

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Michéla Antônia do Nascimento Gusmão**

**CARACTERIZAÇÃO IMUNOLÓGICA DA APIRASE DE BATATA  
E INDUÇÃO DE ANTICORPOS IgE POR EPITOPOS  
COMPARTILHADOS ENTRE AS SmATPDases DE *Schistosoma  
mansoni* E A APIRASE DE *Solanum tuberosum***

JUIZ DE FORA

2017



---

**Programa de Pós - Graduação em Ciências Biológicas  
Imunologia e DIP/Genética e Biotecnologia**

**ICB/UFJF MICHELLIA ANTONIA DO NASCIMENTO GUSMAO 2017**

**ICB/UFJF MICHELLIA ANTONIA DO NASCIMENTO GUSMAO 2017**

**MICHÉLIA ANTÔNIA DO NASCIMENTO GUSMÃO**

**CARACTERIZAÇÃO IMUNOLÓGICA DA APIRASE DE BATATA  
E INDUÇÃO DE ANTICORPOS IgE POR EPITOPOS  
COMPARTILHADOS ENTRE AS SmATPDases DE *Schistosoma  
mansoni* E A APIRASE DE *Solanum tuberosum***

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas como requisito parcial para obtenção do título de Doutor na área de Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Priscila de Faria Pinto**

JUIZ DE FORA

2017

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, Michéla .  
CARACTERIZAÇÃO IMUNOLÓGICA DA APIRASE DE BATATA E INDUÇÃO DE ANTICORPOS IgE POR EPITOPOS COMPARTILHADOS ENTRE AS SmATPDases DE Schistosoma mansoni E A APIRASE DE Solanum tuberosum / Michéla Antônia do Nascimento Gusmão. -- 2017.

104 p.

Orientadora: Priscila de Faria Pinto  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2017.

1. apirase de batata. 2. SmATPDase. 3. IgE. 4. Imunomodulação. 5. Schistosoma mansoni. I. de Faria Pinto, Priscila, orient. II. Título.

**Michéla Antônia do Nascimento Gusmão**

**Caracterização imunológica da apirase de batata e Indução de anticorpos IgE por epitopos compartilhados entre as SmATPDases de *Schistosoma mansoni* e a apirase de batata**

Tese de doutorado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas- Ênfase em Imunologia e DIP da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos parciais para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas (Imunologia).

Banca Examinadora:

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Priscila de Faria Pinto-UFJF**  
**(Orientadora)**

---

**Prof. Dr. Marcos José Marques-UNIFAL**  
**(Membro Externo)**

---

**Prof. Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias-UNIFAL**  
**(Membro Externo)**

---

**Prof. Dr. Olavo dos Santos Pereira Júnior-UFJF**  
**(Membro Interno)**

---

**Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Juciane Maria de Andrade Castro-UFJF**  
**(Membro Interno)**

---

**Prof. Dr. Ivo Santana Caldas-UNIFAL**  
**(Suplente Externo)**

---

**Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Eveline Gomes Vasconcelos-UFJF**  
**(Suplente Interno)**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a:

Deus por abençoar o meu caminho, por ter me dado forças e persistência para seguir em frente e pela saúde que sempre tive para lutar por meus ideais.

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

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal pela concessão da bolsa e apoio financeiro.

A Dr<sup>a</sup> Flávia Fernanda Búbula Couto pela doação dos plasmas e toda a equipe do Dr. Paulo Marcos Zech Coelho do Centro de Pesquisas René Rachou/CPQRR/Fiocruz/BH.

A Dr<sup>a</sup> Angela Maria Gollner pela ajuda na preparação das lâminas histológicas.

Ao professor Dr. Gilson Costa Macedo do Laboratório de Imunologia da UFJF pela ajuda nos experimentos de dosagem de citocinas.

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 e pela compreensão durante toda essa trajetória.

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, consideração, incentivo e a compreensão de minha ausência em vários momentos.

A Eveline por ter me recebido no laboratório tão bem e com muita boa vontade, inicialmente me orientado tanto na parte experimental quanto na vida pessoal, dedicando sua sabedoria e tempo. Uma pessoa com a qual aprendi muito e admiro a dedicação ao trabalho. Peço desculpas pelas falhas cometidas durante esse período.

A Priscila por ser uma orientadora companheira em todo esse período de trabalho e aprendizado, pela paciência em compartilhar comigo o seu conhecimento, pela amizade, consideração e por ser tão solícita com todos nós em qualquer situação. Por ter me acolhido como aluna com tanta dedicação e também peço desculpas pelas falhas cometidas.

A Michelle, um ser humano incrível, por ter me ensinado tanto, desde a Iniciação Científica e em vários experimentos com tanta dedicação e boa vontade, pelas dicas, com quem eu aprendi muito, pela amizade, carinho e consideração.

Aos companheiros de experimentos pela ajuda e aos amigos do laboratório pelos momentos bons e ruins que passamos juntos e pelo aprendizado diário: Nayara, Danielle, Priscila, Luana, Patrícia, Juliane, Lucas Araújo, Laís, Luis Felipe, Michelle, Gabriane, Leonardo, Wagner, Sólon.

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

## RESUMO

A esquistossomose é uma doença tropical negligenciada que acomete milhões de pessoas no mundo. A falta de vacina para essa doença helmíntica impulsiona a busca por moléculas antigênicas oriundas dos parasitos do gênero *Schistosoma*. Dentre as moléculas consideradas como promissoras, se encontra a ATP difosfohidrolase de *Schistosoma mansoni*. O parasito possui duas isoformas de desta enzima que são denominadas SmATPDases e são expressas em todas as fases do ciclo de vida deste helminto. A apirase de batata é uma proteína vegetal pertencente à mesma família de enzimas do parasito, compartilha epitopos com as isoformas de SmATPDases. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização imunológica da apirase de batata em modelo de infecção murina experimental com base nessa homologia protéica. A proteína vegetal foi inoculada em camundongos C57BL/6 que posteriormente foram infectados com cercárias de *S. mansoni*. A proteína vegetal induziu níveis significativos de anticorpos IgG e IgG1 após a imunização, os quais se mantiveram elevados na análise 60 dias após a infecção. A cultura de esplenócitos dos animais imunizados respondeu ao estímulo com a proteína vegetal, induzindo a produção de níveis significativos de IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-5, mas não de IL-13. O processo de imunização não conferiu proteção, sendo incapaz de promover a redução da carga parasitária. O efeito imunomodulador da imunização foi observado através de uma redução da área afetada pela reação granulomatosa hepática nos animais imunizados. Em relação à ligação de anticorpos IgE, a apirase de batata mostrou reatividade significativa com estes anticorpos presentes em amostras do plasma de pacientes com esquistossomose. Em ensaios de *Western blotting*, os anticorpos IgE foram capazes de reconhecer três proteínas presentes no homogeneizado de vermes adultos do helminto, com 91, 63 e 55 kDa. Foi possível inferir que todas as bandas reveladas correspondem a isoformas de SmATPDases com distintos processamentos pós-tradução, tais como glicosilação e proteólise. Comprovando esta reatividade, foi possível verificar que a imunização dos animais (C57BL/6) com a proteína vegetal foi capaz de induzir a produção significativa de anticorpos IgE detectáveis em técnicas de ELISA e *Western*

*blotting*. Como a apirase de batata possui identidade com a NTPDase 1 (CD39) de mamíferos sugerimos que os pacientes possuam anticorpos naturais contra NTPDases envolvidos na manutenção da homeostase do organismo. O conjunto de dados obtidos mostra que a apirase de batata possui um perfil imunoregulatório na esquistossomose, podendo contribuir para a redução da morbidade, induzindo a produção de anticorpos IgE, tidos como protetores na esquistossomose.

Palavras-chave: Apirase de batata, SmATPDase, IgE, Imunomodulação, regulação, *Schistosoma mansoni*.

## ABSTRACT

Schistosomiasis is a neglected tropical disease that affects millions of people around the world. The lack of vaccine for this helminth disease prompts a search for antigenic molecules from the parasites of the genus *Schistosoma*. Among the molecules considered promising are an ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni*. The parasite has two enzyme isoforms which are termed SmATPDases and are expressed in all as life cycle phases of this helminth. The potato apyrase is a plant protein belonging to the same family of parasite enzymes, shared epitopes with SmATPDase isoforms. Thus, the objective of this work was to perform an immunological characterization of potato apyrase in a model of experimental murine infection based on this protein homology. Plant protein was inoculated into C57BL / 6 mice that were infected with *S. mansoni* cercariae. Plant protein induced significant levels of IgG and IgG1 antibodies after immunization, which remained high for analysis 60 days after infection. The splenocytes culture of the immunized animals responded to the stimulus with a plant protein, inducing a significant production of IFN- $\gamma$ , IL-10 and IL-5, but not IL-13. The immunization process did not provide protection, being unable to promote a reduction of the parasitic load. The immunomodulatory effect of immunization was observed through a reduction of the area affected by the hepatic granulomatous reaction in the immunized animals. Concerning the binding of IgE antibodies, potato apyrase showed significant reactivity with these antibodies present in plasma samples from patients with schistosomiasis. In Western blotting assays, IgE antibodies were able to recognize three non-homogenized languages of adult helminth worms at 91, 63 and 55 kDa. It was possible to infer that all the bands revealed correspond to SmATPDase isoforms with various post-translational processing, such as glycosylation and proteolysis. (C57BL / 6) with a plant protein capable of inducing a significant production of IgE antibodies detected in ELISA and Western blotting techniques. As potato apyrase has an identity with a mammalian NTPDase 1 (CD39), we suggest that patients have an antibody against the NTPDases involved in maintaining the body's homeostasis. The obtained data show that the potato harvest has an immunoregulatory profile in schistosomiasis, and may contribute to the reduction

of morbidity, inducing a production of IgE antibodies, considered as protectors in schistosomiasis.

**Key words:** Potato apyrase, SmATPDase, IgE, immunomodulation, regulation, *Schistosoma mansoni*.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Ciclo biológico de <i>Schistosoma mansoni</i> .....	<b>19</b>
<b>Figura 2</b>	Estados do Brasil com infecção por <i>S. mansoni</i> .....	<b>21</b>
<b>Figura 3</b>	Granuloma de <i>S. mansoni</i> na fase aguda.....	<b>25</b>
<b>Figura 4</b>	Opsonização do helminto por IgE e eosinófilos.....	<b>32</b>
<b>Figura 5</b>	Topografia da membrana mostrando as quatro famílias de enzimas...	<b>38</b>
<b>Figura 6</b>	Representação das NTPDases de mamíferos.....	<b>39</b>
<b>Figura 7</b>	Modulação da atividade de Treg pela via CD39/CD73.....	<b>40</b>
<b>Figura 8</b>	Quantificação da produção de anticorpos IgG de camundongos imunizados com a apirase de batata.....	<b>55</b>
<b>Figura 9</b>	Quantificação da produção de anticorpos IgG de camundongos imunizados com a apirase de batata e infectados com <i>S. mansoni</i> .....	<b>56</b>
<b>Figura 10</b>	Perfil de citocinas de camundongos imunizados com a apirase de batata e infectados com <i>Schistosoma mansoni</i> .....	<b>58</b>
<b>Figura 11</b>	Médias das áreas dos granulomas hepáticos de camundongos imunizados com a proteína vegetal (apirase de batata) e infectados com <i>S. mansoni</i> .....	<b>60</b>
<b>Figura 12</b>	Fotomicrografias de lâminas de cortes hepáticos de camundongos C57BL/6 imunizados com apirase de batata e infectados com <i>S. mansoni</i> corados por hematoxilina-eosina.....	<b>61</b>
<b>Figura 13</b>	Célula gigante multinucleada do tipo Células de Langhans.....	<b>63</b>
<b>Figura 14</b>	Fotomicrografias de lâminas de cortes hepáticos de camundongos C57BL/6 imunizados com apirase de batata e infectados com <i>S. mansoni</i> corados por tricrômica de gomori.....	<b>64</b>
<b>Figura 15</b>	Reatividade entre anticorpos IgE de amostras de plasma de pacientes com esquistossomose e apirase de batata por ELISA.....	<b>66</b>
<b>Figura 16</b>	Reatividade de anticorpos IgE de amostras de plasma de camundongos C57BL/6 imunizados com a apirase de batata por ELISA.....	<b>67</b>

- Figura 17** Reatividade da apirase de batata com anticorpos IgE do plasma de pacientes e de camundongos com esquistossomose por *Western blotting*.....**69**
- Figura 18** Reatividade de anticorpos IgE de plasmas de humanos com SmATPDases de *S. mansoni*.....**71**
- Figura 19** Reatividade de anticorpos IgE, IgG e IgM do plasma de pacientes saudáveis e com esquistossomose com NTPDase de macrófagos.....**73**

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Área do granuloma hepático e vermes adultos de *S. mansoni* recuperados do grupo imunizado com apirase de batata, grupo que recebeu somente Adjuvante de Freund e grupo Controle. Todos os grupos foram infectados com cercárias de *S. mansoni* 15 dias após a segunda imunização e sacrificados após 55 dias de infecção.....**60**

**Tabela 2.** Análise semi-quantitativa do número de células gigantes multinucleadas localizadas nas áreas periféricas dos granulomas hepáticos dos camundongos C57BL/6 imunizados com a proteína vegetal (apirase de batata) e infectados com 50 cercárias de *S. mansoni*.....**63**

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

v/v	Volume/volume
°C	graus Celsius
M	Molar
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Pg/mL	Picogramas/mL
m/v	massa/volume
nm	Nanômetro
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	Micromolar
ACRs	Apyrase Conserved Regions (Regiões Conservadas da Apyrase)
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
ACF	Adjuvante Completo de Freund
AIF	Adjuvante Incompleto de Freund
WB	<i>Western blotting</i>
DO	Densidade Ótica
DP	Desvio Padrão
EP	Erro Padrão
ELISA	“Enzyme-linked immunosorbent assay” (Ensaio imunoenzimático ligado a enzima)
<i>g</i>	Força gravitacional
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
IgG	Imunoglobulina da classe G
kDa	Quilo Dalton
IgG1	Imunoglobulina da subclasse 1
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sódio
IgE	Imunoglobulina da classe E
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD	O-phenylenediamine dihydrochloride (Dihidrocloreto de o-fenilenodiamina)

PBS	Phosphate buffered saline (Tampão fosfato salino)
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico
sc	Subcutânea
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Dodecil sulfato de sódio)
SDS- Page	Eletroforese em gel de poli(acrilamida) na presença de dodecil sulfato de sódio
E-NTPDase	Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase
E-NTP	Ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico
NDPase	Nucleosídeo difosfato hidrolase
NTPase	Nucleosídeo trifosfato hidrolase
NTPDase	Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase
Pi	Fosfato inorgânico
SWAP	Soluble Adult Worm Antigens (Antígeno Solúvel de Vermes adultos)
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano

## LISTA DE ANEXOS

- A- Cartas de ética para pesquisa em humanos.
- B- Cartas de ética para pesquisa em animais.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
1.1 <i>Schistosoma mansoni</i> .....	20
1.2 ESQUISTOSSOMOSE.....	21
1.3 O GRANULOMA NA ESQUISTOSSOMOSE.....	24
1.4 DIAGNÓSTICO.....	27
1.5 TRATAMENTO E CONTROLE.....	28
1.6 IMUNOLOGIA DA ESQUISTOSSOMOSE.....	30
1.6.1 O PERFIL DE CITOCINAS NA ESQUISTOSSOMOSE.....	30
1.6.2 RESPOSTA HUMORAL NA ESQUISTOSSOMOSE.....	33
1.6.3 ANTICORPOS NATURAIS ?.....	35
1.7 A FAMÍLIA DAS NTPDases.....	39
<b>2.OBJETIVOS.....</b>	<b>46</b>
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	46
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>48</b>
3.1 PURIFICAÇÃO DA APIRASE DE BATATA.....	48
3.2 IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS C57BL6 COM A APIRASE DE BATATA, DESAFIO COM CERCÁRIAS E QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS POR ELISA.....	48
3.3 AVALIAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA E ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	49
3.4 CULTURA DE ESPLÊNOCITOS PARA ANÁLISE DE CITOCINAS.....	508
3.5 ANÁLISE MORFOMÉTRICA E CONTAGEM DE CÉLULAS.....	50
3.6 OBTENÇÃO DE PLASMA DOS PACIENTES.....	51
3.7 ELISA DE PLASMAS HUMANOS.....	50
3.8 PREPARAÇÃO DOS ANTÍGENOS SOLÚVEIS DO VERME ADULTO (SWAP).....	52
3.9 ATIVIDADE FOSFOHIDROLÍTICA, SEPARAÇÃO E REATIVIDADE DAS ISOFORMAS SmATPDases COM ANTICORPOS IgE.....	53
3.10 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DA FAMÍLIA DAS NTPDASES POR “WESTERN BLOTTING”.....	54
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55
3.12 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....	55
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>56</b>
4.1 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE ANTICORPOS PRODUZIDOS PELA IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS C57BL/6 COM APIRASE DE BATATA E POSTERIORMENTE INFECTADOS COM <i>S. mansoni</i> .....	56
4.1.2 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CITOCINAS INDUZIDOS PELA IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS C57BL/6 COM APIRASE DE BATATA E POSTERIORMENTE INFECTADOS COM <i>S. mansoni</i> .....	59

4.1.3 CONTAGEM DE VERMES RECUPERADOS APÓS INFECÇÃO COM <i>S. mansoni</i> E AVALIAÇÃO DO PERFIL IMUNOMODULATÓRIO DA APIRASE DE BATATA SOBRE GRANULOMAS DE <i>S. mansoni</i> .....	61
4.2 ANÁLISE DAS CÉLULAS GIGANTES MULTINUCLEADAS E DO PERFIL DE FIBRAS COLÁGENAS NOS GRANULOMAS HEPÁTICOS DE CAMUNDONGOS C57BL/6 IMUNIZADOS COM A APIRASE DE BATATA E POSTERIORMENTE INFECTADOS COM O PARASITO.....	64
4.3 REATIVIDADE DA APIRASE DE BATATA COM ANTICORPOS IgE DOS PLASMAS DE PACIENTES COM ESQUISTOSSOMOSE POR ELISA .....	67
4.3.1 INDUÇÃO DE ANTICORPOS IgE PELA APIRASE DE BATATA EM CAMUNDONGOS C57BL/6 .....	69
4.3.2 REATIVIDADE DA APIRASE DE BATATA COM ANTICORPOS IgE DOS PLASMAS DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS OU INFECTADOS COM <i>S. mansoni</i> E DE PACIENTES COM ESQUISTOSSOMOSE POR <i>WESTERN BLOTTING</i> .....	70
4.3.3 IDENTIFICAÇÃO DAS SmATPDases DE <i>S. mansoni</i> POR ANTICORPOS IgE DO PLASMA DE PACIENTES COM ESQUISTOSSOMOSE POR <i>WESTERN BLOTTING</i> .....	72
4.4 REATIVIDADE DE ANTICORPOS IgE DO PLASMA DE PACIENTES SAUDÁVEIS OU DOENTES COM NTPDase DE MACRÓFAGOS POR <i>WESTERN BLOTTING</i> .....	74
5. DISCUSSÃO .....	77
5.1 O PAPEL IMUNOMODULATÓRIO DA APIRASE DE BATATA NA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI .....	77
5.2 A APIRASE DE BATATA E A REATIVIDADE COM ANTICORPOS IgE .....	84
6. CONCLUSÕES .....	92
7. REFERÊNCIAS .....	93

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 *Schistosoma mansoni*

O gênero *Schistosoma* pertence ao filo Platyhelminthes, classe Trematoda e à família Schistosomatidae. Diferente de outros trematódeos, os parasitos desse gênero possuem sexos separados e parasitam os vasos sanguíneos de mamíferos, os quais são seus hospedeiros definitivos. O macho é menor (cerca de 1 cm) que a fêmea (aproximadamente 1,5 cm) e ambos possuem duas ventosas: uma oral, mais anterior, onde se encontra a abertura bucal; e a ventral ou acetábulo. A fêmea tem o tegumento liso e vive albergada no canal ginecóforo do macho que, diferente da fêmea, possui tubérculos em sua superfície e tem cor mais esbranquiçada que a mesma, a qual tende a ser mais escura devido à maior quantidade de sangue no ceco (GRYSEELS, 2006; CARVALHO, COELHO & LENZI, 2008).

O parasito *S. mansoni*, responsável pela doença no Brasil (CHITSULO, 2000), possui ciclo de vida complexo (**FIGURA 1**) que envolve dois hospedeiros: o molusco do gênero *Biomphalaria* como hospedeiro intermediário e vertebrados como hospedeiros definitivos (ROSS, 2002; ROSS, 2007). A fêmea de *S. mansoni* produz centenas de ovos por dia (GRYSEELS, 2012), contudo, a maioria dos trabalhos aponta para números entre 150 e 300 ovos por dia (CARVALHO, COELHO & LENZI, 2008). Os ovos possuem uma larva ciliada, o miracídio, que secreta enzimas as quais auxiliam na migração dos ovos nos vasos sanguíneos até o lúmen intestinal. Nesta jornada, muitos ovos ficam presos nos tecidos, principalmente no fígado, mas cerca de um terço é excretado nas fezes. Em condições ideais, ao entrar em contato com a água, o miracídio eclode e penetra em moluscos do gênero *Biomphalaria*. Posteriormente, os miracídios se transformam, por reprodução assexuada, em esporocistos primários e posteriormente, em secundários, os quais sofrem profundas modificações anatômicas passando pelo processo de formação cercariana. Um único miracídio pode gerar cerca de 300 mil cercárias (CARVALHO, COELHO & LENZI, 2008; GRYSEELS, 2012). Em contato com o hospedeiro humano, as cercárias penetram através da pele, perdem a cauda e se transformam em esquistossômulos que migram para o coração, pulmões, fígado e veia porta (GRYSEELS, 2006). Na veia porta, ocorre o acasalamento e maturação dos vermes que migram para os vasos

mesentéricos, onde ocorre a oviposição, iniciando o ciclo novamente (GRYSEELS, 2006).

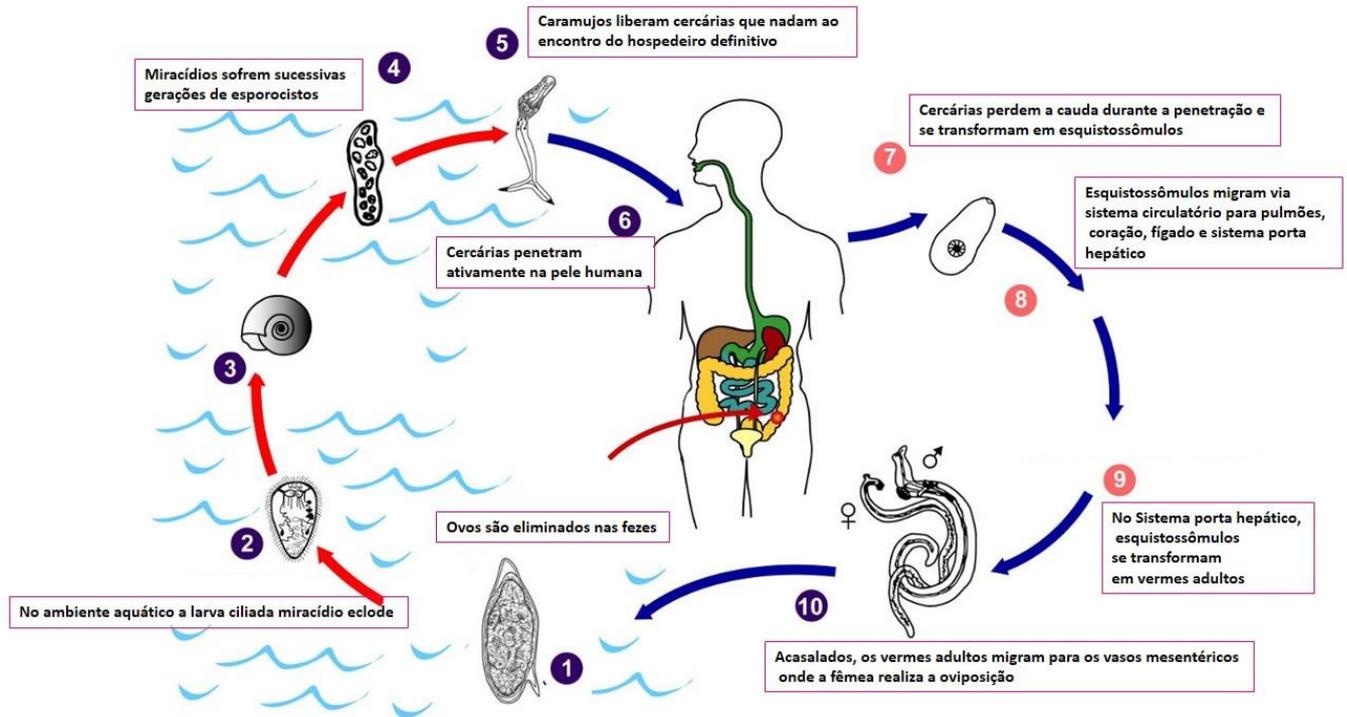


Figura 1. Ciclo Biológico de *Schistosoma mansoni*. Adaptado de <http://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.html>

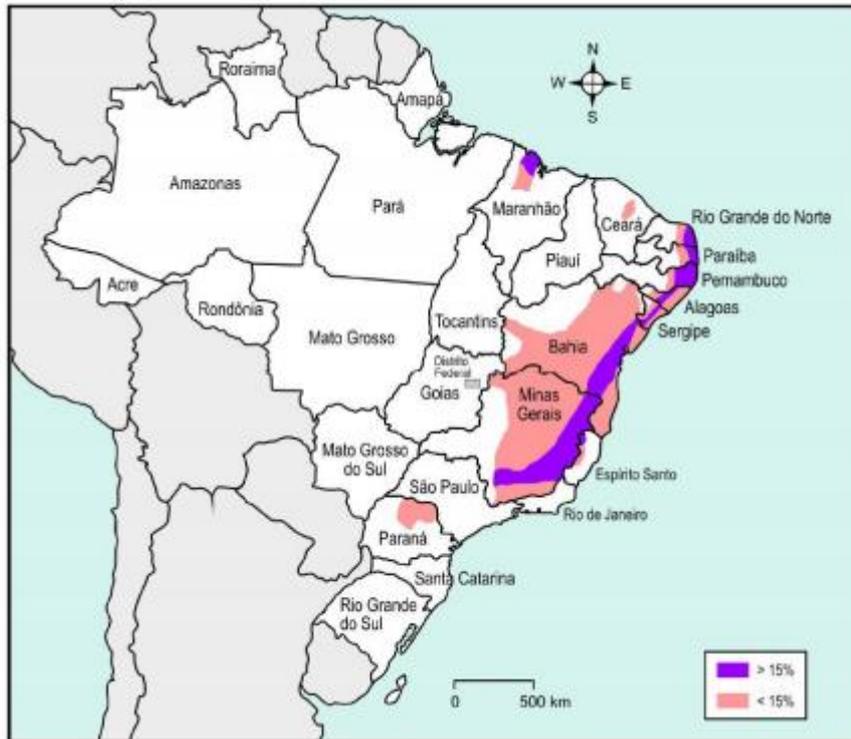
## 1.2 ESQUISTOSSOMOSE

Existem seis espécies de *Schistosoma* que podem infectar os humanos: *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. mekongi*, *S. haematobium*, *S. intercalatum* e *S. malayensis*. As infecções por *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. mekongi* e *S. intercalatum* estão associadas com a doença crônica do fígado e intestino, enquanto que infecções crônicas por *S. haematobium* podem levar à fibrose e calcificação do trato urinário (CARVALHO, COELHO & LENZI, 2008). A maioria das infecções por *S. haematobium*, *S. mansoni* e *S. intercalatum* é encontrada na África Subsaariana. A infecção por *S. japonicum* ocorre na China, Indonésia e Filipinas apesar de amplas e substanciais medidas de controle. *S. mekongi* é encontrado no Camboja e Laos e ao longo do Rio Mekong. No caso de *S. malayensis*, essa espécie ocorre na Ásia (LESHEM et al.,

2009) e o *S. mansoni* ocorre em algumas partes do Brasil, Suriname, Venezuela e Caribe (ROSS, 2002; <http://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/epi.html>).

A esquistossomose é uma das doenças tropicais negligenciadas, além disso, é considerada a mais importante das doenças helmínticas em termos de morbidade e mortalidade (JURBERG, 2015). Recentemente, um trabalho avaliou, por meio de uma revisão sistemática, os trabalhos publicados sobre a prevalência e intensidade da esquistossomose mansoni na América Latina e em países do Caribe de 1942-2014. Neste trabalho, foi observado que apenas o Brasil publicou estudos após 2001, mostrando “hot spots” de alta prevalência. Para que os programas de controle sejam direcionados no sentido de eliminação e/ou transmissão da doença a curto prazo, é necessária a atualização da situação epidemiológica da esquistossomose (ZONI, CATALÁ & AUTI, 2016).

Em nosso país, a transmissão da doença ocorre em uma área endêmica que vai desde o Maranhão, até Espírito Santo e Minas Gerais (**FIGURA 2**). Cerca de 30 milhões de pessoas são expostas ao risco de contrair a esquistossomose, sendo a região Nordeste do país a área mais endêmica (LAMBERTUCCI, 2010; SOUZA et al., 2012; ROKNI, 2012; ZONI, CATALÁ & AUTI, 2016). Em Minas Gerais, 61% dos municípios tem relatado transmissão da infecção com mais de 10 milhões de pessoas vivendo em áreas endêmicas, entretanto a maioria dos estudos tem focado em áreas de alta endemicidade. Couto e cols. (2014) observaram que dentre as helmintíases encontradas, a esquistossomose foi a doença mais frequente, apesar de baixa prevalência, na Zona da Mata Mineira (Minas Gerais).



**Figura 2.** Estados do Brasil com infecção por *S. mansoni*. Extraído de Rokni, 2012.

A esquistossomose pode se apresentar no homem sob uma forma aguda e duas formas crônicas. Uma forma crônica é a hepatointestinal, é leve, geralmente assintomática e atinge a maioria dos indivíduos de área endêmica. A outra, é classificada como forma hepatoesplênica, é rara e se manifesta geralmente com hepatoesplenomegalia e outros sinais de hipertensão portal. A doença é caracterizada, em sua forma aguda, pela presença de numerosos granulomas periovulares que se desenvolvem principalmente no fígado. Esses granulomas possuem muitos eosinófilos, periferia pouco delimitada e frequente necrose central. As manifestações clínicas são caracterizadas por prostração, febre e eosinofilia, que podem surgir alguns dias após a exposição cercariana ou após cerca de um mês, período coincidente com o início da eliminação dos ovos nas fezes, o que pode provocar dores abdominais e diarreia mucosanguinolenta (CARVALHO, COELHO & LENZI, 2008).

A forma crônica habitual ou leve é a que se encontra na maioria das pessoas infectadas nas áreas endêmicas, as quais eliminam ovos viáveis nas fezes, mas assintomáticas ou com queixas vagas, inespecíficas. O intestino é geralmente pouco lesado nos casos de esquistossomose mansoni no Brasil, mas o fígado está sempre comprometido. Neste órgão são vistos granulomas periovulares isolados em várias fases de evolução para a cicatrização. Já a forma grave da esquistossomose é caracterizada morfológicamente pela fibrose hepática periportal. É uma lesão representada por expansão fibrosa dos espaços porta, acompanhada de lesões destrutivas e que podem conduzir à hipertensão portal (CARVALHO, COELHO & LENZI, 2008).

### 1.3 O GRANULOMA NA ESQUISTOSSOMOSE

O granuloma (**FIGURA 3**) na esquistossomose é uma reação inflamatória focal, caracterizada por células mononucleares fagocíticas e outros tipos celulares que estão de forma compacta e organizada em torno dos ovos do parasito (LENZI et al., 1998). Na fase aguda da doença, o tamanho do granuloma é determinado pelas células T, é sensível à IL-10 com poucos efeitos da resposta de anticorpos, já na fase crônica, a regulação do tamanho depende da resposta de anticorpos e das células T (LENZI et al., 1999). O granuloma de *S. mansoni* foi classificado em 2 estágios que se subdividem em outros estágios (LENZI et al., 1998):

I) Estágio pré-granulomatoso:

- Fracamente/inicialmente reativo (após 30 dias de infecção);
- Exsudativo (após 35 dias após a infecção).

II) Estágio granulomatoso:

- Exsudativo-produtivo (de 40 a 70 dias após a infecção);
- Produtivo (de 70 a 90 dias após a infecção);
- Involutivo (inicia aos 90 dias após a infecção).

No estágio pré-granulomatoso há o acúmulo gradual de células ao redor do ovo por meio da destruição focal das paredes vasculares envolvidas e do parênquima adjacente. O estágio granulomatoso tem início com o surgimento de histiócitos e células epitelióides que substituem a zona leucocitária. Posteriormente, o ovo se degenera e se desintegra, tornando-se mais proeminentes as fibras colágenas e o

granuloma passa para a fase involutiva, tornando-se reduzidos em tamanho com hialuronização das fibras colágenas.

Os granulomas de *S. mansoni* são compostos principalmente de eosinófilos, linfócitos e macrófagos, com a proporção de células variando nos diferentes órgãos (CHEEVER et al., 2002). Dessas células que compõem o granuloma, cerca de 50% são eosinófilos, os quais secretam proteínas que podem romper e matar esquistossômulos (LINS et al., 2008). Além disso, algumas evidências tem mostrado um papel imunoregulatório dessas células na resposta imune inata e adaptativa, por exemplo, na apresentação de antígenos e regulação e polarização das células T (AKUTHOTA et al., 2008).

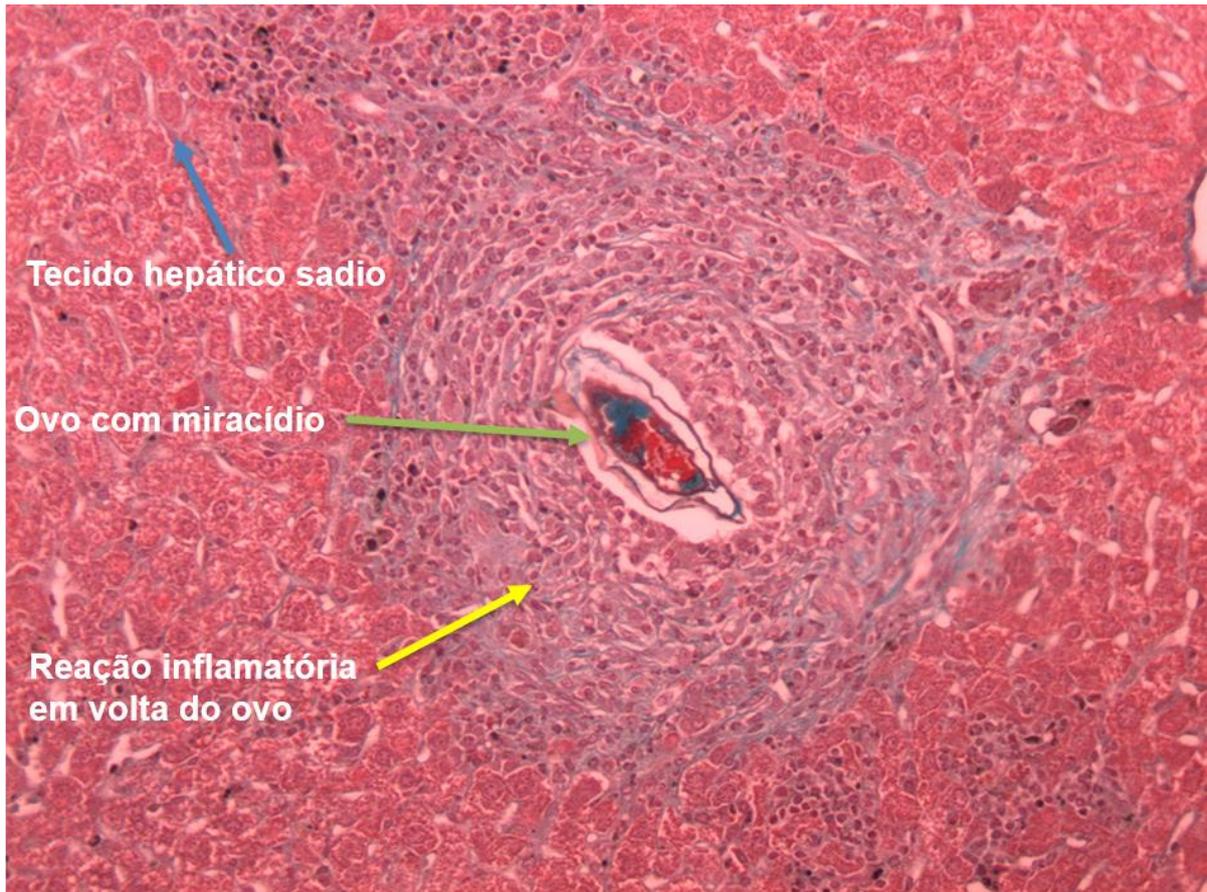
A resposta granulomatosa é inicialmente orquestrada por células TCD4<sup>+</sup> mas células TCD8<sup>+</sup>, células B e macrófagos tem sido mostrados com um papel na regulação da formação do granuloma que é o principal responsável pela patologia na esquistossomose. Entretanto, é uma forma de proteção do hospedeiro, já que sem um granuloma intacto funcional ocorre, por exemplo, dano microvesicular nos hepatócitos. Isso pode ser observado em camundongos infectados por *S. mansoni* com células TCD4<sup>+</sup> depletadas, os quais desenvolveram a doença na forma aguda fatal, com animais morrendo 4-6 semanas após a infecção, coincidindo com o período de deposição dos ovos no tecido (HAMS, AVIELLO & FALLON, 2013).

Em relação aos macrófagos, os mesmos podem ser classificados em dois principais subgrupos: os classicamente ativados, que são induzidos por citocinas inflamatórias como IFN- $\gamma$  e IL-12, e os alternativamente ativados que são típicos de um ambiente marcado por citocinas como IL-4, IL-13 e IL-21. No granuloma, essas células podem ter um papel duplo: auxiliar no sequestro dos antígenos liberados pelo ovo no início da resposta inflamatória e mais tarde possuem um caráter anti-inflamatório, na fase crônica, suprimindo indiretamente a função de outras células e diminuindo o volume do granuloma (WILSON et al., 2012).

Durante a evolução do processo granulomatoso, os macrófagos tornam-se maduros, grandes e normalmente descritos como macrófagos epitelióides por sua semelhança à células epiteliais. Essas células epitelióides podem se fundir formando células gigantes multinucleadas (REISNER, 2015). Enquanto as células epitelióides são não fagocíticas mas secretórias, as células gigantes retêm a sua capacidade fagocíticas e também produzem e secretam citocinas (HERNANDEZ-PANDO et al., 2000; BOROS & REVANKAR, 2010).

Já foram descritos alguns estímulos para a formação de células gigantes multinucleadas, como algumas citocinas. Foi mostrado que a IL-4 é requerida para a formação dessas células, *in vitro*, *in vivo* e na esquistossomose. Além dessa citocina e de estímulos quimiotáticos, a IL-13 e o IFN- $\gamma$  também favorecem a fusão dos macrófagos (HELMING & GORDON, 2007).

A fase produtiva do granuloma, segunda fase do estágio granulomatoso, corresponde ao início da formação de fibras e ocorre após a absorção e fagocitose dos restos celulares resultantes da necrose dos hepatócitos (LINS et al., 2008). A arquitetura tridimensional do granuloma mostra fibras de matriz extracelular arranjadas num padrão de malha, que ocorre no estágio granulomatoso exsudativo produtivo, e posteriormente, evolui para um arranjo final concêntrico e compacto no estágio produtivo (~70 dias de infecção). Esses dois arranjos de fibras correspondem a diferentes tipos de colágeno que aparecem na evolução do granuloma: colágeno tipo III, contendo fibras reticulares, que é posteriormente substituído por colágeno tipo I contendo fibras colágenas (LENZI et al., 1998).



**Figura 3. Granuloma de *S. mansoni* na fase aguda.** Corte histológico de fígado de camundongos C57BL/6 após 55 dias de infecção com *S. mansoni* evidenciando a área do granuloma na fase aguda da doença. A seta azul mostra o tecido hepático sadio, a seta verde evidencia o ovo do parasito e a seta amarela mostra a reação inflamatória em torno do ovo que gera a reação granulomatosa (H&E, 100X). Arquivo Pessoal.

#### 1.4 DIAGNÓSTICO

Os métodos de diagnóstico da esquistossomose podem ser agrupados em duas categorias: os diretos, que detectam o parasito ou suas partes, e os indiretos que identificam evidências indiretas do parasito. O diagnóstico da infecção por *S. mansoni* por meio de métodos parasitológicos se baseia na observação microscópica dos ovos do parasito nas fezes devido ao baixo custo operacional e sua praticidade em casos de infra-estrutura laboratorial precária (CARVALHO, COELHO & LENZI, 2008).

O diagnóstico direto mais utilizado é o parasitológico de fezes, feito pelo método de Kato-Katz que é recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) por que associa o melhor custo-benefício à maior praticidade. Esse método permite a visualização e contagem dos ovos por grama de fezes. Entretanto, 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, em áreas de baixa endemicidade e nos casos de avaliação pós-tratamento (FERRARI, 2003; CARVALHO, COELHO & LENZI, 2008; ZHAO, 2012).

Novos métodos de diagnóstico têm sido propostos uma vez que os métodos clássicos de diagnóstico falham em detectar a infecção quando o número de ovos eliminados é baixo. Teixeira e colaboradores (2007) desenvolveram um método altamente sensível, o Helmintex, para identificar ovos de *S. mansoni* em maiores quantidades de fezes. Esse método envolve a separação de ovos por meio de beads paramagnéticos. Outro método desenvolvido por Jurberg (2008) consiste em um dispositivo de incubação para a detecção do miracídio. Esses métodos são muito sensíveis mas necessitam de fezes frescas, entretanto, a suspensão dos miracídios pode ser examinada por até 15 dias após fixação. Mais recentemente, foi descrita uma nova técnica diagnóstica baseada na sedimentação diferencial dos ovos quando sujeitos a um fluxo lento e contínuo de uma solução salina a 3%. Esse método é sensível, rápido e de fácil execução, mas pesquisas adicionais estão em andamento para utilizá-lo em grandes populações (COELHO et al., 2009).

Existem uma variedade de métodos imunológicos para diagnóstico da esquistossomose, dentre eles, os mais utilizados são ELISA, COPT (Teste de precipitação Circumoval), IHAT (Teste de Hemaglutinação Indireta) e IFT (Teste de Imunofluorescência Indireta). Entretanto, alguns têm um valor limitado devido a reações cruzadas com outras helmintíases, não detectam a intensidade da infecção, não diferenciam infecções anteriores das recentes e podem permanecer positivos durante anos após a cura quimioterápica. Na forma aguda da esquistossomose, para complementar o exame clínico, a ultrassonografia abdominal pode ser útil na visualização de aumento inespecífico do fígado e do baço, além da presença de linfadenomegalia peripancreática e periportal (CARVALHO, COELHO & LENZI, 2008; GOMES, 2014).

## 1.5 TRATAMENTO E CONTROLE

Na busca por novos fármacos para a terapêutica da esquistossomose, deve-se considerar aquelas que poderão prevenir a infecção, as que irão agir nas formas jovens do verme; drogas supressoras que interrompam a postura das fêmeas, visto

que o ovo é o principal agente patogênico, além de interromper a transmissão da doença; e drogas curativas que matam os vermes adultos (CARVALHO, COELHO & LENZI, 2008).

O praziquantel é a farmacoterapia chave utilizada para tratar a esquistossomose pois é um fármaco efetivo que pode ser utilizado para todas as espécies de *Schistosoma* que infectam humanos (CHAN, 2013). Possui baixo custo e alta taxa de cura (ESMAT et al., 2009). Para tentar resolver o problema da baixa susceptibilidade dos estágios imaturos do parasito à droga, pode-se administrar uma segunda dose após 15 dias (CIOLI et al., 2014). Os efeitos colaterais são leves, não existindo evidências de que provoque lesões tóxicas graves no fígado ou outros órgãos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Várias drogas com potencial anti-helmíntico têm como alvo os canais iônicos, dada a importância desses canais para a biologia do parasito. Estudos iniciais sobre a atuação do praziquantel em esquistossomos mostraram que além de causar modificações na superfície do verme adulto expondo vários antígenos do parasito ao sistema imune do hospedeiro, essa droga causa contração e paralisia muscular dos vermes adultos, acompanhada de rápida captação de cálcio do meio externo (ARAGON, 2009; CHAN et al., 2013; CIOLI et al., 2014).

Atualmente, o controle da doença é principalmente baseado no tratamento de indivíduos infectados com o fármaco citado, entretanto o praziquantel não previne a reinfecção, além da possibilidade de resistência à droga (CARDOSO et al., 2006; GAZE et al., 2014). A melhor estratégia, a longo prazo, para controlar a esquistossomose, seria a imunização por meio de uma vacina (CARDOSO et al., 2006).

Novos antígenos de *Schistosoma* têm sido descobertos graças aos avanços na biologia molecular do parasito, genoma, transcriptoma e proteoma do tegumento. Os principais alvos candidatos a vacina são produtos do sistema excretor e secretor, bem como moléculas da superfície do verme. Esses são moléculas que interagem diretamente com o sistema imune do hospedeiro (RICCIARDI & NDAO, 2015).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (BETHONY et al., 2011), um possível candidato a vacina deve oferecer uma proteção acima de 40%. De acordo com estudos de imunização com cercárias irradiadas em modelos animais, esta estratégia pode oferecer uma taxa de 60 a 70% de proteção (RICCIARDI & NDAO, 2015).

Um antígeno recombinante de Glutathione-S-transferase (GST), clonado de *S. haematobium*, foi o primeiro antígeno de *Schistosoma* a participar de ensaios clínicos. A vacina contendo esse antígeno é chamada Bilhvax, formulada com o adjuvante hidróxido de alumínio. Em estudos pré-clínicos, a mesma inibiu significativamente a fecundidade da fêmea e a viabilidade dos ovos (CAPRON et al., 2001). Um recente ensaio clínico de Fase 1 em homens Caucásianos saudáveis usando esse antígeno mostrou níveis elevados de anticorpos GST-neutralizantes, bem como níveis significativos de citocinas IL-5 e IL-13 detectados 21 dias após a segunda dose da vacina GST. Embora anticorpos IgE sejam conhecidos como protetores na esquistossomose, nenhum anticorpo dessa classe anti-GST foi gerado nesses indivíduos (RIVEAU et al., 2012).

O segundo antígeno aplicado em ensaios clínicos, também promissor como candidato a vacina, foi o Sm14, uma proteína ligadora de ácidos graxos. Em camundongos, a proteína recombinante gerou níveis de proteção de 67% contra o desafio com *S. mansoni*. Em humanos, houve uma indução de anticorpos IgG e de células TCD4<sup>+</sup> produtoras de IFN-gama e IL-2 quando esse antígeno recombinante formulado com glicopiranosil lipídio A em uma emulsão óleo em água (rSm14/GLA-SE) foi administrado em 20 homens saudáveis de uma área não endêmica para esquistossomose em três doses com intervalo de 30 dias (SANTINI-OLIVEIRA et al., 2016).

Além dos antígenos citados, existem outros promissores como candidatos a vacina, entretanto, estão em testes pré-clínicos mas tem potencial para entrarem em ensaios clínicos em um futuro próximo (RICCIARDI & NDAO, 2015).

## **1.6 IMUNOLOGIA DA ESQUISTOSSOMOSE**

### **1.6.1 O PERFIL DE CITOCINAS NA ESQUISTOSSOMOSE**

O sistema imune de hospedeiros infectados responde aos vários estágios do ciclo de *Schistosoma*, inicialmente à penetração da cercária, migração dos esquistossômulos, vermes adultos e aos ovos aprisionados no tecido. Todos esses estágios possuem vários antígenos que estimulam uma forte resposta imune humoral e celular (COLLEY et al., 2014).

Durante os estágios iniciais da infecção em camundongos, nas primeiras 4-6 semanas, há uma resposta imune predominante do tipo Th1, dirigida principalmente aos antígenos dos esquistossômulos e vermes adultos imaturos. Essa resposta é caracterizada pelo aumento de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . O IFN- $\gamma$  contribui para a formação do granuloma e a ausência de receptores para esta citocina em animais foi responsável pela formação de granulomas de tamanho reduzido, que avançam mais rapidamente para a fase crônica, sugerindo um término prematuro da fase inflamatória (REZENDE et al., 1997).

Por volta da sexta semana de infecção, quando se inicia a oviposição, esse perfil sofre uma mudança para uma resposta imune predominantemente do tipo Th2, com secreção de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. A partir da oviposição tem início a formação do granuloma esquistossomótico que é principalmente causada pelos ovos do parasito que ficam aprisionados nos órgãos do hospedeiro, como intestino e fígado. Esses ovos secretam antígenos como o  $\omega$ 1 e IPSE/alfa 1 os quais são liberados em maior abundância, sendo que o primeiro direciona as células dendríticas para uma resposta Th2 e IPSE/alfa 1 induz a liberação de IL-4 e IL-13 dos basófilos (PEARCE et al., 2002; BURKE et al., 2009; SCHRAMM, et al., 2010).

A resposta Th2 e o pico de formação do granuloma ocorre entre 8 e 10 semanas após a infecção. Essa resposta Th2 começa a diminuir com a progressão para a fibrose crônica (BURKE et al., 2009; WYNN et al., 2015). A depleção dessa resposta, particularmente da IL-4, causa dano tecidual e morte do hospedeiro devido a uma forte resposta Th1 pró-inflamatória. Dessa forma, a resposta Th2 desempenha um papel protetor para o hospedeiro, regulando a intensidade da reação inflamatória granulomatosa causada pelos ovos do parasito (COLLEY et al., 2014).

A citocina IL-4 é responsável por determinar o tamanho do granuloma induzindo a proliferação de linfócitos produtores de citocinas Th2, essa citocina também é importante para a produção de IL-5 e IL-13 pelas células associadas ao granuloma, aumentando o efeito da IL-13 sobre a fibrogênese (BURKE et al., 2009). A citocina IL-13, associada à IL-4, induz a expressão de arginase em macrófagos, a qual usa L-arginina como substrato para fazer L-ornitina que é convertida em prolina, aminoácido essencial para a produção de colágeno e desenvolvimento da fibrose (PEARCE et al., 2002). Adicionalmente, estas citocinas de perfil Th2, como IL-4 e IL-5, podem ser associadas com a resistência uma vez que as mesmas controlam a produção de IgE

e eosinófilos, respectivamente, os quais foram relacionados com resistência à reinfeção (KHALIFE et al., 2000).

Embora inicialmente ocorra uma resposta Th1 na esquistossomose, existem razões para suspeitar que a resposta aos vermes do parasito durante a infecção prepatente seja mais complexa uma vez que há eosinofilia e o aumento da eosinopoiese durante as primeiras semanas de infecção, resposta mediada tipicamente por IL-5, uma citocina Th2 (FRAGA et al., 2010). Os eosinófilos são as células mais abundantes nos granulomas induzidos por *S. mansoni* (REIMAN et al., 2006), produzem também citocinas Th2 como a IL-13 (BURKE et al., 2009). Além da IL-5, a sobrevivência dos eosinófilos nos tecidos pode ser aumentada por IL-3, GM-CSF, IL-33 e IFN- $\gamma$  (STONE et al., 2010).

Entre 7 e 8 semanas de infecção, células Treg FOXP3<sup>+</sup> e IL-10 são detectáveis, além de começar a proliferar células B CD5<sup>+</sup> FasL<sup>+</sup> esplênicas (LUNDY & LUKCASS, 2013). Nesse aspecto regulatório, tem sido descrita a presença de células Treg naturais e induzíveis. As primeiras têm uma expansão significativa após 4 semanas de infecção. Na infecção por *Schistosoma* essas células têm várias funções como a supressão da ativação de células dendríticas, orquestração da resposta Th2 e regulação da mesma no desenvolvimento do granuloma e fibrose (WILSON et al., 2009). Esse papel regulatório das células Treg ocorre por mecanismos dependentes de IL-10 e/ou TGF- $\beta$  sendo que a citocina IL-10 possui um papel regulatório, facilitando a mudança do perfil Th1 para Th2 (MBOW et al., 2013).

Na esquistossomose murina, tem sido mostrado que a IL-10 suprime a ativação de macrófagos e células dendríticas prevenindo o desenvolvimento da patologia severa devido a uma resposta excessiva Th1 ou Th2 e evita uma potencial inflamação deletéria no tecido (BURKE et al., 2009; DEWALS, 2010). Camundongos tratados com anticorpos monoclonais anti-IL-10R e anti-TGF- $\beta$  tiveram aumento de mortalidade e da citocina IL-17, o que reforça a hipótese de que o balanço das células Th17 e Tregs pode ser crítico para o resultado clínico da doença em humanos (MBOW et al., 2013). Na presença de TGF- $\beta$  e IL-6, as células Th se diferenciam em Th17, sugerindo assim uma relação recíproca entre Treg e Th17, uma vez que a manipulação dessa via gera elevação dos níveis de células Treg ou Th17, podendo promover um aumento da inflamação no tecido (OZDEMIR, 2009).

As células Th17 não parecem estar envolvidas na patogênese da esquistossomose em camundongos com moderada patologia e têm sido associadas

ao desenvolvimento de uma patologia severa em camundongos CBA/J com resposta polarizada Th1 que desenvolvem uma forte resposta inflamatória com altos níveis de IFN- $\gamma$  (BURKE et al., 2009).

Além das células Treg, estudos em camundongos têm mostrado que células B produtoras de IL-10 podem regular negativamente a resposta imune por meio de mecanismos dependentes de anticorpos e da produção de citocinas regulatórias (BOUAZIZ et al., 2012). Tem sido mostrado que as células B tem um papel regulatório na infecção por *S. mansoni*, uma vez que camundongos infectados com o parasito e deficientes em células B apresentaram uma redução da sobrevivência durante a fase crônica da infecção (MANGAN et al., 2004; LUNDY & LUKCAS, 2013). Além disso, foi mostrado que há intenso recrutamento de células B1CD5<sup>+</sup> na cavidade peritoneal durante as primeiras 5 semanas de infecção. Assim, os estudos com essas células regulatórias mostram que tanto células Breg quanto Treg com propriedades anti-inflamatórias contribuem para controlar ambas as respostas imunes, inata e adaptativa, principalmente em infecções crônicas (MAJLESSI et al., 2008).

### 1.6.2 RESPOSTA HUMORAL NA ESQUISTOSSOMOSE

O processo envolvido na resposta imune contra *Schistosoma* é complexo devido à variação antigênica durante o ciclo de vida e aos mecanismos pelos quais o parasito evade do sistema imune do hospedeiro (ZHANG et al., 2006). Na infecção por *S. mansoni*, a expressão de proteínas em todo o ciclo de vida do parasito e sua localização em tecidos específicos pode ser muito importante para determinar os níveis de exposição de uma proteína ao sistema imune e a resposta de anticorpos correspondentes (FARNELL et al., 2015).

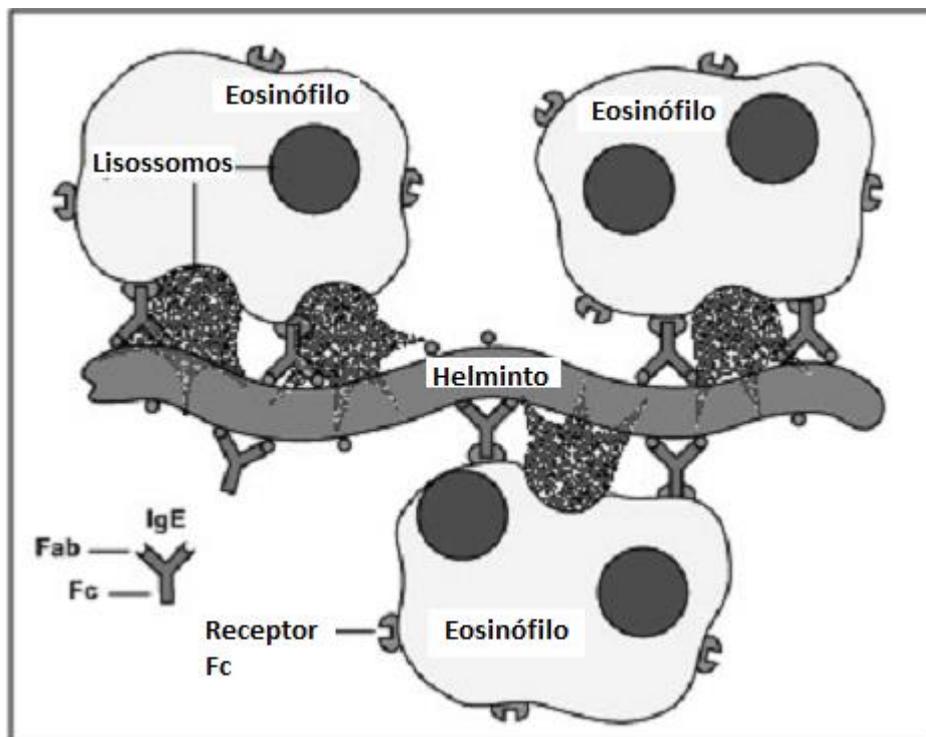
Durante a infecção natural por *S. mansoni*, após a ovoposição, a resposta imune muda de um perfil Th1 para Th2 ocorrendo um aumento nos níveis de IgE e do número de eosinófilos circulantes refletindo a produção de IL-4 e IL-5 que marcam a mudança para o perfil Th2 (ZHANG et al., 2006).

Vários estudos em modelos experimentais sobre os mecanismos efetores dirigidos contra *S. mansoni* demonstraram que os anticorpos são citotóxicos para os esquistossômulos na presença de células efetoras, como eosinófilos, macrófagos e plaquetas. Na esquistossomose humana, IgG1, IgG3 e IgE têm sido apontados como

os anticorpos diretamente envolvidos nos mecanismos efetores (KHALIFE et al., 2000).

Em relação à IgE, há uma correlação positiva entre resistência à reinfecção e a resposta específica dessa imunoglobulina observada em vários estudos epidemiológicos. Os anticorpos dessa classe podem se ligar diretamente nos eosinófilos pela ligação aos receptores Fc $\epsilon$ RI que pode mediar a citotoxicidade dependente de eosinófilos específica contra esquistossômulos pela liberação da peroxidase eosinofílica (**FIGURA 4**) (ZHANG et al., 2006). Além do receptor Fc $\epsilon$ RI para IgE, os eosinófilos têm receptores para IgG (Fc $\gamma$ RII/CD32) e IgA (Fc $\alpha$ RI/CD89), dentre outros (STONE et al., 2010).

Além dos eosinófilos, mastócitos e basófilos também possuem receptores Fc $\epsilon$ RI para IgE que ao se ligar de forma cruzada ao antígeno e ao receptor desencadeia a liberação de mediadores inflamatórios como histamina por mastócitos e citocinas IL-4 e IL-13 por basófilos (KNOL et al., 2006; STONE et al., 2010).



**Figura 4. Opsonização do helminto por IgE e eosinófilos.** Adaptado de Zhang e Mutapi, 2006).

Em relação ao anticorpo IgG4, o mesmo tem sido associado ao aumento da susceptibilidade à reinfecção, uma vez que essa imunoglobulina inibe a citotoxicidade dependente de IgG1 e IgG3 e promove uma competição por antígenos com anticorpos IgE (KHALIFE et al., 2000).

Em camundongos, complexos imunes de IgG podem mediar a liberação de mediadores pelos mastócitos via receptor FcγRIII assim como por meio do receptor FcεRI (receptor de alta afinidade para IgE) em camundongos deficientes em IgE. Assim, quando anticorpos IgG específicos para o alérgeno são administrados ou induzidos em modelo murino, poderá resultar em um resultado falso positivo. Quando alérgenos são pré-incubados com IgG e IgE específicos, IgG também pode se ligar a esses antígenos e diminuir a subsequente ativação de mastócitos/basófilos com os alérgenos pré-incubados (KNOL, 2006).

Dessa forma, o lento desenvolvimento de imunidade adquirida pode ser devido ao bloqueio de receptores de IgE pelo excesso de anticorpos IgG4 anti-Schistosoma e possivelmente a outras imunoglobulinas nos primeiros anos da infecção (COLLEY et al., 2014).

A concentração de IgE no plasma é a mais baixa de todas as imunoglobulinas, tem meia vida de ~2 dias, sendo sua expressão altamente controlada na ausência de doença. Ao longo da infância, na ausência de doença, os níveis dessa imunoglobulina aumentam e têm um pico aos 10-15 anos de idade e, posteriormente, diminuem durante a vida adulta, sendo seus níveis influenciados pela genética, raça, status imune e fatores ambientais (STONE et al., 2010).

Além da idade, na esquistossomose, o perfil de anticorpos também é influenciado pela área, sexo e intensidade da infecção. Em relação aos anticorpos IgE, a maioria dos estudos que associam essa imunoglobulina à imunidade contra o parasito são epidemiológicos (FITZSIMONS, FALCONE & DUNNE, 2014). No estudo de Mutapi e colaboradores (1997), pessoas de área endêmica com elevada taxa de infecção produziram mais IgE anti-SEA (antígenos solúveis de ovos) e a reatividade dos anticorpos IgE contra os antígenos de vermes adultos aumentou com a idade em ambas regiões, de alta e baixa intensidade de infecção. A regulação de IgE também depende da extensão e duração da exposição do indivíduo a determinadas proteínas *allergen-like* do parasito (PINOT DE MOIRA, 2013).

Em *S. mansoni* existem algumas proteínas descritas que induzem anticorpos IgE como a IPSE/alpha 1 (SCHRAMM et al., 2007), proteína secretada pelos ovos do

parasito e uma proteína de 22,6 kDa (DUNNE et al., 1997) presente no tegumento dos vermes adultos. Além destas, existem outras do parasito que são apresentadas como proteínas *allergen-like*, ou seja, proteínas do helminto que contem estruturas similares aos principais alérgenos ambientais conhecidos (FARNELL et al., 2015).

A resposta de IgE para a proteína SmTAL2 (*allergen-like*) do tegumento de *S. mansoni*, expressa em todo o ciclo de vida do parasito, foi mais baixa nos pacientes residentes mais antigos de uma área endêmica do Quênia e significativamente maior em imigrantes recentes da mesma área (PINOT DE MOIRA, 2013).

Helmintos e alergia induzem uma forte resposta Th2 com *switching* para a produção de IgE e acredita-se que esse perfil de resposta, juntamente com IgE, tenha evoluído para controlar parasitos extracelulares. Há um aumento nas evidências de que a forte resposta Th2 de indivíduos atópicos é suprimida por certas infecções helmínticas (FITZSIMMONS et al., 2009). Nesse sentido, tem sido discutida a “hipótese da higiene”, um conceito sugestivo de que a exposição a produtos microbianos nas fases iniciais da vida induz uma modulação imunológica de forma a diminuir processos inflamatórios no hospedeiro (SANTIAGO & NUTMAN, 2016). Dessa forma, essa hipótese propõe que a incidência de doenças alérgicas e autoimunes em países industrializados é consequência da melhoria nas condições sanitárias (KEARNEY et al., 2014).

Algumas hipóteses são propostas para explicar a supressão da resposta Th2 de indivíduos atópicos infectados por helmintos: a produção de citocinas regulatórias como a IL-10 e TGF- $\beta$  por helmintos como *Schistosoma*, a competição por IgE policlinal induzida pelo helminto e IgE específica para aeroalérgenos pelos receptores presentes na superfície de mastócitos, inibição da síntese de IgE específica para aeroalérgenos pelos altos níveis de IgE policlinal e altas concentrações de IgG4 (anticorpo bloqueador) que pode competir com IgE pela ligação ao alérgeno (FIGUEIREDO, 2004; FLOHR et al., 2009; SANTIAGO & NUTMAN, 2016).

Uma minoria de antígenos tem propriedades alergênicas, algumas propriedades funcionais dão às proteínas ambientais e alérgenos alimentares maior possibilidade de sensibilizar indivíduos susceptíveis. Uma característica comum de um pequeno número de alérgenos é a atividade proteolítica, a qual permite que possam ultrapassar barreiras mucosas. Muitos helmintos dependem da produção de proteases durante a migração nos tecidos e tem-se argumentado que essas proteases

possam ter uma alergenicidade intrínseca, entretanto, nem sempre essas propriedades biológicas estão presentes nos alérgenos (FITZSIMMONS et al., 2014).

### 1.6.3 ANTICORPOS NATURAIS ?

Anticorpos naturais são produzidos sem a necessidade de estímulo antigênico externo (LUTZ, 2008). Os títulos de anticorpos naturais IgM já aumentam no útero e são bem constantes durante toda a vida humana, o mesmo é válido para os IgG's em crianças saudáveis (até 18 anos). Assim, os humanos, ao nascimento, já têm níveis substanciais de anticorpos IgM, ou seja, anticorpos naturais que estão preparados para contribuir com as defesas neonatas do hospedeiro contra ameaças do ambiente externo, diferente dos anticorpos IgG e IgA que vem do sistema imunológico materno (SILVERMAN, 2015).

Diferente de IgM, os anticorpos naturais IgG's tem os títulos aumentados a vários autoantígenos e em particular a proteínas do citoesqueleto, aumentando 2 a 3 vezes após injúria severa com trauma e permanecem altos por vários anos (LUTZ, 2007).

Há uma concordância de que os anticorpos naturais em humanos e camundongos saudáveis são codificados por genes que não foram submetidos a uma mutação somática extensiva e maturação de afinidade, como é o caso das respostas de anticorpos dependentes de células T induzidas por antígenos em imunizações convencionais. E essa falta de maturação de afinidade poderia explicar o fato dos anticorpos naturais serem multireativos (COUTINHO, KAZATCHKINE & AVRAMEAS, 1995).

Muitos anticorpos naturais IgM e IgG são contra constituintes intracelulares que atuam na homeostase (LUTZ, 2009). A homeostase dos tecidos em vertebrados requer a habilidade em limpar proteínas liberadas de células lisadas, eliminar proteínas plasmáticas não-funcionais e reconhecer e eliminar células senescentes e apoptóticas (LUTZ, 2007). Esses anticorpos são de baixo título, baixa afinidade para autoantígenos conservados ou antígenos não-próprios (JELEZAROVA et al., 2005).

O desenvolvimento de imunoglobulinas com papéis homeostáticos teciduais requer mais a diferenciação entre o que é próprio exposto e oculto alterado do que o que é próprio e não próprio. Desse modo, as estratégias do sistema imunológico para tal, não foi “eliminar clones reativos próprios” e “ligação de alta afinidade” mas criar

um sistema refinado e simples aproveitando a acessibilidade e a avidéz. O reconhecimento de proteínas liberadas a partir de células lisadas ou que estão morrendo é análogo à “limpeza” do que é não-próprio, porque esses autoantígenos tornam-se acessíveis somente após a lise celular e não são normalmente expostos a anticorpos circulantes (LUTZ, 2007). Nesse sentido, de remoção dos resíduos, esses anticorpos naturais podem prevenir uma resposta imune adaptativa e doenças auto-imunes (LUTZ et al., 2009).

Tanto humanos quanto camundongos podem aumentar a produção de anticorpos naturais IgG. Essa regulação positiva de anticorpos naturais IgG está de acordo com seu papel em mediar a fagocitose via receptor do complemento e FcγR dos resíduos celulares (LUTZ, 2007). Uma característica marcante dos anticorpos naturais em camundongos é que essas imunoglobulinas podem ser encontradas nos animais *germ-* e *antígeno-free* (animais *germ-free* que recebem uma dieta ultrafiltrada) o que é sugerido pelo menos em parte, sua produção por autoantígenos (KEARNEY et al., 2015).

Muitas das famílias de alérgenos descritas, também estão presentes em humanos mas podem não ser alvo de uma resposta de IgE. Por meio de análises *in silico* de proteínas alimentares e suas respostas de IgE, foi proposto que proteínas com alta identidade na sequência com as homólogas de humanos (acima de 62%) foram raramente alérgicas. Por isso, acredita-se que a imunologia relacionada a IgE evoluiu para direcionar a resposta Th2 a grandes parasitos multicelulares que são mais estreitamente relacionados a nós do que patógenos bacterianos, fúngicos ou virais (FITZSIMMONS et al., 2014). Anticorpos para antígenos conservados em bactérias que comumente causam infecções em humanos tem o potencial de reagir com outros organismos, incluindo fungos e insetos associados com a alergia (KEARNEY et al., 2015).

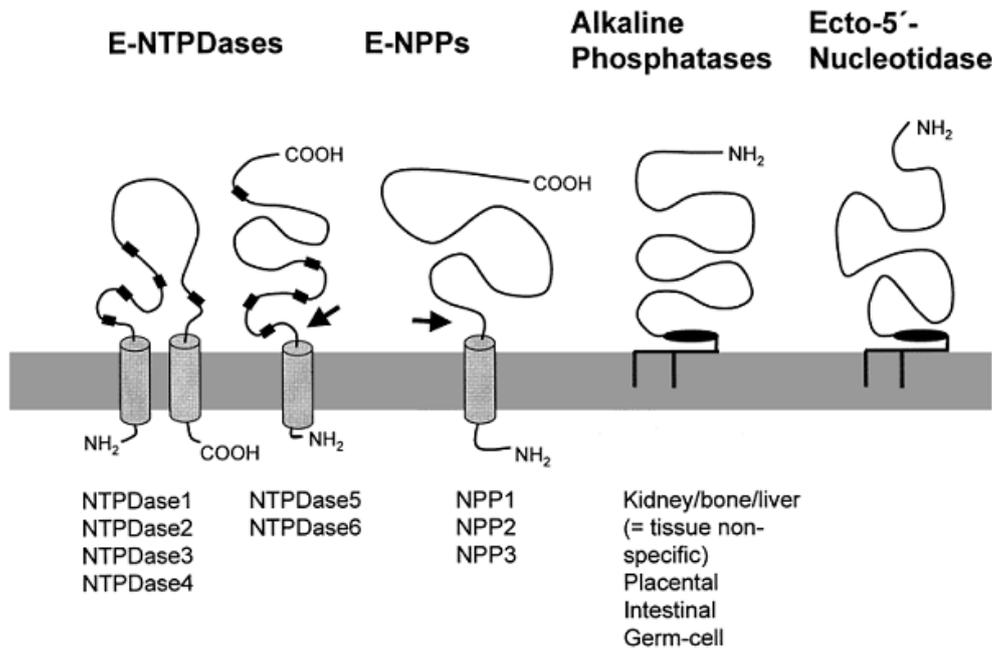
Historicamente, na primeira descrição de autorreatividade humana não foi possível identificar a natureza molecular da proteína endógena que gerava autoanticorpos IgE até o progresso nos métodos de biologia molecular. As reações contra antígenos próprios que compartilham homologia estrutural com alérgenos ambientais podem ser explicadas pelo mimetismo molecular entre epítomos comuns para células B. Estruturas 3D de diversos alérgenos tem sido elucidadas e no que diz respeito à reatividade cruzada a antígenos próprios, as estruturas mais interessantes

são as que permitem a comparação de pares entre o ambiente e proteínas humanas correspondentes (ZELLER et al., 2008).

A presença de autoanticorpos IgE tem sido descrita em algumas doenças autoimunes como no caso do Lúpus eritematoso sistêmico, onde esses autoanticorpos para antígenos nucleares como anti-dsDNA é mais comum em indivíduos com a doença ativa (DEMA et al., 2014). Embora a reatividade de autoantígenos mediada por anticorpos IgE tenha sido demonstrada *in vitro* e *in vivo* ainda não está claro “se” e “como” o reconhecimento imunológico de autoantígenos IgE-reativos podem contribuir para a patogênese da inflamação alérgica. Entretanto, tem aumentado as evidências derivadas de trabalhos estruturais comparando pares de homólogos ambientais e antígenos próprios e de trabalhos celulares indicando que a autoreatividade a antígenos próprios é devido ao mimetismo molecular entre epítomos de células B comuns no processo de sensibilização (ZELLER et al., 2008).

## 1.7 A FAMÍLIA DAS NTPDases

Enzimas localizadas na superfície celular que hidrolisam nucleotídeos extracelulares foram descritas antes da sinalização intercelular via nucleotídeos extracelulares, descoberta como principal meio de comunicação entre as células. Essas enzimas (**FIGURA 5**) são divididas em 4 grupos que incluem as Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDases), ecto-5-nucleotidases (eN), Ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterases (E-NPPs) e Fosfatases alcalinas (APs) (ZIMMERMANN et al., 2012).



**Figura 5. Topografia da membrana mostrando as quatro famílias de enzimas.** As setas evidenciam os locais onde podem ser clivadas. Fonte: Extraído de Zimmerman et al., 2012.

As NTPDases são nucleotídeo-específicas e hidrolisam nucleosídeo di- e trifosfatados em nucleosídeo monofosfatados como produto final da hidrólise e sua atividade catalítica é dependente de íons divalentes como cálcio e magnésio (ZIMMERMANN et al., 2012).

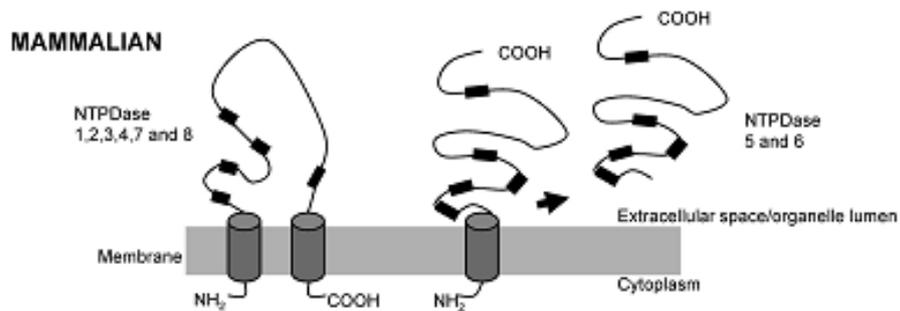
Todos os membros dessa família de proteínas apresentam em sua estrutura cinco regiões comuns, chamadas regiões conservadas de apirase (ACRs), as quais conferem a este grupo de enzimas uma identidade e estão envolvidas na atividade catalítica da enzima (HANDA & GUIDOTTI, 1996; VASCONCELOS et al. 1996). Além disso, essas enzimas diferem de outras fosfohidrolases por serem insensíveis a inibidores conhecidos de várias ATPases (Tipo P, F e V), fosfatases e adenilato quinases (HANDA & GUIDOTTI, 1996).

Em relação à nomenclatura, essa família de proteínas não possui uma uniformemente aceita para todos os membros que a compõem, os quais são classificados pela ordem de descoberta e pelas propriedades catalíticas (ROBSON, 2006; VASCONCELOS et al., 2009). Os membros dessa família são nomeados como ATP difosfohidrolase ou NTPase em parasitos, NTPDases em mamíferos e apirases em plantas (VASCONCELOS et al., 2009).

A primeira descrição da família ATP difosfohidrolase foi feita há mais de 20 anos baseada em estudos da apirase de batata (*Solanum tuberosum*) (HANDA &

GUIDOTTI, 1996; VASCONCELOS, 1996). Em plantas, a apirase pode ser uma proteína citosólica, ligada à membrana ou ao núcleo. Devido à localização, essa proteína pode ter participação em vários processos, como resposta ao estímulo táctico, germinação do pólen e biossíntese de amido (KETTLUN et al., 2005).

O primeiro membro de NTPDase a ser clonado e sequenciado em mamíferos foi o antígeno de ativação celular de linfócitos, o CD39. Nesses organismos, existem oito isoformas descritas (**FIGURA 6**); quatro são enzimas tipicamente localizadas na superfície celular com um sítio catalítico para o meio extracelular (NTPDases 1, 2, 3 e 8); as isoformas 4 e 7 estão localizadas inteiramente no meio intracelular para o lúmen de organelas citoplasmáticas e as NTPDases 5 e 6 exibem localização intracelular e são secretadas (ROBSON et al., 2006; SANSOM et al., 2008).

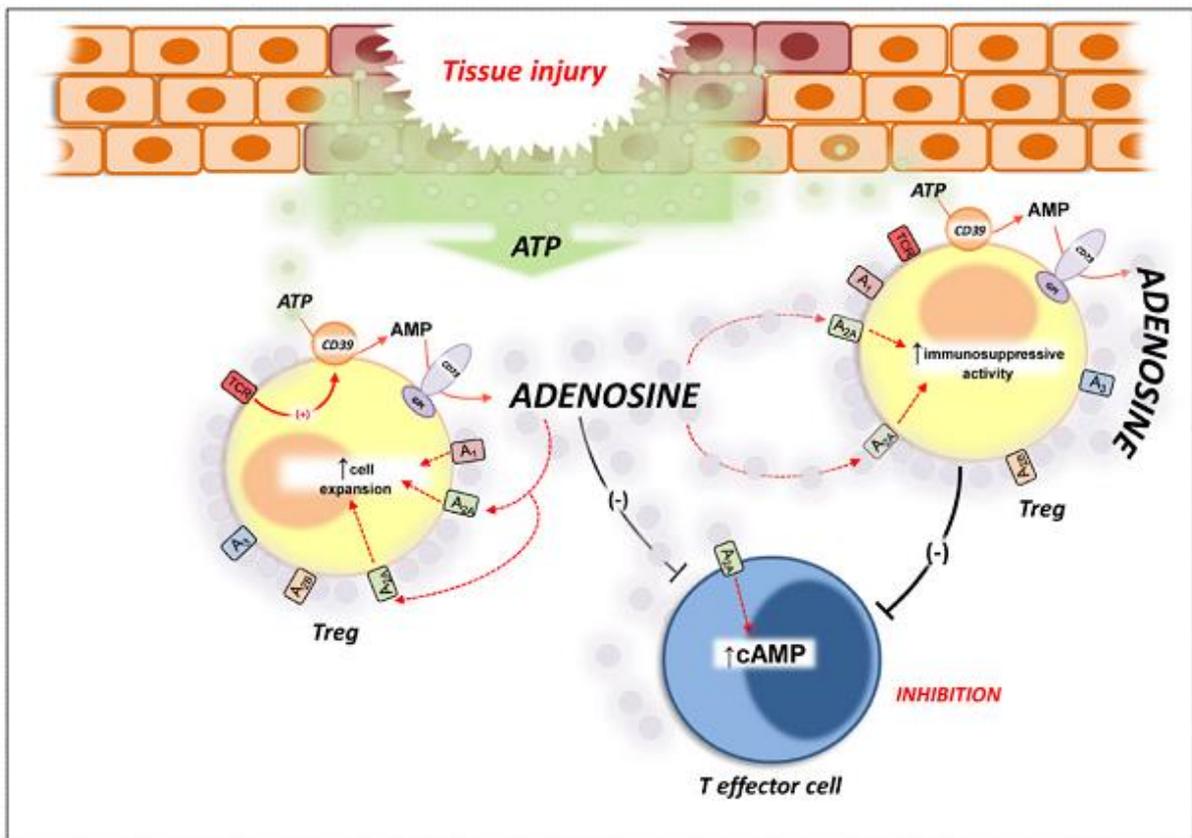


**Figura 6. Representação das NTPDases de mamíferos.** Fonte: Adaptado de Sansom et al., 2008.

O CD39 é expresso em várias células como NK, monócitos, células dendríticas, em células B e subgrupos de células T ativadas como as células Treg (DWYER et al., 2007; KANTHI et al., 2014).

Além do papel anti-inflamatório, CD39 tem sido associado à desagregação plaquetária por hidrolisar o ADP extracelular e regular o tamanho do trombo. Neutrófilos estimulados mobilizam CD39 na membrana celular e o ATP também é liberado em sua superfície sendo hidrolisado a AMP que é convertido a adenosina por outra ectoenzima CD73. A adenosina estimula os receptores purinérgicos promovendo a migração celular desempenhando diferentes funções em vários tecidos, como um efeito anti-inflamatório em células Treg. Além de células do hospedeiro, vários patógenos possuem *enzimas-like* CD39 que promovem o estabelecimento e propagação da infecção. Dessa forma, vários mecanismos

regulatórios são usados para manter a homeostase imune, evitar a autoimunidade e moderar a inflamação induzida por patógenos e injúrias ambientais. Nesse sentido, as células Treg tem um papel central pois a via CD39/CD73 modula a atividade de Treg (**FIGURA 7**) (DWYER et al., 2007;ANTONIOLI et al., 2013).



**Figura 7. Modulação da atividade de Treg pela via CD39/CD73.** A ativação do TCR na célula Treg induz a atividade de CD39 que metaboliza o ATP sendo crucial para a atividade imunossupressora de Treg por que facilita a geração de adenosina, um componente essencial na atividade imunossupressora e anti-inflamatória nessas células T regulatórias. Extraído de ANTONIOLI et al., 2013.

Em relação às ATP difosfohidrolases, as mesmas já foram caracterizadas em diversos parasitos, como *T. gondii* (BERMUDES, 1994), *T. cruzi* (FIETTO, 2004), *L. amazonensis* (COIMBRA, 2002) e *L. braziliensis* (REZENDE-SOARES, 2010). Em *Schistosoma mansoni*, existem duas isoformas dessas proteínas descritas, a SmATPDase 1 e a SmATPDase 2 com massa molecular de aproximadamente 63 kDa, identificadas no tegumento do verme adulto (VASCONCELOS et al., 1993; VASCONCELOS et al., 1996) e em ovos do parasito (FARIA-PINTO et al., 2004).

A caracterização molecular da SmATPDase 1 (DeMARCO et al., 2003) mostrou que a mesma é expressa em todos os estágios do ciclo de *S. mansoni* e que a mesma possui alta similaridade com a CD39/NTPDase 1 humana. Posteriormente, a SmAPDase 2 teve seu gene clonado e foi mostrado que essa isoforma possui massa molecular de ~63 kDa com uma região transmembrana amino-terminal sujeita a processamento pós- traducional sendo secretada com ~55 kDa, sendo essa isoforma mais similar às NTPDases 5 e 6 de mamíferos (LEVANO-GARCIA et al., 2007). Da'dara e colaboradores (2014 a) observaram, por meio de RNAi, que a SmATPDase 1 é a principal responsável pela atividade ATPásica e ADPásica em *Schistosoma mansoni*, diferente das outras ectoenzimas fosfatase alcalina (SmAP) e fosfodiesterase (SmNPP-5). As três enzimas recombinantes também foram testadas em ensaios de proteção em camundongos e individualmente ou em conjunto, não reduziram a carga de vermes. Entretanto, a imunização com a SmAP sozinha ou as três enzimas juntas associadas ao tratamento com praziquantel reduziu em torno de 40% a carga de vermes e a SmAP e SmPNPP-5 também induziram altos níveis de anticorpos mas a SmAP foi a mais imunogênica (ROFFATO et al., 2013).

Em tecidos saudáveis, o ATP está presente no interior das células, atingindo concentrações milimolares e a concentração extracelular é baixa, podendo atuar na comunicação intercelular. Entretanto, nucleotídeos extracelulares como ATP são conhecidos por atuarem como DAMPs (Padrões Moleculares Associados ao Dano) por agirem como moléculas sinalizadoras endógenas que contribuem para a inflamação e resposta imunológica. O ATP exerce um efeito quimiotático direto sobre eosinófilos, neutrófilos e células dendríticas imaturas (TRAUTMANN et al., 2009).

Dessa forma, é proposto que o dano físico causado pelo movimento intravascular dos vermes ou passagem dos ovos de *S. mansoni* no endotélio do hospedeiro poderia causar liberação de DAMPs como ATP que estimularia uma resposta imune inflamatória ao redor desses parasitos. Dessa forma, as NTPDases poderiam eliminar o sinal de dano por hidrolisar esse nucleotídeo (BHARDWAJ et al., 2009).

Além disso, como esses parasitos tem um hábitat intravascular, podem lesionar e obstruir os vasos causando coagulação sanguínea em seu entorno. Como o ADP é pró-agregante plaquetário, uma enzima como a SmATPDase 1 que hidrolisa esse substrato pode evitar esse dano ao redor do parasito (DA'DARA, 2014 a). Neste trabalho, Da'Dara e cols. (2014, b) observaram que a SmATPDase 2 é mais expressa

nos ovos de *S. mansoni* em comparação com as fêmeas do verme adulto e que a supressão da mesma usando RNAi não impactou a habilidade dos parasitos em degradar o ATP ou ADP exógeno, diferente de quando a SmATPDase 1 foi suprimida. Dessa forma, propuseram que a isoforma 2 tenha uma função no ambiente interno do parasito como reações de glicosilação no aparato de Golgi e exerça um papel importante principalmente nos ovos, onde é consideravelmente mais expressa (DA'DARA et al., 2014).

A apirase de batata (*Solanum tuberosum*), membro da família das ATP difosfohidrolases, e os anticorpos produzidos contra a mesma tem sido utilizados por nosso grupo para estudar as proteínas dessa família em parasitos como *Leishmania spp* (COIMBRA et al., 2008; REZENDE-SOARES et al., 2010; MAIA et al., 2013) e *Schistosoma mansoni* (Vasconcelos et al., 1996; Faria-Pinto et al., 2004). A proteína vegetal mostrou propriedades imunoestimulatórias em camundongos e coelho. As duas isoformas de *S. mansoni* possuem imunoreatividade cruzada com anticorpos anti-apirase de batata (VASCONCELOS et al., 1996; FARIA-PINTO et al., 2004) e por microscopia confocal, anticorpos anti-apirase de batata mostraram forte marcação em vermes adultos (VASCONCELOS et al., 1996) e ovos (FARIA-PINTO et al., 2004) de *S. mansoni*, o que sugeriu a existência de domínios conservados entre a proteínas vegetal e aquelas dos parasitos citados.

Em 2008, por meio de análises *in silico*, Faria-Pinto e colaboradores observaram a existência de homologia entre a proteína vegetal e a SmATPDase 2 de *S. mansoni* (28% de identidade e 43% de similaridade), já com a SmATPDase 1 a homologia foi menor (25% de identidade e 42% de similaridade). Neste trabalho, também foi observada a ocorrência de um domínio conservado que é compartilhado entre a apirase de batata e a SmATPDase 2 de *S. mansoni*, o que 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). Em camundongos Balb/c, esse r-Domínio foi imunoestimulatório e anticorpos IgG de pacientes com esquistossomose (40% de plasmapositividade) exibiram significativa imunoreatividade cruzada com o mesmo (MAIA et al., 2011). Além disso, anticorpos produzidos em camundongos contra um peptídeo sintético derivado do Domínio B da SmATPDase 2 de *S. mansoni* imunolocalizaram, por microscopia confocal, a ATP difosfohidrolase no ovo do parasito em granulomas do fígado de animais infectados (GUSMÃO, 2012).

Para verificar o papel da proteína vegetal e do Domínio B dela derivado na esquistossomose experimental com base nessa relação estrutural existente com as SmATPDases do parasito, foi feito um ensaio de proteção em camundongos Swiss por nosso grupo (SOARES, 2012). Neste trabalho, a imunização dos camundongos Swiss com a apirase de batata ou r-Domínio B, ambos 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 ovoposição mas houve uma redução na área granulomatosa e produção significativa de anticorpos IgG nos animais imunizados com a apirase de batata.

Esses resultados nos motivaram a realizar nesta Tese um ensaio de imunização com a proteína vegetal em camundongos C57BL/6 seguido de infecção com *S. mansoni* afim de verificar o perfil imunológico humoral e de citocinas induzido por essa proteína após as imunizações e infecção experimental.

## **2.OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVOS GERAIS**

**2.1.1.** Caracterizar a resposta imunológica da apirase de batata na esquistossomose experimental em camundongos C57BL/6.

**2.1.2.** Avaliar a possível indução de anticorpos IgE pelas SmATPDases de *S. mansoni* em plasmas de pacientes com esquistossomose com base no compartilhamento de epitopos com a apirase de batata e a indução de anticorpos IgE por esta proteína em modelo murino.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**2.2.1.** Avaliar os níveis de anticorpos IgG e IgG1 produzidos pela imunização prévia com a apirase de batata e após a infecção de camundongos C57BL/6 com cercárias de *S. mansoni*;

**2.2.2.** Verificar o perfil de citocinas IFN- $\gamma$ , IL-5, IL-13 e IL-10 induzidos pela imunização com apirase de batata em camundongos C57BL6 e posteriormente infecção com *S. mansoni*;

**2.2.3.** Avaliar o potencial imunogênico da apirase de batata em protocolo experimental de imunização de camundongos C57BL6 seguida de infecção com cercárias de *S. mansoni* por meio da contagem de vermes e análise histopatológica de granulomas hepáticos;

**2.2.4.** Analisar o perfil de fibras colágenas nos cortes histológicos de granulomas do fígado dos animais imunizados com a apirase de batata e posteriormente infectados com cercárias de *S. mansoni*;

**2.2.5.** Analisar, por ELISA, a reatividade entre a apirase de batata e anticorpos IgE de pacientes com esquistossomose e a indução de anticorpos IgE em camundongos C57BL/6 imunizados com a apirase de batata;

**2.2.6.** Analisar, por ELISA, a indução de anticorpos IgE em camundongos C57BL/6 imunizados com a apirase de batata após a imunização com a proteína vegetal e infecção desses animais com cercárias do parasito;

**2.2.7.** Verificar, por *Western Blotting*, a reatividade da apirase de batata com anticorpos IgE do plasma de pacientes com esquistossomose e de camundongos imunizados e/ou infectados com *S. mansoni*;

**2.2.8.** Avaliar a reatividade de anticorpos do plasma de indivíduos saudáveis e doentes com NTPDase 1 de macrófagos de camundongos.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 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 por decantação. 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 foi 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 por meio de dosagem de proteínas (LOWRY et al., 1951), atividade enzimática e eletroforese em gel SDS-PAGE 10% (LAEMMLI, 1970), seguida de coloração pelo Coomassie blue.

#### **3.2 IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS C57BL6 COM A APIRASE DE BATATA, DESAFIO COM CERCÁRIAS E QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS POR ELISA**

Fêmeas de camundongos C57BL/6 foram adquiridas do centro de Biologia da Reprodução (CBR), localizado no Instituto Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora. Estes camundongos, com sete semanas de vida e cerca 22 g foram divididos em 3 grupos de 7 animais, um grupo recebeu duas doses intraperitoneais da apirase de batata (10 µg), com intervalo de quinze dias, os outros dois grupos, adjuvante e controle, receberam dois inóculos apenas de adjuvante ou de PBS (tampão fosfato salino), respectivamente. A apirase de batata foi emulsificada em Adjuvante de Freund Completo para o primeiro inóculo, e em Adjuvante de Freund

Incompleto 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 como antígeno de captura. Quinze dias após a segunda imunização, os camundongos C57BL6 dos grupos controle, inoculado com o adjuvante Completo e Incompleto de Freund ou imunizado com a apirase de batata foram infectados com 50 cercárias de *S. mansoni* (SMITHERS & TERRY, 1965; PELLEGRINO & SIQUEIRA, 1956). Ao final de aproximadamente 60 dias, foi feita nova coleta de sangue pelo plexo orbital desses animais, os quais foram posteriormente sacrificados por aprofundamento da anestesia. O plasma foi separado e utilizado em técnicas de ELISA para a quantificação do título de IgG, IgG1 (1:50 até 1:6400) e IgE (1:50) reativos com a apirase de batata (10 µg/poço) usada como antígeno de captura.

### **3.3 AVALIAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA E ANÁLISE HISTOLÓGICA**

Após a coleta das amostras de sangue, seguida de eutanásia, os animais foram submetidos à perfusão manual para recuperação dos vermes do mesentério e fígado dos camundongos de cada grupo. Os vermes recuperados foram contados manualmente e separados. Fragmentos dos fígados foram removidos para a análise histológica em colaboração com a Dr<sup>a</sup> Angela Maria Gollner. Estes fragmentos de fígado foram fixados em solução de formol (10%) tamponado com solução de PBS, pH 7,4 para estudo histológico. Após sucessivas lavagens com etanol a 70% para completa remoção do fixador, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol a partir de 70% até álcool absoluto. Após essa etapa, as amostras foram diafanizadas em xilol e impregnadas em parafina histológica fundida a 60°C. Posteriormente, foram incluídas em parafina, cortadas em micrótomo obtendo-se cortes de 5 µm de espessura. Os cortes destinados ao estudo histopatológico foram corados pela hematoxilina-eosina (H&E).

### 3.4 CULTURA DE ESPLÊNOCITOS PARA ANÁLISE DE CITOCINAS

Os baços dos animais sacrificados (n=5, para cada grupo) foram removidos e isolados após 60 dias de infecção e a cultura dos esplenócitos foi feita no Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Juiz de Fora em colaboração com o Professor Gilson Costa Macedo. O baço de cada animal foi macerado em 10 ml PBS com o auxílio de uma peneira de aço. Posteriormente, foram centrifugados (10 min a 600g), o sobrenadante foi descartado e as células obtidas foram tratadas com tampão ACK (0,15 M NH<sub>4</sub>Cl, CaCO<sub>3</sub> 1,0 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 0,1 mM, pH 7,2) por 5 min para lisar as células vermelhas do sangue. Posteriormente, acrescentou-se PBS a essas células e foi feita nova centrifugação. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 (Gibco, Carlsbad, CA) suplementado com 10% de plasma fetal bovino (SFB)(Gibco, Carlsbad, CA), penicilina G sódica (100 U/mL), e estreptomicina (1ug/mL). A seguir, as células foram contadas em câmara de Neubauer. As células foram cultivadas na concentração de 1x10<sup>6</sup> células/mL em placas de 96 poços (NUNC). Esplenócitos dos camundongos infectados, inoculados com apirase de batata ou adjuvante foram estimulados com a apirase de batata (5 ug/ml), SWAP (5 ug/ml), Concanavalina A (1 ug/ml Sigma, Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo) ou LPS de *E. coli* (1 ug / ml, Sigma, St. Louis, MO). As células foram estimuladas com meio RPMI 1640 como controle negativo. As células do baço foram incubadas a 37 °C em 5% de CO<sub>2</sub>, e aliquotas de sobrenadante foram recolhidas após 24, 48 e 72 h de cultura. Para a quantificação de IL-10, IFN-γ e IL-13, o tempo escolhido foi de 48 h e para IL-5, o tempo de 24 h. Os níveis de IL-10, IFN-γ ou IL-5 e IL-13 foram medidos em sobrenadantes celulares por ELISA utilizando o kit DuoSet (BD Systems, Minneapolis, MN) e Peprotech, respectivamente, de acordo com as instruções do fabricante.

### 3.5 ANÁLISE MORFOMÉTRICA E CONTAGEM DE CÉLULAS

Secções de fígado de camundongos dos grupos controle (n=7), adjuvante (n=7) e apirase (n=7) foram analisadas. Fragmentos dos fígados removidos do lobo esquerdo foram fixadas com 10% de formaldeído em tampão PBS. Os cortes histológicos de 5 µm foram obtidos e as lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina para análise da área do granuloma. Para a avaliação do perfil de fibras

colágenas, cortes histológicos foram corados com tricômico de Gomori (Grunnet, 1978). As áreas de dez granulomas contendo um único ovo bem definido de cada animal por grupo foram analisadas utilizando o programa Image Pro Plus 4.5. Usando um microscópio com a lente objetiva de 10x, os granulomas foram então varridos com a câmera de vídeo Olympus DP72 (Olympus BX41) e digitalizadas através do software (Media Cybernetics). A área total de granulomas foi medida e os resultados foram expressos em micrômetros quadrados ( $\mu\text{m}^2$ ). Para a contagem das células gigantes e avaliação das fibras colágenas também foram utilizados dez granulomas com um único ovo bem definido de cada animal por grupo (lente objetiva de 40X e 100X).

### **3.6 OBTENÇÃO DE PLASMA DOS PACIENTES**

As amostras de plasmas de pacientes com esquistossomose de Penha do Cassiano (n=102) e de Tabuas (n=15) (Montes Claros-MG) foram doadas pelo Dr. Paulo Marcos Zech Coelho, chefe do Laboratório de Esquistossomose do CPqRR foram doadas de plasmatecas do Instituto de Pesquisas René Rachou (CPqRR), Belo Horizonte, MG. As amostras dos pacientes habitantes dos distritos de Caju (n=15) (Governador Valadares-MG) foram doadas pelo Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira, chefe do Laboratório de Imunologia do mesmo Instituto.

Os plasmas utilizados nos experimentos de ELISA foram de Penha do Cassiano e como controle foram testados plasmas de 26 indivíduos saudáveis de área não endêmica para esquistossomose e sem qualquer outra doença parasitária. Para os experimentos de *Western Blotting*, foram utilizados plasmas dos pacientes de Tabuas e Caju. Em pacientes do Caju e de Penha do Cassiano foi feito o diagnóstico da doença por Kato-Katz. Em pacientes oriundos de Tabuas foram realizados o teste de Kato-Katz e o teste de gradiente salino (COELHO et al., 2009). A seleção dos plasmas utilizou como critério de inclusão das amostras, pacientes positivos para esquistossomose e como critério de exclusão os pacientes co-infectados e mono-infectados com outras parasitoses. Os protocolos de estudo cumpridos em conformidade com os regulamentos do Conselho Nacional de Pesquisa em Seres Humanos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, no âmbito de protocolos CEPESH / CPqRR 06/2001 e 04/2005.

### 3.7 ELISA DE PLASMAS HUMANOS

Uma titulação anterior foi realizada para a escolha da melhor concentração do antígeno apirase de batata (5 µg/poço diluída em 0,1 M de NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,6) que foi adsorvida em placas de microtitulação de 96 poços (Nunc Maxisorp) *overnight*. Posteriormente foi feito o bloqueio (PBS 0,15 M, pH 7,2; Tween-20, 3% de caseína). Para o primeiro ELISA, as amostras de plasma de pacientes com esquistossomose de Penha do Cassiano (n=102) e indivíduos saudáveis (n=26) foram diluídas a 1:50 (em duplicata) em tampão de bloqueio. Os anticorpos ligados à apirase de batata na placa foram detectados utilizando anticorpo secundário anti-IgE de humanos conjugado a peroxidase diluído a 1: 500 (Zymed) e o-fenilenodiamina (OPD) / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram usados como substrato. A solução de parada com ácido sulfúrico 1N foi adicionada. A reação de cor subsequente foi lida a 492 nm num leitor de microplacas (Molecular Devices Corp., Menlo Park, CA).

Em um segundo ELISA, as amostras de plasma de pacientes com esquistossomose (n=20) com reatividade positiva contra a apirase de batata ou indivíduos saudáveis (n=8) foram pré-incubados (1:1; v/v) durante 10 minutos com IgG anti-humano (Bethyl) e os complexos de anticorpos removidas por centrifugação a 5000 rpm (SOUZA-ATTA, 1999). O sobrenadante foi diluído 1:50 e aplicado em placas de microtitulação pré-revestidas com apirase de batata como já descrito e o nível de anticorpo IgE foi detectado. Estes métodos foram adaptados de SOUZA-ATTA e cols. (1999).

### 3.8 PREPARAÇÃO DOS ANTÍGENOS SOLÚVEIS DO VERME ADULTO (SWAP)

O ciclo biológico do parasito *S. mansoni* é mantido no Laboratório de Esquistossomose do CPqRR, Belo Horizonte, MG, sob a supervisão do Dr. Paulo Marcos Zech Coelho. Caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* foram infectados com 15 miracídios/caramujo por meio de exposição direta dentro de placas de Petri, por duas horas. Ao final de 6-7 semanas, as cercárias liberadas por estes caramujos foram utilizadas para a infecção de camundongos Swiss, os quais receberam inóculos de ~150 cercárias/animal por via subcutânea (PELLEGRINO & SIQUEIRA, 1956; SMITHERS & TERRY, 1965). Os animais infectados foram sacrificados ao final de aproximadamente 45 dias. A preparação dos antígenos solúveis de vermes adultos

(SWAP) foi realizada com adaptações da técnica previamente descrita (Colley et al., 1977). Os vermes foram extraídos dos camundongos Swiss com 6 ou 7 semanas de infecção por perfusão e homogeneizados em tampão Tris-HCL 50 mM, pH 7,4, com sacarose 8% e inibidores de proteases leupeptina (0,5 µg/ml), pepstatina (0,07 µg/ml), inibidor de tripsina (50 µg/ml) e fluoreto de fenilmetilsufonil (2 µg/ml), rompidos através de ciclos de 10 minutos em banho ultrassônico e banho de gelo pelo mesmo período de tempo e submetidos a ciclos de ruptura de tecido através de homogeneizações em Potter por 30 segundos, com 60 segundos de intervalo entre elas quando todo material solúvel foi extraído e posteriormente recuperado por centrifugação para obtenção do SWAP (FARIA-PINTO et al., 2008). A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry (LOWRY, 1951), usando albumina bovina como padrão. Estas preparações foram estocadas à -20° C para utilização como controle no experimento da cultura de esplenócitos.

### **3.9 ATIVIDADE FOSFOHIDROLÍTICA, SEPARAÇÃO E REATIVIDADE DAS ISOFORMAS SmATPDases COM ANTICORPOS IgE**

Alíquotas de 100 µg de homogeneizado total de vermes adultos de *S. mansoni* foram solubilizadas em tampão de amostra composto por Tris-HCl 0,125 M pH 6,8, glicerol 10%, deoxicolato de sódio (DOC) 0,2%, Triton X-100 0,2% e azul de bromofenol. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 6% com Triton X-100 0,1%, DOC 0,1% e submetidas à eletroforese a 130 V por 3 h usando o sistema Mini Protean III (BioRad). Após a corrida, o gel foi lavado 2 vezes por 20 minutos em tampão MOPS 50 mM, pH 7,4. Os “lanes” foram cortados e incubados a 37°C com MOPS 50 mM, pH 7,4, suplementado com CaCl 10 mM e 5 mM do substrato ATP. Após 12 horas, uma atividade fosfohidrolítica foi identificada pela formação de um precipitado de fosfato de cálcio no gel. As bandas foram cortadas, imersas em tampão de amostra e aquecidas por 5 minutos a 100°C e aplicadas em gel de poliacrilamida 10% com 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS), adaptado de LAEMMLI (1970). Também foi aplicado um padrão de peso molecular pré-corado. A corrida foi realizada por cerca de 2 horas a 100 V em um sistema de eletroforese (Mini Protean III, BioRad). Uma parte do gel foi corada com Azul de Comassie (1% de azul de comassie R (m/v), 30% de ácido acético glacial e 40% de metanol) e as proteínas da outra parte foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose (Mini Trans-Blot III, BioRad). As

membranas foram bloqueadas por 2 h com tampão fosfato (PBS + 3% de caseína + Tween 20 0,1%). A seguir, a membrana foi incubada com do pool de plasmas de pacientes com esquistossomose de Penha do Cassiano (1:50) por 24 horas e após as lavagens (tampão fosfato (PBS) e Tween 20 0,1%; 3 x10 min) foi feita a incubação com anticorpos secundário anti-IgE de humanos (Bethyl) (1: 1000) (20 horas), seguida de lavagem (tampão fosfato (PBS) e Tween 20 0,1% ; 3x10 min) para a revelação, o luminol foi usado como substrato, seguido de exposição a filmes de raio-X, de acordo com as instruções do fabricante (ECL Western blotting System; GE Healthcare Life Sciences, Brasil) .

### **3.10 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DA FAMÍLIA DAS NTPDASES POR “WESTERN BLOTTING”**

Homogeneizados de macrófagos da linhagem RAW 264.7 de camundongos, gentilmente doados pelo Prof. Dr. Gilson Costa Macedo do Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, foram preparados segundo o trabalho de Marconato (2015). As linhagens RAW 264.7 são *macrófagos-like* transformadas com vírus Abelson de leucemia murina em camundongos Balb/c. Essa linhagem celular é comumente utilizada como modelo de macrófagos de camundongos (<https://www.atcc.org/products/all/TIB-71.aspx#characteristics>). A apirase de batata purificada ou homogeneizado de macrófagos foram solubilizadas em tampão de amostra e aplicadas em gel de poliacrilamida 10% com 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS), de acordo com Laemmli (1970) e posteriormente foi feito Western blotting como descrito no item anterior (3.8). As membranas contendo os macrófagos RAW foram incubadas com anticorpos IgG anti-CD39 de coelho (1: 500), anticorpos IgG de humanos (1:500), anti-IgM de humanos ( 1:500), anticorpos IgE do *pool* de 15 plasmas de pacientes saudáveis e pool de 15 plasmas de pacientes com esquistossomose de duas áreas distintas, Caju (Governador Valadares-MG) e Tabuas (Montes Claros-MG) (dil. 1:50) e as membranas contendo a apirase de batata foram incubadas com os plasmas desses pacientes ou de camundongos C57BL6 imunizados com a apirase de batata (dil. 1:50), anticorpos IgE do pool de plasmas de camundongos C57BL/6 saudáveis (dil. 1:50) e anticorpos IgE do pool de plasmas de plasmas de camundongos infectados com *S.mansoni* (dil. 1:50). Todos os plasmas para a análise de IgE foram previamente depletados de IgG. Anticorpos IgG anti-apirase de batata

(1:3000) foram usados apenas como controle positivo, uma vez que essa reatividade já se encontra comprovada na literatura por trabalhos prévios da equipe (FARIA-PINTO et al, 2004; 2008; 2010). Os ensaios foram revelados por quimioluminêscia utilizando anticorpos secundários anti-IgG de camundongo conjugados a peroxidase (1:5000) (Bethyl Laboratories INC., Montgomery, TX, USA), anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase (1:2000) (Santa Cruz Biotechnology, INC., Europe), anticorpos anti-IgG de humano (1:1000), anticorpos anti-IgM (1:2000) e o luminol como substrato, seguido de exposição a filmes de raio-X, de acordo com as instruções do fabricante (ECL Western blotting System; GE Healthcare Life Sciences, Brasil).

### **3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A média da densidade óptica (D.O.) das amostras de plasma de pacientes do controle mais duas vezes o desvio padrão foi aplicada como *cut-off* para a reatividade do anticorpo. Os valores superiores ao *cut-off* foram considerados plasmapositivos. A média e a significância foram calculadas e analisadas pelo teste de Mann-Whitney.

Os resultados foram apresentados como a média  $\pm$  erro padrão. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA com Bonferroni, dosagem de citocinas foi utilizado o ANOVA e Tukey, para as análises da área dos granulomas foi utilizado o teste de ANOVA e Kruskal-Wallis.

### **3.12 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA**

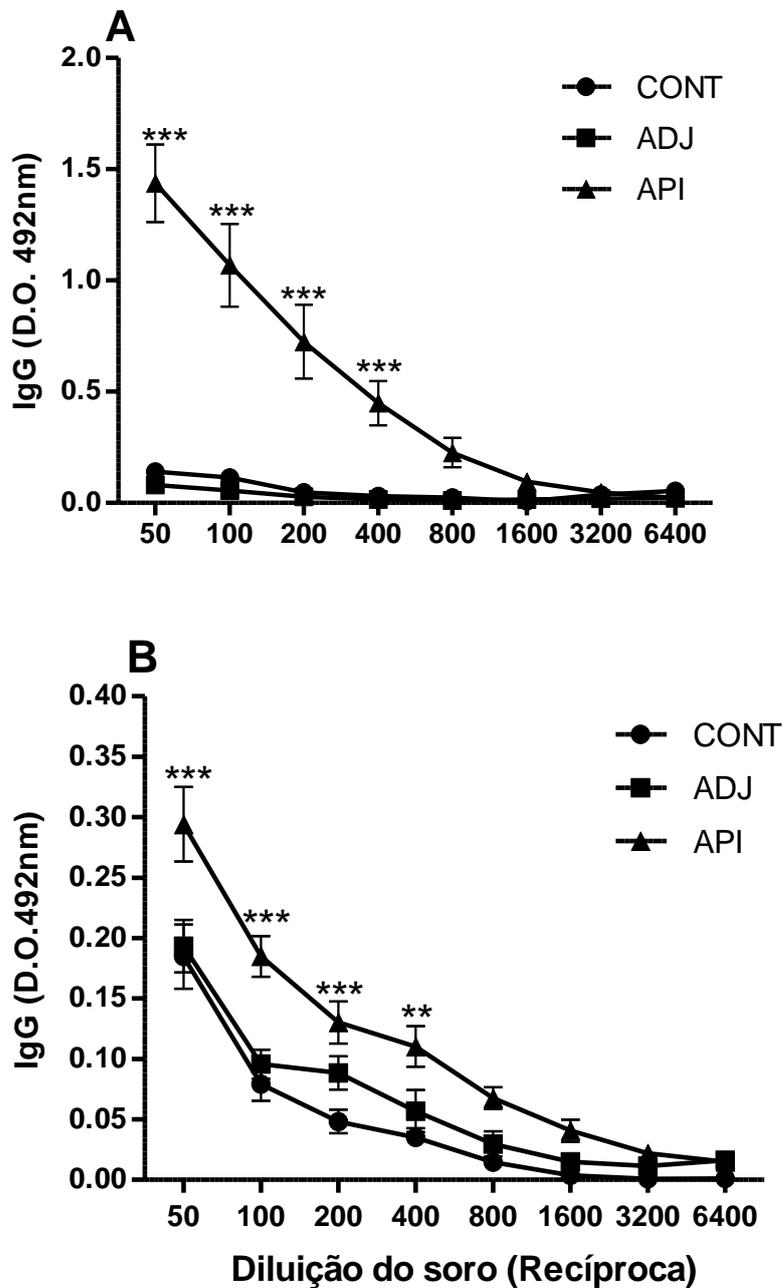
As coletas de amostras de material biológico empregadas no presente projeto foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Experimentação animal da Universidade Federal de Juiz de Fora sob os protocolos nº 017/2009 e nº025/2012.

Para a utilização dos plasmas de humanos, os protocolos do estudo, CEPESH/CPqRR 04/2005, foram previamente analisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

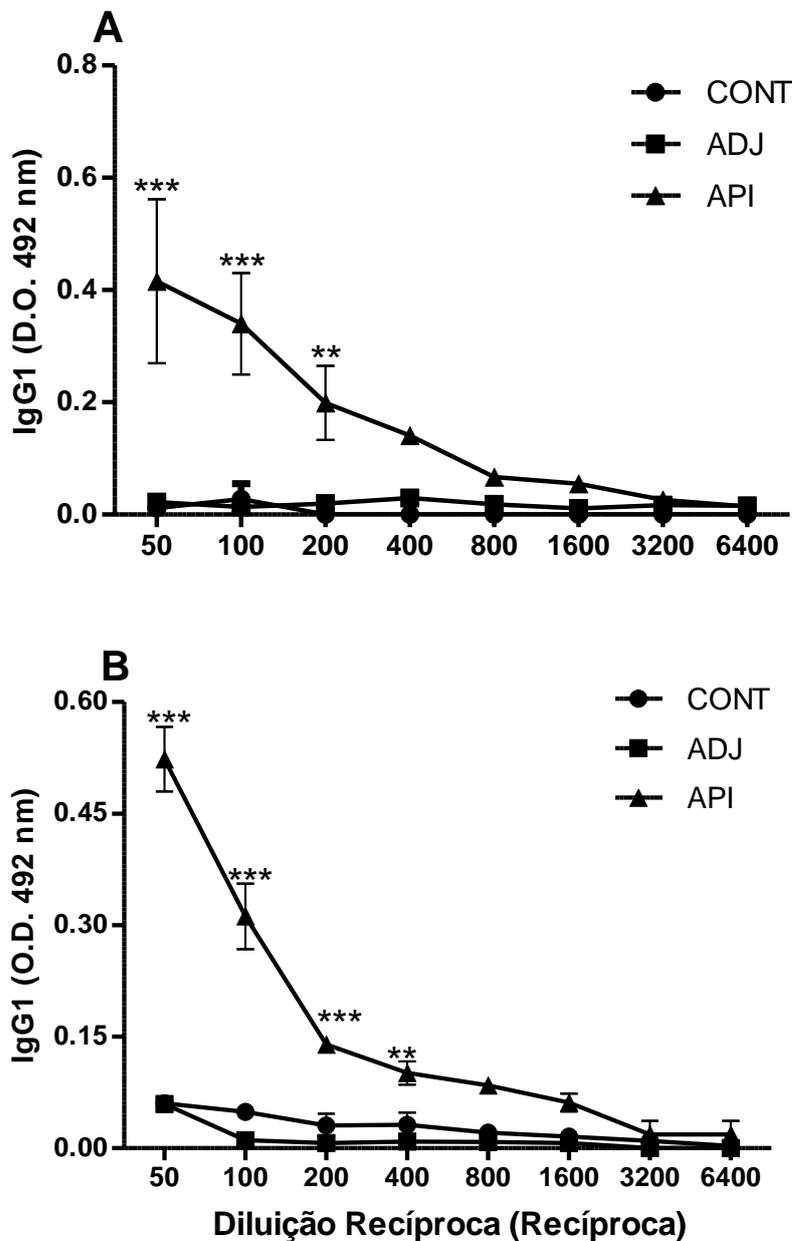
## 4. RESULTADOS

### 4.1 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE ANTICORPOS PRODUZIDOS PELA IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS C57BL/6 COM APIRASE DE BATATA E POSTERIORMENTE INFECTADOS COM *S. mansoni*

Para avaliar o nível de anticorpos IgG (**FIGURA 8, A e B**) e IgG1 (**FIGURA 9, A e B**) específicos induzido pela imunização com a apirase de batata, plasmas de cinco animais de cada grupo foram avaliados por ELISA. Após duas doses de imunização com a proteína vegetal, títulos significativos (até 1: 800 ) de anticorpos IgG específicos foram detectados nos plasmas dos camundongos imunizados (**FIGURA 8, A**) em relação aos grupos controle (sem imunização e adjuvante). Após a infecção com *S. mansoni*, estes animais mantiveram estes níveis de IgG significativos e reativos com a proteína vegetal (1:800; **FIGURA 8, B**). Os níveis de IgG1 detectados nos plasmas dos camundongos após a imunização foram significativos até a diluição de 1:100 (**FIGURA 9, A**) e após a infecção (**FIGURA 9, B**), a reatividade destes soros foi significativa até diluições maiores (até 1:800) em relação aos controles.



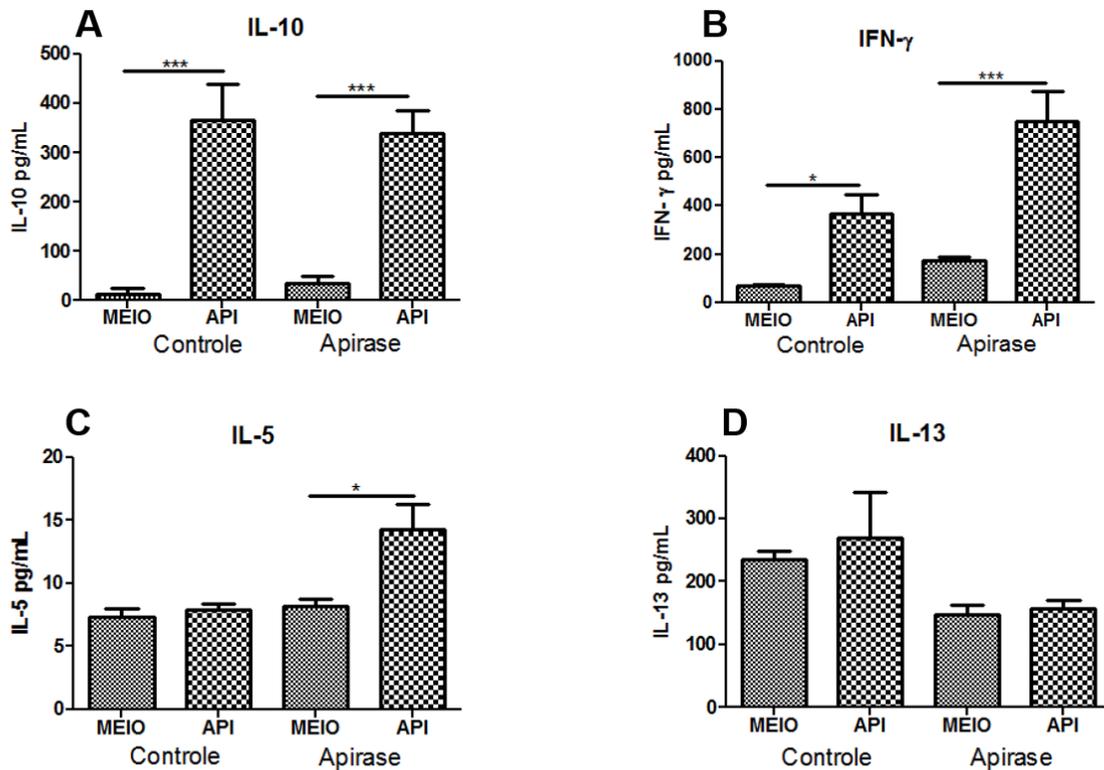
**Figura 8. Quantificação da produção de anticorpos IgG de camundongos imunizados com a apirase de batata e infectados com *S. mansoni*.** Camundongos C57BL6 foram imunizados com dois inóculos de apirase de batata (10 µg) em um intervalo de 15 dias e desafiados com 50 cercárias de *S. mansoni* 15 dias após a segunda imunização. Quantificação de anticorpos IgG específicos anti-apirase de batata após a segunda imunização **(A)** e após a infecção **(B)**. **API**, grupo imunizado com apirase de batata; **ADJ**, inoculados apenas com o Adjuvante de Freund e **CONT**, o grupo que recebeu PBS. As amostras de plasma foram tituladas de 1: 50 a 1:6.400 e testadas em duplicata. Os resultados representam a média de dois experimentos independentes. Os dados estão representados como média ± desvio padrão (DP) da densidade óptica (D.O.). \*\*\*P < 0,001; \*\*P < 0,01



**Figura 9. Quantificação da produção de anticorpos IgG1 de camundongos imunizados com a apirase de batata e infectados com *S. mansoni*.** Camundongos C57BL6 foram imunizados com dois inóculos de apirase de batata (10 µg) em um intervalo de 15 dias e desafiados com 50 cercárias de *S. mansoni* 15 dias após a segunda imunização. Quantificação de anticorpos IgG1 específicos anti-apirase de batata após a segunda imunização **(A)** e após a infecção **(B)**. **API**, grupo imunizado com apirase de batata; **ADJ**, inoculados apenas com o Adjuvante de Freund e **CONT**, o grupo que recebeu PBS. As amostras de plasma foram tituladas de 1: 50 a 1:6.400 e testadas em duplicata. Os resultados representam a média de dois experimentos independentes. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão (DP) da densidade óptica (D.O.). \*\*\*P < 0,001; \*\*P < 0,01

#### 4.1.2 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CITOCINAS INDUZIDOS PELA IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS C57BL/6 COM APIRASE DE BATATA E POSTERIORMENTE INFECTADOS COM *S. mansoni*

A análise da produção de citocinas induzida pela apirase de batata foi realizada utilizando culturas de esplenócitos individuais de camundongos imunizados com apirase de batata ou o grupo controle (n = 5 para cada grupo; 24, 48 e 72 h de cultura), ambos infectados 15 dias após o segundo inóculo com o antígeno. Os esplenócitos dos camundongos foram isolados após 60 dias de infecção. Como controles positivos deste experimento foram utilizados Concanavalina (IL-10 em pg/ml :Controle:  $2463 \pm 1200$  , Apirase:  $1609 \pm 378,8$ ; IFN-  $\gamma$ : Controle:  $2942 \pm 197,7$ , Apirase:  $4133 \pm 978,5$ ; IL-5: Controle:  $262,5 \pm 51,45$ , Apirase:  $224,5 \pm 121,4$  ; IL-13: Controle:  $644,6 \pm 31,74$ , Apirase:  $426,9 \pm 65,20$ ), LPS (lipopolissacarídeo) e SWAP (antígenos solúveis do verme adulto). Estão apresentadas as médias da produção das citocinas IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-5 e IL-13 nos sobrenadantes de cultura de células do baço cultivadas por 24 (IL-5) e 48 horas ( IL-10, IFN- $\gamma$  e IL-13) na presença de apirase de batata (API) ou meio RPMI (MEIO). A **FIGURA 10 (A)** mostra que níveis elevados de IL-10, em pg/ml, foram produzidos por esplenócitos do grupo controle ( **$364,5 \pm 73,67$** ) e grupo apirase ( **$339,8 \pm 44,99$** ) estimulados com API em comparação com esplenócitos estimulados apenas com o MEIO em ambos os grupos ( **$13,91 \pm 9,94$**  e  **$35,53 \pm 13,42$**  , respectivamente). Níveis elevados de IFN- $\gamma$  (**B**) também foram produzidos por esplenócitos estimulados com API em ambos os grupos. No grupo apirase os níveis de IFN- $\gamma$  foram bem elevados ( **$750 \pm 126,2$** ) em comparação com seu respectivo controle negativo, MEIO ( **$171,9 \pm 18,99$**  ). O grupo controle, sob estímulo com API ( **$368,1 \pm 88,10$** ) ou estímulo pelo próprio MEIO ( **$67,84 \pm 19,02$** ) não apresentou níveis de IFN- $\gamma$  significativos. Além disso, uma produção significativa de IL-5 (**C**) foi detectada no grupo apirase ( **$14,22 \pm 1,99$** ) sob estímulo com a API em relação ao MEIO ( **$8,213 \pm 0,53$**  ), não houve diferença na produção de IL-5 no grupo controle sob estímulo com a proteína vegetal (API). Não houve diferença significativa na produção de IL-13 (**D**) nos dois grupos (Controle e Apirase).



**Figura 10. Perfil de citocinas de esplenócitos isolados de camundongos imunizados com a apirase de batata e infectados com *Schistosoma mansoni*.** Os esplenócitos isolados a partir de camundongos do grupo apirase de batata (camundongos imunizados com apirase de batata e adjuvante e posteriormente infectados) ou grupo controle (camundongos inoculados com solução salina e posteriormente infectados) foram estimulados para avaliar a secreção de IL-10 (A), IFN- $\gamma$  (B), IL -5 (C) e IL-13 (D) em resposta a um estímulo *in vitro* com a apirase de batata (5 ug / ml) ou apenas com o meio RPMI, como controle. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão de cada grupo. As diferenças estatisticamente significativas entre citocinas produzidas após a estimulação com a apirase de batata em comparação com esplenócitos estimulados apenas com o meio RPMI (\*\*\*) P < 0,0001, \* P < 0,05).

#### 4.1.3 CONTAGEM DE VERMES RECUPERADOS APÓS INFECÇÃO COM *S. mansoni* E AVALIAÇÃO DO PERFIL IMUNOMODULATÓRIO DA APIRASE DE BATATA SOBRE GRANULOMAS DE *S. mansoni*

Já foi demonstrado por nosso grupo que a imunização com a apirase de batata é capaz de ativar a resposta imune humoral em camundongos e coelhos. Os anticorpos gerados contra a proteína vegetal reconhecem as isorformas de NTPDases de *S. mansoni* (Vasconcelos et al., 1996, Faria-Pinto et al., 2004), desta forma, resolvemos avaliar a capacidade da imunização com essa proteína em induzir proteção na infecção com *S. mansoni* em camundongos C57BL/6. Como mostrado na **TABELA 1**, a imunização com a proteína vegetal não afetou a carga parasitária nos camundongos imunizados, mas diminuiu significativamente (**TABELA 1**) as áreas dos granulomas (**FIGURA 11**) analisados. Como mostrado nos cortes de fígado corados com hematoxilina e eosina, granulomas com áreas menores foram prevalentes nos camundongos imunizados com a apirase em relação ao grupo controle e grupo do adjuvante (**FIGURA 12**).

**Tabela 1.** Avaliação da carga parasitária e média das áreas dos granulomas hepáticos de animais imunizados com a apirase de batata e posteriormente infectados por *S. mansoni*. Os animais foram analisados 60 dias após a infecção e os vermes adultos foram recuperados dos três grupos experimentais pós perfusão.

Grupos	Total de vermes média $\pm$ SE	Área do granuloma hepático ( $\mu\text{m}^2 \pm$ SE)
<b>Controle (n=8)</b>	10.62 $\pm$ 2.9	105.238 $\pm$ 2.989
<b>Adjuvante (n=7)</b>	12.14 $\pm$ 1.43	95.768 $\pm$ 3.622
<b>Apirase (n=16)</b>	15 $\pm$ 2.45	68.376 $\pm$ 1.655***

\*\*\*Diferença estatisticamente significativa comparada com o grupo controle e com o grupo adjuvante ( $p < 0.0001$ ). SE: Erro padrão

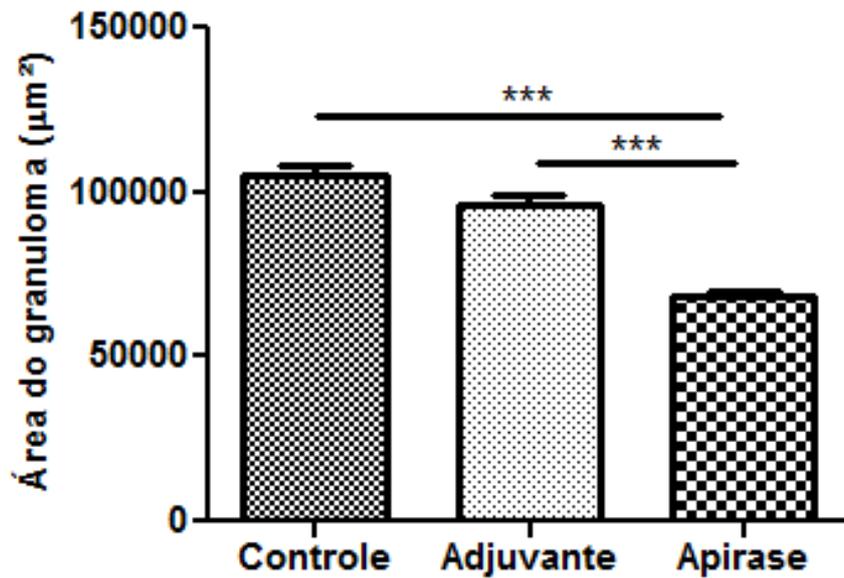
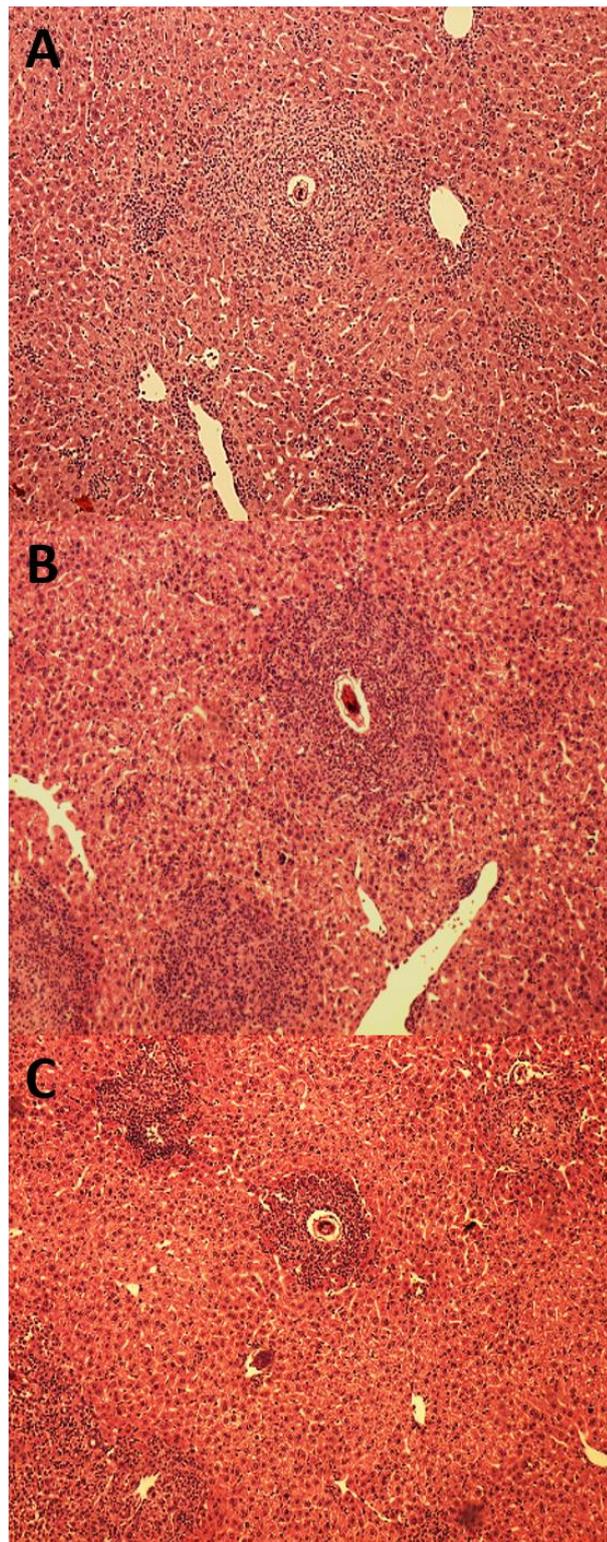


Figura 11. Médias das áreas dos granulomas hepáticos de camundongos imunizados com a proteína vegetal (apirase de batata) e infectados com 50 cercárias de *S. mansoni*. Média das áreas de 10 granulomas hepáticos (escolhidos aleatoriamente) contendo um único ovo central e bem definido/animal/grupo. **Grupo Apirase**, os camundongos imunizados com a apirase de batata; **Grupo Controle**, camundongos que receberam solução salina e **Grupo adjuvante**, os animais que receberam apenas o adjuvante de Freund, todos os grupos foram infectados e os animais foram eutanasiados 60 dias após a infecção. O diâmetro total de granulomas foi medido e os resultados foram expressos em micrômetros quadrados (µm<sup>2</sup>). Os resultados representam a média ± erro padrão de cada grupo. \*\*\*p <0,0001.



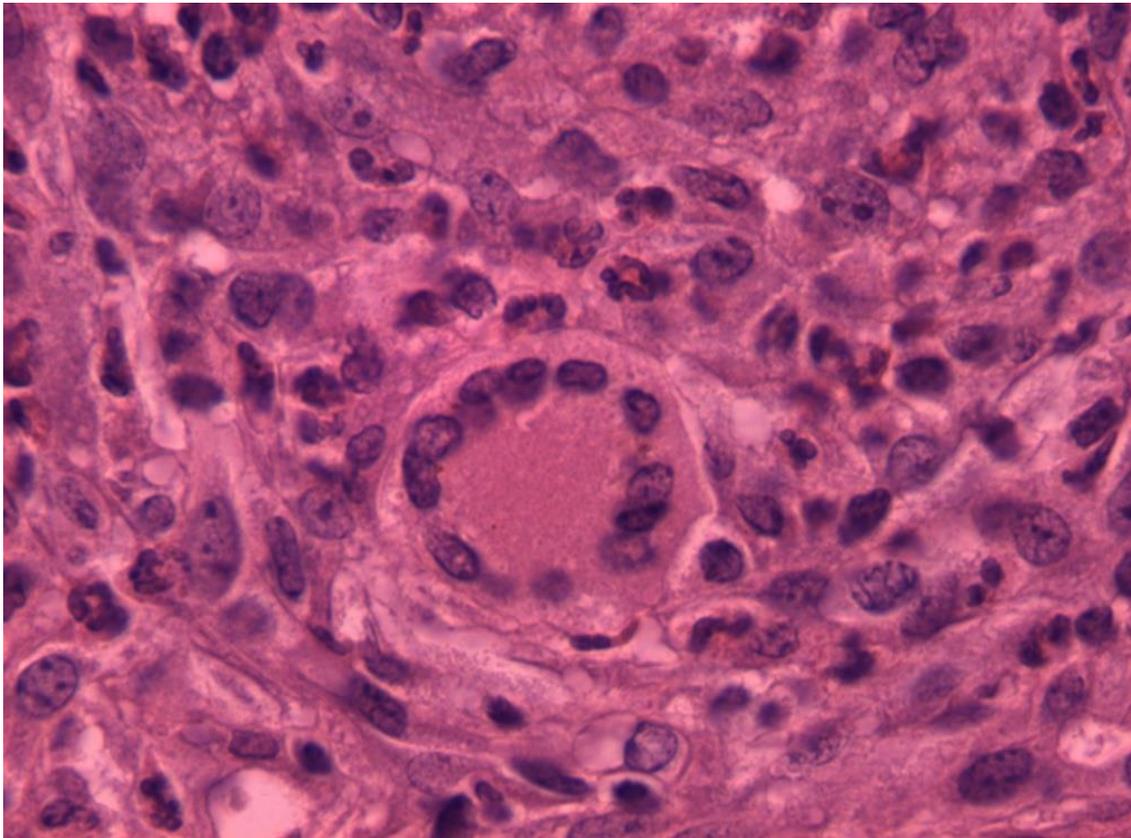
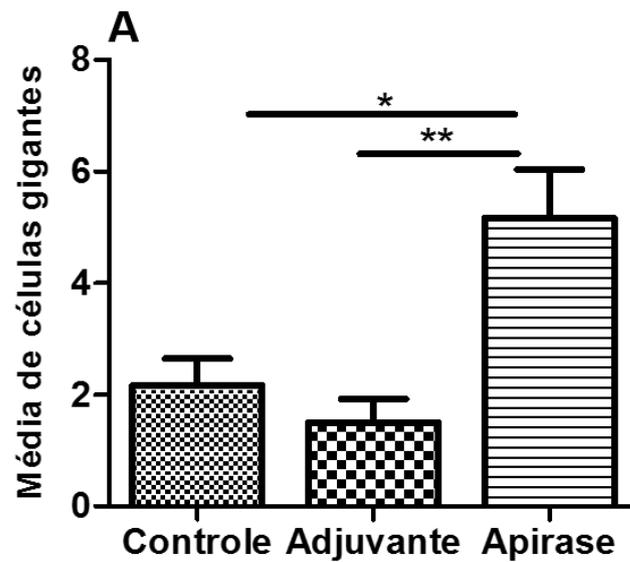
**Figura 12.** Fotomicrografias de lâminas de cortes hepáticos de camundongos C57BL/6 imunizados com apirase de batata e infectados com *S. mansoni* corados por hematoxilina-eosina. Os cortes histológicos, aproximadamente 5  $\mu$ m, corados se referem a granulomas 60 dias após a infecção com o helminto. Na figura, em destaque, um ovo com reação inflamatória granulomatosa desenvolvida ao redor. Controle (A), grupo imunizado apenas com adjuvante (B), grupo imunizado com a proteína vegetal (C).

## 4.2 ANÁLISE DAS CÉLULAS GIGANTES MULTINUCLEADAS E DO PERFIL DE FIBRAS COLÁGENAS NOS GRANULOMAS HEPÁTICOS DE CAMUNDONGOS C57BL/6 IMUNIZADOS COM A APIRASE DE BATATA E POSTERIORMENTE INFECTADOS COM O PARASITO

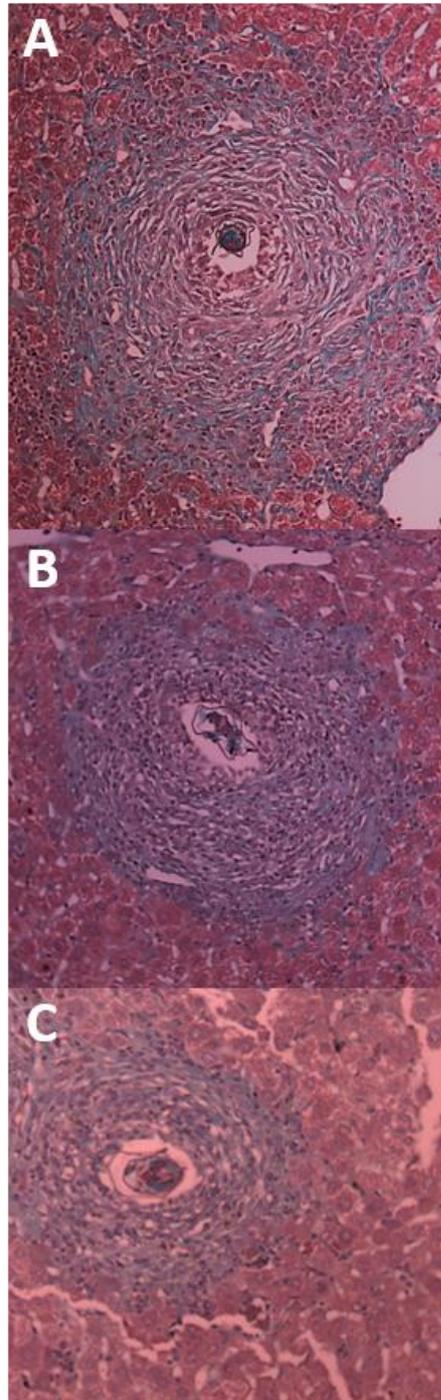
Para fazer uma análise semi-quantitativa de células gigantes nos granulomas hepáticos dos três grupos de camundongos C57BL/6 infectados com *S. mansoni* (grupo controle, adjuvante e imunizado com a apirase de batata) e de fibras colágenas, foram contados 10 granulomas hepáticos/ animal/grupo nas lâminas coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e 10 granulomas hepáticos/animal/grupo nas lâminas coradas com tricômico de Gomori, respectivamente. Como observamos na **TABELA 2** e na **figura 13 (A)**, os animais imunizados com a apirase de batata apresentam um número significativo de células gigantes multinucleadas (**FIGURA 13, B**) em relação aos animais do grupo Controle e Adjuvante. Em relação ao perfil de fibras colágenas não observamos uma diferença significativa em termos qualitativos das fibras avaliadas entre os grupos. Nos animais imunizados com a proteína vegetal, as fibras colágenas estão menos frouxas e mais concêntricas em relação aos grupos controle e adjuvante (**FIGURA 14**).

**Tabela 2.** Análise semi-quantitativa do número de células gigantes multinucleadas localizadas nas áreas periféricas dos granulomas hepáticos dos camundongos C57BL/6 imunizados com a proteína vegetal (apirase de batata) e infectados com 50 cercárias de *S. mansoni*.

Número de células gigantes multinucleadas/Animal/Grupo		
Controle 1= 2	Adjuvante 1 = 3	Apirase 1 = 9
Controle 2= 1	Adjuvante 2 = 2	Apirase 2 = 6
Controle 3 = 2	Adjuvante 3 = 2	Apirase 3 = 3
Controle 4 = 3	Adjuvante 4 = 1	Apirase 4 = 4
Controle 5 = 1	Adjuvante 5 = 0	Apirase 5 = 5
Controle 6= 4	Adjuvante 6= 1	Apirase 6 = 4



**Figura 13. Gráfico da média de células gigantes encontradas nos grupos Apirase, Adjuvante e Controle (A) e fotomicrografia de uma célula gigante multinucleada do tipo Células de Langhans (B).** (A) Média total de células gigantes multinucleadas encontradas em granulomas do fígado de camundongos dos grupos Controle (apenas infectado com *S. mansoni*), Adjuvante (Inoculado com Adjuvante de Freund e infectado) e Apirase (Imunizado com a proteína vegetal e infectado) e (B) fotomicrografia de célula gigante encontrada em granuloma de camundongo C57BL/6 imunizado com a apirase de batata e infectado com o parasito *S. mansoni*. Essa célula gigante é do tipo Langhans, onde os núcleos estão organizados na periferia celular. Aumento de 100X. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .

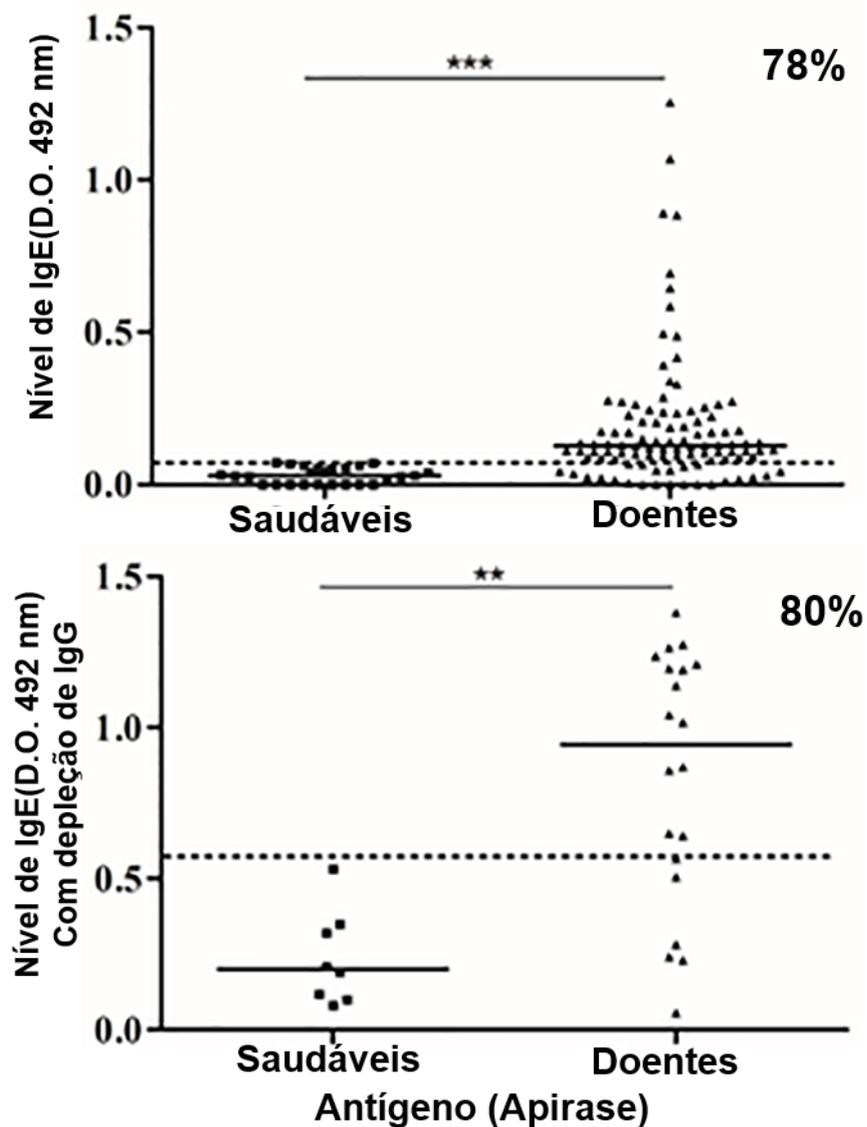


**Figura 14. Fotomicrografias de lâminas de cortes hepáticos de camundongos C57BL/6 imunizados com apirase de batata e infectados com *S. mansoni* corados por tricrômica de gomori.** Os cortes histológicos corados se referem a granulomas 60 dias após a infecção com o helminto. A coloração resalta as fibras colágenas que são produzidas ao longo da resolução da inflamação granulomatosa (fibras em azul). A medida que a inflamação começa a se resolver as fibras adotam uma disposição concêntrica, que vai gradualmente reduzindo até completa cicatrização da área. A imagem se refere a granulomas contendo um único ovo central contendo material do embrião (miracídio). Controle (A), grupo imunizado apenas com adjuvante (B), grupo imunizado com a proteína vegetal (C).

### 4.3 REATIVIDADE DA APIRASE DE BATATA COM ANTICORPOS IgE DOS PLASMAS DE PACIENTES COM ESQUISTOSSOMOSE POR ELISA

A reatividade entre a apirase de batata e anticorpos IgE ( $0,189 \pm 0,0217$ ) em amostras de plasma diluídas 1:50 de pacientes com esquistossomose foi significativamente superior àquela encontrada em indivíduos saudáveis ( $n=26$ ;  $0,030 \pm 0,026$ ). Das 102 amostras, 80 delas reconheceram a proteína de batata (78% de positividade) (**FIGURA 15, A**). O grupo de pacientes com esquistossomose mansoni de área endêmica foi composta por amostras de plasmas de crianças ( $n = 62$ ; faixa etária 7-17 anos) e adultos ( $n = 40$ ; faixa etária 18-60 anos) com diagnóstico positivo para a infecção pelo método de Kato-Katz. Estes indivíduos mostraram diferente positividade de anticorpos IgE contra a apirase de batata. Das 62 crianças doentes, 60 reagiram com a proteína vegetal (97%), enquanto que dos 40 adultos, 23 apresentaram reatividade (58%).

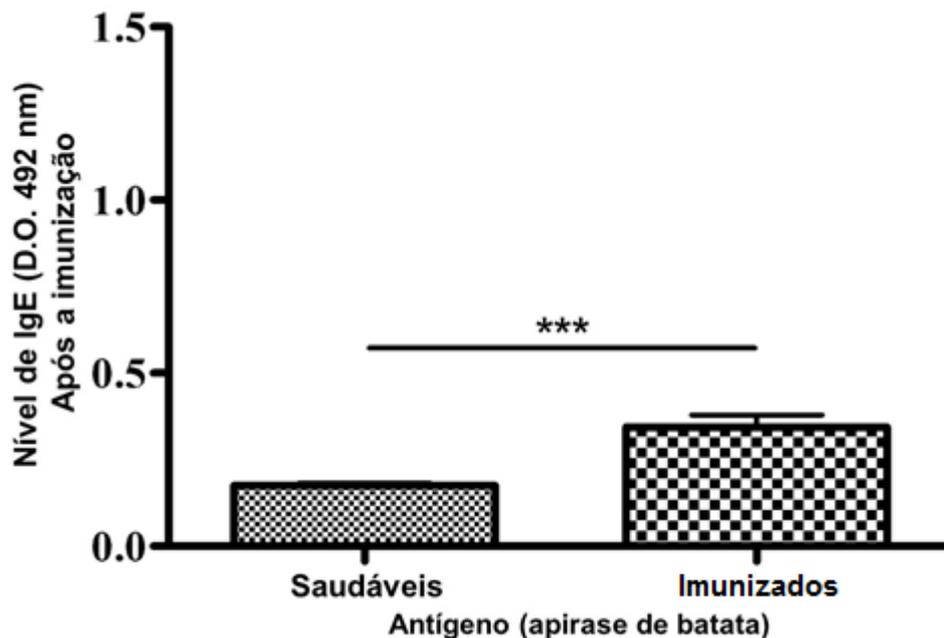
Para remover a influência de anticorpos de IgG, as amostras foram tratadas com anticorpos anti-IgG de humanos (**FIGURA 15, B**). Os complexos de anticorpos foram removidos por centrifugação e o sobrenadante foi utilizado para a análise de reatividade. As amostras de pacientes com esquistossomose mostraram uma maior reatividade de anticorpos IgE ( $0,843 \pm 0,416$ ) quando comparada com os indivíduos saudáveis ( $0,238 \pm 0,154$ ) e 16 (80%) das 20 amostras foram positivas para a apirase de batata (**FIGURA 15, B**).



**Figura 15. Reatividade entre a apirase de batata e anticorpos IgE presentes em amostras de plasma de pacientes com esquistossomose. (A)** A reatividade de anticorpos IgE de amostras de plasma diluídas 1:50 de pacientes (em duplicata), de área endêmica (n = 102). Os resultados representam a média das densidades ópticas (D.O.). A linha pontilhada corresponde ao *cut off* (0,082) obtido pela média da densidade óptica mais duas vezes o desvio padrão de amostras do plasma obtidas de indivíduos saudáveis de áreas não-endêmicas para *S. mansoni* (grupo controle; n = 26). \*\*\* p <0,001. Em **(B)**, as amostras de plasma de pacientes com esquistossomose (n = 20) ou indivíduos saudáveis (grupo controle; n = 8) foram depletados de anticorpos IgG e, depois da centrifugação, os sobrenadantes foram diluídos 1:20 e a reatividade do anticorpo IgE foi testada em microplacas utilizando a apirase de batata como antígeno. A linha pontilhada corresponde ao *cut-off* (0,546). \* p <0,01.

#### 4.3.1 INDUÇÃO DE ANTICORPOS IgE PELA APIRASE DE BATATA EM CAMUNDONGOS C57BL/6

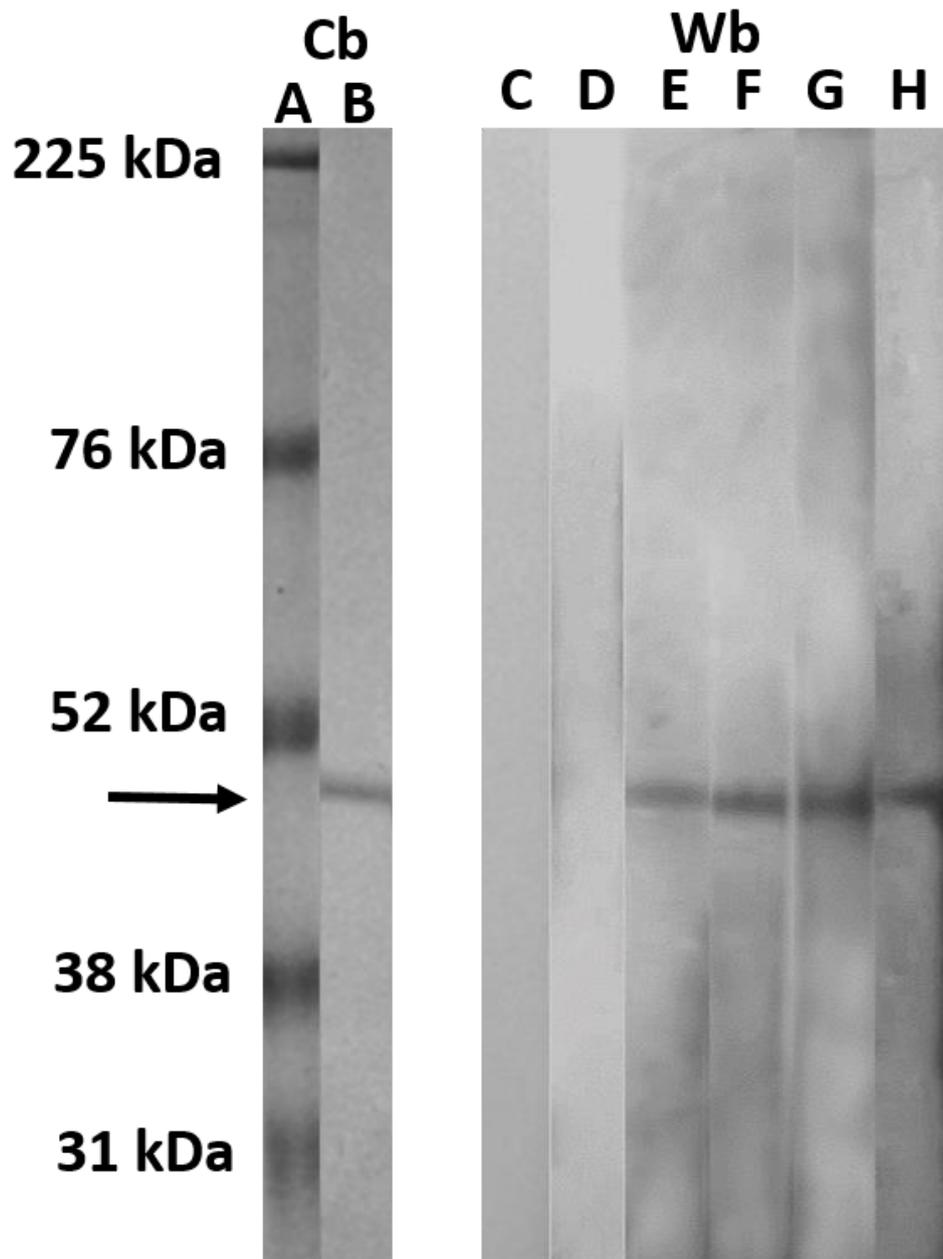
A indução da produção de anticorpos IgE pela apirase de batata foi observada em camundongos C57BL/6 ( $n = 4$ ). Para eliminar a interferência de anticorpos IgG, o *pool* das amostras de plasma foi pré-tratado com anti-IgG de camundongo (1:1; v / v). Como mostrado na **FIGURA 16**, a reatividade de anticorpos IgE dos camundongos imunizados com a proteína vegetal ( $0,344 \pm 0,10$ ;  $p < 0,001$ ) foi significativamente mais elevada do que aquela observada no grupo controle ( $0,176 \pm 0,021$ ).



**Figura 16. Reatividade entre a apirase de batata e anticorpos IgE de amostras de plasma de camundongos C57BL/6 imunizados.** Camundongos ( $n = 4$ ) foram imunizados com duas doses da apirase de batata ( $10 \mu\text{g}$ ) emulsificada em Adjuvante completo e Incompleto de Freund em um intervalo de 15 dias. O *pool* das amostras de plasma foi depletado de anticorpos IgG e utilizado na diluição 1:20, em duplicatas, para a quantificação do nível de anticorpos IgE em placas de microtitulação de ELISA, usando a apirase de batata como antígeno. A revelação foi feita com anticorpo secundário anti-IgE de camundongo conjugado a peroxidase na diluição de 1: 10.000 e OPD /  $\text{H}_2\text{O}_2$  usados como substrato. \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### **4.3.2 REATIVIDADE DA APIRASE DE BATATA COM ANTICORPOS IgE DOS PLASMAS DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS OU INFECTADOS COM *S. mansoni* E DE PACIENTES COM ESQUISTOSSOMOSE POR WESTERN BLOTTING**

A apirase purificada de *Solanum tuberosum* (7ug) foi ressuspensa em tampão Tris-HCL 50 mM, pH 7,4 com 8% sacarose e inibidores de proteases e submetida à eletroforese em gel desnaturante SDS-PAGE 10%. Após a corrida, parte do gel contendo a proteína vegetal foi usada para coloração com Comassie Blue (**Cb**), como mostra a **FIGURA 17 (B)**, a apirase de batata foi obtida com alto grau de pureza e peso ~ 50 kDa (**seta**). A outra parte do gel foi eletrotransferida para membranas de nitrocelulose que foram incubadas com anticorpos IgE do plasma de camundongos C57BL/6 saudáveis IgG depletados (1:50) (**FIGURA 17, C**) e anticorpos IgE do plasma de pacientes saudáveis (**FIGURA 17, D**); com anticorpos IgE do plasma de camundongos C57BL/6 imunizados com a apirase de batata IgG depletados (1:50) (**FIGURA 17, F**), anticorpos IgE do plasma de camundongos C57BL/6 infectados com *S. mansoni* IgG depletados (**FIGURA 17, G**) (1:50) e também foram incubadas com anticorpos IgE do plasma de pacientes doentes (**FIGURA 17, H**) da região do Caju (Governador Valadares-MG). Anticorpos IgG anti-apirase de batata de coelho foram utilizados apenas como controle positivo neste experimento, uma vez que essa reatividade já foi relatada na literatura (**FIGURA 17, E**).



**Figura 17. Reatividade da apirase de batata com anticorpos IgE do plasma de pacientes ou de camundongos por *Western blotting*.** Alíquotas da apirase de batata (7  $\mu$ g) foram submetidas a corrida eletroforética em gel de poliacrilamida, coradas com Comassie Blue (**B**), eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose, para *western blot* (**Wb**) e incubadas com plasma de camundongos saudáveis (**C**) e plasma de pacientes saudáveis (**D**), ambos na diluição de 1:50 e previamente depletados de seu conteúdo de IgG. Anticorpos IgG do plasma de coelho imunizado com apirase de batata foram aplicados como controle positivo (**E**) (1:3.000); **F**: plasma de camundongos imunizados com a apirase de batata; **G**: plasma de camundongos infectados com *S. mansoni* (IgG depletados; 1:50) e **H**: plasma de pacientes com esquistossomose. **A**: Padrão de massa molecular (GE healthcare).

#### 4.3.3 IDENTIFICAÇÃO DAS SmATPDases DE *S. mansoni* POR ANTICORPOS IgE DO PLASMA DE PACIENTES COM ESQUISTOSSOMOSE POR WESTERN BLOTTING

Com o objetivo de preservar a atividade das SmATPDases de *S. mansoni* e separá-las parcialmente de outras proteínas, alíquotas de homogeneizado total de vermes adultos (100 µg) foram submetidas a eletroforese em gel não desnaturante. Após a corrida, o gel foi lavado em tampão e incubado com ATP, substrato das enzimas como descrito em Material e Métodos. As bandas resultantes da atividade enzimática, visualizadas por meio do precipitado de fosfato de cálcio, foram cortadas do gel não desnaturante e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10%, e posteriormente ao *Western blotting* (**FIGURA 18**).

Na revelação do *Western Blotting*, as isoformas de SmATPDases parcialmente purificadas de vermes adultos (**FIGURA 18**) mostram reatividade com os anticorpos IgE do *pool* das amostras de plasma de pacientes com esquistossomose depletadas de anticorpos IgG. Os anticorpos reconheceram três polipeptídeos de cerca de 91, 63 e 55 kDa (**FIGURA 18, B**). Os anticorpos policlonais do plasma de coelho anti-apirase de batata reconheceram a banda de 63 kDa (**FIGURA 18, A**) identificando a SmATPDase parcialmente purificada e, adicionalmente, o polipeptídeo de 91 kDa no verme.



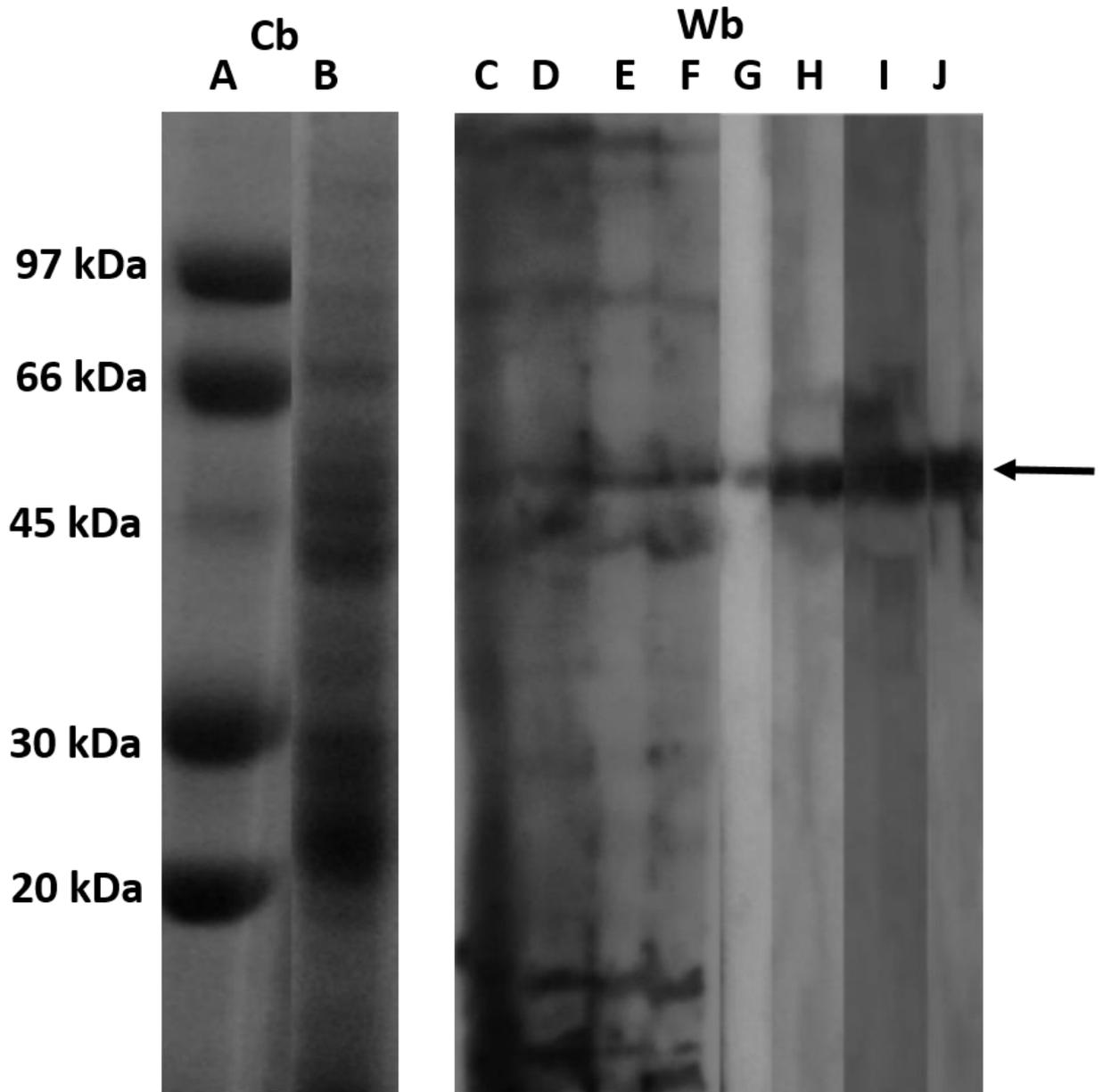
**Figura 18. Reatividade de anticorpos IgE de plasmas de humanos com SmATPDases de *S. mansoni*.** Alíquotas (100 µg) de homogeneizado total de vermes adultos foram submetidas à eletroforese não desnaturante utilizando os detergentes DOC e Triton X100, o gel foi incubado com CaCl e o substrato ATP. As bandas de atividade foram cortadas e submetidas à separação eletroforética em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% e eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose para análise por *Western blotting*. As membranas foram incubadas 24 horas a 4 ° C com pool de amostras de plasma diluído 1:20 pré-depletados de anticorpos IgG obtidas a partir de pacientes com esquistossomose (**B**). Plasma imune policlonal de coelho anti-actinase de batata diluído a 1: 1000 foi usado como controle positivo (**A**). Como anticorpos secundários foram utilizados anti-IgE (Zymed) de humanos (**B**) ou anti-IgG de coelho (GE) (**A**) ligados a peroxidase e DAB / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como substrato.

#### **4.4 REATIVIDADE DE ANTICORPOS IgE DO PLASMA DE PACIENTES SAUDÁVEIS OU DOENTES COM NTPDase DE MACRÓFAGOS POR WESTERN BLOTTING**

Uma vez que anticorpos IgG de alguns pacientes saudáveis já reagiram em menor proporção com a apirase de batata (dados não mostrados), nós acreditamos na existência de anticorpos naturais nesses indivíduos, capazes de reagir com isoformas de NTPDases. Desta forma, foi analisado se anticorpos IgE presentes nos plasmas de indivíduos saudáveis e doentes de duas áreas endêmicas distintas também reagiriam com macrófagos RAW 264.7, células que possuem NTPDases, enzimas pertencentes à mesma família da proteína vegetal, as quais possuem massa molecular aproximada de 50 kDa por possuírem 6 sítios de glicosilação (Kaczmarek et al., 1996, Kansas, 1991).

Macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram ressuspensos em tampão Tris-HCL 50 mM, pH 7,4 com 8% sacarose e inibidores de proteases e processados para a obtenção do homogeneizado de células (100 µg) que foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida. Após a corrida, parte do gel contendo as proteínas foi usada para coloração com Comassie Blue (**Cb**) (**FIGURA 19, B**) e a outra parte foi eletrotransferida para membranas de nitrocelulose, para western blott (**Wb**), que foram incubadas com os plasmas de pacientes saudáveis e com esquistossomose de duas áreas distintas, Caju (Governador Valadares-MG) e Tabuas (Montes Claros-MG).

A revelação por quimioluminescência com anticorpos IgE do plasma de pacientes com esquistossomose do Caju (Governador Valadares-MG) (**FIGURA 19, C**) e saudáveis dessa região (**FIGURA 19, D**) e de Tabuas (Montes Claros-MG), pacientes doentes (**FIGURA 19, E**) e saudáveis (**FIGURA 19, F**), mostrou algumas bandas com diferentes massas moleculares, dentre elas, uma banda de 55 KDa (seta) possivelmente correspondente à uma isoforma de NTPDase 1 de macrófagos, também reconhecida pelo anticorpo IgG anti-CD39 (**FIGURA 19, G**) neste ensaio. Além disso, anticorpos IgG de pacientes com esquistossomose do Caju (**FIGURA 19, H**) ou pacientes saudáveis (**FIGURA 19, I**) e anticorpos IgM de pacientes saudáveis (**FIGURA 19, J**) reconheceram a mesma banda de mesmo peso molecular (55 kDa).



**Figura 19.** Reatividade de anticorpos IgE, IgG e IgM do plasma de pacientes saudáveis ou com esquistossomose com NTPDase de macrófagos por *Western blotting*. Frações de 100 µg de proteínas de homogeneizado de macrófagos RAW 264.7 foram submetidas a separação eletroforética em gel de poliacrilamida, coradas com Comassie Blue (**Cb**, **B**), (**A**): Padrão de alto massa molecular (GE healthcare). Outras frações foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com plasma (1:50) de paciente com esquistossomose da região do Caju (Governador Valadares-MG) e reveladas com anticorpos anti-IgE (**C**); plasma (1:50) de pacientes saudáveis desta mesma região (**D**); plasma (1:50) de pacientes com esquistossomose oriundos da região de Tabuás (Montes Claros-MG) (**E**); plasma (1:50) de pacientes saudáveis da região de Tabuás (**F**); com anticorpos IgG anti-CD39

(**G**); com plasma (1:500) de pacientes com esquistossomose e revelados anticorpos com anti-IgG (**H**); com plasma (1:500) de pacientes saudáveis revelados com anti-IgG (**I**) e com plasma de pacientes saudáveis revelados com anticorpos anti-IgM (**J**). Todos os plasmas humanos utilizados para a reatividade de anticorpos IgE foram previamente depletados do conteúdo de IgG total. Como anticorpos secundários foram utilizados anti-IgG de coelho (1:2.000, GE) (**G, H, I**), anti-IgE de humanos (1:1000, Zymed) (**C,D,E,F**) e anti-IgM (1:2000, Bethyl) (**J**) ligados a peroxidase e DAB / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como substrato.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 O PAPEL IMUNOMODULATÓRIO DA APIRASE DE BATATA NA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI

As doenças tropicais negligenciadas (DTN) são doenças parasitárias que acometem um grande contingente de pessoas em todo o mundo, principalmente nas áreas mais pobres. Dentre estas doenças, as helmintíases têm importante destaque, sendo a esquistossomose a maior representante (BETHONY et al., 2010; RICCIARDI & NDAO, 2015). Atualmente, as análises proteômica e do transcriptoma têm sido direcionadas em busca de novos alvos terapêuticos do parasito que estejam localizadas no seu tegumento (BETHONY et al., 2010).

Uma vez que as isoformas de NTPDases estão presentes nas diferentes fases do ciclo de vida de *S. mansoni* (VASCONCELOS et al 1993, 1996; DeMARCO, 2003; FARIA-PINTO et al 2004;LEVANO-GARCIA, et al, 2007) e possuem localização predominantemente no tegumento, foi sugerido que estas isoformas desempenham um papel importante no metabolismo de nucleotídeos do parasito (DA'DARA et al., 2014 b).

Trabalhos anteriores mostram que o movimento dos vermes adultos sobre o endotélio vascular e/ou a passagem dos ovos pelo mesmo pode resultar na liberação de DAMPs (padrões moleculares associados ao dano) como o ATP. Esta secreção promove o estímulo de uma resposta imune inflamatória capaz de levar o parasito à morte. As enzimas que utilizam o ATP extracelular como substrato e estão presentes no tegumento podem garantir a sobrevivência dos vermes adultos de *S. mansoni* em seu hospedeiro, por serem capazes de eliminar uma grande parte do sinal de dano. Dentre este conjunto de enzimas se encontram as isoformas de NTPDases do vermes adultos de *S. mansoni* (VASCONCELOS et al, 1996; BHARDWAJ et al., 2009; DA'DARA et al., 2014 a e b ).

A isoforma SmATPDase 1 do parasito, presente em elevada proporção no tegumento, tem a habilidade de modificar a concentração de nucleotídeos do microambiente do verme e assim, foi sugerido que pode ser considerada um fator de virulência para *S. mansoni* (WILSON et al., 2012). Da mesma forma, trabalhos mais recentes utilizando RNAi para as enzimas SmATPDase 1 e 2, aplicado a cultura de vermes adultos de *S. mansoni*, revelou que a hidólise de nucleotídeos oriundos do

meio extremo, está diretamente relacionada a presença e atividade da isoforma de SmATPDase 1 (DA'DARA et al., 2014 b).

No aspecto estrutural e imunológico, já foi demonstrado pelo nosso grupo que os anticorpos produzidos contra a apirase de batata, proteína vegetal com alta homologia com as SmATPDases (FARIA-PINTO et al., 2008), reagem de forma cruzada com estas isoformas do parasito (VASCONCELOS et al., 1996; FARIA-PINTO et al, 2004; 2006; VASCONCELOS et al., 2009). Os anticorpos anti-apirase de batata são capazes de reconhecer as isoformas de ATP difosfohidrolase presentes nos ovos e vermes adultos de *S. mansoni* (FARIA PINTO et al., 2004; 2006; 2008), Ensaio posteriores revelaram que esta homologia era ainda maior com a isoforma SmATPDase 2, que é uma isoforma solúvel e secretada (MENDES et al., 2012).

Neste trabalho, a imunização de camundongos C57BL/6 com a apirase de batata induziu a produção de níveis significativos de anticorpos IgG e IgG1 após imunização. Em torno de 60 dias após a infecção, os níveis de IgG e IgG1 dos animais imunizados mantiveram-se mais elevados que os níveis observados nos animais apenas infectados (controles). Esses dados demonstram que a apirase de batata induz de forma significativa a produção de anticorpos e que esses níveis se mantêm após a infecção, possivelmente, pelo estímulo induzido pelos epitopos compartilhados com as SmATPDases do parasito. Os níveis de IgG1, imunoglobulina associada à resposta Th2 em camundongos, durante a progressão da esquistossomose, estão frequentemente relacionados com a regulação negativa do granuloma e morte do parasito (ZOUAIN et al., 2000).

Após a ovoposição os antígenos eliminados pelos ovos do parasito são os principais responsáveis pela mudança no perfil de resposta imune de Th1 para uma resposta predominante Th2 (COLLEY et al., 2014). Resultados anteriores do nosso grupo mostraram que os níveis de anticorpos IgG1 de camundongos da linhagem Swiss, imunizados com proteína vegetal e infectados com *S. mansoni*, reagiram de forma significativa com antígenos solúveis do ovo (SEA) (dados não publicados). Além disso, Levano-Garcia e colaboradores (2008) observaram que a imunização de camundongos C57BL/6 com as isoformas de SmATPDases recombinantes do parasito induziram uma predominância de IgG1 em relação à imunização com as isoformas isoladas.

Foi possível observar que a apirase de batata induziu uma produção significativa de IFN- $\gamma$ . Esta produção foi significativa em ambos os grupos, tanto em

camundongos apenas infectados com *S. mansoni* quanto em camundongos imunizados com proteína vegetal e infectados em resposta à estimulação com a apirase de batata. Entretanto, no grupo apenas infectado, a produção de IFN- $\gamma$  foi menor do que no grupo imunizado com a proteína e posteriormente infectado. A partir desses resultados podemos sugerir que os epitopos compartilhados entre as SmATPDases do parasito e da proteína vegetal induzem a produção dessa citocina e essa produção é acentuada pela imunização prévia com a apirase. O IFN- $\gamma$  pode ser produzido por células NK, NKT, células Th1CD4<sup>+</sup> e células TCD8<sup>+</sup>. As células NKT são consideradas células T que compartilham algumas características com células NK e células T. Esse tipo celular, NKT, possui receptor TCR, restrição CD1d e produzem altos níveis de IL-4 e IFN- $\gamma$  quando estimuladas por glicolipídeos (Godfrey et al., 2000). Em camundongos, cerca de 85% dessas células estão no fígado e na esquistossomose mansoni, células dendríticas estimuladas por antígenos secretados pelos ovos induzem a produção IL-4 e IFN- $\gamma$  por células NKT (MALLEVAEY et al., 2006).

No trabalho de Melo e colaboradores (2013), foi demonstrado que SmTeg (tegumento do esquistossômulo de *S. mansoni*) induziu proteção (43,1%) em camundongos C57BL/6 ao ser administrado com adjuvante alumínio e oligonucleotídeo CpG, induzindo a produção de IFN- $\gamma$  e IgG2c. A imunização com esse mesmo antígeno, utilizando o adjuvante de Freund, promoveu proteção de 43-48% com indução de IFN- $\gamma$ , IgG1 e IgG2c, mas na ausência de adjuvante não houve proteção apesar de ter ocorrido significativa produção de anticorpos (STEPHENSON, 2014). A apirase de batata, sob nossas condições experimentais não conferiu proteção parasitológica embora tenha induzido a produção de um perfil de anticorpos e citocinas similares. É provável que devido à existência de oito isoformas de NTPDases em mamíferos e o compartilhamento de epitopos com a apirase de batata, a imunização tenha induzido um perfil regulatório da resposta imunológica ao helminto, induzindo, além do IFN- $\gamma$ , outras citocinas.

Em camundongos da linhagem C57BL/6, há produção de IgG2c em vez de IgG2a devido a uma deleção para o gene (Zhang et al., 2012) responsável pela produção deste anticorpo mas há uma reatividade cruzada entre IgG2a e IgG2c. A IgG2c também está relacionada com a resposta Th1 e o “switching” para esse subtipo é dependente de citocinas sinalizadoras, tais como IFN- $\gamma$ , assim como para IgG2a.

Isso retrata a observação de níveis de IgG2c significativos (dados não mostrados) após a imunização dos camundongos C57BL/6 com a apirase de batata.

O IFN- $\gamma$  acentua a função microbicida de macrófagos que podem matar os parasitos por mecanismo citotóxico direto, mas *in vitro* esse mecanismo não foi observado no estágio de esquistossômulo pulmonar. Assim, foi sugerido que essa citocina coordena o bloqueio físico da migração dos esquistossômulos através dos vasos pulmonares por regular a produção de várias moléculas de adesão (WILSON et al., 1996). Essa citocina exerce também funções de regulação para limitar o dano tecidual associado à inflamação e modula a resposta T *helper* e diferenciação de células Treg (HU et al., 2009). Na esquistossomose murina, a produção de IFN- $\gamma$  e IL-10 tem um pico inicial durante a evolução das lesões e a injeção com anticorpo monoclonal anti-IL10 aumenta a área granulomatosa mais precocemente (BOROS & WHITFIELD, 1998).

No desenvolvimento do granuloma, macrófagos e células T secretam IL-10 (BOROS & WHITFIELD, 1998), uma potente citocina anti-inflamatória que modula a resposta granulomatosa *in vitro* e também induz apoptose das células T. Esta citocina tem um papel crítico para a sobrevivência do hospedeiro durante a infecção por *S. mansoni* (HOFFMANN, 1999; CARVALHO et al., 2006). Camundongos mutantes para IL-10 desafiados com ovos de *Schistosoma* ou infectados com *S. mansoni* desenvolvem uma resposta imune Th1/Th2 co-dominante. Esse mix de resposta resulta em aumento no tamanho do granuloma hepático, principalmente na fase aguda da infecção (HOFFMANN, 1999). Sun e colaboradores (2012) observaram que a proteína recombinante Sj16 de *Schistosoma japonicum* induziu um aumento de células TCD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> *in vitro* e *in vivo* e uma produção significativa de IFN- $\gamma$  e IL-10. Os autores sugeriram que o IFN- $\gamma$  pode ter funções paradoxas de maneira contexto-específica para a doença e que o antígeno rSj16 induz um subgrupo de células T regs que expressam IFN- $\gamma$  e IL-10, citocinas que também foram induzidas pela apirase de batata no presente trabalho.

Na esquistossomose, os antígenos contidos em amostras de SEA (antígenos solúveis do ovo) podem induzir células T regulatórias, criando no fígado um mecanismo regulatório para estabilizar a resposta imune e limitar a imunopatologia. Em 2011 (MENDES), um trabalho de nossa equipe mostrou que anticorpos produzidos contra um peptídeo sintético (SmB2LJ) derivado de um domínio conservado da SmATPDase 2 do parasito, reconheceu e localizou, por

imunifluorescência, essa proteína em ovos presentes em granulomas hepáticos de camundongos infectados. A SmATPDase 2 de *S. mansoni* possui maior identidade com a apirase de batata do que a SmATPDase 1 (FARIA-PINTO, 2008). Além disso, é importante ressaltar que essa isoforma está expressa em maior quantidade no ovo do parasito em relação às outras formas, sendo secretada por vermes adultos, em cultura (LEVANO-GARCIA et al., 2007). Assim, os resultados apresentados para a proteína vegetal sugerem que a isoforma solúvel da NTPDase de *S. mansoni* pode influenciar a produção de IFN- $\gamma$  e o aumento das células regulatórias na área granulomatosa.

Embora as células Th1 sejam iniciadoras relativamente pobres de resposta de anticorpos, por ser uma resposta típica celular, elas participam da troca de classes de anticorpos liberando IFN- $\gamma$  que, de forma preferencial, induz a troca de classes para IgG2a e IgG2c. Em camundongos, IL-4 induz, preferencialmente, a troca para IgG1 e IgE (MURPHY, TRAVERS & WALPORT, 2010). Neste trabalho, observamos que a apirase de batata induziu de forma significativa a produção de IFN- $\gamma$ , IgE, IgG2a e IgG2c em camundongos, mas não foi possível verificarmos a produção de IL-4. Novos experimentos serão necessários para avaliar a produção dos anticorpos e das citocinas citadas em momentos mais específicos ao longo da imunização e/ou infecção.

Foi observado que a apirase de batata reduziu significativamente a área do granuloma, o que pode estar relacionado com o aumento das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10, uma vez que os níveis IL-10 controlam o balanço entre a destruição do ovo e o dano tecidual prevenindo a intensa deposição de tecido fibrótico. Estas propriedades antifibróticas permitem que a IL-10 module a deposição de matriz extracelular e atue com o IFN- $\gamma$  sinergicamente para prevenir a fibrose severa, tal como sugerido por Arnaud e colaboradores (2008).

IFN- $\gamma$  é também a citocina anti-fibrogênica mais potente produzida no granuloma, uma vez que esta citocina age por inibir a produção de proteínas da matriz extracelular, aumenta a atividade da colagenase no tecido do fígado (SOUZA et al., 2012), ao contrário da IL-13 que aumenta a deposição de colágeno no granuloma e pode contribuir para a fibrose hepática em humanos infectados por *Schistosoma* (DESSEIN et al., 2004). Os dados obtidos para IL-13 não revelaram a capacidade da imunização com a apirase em estimular a produção desta citocina, que também mostrou níveis baixos em todos os grupos experimentais.

Citocinas como IFN-  $\gamma$  e TNF- $\alpha$  reduzem a intensidade da resposta Th2 e também a produção de IL-13, ativando macrófagos a aumentar a expressão da óxido nítrico sintase induzível, em detrimento da ativação da arginase (PEARCE et al., 2002). Mata-Santos e colaboradores (2014) mostraram que o tratamento com a droga silimarina de camundongos infectados com *S. mansoni*, uma substância hepatoprotetora composta de flavolignanas, causou a redução no tamanho dos granulomas e aumentou a taxa IFN- $\gamma$ /IL-13 com diminuição da produção de hidroxiprolina hepática.

Nas condições experimentais selecionadas, a imunização com a apirase de batata não induziu a produção significativa de IL-13. Nesse período de infecção, em torno de 60 dias pós-infecção, a maioria dos granulomas se encontram na fase exsudativa produtiva, onde se inicia a produção de matriz extracelular e de fibras (LENZI et al., 1998; 1999). Em relação às fibras colágenas, notamos que no grupo imunizado com a proteína, há uma redução da área periovular, com aparente redução do número de fibras colágenas, com um aspecto mais concêntrico e menos frouxo, associado a uma redução do infiltrado celular. A literatura aponta para granulomas tendo o início de sua fase produtiva (70 dias após a infecção) com o mesmo padrão de fibras tipicamente concêntrico observado para a imunização com a proteína vegetal (LENZI et al., 1999). Dessa forma, podemos concluir que a apirase de batata promoveu nos animais imunizados e infectados uma redução no perfil inflamatório e aceleração no processo de resolução dos granulomas.

O granuloma é rico em células Th2, eosinófilos e macrófagos M2 que protegem o tecido de toxinas liberadas pelos ovos do parasito, além de formar uma barreira física entre os ovos e o tecido (HAMS & AVIELLO, 2013). A imunização com a apirase de batata induziu a produção de IL-5, uma vez que somente os animais imunizados e posteriormente infectados apresentaram produção significativa dessa citocina. Podemos sugerir que regiões da proteína vegetal induzem essa produção de IL-5, contrariamente a este processo, os esplenócitos dos animais somente infectados não apresentaram produção significativa de IL-5. Essa citocina é importante mediadora de eosinofilia na medula óssea e de sobrevivência dos eosinófilos na periferia, os quais estão entre os tipos celulares mais abundantes nos granulomas induzidos por *S. mansoni* (LINS et al., 2008; REIMAN et al., 2006).

Entretanto, a eosinofilia não necessariamente é dependente da produção de IL-5 uma vez que camundongos deficientes nesta citocina também possuem níveis

basais de eosinófilos que migram para os sítios de infecção por parasitos. A IL-5 também pode ter outras funções como indução da secreção de IgA e no desenvolvimento de células B1, as quais apresentam receptores para esta citocina. Células B-1 são tidas como fontes principais de anticorpos naturais IgM (MATTHAEI, FOSTER & YOUNG, 1997; MOON et al., 2004), os quais podem ser induzidos por NTPDases ou por epítomos não similares entre a apirase de batata e as SmATPDases, uma vez que apenas esplenócitos de animais imunizados e posteriormente infectados apresentaram produção significativa de IL-5.

Já foi mostrado que a capacidade de eosinófilos de matar os esquistossômulos por meio da ADCC aumenta em proporção com o grau de eosinofilia (THOMSON & LOTZE, 2003), tendo importante função na eliminação de detritos teciduais e promovendo a destruição de miracídios e ovos (LINS et al., 2008). Essas células são rapidamente recrutadas em resposta a patógenos ou alérgenos que elicitam uma resposta Th2 ainda na ausência da imunidade adaptativa e são o tipo celular dominante na produção de IL-5 na cavidade peritoneal de camundongos inoculados com ovos do parasito (SPENCER et al., 2010). A imunização com a apirase de batata não induziu proteção e também não foi observada diferença semi-quantitativa por meio de microscópio de campo claro na produção global de eosinófilos teciduais e sanguíneos entre os grupos imunizados e/ou infectados (dados não mostrados).

Infecções por helmintos estão associadas a uma resposta Th2 que é modulada pela expansão de populações de células regulatórias como Tregs, Mregs e Bregs (NUTMAN et al., 2015). Além destas células, eosinófilos que têm sido associados na manutenção da imunidade contra parasitas helmínticos, tendo também a capacidade de expressar e liberar a citocina imunossupressora IL-10 (DAVOINE et al., 2014). É possível que a imunização com a apirase de batata induzindo a produção de IL-5, que é uma mediadora da eosinofilia, concomitante com a produção de IL-10, seja um dos principais motivos da redução da área do granuloma. Assim, podemos sugerir um perfil regulatório da proteína, não definindo uma tendência para um tipo de resposta Th1 e/ou Th2, predominantemente. Dessa forma, mais estudos são necessários com essa proteína para elucidar os tipos de células que estão envolvidos na secreção destas citocinas após a imunização.

O estímulo antigênico parece ser o principal fator indutor da formação de células gigantes multinucleadas. As citocinas IFN- $\gamma$ , IL-4 e TNF- $\alpha$  liberadas de linfócitos T ativados promovem a diferenciação de fagócitos mononucleares em

células epitelióides que se fundem gerando células gigantes multinucleadas (FARAH et al., 2000; DI VIRGILIO et al., 1998). Essas células estão presentes em tecidos onde partículas estranhas são muito grandes para serem fagocitadas por macrófagos como na esquistossomose e em outras doenças inflamatórias crônicas (BRODBECK & ANDERSON, 2009).

Na esquistossomose mansoni, os granulomas apresentam células gigantes de dois tipos, localizadas longe dos ovos – as quais são ricas em pigmentos esquistossomóticos – e células que se localizam no topo da casca dos ovos – que são dominantes e são mais facilmente encontradas nos estágios produtivos e involutivos de evolução dos granulomas (LENZI et al., 1998). Pela análise histológica, observamos no grupo imunizado com a apirase de batata houve um maior número de células gigantes multinucleadas próximas aos ovos dos granulomas. Normalmente, as células gigantes multinucleadas são mais constantes nos granulomas de 80 a 100 dias de infecção, e neste trabalho, os camundongos foram eutanaziados com 60 dias de infecção, o que demonstra o surgimento quantitativo precoce dessas células nos grupos imunizados, as quais corroboram para o efeito imunomodulador exercido pela imunização que promoveu uma redução na área granulomatosa.

A escolha de um antígeno para estudar mecanismos protetores na esquistossomose é uma tarefa difícil devido à complexidade antigênica do parasito e diversas formas de fuga à resposta imune do hospedeiro. Neste contexto, várias moléculas já foram testadas em modelo murino como potenciais candidatos a vacina. Uma vez que esquistossomos não se multiplicam no hospedeiro mamífero e os ovos depositados nos tecidos do hospedeiro vertebrado são o principal responsável pela patologia (THETIOT-LAURENT, 2013), um antígeno que induza a redução da área afetada pelo granuloma, com resolução precoce da inflamação pode ser muito promissor para diminuir a morbidade na esquistossomose.

## **5.2 A APIRASE DE BATATA E A REATIVIDADE COM ANTICORPOS IgE**

Existe uma controvérsia a respeito do perfil de resposta na esquistossomose humana em relação à resistência e susceptibilidade a infecção. O perfil Th1 tem sido associado à proteção contra infecção em indivíduos naturalmente resistentes, os quais apresentaram altos níveis de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . No entanto, a correlação entre altos níveis de IgE, cuja produção é induzida por resposta imune do tipo Th2, e

resistência à infecção e reinfecção tem sido descrita. Entretanto, em humanos, o subtipo IgG4, também Th2, tem sido associado à susceptibilidade à infecção (CARVALHO-QUEIROZ et al., 2004). Durante a infecção normal pelo *Schistosoma*, à medida que tem início a ovoposição, a resposta imune se altera para Th2 e há também um aumento dos níveis de IgE no plasma e de eosinófilos circulantes (ZHANG et al, 2006).

Os resultados obtidos a partir da imunização com a apirase de batata em camundongos C57BL/6 mostraram que essa proteína induziu níveis significativos de IL-5, a qual está fortemente relacionada a uma resposta Th2, o que estimulou a avaliação do perfil de resposta de anticorpos IgE contra o antígeno vegetal.

Para avaliar a reatividade cruzada dos anticorpos IgE presentes em amostras de plasmas de pacientes com esquistossomose moradores de áreas endêmicas, ensaios de ELISA aplicando a apirase como antígeno foram conduzidos. Os anticorpos IgE das amostras de plasmas dos reagiram de forma significativa com a apirase de batata em comparação com os indivíduos saudáveis. Das 102 amostras de plasmas, 80 (78% de plasmapositividade) foram reativas com a proteína vegetal. O grupo de pacientes infectados por *S. mansoni* vivendo em área endêmica foi composto de amostras de plasma de crianças (n=62; faixa etária 7-17 anos) e adultos (n=40; faixa etária 18-60 anos) com diagnóstico positivo para a infecção pelo método de Kato-Katz.

Para remover a influência de anticorpos IgG dos plasmas dos pacientes, doentes e saudáveis, uma vez que a alta concentração dessas imunoglobulinas pode alterar a reatividade de anticorpos IgE, as amostras de plasmas foram tratadas com IgG anti-humana. Muitos casos falsos negativos de reatividade para anticorpos IgE podem ocorrer devido a competição de IgG e IgE pelos mesmos epitopos (SOUZA-ATTA, 1999). Estudos prévios em humanos tem identificado a produção de autoanticorpos da classe IgG produzidos contra IgE. Estes anticorpos IgG podem se ligar especificamente a IgE ou ao receptor FcRI, ativando basófilos e mastócitos independente da ligação aos antígenos. Esse fato explica, pelo menos em parte, por que alguns indivíduos atópicos que tem elevados níveis de IgE específica para um alérgeno e nunca desenvolvem sintomas clínicos (CHAN et al., 2013).

Após a depleção do conteúdo de IgG, as amostras de pacientes com esquistossomose mantiveram uma maior reatividade de anticorpos IgE quando comparados com indivíduos saudáveis, e 80% das amostras foram plasmapositivas.

Estes resultados reafirmam a imunorreatividade cruzada entre a apirase de batata e isoformas de ATP difosfohidrolase de *S. mansoni* como já descrito anteriormente (FARIA-PINTO, 2008; VASCONCELOS et al., 2009; FARIA-PINTO et al., 2010), sugerindo que estas proteínas compartilham epítopos para anticorpos IgE.

Estudos epidemiológicos em humanos moradores de áreas endêmicas indicaram que o aumento nos níveis de IgE contra esquistossomos está estreitamente correlacionado com a resistência à reinfecção. Acreditam que os anticorpos IgE, na presença dos antígenos, estimulam mastócitos e basófilos a liberarem mediadores químicos para a diferenciação de eosinófilos. A citotoxicidade mediada pelos eosinófilos fica estimulada em função da liberação da enzima EPO (peroxidase eosinofílica) a qual é tóxica para os esquistossômulos. Já os níveis elevados dos anticorpos IgG4 contra o parasito estão correlacionados com o aumento da susceptibilidade ao helminto (ZHANG, 2006; NEGRAO-CORREA et al., 2014).

Trabalhos anteriores de nosso grupo, mostraram que anticorpos IgG4 presentes no plasma de pacientes com esquistossomose reagem com a apirase de batata (FARIA-PINTO et al., 2010). Anticorpos desse subtipo tem sua produção estimulada pela secreção de IL-10, uma citocina que apresentou níveis elevados, no presente trabalho, provavelmente sendo estimulada por regiões comuns entre a apirase de batata e as SmATPDases. Esta citocina regula a resposta inflamatória protegendo o tecido do hospedeiro de dano excessivo (VAN DE VEEN et al., 2013).

Camundongos e humanos possuem diferenças na ativação do sistema imune, tais como os fatores envolvidos na resposta alérgica, como os receptores Fc $\gamma$ RI e CD23, ambos expressos em mastócitos, basófilos e em células apresentadoras de antígenos em humanos, mas não em camundongos (GOULD & RAMADANI, 2015). De todas as espécies animais para se estudar a produção de IgE, o camundongo tem sido um modelo muito atrativo já que tem sido documentado por muitos anos a produção dessa imunoglobulina nesse modelo, com um sistema imune bem caracterizado e devido à variedade de cepas *inbred* para estudo (LEHRER et al., 2004).

A plasmapositividade da apirase de batata por ELISA com plasmas de pacientes com esquistossomose levou-nos à análise da produção de IgE anti-apirase de batata em camundongos C57BL/6 imunizados com a proteína vegetal. Para eliminar a grande concentração de IgG, as amostras de plasma foram pré-tratadas com anticorpos anti-IgG de camundongo. A reatividade de anticorpos IgE de

camundongos imunizados com a proteína vegetal foi significativamente maior do que a dos animais controle. Além dessa linhagem, também foi observada a produção de IgE em camundongos da linhagem Swiss imunizados com a apirase de batata (dados não publicados). Esses anticorpos IgE dos animais imunizados também reagem com antígenos solúveis do ovo (SEA) em ensaios de ELISA e Western blot, comprovando que os epitopos compartilhados entre a proteína vegetal e as do parasito podem induzir a produção de IgE (dados não mostrados). Na esquistossomose, tanto em humanos quanto em camundongos, já foi observado que os níveis de IgE específicos para antígenos do parasito aumentam após tratamento da doença devido à morte dos vermes e consequente exposição de antígenos ao sistema imune do hospedeiro (WALTER et al., 2006).

As SmATPDases e a apirase de batata compartilham epitopos que, em ensaios de ELISA, puderam ser observados através da elevada reatividade de anticorpos IgG das amostras de pacientes com esquistossomose e camundongos infectados contra a proteína vegetal (FARIA-PINTO, 2008; FARIA-PINTO, 2010). Como a proteína da batata reagiu com anticorpos IgE dos plasmas de pacientes com esquistossomose e induziu a produção desses anticorpos em camundongos, utilizamos o homogeneizado total de vermes adultos para comprovar a reatividade dos anticorpos IgE em técnicas de *Western blotting*.

Os ensaios mostraram três bandas imunorreativas com anticorpos IgE de aproximadamente 91, 63 e 55 kDa. A análise de *Western blotting* confirmou a reatividade do anticorpo IgE específico para isoformas ATP difosfohidrolases de 63 kDa, também identificadas utilizando anticorpo policlonal de coelho anti-apirase de batata, um plasma imune produzido contra a proteína vegetal, que compartilha epitopos com ambas isoformas, SmATPDase 1 e 2 de aproximadamente 63 kDa (VASCONCELOS, 1996; FARIA-PINTO, 2004; MENDES et al., 2011; FARIA-PINTO, 2008). Ambos os anticorpos IgE dos pacientes e anti-apirase de batata reconheceram uma banda de 91 kDa, que foi detectada pela primeira vez na em homogeneizado total de vermes adultos por Vasconcelos e colaboradores (1996). Esta banda da proteína pode ser o resultado de modificações pós-traducionais ainda não descritas para estas isoformas e ATP difosfohidrolases. Além disso, a banda de aproximadamente 55 kDa correspondente a isoforma SmATPDase 2, em homogeneizados de vermes também foi reconhecida por anticorpos IgE. Esses

resultados sugerem que as ATP difosfohidrolases de *S. mansoni* são importantes indutoras de anticorpos IgE.

A imunorreatividade entre os plasmas de pacientes com esquistossomose e a apirase de batata impulsionou nosso grupo, por meio de análises *in silico*, a busca por epitopos ligadores de IgE na ATP difosfohidrolase de *S. mansoni*. Foi observado que a SmATPDase 1 tem vários epitopos homólogos a alérgenos que estão no banco de dados e pode ser incluída entre as proteínas capazes de induzir a produção de IgE durante a progressão da esquistossomose (EMIDIO, 2013).

Fitzsimmons e colaboradores (2009) encontraram no genoma de *S. mansoni* uma família de proteínas composta de 13 membros *allergen-like*, as quais estão no tegumento do parasito (SmTAL), sendo que algumas são restritas a fases específicas do parasito. A reatividade do plasma de pacientes com esquistossomose com essas proteínas sugere que na área endêmica analisada há um aumento primário na resposta de IgE a SmTALs dos vermes adultos. Esses, podem morrer ao longo do período em que vivem no hospedeiro, ocorrer desensibilização da reatividade a SmTAL presente nos ovos do parasito devido a contínua exposição a estes, que estão morrendo no interior dos granulomas, e baixa imunogenicidade a SmTAL presente nas cercarias devido a eventos de imunossupressão que ocorrem na pele e são induzidos pelo parasito. Como as duas isoformas SmATPDases de *S. mansoni* são expressas em todos os estágios do ciclo de vida do parasito e tem diferenças quantitativas nos níveis de expressão nesses estágios, sugerimos que essas proteínas têm considerável importância metabólica na sobrevivência desses helmintos em seus hospedeiros e que podem promover diversas reações imunológicas distintas de acordo com a forma de apresentação destes antígenos.

Neste trabalho também avaliamos se os pacientes com esquistossomose de uma área endêmica para esquistossomose (Caju-Governador Valadares-MG) e plasmas de camundongos C57BL/6 (saudáveis, infectados com o parasito e de animais imunizados com a apirase de batata) reagiriam a proteína vegetal em *Western blotting*. O pool dos plasmas de pacientes e camundongos depletados dos conteúdos IgG reconheceram a proteína vegetal, presente nos resultados como uma banda em torno de 48kDa. Esses resultados confirmam os resultados obtidos pelo ELISA, mostrando mais uma vez que a apirase de batata tem regiões indutoras de IgE em modelo murino e que essas regiões são homólogas e compartilhadas com as proteínas do parasito.

O tipo de anticorpos e a concentração dos mesmos frente a antígenos do parasito sofre influência de diversos fatores, como idade, sexo, fatores genéticos, além do tratamento com drogas esquistossomicidas. Em um estudo com pacientes Senegaleses infectados com *S. mansoni*, os mesmos produziram diferentes respostas de anticorpos ao antígeno Sm28GST. Estudos utilizando plasmas de pacientes infectados com *Schistosoma* e a habilidade de reconhecer antígenos mostram que a frequência de reconhecimento de diferentes antígenos varia de forma significativa dentro de uma população (MUTAPI et al., 2001).

Em um estudo realizado no Brasil (CORREA-OLIVEIRA et al., 2000), foi observado que em áreas endêmicas há indivíduos saudáveis denominados “normais endêmicos” que não se infectam apesar do contato frequente com água potencialmente contaminada por cercárias. Esses pacientes apresentam exames de fezes negativos para o parasito em exames de fezes sucessivos, no entanto possuem resposta imune tanto celular quanto humoral contra antígenos de *S. mansoni* (CALDAS et al., 2000). Na esquistossomose experimental, foi observado que camundongos nascidos de fêmeas com esquistossomose modulam rapidamente as lesões causadas pelos ovos formando granulomas fibróticos precocemente (CALDAS et al., 2008). Os pacientes saudáveis também podem apresentar desta forma, reatividade contra os antígenos do parasito ou a ocorrência de anticorpos naturais que reagem cruzadamente com os antígenos do helminto. A produção de anticorpos naturais pode ocorrer independente de reatividade cruzada com antígenos externos e não associada a mecanismos específicos de resposta imune a antígenos ambientais, embora esses possam aumentar a produção dos mesmos. Essa produção é uma manifestação de autorreatividade fisiológica expressa em indivíduos saudáveis e representam uma resposta normal a antígenos próprios (COUTINHO, KAZATCHKINE & AVRAMEAS, 1995).

A apirase de batata possui identidade (22-29%) com a NTPDase 1 (CD39) de mamíferos (FARIA-PINTO et al., 2008) que está presente em várias células do sistema imunológico como linfócitos B, neutrófilos, células NK, células T e macrófagos, as quais contribuem para a homeostase do organismo (DWYER et al., 2007). Uma vez que anticorpos IgG dos plasmas de alguns pacientes saudáveis já reagiram com a apirase de batata, investigamos, no presente trabalho, se os anticorpos IgE dos plasmas dos pacientes dessas das regiões de Caju e Tabuas reagiriam com macrófagos da linhagem RAW 246.7.

Esses macrófagos foram processados para a obtenção do homogeneizado de células que foi submetido à eletroforese e *Western blotting*. Neste experimento, amostras de plasma, IgG-depletados dos pacientes saudáveis e com esquistossomose pertencentes às duas áreas, Caju e Tabuas, foram analisados. Como controle, anticorpos IgG anti-CD39 foram aplicados, reconhecendo uma banda de 55 kDa nesta preparação. Além disso, utilizamos anticorpos IgG do plasma de pacientes doentes, de pacientes saudáveis e anticorpos IgM de pacientes saudáveis da região de Caju que também reconheceram apenas uma banda de mesmo peso que o anti-CD39. Os anticorpos IgM são os primeiros a serem produzidos na resposta primária a um antígeno, podem ser produzidas em respostas secundárias mas outras classes predominam a fase tardia de uma resposta de anticorpos, como a classe IgG (MURPHY, TRAVERS & WALPORT, 2010).

O reconhecimento da banda de 55 kDa por anticorpos IgG e IgM de pacientes saudáveis, principalmente IgM que é o principal isotipo de anticorpo natural produzido (SILOSI et al., 2016), reforça a ideia da existência de anticorpos naturais também da classe IgE nesses indivíduos pois anticorpos IgE dos plasmas dos pacientes de ambas regiões, tanto saudáveis quanto doentes, reconheceram 5 bandas e dentre elas, uma banda de 55 kDa, a mesma reconhecida por anticorpos IgG anti-CD39.

A autorreatividade pode ser definida como uma resposta de anticorpos para antígenos próprios e isso não necessariamente está ligado a uma resposta autoimune (Zeller et al., 2008). Autoanticorpos naturais de diferentes isotipos tem sido muito estudados, sendo que a maioria é da classe IgM (70-80% da IgM circulante), os quais são polireativos, com baixa afinidade de ligação mas com alta avidéz, permitindo que clones de células B produtoras de anticorpos naturais possam ser rapidamente ativadas por um antígeno estranho ou auto-antígeno, proporcionando tempo para que haja uma resposta adaptativa mais específica aos antígenos estranhos. Esses autoanticorpos podem participar de vários processos imunes como manutenção da homeostase, resistência a infecções e regulação da resposta imune (LOBO, 2016; SILOSI et al., 2016).

Na homeostase, células apoptóticas são eliminadas por macrófagos residentes nos tecidos, do contrário, essas células podem se acumular e levar à inflamação, quebra da tolerância e consequente patogênese autoimune. As células apoptóticas liberam citocinas anti-inflamatórias como IL-10 precocemente, as quais sinalizam uma tolerância para os macrófagos. No caso do Lúpus Eritematoso Sistêmico, doença

autoimune, foi mostrado que há uma diminuição na capacidade fagocítica de macrófagos dos pacientes com a doença (WU et al., 2016).

A lâmina própria é constantemente exposta a alta pressão antigênica, como bactérias comensais, antígenos derivados de alimentos e patógenos, representando assim um ambiente apropriado para a geração de Tregs que contribui para a homeostase (PALOMARES et al., 2010). Além das células do hospedeiro, muitos patógenos (*E.coli*, *S. aureus*, *S. agalactiae*, *T. gondii* e *T. vaginalis*) possuem uma maquinaria *like* CD39/CD73 que pode auxiliá-los na colonização do hospedeiro. Esta evidência sugere que muitos patógenos podem manipular a via de sinalização da adenosina em benefício próprio como estratégia de fuga do sistema imunológico do hospedeiro (ALAM et al., 2015). A adenosina resulta de nucleotídeos como ATP que é catabolizado por enzimas como CD39 e CD73, que são expressas em várias células, e age sobre diversas células do sistema imune, mediando principalmente efeitos anti-inflamatórios por inibir a ativação das mesmas e consequente dano tecidual (Bono, 2015).

Uma vez que CD39 está presente em várias células do sistema imune e além disso alguns patógenos da microbiota humana podem ter essa enzima, sugerimos que os pacientes que reconhecem a apirase de batata produzam anticorpos contra epitopos compartilhados entre CD39 e a proteína vegetal na manutenção da homeostase e na regulação e defesa imunológica contra patógenos. Muitos fatores podem influenciar a reatividade de IgE desses indivíduos como já mencionado anteriormente, assim será necessário trabalhar individualmente com cada plasma desses pacientes, em outras técnicas experimentais, para verificar a resposta de anticorpos IgE frente a essa família de proteínas. Nossos resultados mostram que o antígeno apirase de batata não é vacinal, mas tem uma atuação importante na modulação da resposta imune frente à esquistossomose, entretanto, pode ser aplicado em diversas doenças uma vez que as NTPDases estão envolvidas em vários processos fisiológicos e patológicos.

## 6. CONCLUSÕES

**6.1** A apirase de batata induz a produção de anticorpos IgG e de citocinas como IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-5 em camundongos imunizados com a proteína vegetal e infectados com *S. mansoni* em camundongos C57BL/6 sugerindo um papel regulatório dessa proteína na infecção experimental.

**6.2** A apirase de batata não induziu proteção em camundongos C57BL/6 sob o protocolo utilizado nesta tese, mas mostrou um caráter imunomodulatório sobre o granuloma do parasito nos animais imunizados com essa proteína.

**6.3** A apirase de batata induz a produção de anticorpos IgE em camundongos C57BL/6 e reage com anticorpos IgE do plasma de pacientes com esquistossomose ou com anticorpos IgE do plasma de camundongos infectados com *S. mansoni* sugerindo que os epitopos compartilhados entre a apirase de batata e as SmATPDases podem induzir a produção desses anticorpos na progressão da doença.

## 7. REFERÊNCIAS

- Abdul-Ghani, R., N. Loutfy, A. el-Sahn and A. Hassan (2009). "Current chemotherapy arsenal for schistosomiasis mansoni: alternatives and challenges." **Parasitol Res** **104**(5): 955-965.
- Akuthota, P., Wang, H.B., Spencer, L.A., Weller, P.F. 2008. Immunoregulatory roles of eosinophils: a new look at a familiar cell. **Clin Exp Allergy** **38**(8): 1254–1263.
- Alam, M. S., M. G. Costales, C. Cavanaugh and K. Williams (2015). "Extracellular adenosine generation in the regulation of pro-inflammatory responses and pathogen colonization." **Biomolecules** **5**(2): 775-792.
- Antonioli, L., Pacher, P., Vizi, E.S., Haskó, G. 2013. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. **Trends Mol Med.** **19**(6): 355–367.
- Aragon, A. D., R. A. Imani, V. R. Blackburn, P. M. Cupit, S. D. Melman, T. Goronga, T. Webb, E. S. Loker and C. Cunningham (2009). "Towards an understanding of the mechanism of action of praziquantel." **Mol Biochem Parasitol** **164**(1): 57-65.
- Arnaud V, Li J, Wang Y, Mengzhi, S., Li, J., Hou, X., Luo, X., Dessein, H., Jie, Z., Xin-Ling, Y., He, H., McManus, D.P., Li, Y., Dessein, A (2008). Regulatory role of interleukin-10 and interferon- $\gamma$  in severe hepatic central and peripheral fibrosis in humans infected with *Schistosoma japonicum*. **J Infect Dis** **198**: 418–426.
- Bermudes, D., K. R. Peck, M. A. Afifi, C. J. Beckers and K. A. Joiner (1994). "Tandemly repeated genes encode nucleoside triphosphate hydrolase isoforms secreted into the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*." **J Biol Chem** **269**(46): 29252-29260.
- Bethony, J. M., R. N. Cole, X. Guo, S. Kamhawi, M. W. Lightowers, A. Loukas, W. Petri, S. Reed, J. G. Valenzuela and P. J. Hotez (2011). "Vaccines to combat the neglected tropical diseases." **Immunol Rev** **239**(1): 237-270.
- Bhardwaj, R. and P. J. Skelly (2009). "Purinergic signaling and immune modulation at the schistosome surface?" **Trends Parasitol** **25**(6): 256-260.
- Bono, M. R., D. Fernandez, F. Flores-Santibanez, M. Roseblatt and D. Sauma (2015). "CD73 and CD39 ectonucleotidases in T cell differentiation: Beyond immunosuppression." **FEBS Lett.**
- Boros, D. L. and J. R. Whitfield (1998). "Endogenous IL-10 regulates IFN-gamma and IL-5 cytokine production and the granulomatous response in *Schistosomiasis mansoni*-infected mice." **Immunology** **94**(4): 481-487.
- Boros, D.L., Revankar, S.G. 2010. Granulomatous Diseases. *Infectious Disease & Antimicrobial Agents*. <http://www.antimicrobe.org/new/e37.asp> / acesso 28/11/2016 10:22.

Bouaziz, J. D., H. Le Buanec, A. Saussine, A. Bensussan and M. Bagot (2012). "IL-10 producing regulatory B cells in mice and humans: state of the art." **Curr Mol Med** **12**(5): 519-527.

Burke, M. L., M. K. Jones, G. N. Gobert, Y. S. Li, M. K. Ellis and D. P. McManus (2009). "Immunopathogenesis of human schistosomiasis." **Parasite Immunol** **31**(4): 163-176.

Brodbeck, W.G., Anderson, J.M (2009). Giant cell formation and function. **Curr Opin Hematol.** **16** (1):53-7.

Caldas, I. R., A. C. Campi-Azevedo, L. F. Oliveira, A. M. Silveira, R. C. Oliveira and G. Gazzinelli (2008). "Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection." **Acta Trop** **108**(2-3): 109-117.

Caldas, I. R., R. Correa-Oliveira, E. Colosimo, O. S. Carvalho, C. L. Massara, D. G. Colley and G. Gazzinelli (2000). "Susceptibility and resistance to *Schistosoma mansoni* reinfection: parallel cellular and isotypic immunologic assessment." **Am J Trop Med Hyg** **62**(1): 57-64.

Capron, A., M. Capron, D. Dombrowicz and G. Riveau (2001). "Vaccine strategies against schistosomiasis: from concepts to clinical trials." **Int Arch Allergy Immunol** **124**(1-3): 9-15.

Cardoso, F. C., R. N. Pacifico, R. A. Mortara and S. C. Oliveira (2006). "Human antibody responses of patients living in endemic areas for schistosomiasis to the tegumental protein Sm29 identified through genomic studies." **Clin Exp Immunol** **144**(3): 382-391.

Carvalho-Queiroz, C., R. Cook, C. C. Wang, R. Correa-Oliveira, N. A. Bailey, N. K. Egilmez, E. Mathiowitz and P. T. LoVerde (2004). "Cross-reactivity of *Schistosoma mansoni* cytosolic superoxide dismutase, a protective vaccine candidate, with host superoxide dismutase and identification of parasite-specific B epitopes." **Infect Immun** **72**(5): 2635-2647.

Carvalho, E. M., L. S. Bastos and M. I. Araujo (2006). "Worms and allergy." **Parasite Immunol** **28**(10): 525-534.

Carvalho, O.S., Coelho, P.Z., Lenzi, H.L (2008). *Schistosoma mansoni* e esquistossomose. Uma visão multidisciplinar, Fiocruz, Rio de Janeiro, 1123 pp.

Chan, J. D., M. Zarowiecki and J. S. Marchant (2013). "Ca<sup>2</sup>(+) channels and praziquantel: a view from the free world." **Parasitol Int** **62**(6): 619-628.

Chitsulo, L., D. Engels, A. Montresor and L. Savioli (2000). "The global status of schistosomiasis and its control." **Acta Trop** **77**(1): 41-51.

Cheever, A.W., Lenzi, J.A., Lenzi, H.L., Andrade, Z.A. Experimental Models of *Schistosoma mansoni* Infection. 2002. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, **97**(7): 917-940.

Cioli, D., L. Pica-Mattoccia, A. Basso and A. Guidi (2014). "Schistosomiasis control: praziquantel forever?" **Mol Biochem Parasitol** **195**(1): 23-29.

Coelho, P. M. Z., A. D. Jurberg, Á. A. Oliveira and N. Katz (2009). "Use of a saline gradient for the diagnosis of schistosomiasis." **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **104**: 720-723.

Coimbra, E. S., S. C. Goncalves-da-Costa, S. Corte-Real, F. G. De Freitas, A. C. Durao, C. S. Souza, M. I. Silva-Santos and E. G. Vasconcelos (2002). "Characterization and cytochemical localization of an ATP diphosphohydrolase from *Leishmania amazonensis* promastigotes." **Parasitology** **124**(Pt 2): 137-143.

Colley, D. G., J. A. Cook, G. L. Freeman, Jr., R. K. Bartholomew and P. Jordan (1977). "Immune responses during human schistosomiasis mansoni. I. In vitro lymphocyte blastogenic responses to heterogeneous antigenic preparations from schistosome eggs, worms and cercariae." **Int Arch Allergy Appl Immunol** **53**(5): 420-433.

Colley, D. G. and W. E. Secor (2014). "Immunology of human schistosomiasis." **Parasite Immunol** **36**(8): 347-357.

Correa-Oliveira, R., I. Rodrigues Caldas, O. A. Martins-Filho, C. Carvalho Queiroz, J. R. Lambertucci, J. Renan Cunha-Melo, A. Soares Silveira, A. Prata, A. Wilson and G. Gazzinelli (2000). "Analysis of the effects of treatment of human *Schistosoma mansoni* infection on the immune response of patients from endemic areas." **Acta Trop** **77**(1): 141-146.

Couto, L. D., S. H. Tibirica, I. O. Pinheiro, A. Mitterofhe, A. C. Lima, M. F. Castro, M. Goncalves, M. R. Silva, R. J. Guimaraes, F. M. Rosa and E. S. Coimbra (2014). "Neglected tropical diseases: prevalence and risk factors for schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis in a region of Minas Gerais State, Brazil." **Trans R Soc Trop Med Hyg** **108**(6): 363-371.

Coutinho, A., Kazatchkine, M.D., Avrameas, S (1995). Natural autoantibodies. **Curr Opin Immunol.**, **7**(6):812-8.

Da'dara, A. A., R. Bhardwaj, Y. B. Ali and P. J. Skelly (2014). "Schistosome tegumental ecto-apyrase (SmATPDase1) degrades exogenous pro-inflammatory and pro-thrombotic nucleotides." **PeerJ** **2**: e316.

Da'dara, A. A., R. Bhardwaj and P. J. Skelly (2014). "Schistosome apyrase SmATPDase1, but not SmATPDase2, hydrolyses exogenous ATP and ADP." **Purinergic Signal** **10**(4): 573-580.

Davoine, F. and P. Lacy (2014). "Eosinophil cytokines, chemokines, and growth factors: emerging roles in immunity." **Front Immunol** **5**: 570.

Dema,B., Pellefigues, C., Hasni, S., Gault, N.,Jiang,C.,Ricks,T.K., Bonelli, M.M.,Scheffel, J.,Sacré, K., Jablonski, M., Gobert, D., Papo, K., Daugas, E., Gabor Illei, N.C.,Rivera, J. Autoreactive IgE Is Prevalent in Systemic Lupus Erythematosus and Is Associated with Increased Disease Activity and Nephritis. **PLoS One**, **9**(2): e90424.

- DeMarco, R., A. T. Kowaltowski, R. A. Mortara and S. Verjovski-Almeida (2003). "Molecular characterization and immunolocalization of *Schistosoma mansoni* ATP-diphosphohydrolase." **Biochem Biophys Res Commun** **307**(4): 831-838.
- Dessein, A., B. Kouriba, C. Eboumbou, H. Dessein, L. Argiro, S. Marquet, N. E. Elwali, V. Rodrigues, Y. Li, O. Doumbo and C. Chevillard (2004). "Interleukin-13 in the skin and interferon-gamma in the liver are key players in immune protection in human schistosomiasis." **Immunol Rev** **201**: 180-190.
- Di Virgillio, F., Chiozzi, P., Falzoni, S., Ferrari, D., Sanz, J.M., Venketaraman, V., Baricordi, O.L (1998). Cytolytic P2X purinoreceptors, Cell Death Differ, 5 (3): 1991-1999.
- Dewals, B., J. C. Hoving, W. G. Horsnell and F. Brombacher (2010). "Control of *Schistosoma mansoni* egg-induced inflammation by IL-4-responsive CD4(+)CD25(-)CD103(+)Foxp3(-) cells is IL-10-dependent." **Eur J Immunol** **40**(10): 2837-2847.
- Dunne, D. W., M. Webster, P. Smith, J. G. Langley, B. A. Richardson, A. J. Fulford, A. E. Butterworth, R. F. Sturrock, H. C. Kariuki and J. H. Ouma (1997). "The isolation of a 22 kDa band after SDS-PAGE of *Schistosoma mansoni* adult worms and its use to demonstrate that IgE responses against the antigen(s) it contains are associated with human resistance to reinfection." **Parasite Immunol** **19**(2): 79-89.
- Dwyer, K. M., S. Deaglio, W. Gao, D. Friedman, T. B. Strom and S. C. Robson (2007). "CD39 and control of cellular immune responses." **Purinergic Signal** **3**(1-2): 171-180.
- El Ridi, R., R. Salem, A. Wagih, N. Mahana, M. El Demellawy and H. Tallima (2006). "Influence of interleukin-2 and interferon-gamma in murine schistosomiasis." **Cytokine** **33**(5): 281-288.
- Esmat, G. and M. E. Raziky (2009). "Antischistosomal therapy: Current status and recent developments." **Arab J Gastroenterol** **10**(1): 1-3.
- Teixeira, F.C., Neuhauss, E., Ben, R., Romanzini, J., Graeff-Teixeira, C. (2007). "Detection of *Schistosoma mansoni* eggs in feces through their interaction with paramagnetic beads in a magnetic field." **PLoS Negl Trop Dis** **1**(2): e73.
- Emidio, N. B. Identificação de potenciais epítomos ligadores de anticorpos da classe IgE na estrutura da proteína SmATPDase1 de *Schistosoma mansoni*. **Universidade Federal de Juiz de Fora**, 2013. 45p.
- Farah, I.O., Nyindo, M., King, C.L., Hau, J (2000). Hepatic Granulomatous Response to *Schistosoma mansoni* eggs in BALB/c Mice and Olive Baboons (*Papio cynocephalus anubis*). *J. Comp. Path.*, v. 123: 7-14.
- Faria-Pinto, P.; Rezende-Soares F.A.; Molica, A. M.; Monstesano, M. A.; Marques, M.J.; Rocha, M.O.C.; Gomes, J. A. S.; Enk, M.J.; Correa-Oliveira, R.; Coelho, P. M. Z.; Neto S.M.; Franco O.L.; Vasconcelos, E. G. 2008. 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., M. N. Meirelles, H. L. Lenzi, E. M. Mota, M. L. Penido, P. M. Coelho and E. G. Vasconcelos (2004). "ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni* egg: characterization and immunocytochemical localization of a new antigen." **Parasitology** 129(Pt 1): 51-57.

Faria-Pinto, P., M. N. Meirelles, H. L. Lenzi, E. M. Mota, M. L. Penido, P. M. Coelho and E. G. Vasconcelos (2006). "Cross-immunoreactivity between anti-potato apyrase antibodies and mammalian ATP diphosphohydrolases: potential use of the vegetal protein in experimental schistosomiasis." **Mem Inst Oswaldo Cruz** 101 Suppl 1: 359-363.

Faria-Pinto, P., R. G. Mendes, C. Carvalho-Campos, A. C. Maia, A. A. Oliveira, P. M. Coelho and E. G. Vasconcelos (2010). "Detection of IgG1 and IgG4 subtypes reactive against potato apyrase in schistosomiasis patients." **Mem Inst Oswaldo Cruz** 105(4): 370-373.

Faria-Pinto, P., M. A. Montesano, A. A. Jacinto, R. S. Santos, F. H. Bordin, A. P. Ferreira, M. L. Penido, P. M. Coelho and E. G. Vasconcelos (2010). "Antibody reactivity against potato apyrase, a protein that shares epitopes with *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase isoforms, in acute and chronically infected mice, after chemotherapy and reinfection." **Mem Inst Oswaldo Cruz** 105(4): 374-379.

Faria-Pinto, P., F. A. Rezende-Soares, A. M. Molica, M. A. Montesano, M. J. Marques, M. O. Rocha, J. A. Gomes, M. J. Enk, R. Correa-Oliveira, P. M. Coelho, S. M. Neto, O. L. Franco and E. G. Vasconcelos (2008). "Mapping of the conserved antigenic domains shared between potato apyrase and parasite ATP diphosphohydrolases: potential application in human parasitic diseases." **Parasitology** 135(8): 943-953.

Farnell, E. J., N. Tyagi, S. Ryan, I. Chalmers, A. Pinot de Moria, J. Wawrzyniak, F. Jones, C. M. Fitzsimmons, E. M. Tukahebwa, N. Furnham, R. Maizels and D. Dunne (2015). "Known allergen structures predict *Schistosoma mansoni* IgE binding antigens in human infection." **Frontiers in Immunology** 6.

Ferrari, M. L., P. M. Coelho, C. M. Antunes, C. A. Tavares and A. S. da Cunha (2003). "Efficacy of oxamniquine and praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* infection: a controlled trial." **Bull World Health Organ** 81(3): 190-196.

Fietto, J. L., R. DeMarco, I. P. Nascimento, I. M. Castro, T. M. Carvalho, W. de Souza, M. T. Bahia, M. J. Alves and S. Verjovski-Almeida (2004). "Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*." **Biochem Biophys Res Commun** 316(2): 454-460.

Fitzsimmons, C. M. and D. W. Dunne (2009). "Survival of the fittest: allergology or parasitology?" **Trends Parasitol** 25(10): 447-451.

Fitzsimmons, C. M., F. H. Falcone and D. W. Dunne (2014). "Helminth Allergens, Parasite-Specific IgE, and Its Protective Role in Human Immunity." **Front Immunol** **5**: 61.

Flohr, C., R. J. Quinnell and J. Britton (2009). "Do helminth parasites protect against atopy and allergic disease?" **Clin Exp Allergy** **39**(1): 20-32.

Gaze, S., P. Driguez, M. S. Pearson, T. Mendes, D. L. Doolan, A. Trieu, D. P. McManus, G. N. Gobert, M. V. Periago, R. Correa Oliveira, F. C. Cardoso, G. Oliveira, R. Nakajima, A. Jasinkas, C. Hung, L. Liang, J. Pablo, J. M. Bethony, P. L. Felgner and A. Loukas (2014). "An immunomics approach to schistosome antigen discovery: antibody signatures of naturally resistant and chronically infected individuals from endemic areas." **PLoS Pathog** **10**(3): e1004033.

Godfrey, D. I., K. J. Hammond, L. D. Poulton, M. J. Smyth and A. G. Baxter (2000). "NKT cells: facts, functions and fallacies." **Immunol Today** **21**(11): 573-583.

Gomes, L. I., M. J. Enk and A. Rabello (2014). "Diagnosing schistosomiasis: where are we?" **Rev Soc Bras Med Trop** **47**(1): 3-11.

Gryseels, B. (2012). "Schistosomiasis." **Infectious Disease Clinics of North America** **26**(2): 383-397.

Gryseels, B., K. Polman, J. Clerinx and L. Kestens (2006). "Human schistosomiasis." **Lancet** **368**(9541): 1106-1118.

Hams, E., G. Aviello and P. G. Fallon (2013). "The schistosoma granuloma: friend or foe?" **Front Immunol** **4**: 89.

Handa, M. and G. Guidotti (1996). "Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*)." **Biochem Biophys Res Commun** **218**(3): 916-923.

Helming, L.; Gordon, S. The molecular basis of macrophage fusion.2007. **Immunobiology**, **212**: 785–793.

Hoffmann, K. F., S. L. James, A. W. Cheever and T. A. Wynn (1999). "Studies with double cytokine-deficient mice reveal that highly polarized Th1- and Th2-type cytokine and antibody responses contribute equally to vaccine-induced immunity to *Schistosoma mansoni*." **J Immunol** **163**(2): 927-938.

Hu, X. and L. B. Ivashkiv (2009). "Cross-regulation of signaling pathways by interferon-gamma: implications for immune responses and autoimmune diseases." **Immunity** **31**(4): 539-550.

Jeleszarova, E. and H. U. Lutz (2005). "IgG naturally occurring antibodies stabilize and promote the generation of the alternative complement pathway C3 convertase." **Mol Immunol** **42**(11): 1393-1403.

Jurberg, A. D. and P. J. Brindley (2015). "Gene function in schistosomes: recent advances toward a cure." **Front Genet** **6**: 144.

Jurberg, A. D., A. A. Oliveira, H. L. Lenzi and P. M. Coelho (2008). "A new miracidia hatching device for diagnosing schistosomiasis." **Mem Inst Oswaldo Cruz** **103**(1): 112-114.

Kanthi, Y. M., N. R. Sutton and D. J. Pinsky (2014). "CD39: Interface between vascular thrombosis and inflammation." **Curr Atheroscler Rep** **16**(7): 425.

Kearney, J. F., P. Patel, E. K. Stefanov and R. G. King (2015). "Natural antibody repertoires: development and functional role in inhibiting allergic airway disease." **Annu Rev Immunol** **33**: 475-504.

Kettlun, A. M., V. Espinosa, L. Garcia and M. A. Valenzuela (2005). "Potato tuber isoapyrases: substrate specificity, affinity labeling, and proteolytic susceptibility." **Phytochemistry** **66**(9): 975-982.

Khalife, J., C. Cetre, C. Pierrot and M. Capron (2000). "Mechanisms of resistance to *S. mansoni* infection: the rat model." **Parasitol Int** **49**(4): 339-345.

Kanthi, Y.M., Sutton, N.R., Pinsky, D.J (2014). CD39: Interface between vascular thrombosis and inflammation. **Curr Atheroscler Rep**.**16**(7):425.

Knol, E. F. (2006). "Requirements for effective IgE cross-linking on mast cells and basophils." **Mol Nutr Food Res** **50**(7): 620-624.

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. (2010). "Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered." **Mem Inst Oswaldo Cruz** **105**(4): 422-435.

Lehrer, S. B., R. Reish, J. Fernandes, P. Gaudry, G. Dai and G. Reese (2004). "Enhancement of murine IgE antibody detection by IgG removal." **J Immunol Methods** **284**(1-2): 1-6.

Lenzi, H.L., (1998). Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biomechanical approaches. Memórias Instituto Oswaldo Cruz, v. 93, p.141-151.

LENZI, H. L., Schechtman, H., Pelajo-Machado, M.,Vale, B.S., Panasco, M.S., Lenzi, J.A. (1999). Collagen arrangement in hepatic granuloma in mice infected with *Schistosoma mansoni*: dependence on fiber radiation centers. **Braz J Med Biol Res**, **v.32**, p. 639-643.

Leshem E, Meltzer E, Marva E, Schwartz E. 2009. Travel-related schistosomiasis acquired in Laos. **Emerg Infect Dis**.**15**:1823–6 10.

Levano-Garcia, J., R. A. Mortara, S. Verjovski-Almeida and R. DeMarco (2007). "Characterization of *Schistosoma mansoni* ATPDase2 gene, a novel apyrase family member." **Biochem Biophys Res Commun** **352**(2): 384-389.

Lins, R. A., C. B. Cavalcanti, J. L. Araujo-Filho, M. R. Melo-Junior and M. E. Chaves (2008). "[Distribution of eosinophils at different stages of hepatic granuloma evolution in mice infected with *Schistosoma mansoni*]." **Rev Soc Bras Med Trop** **41**(2): 173-178.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." **J Biol Chem** **193**(1): 265-275.

Lundy, S.K. & Lukacs, N.W (2013). Chronic schistosome infection leads to modulation of granuloma formation and systemic immune suppression. **Frontiers in Immunology**, **4**(39): 1-18.

Lutz, H. U. (2007). "Homeostatic roles of naturally occurring antibodies: an overview." **J Autoimmun** **29**(4): 287-294.

Lutz, H. U., C. J. Binder and S. Kaveri (2009). "Naturally occurring auto-antibodies in homeostasis and disease." **Trends Immunol** **30**(1): 43-51.

Lutz, H. U. and S. Miescher (2008). "Natural antibodies in health and disease: an overview of the first international workshop on natural antibodies in health and disease." **Autoimmun Rev** **7**(6): 405-409.

Maia, A. C., M. L. Detoni, G. N. Porcino, T. V. Soares, M. A. do Nascimento Gusmao, M. R. Fessel, M. J. Marques, M. A. Souza, P. M. Coelho, J. A. Estanislau, M. O. da Costa Rocha, M. de Oliveira Santos, P. Faria-Pinto and E. G. Vasconcelos (2011). "Occurrence of a conserved domain in ATP diphosphohydrolases from pathogenic organisms associated to antigenicity in human parasitic diseases." **Dev Comp Immunol** **35**(10): 1059-1067.

Majlessi, L., R. Lo-Man and C. Leclerc (2008). "Regulatory B and T cells in infections." **Microbes Infect** **10**(9): 1030-1035.

Mallevaey, T., J. P. Zanetta, C. Faveeuw, J. Fontaine, E. Maes, F. Platt, M. Capron, M. L. de-Moraes and F. Trottein (2006). "Activation of invariant NKT cells by the helminth parasite *Schistosoma mansoni*." **J Immunol** **176**(4): 2476-2485.

Mangan, N. E., R. E. Fallon, P. Smith, N. van Rooijen, A. N. McKenzie and P. G. Fallon (2004). "Helminth infection protects mice from anaphylaxis via IL-10-producing B cells." **J Immunol** **173**(10): 6346-6356.

Mata-Santos, H. A., F. F. Dutra, C. C. Rocha, F. G. Lino, F. R. Xavier, L. A. Chinalia, B. H. Hossy, M. T. Castelo-Branco, A. J. Teodoro, C. N. Paiva and A. dos Santos Pyrrho (2014). "Silymarin reduces profibrogenic cytokines and reverses hepatic fibrosis in chronic murine schistosomiasis." **Antimicrob Agents Chemother** **58**(4): 2076-2083.

Matthaei, M., Foster, P.S., Young, I.G (1997). The Role of Interleukin-5 (IL-5 ) in Vivo: Studies with IL-5 Deficient Mice. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, **92** (II): 63-68.

Mbow, M., B. M. Larkin, L. Meurs, L. J. Wammes, S. E. de Jong, L. A. Labuda, M. Camara, H. H. Smits, K. Polman, T. N. Dieye, S. Mboup, M. J. Stadecker and M. Yazdanbakhsh (2013). "T-helper 17 cells are associated with pathology in human schistosomiasis." **J Infect Dis** **207**(1): 186-195.

Mendes, R. G., M. A. Gusmao, A. C. Maia, L. Detoni Mde, G. N. Porcino, T. V. Soares, M. A. Juliano, L. Juliano, P. M. Coelho, H. L. Lenzi, P. Faria-Pinto and E. G. Vasconcelos (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." **Mem Inst Oswaldo Cruz** **106**(7): 808-813.

Moon, B., Takaki, S., Miyake, K., Takatsu, K (2004). The Role of IL-5 for Mature B-1 Cells in Homeostatic Proliferation, Cell Survival, and Ig Production. **J Immunol**, **172**:6020-6029.

Mutapi, F. (2001). "Heterogeneities in anti-schistosome humoral responses following chemotherapy." **Trends Parasitol** **17**(11): 518-524.

Mutapi, F., P. D. Ndhlovu, P. Hagan and M. E. Woolhouse (1997). "A comparison of humoral responses to *Schistosoma haematobium* in areas with low and high levels of infection." **Parasite Immunol** **19**(6): 255-263.

Negrao-Correa, D., J. F. Fittipaldi, J. R. Lambertucci, M. M. Teixeira, C. M. Antunes and M. Carneiro (2014). "Association of *Schistosoma mansoni*-specific IgG and IgE antibody production and clinical schistosomiasis status in a rural area of Minas Gerais, Brazil." **PLoS One** **9**(2): e88042.

Nutman, T. B. (2015). "Looking beyond the induction of Th2 responses to explain immunomodulation by helminths." **Parasite Immunol**.

Ozdemir, C., M. Akdis and C. A. Akdis (2009). "T regulatory cells and their counterparts: masters of immune regulation." **Clin Exp Allergy** **39**(5): 626-639.

Hernandez-pando, R., Bornstein, Q.L., Leon, D.A., Orozco, E.H., Madrigal, V.K., Cordero, E.M. 2000. Inflammatory cytokine production by immunological and foreign body multinucleated giant cells. **Immunology**, **100**: 352-358.

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.

Palomares, O., G. Yaman, A. K. Azkur, T. Akkoc, M. Akdis and C. A. Akdis (2010). "Role of Treg in immune regulation of allergic diseases." **Eur J Immunol** **40**(5): 1232-1240.

Pearce, E. J. and A. S. MacDonald (2002). "The immunobiology of schistosomiasis." **Nat Rev Immunol** **2**(7): 499-511.

Pinot de Moira, A., F. M. Jones, S. Wilson, E. Tukahebwa, C. M. Fitzsimmons, J. K. Mwatha, J. M. Bethony, N. B. Kabatereine and D. W. Dunne (2013). "Effects of treatment on IgE responses against parasite allergen-like proteins and immunity to reinfection in childhood schistosome and hookworm coinfections." **Infect Immun** **81**(1): 23-32.

Reiman, R. M., R. W. Thompson, C. G. Feng, D. Hari, R. Knight, A. W. Cheever, H. F. Rosenberg and T. A. Wynn (2006). "Interleukin-5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity." **Infect Immun** **74**(3): 1471-1479.

Reisner, H. M (2015). *Patologia: Uma Abordagem por Estudos de Casos*. Editora: Mc Graw Hill; Edição: 1ª.624 p.

Rezende-Soares, F. A., C. Carvalho-Campos, M. J. Marques, G. N. Porcino, N. L. Giarola, B. L. Costa, A. Taunay-Rodrigues, P. Faria-Pinto, M. A. Souza, V. A. Diniz, S. Corte-Real, M. A. Juliano, L. Juliano and E. G. Vasconcelos (2010). "Cytochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* promastigotes and identification of an antigenic and catalytically active isoform." **Parasitology** **137**(5): 773-783.

Rezende, S. A., V. R. Oliveira, A. M. Silva, J. B. Alves, A. M. Goes and L. F. Reis (1997). "Mice lacking the gamma interferon receptor have an impaired granulomatous reaction to *Schistosoma mansoni* infection." **Infect Immun** **65**(8): 3457-3461.

Ricciardi, A. and M. Ndao (2015). "Still hope for schistosomiasis vaccine." **Hum Vaccin Immunother**: 0.

Riveau, G., D. Deplanque, F. Remoue, A. M. Schacht, H. Vodougnon, M. Capron, M. Thiry, J. Martial, C. Libersa and A. Capron (2012). "Safety and immunogenicity of rSh28GST antigen in humans: phase 1 randomized clinical study of a vaccine candidate against urinary schistosomiasis." **PLoS Negl Trop Dis** **6**(7): e1704.

Robson, S. C., J. Sevigny and H. Zimmermann (2006). "The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance." **Purinergic Signal** **2**(2): 409-430.

Rofatto, H. K., B. O. Araujo-Montoya, P. A. Miyasato, J. Levano-Garcia, D. Rodriguez, E. Nakano, S. Verjovski-Almeida, L. P. Farias and L. C. Leite (2013). "Immunization with tegument nucleotidases associated with a subcurative praziquantel treatment reduces worm burden following *Schistosoma mansoni* challenge." **PeerJ** **1**: e58.

Ross, A. G., P. B. Bartley, A. C. Sleight, G. R. Olds, Y. Li, G. M. Williams and D. P. McManus (2002). "Schistosomiasis." **N Engl J Med** **346**(16): 1212-1220.

Ross, A. G., D. Vickers, G. R. Olds, S. M. Shah and D. P. McManus (2007). "Katayama syndrome." **Lancet Infect Dis** **7**(3): 218-224.

Sansom, F. M., S. C. Robson and E. L. Hartland (2008). "Possible effects of microbial ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases on host-pathogen interactions." **Microbiol Mol Biol Rev** **72**(4): 765-781, Table of Contents.

Santini-Oliveira, S., Coler, R.N., Parra, J., Veloso, V., Jayashankar, L., Pinto, P.M., Ciole, M.A., Bergquist, R., Reed, S.G., Tendler, M (2016). Schistosomiasis vaccine candidate Sm14/GLA-SE: Phase 1 safety and immunogenicity clinical trial in healthy, male adults. **Vaccine** **34**: 586–594.

Schramm, G. and H. Haas (2010). "Th2 immune response against *Schistosoma mansoni* infection." **Microbes Infect** **12**(12-13): 881-888.

Schramm, G., K. Mohrs, M. Wodrich, M. J. Doenhoff, E. J. Pearce, H. Haas and M. Mohrs (2007). "Cutting edge: IPSE/alpha-1, a glycoprotein from *Schistosoma mansoni* eggs, induces IgE-dependent, antigen-independent IL-4 production by murine basophils in vivo." **J Immunol** **178**(10): 6023-6027.

Silverman, G. J. (2015). "Protective natural autoantibodies to apoptotic cells: evidence of convergent selection of recurrent innate-like clones." **Ann N Y Acad Sci**.

Souza-Atta, M. L., M. I. Araujo, A. D'Oliveira Junior, A. Ribeiro-de-Jesus, R. P. Almeida, A. M. Atta and E. M. Carvalho (1999). "Detection of specific IgE antibodies in parasite diseases." **Braz J Med Biol Res** **32**(9): 1101-1105.

Souza- Gomes, E. C., O. B. Leal-Neto, J. Albuquerque, H. Pereira da Silva and C. S. Barbosa (2012). "Schistosomiasis transmission and environmental change: a spatio-temporal analysis in Porto de Galinhas, Pernambuco--Brazil." **Int J Health Geogr** **11**: 51.

Souza Rda, P., L. S. Cardoso, G. T. Lopes, M. C. Almeida, R. R. Oliveira, L. M. Alcantara, E. M. Carvalho and M. I. Araujo (2012). "Cytokine and Chemokine Profile in Individuals with Different Degrees of Periportal Fibrosis due to *Schistosoma mansoni* Infection." **J Parasitol Res** **2012**: 394981.

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.

Spencer, L. A. and P. F. Weller (2010). "Eosinophils and Th2 immunity: contemporary insights." **Immunol Cell Biol** **88**(3): 250-256.

Stephenson, R., H. You, D. P. McManus and I. Toth (2014). "Schistosome Vaccine Adjuvants in Preclinical and Clinical Research." **Vaccines** **2**(3): 654-685.

Stone, K. D., C. Prussin and D. D. Metcalfe (2010). "IgE, mast cells, basophils, and eosinophils." **J Allergy Clin Immunol** **125**(2 Suppl 2): S73-80.

Sun, X. J., R. Li, X. Sun, Y. Zhou, Y. Wang, X. J. Liu, Q. Lu, C. L. Zhou and Z. D. Wu (2012). "Unique roles of *Schistosoma japonicum* protein Sj16 to induce IFN-gamma and IL-10 producing CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in vitro and in vivo." **Parasite Immunol** **34**(8-9): 430-439.

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

Tendler, M. and A. J. Simpson (2008). "The biotechnology-value chain: development of Sm14 as a schistosomiasis vaccine." **Acta Trop** **108**(2-3): 263-266.

Thetiot-Laurent, S. A., J. Boissier, A. Robert and B. Meunier (2013). "Schistosomiasis chemotherapy." **Angew Chem Int Ed Engl** **52**(31): 7936-7956.

Thomson, A.W. Lotze, M.T. The cytokine Handbook. 2003. 4<sup>th</sup> Edition. Academic Press.

Trautmann, A. (2009). "Extracellular ATP in the immune system: more than just a "danger signal"." **Sci Signal** **2**(56): pe6.

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

Utzinger, J., G. Raso, S. Brooker, D. De Savigny, M. Tanner, N. Ornberg, B. H. Singer and K. N'Goran E (2009). "Schistosomiasis and neglected tropical diseases: towards integrated and sustainable control and a word of caution." **Parasitology** **136**(13): 1859-1874.

Vasconcelos, E. G., P. Faria-Pinto, F. A. Rezende-Soares, M. L. Penido, S. C. Gonçalves-da-Costa and P. M. Coelho (2009). Potato apyrase: a new tool for parasitic disease research. **Global Science Books**. UK: 80-88.

Vasconcelos, E. G., S. T. Ferreira, T. M. Carvalho, W. Souza, A. M. Kettlun, M. Mancilla, M. A. Valenzuela and S. Verjovski-Almeida (1996). "Partial purification and immunohistochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni*. Immunological cross-reactivities with potato apyrase and *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase." **J Biol Chem** **271**(36): 22139-22145.

Vasconcelos, E. G., P. S. Nascimento, M. N. Meirelles, S. Verjovski-Almeida and S. T. Ferreira (1993). "Characterization and localization of an ATP-diphosphohydrolase on the external surface of the tegument of *Schistosoma mansoni*." **Mol Biochem Parasitol** **58**(2): 205-214.

Wang, Z., J. Hong, W. Sun, G. Xu, N. Li, X. Chen, A. Liu, L. Xu, B. Sun and J. Z. Zhang (2006). "Role of IFN-gamma in induction of Foxp3 and conversion of CD4+ CD25- T cells to CD4+ Tregs." **J Clin Invest** **116**(9): 2434-2441.

Wilson, R. A. (2012). "Virulence factors of schistosomes." **Microbes Infect** **14**(15): 1442-1450.

Wilson, R. A. and P. S. Coulson (2009). "Immune effector mechanisms against schistosomiasis: looking for a chink in the parasite's armour." **Trends Parasitol** **25**(9): 423-431.

Wilson, R. A., P. S. Coulson, C. Betts, M. A. Dowling and L. E. Smythies. 1996 "Impaired immunity and altered pulmonary responses in mice with a disrupted

interferon-gamma receptor gene exposed to the irradiated *Schistosoma mansoni* vaccine." **Immunology** **87**(2): 275-282.

Wood, K. J. and B. Sawitzki (2006). "Interferon gamma: a crucial role in the function of induced regulatory T cells in vivo." **Trends Immunol** **27**(4): 183-187.

Wu, H., Fu, S., Zhao, M., Lu, L., Lu, Q. 2016. Mechanisms in Systemic Lupus Erythematosus. *Molecules*, 22(30): 1-12.

Wynn, T. A. (2015). "Type 2 cytokines: mechanisms and therapeutic strategies." **Nat Rev Immunol** **15**(5): 271-282.

Zeller, S., A. G. Glaser, M. Vilhelmsson, C. Rhyner and R. Cramer (2008). "Immunoglobulin-E-mediated reactivity to self antigens: a controversial issue." **Int Arch Allergy Immunol** **145**(2): 87-93.

Zhang, P. and F. Mutapi (2006). "IgE a key antibody in *Schistosoma* infection." **Electronic Journal of Biology** **2**(1): 11-14.

Zhang, Z., T. Goldschmidt and H. Salter (2012). "Possible allelic structure of IgG2a and IgG2c in mice." **Mol Immunol** **50**(3): 169-171.

Zhao, G. H., J. Li, D. Blair, X. Y. Li, H. M. Elsheikha, R. Q. Lin, F. C. Zou and X. Q. Zhu (2012). "Biotechnological advances in the diagnosis, species differentiation and phylogenetic analysis of *Schistosoma* spp." **Biotechnol Adv** **30**(6): 1381-1389.

Zimmermann, H., M. Zebisch and N. Strater (2012). "Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases." **Purinergic Signal** **8**(3): 437-502.

Zoni, A.C., Catalá, L., Ault, S.K. 2016. Schistosomiasis Prevalence and Intensity of Infection in Latin America and the Caribbean Countries, 1942-2014: A Systematic Review in the Context of a Regional Elimination Goal. **PLoS Negl Trop Dis** **10**(3):1-22.

Zouain, C. S., S. Gustavson, S. C. Oliveira, V. Azevedo, J. B. Alves and A. M. Goes (2000). "The role of IL-10 and IgG1 in the protection and granulomatous response in *Schistosoma mansoni* P24-immunized mice." **Vaccine** **19**(9-10): 1218-1224.