

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

Nayara Braga Emidio

**Caracterização de peptídeos ligadores e indutores de IgE
derivados da isoforma de ATP difosfohidrolase 1 de *Schistosoma
mansoni* (SmATPDase 1)**

**JUIZ DE FORA
2016**

NAYARA BRAGA EMIDIO

**Caracterização de peptídeos ligadores e indutores de IgE
derivados da isoforma de ATP difosfohidrolase 1 de *Schistosoma
mansoni* (SmATPDase 1)**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

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

JUIZ DE FORA
2016

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

Braga Emidio, Nayara.

Caracterização de peptídeos ligadores e indutores de IgE derivados da isoforma de ATP difosfohidrolase 1 de *Schistosoma mansoni* (SmATPDase 1) / Nayara Braga Emidio. -- 2016. 78 f.

Orientadora: Priscila Faria Pinto

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2016.

1. IgE. 2. Esquistossomose. 3. Alergia. 4. Peptídeo. 5. NTPDases. I. Faria Pinto, Priscila, orient. II. Título.

NAYARA BRAGA EMIDIO

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

Caracterização de peptídeos ligadores e indutores de IgE derivados da isoforma de ATP difosfohidrolase 1 de *Schistosoma mansoni* (SmATPDase 1)

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Priscila Faria Pinto (Orientadora)
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a. Dr^a. Priscila Vanessa Zabala Capriles Goliatt (Membro interno)
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Theo Ferraz de Souza (Membro externo)
Universidade Federal do Rio de Janeiro

*Dedico este trabalho a minha
mãe, vó e irmã. Espero um dia
poder retribuir tudo o que
fazem por mim! Amo vocês!*

AGRADECIMENTOS

Certamente, os agradecimentos é uma das partes mais importantes desta dissertação. Seria impossível realizar este trabalho sem o apoio e ajuda das pessoas que fizeram, diretamente ou indiretamente, parte desta etapa.

A minha família que sempre me deu apoio incondicional. Obrigada mãe e vó pelo carinho com que cuidam de mim e por não medir esforços para que eu possa realizar meus sonhos. Minha irmã, que faz meus dias mais felizes e está sempre ao meu lado!

A minha orientadora Dr^a. Priscila Faria Pinto. Um obrigado seria muito pouco para agradecer por tudo que passamos nestes seis anos de convivência. Esta dissertação não seria possível sem sua dedicação! Muito obrigada por me apoiar e até mesmo encorajar a correr atrás dos meus objetivos.

Ao João, a Ana, ao Marcelo e, principalmente, ao Pedro que compartilharam o tempo e atenção da Priscila comigo.

A Dr^a. Eveline Gomes Vasconcelos pelos ensinamentos e confiança depositada em mim.

Aos alunos e agregados do Laboratório de Estrutura e Função de Proteínas pela ajuda técnica e momentos de descontração: Michelia, Felipe, Luiz, Lucas, Lais, Solon, Aline, Nayara, Léo, Victor, Marcel, Marcelo, Gabrienne, Priscila, Wagner, Patrícia e Danielle. Não posso esquecer também dos alunos que já passaram pelo laboratório: Michelle, Ju, Luana, Thiago, Jéssica, Thais, Lucas, Anna Cecillia, Aislan, Julia, Erick, Carolina, Laura, Flávia.

Aos meus amigos Dalyara, Juliana, Larissa, Thiago e Arhur. O convívio e discussões com vocês me proporcionaram diferentes pontos de vistas que me permitiram ampliar minha visão em diversos aspectos.

Aos colaboradores que contribuíram para construção deste trabalho: Dr^a. Priscila Capriles Goliatt e sua equipe (UFJF) pelas estruturas das proteínas, Dr. Clovis Nakaie (UNIFESP) pelos peptídeos, Laboratório de Esquistossomose (CpqRR/FIOCRUZ) pelas amostras de vermes e soroteca, Dr. William Castro Borges (UFOP) pelas análises de espectrometria de massas e a Dr^a. Marta Fonseca (EMBRAPA) por disponibilizar o equipamento de eletroforese de gel de gradiente.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pela oportunidade de cursar este mestrado, aos professores e técnicos da UFJF, a Capes pela concessão da bolsa de estudos e a FAPEMIG, UFJF e CNPq pelo auxílio financeiro.

“A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo da busca. E ensinar e aprender não pode dar-se fora da procura, fora da boniteza e da alegria.”

Paulo Freire

RESUMO

A esquistossomose é uma doença parasitária causada por vermes do gênero *Schistosoma* e afeta principalmente comunidades sem acesso adequado a água potável e condições de saneamento adequadas. O praziquantel é o fármaco indicado para o tratamento desta parasitose e não há vacina disponível. As NTPDases são uma família de proteínas que catalisam a hidrólise de nucleosídeos di e tri fosfatados, sendo amplamente distribuídas nos organismos. Duas isoformas de NTPDases (SmATPDase1 e SmATPDase2) foram descritas em *Schistosoma mansoni*. Sugere-se que a SmATPDase1 regule a concentração extracelular de nucleosídeos di e tri fosfatados, influenciando diretamente em eventos trombóticos e ativação de células do sistema imune. Dessa maneira, a inibição da ATP-difosfohidrolase por fármacos ou anticorpos torna-se uma estratégia interessante no combate a esquistossomose. Intensa resposta do tipo Th2, elevação dos níveis de IgE e das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 são características marcantes em infecções helmínticas e alergias. Acredita-se que esta semelhança se deve ao fato que a resposta alérgica tenha surgido inicialmente para conter parasitos, hipótese reforçada pela imunoreatividade cruzada descrita entre proteínas presentes em parasitos e alérgenos. Acreditamos que a isoforma SmATPDase1 seja um dos principais antígenos indutores de anticorpos IgE (imunoglobulinas com função protetora) durante a esquistossomose mansônica. Neste trabalho, por análise *in silico* identificamos potenciais epitopos de IgE na estrutura linear da SmATPDase1. Destas sequências, três peptídeos foram sintetizados por fase sólida e utilizados em ensaios de ELISA e de imunização. Em ensaios de ELISA, observou-se a capacidade destes peptídeos ligarem anticorpos IgE e IgG4 em soros de pacientes com esquistossomose, assim como IgE e IgG1 nos soros de animais experimentalmente infectados. Por ELISA, não foi possível observar diferença significativa na produção de anticorpos IgE e IgG1 após a imunização de camundongos com os peptídeos. No entanto, os soros imunes foram capazes de identificar a isoforma 1 da NTPDase de *S. mansoni* em ensaios de *western blots*. A identidade da proteína reconhecida foi confirmada por espectrometria de massas. Os resultados dão suporte a hipótese de que estes peptídeos sintetizados correspondam a epitopos ligadores e indutores de IgE presentes na SmATPDase1. Dessa maneira, tais peptídeos podem ser explorados como ferramentas de estudos das NTPDases, por meio da produção de anticorpos contra eles, ou até mesmo no desenvolvimento de imunoterapias em doenças alérgicas, auto-imunes e na própria esquistossomose.

Palavras-chaves: NTPDases, alergia, IgE, esquistossomose, peptídeos.

ABSTRACT

Schistosomiasis is a neglected disease caused by blood flukes (trematode worms) of the genus *Schistosoma*. This disease affects mostly communities without proper access to safe drinking water and adequate sanitation. Praziquantel is the only drug available for this infection and vaccines are currently unavailable at the market. The NTPDases are a family of proteins that catalyze the hydrolysis of nucleoside di and tri phosphates and are widely distributed in the organisms. In *Schistosoma mansoni*, two isoforms of NTPDases (SmATPDase1 and SmATPDase2) were described and might play important role in the parasite physiology. The SmATPDase1 controls extracellular concentration of nucleoside di and tri phosphates, regulating blood clotting and immune system cells activation. In addition, this isoform might be one of the major IgE (a protective immunoglobulin) inducing antigen in the course of schistosomiasis infection. Thus, the inhibition of ATP-diphosphohydrolase by drugs or antibodies is an interesting strategy to target schistosomiasis. Intense Th2 response and high levels of IgE and cytokines IL-4, IL-5 and IL-13 are characteristic of helminth infections and allergies. It is suggested that this similarity is not only by chance, but it is due the fact that the allergic response started as a form of counter parasites - hypothesis supported by cross reactivity between proteins from parasites and allergens. In this work, we identified potential IgE epitopes in the linear structure of SmATPDase1 by *in silico* analysis. Three peptides were synthesized by solid phase and used in ELISA and immunization assays. The ELISA assays showed the capacity of these peptides to bind IgE and IgG4 antibodies in human serum and IgE and IgG1 in infected animals. However, no significant difference was found in the production of IgE and IgG1 after animal immunization with these molecules. Nevertheless, these immune sera were capable of identifying the SmATPDase1 in western blot assays and the identity of the enzyme was confirmed by mass spectrometry. These findings support the hypothesis that these peptides correspond to IgE epitopes. Furthermore, some results also suggest that these peptides are capable of binding natural antibodies that target self-proteins and are homologues to the investigated peptides. Thus, these peptides might be explored as tools for the study of NTPDases, through the production of antibodies against these epitopes, or as immunotherapeutics for treatment of allergies, auto-immune diseases and schistosomiasis.

Keywords: NTPDases, allergy, schistosomiasis, peptides, IgE.

LISTA FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico do parasito <i>S. mansoni</i>	15
Figura 2. Mecanismo de citotoxicidade celular dependente de anticorpos	19
Figura 3. Mecanismos de regulação dos sistema imune por <i>S. mansoni</i>	20
Figura 4. Prováveis epitopos de IgE destacados na estrutura tridimensional e na sequência FASTA da SmATPDase1.....	36
Figura 5. Análise da pureza dos peptídeos por HPLC	38
Figura 6. Espectro de massa dos peptídeos obtidas por ESI no modo positivo.....	39
Figura 7. Determinação ideal do antígeno	41
Figura 8. Reatividade de anticorpos IgE e IgG4 em amostras de soros de pacientes com esquistossomose e indivíduos saudáveis contra os peptídeos sintéticos	42
Figura 9. Reatividade de anticorpos IgE e IgG1 em amostras de soros de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> e saudáveis contra os peptídeos derivados da isoforma SmATPDase1	44
Figura 10. Análise da produção de anticorpos IgG1 e IgE após imunização com os peptídeos sintéticos derivados da SmATPDase1.....	46
Figura 11. Eletroforese de homogeneizado total de verme e marcador de peso molecular e <i>western blot</i> revelado por anticorpos anti-CD39.....	47
Figura 12. Peptídeos da SmATPDase1 identificados por espectrometria de massas na banda de 45 e 63 kDa ..	48
Figura 13. Identificação de uma provável isoforma de NTPDase de <i>S. mansoni</i> no homogeneizado total de vermes adultos usando anticorpos policlonais anti-P14251a, anti-P14411a e anti-P14461a2	49
Figura 14. Identificação da SmATPDase1 por ensaio de imunoprecipitação	50
Figura 15. Purificação parcial das SmATPDases e identificação de uma provável SmATPDase1 por anticorpos anti-P14251a.....	51
Figura 16. Alinhamento entre as sequências FASTA e estrutural das enzimas CD39 e SmATPDase1.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência de seis aminoácidos contínuos e idênticos presente na sequência da isoforma da ATP difosfohidrolase 1	36
Tabela 2. Sequência dos peptídeos sintetizados, massas calculadas e massas obtidas pela análise por espectrometria de massas (LC-MS/ESI).....	38
Tabela 3. Relação IgE/IgG1 após a terceira imunização na diluição 1:50	46

LISTA ABREVIATURAS

ACN – Acetonitrila
ACR – do inglês *Apyrase conserved region*
ADP - Adenosina difosfato
APIRASE - Nome usualmente aplicado as isoformas de ATP difosfohidrolases de origem vegetal
ATP – Adenosina trifosfato
DAMP - Padrão molecular associado ao dano
DCM – Diclorometano
DIC – N,N'-Diisopropilcarbodiimida
DIEA – Diisopropiletilamina
DMF – Dimetilformamida
DMSO – Dimetilsulfóxido
FcεRI – Receptores de IgE de alta afinidade presentes na superfície de células como basófilos e mastócitos.
HCD - do inglês *higher-energy collisional dissociation*
HOBt – 1-hidroxibenzotriazol
HBTU - N,N,N',N'-tetrametil-O-(1H-benzotriazol-1-il) uronium hexafluorofosfato
HPLC – Cromatografia líquida de alta performance (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*)
LC/ESI-MS – Cromatografia líquida de alta performance acoplada a espectrometria de massas com ionização por *electrospray*.
Na-ASP-2 - do inglês *Necator americanus Ancylostoma-secreted protein 2*
NMP – N-metil-pirrolidona
NPP1 - Nucleotídeo pirofosfatase/fosfosdiesterase
NTPDases - Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases
OMS – Organização Mundial da Saúde
OPD - o-fenilenodiamina
PBS – Tampão fosfato
PBST - Tampão fosfato acrescido de tween-20 0,05%
SDAP - do inglês *Structural Database of Allergenic Proteins*
SIT - Imunoterapia alérgeno específica
SmATPDase – Abreviação para ATP difosfohidrolase de *Schistosoma mansoni*
SPSS – síntese de peptídeos por fase sólida (do inglês *solid-phase peptide synthesis*)
t-BOC - Tert-butiloxicarbonil
TEA – Trietilamina
TFA – Ácido trifluoracético
UNIPROT - do inglês *Universal Protein Resource*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Aspectos gerais da esquistossomose mansônica	14
1.2	Conceitos gerais sobre alérgenos e anticorpos IgE.....	17
1.3	A semelhança da resposta imunológica na alergia e helmintoses seria ao acaso?	18
1.4	Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases.....	21
2	OBJETIVOS.....	25
2.1	Objetivo geral.....	25
2.2	Objetivos específicos.....	25
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1	Análise <i>in silico</i> de regiões capazes de ligar anticorpos IgE na sequência da SmATPDase1	26
3.2	Síntese, purificação e análise dos peptídeos.....	27
3.3	Produção de soro policlonal anti-P14251a, anti-P14411a, anti-P14461a2.....	28
3.4	Infecção experimental e perfusão	28
3.5	Procedimento para análise de anticorpos por ELISA	29
3.6	Preparação do homogeneizado total de vermes adultos.....	30
3.7	Purificação parcial das SmATPDases por eletroforese não-desnaturante e <i>western blots</i>	30
3.8	Avaliação dos perfis proteicos por eletroforese <i>SDS-PAGE</i> e <i>western blots</i> ..	31
3.9	Identificação de proteínas por espectrometria de massas.....	32
3.10	Imunoprecipitação	33
3.11	Análises estatísticas.....	34
3.12	Aspectos éticos.....	34
4	RESULTADOS.....	35
4.1	Análise <i>in silico</i> de regiões na SmATPDase1 capazes de ligar anticorpo IgE	35
4.2	Síntese, purificação e análise dos peptídeos.....	37
4.3	Análise dos níveis de IgE e IgG4 reativos contra os peptídeos P14251a, P14411a e P14461a2 em soro de humanos doentes e saudáveis.....	41
4.4	Análise dos níveis de IgE e IgG1 reativos contra os peptídeos p14251a, p14411a e p14461a2 em amostras de soro de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> e saudáveis	44

4.5	Produção de soro policlonal anti-P14251a, anti-P14411a, anti-P14461a2.....	46
4.6	Identificação por espectrometria de massa de bandas proteicas provenientes do homogeneizado total de vermes e reconhecidas por anticorpos anti-CD39.....	48
4.7	Deteção da SmATPDase1 por anticorpos anti-P14251a, anti-P14411a e anti-P14461a2	49
5	DISCUSSÃO	53
5.1	Seleção por análise <i>in silico</i> de peptídeos na sequência da smatpdase1 potencialmente capazes de ligar anticorpos IgE.....	53
5.2	Produção de soro policlonal anti-P14251a, anti-P14411a, anti-P14461a2.....	57
5.3	Reatividade cruzada entre CD39 e SmATPDase1	58
5.4	Deteção de NTPDase de <i>S. mansoni</i> usando os anticorpos anti-P14251a, anti-P14411a e anti-P14461a2	59
5.5	Reatividade de anticorpos IgE e IgG4 em soros humanos e de IgE e IgG1 em soros de animais contra os peptídeos P14251a, P14411a e P14461a2	60
6	CONCLUSÕES.....	64
7	REFERÊNCIAS.....	66
	ANEXOS	74

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA

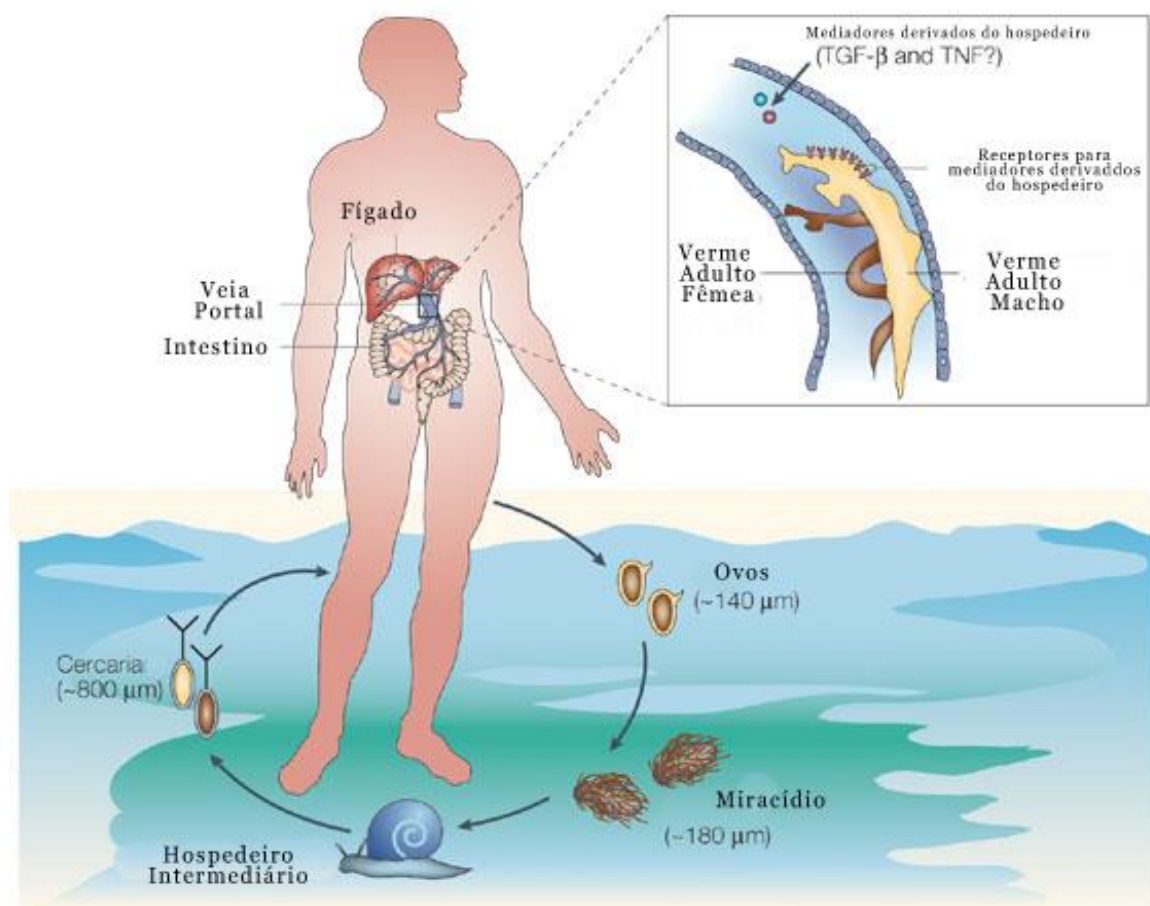
A esquistossomose é uma doença parasitária causada por vermes da classe trematoda e do gênero *Schistosoma*. *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. mekongi* e *S. intercalatum* são as principais espécies capazes de infectar o homem, sendo o *S. mansoni* a única espécie encontrado na América do Sul, inclusive no Brasil (CDC, 2012).

Comunidades com condições de saneamento inadequadas e sem acesso adequado a água potável são as mais afetadas pela esquistossomose, sendo assim, as populações de maior vulnerabilidade são as comunidades rurais, incluindo agricultores, pescadores, mulheres que utilizam a água para trabalhos domésticos e crianças. Atualmente, observa-se que a doença não está restrita a estas áreas, uma vez que, movimentos populacionais estão introduzindo a doença em novas áreas por conta de turistas infectados em razão do ecoturismo (WHO, 2014).

A esquistossomose constitui-se problema de saúde pública no Brasil, estima-se que 7 milhões de pessoas estejam infectadas pelo *S. mansoni*, com destaque para Minas Gerais, estado com importância epidemiológica, visto 61% dos municípios registraram casos de transmissão e infecção e uma população maior 10 milhões de pessoas vive em áreas endêmicas (DRUMMOND et al., 2010).

Os vermes adultos de *S. mansoni* podem viver na corrente sanguínea do hospedeiro humano por vários anos. Estes parasitos ovipõem centenas de ovos embrionados por dia, os quais podem ficar aprisionados nos tecidos, principalmente, fígado e baço ou serem excretados pelas fezes. Em contato com a água e sob estímulo luminoso, os ovos maduros se rompem e os embriões, chamados de miracídios, são liberados e se tornam capazes de infectar o hospedeiro intermediário (caramujos do gênero *Biomphalaria*). Após sua penetração nos moluscos, os miracídios se desenvolvem por um período de 4 a 6 semanas e se transformam em cercárias. Estas cercárias são eliminadas pelos moluscos e nadam ativamente até encontrar o hospedeiro definitivo, mamífero. Uma vez que invadem a pele, as cercárias perdem suas caudas e migram pela corrente sanguínea já na forma de esquistossômulos. Cerca de 21 dias pós infecção, os parasitos chegam ao fígado, onde alcançam a fase adulta e o dimorfismo sexual. Os vermes adultos acasalam-se

e migram para as veias mesentéricas onde ovipõem. Os ovos migram pela corrente sanguínea e atingem as veias mesentéricas do intestino, atravessam o epitélio e atingem a luz intestinal, sendo eliminados junto com as fezes, reiniciando o ciclo (Figura 1) (GRYSEELS, 2012).



Nature Reviews | Immunology

Figura 1. Ciclo biológico do parasito *S. mansoni*: As cercárias penetram no hospedeiro pela pele. Na corrente sanguínea se transformam em esquistossômula. Cerca de 21 dias após a infecção os parasitos chegam ao fígado e alcançam a vida adulta. Os casais acasalam-se e migram para as veias mesentéricas onde ovipõem. Os ovos podem ser direcionados para o fígado ou para as fezes. Os ovos em contato com a água liberam miracídios que infectam o hospedeiro intermediário e se transformam em cercárias que são liberadas pelo caramujo. Fonte - Adaptado de: PEARCE; MACDONALD (2002).

Minutos após a cercária penetrar na pele, sintomas agudos como urticária local começam a aparecer. Algumas semanas depois, pacientes infectados podem apresentar reações de hipersensibilidade. A chegada dos vermes adultos às veias mesentéricas e o início da ovoposição podem causar sintomas intestinais como cólica

e diarreia. Durante a fase aguda da infecção, o exame de fezes é negativo; testes sorológicos e histórico de contato com água com presença do parasito podem indicar o diagnóstico (GRYSEELS, 2012).

Ovos aprisionados nos tecidos, tais como fígado e baço, secretam moléculas que estimulam uma forte resposta inflamatória, caracterizada por um infiltrado de células, polimorfonucleares de sangue periférico ao redor do ovo, levando a formação do granuloma, principal responsável pela morbidade na esquistossomose (GRYSEELS, 2012). É importante notar que os sintomas e patologias resultantes da infecção estão relacionados com a natureza da resposta imune induzida no hospedeiro e os órgãos atingidos (PEARCE; MACDONALD, 2002).

A investigação de ovos pelo método de Kato-Katz (KATZ; CHAVES; PELLEGRINO, 1972) em amostras de fezes (40-50 mg) permanece como padrão ouro no diagnóstico da esquistossomose mansônica. Contudo, o método tem como desvantagens ser capaz de identificar a infecção apenas após a ovoposição e ineficiente no diagnóstico de pacientes com baixa carga parasitária (GRAY et al., 2011). Os métodos indicados para pacientes com baixa carga parasitária são a biopsia da mucosa retal, utilizado apenas em casos especiais, pois trata-se de um método invasivo, e os ensaios sorológicos, os quais tem baixa sensibilidade e são incapazes de distinguir pacientes com infecção ativa dos que tiveram contato prévio com os antígenos do parasito e não se encontram doentes (GRAY et al., 2011; KINKEL et al., 2012).

O praziquantel é o fármaco de escolha para o tratamento da esquistossomose humana, sendo utilizado no tratamento de todas as espécies de *Schistosoma* (KATZ; COELHO, 2008). Esta droga atua sobre a regulação do influxo de Ca^{2+} , o que leva a um aumento da permeabilidade da membrana do parasito a este íon, conseqüentemente, levando contração súbita e paralisia do verme. Além disso, os danos causados no tegumento do verme pela ação da droga expõe antígenos do verme ao sistema imune (MATTOS et al., 2006), favorecendo a atuação conjunta do fármaco e dos mecanismos de proteção imunológica.

Embora o praziquantel seja um fármaco efetivo, com baixo custo e baixa toxicidade, a busca por uma alternativa a este fármaco é necessária visto que, o praziquantel atua apenas contra as formas adultas do verme, não interrompe a transmissão do parasito e atualmente observa-se a resistência a esta droga (KATZ; COELHO, 2008; ROLLINSON et al., 2013).

A vacinação é sugerida como uma forma de controle integrado a quimioterapia para reduzir a transmissão da doença (MUTAPI, 2012), embora, atualmente ainda não exista uma vacina comercial disponível para esquistossomose. A proposta de vacina para *S. mansoni*, cuja formulação baseia-se no antígeno Sm14 é a que se encontra no estágio mais avançado e recentemente passou pela fase 1 de teste clínico (TENDLER, 2015).

1.2 CONCEITOS GERAIS SOBRE ALÉRGENOS E ANTICORPOS IgE

Uma molécula pode ser considerada um alérgeno quando é capaz de: (1) induzir a produção de anticorpos IgE, (2) elicitar uma reação alérgica ou (3) ligar IgE. Algumas proteínas possuem as três propriedades, enquanto outras, embora não elicitam a produção desta imunoglobulina, também são consideradas alérgenos por terem a capacidade de ligar moléculas IgE, consequência a imreatividade cruzada com outros alérgenos (AALBERSE, 2000).

As características que determinam a alergenicidade de uma proteína não estão totalmente compreendidas, entretanto há indícios que envolvam características estruturais, visto que os alérgenos são restritos a poucas famílias - aproximadamente 2% de todas as famílias de proteínas conhecidas (RADAUER et al., 2008). Embora algumas características como estabilidade, hidrofobicidade e atividade enzimática tenham sido propostas como propriedades comuns aos alérgenos, estas características não permitem distinguir as moléculas alergênicas das demais (TRAIDL-HOFFMANN; JAKOB; BEHRENDT, 2009).

Imunoglobulinas da classe E (IgE) foram descritas em 1960 (ISHIZAKA; ISHIZAKA, 1967) e desde então, pesquisadores relacionam estes anticorpos com hipersensibilidade a proteínas alergênicas. O processo de síntese destes anticorpos inicia-se com a ligação do alérgeno a molécula de IgM específica presente na superfície da célula B, sendo necessárias duas etapas de sinalização para síntese do anticorpo: sinalização por citocinas IL-4 e IL-13 e ligação de CD40 nas células B (POULSEN; HUMMELSHOJ, 2007; WU; SCHEERENS, 2014).

Além disso, duas vias distintas podem levar a produção de IgE: (1) Em uma delas, o IgE é gerado diretamente a partir do IgM ($\mu \rightarrow \epsilon$), produzindo anticorpos de baixa afinidade, (2) Na outra, a produção de IgE passa pela formação do intermediário

IgG ($\mu \rightarrow \gamma \rightarrow \epsilon$), o qual é necessário para promover a maturação de afinidade (YOSHIDA et al., 1990; XIONG et al., 2012).

A produção de IgE caracteriza-se por uma fase transiente no centro germinal, rápida diferenciação em plasmócitos, ausência de células B funcionais de memória e *switch* sequencial de classe como requisito para produção de IgE de alta afinidade (HE et al., 2015). Dessa maneira, a meia vida e concentração plasmática dos anticorpos IgE são menores em relação as de outras imunoglobulinas, fato justificado pela reação mediada por IgE ser marcadamente uma das mais rápidas e vigorosas montadas pelo sistema imune - a anafilaxia, por exemplo, pode ocorrer de cinco a dez minutos após uma reexposição a um alérgeno (POULSEN; HUMMELSHOJ, 2007).

A ligação dos anticorpos IgE aos Fc ϵ RI (receptores de alta afinidade de IgE) na superfície dos granulócitos, basófilos e mastócitos, ocorre pela porção Fc destas moléculas. A ligação cruzada entre as moléculas de IgE e seu antígeno desencadeia o processo de degranulação destas células, liberando moléculas inflamatórias intracitoplasmáticas, como a histamina cujo um dos efeitos é o aumento da permeabilidade dos capilares. É importante notar que, a ligação monovalente do antígeno ao complexo IgE-Fc ϵ RI desempenha funções importantes como aumento da expressão de receptores e da resistência à apoptose, embora não seja capaz de induzir degranulação. Apenas a ligação do antígeno com pelo menos duas moléculas de IgE promove este evento (KNOL, 2006).

1.3 A SEMELHANÇA DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA ALERGIA E HELMINTOSES SERIA AO ACASO?

Alergia e infecções helmínticas apresentam respostas imunológicas semelhantes em diversos aspectos: ambas são caracterizadas por intensa resposta predominantemente do tipo Th2, elevação da eosinofilia e dos níveis de IgE, acompanhada por aumento da produção das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 (YAZDANBAKHS; VAN DEN BIGGELAAR; MAIZELS, 2001). No caso das helmintoses, o aumento do IgE sérico é policlonal, sendo apenas uma pequena parte direcionada ao patógeno invasor, possibilitando a liberação de grânulos tóxicos por mastócitos e eosinófilos. Por outro lado, esta resposta é direcionada contra antígenos ambientais como grãos de pólen e poeira em doenças alérgicas (JARRETT; BAZIN, 1974; URBAN, 1982; SANTIAGO HDA et al., 2015).

Por ser uma resposta complexa - composta por componentes celulares e humorais - contra partículas inofensivas, acredita-se que esta semelhança imunológica não seja meramente ao acaso e que a resposta de IgE tenha surgido para conter parasitos os quais não podem ser fagocitados devido ao seu tamanho (FITZSIMMONS; DUNNE, 2009). Esta hipótese é reforçada por estudos mostrando homologia entre famílias de alérgenos e proteínas de parasitos (FITZSIMMONS; DUNNE, 2009; BIELORY; MAINARDI; ROTTEM, 2013; FITZSIMMONS; FALCONE; DUNNE, 2014; FARNELL et al., 2015) o que reflete na imunoreatividade cruzada entre proteínas presentes em parasitos e alérgenos, como no caso da reatividade de IgE induzida pela tropomiosina de *Ascaris lumbricoides* com a tropomiosina de ácaro (ACEVEDO et al., 2009) e de barata (SANTOS et al., 2008).

A maneira que a proteína é expressa durante o ciclo de vida do parasito influencia na resposta do hospedeiro, sendo esta outra evidência que sugere uma relação entre respostas alérgicas e produção de IgE induzida por helmintos: moléculas não continuamente expostas ao hospedeiros, como aquelas liberadas apenas após a morte do verme, induz uma intensa resposta de IgE, enquanto as que o hospedeiro é exposto com maior frequência, como as proteínas secretadas pelo ovo, leva à uma diminuição do nível de IgE e aumento de IgG4, mecanismo similar ao que ocorre durante a imunoterapia alérgeno específica (SIT) (FITZSIMMONS et al., 2007).

Nas helmintoses, a imunoglobulina E tem papel protetor, uma vez que promove uma barreira de defesa e expulsão do parasito (PALM; ROSENSTEIN; MEDZHITOV, 2012). Um dos mecanismos que explica esta proteção envolve a liberação de moléculas inflamatórias por meio da citotoxicidade celular dependente de anticorpos, como ilustrado na Figura 2 (RUJENI; TAYLOR; MUTAPI, 2012). Além disso, a correlação de altos níveis de IgE e resistência a infecção a *S. mansoni* após tratamento quimioterápico está bem estabelecida na literatura (ZHANG; MUTAPI, 2006).



Figura 2. Mecanismo de citotoxicidade celular dependente de anticorpos: Os parasitos possuem moléculas antigênicas em sua superfície, as quais são ligadas a anticorpos produzidos. Tais anticorpos são responsáveis pela citotoxicidade mediada por células através da ligação entre estes (pela porção Fc) e os respectivos receptores celulares. Desta maneira a célula alvo é capaz de liberar produtos tóxicos capazes de danificar os parasitos.

Especula-se que a resposta imunológica contra helmintos possa regular a reposta alérgica, pois, atualmente, observa-se um aumento na taxa de incidência de doenças atópicas e autoimunes concomitante com a redução da incidência de parasitoses. Embora uma série de fatores possa contribuir para este fato, entre eles genéticos e nutricionais, é evidente que a incidência de alergias e doenças autoimunes está aumentando em paralelo ao desenvolvimento econômico, o que implica em uma menor exposição a parasitos. Moléculas presentes nos parasitos são capazes de regular o sistema imune do hospedeiro por meio de mecanismos como produção de IL-10, TGF- β e indução de células regulatórias (Treg). Esta imunoregulação é benéfica para ambos, visto que reduz fatores inflamatórios permitindo a evasão do sistema imune pelo parasito ao mesmo tempo que atenua injúrias ao organismo do hospedeiro, evitando danos ao mesmo. Por isso, atualmente acredita-se que este seja o provável mecanismo de regulação de doenças alérgicas e inflamatórias pela presença de helmintos (Figura 3) (ERB, 2009; ROOK, G. A., 2009; MCSORLEY; MAIZELS, 2012).

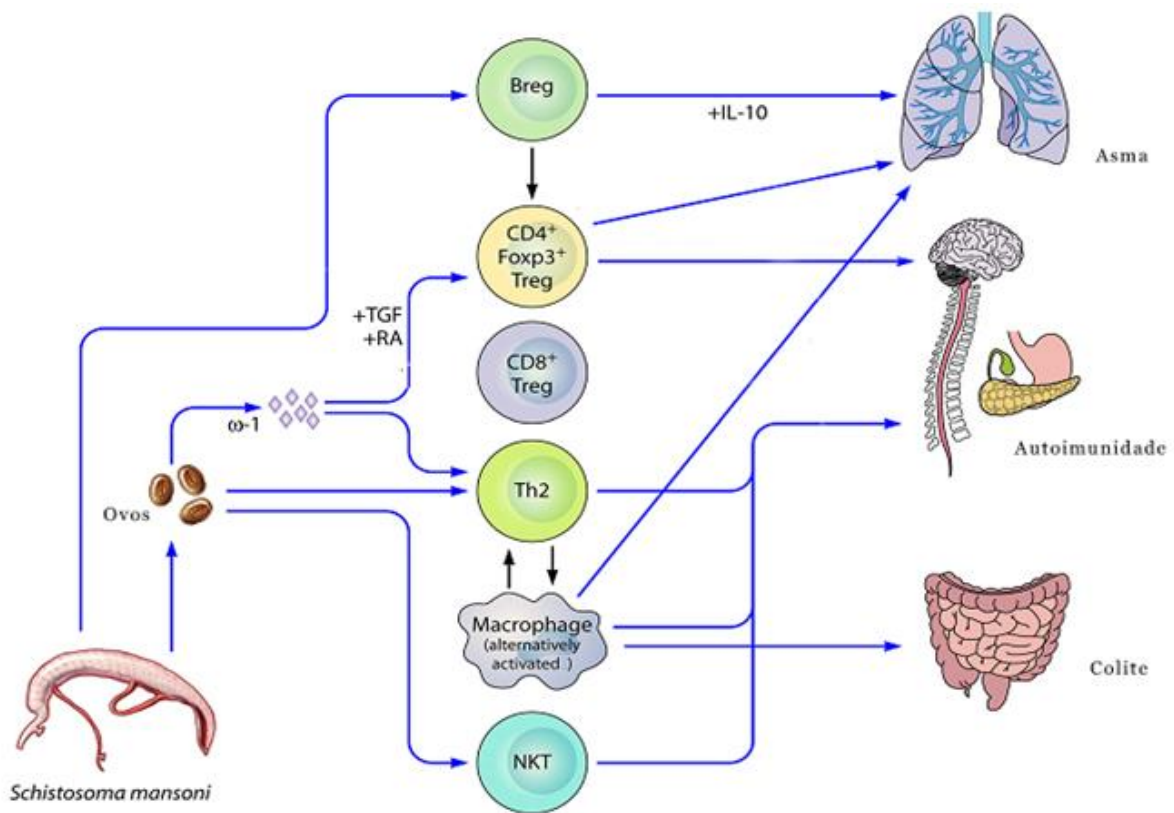


Figura 3. Estratégias de regulação do sistema imune por *S. mansoni*: A indução de células T regulatórias (Treg) e produção de moléculas como IL-10 e TGF- β pelo parasito podem ser capazes de promover a imunoregulação de outras doenças inflamatórias e alérgicas. Fonte - Adaptado de: MCSORLEY MAIZELS (2012).

Do ponto de vista da evolução, acredita-se que as infecções por helmintos e outros microrganismos tenham se tornado uma necessidade, isto é, a infecção por estes parasitos é essencial para o correto funcionamento do sistema imune, uma vez que estimulam uma constante imunorregulação suprimindo respostas inflamatórias exacerbadas e danosas (ROOK, G. A. W., 2009).

Paradoxalmente, o granuloma é o principal responsável pela excessiva resposta inflamatória, sendo principal causa da morbidade no caso da esquistossomose mansônica, mas também está envolvido no processo de imunorregulação, reduzindo, dessa maneira, os danos causados ao hospedeiro. Os antígenos eliminados pelos ovos estimulam uma resposta do tipo Th2, com elevação da produção de IL-4, IL-5 e IL-13 e conseqüente aumento dos níveis de IgE e eosinófilos circulantes (HAMS; AVIELLO; FALLON, 2013). A elucidação do mecanismo de modulação da resposta Th2 pelos parasitos durante a evolução da infecção pode contribuir para a melhoria das terapias utilizadas atualmente empregadas no controle das doenças alérgicas (FITZSIMMONS; FALCONE; DUNNE, 2014).

1.4 NUCLEOSÍDEO TRIFOSFATO DIFOSFOHIDROLASES

As enzimas compreendidas pela família das nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (NTPDases; EC 3.6.1.5) catalisam a hidrólise de nucleosídeos di e trifosfatados sob ativação de cátions divalentes, especialmente cálcio e magnésio (SÉVIGNY, 2012). Outra característica particular a esta família são as cinco regiões conservadas em sua sequência, conhecidas como *apyrase conserved regions* (ACR), as quais estão envolvidas no reconhecimento, ligação e hidrólise de substratos (ROBSON; SEVIGNY; ZIMMERMANN, 2006; SANSOM, 2012).

As NTPDases são amplamente distribuídas nos organismos, sendo descritas em bactérias, fungos, insetos, plantas, parasitos e mamíferos. Quanto a localização celular, estas proteínas já foram encontradas tanto no meio intracelular quanto na superfície da membrana plasmática (ROBSON; SEVIGNY; ZIMMERMANN, 2006; VASCONCELOS et al., 2009).

A primeira enzima da família das NTPDases clonada e purificada foi a apirase de batata (UniProtID: P80595). Neste vegetal, a atividade NTPDásica está envolvida com a biossíntese do amido e supõe-se que a regulação da concentração de ATP

extracelular esteja relacionada com processos de crescimento e simbiose (HANDA; GUIDOTTI, 1996; KNOWLES, 2011). Esta enzima pode ser obtida com alto grau de pureza utilizando métodos de purificação convencionais, permitindo uma maior reprodutibilidade nos ensaios que utilizam esta molécula (VASCONCELOS et al., 2009), como em experimentos que necessitam de uma rápida depleção dos níveis de ATP.

Em mamíferos, as NTPDases são classificadas em oito subclasses (NTPDases 1-8) e diferem entre si por suas propriedades bioquímicas e localização – presentes na superfície celular ancoradas por dois domínios transmembranares (NTPDases 1, 2, 3 e 8), em membranas intracelulares (NTPDases 4 e 7) ou sofrem clivagem e são secretadas (NTPDase 5 e 6). Uma das principais funções atribuídas às NTPDases é o controle dos níveis extracelulares de nucleosídeos, atuando juntamente com um grupo de enzimas conhecidas como ecto-nucleotidases que compreende além das NTPDases, as ecto-5'-nucleotidases (eN), ecto-nucleotideo pirofosfatase/fosfodiesterases (NPP) e fosfatase alcalinas (AP) (ZIMMERMANN; ZEBISCH; STRATER, 2012).

O fato dos receptores purinérgicos, conhecidos como P2, e de adenosina, denominados P1, serem expressos em todas as células faz com que nucleotídeos e adenosina sejam importantes agonistas para o funcionamento de todos os nossos órgãos e serem capazes de regular diversas funções como fluxo sanguíneo, resposta imunológica, secreção e inflamação. Assim, a regulação da concentração extracelular de nucleotídeos liberados pelas células de maneira regulada ou durante sua morte ou lise é crítico para o funcionamento de nossos tecidos e células (ROBSON; SEVIGNY; ZIMMERMANN, 2006; SÉVIGNY, 2012).

A análise do genoma revelou a presença de NTPDases de diversos parasitos (SANSOM, 2012), sendo que a atividade NTPDásica já foi descrita em *Toxoplasma gondii*, *Schistosoma mansoni*, *Trichomonas vaginalis*, *Leishmania (L) amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. chagasi*, *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma cruzi*. Embora suas funções não sejam totalmente compreendidas, as NTPDases nestes parasitos podem estar relacionadas com recuperação de purinas, infectividade das cepas e mecanismos de escape do sistema imune (VASCONCELOS et al., 2009; SANSOM, 2012; WEISS et al., 2015).

A proteína vegetal (apirase de batata) e as isoformas de NTPDases descritas em parasitos compartilham regiões com alta homologia na sequência proteica, além das ACR. Além de serem homólogas, diversas destas regiões exibem comportamento

antigênico, sugerindo a aplicação da apirase de batata ou dos domínios compartilhados para o desenvolvimento de métodos diagnóstico para doenças infecto parasitárias tais como leishmaniose e esquistossomose ou na composição de vacinas (FARIA-PINTO, 2008a, b; VASCONCELOS et al., 2009; FARIA-PINTO et al., 2010; MENDES et al., 2011; DETONI et al., 2013; MAIA et al., 2013).

No parasito *S. mansoni* duas isoformas de NTPDases de aproximadamente 61 kDa foram descritas - SmATPDase1 e SmATPDase2 (VASCONCELOS et al., 1993; VASCONCELOS et al., 1996; DEMARCO et al., 2003; LEVANO-GARCIA et al., 2007). Embora suas funções no verme ainda não estejam totalmente elucidadas, o fato destas isoformas se encontrarem expressas e ativas em todos os estágios do ciclo de vida do parasito revelam sua importância para a fisiologia dos mesmos (FARIA-PINTO et al., 2004; LEVANO-GARCIA et al., 2007).

Dentre o conjunto das enzimas capazes de hidrolisar nucleotídeos expressas no tegumento dos vermes adultos, a isoforma SmATPDase1, juntamente com a fosfatase alcalina, compõem o segundo grupo de proteínas mais abundante no tegumento de vermes adultos (CASTRO-BORGES et al., 2011), confirmando sua importância para a sobrevivência do parasito no hospedeiro.

A SmATPDase1 (UniProtID Q7YTA4) está presente na superfície do tegumento do verme adulto e suas prováveis funções estão relacionadas com a capacidade do verme de evadir do sistema imune do hospedeiro, podendo, assim, ser considerada um fator de virulência (WILSON, 2012). A hidrólise de moléculas de ATP e ADP exógenos pela enzima pode estar relacionada com a capacidade do parasito em modificar eventos trombo regulatórios e impedir a ativação de células do sistema imune, visto que o ADP é uma molécula sinalizadora para agregação plaquetária, enquanto o ATP, considerado um padrão molecular associado ao dano (DAMP) pode agir como uma molécula pró-inflamatória ativando células efetoras do sistema imune (VASCONCELOS et al., 1993; BHARDWAJ; SKELLY, 2009; DA'DARA et al., 2014; DA'DARA; BHARDWAJ; SKELLY, 2014). Recentemente, nosso grupo mostrou que a SmATPDase1 pode ser considerada uma proteína *allergen-like*, pois mostrou-se capaz de ligar anticorpos IgE de soro de pacientes com esquistossomose (EMIDIO, 2013).

A SmATPDase2 (UniProtID: A1BXT9) é ativamente secretada pelo verme adulto e pelo ovo, sendo que a perda do peptídeo sinal justifica a massa de 55 kDa encontrada na forma secretada da enzima (FARIA-PINTO et al., 2004; LEVANO-

GARCIA et al., 2007; MENDES et al., 2011). Recentemente, DA'DARA; BHARDWAJ; SKELLY (2014) mostraram que esta isoforma não é a principal responsável pela degradação dos níveis de ATP e ADP exógenos que ocorrem na superfície do tegumento de vermes adultos.

Atualmente, não existem inibidores específicos para esta família de enzimas (SÉVIGNY, 2012). A disponibilidade de compostos inibidores é importante para um melhor entendimento da função destas enzimas em um contexto fisiológico e para o desenvolvimento de terapias em que estas moléculas possam estar envolvidas. O ARL 67156 é um análogo do ATP descrito como inibidor competitivo fraco para a NTPDase1 (CD39), NTPDase3 e NPP1 de humanos (LÉVESQUE et al., 2007). Os modelos tridimensionais da SmATPDase1 e da CD39 construídos por modelagem comparativa revelaram alta conservação estrutural entre estas duas enzimas, especialmente no sítio catalítico (NUNES et al., 2015), sugerindo que moléculas como o ARL 67156 capazes de inibir a CD39 também podem inibir a enzima do parasito.

Portanto, as NTPDases são fundamentais para a sobrevivência do parasito *S. mansoni*, uma vez que, exercem importantes funções na fisiologia do mesmo e estão envolvidas em mecanismos de evasão do sistema imune do hospedeiro. Dessa maneira, a inibição da ATP-difosfohidrolase por fármacos ou anticorpos torna-se uma estratégia interessante no combate a esquistossomose. Além disso, considerando o papel desta enzima na indução de anticorpos IgE durante a infecção (EMIDIO, 2013), torna a identificação de regiões indutoras desta classe de anticorpos na estrutura da SmATPDase1 interessante para o desenvolvimento de imunoterapias, uma vez que a utilização de epitopos imunodominantes tem vantagens em relação a proteína inteira, já que exclui epitopos que possam causar respostas imune indesejáveis.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar e caracterizar peptídeos derivados da ATP-difosfohidrolase 1 de *Schistosoma mansoni* (SmATPDase1) que são potenciais imunoterapêuticos em casos de alergia e doenças auto-imunes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Identificar *in silico* peptídeos alergênicos na estrutura da SmATPDase1;
- b) Sintetizar e purificar peptídeos derivados da SmATPDase1 preditos como potencialmente ligadores de anticorpos IgE;
- c) Avaliar a reatividade de IgE e IgG4 do soro de pacientes com esquistossomose mansônica e indivíduos saudáveis contra os peptídeos sintetizados;
- d) Avaliar a reatividade de IgE e IgG1 do soro de camundongos infectados e saudáveis contra os peptídeos sintetizados;
- e) Avaliar o potencial dos peptídeos induzirem a produção de IgE e IgG1 em modelo murino;
- f) Verificar a capacidade de anticorpos IgE anti-peptídeo identificar a SmATPDase1 em preparações de verme adultos;
- g) Comprovar a imunorreatividade dos anticorpos anti-CD39 de mamíferos com a isoforma SmATPDase1

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANÁLISE *IN SILICO* DE REGIÕES CAPAZES DE LIGAR ANTICORPOS IgE NA SEQUÊNCIA DA SmATPDase1

A sequência FASTA da isoforma ATP-difosfohidrolase 1 (UniProtID Q7YTA4) do parasito *S. mansoni* foi obtida do banco de dados público *Universal Protein Resource* (UNIPROT; <http://www.uniprot.org/>) e submetida ao banco de dados, também público, *Structural Database of Allergenic Proteins* (SDAP; <http://fermi.utmb.edu/SDAP/sdapwho>), o qual contém sequências de alérgenos comprovados experimentalmente. Foi utilizada uma ferramenta disponível no SDAP que aplica regras da organização mundial da saúde para investigar a alergenicidade da proteína alvo. Assim, a identificação de sequências de seis aminoácidos idênticos e contínuos presentes nas proteínas submetidas e sequências depositadas no SDAP foi empregada como parâmetro para seleção dos peptídeos (IVANCIUC et al., 2003; IVANCIUC; SCHEIN; BRAUN, 2003).

O modelo da estrutura tridimensional (3D) da SmATPDase1 construído por NUNES et al. (2015) por meio do programa Modeller (ESWAR et al., 2007) foi utilizado para destacar os peptídeos identificados como potenciais epitopos pelo SDAP. Segue-se uma breve descrição da metodologia seguida por NUNES et al. (2015) para modelar a enzima SmATPDase1: foram usados como templates as estruturas 3CJA (*Rattus norvegicus* NTPDase 2; 33% de identidade) e 3ZX3 (*Rat* NTPDase1; 37% de identidade) obtidos do *protein data bank* (PDB; <http://www.rcsb.org/pdb/home>). A seleção destes templates foi baseada na identidade, similaridade e presença de ligantes. Os domínios transmembranares, não estavam inclusos nos templates disponíveis no PDB, sendo necessária sua predição pelos *softwares* Phobius, TMHMM e Tmpred. Após a análise da predição, os modelos foram construídos aplicando restrições estruturais durante a modelagem. O alinhamento final entre as sequências da SmATPDase1, 3CJA e 3ZX3 foi realizado utilizando o software Clustal Omega.

3.2 SÍNTESE, PURIFICAÇÃO E ANÁLISE DOS PEPTÍDEOS

A síntese, purificação e análise dos peptídeos foram realizadas conforme descrita por NAKAIE et al. (2011). A SPSS (*Solid Phase Peptide Synthesis*) se baseia em ciclos desproteção, lavagem, acoplamento e lavagem. Para iniciar a síntese, o grupo N-terminal do primeiro aminoácido (sentido C-terminal para o N-terminal), que está imobilizado em uma resina, é ligado ao próximo aminoácido da sequência cujo grupo α -amino está protegido por um grupo t-Boc ou Fmoc. Após o acoplamento, o aminoácido é desprotegido, permitindo o acoplamento com o próximo aminoácido. Os ciclos se repetem até obtenção da sequência desejada, quando as cadeias laterais são desprotegidas e o peptídeo clivado da resina utilizando reagentes específicos de acordo com a estratégia utilizada (t-Boc ou Fmoc) (AMBLARD et al., 2005).

Na síntese realizada neste trabalho, a desproteção e neutralização do grupo α -amino dos aminoácidos foi realizada com 30% ácido trifluoroacético (TFA)/diclorometano (DCM) (30 min) e 10% trietilamina (TEA)/DCM (10 min). O acoplamento dos aminoácidos foi realizado utilizando os mesmos em excesso (3X) com diisopropilcarbodiimida (DIC)/hidroxibenzotriazol (HOBt) em dimetilformamida (DMF) por três horas e, em certos casos, aminoácido/N,N,N',N'-tetrametil-O-(1H-benzotriazol-1-il)uronium hexafluorofosfato (HBTU)/HOBt 1:1:1 em presença de excesso de diisopropiletilamina (DIEA) usando 20% DMSO/ N-metil-pirrolidona (NMP) como sistema solvente. Os reagentes DIC, HOBt, HBTU e DIEA ativam o grupo carboxila do aminoácido para que este possa reagir com o grupo amino formando a ligação peptídica. Para estimar o rendimento da reação foi realizado o teste da ninidrina, que identifica grupo amino livre. A clivagem do peptídeo da resina foi realizada usando ácido fluorídrico anidro a 0° por duas horas.

Após o procedimento de síntese, os peptídeos foram submetidos a cromatografia líquida de fase reversa (RP-HPLC) para análise de pureza utilizando uma coluna C18 (4,6 mm x 150 mm) com poro de 300 Å e partícula de 5 μ m (C18; Vydac, Hesperia, CA, USA). O sistema de solventes nesta análise foi: (A) água contendo 0,1% TFA e (B) 60% acetonitrila (ACN) em água contendo 0,1% TFA. Um gradiente linear de 10-90% em 30 min foi aplicado a um fluxo de 1,5 mL/min e utilizou-se comprimento de onda de 220 nm para monitoramento.

A composição dos peptídeos foi monitorada pela análise dos aminoácidos utilizando o equipamento *Biochrom 20 Plus amino acid analyzer* (Pharmacia LKB

Biochrom Ltd., Cambridge, England). Os peptídeos também foram analisados por LC/ESI-MS para checagem das massas dos mesmos, utilizando uma coluna C18 Nova-Pak (2,1 mm x 150 mm, poro de 60 Å, tamanho de partícula 3,5 µm), solventes A e B como descrito anteriormente para análise cromatográfica, fluxo de 0,4 mL/min e gradiente linear de 5% a 95% em 30 minutos. A condição usada para a espectrometria de massas foi ESI positivo.

Os peptídeos sintetizados correspondem as seguintes sequências derivadas da SmATPDase1: ⁴²⁸KDVAKI⁴³³ (P14251a), ²⁸⁹SIAASLL²⁹⁶ (P14411a) e ⁴⁷⁰ITFDSKVNGKSVS⁴⁸² (P14461a2).

3.3 PRODUÇÃO DE SORO POLICLONAL ANTI-P14251a, ANTI-P14411a, ANTI-P14461a2

Fêmeas de camundongos BALB/C (n=3) com 7 semanas receberam 3 inóculos do peptídeo (5 ug) em intervalos de 15 dias, sendo que no primeiro inóculo o peptídeo foi emulsificado em adjuvante completo de Freund e no segundo e terceiro inóculos em adjuvante incompleto de Freund. Como controle, um grupo de camundongos (n=2) não foi inoculado e um outro grupo (n=2) recebeu 3 inóculos com intervalo de 15 dias, sendo o primeiro inóculo com adjuvante completo de Freund e os demais com adjuvante incompleto de Freund. Os soros obtidos 10 dias após o último inóculo, foram estocados a -20° C. O título de anticorpos IgE e IgG1 anti-P14251a, anti-P14411a e anti-P14461a2 foram analisados por ELISA, como descrito no item 3.5.

3.4 INFECÇÃO EXPERIMENTAL E PERFUSÃO

Cercárias obtidas de caramujos *Biomphalaria glabrata* infectados com miracídios provenientes da cepa LE de Belo Horizonte foram usadas para a infecção. Camundongos *Swiss* foram submetidos à infecção subcutânea com 50 cercárias de *S. mansoni*. Após 60 dias da infecção os animais foram anestesiados e submetidos à coleta de sangue para obtenção do soro. Logo após, foi realizado o aprofundamento da anestesia e eutanásia dos camundongos para a realização da perfusão total do sangue com salina (NaCl 0,85%) heparinizada, com adaptações da técnica descrita por PELLEGRINO; SIQUEIRA (1956), possibilitando a recuperação dos vermes presentes no mesentério e no fígado.

3.5 PROCEDIMENTO PARA ANÁLISE DE ANTICORPOS POR ELISA (*ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAYS*)

ELISA é um teste imunoenzimático que permite a detecção e quantificação de anticorpos específicos presentes em amostras de soro ou plasma. Os anticorpos específicos se ligam ao antígeno adsorvido na microplaca. Este complexo antígeno-anticorpo formado é detectado por um anticorpo secundário, acoplado a uma enzima. A adição de substrato para esta enzima resulta na formação de um sinal detectável, sendo que na maioria das vezes este sinal é a mudança da cor da solução.

Neste trabalho, ensaios de ELISA foram realizados para detecção de anticorpos capazes de ligar aos peptídeos P14251a, P14411a e P14461a2 presentes nos soros dos animais imunizados, animais infectados e saudáveis e humanos doentes e saudáveis.

Primeiramente, os antígenos (peptídeos P14251a, P14411a e P14461a2; 1 µg/mL) foram solubilizados em tampão bicarbonato (NaHCO₃ 0,1 M, pH 9,6) e adsorvidos em placas de microtitulação (COSTAR), durante 15 horas à 4°C. As placas foram lavadas três vezes com tampão fosfato acrescido de 0,05% de tween-20 (PBST), pH 7,2. Para evitar que os anticorpos se ligassem diretamente na microplaca, as regiões não cobertas pelo antígeno foram bloqueadas por 2 h com solução de PBS acrescida de 3% de caseína e 10% de soro fetal bovino. As placas foram incubadas por 4 h com os soros diluídos na solução de bloqueio.

As amostras de soros de pacientes com esquistossomose habitantes dos distritos de Caju e Penha do Cassiano (Governador Valadares-MG) foram obtidas de uma soroteca do Instituto de Pesquisas René Rachou (CPqRR), Belo Horizonte, MG. Para confirmar o diagnóstico de esquistossomose, 3 amostras de fezes foram examinadas pelo método Kato Katz. Os soros utilizados como controle são provenientes de indivíduos saudáveis de áreas não endêmicas, os quais também foram examinados. Já os soros de animais foram obtidos como descritos nos itens 3.3 e 3.4.

É importante destacar que para a quantificação dos níveis de anticorpos IgE, os soros foram previamente depletados de seu conteúdo de anticorpos IgG antes de serem aplicados na microplaca, adaptado da técnica descrita por SOUZA-ATTA et al. (1999). Para tal, adicionou-se 200 µl de anticorpo anti-IgG (Bethyl), 600 µl de PBS e 200 µl do soro. Após 20 minutos, esta solução foi centrifugada por 5 minutos a 5000

RPM e o sobrenadante recolhido foi diluído 1:4, resultando em uma diluição final de 1:20 que foi aplicada. Este procedimento de depleção de IgG não foi realizado para análise de IgE dos animais imunizados. As placas foram então lavadas 3 vezes com PBST e incubadas por 1 h e 30 min com os anticorpos secundários ligados à peroxidase (anti-IgE de humano (1:500), anti-IgG4 de humanos (1:500), anti-IgE de camundongo (1:10000), anti-IgG1 de camundongo (1:1000) diluídos em solução de PBS. As placas foram lavadas três vezes com PBST para remover os anticorpos que se ligaram não especificamente. Para a revelação foram utilizados OPD (o-fenilenodiamina) e água oxigenada, previamente diluídos em tampão citrato. Ácido sulfúrico 2N foi utilizado para parar a reação. As leituras foram realizadas a 492 nm em um leitor de ELISA (Molecular Devices Corp., Melon Park, CA, USA). Como branco, foram usados poços na ausência dos soros testados. Os experimentos foram realizados em duplicata.

A razão IgE/IgG1 do soro dos animais imunizados foi calculada utilizando os valores de densidade óptica transformados em unidade de ELISA (U.E.). Para o cálculo de Unidade de Elisa, o valor da média das densidades ópticas foi dividido pela média das densidades ópticas obtidas do grupo controle, somada a duas vezes o desvio padrão [média da DO de cada amostra/(X_{DO} controle + 2 DP)].

3.6 PREPARAÇÃO DO HOMOGENEIZADO TOTAL DE VERMES ADULTOS

A preparação do homogeneizado total de vermes adultos foi baseada na técnica previamente descrita COLLEY et al. (1977), com algumas adaptações. Os parasitos foram extraídos dos camundongos *Swiss* albinos com 6 ou 7 semanas de infecção. Em seguida, os vermes adultos de *S. mansoni* foram submetidos à trituração mecânica em *potter* e o conteúdo proteico determinado pelo método de LOWRY et al. (1951). Estas preparações foram estocadas à -20° C até o momento do uso.

3.7 PURIFICAÇÃO PARCIAL DAS SmATPDases POR ELETROFORESE NÃO-DESNATURANTE E WESTERN BLOTS

Alíquota de preparação de verme adulto total (100 µg/poço) foi submetida a eletroforese não desnaturante (ou nativa) para visualizar a atividade das SmATPDases em gel (VASCONCELOS et al., 1996). Este tipo de eletroforese permite que a enzima

permaneça em sua forma nativa durante a corrida, uma vez que não utiliza-se SDS e outros agentes desnaturantes.

Primeiramente, a amostra foi homogeneizada em tampão de amostra acrescido de Triton X-100 0,2% (v/v) e deoxicolato de sódio (DOC) 0,4% (m/v) e aplicadas em gel de poliacrilamida 6% com Triton X-100 0,1% e DOC 0,1% e submetidas à eletroforese a 130V a 4°C. Após a corrida, o gel foi lavado por 40 min em Tampão MOPS 50 mM pH 7,2 e incubado em tampão MOPS 50 mM pH 7,2, CaCl₂ 1 M e 0,1 M do substrato ATP ou ADP a 37°C até o aparecimento de atividade, caracterizada pela precipitação de fosfato de cálcio. Para separar as proteínas presentes nas bandas que apresentou atividade de acordo com suas massas, estas regiões foram excisados, solubilizados em tampão de amostra e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 10% com 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS), como descrito previamente por LAEMMLI (1970), em um sistema de eletroforese (Mini Protean III, BioRad). Para calcular o volume molecular, em um dos poços foi aplicado um padrão de peso molecular pré-corado. Logo após, as proteínas foram eletrotransferidas (BioRad, Mini Trans-Blot III) para membranas de nitrocelulose. As membranas foram lavadas com PBST, os locais da membrana sem antígeno foram bloqueados (caseína 3%) para evitar que os anticorpos se ligassem diretamente e, em seguida, incubadas por 3 h com o soro anti-P14251a (1:50).

Para visualizar as bandas que os anticorpos foram capazes de se ligar, os ensaios de *western blots* foram revelados por quimioluminescência usando como anticorpo secundário anti-IgE de camundongo (1:5000) conjugado à peroxidase, 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).

3.8 AVALIAÇÃO DOS PERFIS PROTEICOS POR ELETROFORESE SDS-PAGE E WESTERN BLOTS

Tendo em vista uma melhor separação das proteínas, as corridas eletroforéticas foram realizadas usando o sistema Amersham ECL Gel Box em um gel de gradiente 8-16% de poliacrilamida (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden) com 60 µg de proteínas/poço de preparação de verme adulto solubilizadas em tampão de amostra de acordo com LAEMMLI (1970). Para realizar o cálculo aproximado do volume

molecular, também foi utilizado um padrão de peso molecular (BioRad). Parte do gel foi corada com Azul de Coomassie, e a outra parte eletrotransferida (BioRad, Mini Trans-Blot III) para membranas de nitrocelulose. Os ensaios de *western blots* foram executados conforme descrito no item 3.7, utilizando os seguintes soros: (1) pré-imune (1:75), (2) anti-P14251a (1:75), (3) anti-P14461a2 (1:75), (4) anti-P14411a (1:75) e anti-CD39 (1:250).

3.9 IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

As bandas do gel de poliacrilamida correspondem às bandas de aproximadamente 94, 63 e 45 kDa identificadas pelo anticorpo anti-CD39 foram excisadas e submetidas a análise por espectrometria de massas. Primeiramente, as amostras foram submetidas a tratamento prévio e digestão em gel pela enzima tripsina e os peptídeos tripticos resultantes ressuspensos em 20 μL de solução de ácido trifluoroacético 0,1% (TFA, Fluka®). Logo após, 5 μL foram injetados utilizando o sistema nanoUHPLC UltiMate® 3000 (Dionex®) equipado com coluna Nano-Trap Acclaim PepMap100 C18 (100 μm i.d. \times 2 cm, 5 μm , 100 Å; Thermo Scientific®) e coluna capilar Acclaim PepMap100 C18 RSLC (75 μm i.d. \times 15 cm, 2 μm , 100 Å; Thermo Scientific®). Primeiramente, os peptídeos são retidos no trap utilizando fase móvel composta de ACN 2% com TFA 0,05% e, após 3 minutos, são eluídos a uma vazão de 3 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Estes peptídeos eluídos previamente são então submetidos à separação cromatográfica em coluna C18. Para tal, utilizou-se fase móvel com vazão de 0,300 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, sendo composta por: (A) ácido fórmico 0,1% e, (B) ACN 80%, ácido fórmico 0,1%, sob modo gradiente de 4 a 90% de B em 61 min, à 40°C.

O sistema nanoUHPLC é acoplado ao instrumento Q-Exactive (Thermo Scientific®, Bremen, Alemanha) através da fonte Nanospray Flex Ion (Thermo Scientific), realizando a análise por espectrometria de massas dos peptídeos eluídos. Esta fonte é equipada com emitter de aço-inoxidável nano-bore (150 μm o.d. \times 30 μm i.d., Proxeon, Thermo Scientific®), operou sob voltagem de 1,9 kV, no modo positivo e temperatura de 250°C. Realizou-se varredura no modo *scan* à uma resolução de 70.000 com tempo máximo de injeção de 100 ms e acúmulo de íons no valor de 3×10^6 . Neste equipamento a fragmentação dos íons ocorre na cela de *higher-energy collisional dissociation* (HCD) e, neste método selecionou-se os 12 íons mais intensos monitorados na faixa de 300-2.000 m/z, com carga ≥ 2 e ≤ 5 , que foram isolados em

uma faixa de 2 m/z antes de serem fragmentados, com energia de colisão normalizada em 30 V. Os espectros MS/MS gerados foram adquiridos com resolução de 17.500, tempo máximo de injeção de 150 ms e acúmulo de íons no valor de 5×10^5 íons. O tempo de exclusão utilizado foi de 40 segundos.

Após a obtenção dos espectros de massas, este conjunto de dados foi submetido à busca em banco de dados utilizando o *software Proteome Discoverer* (versão 1.4, Thermo Scientific®). Para isso, utilizou-se o *workflow* com sistema de busca via SequestHT com *event detector* e *precursor ions area detector*, para quantificação por *label-free*. Os parâmetros de busca incluíram: (i) enzima: tripsina/P; (ii) número máximo de sítio de clivagem perdidos = 2; (iii) carbamidometilação (C), como modificação estática; (iv) oxidação de metionina e acetilação N-terminal, como modificações dinâmicas; (v) tolerância de massa de 10 ppm para íons parentais e de 0,1 Da para os fragmentos. Como banco de dados para a realização da busca adaptou-se o banco de *Shistosoma mansoni* disponível no servidor *Uniprot* (www.uniprot.org), contendo 10.779 sequências. Após a busca, foram consideradas como identificadas apenas as proteínas que apresentaram peptídeos com confiabilidade de no mínimo 5 % (taxa de *false discovery rate*) e com o mínimo de dois peptídeo únicos.

3.10 IMUNOPRECIPITAÇÃO

Uma alíquota de homogeneizado de vermes adultos de *S. mansoni* foi incubada por três horas a temperatura ambiente sob leve agitação com anticorpos policlonais anti-P14251a (1:50), anti- P14411a (1:50), anti- P14461a2 (1:50) e anti-CD39 (1:250). Logo após, foi adicionada proteína G (20 µl/100 µl amostra), e a incubação estendida por mais duas horas. Como controle, soro pré-imune de camundongo (diluição final 1:50) foi usado sob as mesmas condições. O complexo Proteína G-anticorpo-antígeno foi sedimentado por centrifugação durante cinco minutos, lavado com tampão MOPS 50 mM, pH 7,4 por centrifugação (processo repetido três vezes). Ao final do processo, o imunoprecipitado foi solubilizado em tampão de amostra e a realizou-se uma corrida eletroforética seguido por eletrotransferência, como descrito no item 3.8. A revelação dos *western blots* foi realizada de acordo com o item 3.7 utilizando anticorpo anti-CD39 (1:250) como anticorpo primário.

3.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste t para dois grupos de dados e o teste de Kruskal Wallis para grupos de dados superior a dois, com auxílio do software GraphPad Prism, versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3.12 ASPECTOS ÉTICOS

Os experimentos realizados com animais foram conduzidos de acordo com o guia de “Princípios e cuidado no uso de animais de laboratório” e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Juiz de fora conforme consta nos protocolos nº 017/09; 25/2012.

Para a utilização dos soros de humanos, os protocolos do estudo, CEPSh/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 ANÁLISE *IN SILICO* DE REGIÕES NA SmATPDase1 CAPAZES DE LIGAR ANTICORPOS IgE

A busca de potenciais epitopos de IgE na sequência FASTA da SmATPDase1(UniProtID Q7YTA4) foi feita utilizando uma ferramenta do servidor SDAP que identifica sequências de aminoácidos com características de alergenicidade definidas pela organização mundial da saúde (OMS), que neste caso foi a identificação na SmATPDase1 de sequências de 6 aminoácidos contínuas e idênticas presentes em alérgenos comprovados. Esta busca retornou oito peptídeos (LHKILT, ILTILA, SIAAAS, MKFCKK, KDVAKI, ITFDSK e NGKSVS) da isoforma SmATPDase1 que também estão presentes em alérgenos clássicos provenientes de diversas origens, tais como insetos e alimentos. Alguns desses peptídeos ocorrem na sequência de mais de um alérgeno, como o peptídeo KDVAKI que está presente em seis diferentes polcalcinas (Tabela 1).

As sequências retornadas pelo banco de dados do SDAP (Tabela 1) foram destacadas na estrutura primária (sequência FASTA; Figura 4A) e na estrutura tridimensional da SmATPDase1 (Figura 4B) utilizando o mesmo padrão de cores. Na figura 4B é possível visualizar que seis destas regiões retornadas pelo SDAP, correspondentes aos peptídeos SIAAAS, ILTILA, MKFCKK, KDVAKI, ITFDSK e NGKSVS, estão presentes na porção extracelular da enzima (domínio extracelular) e, portanto, mais acessíveis para ligação de imunoglobulinas, diferente dos peptídeos LHKILT e ILTILA, que se encontram localizados na porção transmembranar da SmATPDase1 (Figura 4A e B - em azul).

Tabela 1. Sequência de seis aminoácidos contínuos e idênticos presente na sequência da isoforma da ATP difosfohidrolase: SmATPDase1 e alérgenos depositados no banco de dados SDAP que contém esta sequência.

Posição do peptídeo na SmATPDase1/ Sequência alergênica	Alérgenos	Nº entrada no uniprot	Organismo
³⁷ LHKILT	Calcium-binding allergen Ole e 8	ALL8_OLEEU	<i>Olea europaea</i>
⁴⁰ ILTILA	Gamma Gliadin	GDBX_WHEAT	<i>Triticum aestivum</i>
	Gamma Gliadin B	GDBB_WHEAT	<i>Triticum aestivum</i>
	Gamma Gliadin	GDB0_WHEAT	<i>Triticum aestivum</i>
	Gamma Gliadin	GDB2_WHEAT	<i>Triticum aestivum</i>
²⁸⁹ SIAAAS	Ovoalbumin	OVAL_CHICK	<i>Gallus gallus</i>
²⁹¹ AAASLL	BW10KD allergen protein	Q8W3Y9_FAGE S	<i>Fagopyrum esculentum</i>
⁴²⁰ MKFCKK	Salivary antigen 1	CTF1_CTEFE	<i>Ctenocephalides felis</i>
	Polcalcin Syr v 3	POLC3_SYRVU	<i>Syringa vulgaris</i>
	Polcalcin Bra n 2	POLC2_BRANA	<i>Brassica napus</i>
	Polcalcin Bra r 2	POLC2_BRARA	<i>Brassica campestris</i>
	Polcalcin Aln g 4	POLC4_ALNGL	<i>Alnus glutinosa</i>
	Polcalcin Ole e 3	ALL3_OLEEU	<i>Olea europaea</i>
	Polcalcin Bet v 4	POLC4_BETPN	<i>Betula pendula</i>
⁴⁷⁰ ITFDSK	Pathogenesis-related protein 1	PR1_PHAVU	<i>Phaseolus vulgaris</i>
	Stress-induced protein SAM22	SAM22_SOYBN	<i>Glycine max</i>
⁴⁷⁷ NGKSVS	Kiwellin	KIWEL_ACTDE	<i>Actinidia deliciosa</i>

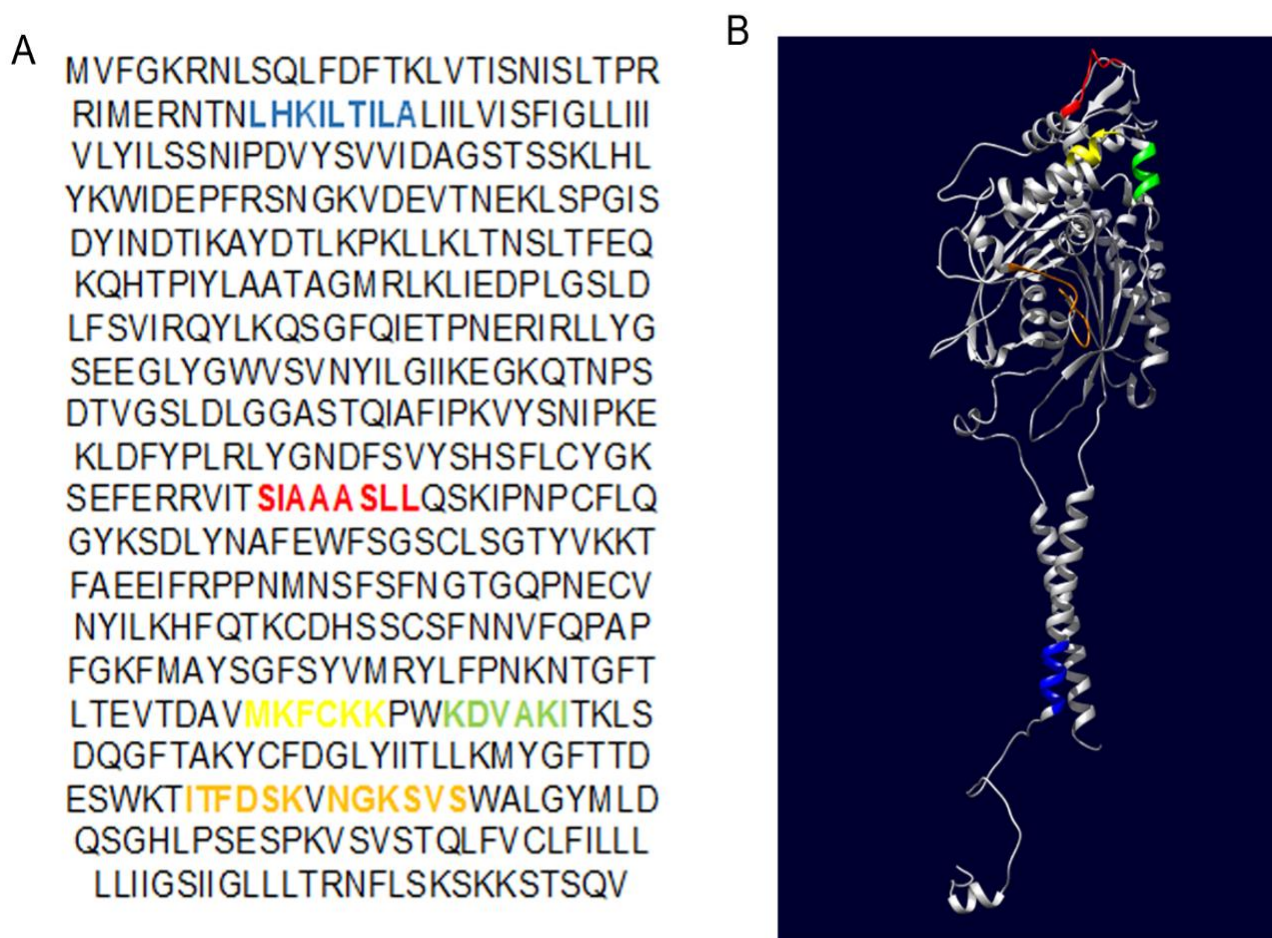


Figura 4. Prováveis epítomos de IgE destacados na estrutura sequência FASTA e na estrutura tridimensional da SmATPDase1: (A) sequência primária da SmATPDase1 foi obtida a partir do banco de dados UNIPROTKB – ExPasy (UniProtID Q7YTA4), os peptídeos preditos como alergênicos foram destacados em cores. (B) Modelo da estrutura tridimensional da isoforma proteica construído por modelagem comparativa. As mesmas sequências alergênicas ligadoras de IgE, foram destacadas no modelo da SmATPDase1.

4.2 SÍNTESE, PURIFICAÇÃO E ANÁLISE DOS PEPTÍDEOS

Três peptídeos foram selecionados para serem caracterizados quanto ao seu potencial de ligar e induzir a produção de IgE. A escolha da sequência foi determinada pela acessibilidade do peptídeo na estrutura nativa da enzima, facilidade de síntese e estabilidade. Por isso, eliminamos peptídeos que continham cisteína em sua estrutura, em função de sua elevada probabilidade de sofrer processos de oxidação.

Dessa maneira, entre as sequências retornadas pela busca no SDAP e que estão acessíveis na estrutura 3D da SmATPDase1, selecionamos as sequências KDVAKI (P14251a), ITFDSKVNKGKSVS (P14461a2) devido à proximidade das

sequências ITFDSK e NGKSVS e, finalmente, o peptídeo SIAAASLL (P14411a) desenhado a partir fusão das sequências SIAAAS e AAASLL (Tabela 2).

As moléculas foram sintetizadas manualmente por fase sólida usando a estratégia t-Boc e purificados por cromatografia líquida de fase reversa, obtendo uma pureza final de aproximadamente 100%. A análise da pureza final dos peptídeos sintéticos está representada nos cromatogramas da Figura 5.

As massas dos peptídeos foram verificadas por espectrometria de massas e os resultados das análises podem ser observados nos espectros de massas apresentados na Figura 6 que representam a intensidade do pico versus a relação massa/carga do peptídeo. Foram encontrados valores correspondentes a massa de cada um dos peptídeo em sua forma monocarregada $(M+H)^+$ ou muticarregada.

Tabela 2. Sequência dos peptídeos sintetizados, massas calculadas e massas obtidas pela análise por espectrometria de massas (LC-MS/ESI).

Peptídeo	Sequência	Massa teórica	Massa ESI (M+H)⁺
P14251a	KDVAKI-OH	672,43	673,71
P14411a	SIAAASLL-NH ₂	743,4541	744,43
P14461a2	ITFDSKVNGKSVS-NH ₂	1379,7408	1380,74

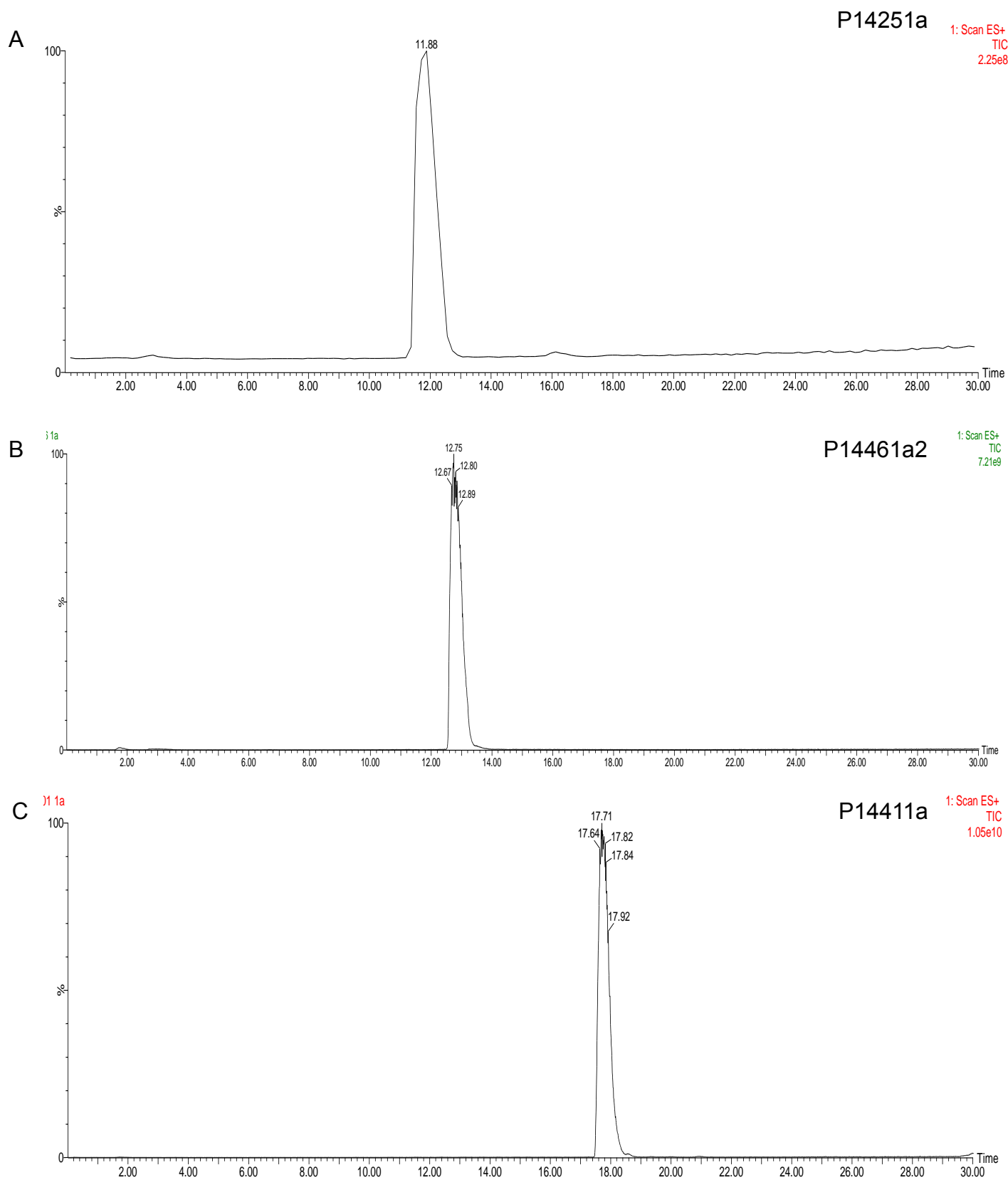


Figura 5. Análise da pureza dos peptídeos por cromatografia líquida de fase reversa: A análise foi realizada em coluna C18 Nova-Pak (2,1x 150 mm, poro de 60 Å, tamanho de partícula 3,5 µm), solventes A (água contendo 0,1% TFA) e B (60% ACN contendo 0,1% TFA) a um fluxo de 0,4 mL/min, em gradiente linear de 5% a 95% em 30 minutos.

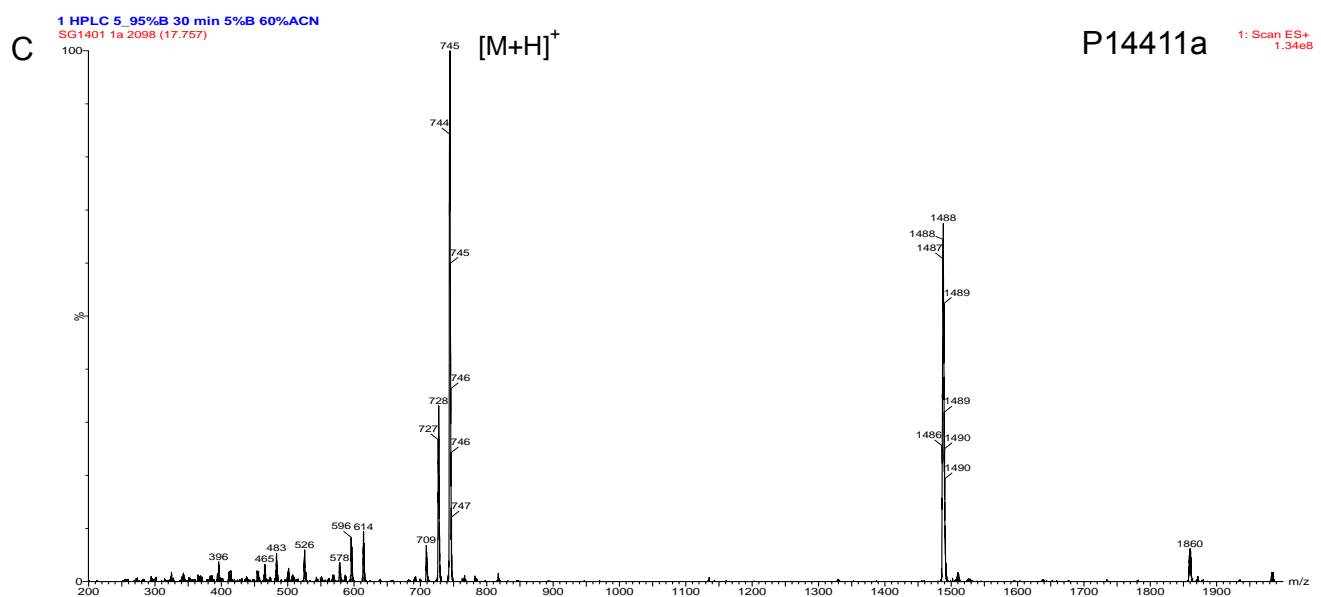
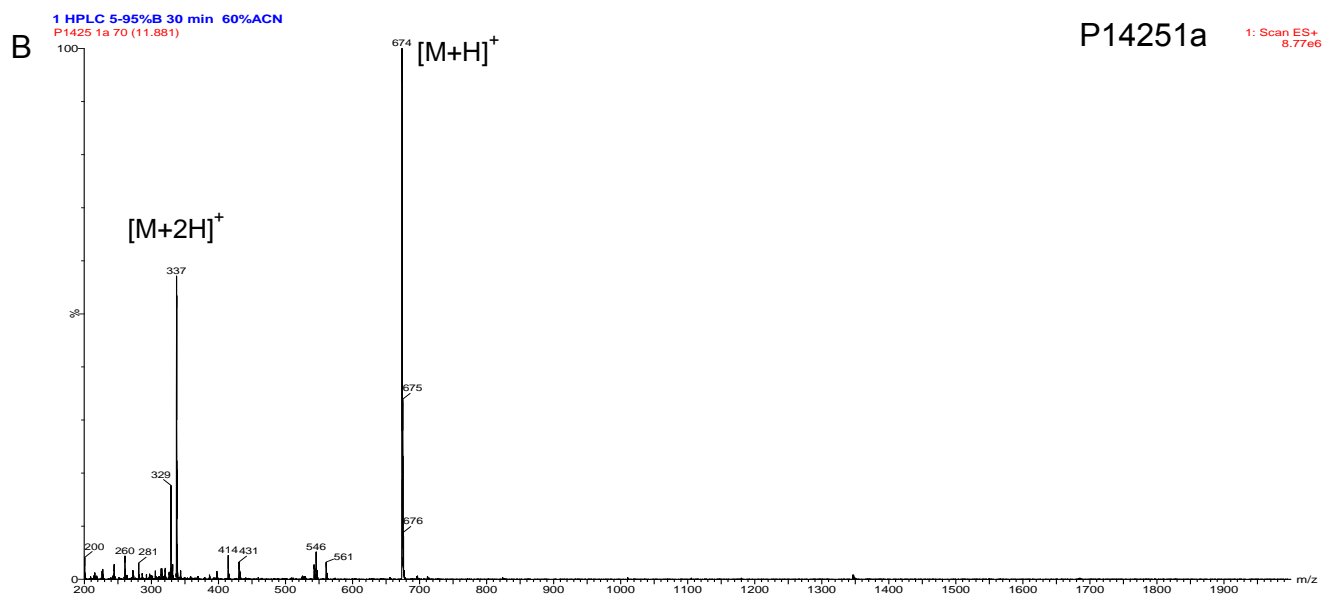
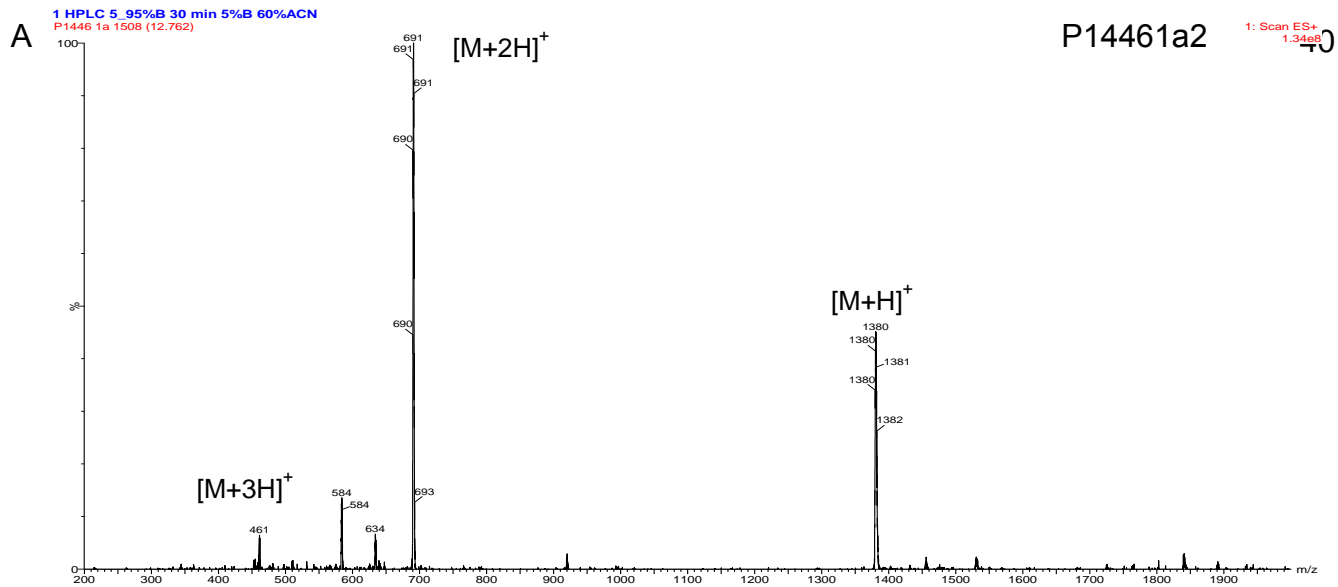


Figura 6. Espectros de massas dos peptídeos sintetizados: Para avaliar o sucesso da síntese, a massa dos peptídeos obtidos foi analisada por espectrometria de massas no modo positivo. Foi possível visualizar os peptídeos em sua forma monocarregada ou muticarregada, conforme indicado nos espectros acima.

4.3 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE IgE E IgG4 REATIVOS CONTRA OS PEPTÍDEOS P14251a, P14411a E P14461a2 EM SORO DE HUMANOS DOENTES E SAUDÁVEIS

Para a determinação da concentração ideal do antígeno a ser utilizada nos ensaios ELISA, os peptídeos P14251a, P14411a e P14461a2, foram testados em seis concentrações distintas, de 1 a 6 µg/mL, com soros de pacientes infectados com *S. mansoni* e indivíduos saudáveis (Figura 7). Para isso, o conteúdo de IgG total das amostras de soros foi previamente depletado e a revelação foi feita com anticorpos secundários anti-IgE de humanos. A análise estatística (Kruskal-Wallis) mostrou que não houve diferença significativa de reatividade nas diferentes concentrações de peptídeo para a mesma diluição do soro. Desta forma, podemos inferir que o aumento de concentração do antígeno não influenciaria nas reatividades, sendo a concentração de antígeno 1 µg/mL suficiente para saturação da placa. A partir deste ensaio a utilização do antígeno ficou padronizada em 1 µg/mL.

Os níveis de anticorpos IgE e IgG4 reativos contra os peptídeos (antígeno de cobertura, 1 µg/mL) foram avaliados em *pool* de amostras de soros de pacientes diagnosticados com esquistossomose mansônica e de indivíduos saudáveis (controle) titulados de 1:40 a 1:1280 (Figura 8) pela técnica de ELISA.

É importante enfatizar que para análise de IgE, foi realizada a depleção do conteúdo IgG a fim de melhorar a reatividades dos anticorpos secundário anti-IgE e diminuir a competição com IgG4, visto que ambos se ligam a epitopos similares. A comparação dos níveis de anticorpos IgE circulantes revelou uma maior reatividade das amostras do grupo controle (pacientes que não possuem esquistossomose) em relação ao grupo pacientes com a helmintose para o peptídeo P14251a (diluições 1:40 a 1:160; Figura 8A) e para o peptídeo P14411a e P14461a2 (diluições de 1:40 a 1:640; Figuras 8B e 8C, respectivamente). Por outro lado, a reatividade de IgG4 foi maior no grupo de pacientes infectados com *S. mansoni* em relação ao controle nas diluições 1:40 a 1:160 para os peptídeos P14251a e P14411a (Figura 8B e 8D), respectivamente. Não se observou diferença significativa dos níveis de IgG4 entre os grupos de pacientes para o antígeno P14461a2 (Figura 8F)

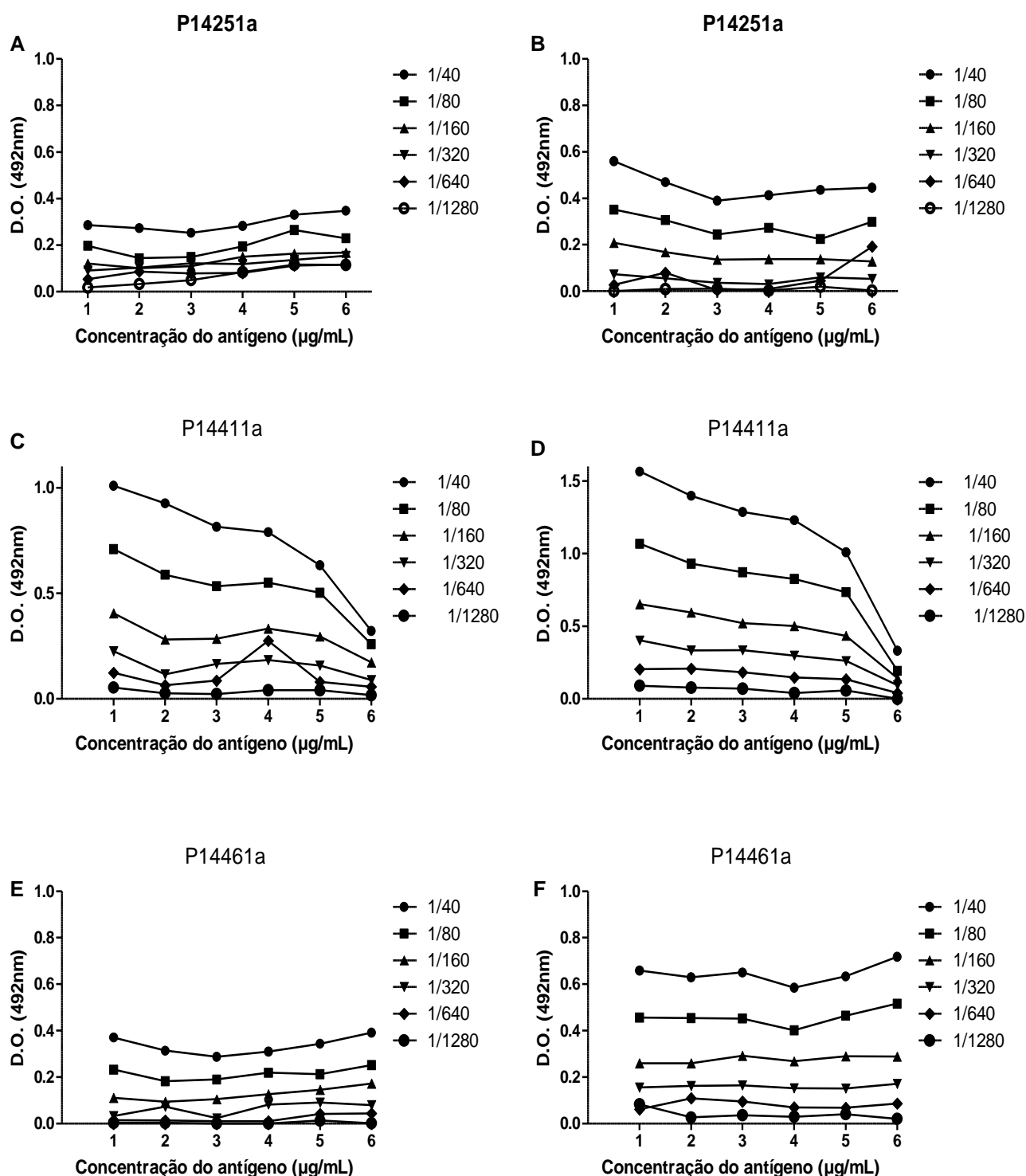


Figura 7. Determinação da concentração ideal de antígeno: Os soros de pacientes com esquistossomose (A, C e E) e indivíduos saudáveis (B, D e F) previamente depletados de IgG foram titulados (1:40 a 1:1280) usando diferentes concentrações (1 a 6 µg/mL) de peptídeo como antígeno de cobertura em técnica de ELISA. A reação foi revelada por anticorpos anti-IgE (1:500) de humanos acoplados a peroxidase. O teste estatístico Kruskal-Wallis mostrou que não houve diferença significativa entre estes grupos.

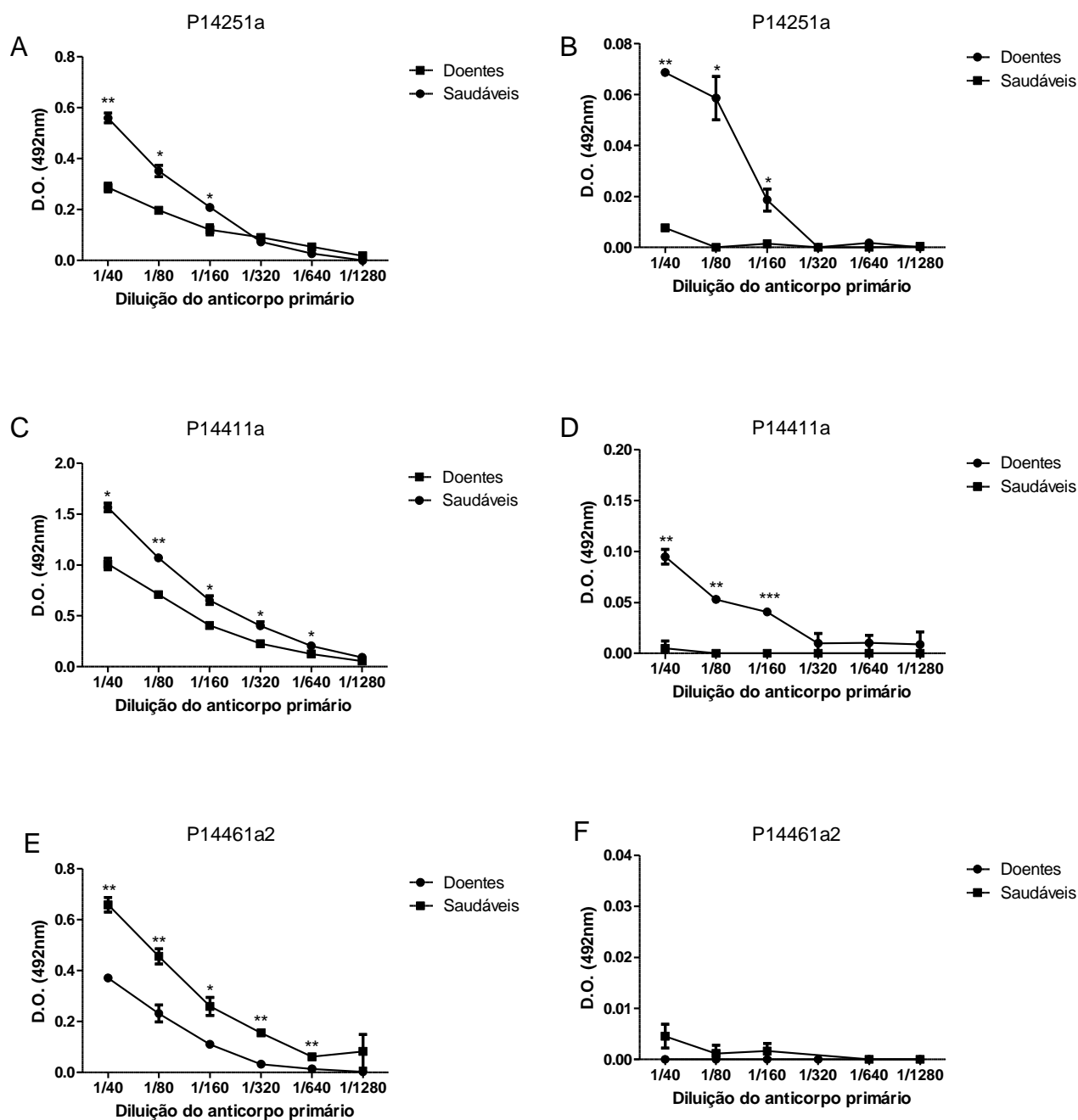


Figura 8. Reatividade de anticorpos IgE (A, C e E) e IgG4 (B, D e F) em amostras de soros de pacientes com esquistossomose e indivíduos saudáveis contra os peptídeos sintéticos: Pool de amostras de soro de pacientes infectados com *S. mansoni* e amostras de soros de indivíduos saudáveis foram titulados (1:40 a 1:1280), utilizando os peptídeos como antígeno de cobertura (1 ug/mL) pela técnica de ELISA. Para análise de IgE, os soros foram previamente depletados do conteúdo de anticorpos IgG total. A reação foi revelada com anticorpos anti-IgE (1:500) ou IgG4 (1:500) de humanos acoplados peroxidase. Os resultados são expressos em densidade ótica da média \pm desvio padrão, o experimento realizado em duplicata para todas as diluições. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.4 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE IgE E IgG1 REATIVOS CONTRA OS PEPTÍDEOS P14251a, P14411a E P14461a2 EM AMOSTRAS SORO DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *S. mansoni* E CONTROLE

De maneira similar a análise de anticorpos reativos contra os peptídeos (antígeno de cobertura, 1 µg/mL) em amostras de soros de pacientes doentes e indivíduos saudáveis, foi analisada a reatividade de IgE e IgG1 em soros de camundongos infectados e não infectados (controle) Figura 9). Os resultados revelaram um perfil de reatividade diferente em relação a reatividade encontrada nas amostras de humanos. Neste caso, a reatividade de IgE e IgG1 foi maior no grupo de animais infectados em relação ao controle. A reatividade de IgE foi significativamente maior nas diluições 1:40 e 1:80 para todos os peptídeos, enquanto que para IgG1 a reatividade foi significativamente maior nas diluições 1:40 a 1:640 para os peptídeos P14251a e P14461a2 e das diluições 1:40 a 1:1280 para o peptídeo P14411a.

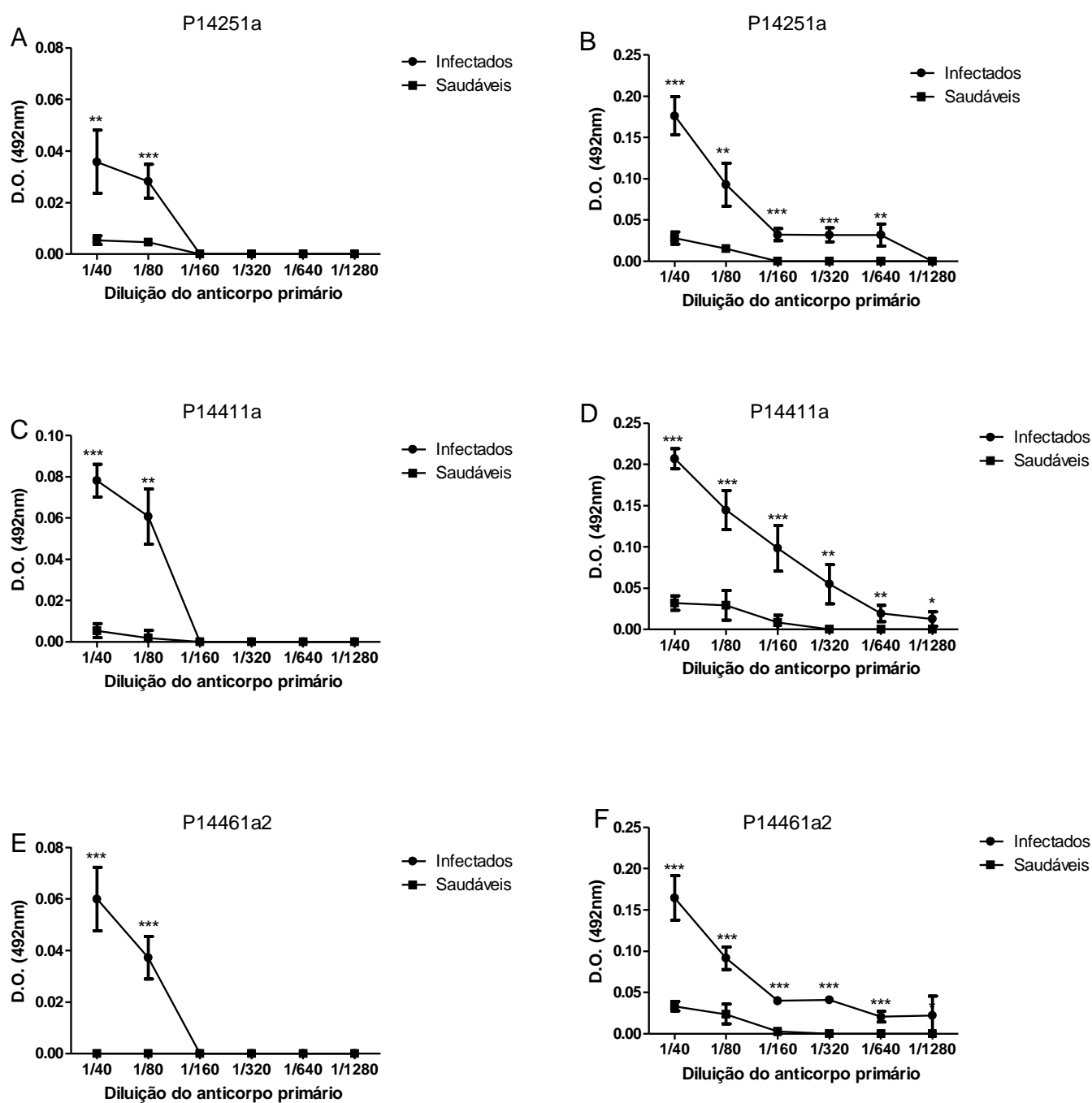


Figura 9. Reatividade de anticorpos IgE (A, C e E) e IgG1 (B, D e F) em amostras de soros de camundongos infectados com *S. mansoni* e saudáveis contra os peptídeos derivados da isoforma SmATPDase 1: Pool de amostras de soro de camundongos infectados e camundongos saudáveis foram titulados (1:40 a 1:1.280) utilizando os peptídeos como antígeno de cobertura em técnica de ELISA (1 µg/mL). Para análise de IgE, os soros foram previamente depletados do conteúdo de IgG total. A reação foi revelada por anticorpos anti-IgE (1:10.000) ou IgG1 (1:1.000) de camundongos acoplados peroxidase. Os resultados foram expressos em densidade óptica, estão representados os valores da média ± desvio padrão de experimento feito em quadruplicata para todas as diluições. *p<0.05, **p<0.01, *p<0.001**

4.5 PRODUÇÃO DE SORO POLICLONAL ANTI-P14251a, ANTI-P14411a, ANTI-P14461a2

Camundongos BALB/C com 7 semanas (n=3) receberam 3 inóculos contendo 5 µg dos peptídeos testados para indução de anticorpos. Na primeira dose, os antígenos foram emulsificados em adjuvante completo de Freund e nas segunda e terceira doses emulsificou-se as moléculas com adjuvante incompleto de Freund. Os títulos de IgG1 e IgE dos animais imunizados foram avaliados pela técnica de ELISA, empregando-se os próprios peptídeos como antígenos de cobertura. Embora graficamente possa ser observado um aumento da produção dos anticorpos IgE nos camundongos imunizados com o peptídeo P14251a2, não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 10). Para os demais peptídeos não foi possível observar a indução da produção de anticorpos específicos contra estes peptídeos sob condições adotadas neste ensaio.

Os valores de densidade óptica foram transformados em unidades de ELISA e a relação IgE/IgG1 foi calculada (Tabela 3). Esta relação foi maior para o peptídeo P14251a, sugerindo que este peptídeo induz uma produção maior de IgE.

Tabela 3. Relação IgE/IgG1 após a terceira imunização na diluição 1:50: Os valores das densidades ópticas da diluição 1:50 do soro coletado de cada camundongo após a terceira imunização foram transformados em Unidade de ELISA ([média da DO de cada amostra/(X_{DO} controle + 2 DP)]).

Peptídeos	Média IgE (U.E.)	Média IgG1 (U.E.)	Média IgE/IgG1
P14411a	0,89	2,34	0,38
P14251a	1,58	1,06	1,49
P14461a2	0,87	1,42	0,61

*IgG1 X_{DO} controle + 2 DP = 0,069252648 (P14411a), 0,098052648 (P14251a2), 0,065821277 (P14461a2)

*IgE X_{DO} controle + 2 DP = 0,107049 (P14411a), 0,125285 (P14251a2), 0,108207 (P14461a2)

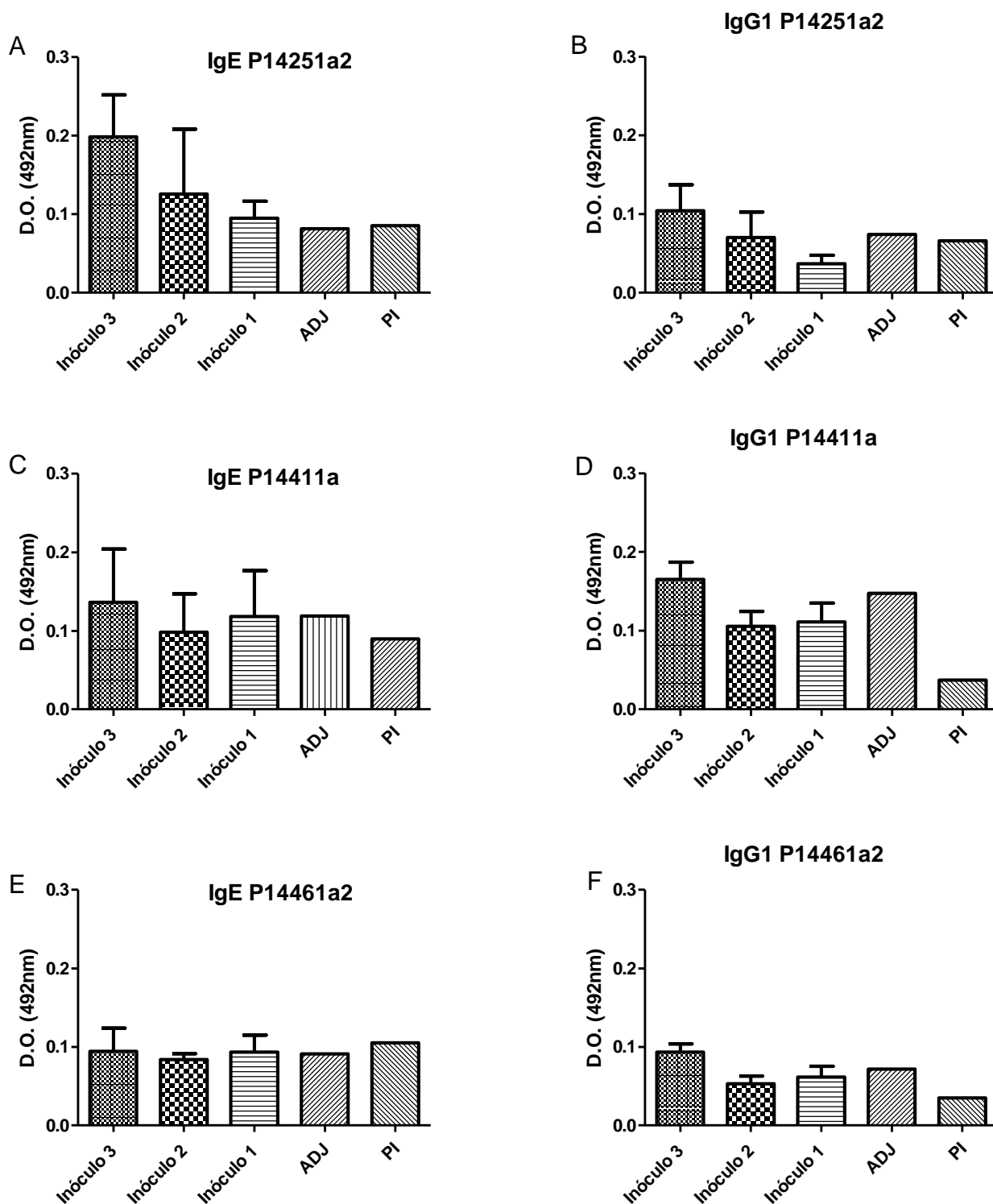


Figura 10. Análise da produção de anticorpos IgG1 e IgE após imunização com os peptídeos sintéticos derivados da SmATPDase 1: Camundongos BALB/C, com sete semanas, foram imunizados com 3 doses de cada peptídeo (5 µg) em intervalo de 15 dias emulsificados em adjuvante completo (primeiro inóculo) ou incompleto de Freund (demais inóculos). Os níveis de IgG1 (1:1000) e IgE (1:10000) contra cada um dos peptídeos foram analisados através da técnica de ELISA (diluição 1:50), empregando 1 µg/mL de cada peptídeo como antígeno de cobertura nas placas. Os resultados apresentados se referem a média das leituras dos animais a cada inóculo realizado.

4.6 IDENTIFICAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE BANDAS PROTEICAS PROVENIENTES DO HOMOGENEIZADO TOTAL DE VERMES E RECONHECIDAS POR ANTICORPOS ANTI-CD39

A separação eletroforética em gel desnaturante de gradiente (8-16%) das proteínas presentes no homogeneizado total de vermes adultos foi realizada (Figura 11A). Em seguida, uma parte deste gel foi submetido a transferência para membranas de nitrocelulose e a revelação de *western blots* deste homogeneizado com anticorpos anti-CD39 (1:250). Nesta revelação, foram observadas 6 bandas predominantes (Figura 11B). As bandas de 93, 63 e 45 kDa foram excisadas do gel, submetidas ao tratamento para reduzir e alquilar as proteínas seguida de digestão enzimática utilizando tripsina. Os peptídeos trípticos foram submetidos a análise por LC-MS/MS e as proteínas contidas nas bandas do gel foram identificadas utilizando o programa SEQUEST. A análise da banda de 63 kDa retornou 13 peptídeos provenientes da sequência da SmATPDase1, que correspondem a 30.33% da sequência. A banda de 45 kDa mostrou 2 peptídeos (5,51%) que também correspondem a peptídeos presentes na SmATPDase1 (Figura 12). Na banda de 93 kDa não foram identificados peptídeos provenientes de isoformas de NTPDases.

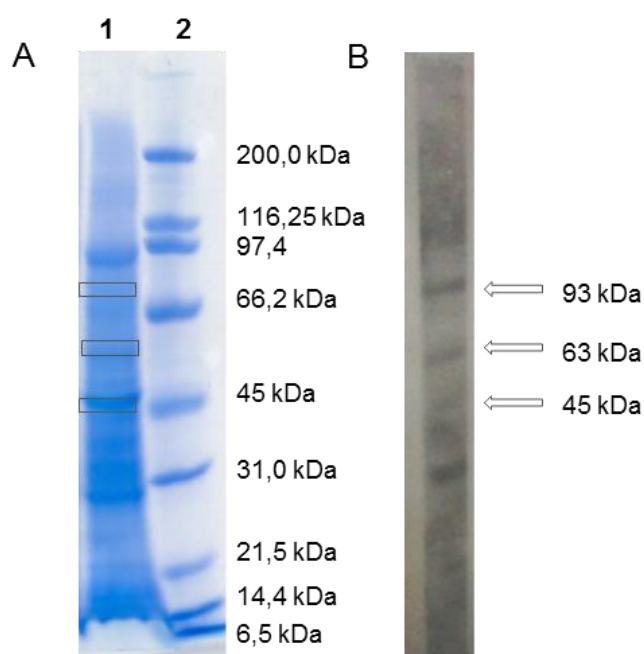


Figura 11. (A) Eletroforese de homogeneizado total de verme e marcador de peso molecular, respectivamente (B) *Western blot* revelado por anticorpos anti-CD39: As corridas eletroforéticas foram realizadas em um gel de gradiente 8-16% de poliácridamida (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden) com 60 µg de proteínas/poço de preparação de verme adulto seguida de eletrotransferência para membrana de nitrocelulose. O *Western blot* foi desenvolvido com anticorpos anti-CD39 (1:250). As membranas foram reveladas por quimioluminescência com anticorpo secundário anti-IgG (1:1000) de coelho conjugado à peroxidase e Luminol como substrato, usando o kit ECL como recomendado pelo fabricante (GE Healthcare, Brasil).

A MVFGKRNLSQLFDFTKLVLTISNISLTPRRIMERNTNLHKILTILALILVISFIGLLIIIVLYLSSNIPDVYSVVIDAGSTSS
 KLHLYK**WIDEPFR**SNGKVDEVTNEKLSPGISDYINDTIKAYDTLKPCLK**LTNSLTFEQK**QHTPIYLAATAGMRLK**L**
EDPLGSLDLFSVIRQYLK**QSGFQIETPNER**IRLLYGSEEGLYGWVSVNYILGIIKEGKQTNPSDVTGSLDLGGASTQ
 IAFIPKVYSNIPKE**KLDFYPLRLYGNDFSVYSHSFLCYGK**SEFER**RVITSIAAASLLQSK**IPNPCFLQGYK**SDLYNAF**
EWFGSGSCLSGTYVKKTFAEEIFRPPNMNSFSFNGTGQPNECVNYILKHFQTKCDHSSCSFNNVFQPAPFGKFMA
 YSGFSYVMRYLFPNKNTGFTLLEVTDAMVKFCKKPWKDVAKITKLSAQGFTAK**YCFDGLYIITLLKMYGFTTDES**
WKTITFDSKVNGK**SVSWALGYMLDQSGHLPSESPK**VSVSTQLFVCLFILLLLLIIGSIIGLLLTRNFLSKSKKSTSQV

B MVFGKRNLSQLFDFTKLVLTISNISLTPRRIMERNTNLHKILTILALILVISFIGLLIIIVLYLSSNIPDVYSVVIDAGSTSS
 KLHLYKWIDEPFRSNGKVDEVTNEKLSPGISDYINDTIKAYDTLKPCLKLTNSLTFEQKQHTPIYLAATAGMRLK**L**
EDPLGSLDLFSVIRQYLKQSGFQIETPNERIRLLYGSEEGLYGWVSVNYILGIIKEGKQTNPSDVTGSLDLGGASTQ
 IAFIPKVYSNIPKE**KLDFYPLRLYGNDFSVYSHSFLCYGKSEFER****VITSIAAASLLQSK**IPNPCFLQGYKSDLYNAF
 EWFGSGSCLSGTYVK**KTFAEEIFRPPNMNSFSFNGTGQPNECVNYILKHFQTKCDHSSCSFNNVFQPAPFGKFMA**
 YSGFSYVMRYLFPNKNTGFTLLEVTDAMVKFCKKPWKDVAKITKLSAQGFTAK**YCFDGLYIITLLKMYGFTTDES**
 WK**TITFDSKVNGKSVSWALGYMLDQSGHLPSESPK**VSVSTQLFVCLFILLLLLIIGSIIGLLLTRNFLSKSKKSTSQV

Figura 12. Peptídeos da SmATPDase1 identificados por espectrometria de massas na banda de 45 kDa (B) e 63 kDa: (A) Sequência de 13 peptídeos únicos identificados na banda de 63 kDa destacados na sequência da SmATPDase1, correspondendo a uma cobertura de 30% da enzima (B) Sequência de 2 peptídeos únicos identificados na banda de 45 kDa destacados na sequência da SmATPDase1, correspondendo a uma cobertura de 5.5% da enzima.

4.7 DETECÇÃO da SmATPDase1 POR ANTICORPOS anti-P14251a, anti-P14411a e anti-P14461a2

Amostras dos soros policlonais anti-peptídeos produzidos foram utilizados para identificação da isoforma SmATPDase 1 de *S. mansoni* contida no homogeneizado total de vermes adultos. Desta forma, análises de *western blots* foram realizadas com o homogeneizado total de vermes adultos utilizando anticorpos policlonais anti-P14251a, anti-P14411a e anti-P14461a2 produzidos em camundongos BALB/C. Bandas de aproximadamente 93, 63, 50, 40 e 33 kDa foram reveladas pelos anticorpos anti-peptídeos, utilizando-se como anticorpo secundário anti-IgE de camundongos e bandas de aproximadamente 94 e 63 kDa quando as proteínas foram reveladas com os mesmos anticorpos primários e anticorpos secundários anti-IgG de camundongo (Figura 13).

A fim de reforçar os resultados que mostraram a capacidade dos anticorpos anti-peptídeos reconhecerem a SmATPDase1 em homogeneizado total de verme adulto, realizou-se dois experimentos adicionais. No primeiro, alíquotas de homogeneizado total de verme adulto foram incubadas com os anticorpos anti-peptídeos e anti-CD39 por 3 horas. Após esse período, acrescentou-se proteína G, estendeu a incubação por mais duas horas e, logo em seguida, centrifugou. A proteína G é uma proteína que se liga à porção Fc de imunoglobulinas e está covalentemente ligada a *beads* de agarose. O complexo formado pelo anticorpo-antígeno foi então precipitado e utilizado para ensaios de *western blots* utilizando anticorpos anti-CD39

que indicou a presença de uma banda de 64 kDa (Figura 14). No segundo experimento, foi feita a purificação parcial das SmATPDases por gel de poliacrilamida não desnaturante. As bandas do gel que apresentaram atividade ATPDásica ou ADPDásica (Figura 15) foram excisadas e utilizadas novamente em ensaio de *western blot*, desta vez, devido a insuficiência de amostra, realizou-se a revelação apenas com anti-P14251a que foi capaz de reconhecer duas bandas de 66 e 57 kDa.

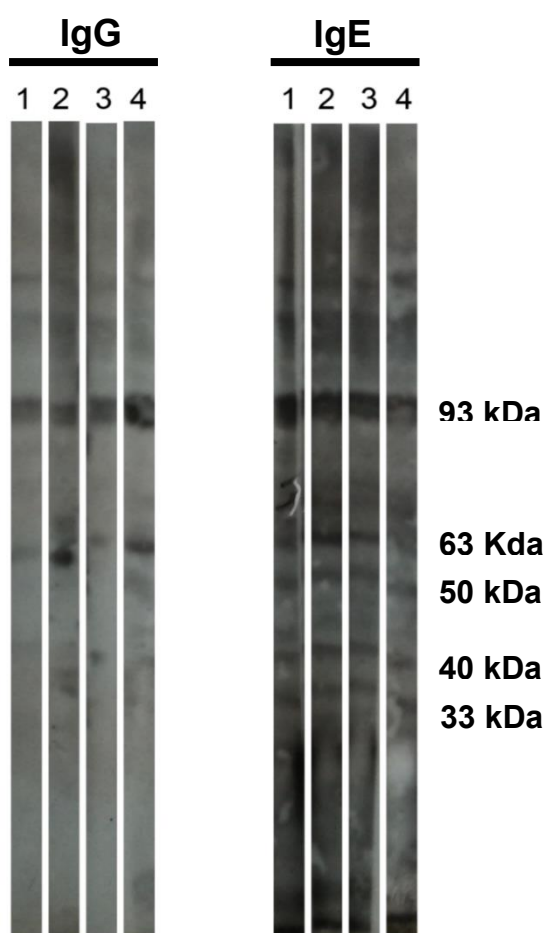


Figura 13. Identificação de uma provável isoforma de NTPDase de *S. mansoni* no homogeneizado total de vermes adultos usando anticorpos policlonais anti-P14251a, anti-P14411a e anti-P14461a2: As corridas eletroforéticas foram realizadas em um gel de gradiente 8-16% de poliacrilamida (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden) com 60 µg de proteínas/lane de preparação de verme adulto seguida de eletrotransferência para membrana de nitrocelulose. O *Western blot* foi desenvolvido com os seguintes soros: (1) pré-imune (1:75), (2) anti-P14251a (1:75), (3) anti-P14461a2 (1:75), (4) anti-P14411a (1:75). As membranas foram reveladas por quimioluminescência com anticorpo secundário anti-IgE (1:1000) ou IgG (1:1000) de camundongo conjugado à peroxidase e Luminol como substrato, usando o kit ECL como recomendado pelo fabricante (GE Healthcare, Brasil).

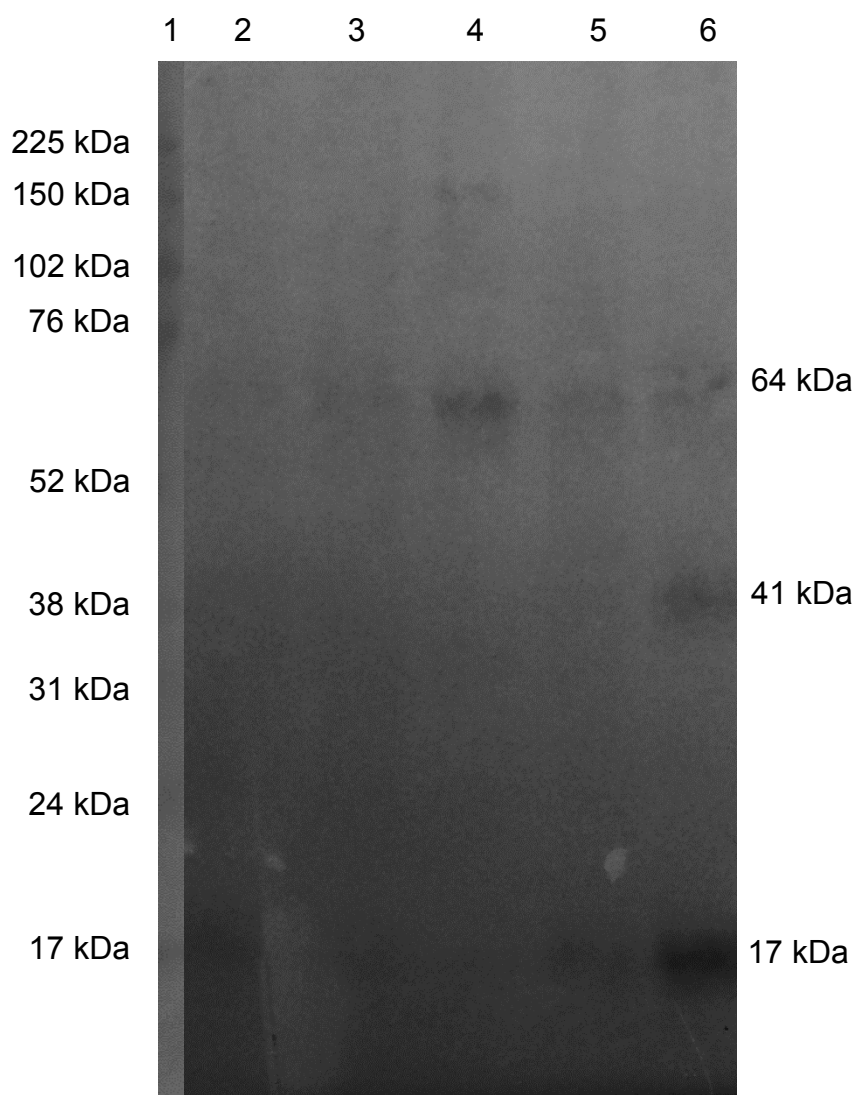


Figura 14. Identificação da SmATPDase1 por ensaio de imunoprecipitação: O poço 1 corresponde ao padrão de peso molecular (GE). Uma alíquota de homogeneizado de vermes adultos de *S. mansoni* foi incubada por 3 horas a temperatura ambiente sob leve agitação com anticorpos policlonais (2) adjuvante (1:50), (3) anti-P14251a (1:50), (4) anti- P14411a (1:50), (5) anti- P14461a2 (1:50) e (6) anti-CD39 (1:250). Logo após, foi adicionada proteína G (20 μ l/100 μ l amostra), e a incubação estendida por mais 2 horas. O complexo Proteína G-anticorpo-antígeno foi sedimentado por centrifugação durante 5 minutos e lavado com tampão MOPS 50 mM, pH 7,4 (processo repetido 3 vezes). Ao final do processo, o imunoprecipitado foi solubilizado em tampão de amostra e realizou-se uma corrida eletroforética seguido por eletrotransferência. A revelação dos *western blots* foi realizada com anticorpo anti-CD39 (1:250) como anticorpo primário.

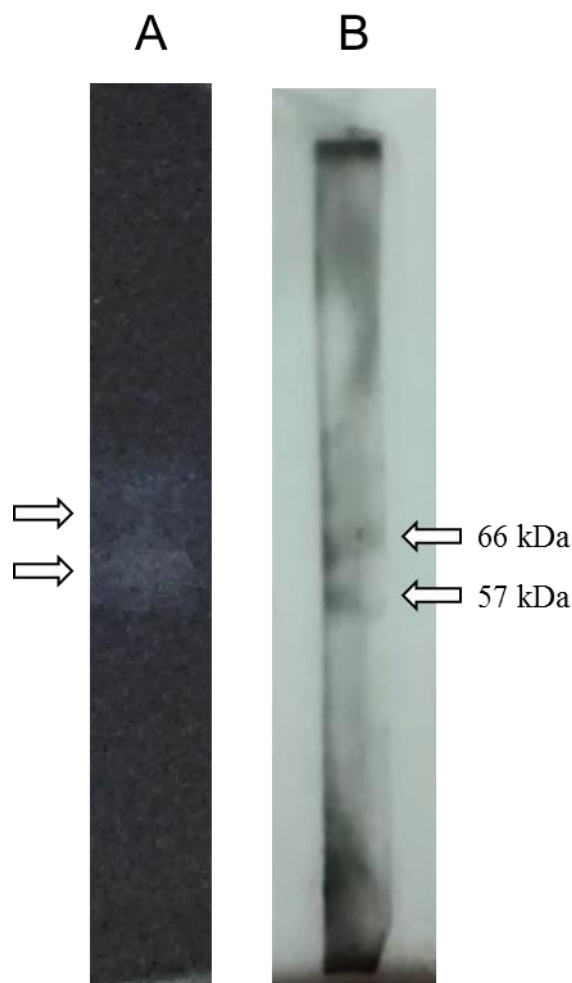


Figura 15. (A) Purificação parcial das SmATPDases e (B) Identificação de uma provável SmATPDase1 por anticorpos anti-P14251a: Aliquotas (100 μ g) de homogeneizado total de vermes adultos foram submetidas à eletroforese não desnaturante utilizando os detergentes DOC e Triton X100. Após lavagem com tampão MOPS, o gel foi incubado a 37°C com CaCl_2 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*. O *Western blot* foi desenvolvido com anti-P14251a (1:50). A membrana foi revelada por quimioluminescência com anticorpo secundário anti-IgE (1:1000) de camundongo conjugado à peroxidase e Luminol como substrato, usando o kit ECL como recomendado pelo fabricante (GE Healthcare, Brasil).

5 DISCUSSÃO

5.1 SELEÇÃO POR ANÁLISE *IN SILICO* DE PEPTÍDEOS NA SEQUÊNCIA DA SmATPDase1 POTENCIALMENTE CAPAZES DE LIGAR ANTICORPOS IgE

A SmATPDase 1 é uma enzima importante para a sobrevivência do helminto *S. mansoni*, pois sua função está relacionada tanto a processos fisiológicos do parasito, por exemplo síntese de novo de purinas, quanto regulação de respostas do hospedeiro, participando, dos processos de escape e de proteção contra “DAMPs” (*danger-associated molecular patterns*) (FARIA-PINTO et al., 2004; CASTRO-BORGES et al., 2011).

Além disso, a SmATPDase1 constitui o segundo grupo de proteínas mais abundante na superfície do tegumento dos vermes adultos e se encontra presente em todas as formas do ciclo de vida do parasito (FARIA-PINTO et al., 2004; CASTRO-BORGES et al., 2011). Um dos papéis atribuídos a esta enzima na superfície do tegumento é hidrolisar o ATP liberado pelas células do hospedeiro a medida que o verme migra pela vasculatura. A quebra do ATP libera fosfato e outros motivos orgânicos que podem ser utilizados pelo verme, além de atuar como um mecanismo de escape (CASTRO-BORGES et al., 2011).

Durante a esquistossomose ocorrem pequenas disfunções na fisiologia vascular, principalmente na pequena circulação, alterando o fluxo sanguíneo e aumentando o “*stress local*”, com maior liberação de DAMPs, como o ATP. As duas isoformas de NTPDases presentes em *S. mansoni* podem estar envolvidas diretamente na capacidade do parasito em diminuir a resposta imunológica e o efeito trombótico em torno dos vermes adultos e ovos, garantindo a mobilidade intravascular do parasito. A garantia do metabolismo purinérgico ofertado por estas enzimas reduz o aumento das concentrações de ATP lítico e sinalizador (DAMPs) (BHARDWAJ; SKELLY, 2009). Empregando RNA de interferência, DA’DARA et al. (2014) silenciou a expressão gênica das enzimas SmATPDase1, fosfatase alcalina (SmAP; UniprotID: A8TKU6) e fosfodiesterase (SmNPP-5; UniprotID: C4QCZ2) nos vermes de *S. mansoni* e mostrou que a habilidade de catalizar ATP e ADP é exclusiva da SmATPDase1, diferente de outros organismos que possuem mais de uma enzima para exercer esta função. A interferência direta na sinalização purinérgica pode ser uma estratégia adaptativa de imunomodulação da resposta imune do hospedeiro,

limitando eventos como a trombose e aumentando a sobrevivência do patógeno (SKELLY AND BHARDWAJ, 2009).

Resultados preliminares obtidos por nosso grupo sugeriram que a SmATPDase1 é um *allergen-like*, isto é, proteína capaz de ligar anticorpos IgE (EMIDIO, 2013). Na esquistossomose, os anticorpos IgE são de grande relevância, uma vez que estão envolvidos em mecanismos efetores da resposta imune protetora (KHALIFE et al., 2000), sendo que diversos estudos já mostraram a relação entre os níveis de IgE e resistência à reinfeção (RIHET et al., 1991; DUNNE et al., 1992). Entretanto, a utilização de antígenos de IgE em vacinas ou imunoterapias eleva o risco de respostas indesejadas, devido aos efeitos deletérios associados a esta imunoglobulina, como ocorreu com o teste do antígeno Na-ASP-2 (*Necator americanus* Ancylostoma-secreted protein 2; UniprotID: Q7Z1H1). A vacinação (fase clínica I) em dose única desta proteína secretada pelo parasito *Necator americanus* em pessoas de áreas endêmicas resultou em reações de urticária generalizada, visto que as pessoas desta área já tinham elevados níveis de IgE anti-Na-ASP-2 circulantes (DIEMERT et al., 2012). Algumas alternativas foram propostas para casos como estes: mutar epitopos de IgE, administrar a vacina com adjuvantes que induzam uma resposta Th1 ou triar os pacientes previamente sensibilizados, já que o antígeno vacinal Na-ASP-2 foi bem tolerado em indivíduos não expostos (DIEMERT et al., 2012).

Neste trabalho propomos uma nova ideia: a utilização de peptídeos pequenos desenhados a partir do epitopos de IgE identificados na molécula para a indução desta classe de anticorpos. Devido ao seu tamanho supõe-se que eles sejam incapazes de realizar *cross-linking* com os receptores de IgE na superfície de células, como basófilos e mastócitos e, portanto, não consigam iniciar o processo de degranulação. Esta hipótese necessita ser investigada e baseia-se no fato que a degranulação depende de pelo menos uma ligação divalente para desencadear este fenômeno (KNOL, 2006).

A primeira etapa deste trabalho foi identificar sequências na estrutura linear da SmATPDase1 que pudessem ser potenciais epitopos de IgE durante o desenvolvimento da esquistossomose. Para isto, a sequência FASTA desta enzima foi submetida ao servidor SDAP, que integra um banco de dados de proteínas comprovadamente alergênicas e ferramentas de bioinformática, o que permitiu localizar a existência de sequências homólogas entre a proteína de interesse e

alérgenos conhecidos e descritos. A ferramenta utilizada pelo SDAP testa um dos critérios de alergenicidade definido oficialmente pela OMS. Este critério propõe que a reatividade cruzada deva ser considerada quando existe um peptídeo com 6 aminoácidos contínuos e idênticos na sequência da proteína investigada e de um alérgeno comprovado experimentalmente e inserido no banco. A busca retornou oito sequências (Tabela 1, p. 36) das quais seis delas se encontram expostas na superfície da estrutura tridimensional da proteína conforme ilustrado na Figura 4B (p.36) e, portanto, aumentam sua acessibilidade aos anticorpos na estrutura nativa.

Todas as sequências mostradas na Tabela 1 representam potenciais epitopos de IgE. A partir destas, foram desenhadas três sequências de peptídeos para serem sintetizadas e testadas em duas frentes de trabalho: (I) quanto ao seu potencial de induzir a produção de anticorpos IgE e IgG1 em modelo animal e (II) em sua capacidade de ligação a anticorpos IgE e IgG4 presentes em soros de pacientes com esquistossomose ou IgG1 e IgE presentes em soros de animais experimentalmente infectados. A escolha da sequência foi determinada pela acessibilidade do peptídeo na estrutura nativa da enzima, facilidade de síntese e estabilidade. Dessa maneira, eliminamos peptídeos que continham cisteína em sua estrutura, em função de sua elevada probabilidade de sofrer processos de oxidação.

Dessa maneira, entre as sequências retornadas pela busca no SDAP e que estão acessíveis na estrutura 3D da SmATPDase1, selecionamos as sequências KDVAKI (P14251a), ITFDSKVNGKSVS (P14461a2) devido à proximidade das sequências ITFDSK e NGKSVS e, finalmente, o peptídeo SIAAASLL (P14411a) desenhado a partir fusão das sequências SIAAAS e AAASLL.

Embora ainda não se saiba exatamente qual mecanismo leve ao *switch* para produção de imunoglobulinas da classe IgE, alguns autores sugerem que existam motivos estruturais compartilhados entre as estruturas de proteínas alergênicas que tenham maior probabilidade de induzir uma resposta de IgE (AALBERSE; CRAMERI, 2011).

Em 1997, os autores WAINE; MAZZER; MCMANUS (1997) mostraram que a proteína recombinante do antígeno 22 kDa presente no tegumento de *S. japonicum* tem capacidade de estimular a produção de IgE sem o uso de adjuvantes, propondo que o sinal para induzir o *switch* para IgE está presente na própria estrutura proteica, podendo estar relacionado com a sequência primária, estruturas secundárias ou terciária da proteína, ou na combinação de todas elas.

Em outro estudo, foi mostrado que um peptídeo sintético de 12 aminoácidos (WGPRVIFEDVTV; denominado MP2) foi capaz de elicitar uma resposta anafilática sistêmica em camundongos após a segunda dose do antígeno (SMITH et al., 2011). A substituição de aminoácidos carregados negativamente na sequência do peptídeo eliminou os efeitos alergênicos observados em animais que receberam o peptídeo sem a modificação (SMITH et al., 2011). Somando importantes dados a estas informações, alguns trabalhos na literatura propõem que a alergia evoluiu como uma forma de proteção contra parasitos e, por isso, proteínas alergênicas e de parasitos compartilham estruturas que seriam responsáveis pela indução da produção de anticorpos IgE (FITZSIMMONS, C. M.; DUNNE, D. W., 2009; FARNELL et al., 2015).

O desenvolvimento do processo de síntese de peptídeos em fase sólida foi um grande avanço no campo da química e se tornou uma ferramenta importante para imunologia, principalmente na área de desenho de candidatos a vacinas. Uma vantagem da síntese química em relação a expressão de recombinantes está na segurança devido à ausência de contaminantes como endotoxinas (GAO; TSAN, 2003; PEPYS et al., 2005). Entretanto, a síntese química tem limitação quanto ao tamanho da cadeia polipeptídica. Neste trabalho, os peptídeos foram sintetizados em fase sólida usando a estratégia t-Boc (grupo que protege a porção amino do aminoácido), que se baseia em em ciclos desproteção, lavagem, acoplamento e lavagem dos aminoácidos ancorados em uma resina até obtenção da sequência desejada. O processo de síntese ocorreu com sucesso como pode ser observado pelas massas obtidas por espectrometria de massas (Figura 6, p. 39) as quais são condizentes com as massas preditas para estas sequências (Tabela 2, p.38).

A pureza de peptídeos recomendada para bioensaios *in vitro* e *in vivo* é maior que 95%. Para ensaios imunológicos através da técnica de ELISA, em que os peptídeos são usados como antígeno de cobertura, recomenda-se pureza maior que 70%, portanto as moléculas obtidas (maior que 99% de pureza – Figura 5, p. 38) são adequadas para estes ensaios e aplicação nos testes de imunização de animais.

5.2 PRODUÇÃO DE SORO POLICLONAL ANTI-P14251a, ANTI-14411a, ANTI-14461a2

Segurança e facilidade na produção são as principais vantagens de desenvolver vacinas baseadas em peptídeos em relação às outras formas. Entretanto, os peptídeos tem a desvantagem de serem pouco imunogênicos, necessitando de adjuvantes para estimular resposta de células T e elicitar memória imunológica (PURCELL; MCCLUSKEY; ROSSJOHN, 2007). Por isso, nos ensaios de imunização com os peptídeos sintéticos, os animais receberam inóculos com as moléculas de interesse emulsificadas em adjuvante completo de Freund no primeiro inóculo e com adjuvante incompleto de Freund nos dois inóculos seguintes. Este adjuvante é composto por uma emulsão água/óleo contendo micobactérias mortas ou seu extrato e atua como um sistema de liberação de antígenos, induzindo uma resposta imune mista, com elementos tanto de resposta Th1 quanto Th2. Devido a indução de uma exacerbada resposta inflamatória no sítio da injeção e efeitos tóxicos devido ao óleo não metabolizado, o uso do adjuvante de Freund em humanos foi proibido por órgãos governamentais regulatórios. O adjuvante incompleto de Freund não contém a micobactéria e induz fracamente a produção de anticorpos, por isso este é usado apenas para intensificar a resposta após o primeiro inóculo (STEPHENSON et al., 2014).

Nos ensaios realizados, sob nossas condições experimentais, não observou-se a produção significativa de anticorpos IgG1 e IgE estimulado pelo inóculo dos peptídeos. Entretanto, isto não exclui a hipótese de que esta molécula possa induzir uma resposta humoral, visto que vários fatores como quantidade inoculada, rota de administração, tamanho do peptídeo e adjuvante podem influenciar na indução da resposta. Recentemente, FONSECA; OLIVEIRA; ALVES (2015) revisaram os principais antígenos testados como vacina para esquistossomose e mostraram que diferentes formulações com a mesma molécula podem resultar em respostas imunológicas distintas e conseqüentemente diferentes níveis de proteção.

Além disso, devido aos resultados de *western blot* revelados com o soro dos animais imunizados, nos quais foram possíveis identificar a isoforma da SmATPDase1, acreditamos que neste caso, a análise de ELISA pode não ter sido suficiente para comprovar a indução da resposta humoral após o inóculo das biomoléculas.

5.3 REATIVIDADE CRUZADA ENTRE CD39 E SmATPDase1

A enzima CD39, assim como a SmATPDase1, pertence a família das NTPDases (WANG; GUIDOTTI, 1996). Já foi descrita a expressão deste receptor em células endoteliais, células B, *natural killers*, células dendríticas, macrófagos, entre outras (ANTONIOLI et al., 2013). A enzima CD39 atua em conjunto com outras ectonucleotidases controlando os níveis de nuclotídeos extracelulares e, dessa maneira, regula vários processos que envolvem sinalização purinérgica, como inflamação, regulação do sistema imune e regulação da formação de trombos (SCHETINGER et al., 2007).

Tendo em vista a alta similaridade compartilhada entre as enzimas CD39 e SmATPDase1 tanto em suas sequência linear (alinhamento realizado no clustal omega: 32% de homologia e 27,7% de identidade) quanto estrutural (Figura 16) (NUNES et al., 2015), investigamos por *western blots* a imunoreatividade cruzada entre estas proteínas. O anticorpo policlonal anti-CD39, produzido em coelho e direcionado contra um peptídeo (epitopo correspondente aos aminoácidos 256-340 na sequência da proteína) na sequência desta NTPDase de mamíferos foi capaz de reconhecer proteínas presentes no homogeneizado total de vermes adultos de *S. mansoni*.

Este reconhecimento pelos anticorpos anti-CD39 revelou 6 bandas predominantes, das quais 3 foram excisadas do gel de poliacrilamida e identificadas por espectrometria de massas. Em duas destas, foi identificado peptídeos tripticos que correspondem a sequências de aminoácidos pertencentes a SmATPDase1 (Figura 12, p. 48), comprovando que a homologia entre as proteínas pode ser verificada pelo reconhecimento com os anticorpos anti-CD39, que reagem cruzadamente com a isoforma SmATPDase1.

Considerando apenas o alinhamento entre a sequência utilizada para produzir o anticorpo anti-CD39 e sua sequência homóloga na SmATPDase1, observa-se identidade e similaridade de aproximadamente 19% e 30%, respectivamente. Estes resultados mostram que apesar da homologia e identidade não serem muito altas, existe reatividade cruzada entre estas proteínas, portanto, a sequência responsável

efetivamente pela indução da produção dos anticorpos corresponde a uma sequência de poucos aminoácidos.

```

Q7YTA4_SCHMA MVFGKRNLSQLDFDTKLVTIISNISLTPRRIMERN--TNLHKILTILALIILVISFIGLLI 58
ENTP1_HUMAN -----MEDTKESNVKTFCS--KNILAILGFSSIIA 28
                ** . :*: : : : : : * : : : * : : :
Q7YTA4_SCHMA IIVLYI----LSS--NIPDVYSVVIDAGSTSSKHLHYKWIDEPFRSNGKVDEVTEK-LS 111
ENTP1_HUMAN VIALLAVGLTIQNKALPENVKYGIIVLDAGSSHTSLYIYKWPFAEKENDTGUVVHQVEECRVKG 88
                :*: * : : : : : * : : : * : : :
Q7YTA4_SCHMA PGISDYINDTIKAYDTLKPPLLKLTNSLTFEQKHTPIYLAATAGMRLKLIEDPLGSLDL 171
ENTP1_HUMAN PGISKVFQKVNEIGIYLTDCMERAREVIPSQHQETPVYLGATAGMRLLRMESEELADRV 148
                ****: : : : : : * : : : : : * : : : * : : :
Q7YTA4_SCHMA FSVIRQYLKQSGFQIETPNERIRLLYGSEEGLYGWSVNYILGIIKEGK-----QTN 223
ENTP1_HUMAN LDVVERSLSNYPFD----FQGARIITGQEEGAYGWITINYLLGKFSQKTRWFVSIVPYETN 204
                :*: : : * : : * : : * : : * : : * : : * : :
Q7YTA4_SCHMA PSDTVGSLDLGGASTQIAFIPKVYSNIPKEKLDYFPLRLYGNDFSVYSHSFLCYGKSEFE 283
ENTP1_HUMAN NQETFGALDLGGASTQVTFVPQNQTIES--PDNALQFRLYGKDYNVYTHSFLCYGKDQAL 262
                :*: : : * : : * : : * : : * : : * : : * : :
Q7YTA4_SCHMA RRVITSIAAASLLQSKI PNPCFLQGYKSDLYNAFEWFSGSCLSGT YVKKTFAEEIFRPPN 343
ENTP1_HUMAN WQKLAKD-IQVASNEILRDEPCFHPGYKVVN-VSDLYKTPCTKRF-----EMILP 310
                : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Q7YTA4_SCHMA MNSFSFNGTGGPNECVNYILKHFQT-KCDHSSCSFNNVFQPAPFGKFMAYSGFSYVMRYL 402
ENTP1_HUMAN FQQFEIQGIGNYQQCHQSILELFNTSYCPYSQCAFNGIFLPLPQDGFAGFSAFYFVMKFL 370
                :*: : : * : : * : : * : : * : : * : : * : :
Q7YTA4_SCHMA FPNKNTGFTLLEVTDAVMKFKCKPWRDVAKITKLSQSGFTAKYCFDGLYIITLLKMYGFT 462
ENTP1_HUMAN NLTS-EKVSQEKVTEMMKKFCAQFWEIETKSYAGVKEKYLSEYCFSGTYILSLLLQGYHF 429
                . . : : : : * : : * : : : : : : : : :
Q7YTA4_SCHMA TDESWKITITFDSKVNKSVSWALGYMLDQSGHLPSESPKVSST-QLFVCLFILL-LLLI 520
ENTP1_HUMAN TADSWEHIFIGKIQSSDAGWTLGYMLNLTNMI PAEQPLSTPLSHSTYVFLMVLFSVLVF 489
                * : : : * : : * : : * : : * : : * : : * : :
Q7YTA4_SCHMA IGSIIIGLLLRN--FLSKSKKSTSQV 544
ENTP1_HUMAN TVAIIGLLIFHKPSYFWKDMV----- 510
                :* : : : : : : : : : : :

```

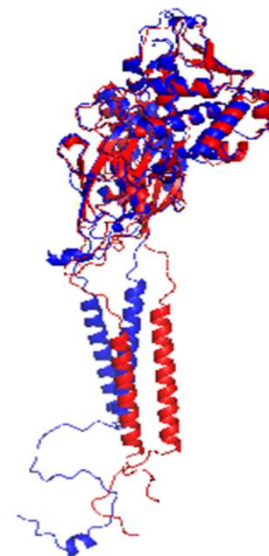


Figura 16. (A) Alinhamento entre as sequências FASTA e (B) estrutural das enzimas CD39 (vermelho) e SmATPDase1 (azul): Em (A), a sequência fasta da enzima CD39 e da SmATPDase1 de *S. mansoni* estão alinhadas, a região utilizada para induzir a produção do anticorpo policlonal anti-CD39 foi destacada. Em (B), o alinhamento das estruturas tridimensionais reflete a elevada homologia entre as enzimas.

5.4 DETECÇÃO DE NTPDase de *S. mansoni* USANDO OS ANTICORPOS anti-P14251a, anti-P14411a e anti-14461a2

Anteriormente, nosso grupo demonstrou por análises de *western blots* que a isoforma SmATPDase1 reage com anticorpos IgE de soro de pacientes doentes. Nestas análises, anticorpos IgE reconheceram bandas de aproximadamente 91, 63 e 50 kDa (EMIDIO, 2013). Foi sugerido que a proteína de 63 kDa provavelmente correspondesse a isoforma SmATPDase1, previamente identificada por anticorpos IgG anti-apirase de batata produzidos em coelhos. A reatividade cruzada entre a apirase de batata e isoformas de NTPDases de *S. mansoni* permite a utilização de anticorpos produzidos contra a proteína vegetal como ferramenta para identificação de NTPDases em homogeneizado total de verme de *S. mansoni* e em outros sistemas. Desde a descrição da família das NTPDases em 1996, por Vasconcelos e colaboradores, acredita-se que a banda de 91 kDa, encontrada em várias condições experimentais (VASCONCELOS et al., 1996), seja resultado de modificações pós-

transducionais ainda não descritas ou uma interação entre a NTPDase e outra proteína.

Utilizando os soros policlonais anti-P14251a, anti-P14411a e anti-P14461a2 produzidos em camundongos BALB/C foi possível revelar diversas bandas no *western blot* a partir da separação de proteínas contidas no homogeneizado de vermes adultos. Como os anticorpos secundários utilizados foram anti-IgG e anti-IgE de camundongo, as bandas predominantes, reveladas por ambos anticorpos foram alvo de estudo (Figura 13, p. 49). Acreditamos que as bandas de 63 kDa e 93 kDa correspondam as mesmas bandas encontradas em trabalho publicado por VASCONCELOS et al. (1996), sendo que a diferença na massa de 93 para 91 KDa, é devido a migração diferencial das proteínas nos diferentes géis utilizados.

Além disso, foram feitos mais dois ensaios para demonstrar a ligação de anticorpos anti-peptídeos com a SmATPase1. No primeiro deles, fizemos a imunoprecipitação de proteínas do homogeneizado total de vermes com anticorpos policlonais anti-peptídeos. A revelação das proteínas precipitadas em ensaios de *western blot* foi realizada com anticorpos anti-CD39, mostrando a presença de uma banda de aproximadamente 64 kDa. Em outro experimento, foi mostrado que anticorpos anti-P14251a foram capazes de reconhecer bandas de aproximadamente 57 e 66 kDa. Esta mesma banda foi extraída de um gel não desnaturante onde apresentou atividades ATPásica e ADPásica, localizada através de depósitos de fosfato de cálcio no gel de eletroforese.

O reconhecimento da SmATPDase1 por anticorpos produzidos contra os peptídeos derivados desta sequência indica que uma imunoterapia utilizando tais peptídeos pode ser importante como um possível tratamento contra esquistossomose, uma vez que a ligação do anticorpo a enzima pode afetar sua atividade enzimática e, assim, impedir o verme de hidrolisar nucleotídeos pro-inflamatórios e pró-trombóticos (DA'DARA et al., 2014). Além disso, estes resultados encorajam a produção de anticorpos monoclonais, os quais podem ser utilizados como ferramentas biotecnológica no estudo das funções da NTPDase 1 de *S. mansoni*.

5.5 REATIVIDADE DE ANTICORPOS IgE E IgG4 EM SOROS HUMANOS E DE IgE e IgG1 EM SOROS DE ANIMAIS CONTRA OS PEPTÍDEOS P14251A, P14411a E P14461a2

A infecção por *S. mansoni* desencadeia a ativação policlonal de células B e produção de diferentes classes de imunoglobulinas, as quais podem competir pelos mesmos epítomos. Esta competição é conhecida entre anticorpos IgG e IgE e a alta concentração de IgG presente na amostra pode interferir na quantificação de IgE (SOUZA-ATTA et al., 1999; LEHRER et al., 2004). Para aumentar a sensibilidade do método para detecção de anticorpos IgE no soro de humanos e de camundongos, foi feita a depleção de imunoglobulinas IgG através da precipitação com anticorpos anti-IgG.

A maioria de indivíduos que produz uma resposta de IgE também induz uma resposta de IgG4 contra o mesmo antígeno, sendo que a produção apenas de IgE é menos frequente (FARNELL et al., 2015). O perfil da produção de anticorpos (razão IgE/IgG4) pode ser relacionada com a susceptibilidade e proteção contra infecção/re-infecção em humanos, sendo que a resposta de IgG4 contra proteínas *allergen-like* de *S. mansoni* pode estar relacionada com mecanismos de regulação da resposta inflamatória mediada por IgE (FITZSIMMONS, COLIN M. et al., 2012; MCSORLEY; MAIZELS, 2012).

Já foram descritos na literatura a existência de auto-anticorpos IgE. Os antígenos próprios alvo desta imunoglobulina podem ser classificados em: (1) auto-antígenos homólogos a alérgenos ambientais; (2) auto-antígenos sem sequência homóloga a alérgenos ambientais e (3) auto-antígenos modificados quimicamente (CRAMERI, 2012).

A reatividade de anticorpos IgE e IgG4 presentes nos soros de pacientes doentes aos peptídeos aqui apresentados sugere que estas sequências sejam, de fato, epítomos da isoforma SmATPase1. Curiosamente, foi observada uma maior reatividade no grupo controle em relação ao grupo de pacientes com esquistossomose (Figura 8, p. 42). Estes resultados sugerem a existência de anticorpos que ocorrem naturalmente contra proteínas próprias, as quais possuem sequências homólogas a estes peptídeos, promovendo uma reatividade cruzada. Tal reatividade pode ser fruto de diversos mecanismos envolvidos na aquisição de tolerância imunológica periférica.

Embora possa parecer incoerente com a visão tradicional de auto-tolerância da imunologia, estes anticorpos podem desempenhar importantes funções fisiológicas, regulando, por exemplo a atividade de enzimas e limpeza de células mortas. A regulação do conteúdo destes anticorpos circulantes é essencial para prevenir eventos de auto-agressão ao organismo (LUTZ; BINDER; KAVERI, 2009). Nossa

hipótese é que a SmATPDase1 compartilhe epitopos com estruturas próprias, uma vez que exibe aproximadamente, 32% de homologia e 27% de identidade com a NTPDase 1 (CD39) de humanos, exibida na maioria das linhagens celulares, e que tais epitopos possam exibir importantes semelhanças com as sequências antigênicas descritas neste trabalho.

Durante a infecção, ocorre um estímulo constante para produção de anticorpos direcionados a proteínas presentes no tegumento dos vermes adultos, e neste evento, incluímos a presença de anticorpos reativos contra a isoforma SmATPDase1, que já foi descrita como parte integrante desta região corporal em vermes adultos, sendo uma das principais enzimas expressas (CASTRO-BORGES et al., 2011). Dentre as classes de anticorpos induzidos durante a esquistossomose humana e que são reativos com as isoformas de NTPDases deste helminto estão presentes as classes IgM, IgG e IgE (FARIA-PINTO, 2008a, b; FARIA-PINTO et al., 2010). Em um estudo conduzido por nosso grupo, pacientes com esquistossomose apresentaram soropositividade em torno de 80% contra uma isoforma de NTPDase de batata (apirase de batata) para os anticorpos IgG1 e IgG4 (FARIA-PINTO et al., 2010). Tais anticorpos estão diferentemente envolvidos na evolução da doença e na resistência a reinfeção. Assim, é possível supor que para evitar efeitos deletérios da elevada taxa de indução de IgE contra antígenos do helminto, o organismo humano mantenha elevado o estímulo da produção de IgG4 contra estes mesmos antígenos. Podemos então supor que a reatividade expressiva de IgG4 contra os peptídeos aqui apresentados foi maior e capaz de suprimir a reatividade de IgE contra estes mesmos epitopos.

Um fator que reforça tal hipótese é observar que as amostras de soros de camundongos apresentaram uma relação inversa: soros de camundongos doentes apresentaram uma maior reatividade de IgE em relação aos camundongos controle (não-infectados). O mesmo observamos para os níveis de IgG1 nos soros destes animais. Os resultados dos ELISAS com amostras de humanos e animais são complementares, reforçando a hipótese de que estes peptídeos correspondam de fato a epítopos da SmATPDase1.

Entretanto, humanos e camundongos apresentam formas distintas indução e de regulação de anticorpos IgE, os mecanismos humanos são muito mais intensos e controlam com maior intensidade a manutenção dos níveis de IgE em valores reduzidos. Uma diferença marcante nas respostas montadas por estas duas espécies

está na expressão da enzima CD39, onde as células T regulatórias de humanos expressam grande quantidade deste receptor, enquanto em camundongos a enzima está restrita a apenas uma subpopulação de células (BORSELLINO et al., 2007). Desta forma, as moléculas de ATP, que agem como sinais pró-inflamatórios, são degradadas pela atividade do CD39 presente na superfície das células T, em especial das células Treg, exercendo efeitos anti-inflamatórios, com produção de níveis elevados de IL-10 (BORSELLINO et al., 2007).

Estes fenômenos podem, de fato, estar relacionados com a isoforma SmATPDase 1, a qual é um imunógeno (FARIA-PINTO et al., 2004; LEVANO-GARCIA et al., 2007; FARIA-PINTO, 2008; FARIA-PINTO et al., 2010), que pode reagir com anticorpos IgE induzidos durante a progressão da esquistossomose humana e murina. Esta classe de anticorpos possui meia vida plasmática curta e são de produção rápida, caracterizados por não promoverem forte memória imunológica (POULSEN; HUMMELSHOJ, 2007). Como a produção da IgE está vinculada ao tipo de exposição aos antígenos (FITZSIMMONS et al., 2007) e a isoforma SmATPDase 1 de *S. mansoni* é apresentada continuamente ao hospedeiro mamífero desde a penetração das cercárias, tornando cada vez maior esta exposição no decorrer do ciclo do parasito, a indução de IgE fica sujeita a uma forte regulação imunológica. Tal regulação pode justificar a produção de outras classes de anticorpos contra os mesmos epítomos que induzem a produção de IgE, tais como IgG4, para humanos, e IgG1, para animais. A estreita relação entre a isoforma SmATPDase 1 e a isoforma CD39 presente nas células de mamíferos pode justificar esta imunomodulação. Os peptídeos desenhados e testados nesta dissertação representam epítomos indutores de anticorpo IgE na sequência da SmATPDase 1 de *S. mansoni*, capazes de serem modificados para sua otimização e utilização em ensaios de proteção para a esquistossomose.

A esquistossomose oferece proteção contra o desenvolvimento de diversas doenças não infecciosas induzidas pela imunidade. O mecanismo envolvido nesta proteção ainda é indeterminado, no entanto, ocorrem eventos relacionados à resposta imune inata e ao desenvolvimento e regulação da resposta imune adquirida (LA FLAMME et al., 2004). As helmintoses, de forma similar as alergias, induzem uma resposta imunológica típica Th2 e a relação parasito-hospedeiro estabelecida parece ter sido determinada por fatores adaptativos desenvolvidos pelos parasitos para evadirem da resposta imune do hospedeiro e prevenir uma exacerbação da resposta

inflamatória, capaz de provocar lesões ao hospedeiro (CARVALHO; BASTOS; ARAUJO, 2006). Desta forma, antígenos dos vermes tem capacidade de imunomodular a resposta imune do tipo Th1 e atenuar respostas auto-imunes severas em modelos experimentais (LA FLAMME et al, 2004). Assim, os epitopos aqui descritos como indutores de IgE e consequente resposta Th2 para esquistossomose, poderão ser uteis na formulação de estratégias de controle de respostas alérgicas ou no combate a doenças auto-imunes.

6 CONCLUSÕES

- a) Identificamos potenciais epitopos de anticorpos IgE na sequência da SmATPDase1 por análises *in silico*;

- b) Os peptídeos P14411a, P14251a e P14461a2 são ligadores e indutores de anticorpos IgE e correspondem a epitopos da SmATPDase1;
- c) Os resultados sugerem que existam anticorpos naturais em humanos direcionados a sequências homólogas a dos peptídeos P14411a, P14251a e P14461a2;
- d) Anticorpos anti-CD39 reagem cruzadamente com a isoforma SmATPDase1.

O futuro deste trabalho pode abrir novas perspectivas de pesquisa, onde através da utilização de anticorpos dirigidos a estes peptídeos poderemos avaliar o envolvimento da atividade da ATP difosfohidrolase, SmATPDase1, para o desenvolvimento do parasito em ensaios *in vitro* e projetar ensaios capazes de mostrar como a inibição da atividade hidrolítica dos nucleotídeos pelos linfócitos Treg na esquistossomose pode estar envolvida na exacerbação da resposta imune tipo Th2 da doença. Além disso, os peptídeos podem ser testados quanto sua capacidade de estimular uma resposta imunoregulatória, e dessa maneira, espera-se que estas moléculas possam ser testadas como imunoterapêuticos em casos de alergias e doenças auto-imunes.

7 REFERÊNCIAS

- AALBERSE, R. C. Structural biology of allergens. **J Allergy Clin Immunol**, v. 106, n. 2, p. 228-238, 2000.
- AALBERSE, R. C.; CRAMERI, R. IgE-binding epitopes: a reappraisal. **Allergy**, v. 66, n. 10, p. 1261-1274, 2011.
- ACEVEDO, N.; SANCHEZ, J.; ERLER, A.; MERCADO, D.; BRIZA, P.; KENNEDY, M.; FERNANDEZ, A.; GUTIERREZ, M.; CHUA, K. Y.; CHEONG, N.; JIMENEZ, S.; PUERTA, L.; CARABALLO, L. IgE cross-reactivity between *Ascaris* and domestic mite allergens: the role of tropomyosin and the nematode polyprotein ABA-1. **Allergy**, v. 64, n. 11, p. 1635-1643, 2009.
- AMBLARD, Muriel et al. Fundamentals of modern peptide synthesis. In: Peptide synthesis and applications. Humana Press, 2005. p. 3-24.
- ANTONIOLI, L.; PACHER, P.; VIZI, E. S.; HASKÓ, G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. **Trends in molecular medicine**, v. 19, n. 6, p. 355-367, 2013.
- BHARDWAJ, R.; SKELLY, P. J. Purinergic signaling and immune modulation at the schistosome surface? **Trends Parasitol**, v. 25, n. 6, p. 256-260, 2009.
- BIELORY, B. P.; MAINARDI, T.; ROTTEM, M. Evolutionary immune response to conserved domains in parasites and aeroallergens. **Allergy Asthma Proc**, v. 34, n. 1, p. 93-102, 2013.
- CARVALHO, E. M.; BASTOS, L. S.; ARAUJO, M. I. Worms and allergy. **Parasite Immunol**, v. 28, n. 10, p. 525-534, 2006.
- CASTRO-BORGES, W.; SIMPSON, D. M.; DOWLE, A.; CURWEN, R. S.; THOMAS-OATES, J.; BEYNON, R. J.; WILSON, R. A. Abundance of tegument surface proteins in the human blood fluke *Schistosoma mansoni* determined by QconCAT proteomics. **J Proteomics**, v. 74, n. 9, p. 1519-1533, 2011.
- CDC, C. F. D. C. A. P. **Parasites - Schistosomiasis**, 2012.
- COLLEY, D. G.; COOK, J. A.; FREEMAN, G. L., JR.; BARTHOLOMEW, R. K.; JORDAN, P. 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**, v. 53, n. 5, p. 420-433, 1977.
- DA'DARA, A. A.; BHARDWAJ, R.; ALI, Y. B. M.; SKELLY, P. J. Schistosome tegumental ecto-ATPase (SmATPDase1) degrades exogenous pro-inflammatory and pro-thrombotic nucleotides. **PeerJ**, v. 2, p. e316, 2014.

DA'DARA, A. A.; BHARDWAJ, R.; SKELLY, P. J. Schistosome apyrase SmATPDase1, but not SmATPDase2, hydrolyses exogenous ATP and ADP. **Purinergic Signal**, v. 10, n. 4, p. 573-580, 2014.

DEMARCO, R.; KOWALTOWSKI, A. T.; MORTARA, R. A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. Molecular characterization and immunolocalization of *Schistosoma mansoni* ATP-diphosphohydrolase. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 307, n. 4, p. 831-838, 2003.

DETONI, M. L.; FESSEL, M. R.; MAIA, A. C.; PORCINO, G. N.; QUELLIS, L. R.; FARIA-PINTO, P.; MARQUES, M. J.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; DINIZ, V. A.; CORTE-REAL, S.; GONCALVES-DA-COSTA, S. C.; SOUZA, C. S.; VASCONCELOS, E. G. An antigenic domain of the *Leishmania amazonensis* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1) is associated with disease progression in susceptible infected mice. **Parasitol Res**, v. 112, n. 8, p. 2773-2782, 2013.

DIEMERT, D. J.; PINTO, A. G.; FREIRE, J.; JARIWALA, A.; SANTIAGO, H.; HAMILTON, R. G.; PERIAGO, M. V.; LOUKAS, A.; TRIBOLET, L.; MULVENNA, J.; CORREA-OLIVEIRA, R.; HOTEZ, P. J.; BETHONY, J. M. Generalized urticaria induced by the Na-ASP-2 hookworm vaccine: implications for the development of vaccines against helminths. **J Allergy Clin Immunol**, v. 130, n. 1, p. 169-176. e6, 2012.

DRUMMOND, S. C.; PEREIRA, S. R. S.; SILVA, L. C. D. S.; ANTUNES, C. M. D. F.; LAMBERTUCCI, J. R. Schistosomiasis control program in the state of Minas Gerais in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n.4, p. 519-523, 2010.

DUNNE, D. W.; BUTTERWORTH, A. E.; FULFORD, A. J.; KARIUKI, H. C.; LANGLEY, J. G.; OUMA, J. H.; CAPRON, A.; PIERCE, R. J.; STURROCK, R. F. Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection. **Eur J Immunol**, v. 22, n. 6, p. 1483-1494, 1992.

EMIDIO, N. B. **Identificação de potenciais epítomos ligadores de anticorpos da classe IgE na estrutura da proteína SmATPDase1 de *Schistosoma mansoni*.** Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Juiz de Fora, 2013. 45 p.

ESWAR, N.; WEBB, B.; MARTI-RENOM, M. A.; MADHUSUDHAN, M. S.; ERAMIAN, D.; SHEN, M. Y.; PIEPER, U.; SALI, A. Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Curr Protoc Protein Sci*, v. Chapter 2, n., p. Unit 2.9, 2007.

ERB, K. J. Can helminths or helminth-derived products be used in humans to prevent or treat allergic diseases? **Trends Immunol**, v. 30, n. 2, p. 75-82, 2009.

FARIA-PINTO, P.; MEIRELLES, M. N.; LENZI, H. L.; MOTA, E. M.; PENIDO, M. L.; COELHO, P. M.; VASCONCELOS, E. G. ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni* egg: characterization and immunocytochemical localization of a new antigen. **Parasitology**, v. 129, n. 1, p. 51-57, 2004.

FARIA-PINTO, P. **Mapeamento dos domínios antigênicos compartilhados entre a apirase de batata e as isoformas de ATP difosfohidrolase de *Schistosoma***

mansoni. Centro de Pesquisa René Rachou-CPqRR, da Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2008. 126 p.

FARIA-PINTO, P.; REZENDE-SOARES, F.; MOLICA, A.; MONTESANO, M.; MARQUES, M.; ROCHA, M.; GOMES, J.; ENK, M.; CORREA-OLIVEIRA, R.; COELHO, P. Mapping of the conserved antigenic domains shared between potato apyrase and parasite ATP diphosphohydrolases: potential application in human parasitic diseases. **Parasitology**, v. 135, n. 08, p. 943-953, 2008.

FARIA-PINTO, P.; MENDES, R. G.; CARVALHO-CAMPOS, C.; MAIA, A. C.; OLIVEIRA, A. A.; COELHO, P. M.; VASCONCELOS, E. G. Detection of IgG1 and IgG4 subtypes reactive against potato apyrase in schistosomiasis patients. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 4, p. 370-373, 2010.

FARNELL, E. J.; TYAGI, N.; RYAN, S.; CHALMERS, I.; PINOT DE MORIA, A.; WAWRZYNIAK, J.; JONES, F.; FITZSIMMONS, C. M.; TUKAHEBWA, E. M.; FURNHAM, N.; MAIZELS, R.; DUNNE, D. Known allergen structures predict *Schistosoma mansoni* IgE binding antigens in human infection. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p., 2015.

FITZSIMMONS, C. M.; MCBEATH, R.; JOSEPH, S.; JONES, F. M.; WALTER, K.; HOFFMANN, K. F.; KARIUKI, H. C.; MWATHA, J. K.; KIMANI, G.; KABATEREINE, N. B.; VENNERVALD, B. J.; OUMA, J. H.; DUNNE, D. W. Factors affecting human IgE and IgG responses to allergen-like *Schistosoma mansoni* antigens: Molecular structure and patterns of in vivo exposure. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 142, n. 1, p. 40-50, 2007.

FITZSIMMONS, C. M.; DUNNE. Survival of the fittest: allergology or parasitology? **Trends Parasitol**, v. 25, n. 10, p. 447-451, 2009.

FITZSIMMONS, C. M.; FALCONE, F. H.; DUNNE, D. W. Helminth Allergens, Parasite-Specific IgE, and Its Protective Role in Human Immunity. **Front Immunol**, v. 5, p. 61, 2014.

FITZSIMMONS, C. M.; DUNNE, D. W. Survival of the fittest: allergology or parasitology? **Trends Parasitol**, v. 25, n. 10, p. 447-451, 2009.

FONSECA, C. T.; OLIVEIRA, S. C.; ALVES, C. C. Eliminating schistosomes through vaccination: What are the best immune weapons? **Frontiers in Immunology**, v. 6, p., 2015.

GAO, B.; TSAN, M. F. Endotoxin contamination in recombinant human heat shock protein 70 (Hsp70) preparation is responsible for the induction of tumor necrosis factor alpha release by murine macrophages. **J Biol Chem**, v. 278, n. 1, p. 174-179, 2003.

GRAY, D. J.; ROSS, A. G.; LI, Y.-S.; MCMANUS, D. P. Diagnosis and management of schistosomiasis. **BMJ : British Medical Journal**, v. 342, p. d2651, 2011.

GRYSEELS, B. Schistosomiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 383-397, 2012.

HAMS, E.; AVIELLO, G.; FALLON, P. G. The Schistosoma granuloma: friend or foe? **Frontiers in Immunology**, v. 4, p., 2013.

HANDA, M.; GUIDOTTI, G. Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). **Biochem Biophys Res Commun**, v. 218, n. 3, p. 916-923, 1996.

HE, J. S.; NARAYANAN, S.; SUBRAMANIAM, S.; HO, W. Q.; LAFAILLE, J. J.; CUROTTO DE LAFAILLE, M. A. Biology of IgE production: IgE cell differentiation and the memory of IgE responses. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 388, p. 1-19, 2015.

ISHIZAKA, K.; ISHIZAKA, T. Identification of gamma-E-antibodies as a carrier of reaginic activity. **J Immunol**, v. 99, n. 6, p. 1187-1198, 1967.

IVANCIUC, O.; SCHEIN, C. H.; BRAUN, W. SDAP: database and computational tools for allergenic proteins. **Nucleic Acids Res**, v. 31, n. 1, p. 359-362, 2003.

IVANCIUC, O.; MATHURA, V.; MIDORO-HORIUTI, T.; BRAUN, W.; GOLDBLUM, R. M.; SCHEIN, C. H. Detecting potential IgE-reactive sites on food proteins using a sequence and structure database, SDAP-food. **J Agric Food Chem**, v. 51, n. 16, p. 4830-4837, 2003.

JARRETT, E.; BAZIN, H. Elevation of total serum IgE in rats following helminth parasite infection. **Nature**, v. 251, n. 5476, p. 613-614, 1974.

KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in Schistosomiasis mansoni. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 14, n. 6, p. 397-400, 1972.

KATZ, N.; COELHO, P. M. Z. Clinical therapy of schistosomiasis mansoni: The Brazilian contribution. **Acta Tropica**, v. 108, n. 2-3, p. 72-78, 2008.

KHALIFE, J.; CETRE, C.; PIERROT, C.; CAPRON, M. Mechanisms of resistance to *S. mansoni* infection: the rat model. **Parasitol Int**, v. 49, n. 4, p. 339-345, 2000.

KINKEL, H.-F.; DITTRICH, S.; BÄUMER, B.; WEITZEL, T. Evaluation of Eight Serological Tests for Diagnosis of Imported Schistosomiasis. **Clinical and Vaccine Immunology : CVI**, v. 19, n. 6, p. 948-953, 2012.

KNOL, E. F. Requirements for effective IgE cross-linking on mast cells and basophils. **Mol Nutr Food Res**, v. 50, n. 7, p. 620-624, 2006.

KNOWLES, A. F. The GDA1_CD39 superfamily: NTPDases with diverse functions. **Purinergic Signal**, v. 7, n. 1, p. 21-45, 2011.

LA FLAMME, A. C.; CANAGASABEY, K.; HARVIE, M.; BÄCKSTRÖM, B. T. Schistosomiasis protects against multiple sclerosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 33-36, 2004.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LEVANO-GARCIA, J.; MORTARA, R. A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; DEMARCO, R. Characterization of *Schistosoma mansoni* ATPDase2 gene, a novel apyrase family member. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 352, n. 2, p. 384-389, 2007.

LÉVESQUE, S. A.; LAVOIE, É. G.; LECKA, J.; BIGONNESSE, F.; SÉVIGNY, J. Specificity of the ecto-ATPase inhibitor ARL 67156 on human and mouse ectonucleotidases. **British Journal of Pharmacology**, v. 152, n. 1, p. 141-150, 2007.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MAIA, A. C.; PORCINO, G. N.; DETONI MDE, L.; EMIDIO, N. B.; MARCONATO, D. G.; FARIA-PINTO, P.; FESSEL, M. R.; REIS, A. B.; JULIANO, L.; JULIANO, M. A.; MARQUES, M. J.; VASCONCELOS, E. G. An antigenic domain within a catalytically active *Leishmania infantum* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1) is a target of inhibitory antibodies. **Parasitol Int**, v. 62, n. 1, p. 44-52, 2013.

MATTOS, A.; KUSEL, J.; PIMENTA, P.; COELHO, P. Activity of praziquantel on in vitro transformed *Schistosoma mansoni* sporocysts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 283-287, 2006.

MCSORLEY, H. J.; MAIZELS, R. M. Helminth Infections and Host Immune Regulation. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 4, p. 585-608, 2012.

MENDES, R. G.; GUSMAO, M. A.; MAIA, A. C.; DETONI MDE, L.; PORCINO, G. N.; SOARES, T. V.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; COELHO, P. M.; LENZI, H. L.; FARIA-PINTO, P.; VASCONCELOS, E. G. 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**, v. 106, n. 7, p. 808-813, 2011.

MUTAPI, F. Helminth parasite proteomics: from experimental models to human infections. **Parasitology**, v. 139, n. 9, p. 1195-1204, 2012.

NAKAIE, C. R.; OLIVEIRA, E.; VICENTE, E. F.; JUBILUT, G. N.; SOUZA, S. E.; MARCHETTO, R.; CILLI, E. M. Solid-phase peptide synthesis in highly loaded conditions. **Bioorg Chem**, v. 39, n. 2, p. 101-109, 2011.

NUNES, V. S.; VASCONCELOS, E. G.; FARIA-PINTO, P.; BORGES, C. C. H.; CAPRILES, P. V. Structural Comparative Analysis of Ecto-NTPDase Models from *S. Mansoni* and *H. Sapiens*. In: (Ed.). **Bioinformatics Research and Applications**: Springer International Publishing, 2015, p.247-259.

PALM, N. W.; ROSENSTEIN, R. K.; MEDZHITOV, R. Allergic host defences. **Nature**, v. 484, n. 7395, p. 465-472, 2012.

PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 7, p. 499-511, 2002.

PELLEGRINO, J.; SIQUEIRA, A. F. A perfusion technic for recovery of *Schistosoma mansoni* from experimentally infected guinea pigs. **Rev Bras Malariol Doencas Trop**, v. 8, n. 4, p. 589-597, 1956.

PEPYS, M. B.; HAWKINS, P. N.; KAHAN, M. C.; TENNENT, G. A.; GALLIMORE, J. R.; GRAHAM, D.; SABIN, C. A.; ZYCHLINSKY, A.; DE DIEGO, J. Proinflammatory effects of bacterial recombinant human C-reactive protein are caused by contamination with bacterial products, not by C-reactive protein itself. **Circ Res**, v. 97, n. 11, p. e97-103, 2005.

POULSEN, L. K.; HUMMELSHOJ, L. Triggers of IgE class switching and allergy development. **Ann Med**, v. 39, n. 6, p. 440-456, 2007.

PURCELL, A. W.; MCCLUSKEY, J.; ROSSJOHN, J. More than one reason to rethink the use of peptides in vaccine design. **Nat Rev Drug Discov**, v. 6, n. 5, p. 404-414, 2007.

RADAUER, C.; BUBLIN, M.; WAGNER, S.; MARI, A.; BREITENEDER, H. Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions. **J Allergy Clin Immunol**, v. 121, n. 4, p. 847-852 e7, 2008.

RIHET, P.; DEMEURE, C. E.; BOURGOIS, A.; PRATA, A.; DESSEIN, A. J. Evidence for an association between human resistance to *Schistosoma mansoni* and high anti-larval IgE levels. **Eur J Immunol**, v. 21, n. 11, p. 2679-2686, 1991.

ROBSON, S. C.; SEVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signal**, v. 2, n. 2, p. 409-430, 2006.

ROLLINSON, D.; KNOPP, S.; LEVITZ, S.; STOTHARD, J. R.; TCHUENTÉ, L.-A. T.; GARBA, A.; MOHAMMED, K. A.; SCHUR, N.; PERSON, B.; COLLEY, D. G. Time to set the agenda for schistosomiasis elimination. **Acta Tropica**, v. 128, n. 2, p. 423-440, 2013.

ROOK, G. A. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: the broader implications of the hygiene hypothesis. **Immunology**, v. 126, n. 1, p. 3-11, 2009.

ROOK, G. A. W. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: The broader implications of the hygiene hypothesis. **Immunology**, v. 126, n. 1, p. 3-11, 2009.

RUJENI, N.; TAYLOR, D. W.; MUTAPI, F. Human schistosome infection and allergic sensitisation. **J Parasitol Res**, v. 2012, p. 154743, 2012.

SANSOM, F. M. The role of the NTPDase enzyme family in parasites: what do we know, and where to from here? **Parasitology**, v. 139, n. 8, p. 963-980, 2012.

SANTIAGO HDA, C.; RIBEIRO-GOMES, F. L.; BENNURU, S.; NUTMAN, T. B. Helminth infection alters IgE responses to allergens structurally related to parasite proteins. **J Immunol**, v. 194, n. 1, p. 93-100, 2015.

SANTOS, A. B. R.; ROCHA, G. M.; OLIVER, C.; FERRIANI, V. P. L.; LIMA, R. C.; PALMA, M. S.; SALES, V. S. F.; AALBERSE, R. C.; CHAPMAN, M. D.; ARRUDA, L. K. Cross-reactive IgE antibody responses to tropomyosins from *Ascaris lumbricoides* and cockroach. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 121, n. 4, p. 1040-1046. e1, 2008.

SCHETINGER, M. R. C.; MORSCH, V. M.; BONAN, C. D.; WYSE, A. T. S. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: New perspectives for human health. **BioFactors**, v. 31, n. 2, p. 77-98, 2007.

SÉVIGNY, J. E-NTPDase Family. In: Choi, S. (Ed.). **Encyclopedia of Signaling Molecules**: Springer New York, 2012, p.552-560.

SMITH, C. M.; BRADDING, P.; NEILL, D. R.; BAXENDALE, H.; FELICI, F.; ANDREW, P. W. Novel immunogenic peptides elicit systemic anaphylaxis in mice: implications for peptide vaccines. **J Immunol**, v. 187, n. 3, p. 1201-1206, 2011.

SOUZA-ATTA, M. L.; ARAUJO, M. I.; D'OLIVEIRA JUNIOR, A.; RIBEIRO-DE-JESUS, A.; ALMEIDA, R. P.; ATTA, A. M.; CARVALHO, E. M. Detection of specific IgE antibodies in parasite diseases. **Braz J Med Biol Res**, v. 32, n. 9, p. 1101-1105, 1999.

STEPHENSON, R.; YOU, H.; MCMANUS, D. P.; TOTH, I. Schistosome Vaccine Adjuvants in Preclinical and Clinical Research. **Vaccines**, v. 2, n. 3, p. 654-685, 2014.

TENDLER, M. Development of the Brazilian anti Schistosomiasis vaccine based on the recombinant FABP Sm14 +GLA-SE. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p., 2015.

TRIDL-HOFFMANN, C.; JAKOB, T.; BEHRENDT, H. Determinants of allergenicity. **J Allergy Clin Immunol**, v. 123, n. 3, p. 558-566, 2009.

URBAN, J. F. Cellular basis of the non-specific potentiation of the immunoglobulin E response after helminth parasite infection. **Veterinary Parasitology**, v. 10, n. 2, p. 131-140, 1982.

VASCONCELOS, E. G.; NASCIMENTO, P. S.; MEIRELLES, M. N.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; FERREIRA, S. T. Characterization and localization of an ATP-diphosphohydrolase on the external surface of the tegument of *Schistosoma mansoni*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 58, n. 2, p. 205-214, 1993.

VASCONCELOS, E. G.; FERREIRA, S. T.; CARVALHO, T. M.; SOUZA, W.; KETTLUN, A. M.; MANCILLA, M.; VALENZUELA, M. A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. 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**, v. 271, n. 36, p. 22139-22145, 1996.

VASCONCELOS, E. G.; FARIA-PINTO, P.; REZENDE-SOARES, F. A.; PENIDO, M. L.; GONÇALVES-DA-COSTA, S. C.; COELHO, P. M. Potato apyrase: a new tool for parasitic disease research. In: (Ed.). **Global Science Books**. UK, 2009, p.80-88.

WAINE, G. J.; MAZZER, D. R.; MCMANUS, D. P. Production of IgE antibodies against the 22 kDa tegumental membrane-associated antigen of schistosomes is directed by the antigen itself. **Parasite Immunol**, v. 19, n. 11, p. 531-533, 1997.

WANG, T. F.; GUIDOTTI, G. CD39 is an ecto-(Ca²⁺,Mg²⁺)-apyrase. **J Biol Chem**, v. 271, n. 17, p. 9898-9901, 1996.

WEISS, P. H. E.; BATISTA, F.; WAGNER, G.; MAGALHÃES, M. D. L. B.; MILETTI, L. C. Kinetic and biochemical characterization of Trypanosoma evansi nucleoside triphosphate diphosphohydrolase. **Experimental Parasitology**, v. 153, n. 0, p. 98-104, 2015.

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

WILSON, R. A. Virulence factors of schistosomes. **Microbes Infect**, v. 14, n. 15, p. 1442-1450, 2012.

WU, L. C.; SCHEERENS, H. Targeting IgE production in mice and humans. **Current Opinion in Immunology**, v. 31, p. 8-15, 2014.

XIONG, H.; DOLPADY, J.; WABL, M.; CUROTTO DE LAFAILLE, M. A.; LAFAILLE, J. J. Sequential class switching is required for the generation of high affinity IgE antibodies. **J Exp Med**, v. 209, n. 2, p. 353-364, 2012.

YAZDANBAKHSH, M.; VAN DEN BIGGELAAR, A.; MAIZELS, R. M. Th2 responses without atopy: immunoregulation in chronic helminth infections and reduced allergic disease. **Trends in Immunology**, v. 22, n. 7, p. 372-377, 2001.

YOSHIDA, K.; MATSUOKA, M.; USUDA, S.; MORI, A.; ISHIZAKA, K.; SAKANO, H. Immunoglobulin switch circular DNA in the mouse infected with Nippostrongylus brasiliensis: evidence for successive class switching from mu to epsilon via gamma 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 20, p. 7829-7833, 1990.

ZHANG, P.; MUTAPI, F. IgE a key antibody in Schistosoma infection. **Electronic Journal of Biology**, v. 2, n. 1, p. 11-14, 2006.

ZIMMERMANN, H.; ZEBISCH, M.; STRATER, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. **Purinergic Signal**, v. 8, n. 3, p. 437-502, 2012.

ANEXOS

1. Certificado comitê de ética: Infecção experimental



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

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 026/2012 – CEEA sobre “OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DE PARASITO SCHISTOSOMA MANSONI EM CAMUNDONGOS SWISS FÊMEOS PARA EXPERIMENTOS LABORATORIAIS”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de PRISCILA DE FARIA PINTO, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 20/03/2012. Para o desenvolvimento da pesquisa foram liberados 360 animais, conforme solicitado.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 026/2012- CEEA about “OBTAINING AND MAINTAINING THE SCHISTOSOMA MANSONI PARASITE IN SWISS MICE FEMALES FOR LABORATORY EXPERIMENTS ” - PRISCILA DE FARIA PINTO - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 20/03/2012. For the development of this research 360 animals were released, as requested

Juiz de Fora, 20 de março de 2012.

Presidente/CEEA

Secretário/CEEA

2. Certificado comitê de ética: imunização com peptídeos



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

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 025/2012 – CEEA sobre “ESTUDO DO POTENCIAL IMUNOMODULATOR DA BATATA PURIFICADA E SEUS PEPTÍDEOS SOBRE AS RESPOSTAS HUMORAL, DE CITOCINAS E INFLAMATÓRIA GRANULOMATOSA NA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI EXPERIMENTAL”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de PRISCILA DE FARIA PINTO, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO de ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 20/03/2012. Para o desenvolvimento da pesquisa foram liberados 200 animais, conforme solicitado.

CERTIFICATE

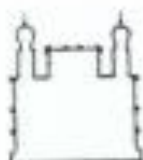
We certify that the protocol nº 025/2012- CEEA about “STUDY OF THE POTENCIAL IMUNOMODULATORY OF PURIFIED POTATO APYROSE AND ITS PEPTIDES ABOUT THE HUMORAL GRANULOMATUS INFLAMATORY AND CYTOKINSES RESPONSES IN EXPERIMENTAL SCHISTOSOMIASSES” - PRISCILA DE FARIA PINTO - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 20/03/2012. For the development of this research 200 animals were released, as requested

Juiz de Fora, 20 de março de 2012.

Presidente/CEEA

Secretário/CEEA

3. Certificado comitê de ética: utilização da soroteca de humanos



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa René Rachou

Comitê de Ética

PARECER Nº 03/2006 – CEP SH- CPqRR

Protocolo CEP SH/CPqRR nº: 04/2005

Projeto de Pesquisa: "Desenvolvimento de nova técnica quantitativa de exames de fezes e aperfeiçoamento da técnica de ELISA para detecção de anticorpos e antígenos circulantes para diagnóstico antes e após tratamento quimioterápico em áreas de baixa endemicidade para Esquistossomose mansoni (Chorim de Cima), município de Governador Valadares, MG"

Pesquisador Responsável: Paulo Marcos Zech Coelho

Instituição: Centro de Pesquisa René Rachou / FIOCRUZ

Data de entrada no CEP: 02/02/2005

Ao se proceder a análise do protocolo em questão, após consideradas as respostas as pendências anteriores, constatou-se que as informações enviadas atendem aos aspectos fundamentais da Resolução CNS 196/96, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo Seres Humanos.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou / FIOCRUZ, de acordo com as atribuições da Resolução 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: PROJETO APROVADO

Belo Horizonte, 17 de março de 2006.

João Carlos Pinto Dias
Coordenador do CEP SH- CPqRR

Dr. João Carlos Pinto Dias
Pesquisador Titular
INPE 22196/11 - CRM MG 3691
CETEC - CPqRR - FIOCRUZ

Artigo publicado

Nayara Braga Emídio, Michelia Antonia do Nascimento Gusmão, William Castro Borges, Clovis Ryuichi Nakaie, Eveline Gomes Vasconcelos, Priscila de Faria Pinto; Identification of a linear IgE inducing epitope on the SmATPDase1 surface, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, Volume 49, Issue 6, 1 June 2017, Pages 564–566, <https://doi.org/10.1093/abbs/gmx031>