



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**BRUNA ALVES DE OLIVEIRA**

**POTENCIAL MODULAÇÃO DO GRANULOMA HEPÁTICO PELA  
PROTEÍNA VEGETAL DE *SOLANUM TUBEROSUM* ASSOCIADA AO  
PRAZIQUANTEL SUBCURATIVO SOBRE A ESQUISTOSSOMOSE  
MURINA**

JUIZ DE FORA  
2019

BRUNA ALVES DE OLIVEIRA

**POTENCIAL MODULAÇÃO DO GRANULOMA HEPÁTICO PELA  
PROTEÍNA VEGETAL DE *SOLANUM TUBEROSUM* ASSOCIADA AO  
PRAZIQUANTEL SUBCURATIVO SOBRE A ESQUISTOSSOMOSE  
MURINA**

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

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

JUIZ DE FORA  
2019

de Oliveira, Bruna Alves.

Potencial modulação do granuloma hepático pela proteína vegetal de *Solanum tuberosum* associada ao praziquantel subcurativo sobre a esquistossomose murina / Bruna Alves de Oliveira. -- 2019.

106 f. : il.

Orientadora: Priscila de 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, 2019.

1. Apirase de batata. 2. Reatividade cruzada. 3. Praziquantel subterapêutico. I. Faria Pinto, Priscila de , orient. II. Título.

(Verso)

BRUNA ALVES DE OLIVEIRA

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

**POTENCIAL MODULAÇÃO DO GRANULOMA HEPÁTICO PELA PROTEÍNA VEGETAL DE *SOLANUM TUBEROSUM* ASSOCIADA AO PRAZIQUANTEL SUBCURATIVO SOBRE A ESQUISTOSSOMOSE MURINA**

Banca Examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Priscila de Faria Pinto (Orientadora)  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Danielle Cristina Zimmermann Franco (Membro externo)  
Universidade Presidente Antônio Carlos - UNIPAC-JF

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lauren Hubert Jaeger (Membro Interno)  
Universidade Federal de Juiz de Fora

A Deus e à minha família:  
o que tenho de mais precioso.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus o meu maior agradecimento por guiar meus passos em cada momento e me instruir em todas as decisões.

Aos meus pais Joel e Doralice por me mostrarem o caminho da honestidade e persistência.

Às minhas irmãs Verônica, Josimara e Paloma pela admiração e carinho.

Ao meu sobrinho Bernardo criança que transborda alegria e vive intensamente as curiosas descobertas da infância e a minha “princesinha” Lara (a caminho) que já transpira amor.

A Professora Priscila por ter me acolhido e depositado confiança em me orientar, antes mesmo de me conhecer. Por toda paciência e ensinamentos. O meu respeito e admiração por sua sabedoria e Dom no ensino da Ciência, inibindo sempre a vaidade em prol da simplicidade e eficiência.

Aos companheiros do Laboratório de Estrutura e Função de Proteínas, especialmente à doutoranda Danielle, sempre presente e pronta a responder todas as dúvidas.

À equipe do Laboratório de Esquistossomose do Instituto René Rachou/FIOCRUZ e aos professores Gilson Costa Macedo, Manoel Carlos de Araújo e Márcio Roberto Silva pela parceria na realização do trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização desta tarefa. Gostaria de expressar toda minha gratidão e apreço. Muito obrigada!

## RESUMO

A esquistossomose é uma importante doença tropical negligenciada causada por trematódeos do gênero *Shistosoma spp.* Constitui uma parasitose endêmica em mais de 70 países com aproximadamente 230 milhões de pessoas atingidas e 800 milhões residindo em áreas endêmicas. A doença está condicionada à populações de baixo nível socioeconômico, onde as condições de saneamento e educação sanitária são deficientes, sendo por isso, um problema à saúde pública. O praziquantel (PZQ) é o atual fármaco de escolha, porém não é capaz de controlar a grave morbidade, que frequentemente acomete os pacientes. Este viés avigora a importância do controle da morbidade e transmissão da esquistossomose. As NTPDases são uma família de proteínas vastamente distribuídas entre os organismos, são enzimas catalizadoras da hidrólise de nucleotídeos di e tri fosfatados. Em *Schistosoma mansoni*, duas isoformas foram descritas SmATPase 1 e SmATPase 2. A apirase de batata (NTPDase de *Solanum tuberosum*) apresenta forte imunorreatividade cruzada com isoformas de *S.mansoni* parcialmente purificadas, sugerindo um compartilhamento dos epítomos conservados entre as proteínas do parasita e a proteína vegetal. Investigamos o potencial efeito modulador da proteína vegetal associada ao PZQ subcurativo sobre a patogenia da Esquistossomose experimental. A proteína vegetal foi purificada através de ciclos de precipitações com sulfato de amônio, colunas de troca de tamanho e troca iônica, as amostras foram liofilizadas e a eficiência do processo confirmada pela atividade enzimática ATPásica e ADPásica e Eletroforese SDS-page. A apirase de batata foi empregada no ensaio de imunogenicidade em camundongos Balb/c (n=5) associada ou não ao praziquantel subterapêutico. A capacidade moduladora da proteína vegetal sobre o sistema imune combinada ou não ao PZQ subcurativo foi avaliada em murinos C57BL/6 (n=5) infectados com *S.mansoni*. A associação entre apirase de batata e PZQ induziu a produção de IgG, IgG1, IgG2a e IFN- $\gamma$  no modelo experimental de esquistossomose mansoni e reduziu o número de células CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> e da citocina IL-17. Apesar da apirase de batata não induzir proteção contra esquistossomose mansoni, a mesma foi capaz de reduzir o diâmetro dos granulomas hepáticos. Esses dados indicam que essa proteína pode atuar na modulação do granuloma por mecanismos específicos, principalmente quando associada ao PZQ subcurativo e reduzir a patologia provocada pela Esquistossomose mansoni em murinos, sendo assim uma importante ferramenta na melhor compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos no processo e como ferramenta na busca de antígenos vacinais e/ou que sejam capazes de reduzir a patologia hepática recorrente na esquistossomose.

**Palavras chave:** apirase de batata, reatividade cruzada, praziquantel subterapêutico.

## ABSTRACT

Schistosomiasis is an important neglected tropical disease caused by trematodes of the genus *Schistosoma* spp. It is an endemic parasite in more than 70 countries with approximately 230 million people affected and 800 million living in endemic areas. The disease is conditioned to populations of low socioeconomic status, where sanitation and sanitary education are deficient and is therefore a public health problem. Praziquantel (PZQ) is the current drug of choice, but it is not able to control the severe morbidity, which often affects patients. This bias invigorates the importance of controlling the morbidity and transmission of schistosomiasis. NTPDases are a family of proteins widely distributed among organisms, are enzymes that catalyze the hydrolysis of di and tri phosphate nucleotides. In *Schistosoma mansoni*, two isoforms were described SmATPase 1 and SmATPase 2. Potato apyrase (*Solanum tuberosum* NTPDase) shows strong cross-immunoreactivity with partially purified *S. mansoni* isoforms, suggesting a sharing of conserved epitopes between parasite proteins and plant protein. We investigated the potential modulating effect of the plant protein associated with the PZQ subcurative on the pathogenesis of experimental schistosomiasis. The plant protein was purified by ammonium sulphate precipitation cycles, size change and ion exchange columns, the samples were lyophilized and the process efficiency confirmed by ATPase and ADPase enzymatic activity and SDS-page electrophoresis. Potato apyrase was employed in the immunogenicity assay in Balb/c mice (n=5) associated or not to sub-therapeutic praziquantel. The modulatory capacity of the plant protein on the immune system combined or not with the subcutaneous PZQ was evaluated in *S. mansoni* infected C57BL/6 (n=5) murine. The association between potato apyrase and PZQ induced the production of IgG, IgG1, IgG2a and IFN- $\gamma$  in the experimental model of schistosomiasis mansoni and reduced the number of CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> and cytokine IL-17 cells. Although potato apyrase did not induce protection against schistosomiasis mansoni, it was able to reduce the diameter of hepatic granulomas. These data indicate that this protein can act in the modulation of granuloma by specific mechanisms, especially when associated with the PZQ subcurative and to reduce the pathology caused by Schistosomiasis mansoni in murinos, thus being an important tool in the better understanding of the immunological mechanisms involved in the process and as a tool in the search for vaccine antigens and / or that are able to reduce the recurrent hepatic pathology in schistosomiasis.

**Key words:** potato apyrase, cross-reactivity, subcurative dose.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mapa de distribuição da esquistossomose com classificação de risco em contrair a doença.....	18
<b>Figura 2.</b> Distribuição da esquistossomose de acordo com a faixa de positividade por município, Brasil 2010-2015.....	19
<b>Figura 3.</b> Ciclo de vida do parasito <i>S.mansoni</i> .....	21
<b>Figura 4.</b> Ovos de <i>Schistosoma spp.</i> .....	28
<b>Figura 5.</b> Resposta celular desenvolvida pelo hospedeiro definitivo após infecção por <i>S.mansoni</i> .....	31
<b>Figura 6.</b> Principais componentes envolvidos na resposta granulomatosa aos ovos de <i>S. mansoni</i> e <i>S. japonicum</i> .....	33
<b>Figura 7.</b> Topografia de membrana prevista e propriedades catalíticas das famílias de NTPDases de mamíferos .....	36
<b>Figura 8.</b> Esquema geral do trabalho .....	43
<b>Figura 9.</b> Protocolo de avaliação da resposta imune à apirase de batata .....	44
<b>Figura 10.</b> Protocolo de avaliação do potencial imunológico da apirase de batata junto ao praziquantel subcurativo sobre a esquistossomose murina .....	46
<b>Figura 11.</b> Eletroforese da proteína vegetal purificada .....	52
<b>Figura 12.</b> Reatividade de anticorpos anti-apirase específicos em soros de camundongos Balb/c sensibilizados com apirase de batata e tratados com praziquantel subcurativo .....	54
<b>Figura 13.</b> Reatividade entre apirase de batata e anticorpos IgE em amostras de soros de camundongos Balb/c sensibilizados com proteína vegetal e tratados com PZQ subcurativo.....	55
<b>Figura 14.</b> Número de linfócitos CD3 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> em esplenócitos de murinos Balb/c após protocolo de sensibilização com apirase de batata e tratamento com praziquantel subterapêutico.....	56
<b>Figura 15.</b> Número de linfócitos CD3 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> em esplenócitos de murinos Balb/c após protocolo de sensibilização com apirase de batata e tratamento com praziquantel subterapêutico.....	58

<b>Figura 16.</b> Perfil de IFN- $\gamma$ em sobrenadante de esplenócitos isolados de camundongos Balb/c sensibilizados com apirase de batata e tratados com PZQ subterapêutico.....	60
<b>Figura 17.</b> Perfil de IL-17 em sobrenadante de esplenócitos isolados de camundongos Balb/c sensibilizados com apirase de batata e tratados com PZQ subterapêutico.....	61
<b>Figura 18.</b> Reatividade de anticorpos anti-SWAP específicos em soros de camundongos Balb/c sensibilizados com apirase de batata e tratados com praziquantel subterapêutico .....	63
<b>Figura 19.</b> Reatividade de anticorpos IgE anti-SWAP específicos em soros de camundongos Balb/c sensibilizados com apirase de batata e tratados com praziquantel subterapêutico .....	64
<b>Figura 20.</b> Efeito da reatividade cruzada em camundongos Balb/c sensibilizados com apirase de batata e tratados com praziquantel subterapêutico no número de células CD3 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> e CD3 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> em esplenócitos estimulados com antígenos solúveis do verme adulto (SWAP).....	65
<b>Figura 21.</b> Perfil de IFN- $\gamma$ e IL-17 no sobrenadante de esplenócitos isolados de camundongos Balb/c sensibilizados com apirase de batata e tratados com PZQ subterapêutico.....	66
<b>Figura 22.</b> Recuperação de vermes do fígado e mesentério de camundongos C57BL/6 após protocolo experimental de sensibilização, infecção com <i>S.mansoni</i> e tratamento subcurativo com praziquantel.....	68
<b>Figura 23.</b> Reatividade de anticorpos anti-apirase específicos em soros de camundongos C57BL/6 sensibilizados com apirase de batata, infectados com <i>S.mansoni</i> e tratados com praziquantel subcurativo .....	70
<b>Figura 24.</b> Reatividade de anticorpos entre apirase de batata e anticorpos IgE presentes em amostras de soro de camundongos C57BL/6 sensibilizados com apirase de batata e tratados com praziquantel subcurativo no protocolo de infecção por <i>S.mansoni</i> .....	71
<b>Figura 25.</b> Perfil de IL-17 no sobrenadante de esplenócitos isolados de camundongos C57BL/6 sensibilizados com apirase de batata e tratados com PZQ subterapêutico em protocolo de esquistossomose mansoni .....	72

**Figura 26.** Perfil de IFN- $\gamma$  no sobrenadante de esplenócitos isolados de camundongos C57BL/6 sensibilizados com apirase de batata e tratados com PZQ subterapêutico em protocolo de esquistossomose mansoni ..... 73

**Figura 27.** Análise morfométrica de granulomas hepáticos de camundongos C57BL/6 sensibilizados com apirase de batata e tratados com PZQ subterapêutico em protocolo de Esquistossomose mansoni ..... 74

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Distribuição dos grupos experimentais de camundongos Balb/c e os respectivos esquemas de sensibilização e tratamento realizadas em cada grupo ...	44
<b>Tabela 2.</b> Distribuição dos grupos experimentais de camundongos C57BL/6 em cinco grupos experimentais e os respectivos esquemas de sensibilização e tratamento realizados .....	46
<b>Tabela 3.</b> Atividade ATPásica e ADPásica da apirase de batata após processo de purificação .....	51
<b>Tabela 4.</b> Avaliação da carga parasitária de camundongos C57BL/6 sensibilizados com apirase de batata, posteriormente infectados com <i>S.mansoni</i> e tratados com PZQ .....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACR - do inglês *Apyrase conserved region*

ACK – tampão de lise cloreto de amônio e potássio

ADP - adenosina difosfato

Al(OH)<sub>3</sub> - hidróxido de alumínio

APIRASE - nome usualmente aplicado as isoformas de ATP difosfohidrolases de origem vegetal

ATP - Adenosina trifosfato

CaMK II - proteína-quinase dependente de cálcio/calmodulina tipo II

cm – centímetros

CMC - carboximetilcelulose

°C - graus *Celsius*

ELISA – do inglês “*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*” – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

*g* - Força gravitacional

GST - glutathiona-s-transferase

h - hora

KDa – quilo Dalton

Kg - quilograma

KK - Kato-Katz

L – litros

LPS - lipopolissacarídeo

µg – micrograma

µmolPi – micromolar de fosfato

mg - miligrama

mL - mililitro

mM – milimolar

M - molar

nm - nanômetro

nmolPi – nanomolar de fosfato

N - Normal

n - número de animais nos grupos experimentais

NTPDases - Nucleosideo trifosfato difosfohidrolases

OMS - Organização Mundial da Saúde

OPD - do inglês *o-phenylenediamine dihydrochloride*

PBS - Tampão fosfato-salino, do inglês *phosphate buffered saline*

PZQ – praziquantel

rpm - rotações por minuto

RPMI – meio de cultura celular com L-glutamina e bicarbonato de sódio, desenvolvido por *Roswell Park Memorial Institute*.

SDS-page - eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio

SFB - soro fetal bovino

SWAP - preparação de antígenos solúveis de verme adulto

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
1.1 ESQUISTOSSOMOSE: ASPECTOS GERAIS.....	17
1.2 TERAPÊUTICA E CONTROLE DA ESQUISTOSSOMOSE .....	23
1.3 DIAGNÓSTICO CLÍNICO-LABORATORIAL .....	27
1.4 RESPOSTA IMUNE FRENTE À ESQUISTOSSOMOSE .....	30
1.5 REGULAÇÃO IMUNOLÓGICA NA PATOGÊNESE E MORBIDADE .....	32
1.6 NTPDases ANTIGÊNICAS.....	36
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	39
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	39
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
3.1 LOCAL DE PESQUISA E ASPECTOS ÉTICOS .....	40
3.2 REAGENTES .....	40
3.3 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA VEGETAL DE <i>SOLANUM TUBEROSUM</i> .....	41
3.4 PREPARAÇÃO DE ANTÍGENOS SOLÚVEIS DO VERME ADULTO ( <i>SWAP</i> ) ...	41
3.5 CAMUNDONGOS E PARASITAS.....	42
3.6 ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE À APIRASE DE BATATA ASSOCIADA AO PRAZIQUANTEL SUBTERAPÊUTICO EM CAMUNDONGOS BALB/C .....	42
3.7 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOLÓGICO DA APIRASE DE BATATA ALIADA AO PRAZIQUANTEL SUBTERAPÊUTICO SOBRE A ESQUISTOSSOMOSE MANSONI.....	45
3.8 AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO CONTRA INFECÇÃO POR <i>S.mansoni</i> APÓS SENSIBILIZAÇÃO COM APIRASE DE BATATA E TRATAMENTO SUBCURATIVO COM PRAZIQUANTEL .....	47

3.9 QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-APIRASE DE BATATA E ANTI-SWAP POR ELISA.....	48
3.10 CITOMETRIA DE FLUXO .....	48
3.11 CULTURA DE ESPLÊNOCITOS E ANÁLISE DE CITOCINAS.....	49
3.12 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DE GRANULOMAS HEPÁTICOS.....	49
3.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	50
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
4.1 IDENTIFICAÇÃO E ATIVIDADE ATPásica E ADPásica DA APIRASE DE BATATA .....	51
4.2 RESPOSTA IMUNE INDUZIDA PELA SENSIBILIZAÇÃO COM APIRASE DE BATATA ASSOCIADA AO PRAZIQUANTEL SUBCURATIVO .....	53
<b>4.2.1 Níveis de anticorpos anti-apirase específicos produzidos após sensibilização com proteína vegetal e tratamento subterapêutico com praziquantel .....</b>	<b>53</b>
<b>4.2.2 Reatividade de apirase de batata com anticorpos IgE em soros de animais sensibilizados.....</b>	<b>55</b>
<b>4.2.3 Influência da sensibilização com apirase de batata e tratamento com praziquantel subterapêutico no número de células CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ...</b>	<b>56</b>
<b>4.2.4 Avaliação da produção de INF-<math>\gamma</math> e IL-17 induzidos pela da sensibilização de camundongos Balb/c com apirase de batata e tratamento com praziquantel subterapêutico .....</b>	<b>59</b>
4.3 EFEITO DA REATIVIDADE CRUZADA DOS ANTÍGENSO SOLÚVEIS DO VERME ADULTO (SWAP) SOBRE A RESPOSTA IMUNE DOS ANIMAIS SENSIBILIZADOS COM APIRASE DE BATATA E TRATADOS COM PRAZIQUANTEL SUBCURATIVO.....	62
4.4 ENSAIO PRELIMINAR DA POTENCIAL MODULAÇÃO DO SISTEMA IMUNE PELA APIRASE DE BATATA ASSOCIADA AO PRAZIQUANTEL SUBCURATIVO NA ESQUISTOSSOMOSE MURINA.....	67

<b>4.4.1 Recuperação dos vermes após infecção experimental com <i>Schistosoma mansoni</i>.....</b>	<b>67</b>
<b>4.4.2 Níveis de anticorpos anti-apirase específicos produzidos após sensibilização com apirase de batata, infecção com <i>S.mansoni</i> e tratamento subterapêutico com praziquantel .....</b>	<b>69</b>
<b>4.4.3 Reatividade da apirase de batata com anticorpos IgE em soros de animais sensibilizados e tratados em protocolo experimental de esquistossomose experimental .....</b>	<b>71</b>
<b>4.4.4 Avaliação da produção de citocinas IFN-<math>\gamma</math> e IL-17 em camundongos C57BL/6 sensibilizados co apirase de batata e tratados com praziquantel subcurativo em protocolo experimental de Esquistossomose mansoni .....</b>	<b>72</b>
<b>4.4.5 Efeito da sensibilização com apirase de batata e tratamento subterapêutico com praziquantel sobre granulomas hepáticos de murinos C57BL/6 decorrentes da Esquistossomose mansoni .....</b>	<b>74</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>75</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>83</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>85</b>
<b>ANEXO 1: Protocolos de liberação dos animais para o experimento realizado .....</b>	<b>106</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ESQUISTOSSOMOSE: ASPECTOS GERAIS

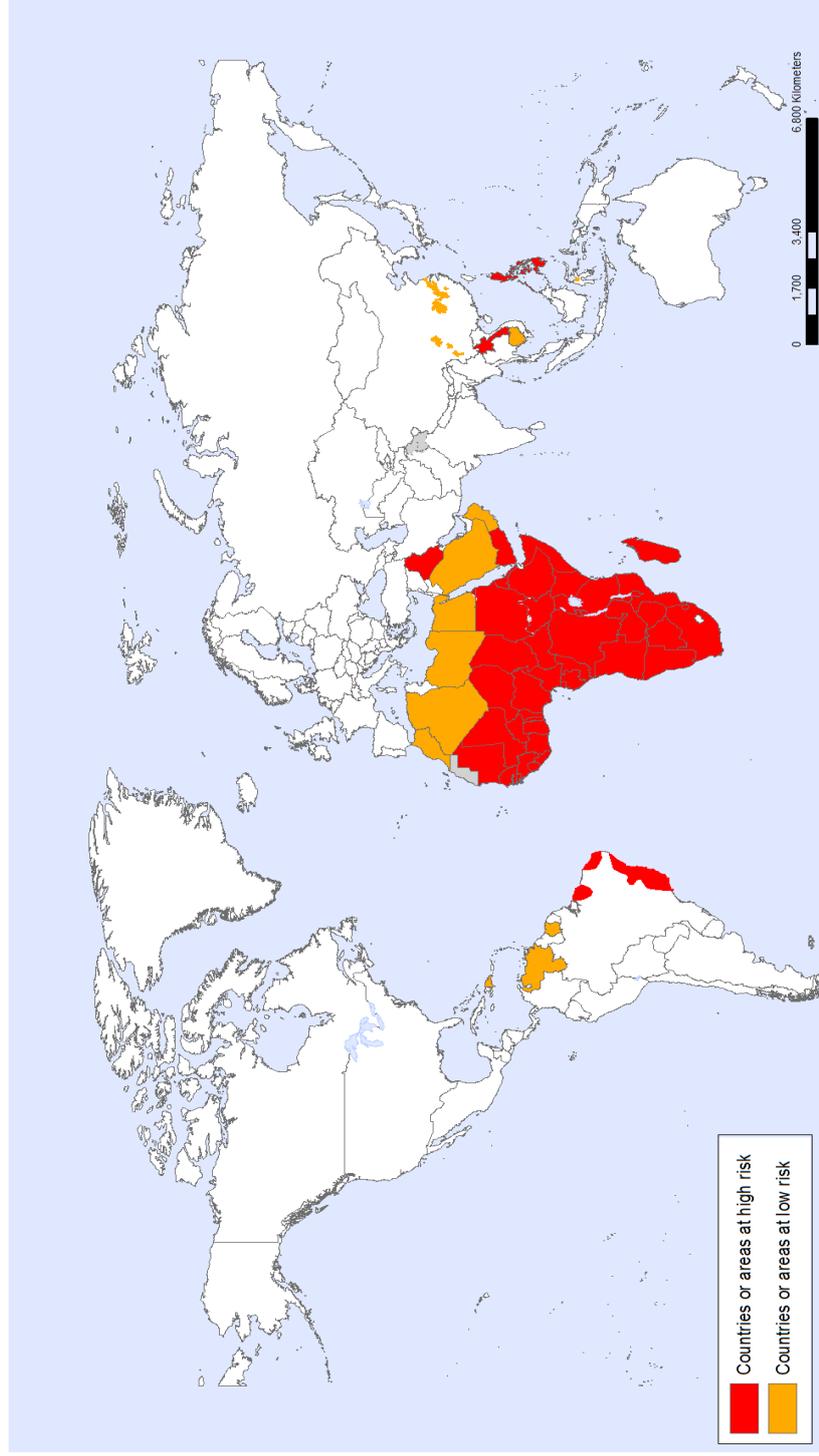
A esquistossomose é uma importante doença tropical negligenciada, a qual atinge aproximadamente 230 milhões pessoas em mais de 70 países. Estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que aproximadamente 800 milhões de indivíduos residem em áreas endêmicas. A falta de condições de saneamento básico, baixo nível socioeconômico e educação sanitária deficiente atuam como condicionantes e contribuem para a ocorrência desta enfermidade (BRASIL, 2014; GASIM et al., 2015; ROSS et al., 2016; WHO, 2017).

Além disso, a doença detém relevância pelas altas taxas de mortalidade e morbidade. São registradas aproximadamente 12.000 mortes anuais diretas, e pelo menos, 200.000 como cofator. Do mesmo modo, 20 milhões de pessoas sofrem por consequências dessa doença a cada ano. Esses dados tornam a esquistossomose a parasitose mais prevalente no mundo e uma das doenças tropicais negligenciadas que mais provocam óbitos, depois da malária (MARI et al., 2017; LAMBERTON et al., 2017).

Seis espécies de *Schistosoma spp.* são capazes de infectar o homem, *S.mansoni*, *S.japonicum*, *S.intercalatum*, *S.mekongi*, *S.malayensis* e *S.haematobium*, as mesmas encontram-se distribuídas de acordo com a presença de hospedeiros intermediários susceptíveis (NAHUM et al., 2012). A esquistossomose ocorre em várias partes do mundo (**Figura 1**), principalmente no Oriente Médio (Israel, Arábia Saudita, Irã), na maior parte da África (especialmente na África Subsaariana), na China e América do Sul e Central (FENWICK & JOURDAN, 2016).

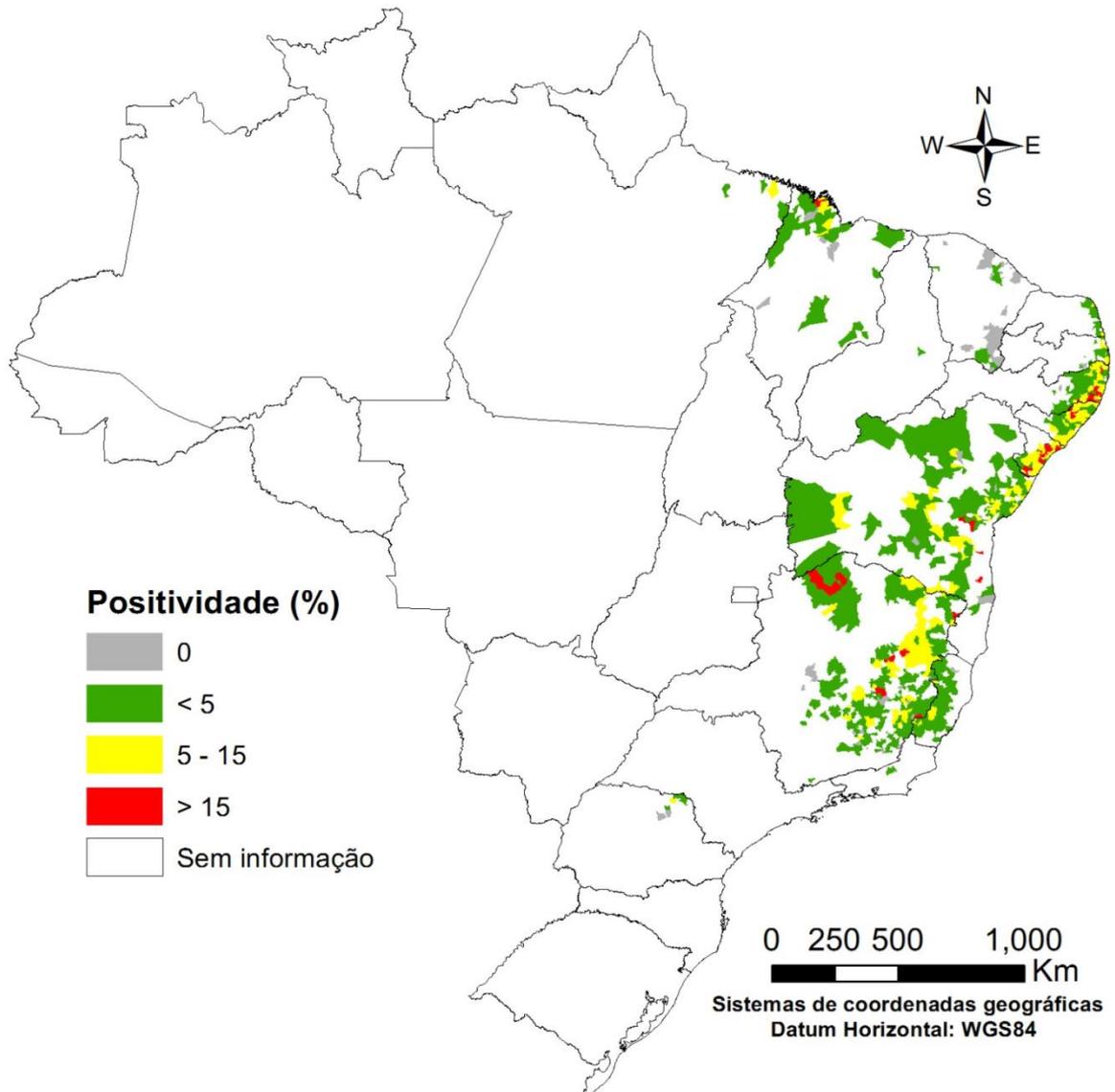
No Brasil, a introdução da doença se deu por meio do tráfico de escravos infectados. No território brasileiro, encontrou condições favoráveis ao desenvolvimento e transmissão, o que permitiu se estabelecer em vasta extensão territorial como representado na **Figura 2** (BRASIL, 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Em virtude da inexistência de outros hospedeiros intermediários susceptíveis aos demais helmintos, apenas o *Schistosoma mansoni* - cujos hospedeiros intermediários são planorbídeos do gênero *Biomphalaria spp.* - permaneceu no país.

## Schistosomiasis, countries or areas at risk, 2014



**Figura 1: Mapa de distribuição mundial da esquistossomose com classificação de risco em contrair a doença.** A esquistossomose está presente especialmente nos continentes da África, América do Sul e Oriente Médio, onde as espécies completam seus ciclos de vida de acordo com os hospedeiros intermediários presentes em cada área. *S.mansoni* faz-se presente na África, Península Arábica e América do Sul; *S.haematobium* na África e Península Arábica; *S.japonicum* na China, Indonésia e Filipinas; *S.intercalatum* e *S.mekongi*, em áreas restritas da África e Ásia; *S.malayensis* na Malásia. **Fonte: OMS, 2015.**

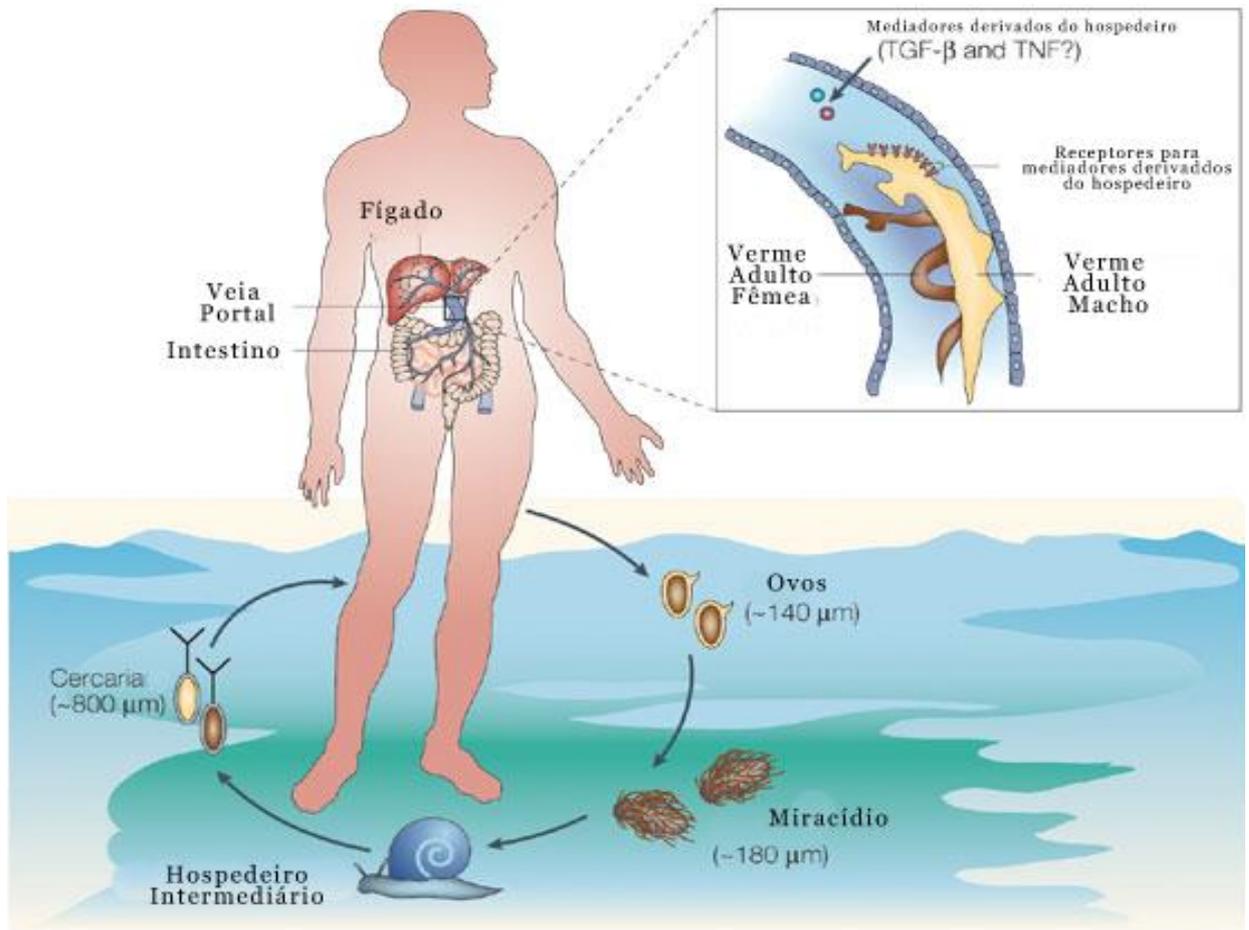
## Distribuição da esquistossomose, de acordo com a faixa de positividade, por município. Brasil, 2010 – 2015



**Figura 2. Distribuição da esquistossomose, de acordo com a faixa de positividade, por município. Brasil, 2010 – 2015:** No Brasil as regiões Nordeste e Sudeste são as mais atingidas, devido presença dos hospedeiros intermediários (moluscos). Atualmente, é possível detectar a doença em todas as regiões do país. As áreas endêmicas e focais estão compreendidas em 19 estados, sendo os principais deles: Pernambuco, Sergipe, Alagoas, litoral do Rio Grande do Norte, Bahia, Minas Gerais e Espírito Santo. **Fonte:** Ministério da Saúde, 2017.

Em seu ciclo biológico, o helminto alterna fases assexuadas e sexuadas de reprodução, sendo heteroxênico (**Figura 3**). Após oviposição na parede do intestino, os ovos chegam à luz deste órgão, onde sofrem maturação, contendo em seu interior o miracídio. Ao chegarem ao exterior juntamente com o bolo fecal, atingem a água e eclodem para liberá-lo, dependendo das condições de temperatura, luminosidade e oxigenação da água. Os miracídios nadam até que encontrem moluscos susceptíveis ao seu desenvolvimento. No interior dos caramujos os miracídios replicam-se assexuadamente, passam por modificações e evoluem para cercárias entre 4 a 6 semanas (COLLEY et al., 2014). As cercárias - forma infecciosa ao hospedeiro mamífero - deixam os moluscos e nadam ativamente até serem atraídas por um hospedeiro definitivo, nos quais podem penetrar ativamente pela pele ou mucosa, graças aos seus movimentos ativos e secreções pelas glândulas de penetração (SOUZA et al., 2011). Após a penetração as larvas resultantes desse processo – os esquistossômulos – adaptam-se às condições fisiológicas do mamífero e percorrem, via sistema vascular sanguíneo, coração e pulmão até o sistema porta hepático, onde completam a maturação e diferenciação sexual e também onde ocorrerá a copulação, sendo que as fêmeas fecundadas isoladas ou acopladas ao macho irão se dirigir para a submucosa intestinal a fim de realizar a postura de ovos, completando o ciclo do *S. mansoni* (CARVALHO et al., 2008; GRYSEELS, 2012; MERRIFIELD et al., 2016; MARI et al., 2017). Logo após a penetração das cercárias na pele do hospedeiro mamífero as larvas em maturação (esquistossômulos) necessitam cerca de 5 a 7 semanas para tornarem-se adultos e produzir ovos (CARVALHO et al., 2008; COLLEY et al., 2014).

No decorrer do ciclo, o *S.mansoni* faz alterações morfológicas e bioquímicas significativas, que o tornam capaz de evadir do sistema imunológico do hospedeiro, mas também de subverter e utilizar para sua sobrevivência e transmissão (DUNNE & COOKE, 2005). Cada etapa suscita a ativação de complexos mecanismos imunológicos.



Nature Reviews | Immunology

**Figura 3. Ciclo de vida do parasito *S. mansoni*:** As cercárias penetram no hospedeiro definitivo pela pele ou mucosa. Na corrente sanguínea se transformam em esquistossômulos. Cerca de 21 dias após a infecção os parasitos chegam ao fígado e alcançam as formas adultas. Os casais acasalam-se e migram para as veias mesentéricas onde realizam a oviposição. Levados pela corrente sanguínea, os ovos são direcionados para os tecidos, sendo o fígado e o intestino (que sairá nas fezes) os locais de maior concentração destes ovos. Em contato com a água, liberam miracídeos – larvas ciliadas - que infectam os hospedeiros intermediários e se transformam em cercárias, responsáveis por infectar o hospedeiro definitivo e assim reiniciar o ciclo. TGF- $\beta$  (Fator de transformação do Crescimento beta) TNF (Fator de Necrose Tumoral). **Fonte:** Adaptado de: PEARCE & MACDONALD (2012).

Inicialmente a penetração das cercárias produz importante reação inflamatória dérmica – erupção maculopapular e discreta eritomatose – capaz de destruir importante quantitativo de vermes. Os esquistossômulos resultantes do sucesso na penetração na pele iniciam a migração e amadurecimento (que varia de 40 a 60 dias) suscitando a fase de reação de hipersensibilidade sistêmica (fase aguda) que pode perpassar de forma assintomática ou como uma síndrome

denominada “*Febre de Katayama*”, com sintomas gerais de febre, mal-estar, mialgia, fadiga, tosse não produtiva, eosinofilia, diarreia (com ou sem a presença de sangue); esta forma da doença é comum em viajantes ou imigrantes para regiões endêmicas, que são expostos aos antígenos esquistossomóticos pela primeira vez (COLLEY et al., 2014). Tais sintomas podem ocorrer da quarta até a oitava semana de infecção – coincidindo com a maturidade dos vermes. Finalmente, a fase crônica vai depender do órgão atingido e dos desdobramentos da reação granulomatosa frente aos ovos internalizados nos tecidos (GRAY et al., 2011; BARSOUM et al., 2013; CHOFLE et al., 2014).

A evolução clínica depende da resposta do hospedeiro à invasão, ao desenvolvimento e à oviposição do verme. No homem a doença se apresenta sob uma forma aguda e duas crônicas. A condição aguda atinge órgãos como fígado, pulmão e intestino, nos quais estão presentes granulomas periovulares, além de intensa produção de ovos, prostração, febre e eosinofilia, coincidindo com o início da eliminação de ovos nas fezes que pode causar dor abdominal e diarreia com muco e sangue (SCHALL et al., 2007; BRASIL, 2014).

A forma crônica leve ou intestinal é a que se encontra a maioria das pessoas de áreas endêmicas, as quais apresentam baixa carga parasitária, são assintomáticas ou com queixas inespecíficas, apesar de permanecerem eliminando ovos viáveis nas fezes. O intestino geralmente é pouco lesado e no fígado eventualmente ocorre uma resposta inflamatória crônica local a ovos do *S.mansoni* com formação de granulomas periovulares isolados em fases distintas de cicatrização e ramificações finas da veia porta, caracterizando a forma leve da doença. Este quadro clínico pode evoluir para inflamação hepatoesplênica e fibrose hepática (CARVALHO et al., 2008; GRAY et al., 2011).

Na forma hepatointestinal há aumento da liberação de ovos, acúmulo de granulomas e lesões hepáticas intensas e prejudiciais (SCHALL et al., 2007). A forma grave ou hepatoesplênica é tipicamente reconhecida por fibrose hepática periportal, pois as consequências se expandem ao sistema porta com lesões destrutivas e obstrutivas, devido à embolização dos ovos e deposição de colágeno, sendo que o indivíduo pode apresentar ou não sinais de hipertensão portal como: esplenomegalia, varizes no esôfago, neste caso acompanhado de alta carga parasitária. Tais manifestações podem ocorrer anos após a infecção (BARSOUM et al., 2013).

## 1.2 TERAPÊUTICA E CONTROLE DA ESQUISTOSSOMOSE

Ao longo dos anos estratégias de controle - orientadas a ambos hospedeiros - têm sido empregadas a fim de reduzir o risco de transmissão da esquistossomose e conseqüentemente a morbidade associada à doença. O encargo imposto pela doença levou a implementação da quimioterapia em massa e direcionada pela OMS juntamente com melhorias no saneamento, educação sanitária e controle do hospedeiro invertebrado através de modificação do meio ambiente e uso de moluscidas, com o intuito de impedir a transmissão e reduzir carga parasitária dos indivíduos infectados (WHO, 2013; BRASIL, 2014; CARVALHO, 2017).

O medicamento de escolha para tratamento da esquistossomose é o praziquantel (PZQ), um derivado pirazinoisoquinoleínico, do grupo dos tioxantônicos. Foi introduzido, em 1996, na rotina do Programa de Controle da Esquistossomose (PCE) e atualmente é o único medicamento utilizado, por apresentar baixo custo e toxicidade, além da fácil administração e adesão (ERKO et al., 2012; BRASIL, 2014; VALE et al., 2017). O praziquantel perturba a homeostase do  $Ca^{2+}$  em esquistossomos adultos, através de um mecanismo desconhecido (ANDREWS, 1985; DAY et al., 1992; REDMAN et al., 1996). Em poucos minutos de exposição ao PZQ dois efeitos principais se tornam aparentes no parasito: contração muscular rápida e sustentada (FETTERER et al., 1980) e ruptura tegumentar (BECKER et al., 1980; MEHLHORN et al., 1981), o que leva subsequentemente a exposição de antígenos parasitários na superfície do verme (HARNETT & KUSSEL, 1986).

O PZQ promove a cura em 75% a 95% dos pacientes e redução de 80 a 98% na percentagem de ovos. A eficácia deste fármaco em tratar a esquistossomose varia em função da idade do paciente e do grau de infecção. O percentual de cura geralmente é menor em crianças e em pacientes com infecção massiva (FERRARI et al., 2003).

De fato, além da ação contra cestódeos e trematódeos, o PZQ foi a primeira droga a apresentar atividade acentuada por via oral para as três principais espécies que acometem o ser humano *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. haematobium* (GONNERT & ANDREWS, 1977; WEBBE & JAMES, 1977; ANDREWS et al., 1985.; CHAN et al., 2013). Além de ser eficaz para tratar todas as formas clínicas da doença (VALE et al., 2017).

A dose de cura do PZQ para esquistossomose é de 50 mg/Kg em adultos e 60 mg/Kg em crianças acima de 4 anos de idade, ambos em dose única (BRASIL, 2017). Em modelo murinho, a dose experimental curativa é de 600mg/Kg. Apesar das pesquisas sobre a atividade do PZQ concentrarem-se principalmente na posologia do fármaco, alguns estudos relatam efeitos importantes quando empregado em dose subterapêutica ou subcurativa, ou seja, em dose abaixo da recomendada. Os resultados em murinos apontam que a dose única de 200mg/Kg foi capaz de causar danos permanentes no tegumento de vermes adultos (SHAW, 1990; FALLON et al., 1996), com exposição antigênica e em órgãos reprodutivos das fêmeas de *Schistosoma spp.* (SHAW & ERASMUS, 1988), além de reduzir de forma significativa o número de ovos nos órgãos afetados por *S. mansoni* na dose de 333mg/Kg (BOTROS et al., 1989). Como os vermes adultos apresentaram susceptibilidade parcial à dose subcurativa do PZQ, os ovos – que são a principal causa da patogênese – foram subsequentemente reduzidos. Logo, o tratamento em dose subterapêutica pode contribuir para redução da patologia associada ao ovo (CHAIWORAPORN et al., 2005).

Mesmo após décadas de uso extensivo, muito permanece desconhecido sobre o PZQ, em particular, seu modo exato de ação, a identidade precisa e localização do(s) alvo(s) moleculares da droga, metabolismo *in vivo* e seu (s) alvo (s) molecular (es) (DAY et al., 1992; REDMAN et al., 1996; CIOLI E PICA-MATTOCCIA, 2003). As primeiras pesquisas destacaram três principais efeitos sobre os vermes de *S. mansoni*: influxo de cálcio em todo o parasita, contração muscular e alterações no tegumento (GREENBERG, 2005; CIOLI et al., 2014; MEISTER et al., 2016). É tentador ligar esses fenômenos em um único segmento, assumindo que o influxo de cálcio é o evento chave, que por sua vez induz a contração muscular (NOVAES et al., 1999; CIOLI et al., 1995, 2014; VALE et al., 2017). Entretanto, em estudos subsequentes com parasitas mantidos *in vitro*, foi comprovado que o acúmulo de cálcio por si só, não pode explicar o efeito esquistossomicida do PZQ (PAX et al., 1985; PICA-MATTOCCIA et al., 2008; NOGI et al., 2009). Abordagens transcriptômicas revelam genes que podem evoluir em condições de metabolismo aeróbico e regulação do cálcio citosólico, sugerindo que a atividade esquistossomicida do PZQ é semelhante à observada durante o estresse oxidativo (ARAGON et al., 2009). Além disso, a proteína-quinase dependente de cálcio/calmodulina tipo II (CaMK II) parece desempenhar um papel chave na ação do

PZQ e, portanto, pode ser considerado um novo e promissor alvo de drogas (YOU et al., 2013; RINALDI et al., 2015).

Vale ressaltar que o PZQ se constitui em uma mistura racêmica, na qual apenas o isômero levógiro é ativo (XIAO & CATTO, 1989; XIAO, 1999; FARIAS et al., 2013). Assim, a estereoespecificidade do PZQ é um argumento indicativo de que a droga interage com alguma proteína do parasito importante na regulação do fluxo de  $Ca^{2+}$  (CARVALHO et al., 2008).

Algumas desvantagens acerca deste fármaco são: gosto amargo, baixa eficácia contra as formas imaturas do parasita (OTHMAM & SOLUMAN, 2015; CIOLI et al., 2014) e relatos de resistência à droga, principalmente em focos de endemicidade e não prevenção da reinfecção (CARDOSO et al., 2006.; GAZE et al., 2014).

Estudos apontam para uma relação de cooperação entre a ação do PZQ e a resposta imune do hospedeiro definitivo, resultante da exposição e liberação de antígenos indiretamente induzida pelo fármaco (ANDREWS et al., 1985.; BRINDLEY & SHER, 1990; VALE et al., 2017), com efeitos relevantes como aumento de IL-4 e IL-5 - citocinas associadas com a produção de IgE e eosinófilos (BAKER et al., 2010; PELLETREAU et al., 2011).

Análises *in vitro*, atestaram que nos estágios em que o *S.mansoni* é menos suscetível ao PZQ, a combinação da quimioterapia com anti-soro de coelho (produzido a partir de antígenos da superfície do verme adulto) alcança maiores taxas de cura em comparação com o emprego do fármaco isolado (DOENHFF et al., 1987). Ribeiro et al. (2004) descobriram uma ação sinérgica entre a imunidade específica contra *S.mansoni* - induzida frente a reinfecção – e o tratamento com doses subterapêuticas de PZQ.

Ainda assim, as limitações, acerca da quimioterapia para a esquistossomose persistem, uma vez que se concentra apenas na cura de indivíduos, sem, contudo intervir diretamente na morbidade, transmissão e reinfecção, sendo esta última recorrente em áreas endêmicas (CARDOSO et al., 2006). A estratégia mais acertada e útil, em longo prazo, seria uma vacina eficaz contra a doença, capaz de reprimir a reinfecção, que lhe é característico (EL RIDI & TALLIMA, 2013; GAZE et al., 2014).

A OMS preconiza que a oferta de um candidato a vacina para esquistossomose seja acima de 40%. O primeiro antígeno em ensaios clínicos foi a Glutathione-S-Transferase (GST), clonada de *S.haematobium*. Os estudos de fase I e II demonstraram um perfil de segurança aceitável e redução da fecundidade da fêmea – efeito promissor que poderia reduzir a patologia e a transmissão no trato urinário. Além disso, altos títulos de anticorpos IgG3 anti-GST-neutralizantes foram detectados, como também níveis significativos de citocinas IL-5 e IL-13 após 21 dias da segunda dose da vacina GST. Apesar de anticorpos IgE serem considerados protetores na esquistossomose, os mesmos (anti-GST) não foram detectados nos indivíduos em ensaio (RIVEAU et al., 2012).

Com relação à esquistossomose mansônica outros dois candidatos a vacinas permanecem em estudo clínico. O primeiro é uma proteína de superfície Sm-TSP-2, que após ser empregada na imunização, reduziu substancialmente a carga de vermes (CURTI et al., 2013; CHENG et al., 2013). O outro antígeno promissor empregado em estudos clínicos foi o Sm14 - proteína capaz de ligar ácidos graxos. Em modelo murino alcançou níveis de proteção de 67%, no desafio contra *S. mansoni*. Em humanos induziu produção de IgG, células CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  e IL-2, após 3 doses com intervalo de 30 dias (SANTINI-OLIVEIRA et al., 2016). Em áreas endêmicas a proteína tegumentar Sm29, induziu a resistência à reinfeção através dos níveis significativos de IgG1 e IgG3. Além disso, a imunização com Sm29 também levou à redução do número de ovos e vermes adultos (CARDOSO et al., 2008) e aumento IFN- $\gamma$  (PINHEIRO et al., 2014).

Outros antígenos promissores candidatos a vacinas permanecem em estudo, como Smp80, que demonstrou eficácia em primatas e aguarda ser liberada para fase clínica de estudo. Adicionalmente, estratégias diferenciadas de controle vêm sendo investigadas, como bloqueio transmissão da esquistossomose asiática causada por *S.japonicum* para seres humanos, através de búfalos, gado e porcos, vista a importância desta zoonose. Assim também há otimismo em uma vacina pan-esquistossomótica, uma vez que existe uma variedade de antígenos altamente conservados entre espécies diferentes, além da projeção futura de uma vacina multivalente contra helmintos, devido à sobreposição geográfica entre a esquistossomose e ancilostomose (DA'DARA et al., 2008; KARMAKAR et al., 2014).

### 1.3 DIAGNÓSTICO CLÍNICO-LABORATORIAL

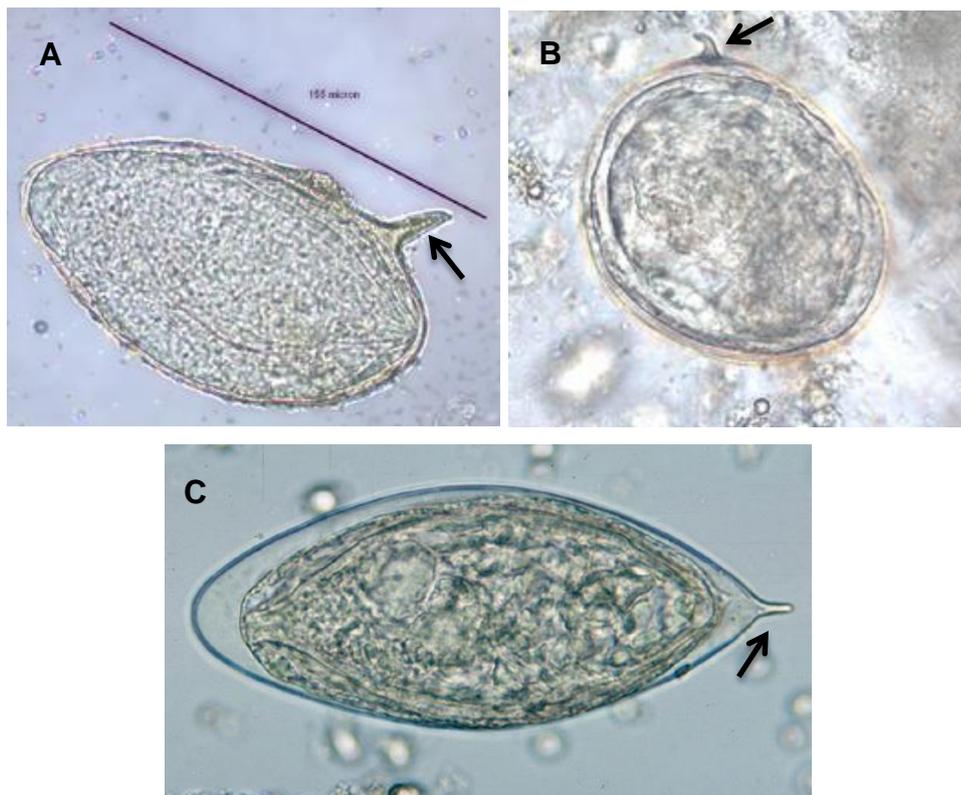
No contexto do diagnóstico clínico-epidemiológico, a confirmação laboratorial é um instrumento imprescindível, sendo baseada, essencialmente, pela observação microscópica de ovos de *Schistosoma spp.* (**Figura 2**) em amostras fecais, os quais exibem características singulares, com tamanho alusivo e presença da espícula lateral (somente *S. mansoni*) ou terminal de acordo com a espécie (GRAY et al., 2011). Esse conjunto de métodos permanece como instrumento mais amplamente utilizado, principalmente por seu baixo custo operacional e praticidade em situações de infra-estrutura laboratorial precária, exceto para *S. haematobium*, em que os ovos são eliminados na urina (CARVALHO et al., 2008; GANDASEGUI et al., 2018).

A técnica de Kato-Katz (KK) é o procedimento internacionalmente recomendado pela OMS (WHO, 1994; WHO, 2012) para diagnóstico de *S. mansoni*. e permite estimar a carga parasitária e classificar a intensidade da infecção em baixa, moderada e alta pela quantificação do número de ovos por grama de fezes analisada (WHO, 2012), ou seja, fornece dados para estudo e programas de controle epidemiológico. Não obstante o diagnóstico também possa ser realizado por outros exames parasitológicos de rotina, por meio de técnicas de concentração ou sedimentação, apesar de sofrerem interferência de fatores como variação diária do número de ovos eliminados por dia (ZHANG, 2013; LINDHOLZ et al., 2018).

Apesar do amplo uso, a técnica KK pode apresentar falsos negativos em pacientes na fase pré-patente da infecção ou com baixa carga parasitária, especialmente em áreas não endêmicas e populações anteriormente submetidas a tratamentos (ZHAO et al., 2012; OKOYO et al., 2018). Além disso, boa fração de exames verdadeiros podem ser perdidas no KK, pelo fato de o volume de fezes necessário ser muito pequeno (<50 mg), podendo os ovos estarem distribuídos de forma desigual nas fezes (OLIVEIRA et al., 2018).

Estudos comprovaram que a observação de uma única lâmina pelo KK subestima a população infectada em locais de baixa transmissão, e que, portanto, o fornecimento de mais amostras fecais e a observação de três esfregaços aumentou a sensibilidade da técnica em mais de 30% (BERHE et al., 2004; FROTA et al., 2011; SIQUEIRA et al., 2011).

Devido à sensibilidade reduzida da técnica de KK em áreas de baixa endemicidade, métodos diagnósticos aprimorados vêm sendo propostos para detecção precisa de *Schistosoma spp* nas populações de risco e monitoramento dos programas de controle da esquistossomose. O *Helmintex*, desenvolvido por Teixeira e cols. (2007), constitui um método altamente sensível capaz de detectar ovos de *S.mansoni* em quantidades maiores de fezes por meio de *beads* paramagnéticos (LINDHOLZ et al., 2018). Assim também, Jurberg et al., (2008), sugeriu um dispositivo para detecção do miracídio, que pode ser avaliado até 15 dias pós fixação. Outro método rápido, sensível e de fácil execução, ainda em aperfeiçoamento para uso em grandes populações consiste na sedimentação diferencial dos ovos quando submetidos a fluxo lento e contínuo de solução salina 3% (COELHO et al., 2009.; WARLLEM et al., 2018).



**Figura 4. Ovos de *Schistosoma spp*.** Os ovos de *S.mansoni* (A) possuem uma forma característica - uma espícula lateral proeminente perto da extremidade posterior. A extremidade anterior é cônica e ligeiramente curva. Já os ovos de *S.japonicum* (B) são mais arredondados e a espícula lateral é menor e menos conspícua que das outras espécies. Em contrapartida a espícula do *S.haematobium* (C) é terminal e bem pronunciada. Os ovos contêm o miracídio maduro quando são eliminados nas fezes (*S.mansoni* e *S.japonicum*) ou na urina (*S.haematobium*). As setas indicam a localização da espícula dos ovos das três principais espécies de *Schistosoma spp*. que infectam o homem. **Fonte:** Laboratório de Higiene do Estado de Wisconsin – EUA. Disponível em: [www.mcdinternational.org](http://www.mcdinternational.org).

Através da detecção dos níveis de antígenos marcadores de *Schistosoma spp.* em soro e urina, o POC-CCA<sup>®</sup> é um método recente e com resultados pertinentes na avaliação epidemiológica tanto em áreas endêmicas (VAN LIESHOUT et al., 2000; VAN DAM et al., 2004), como não endêmicas, com maior sensibilidade se comparado ao KK (KITUR et al., 2016; SIQUEIRA et al., 2016; ASSARÉ et al., 2018).

Não obstante, a detecção de anticorpos através dos imunoenaios é igualmente útil pela relativa sensibilidade, especialmente em áreas de baixa endemicidade, em casos de turistas infectados e na diferenciação da fase aguda e crônica, mesmo com possibilidade de reações cruzadas com outras helmintoses e não diferenciação entre infecção recente e passada (CARVALHO et al., 2008; CAVALCANTI et al., 2013).

Os avanços da biologia celular e molecular viabilizaram a síntese de peptídeos sintéticos e antígenos recombinantes capazes de detectar epítopos específicos em infecção ativa, exibindo também menor possibilidade de reações cruzadas (CARVALHO et al., 2008), assim como a amplificação do DNA via reação em cadeia da polimerase (PCR), que forneceu um diagnóstico primoroso pela extrema sensibilidade, apesar de seu alto custo. O PCR pode ser utilizado em amostras de soro e fezes, especialmente se o padrão de oviposição for abaixo do limite de detecção do KK (PONTES, DIAS-NETO & RABELLO, 2002; PONTES et al., 2003). Ademais as técnicas histopatológicas como biópsia retal e hepática ampliam a investigação da esquistossomose, porém com restrição a casos de difícil diagnóstico, devido ao seu caráter invasivo (WHO, 2009).

## 1.4 RESPOSTA IMUNE FRENTE À ESQUISTOSSOMOSE

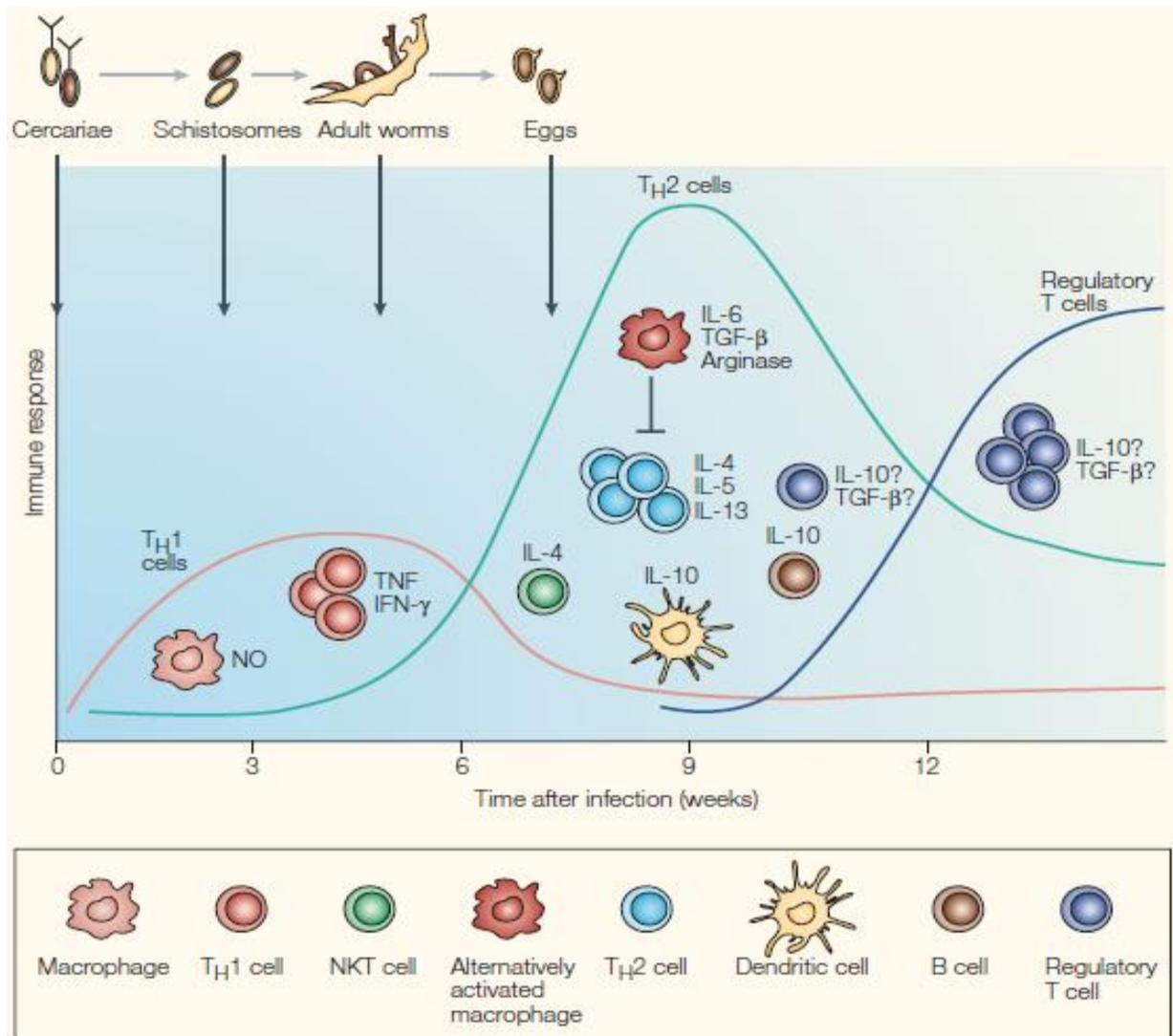
A resposta imunológica do hospedeiro definitivo (**Figura 5**) ao *S. mansoni* é dinâmica no decorrer da infecção. Nos estágios iniciais - 3 a 5 semanas – há uma ativação predominante Th1 direcionada principalmente aos antígenos dos esquistossômulos e vermes imaturos, a fim de eliminar o parasita. Células mononucleadas do sangue periférico (PBMCs) são induzidas a promover a citotoxicidade celular com secreção de citocinas inflamatórias como: fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleucinas (IL) 1 e 6 (PEARCE & MACDONALD, 2002; WILSON et al., 2007).

Presumivelmente, com a natural progressão da doença – por volta de 5-6 semanas – os parasitos amadurecem, acasalam e começam a produzir ovos. O início da oviposição ativa as células *natural killer* (NK) e dendríticas, que aumentam a produção de IL-10 e reduzem a secreção de IL-12, em resposta aos antígenos do ovo (DUNNE & COOKE, 2005), o que propicia a redução do componente pró-inflamatório Th1 e surgimento de um proeminente perfil modulatório Th2, através da secreção de citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (PEARCE & MACDONALD, 2002; SCHRAMM, HAAS, 2010) e aumento do número de eosinófilos, basófilos e mastócitos, bem como alta circulação níveis de IgE (DUNNE & COOKE, 2005).

Ovos, direcionados ao fígado incitam uma reação inflamatória focal, com acúmulo de mononucleares, neutrófilos, eosinófilos e outros tipos celulares de forma compacta e organizada (LENZI et al., 1998). A forte resposta celular para tentar conter e eliminar os ovos predispõe a modulação para um perfil Th2, com o intuito de evitar ou atenuar a lesão tecidual, que possa ser provocada pela constante ativação da resposta Th1 (PEARCE & MACDONALD, 2002). Além disso, o parasito é capaz de modular essa resposta Th2 por mecanismos variados, especialmente na fase crônica de infecção (DUNNE & COOKE, 2005).

Esse processo acontece gradualmente ao longo de várias semanas, como resultado de mediadores humorais de origem parasitária e hospedeira. As células inflamatórias são gradualmente substituídas por fibroblastos, os granulomas regridem e tendem a calcificar (COLLEY et al., 2014). Dentre outros mecanismos em estudo, o desfecho clínico satisfatório é possível por meio da ativação de linfócitos T e B regulatórios (Treg e Breg) – capazes de suprimir a resposta imune, macrófagos alternativamente ativados e equilíbrio entre os perfis Th17 (patológico) e Treg.

(MAJLESSI et al., 2008; SAKAGUCHI et al., 2006). Por mecanismos não completamente elucidados, alguns indivíduos, são incapazes de realizar a regulação da resposta Th2, o que promove intensa deposição de colágeno no tecido em que se encontra o granuloma, e conseqüentemente alterações funcionais no mesmo (REIMAN et al., 2006).

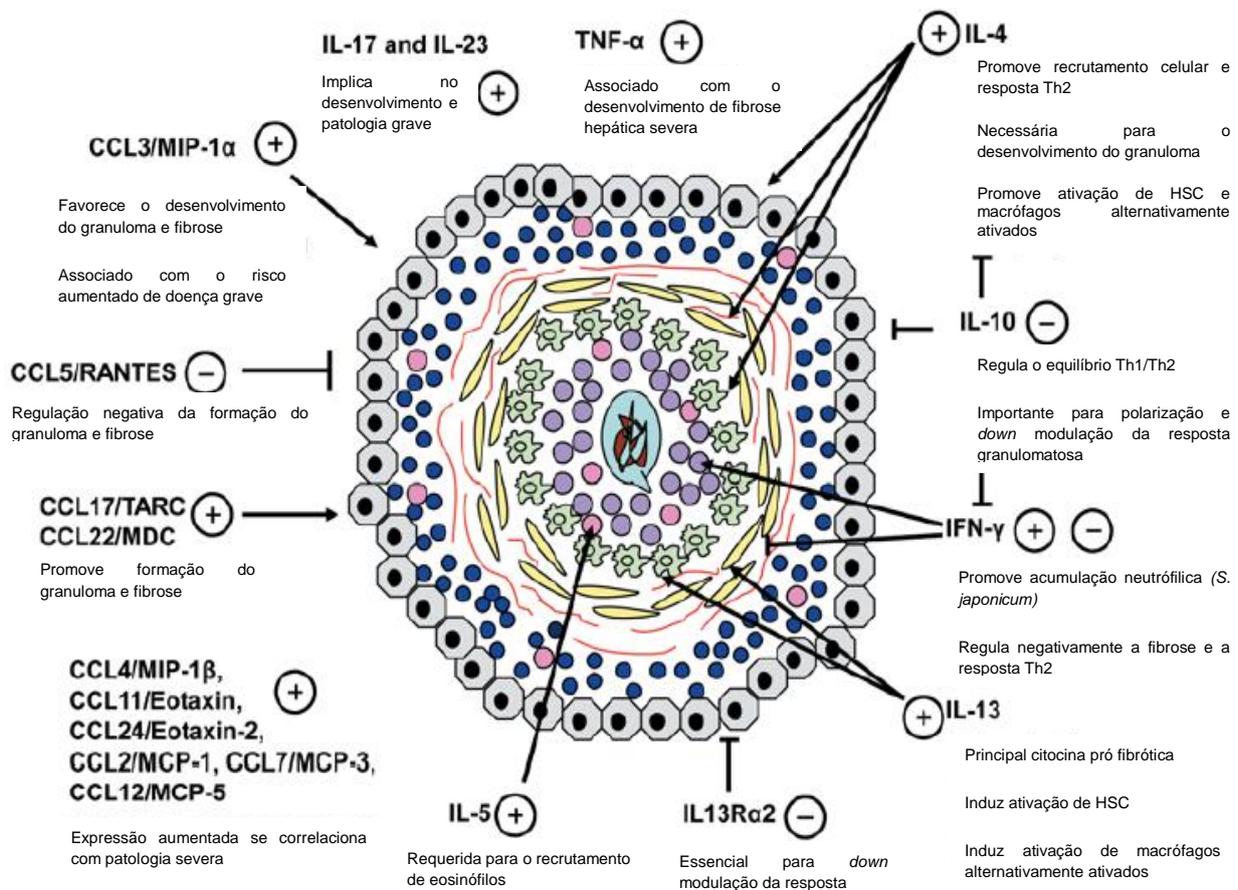


**Figura 5: Resposta celular desenvolvida pelo hospedeiro definitivo após infecção por *Schistosoma mansoni*.** Após a infecção, primeiramente se desenvolve uma resposta Th1, com secreção de mediadores inflamatórios, como, NO, TNF e IFN- $\gamma$ . O amadurecimento do verme e a oviposição incitam o surgimento de um perfil celular Th2, no qual células dendríticas e *natural killer* são estimuladas a reduzir a secreção de IL-12 e aumentar IL-10. O perfil regulatório se faz presente, mediante células T regulatórias e macrófagos alternativamente ativados, a fim de controlar a forte resposta Th2, capaz de provocar fibrose tecidual. **Fonte:** Adaptado de DUNNE & COOKE, 2005.

## 1.5 REGULAÇÃO IMUNOLÓGICA NA PATOGÊNESE E MORBIDADE

As evidências apontam que os ovos são a forma evolutiva responsável pela morbidade na esquistossomose - e não a forma adulta do verme – uma vez que boa parte não é excretada e permanece nos intestinos ou fígado no caso de *S.mansoni* e *S.japonicum*, ou na bexiga e sistema urogenital, para *S.haematobium*. Os ovos suscitam uma intensa resposta imune dependente de células TCD4<sup>+</sup> (MAJLESSI et al., 2008), com formação de granulomas caracterizados por linfócitos produtores de citocinas do tipo Th2, como IL-4, IL-5 e IL-13, assim também por eosinófilos e macrófagos alternativamente ativados. Estas e outras quimiocinas regulam a reação granulomatosa de forma singular (**Figura 6**).

Na maioria dos indivíduos a resposta ao granuloma é regulada de modo que a doença evolua para a forma intestinal (para *S.mansoni* e *S.japonicum*), com manifestações inespecíficas como dor abdominal intermitente, diarreia e sangramento retal de acordo com a intensidade da infecção (COLLEY et al., 2014). Contudo, em algumas pessoas o sistema imune responde de maneira peculiar aos antígenos do ovo, permitindo o depósito de colágeno no sistema periportal, que pode levar à obstrução progressiva do fluxo sanguíneo, hipertensão portal e por fim, varizes e sangramentos. Por essa razão manifesta-se uma extensa fibrose hepatoesplênica, quase sempre com evolução para fibrose periportal (GRAY et al., 2011). Nesse caso, as características clínicas incluem desconforto abdominal superior com nódulo hepatoesplênico palpável e duro, comumente associado à esplenomegalia. Ascite e hematêmese são graves complicações da hipertensão periportal que podem ser fatais. O tempo decorrido entre a infecção inicial até a fibrose avançada varia entre 5 e 15 anos. Todavia, crianças a partir de 6 anos estão sujeitas a fibrose periportal, salientando a necessidade de rastreamento e tratamento de crianças em idade pré-escolar (COLLEY et al., 2014).



**Figura 6. Principais componentes envolvidos na resposta granulomatosa aos ovos de *S. mansoni* e *S. japonicum* no fígado do hospedeiro.** Citocinas e quimiocinas essenciais na regulação imunológica em resposta ao granuloma. Legenda: ovo, neutrófilo, eosinófilo, macrófago, fibroblastos, células estreladas hepáticas, fibras colágenas, células T CD4<sup>+</sup>, células B e hepatócitos. **Fonte:** Adaptado de: BURKE et al., 2009.

Especialmente IFN- $\gamma$  secretado por macrófagos alternativamente ativados e IL-10 fazem parte do *dowregulation* da resposta Th2, para limitar a inflamação granulomatosa inicial que atinge o seu tamanho e intensidade após cerca de 8 semanas de infecção por *S.mansoni* (COLLEY & SECOR, 2014). Entretanto, a produção crônica e não regulada de citocinas Th2 conduz eventualmente à fibrose patológica, causa funcional da doença hepatoesplênica (REIMAN et al., 2006).

Simultaneamente ocorre mastocitose, eosinofilia e produção de anticorpos IgE (FITZSIMMONS, FALCONE, DUNNE, 2014). A produção dessa subclasse contra antígenos de vermes adultos tem sido relacionada com resistência a reinfeção; estas respostas tendem a aumentar com a idade e após o tratamento quimioterápico em regiões endêmicas. Além disso, a IgE possui efeitos

imunomoduladores importantes sobre células reguladoras e citocinas capazes de limitar a morbidade da infecção (DUNNE et al., 1997; SCHRAMM & HAAS, 2010).

Já é bem estabelecido que a IL-4 funciona como um “gatilho” da fibrose, posto que a IL-13 atua como principal mediadora e a IL-5 é responsável principalmente pela expansão de eosinófilos – tipo celular predominante no granuloma - a nível medular e sua sobrevivência na periferia. Os eosinófilos por sua vez são importante fonte dessas citocinas (REIMAN et al., 2006). Além da IL-5, citocinas como IL-3, GM-CSF, IL-33 e IFN- $\gamma$  são capazes de aumentar a sobrevivência dos eosinófilos nos tecidos (STONE et al., 2010).

REIMAN e cols. (2006) demonstraram que a deleção de IL-13 e IL-4 inibiu a formação do granuloma em animais infectados, enquanto que a deficiência apenas de IL-13 bloqueou de maneira significativa a fibrose hepática, além de aumentar a sobrevida nas infecções crônicas. Os camundongos *knocaut* para IL-5/eosinófilos produziram mais IFN- $\gamma$ , o que sugere capacidade reduzida de desenvolver uma resposta polarizada Th2; assim como naqueles desprovidos apenas de IL-5, houve uma remoção de quase 100% dos eosinófilos do granuloma, além de redução do tamanho e da fibrose. Tais resultados comprovam o papel dos eosinófilos e da IL-5 na pró-fibrose.

O TNF- $\alpha$  parece prefigurar um papel crucial na geração e continuidade do granuloma induzido pelo ovo (WILLE et al., 2004), sendo que a modulação com redução de área do granuloma foi associada à redução focal e sistêmica desta citocina (HAWRYLOWICZ & O' GARRA, 2005). Ademais, essa citocina é liberada por hepatócitos lesionados – principalmente àqueles próximos ao granuloma, o que estimula a inflamação de modo persistente através da secreção de outras citocinas. (RIMKUNAS et al., 2009). Dessa maneira, o TNF- $\alpha$  atua como uma citocina pró inflamatória e pró fibrótica (RAMADAN et al., 2013) na esquistossomose.

Jankovic e cols. (1998) investigaram o papel das células B na esquistossomose e notaram uma redução acentuada na sobrevida de animais desprovidos de dessas células durante a fase crônica da infecção. Assim como, observaram aumento da patologia no fígado nos camundongos deficientes de células B, como também nos deficientes no receptor *Fc*, indicando que os anticorpos estão envolvidos no controle do granuloma associado ao ovo. De importância a infecção por *S.mansoni* está associada ao crescimento e recrutamento de células B1 CD5<sup>+</sup> (células Breg) para a cavidade peritoneal nas primeiras 5 semanas de

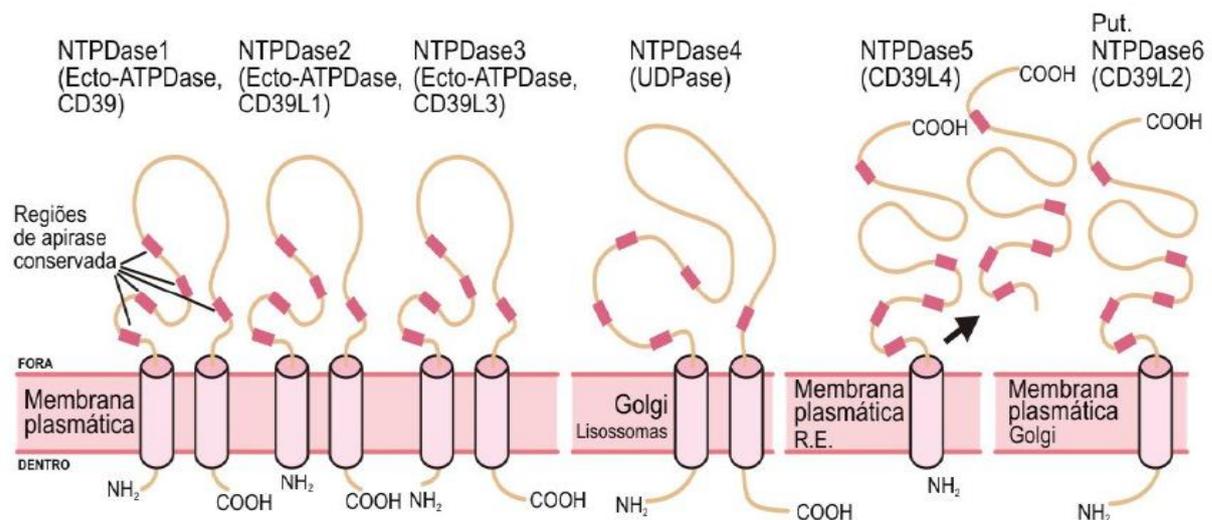
infecção. Tais células possuem efeito regulatório através da produção de IL-10 e também são capazes de produzir IgM independente de células T (MAJLESSI et al., 2008).

Al-Qaoud et al., (1998) observaram que a susceptibilidade à infecção foi associado à redução de IL-10 e respostas de anticorpos. Mais recentemente, Mangan et al., (2004) demonstraram que a transferência de células Breg induzidas após infecção por *S.mansoni* foram capazes de proteger camundongos de modelo experimental de anafilaxia, não deficientes de IL-10, salientando o papel imunomodulatório das células B.

Murinos C57BL/6 com esquistossomose mansônica grave, apresentaram porcentagens expressivas de células Th17 no baço, granulomas e sangue periférico. Neste último, o ambiente inflamatório da IL-17 observado retrata o quadro imunopatológico observado no tecido. Embora o aumento de células Th17 e Treg na periferia seja relatado de forma recíproca, a expansão de células Th17 pode ocorrer sem diminuição de Treg, esclarecendo a observação de que o número aumentado de células Th17 não é necessariamente acompanhado por um nível reduzido de Tregs, como encontrado no estudo de MOUSTAPHA et al., 2013.

## 1.6 NTPDases ANTIGÊNICAS

Amplamente distribuídas entre organismos distintos as nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (NTPDases) são enzimas de superfície celular nucleotídeo-específicas, que hidrolisam nucleotídeos di e trifosfatados. Com atividade catalítica dependente de íons divalentes como cálcio e magnésio, são a principal via de comunicação entre células (ZIMMERMANN et al., 2012). Os integrantes desta superfamília compartilham cinco regiões conservadas de apirase - ACR1 a ACR5 (**Figura 7**), que confere identidade ao grupo e supostamente estão envolvidas no ciclo catalítico. Bem como, incluem isoformas solúveis ou associadas à membrana no mesmo organismo (HANDA & GUIDOTTI 1996; DETONI et al., 2013.; MAIA et al., 2013).



**Figura 7. Topografia de membrana prevista e propriedades catalíticas da família NTPDases de mamíferos.** Todos os membros da família compartilham cinco domínios de sequência altamente conservados (“regiões conservadas em apirase” - ACR1 a ACR5), que provavelmente participam do sítio catalítico. As NTPDases 1 a 4 possuem um domínio transmembrana nas porções carbóxi e amino terminal (N-terminal e C-terminal). As NTPDases 5 e 6, possuem apenas domínio transmembrana na porção N-terminal, sendo que essa sequência é clivada, resultando numa forma solúvel e segregada da enzima. **Fonte:** Adaptado de ZIMMERMANN 2000).

As isoformas de NTPDases são antigênicas na toxoplasmose (BERMUDES, 1994; ASAI et al.; 1992; KIKUCHI et al., 2001, 2002; TAN et al., 2010, 2011), leishmaniose cutânea americana (FARIA-PINTO et al., 2008; REZENDE-SOARES et al., 2010) e leishmaniose visceral (MAIA et al., 2013). Também em *Schistosoma mansoni*, duas isoformas foram identificadas e descritas – SmATPase

1 e SmATPase 2 – no tegumento do verme adulto (VASCONCELOS et al 1993; VASCONCELOS et al 1996) e em ovos do parasito (FARIA-PINTO et al 2004, 2008, 2010a,b). Ambas as enzimas possuem massa molecular aproximada de 63KDa, divergindo na solubilidade em detergentes, ponto isoelétrico e razão da atividade ATPásica/ADPásica (VASCONCELOS et al 1993, 1996; FARIA-PINTO et al., 2004). Acredita-se que a expressão destas enzimas possa debilitar processos inflamatórios e imunes do hospedeiro em resposta à infecção (SUMMERS et al., 2017).

A SmATPase 1 encontra-se principalmente na superfície externa do tegumento do verme e provavelmente está relacionada à evasão do parasito do sistema de hemostasia do hospedeiro, reduzindo a agregação plaquetária induzida por ADP (DeMARCO et al., 2003), além disso, tem a capacidade de modificar a concentração de nucleotídeos do microambiente do verme, sendo considerada um fator de virulência para *S.mansoni* (WILSON, 2012).

Já a SmATPase 2 está situada em algumas células internas do tegumento do verme. Presumivelmente, é produzida e excretada ao exterior, podendo ter relação direta com a inibição da agregação plaquetária (LEVANO-GARCIA et al., 2007).

Em plantas essas enzimas possuem funções no crescimento e papéis na simbiose durante a nodulação (SUMMERS et al., 2017). A apirase de batata – NTPDase de *Solanum tuberosum* - e os anticorpos produzidos contra a mesma demonstraram propriedades imunoestimulantes consideráveis com ativação de resposta imune humoral em camundongos. Inóculo da proteína vegetal pura em camundongos BALB/c promoveu aumento dos níveis de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-pairase específicos, sugerindo que a mesma possui epítomos capazes de estimular a resposta celular (FARIA PINTO et al., 2010b).

Foi demonstrada forte imunorreatividade cruzada entre anticorpos policlonais com isoformas de *S.mansoni* parcialmente purificadas e apirase de batata, sugerindo um compartilhamento dos epítomos conservados entre das proteínas do parasita e a proteína vegetal (VASCONCELOS et al., 2009; FARIA-PINTO et al 2004, 2008, 2010).

Estudos certificaram elevada identidade entre apirase de batata e as isoformas de *S.mansoni*, sendo a maior delas com a SmATPase 1 (26% de identidade) (FARIA-PINTO et al., 2008; VASCONCELOS et al., 2009). A microscopia confocal evidenciou forte marcação da superfície externa do embrião de ovos do

parasita utilizando anticorpos policlonais de coelho anti-apirase específicos, que provavelmente se ligaram a uma isoforma de ATP difosfohidrolase associada à membrana. Mesma marcação foi observada na superfície externa do ovo, o que sugere a presença de uma isoforma solúvel e secretada (FARIA-PINTO et al., 2004, 2006).

Testes *in vitro* atestaram um perfil de citocinas Th2 e níveis elevados de anticorpos específicos anti-ATP difosfohidrolase, após estimulação de linfócitos esplênicos. Tais fatos sugerem que a proteína do parasita pode estar envolvida na resposta imune do hospedeiro durante o curso de infecção (JACINTO et al., 2001; FARIA-PINTO et al., 2004).

Dados anteriores do nosso grupo mostraram significativa redução das áreas de granulomas hepáticos por parte de camundongos *Swiss* imunizados com a apirase de batata e infectados com *S.mansoni*, caracterizada por redução do infiltrado celular e consequente substituição por fibras colágenas (SOARES, 2012).

Assim sendo, dada a homologia existente entre as SmATPases e a apirase de batata, uma vez que ambas são capazes de ativar o sistema imune do hospedeiro, neste estudo investigamos o potencial efeito imunomodulatório da proteína vegetal, na infecção por *S.mansoni* associada ao PZQ subcurativo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade modulatória da proteína vegetal de *Solanum tuberosum* – apirase de batata – associada ao praziquantel subterapêutico sobre a resposta imune da esquistossomose experimental.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Purificar a proteína vegetal de *Solanum tuberosum* a ser empregada no protocolo experimental;
- Avaliar a resposta humoral através dos níveis de IgG, IgG1, IgG2a e IgE por ELISA, promovida pela sensibilização com apirase de batata e tratamento subterapêutico com PZQ;
- Analisar a resposta celular em murinos, obtida após sensibilização com apirase de batata e tratamento com PZQ subcurativo, por meio do número de linfócitos CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> na população de células do baço, bem como os níveis de IFN- $\gamma$  e IL-17, no sobrenadante;
- Verificar a reatividade cruzada entre *SWAP* e a resposta imune de camundongos submetidos à sensibilização com apirase de batata e tratamento subcurativo com PZQ;
- Averiguar o potencial imunogênico da apirase de batata no protocolo experimental de esquistossomose junto ao tratamento subterapêutico com PZQ por meio dos níveis de anticorpos, citocinas IL-17 e IFN- $\gamma$ , contagem de vermes e análise quantitativa de granulomas hepáticos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 LOCAL DE PESQUISA E ASPECTOS ÉTICOS

O estudo laboratorial experimental de caráter quali-quantitativo foi realizado no Biotério de Experimentação do Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz/MG, que forneceu camundongos machos C57BL/6 após aprovação da Comissão de Ética local nº **P-3/2018-2**, em parceria com os Laboratórios de Estrutura e Função de Proteínas, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Juiz de Fora e também com o Centro de Tecnologia Celular e Imunologia Aplicada (IMUNOCET), na mesma universidade, que forneceu camundongos machos Balb/c sob a aprovação do protocolo de número **042/2017** (ANEXO A).

#### 3.2 REAGENTES

Todos os reagentes utilizados neste trabalho possuem alto grau de pureza e foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis. MO, USA), Merk (Rio de Janeiro, Brasil) e Reagen (Rio de Janeiro, Brasil). As soluções foram preparadas utilizando água deionizada obtidas por resina de troca iônica no deionizador Permutation. Anticorpos anti-IgG, anti-IgG1, anti-IgG2a e anti-IgE de camundongos conjugados à peroxidase foram obtidos da Bethyl Laboratories Inc.(São Paulo, SP, Brazil). Marcador de peso molecular pré-corado e membranas de nitrocelulose foram obtidos da GE Healthcare (São Paulo, Brasil). Os anticorpos monoclonais mAbs (FITC/PE/PerCy5) foram obtidos da BD Biosciences (EUA): anti-CD3<sup>+</sup>, anti-CD4<sup>+</sup> e anti-CD8<sup>+</sup>.

### 3.3 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA VEGETAL DE *SOLANUM TUBEROSUM*

A purificação da apirase de batata *S.tuberosum*, foi realizada por adaptação do método precedentemente descrito (TRAVERSO-CORI; CHAIMOVICH; CORI, 1965). Batatas de origem comercial, da variedade *Asterix*, foram trituradas a 4°C com ácido tioglicólico 10mM a fim de inibir as tirosinases. O extrato bruto foi filtrado e submetido à centrifugação em 11860g por 15 minutos para remoção do amido. Na etapa seguinte as proteínas em solução foram lentamente precipitadas com sulfato de amônio até saturação de 40%. O precipitado foi descartado e adicionado sulfato de amônio até 70% de saturação. A solução foi novamente agitada e centrifugada. O precipitado foi ressuspendido em ácido tioglicólico 10 mM em volume correspondente a 10, 2 e 0,5% do extrato bruto a cada ciclo respectivamente. Cada centrifugação foi realizada a 11860g por 10 min. A amostra obtida foi aplicada em coluna de filtração em gel Sephadex G-25 (2,4 x 20 cm), seguidamente Sephadex G-100 (2,4 x 50 cm), e como etapa final coluna de troca iônica (carboximetilcelulose - 2,4 X 10 cm), seguida de diálise para eliminação do excesso de sal. Os picos de proteína extraídas das colunas foram determinados por densidade óptica a 280nm e atividade ATPásica e ADPásica pelo Método de Taussky e Shorr (1953). O rendimento da purificação foi averiguado por dosagem de proteínas (LOWRY et al., 1951), atividade enzimática, eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% e 0,1% de dodecil sulfato de sódio (LEMMLI, 1970), seguida pela coloração de azul de *Comassie blue*.

### 3.4 PREPARAÇÃO DE ANTÍGENOS SOLÚVEIS DO VERME ADULTO (SWAP)

Os antígenos solúveis de vermes adultos (SWAP), foram obtidos pela manutenção do ciclo biológico de *S.mansoni* mantido no Laboratório de Esquistossomose do CPqRR através da técnica de Colley e cols (1977) com adaptações. Camundongos *Swiss* infectados com 150 cercárias via subcutânea foram eutanasiados após 45 dias e os vermes adultos obtidos por perfusão (PELLEGRINO & SIQUEIRA, 1956; SMITHERS & TERRY, 1965). Os vermes foram homogeneizados em tampão Tris – HCl 50 mM, pH 7,4, com sacarose 8% e inibidores de protease leupeptina (0,5µg/mL), pepstatina (0,07µg/mL), inibidor de tripsina (50 µg/mL) e fluoreto de fenilmetilsufonil (2µg/mL), rompidos através de

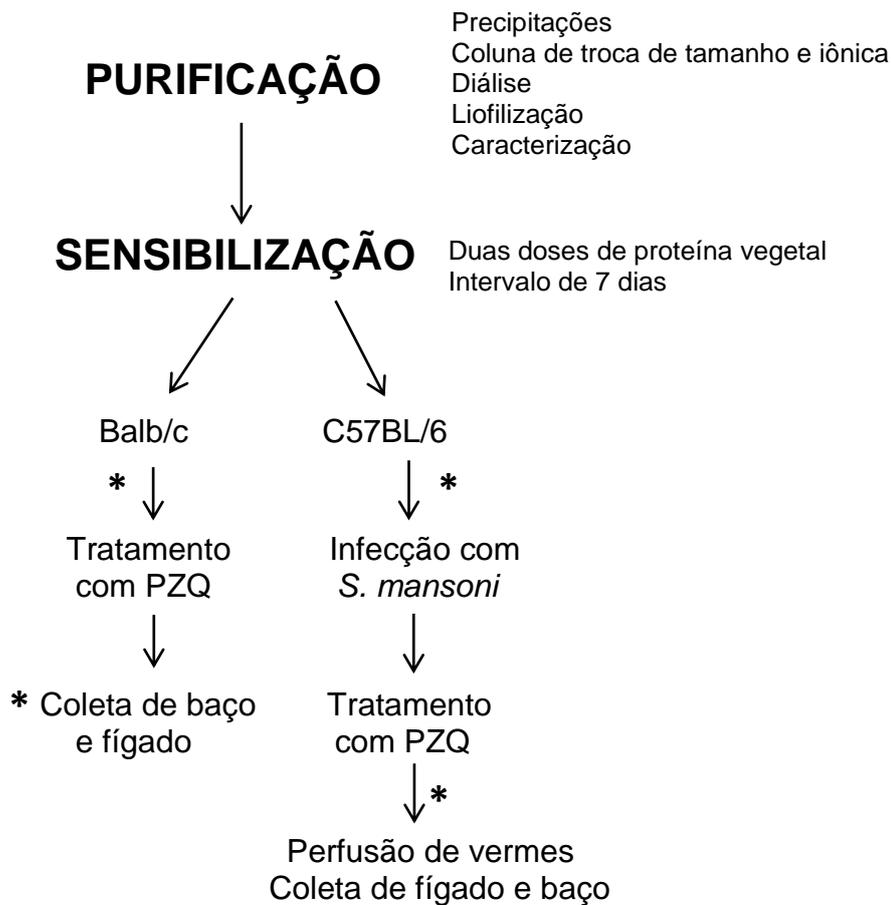
ciclos de 10 minutos em banho ultrassônico e banho de gelo alternadamente e submetidos a ciclos de ruptura de tecido por homogeneizações em Potter por 30 segundos, com 60 segundos de intervalo entre elas, até extração de todo material solúvel. Em seguida o material foi centrifugado por 1h a 75 000g para obtenção do *SWAP* - sobrenadante. A concentração de proteínas foi determinada utilizando protocolo de Lowry (LOWRY et al., 1951), utilizando albumina bovina como padrão. Estas preparações foram estocadas à - 20°C para utilização como antígeno no ELISA e estímulo na cultura de esplenócitos.

### 3.5 CAMUNDONGOS E PARASITAS

As cercárias de *S.mansoni* (cepa LE) preservadas rotineiramente no Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz/MG em moluscos *B.glabrata* foram obtidas por exposição dos caramujos à luz artificial por 1 a 2h para induzir a saída das cercárias. O número de cercárias e sua viabilidade foram determinados por microscopia óptica. No protocolo experimental foram utilizados camundongos machos das linhagens C57BL/6 e Balb/c entre 6 a 8 semanas, sendo um total de 25 animais por linhagem. As condições de acesso à água e ração foram *ad libitum*.

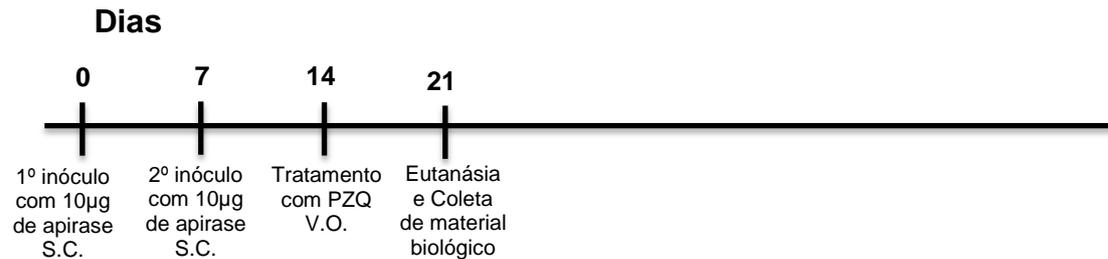
### 3.6 ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE À APIRASE DE BATATA ASSOCIADA AO PRAZICUANTEL EM CAMUNDONGOS Balb/c

A **Figura 8** representa o diagrama geral do estudo. A avaliação da resposta imune à apirase de batata junto ao PZQ subcurativo se deu através de duas sensibilizações com inóculos via subcutânea de 10µg da proteína adsorvida em 250µg de gel coloidal de hidróxido de alumínio Al(OH)<sub>3</sub> (alúmen), com intervalo de 7 dias e após o mesmo intervalo realizado tratamento com 200mg/Kg de PZQ. Camundongos Balb/c, que foram divididos em grupos (n=5): controle (salina), praziquantel (tratados com PZQ), apirase (sensibilizados com apirase de batata), apirase/PZQ (sensibilizados com apirase de batata e tratados com PZQ), adjuvante (sensibilizados com alúmen), todos com o mesmo intervalo de dose descrito (**Figura 9 e Tabela 1**).



**Figura 8: Esquema geral do trabalho.** A proteína vegetal foi purificada através de precipitações com sulfato de amônio, colunas de separação de gel de tamanho e troca iônica. Em seguida a apirase de batata passou por diálise para eliminação do excesso de sal, e posteriormente por caracterização via Eletroforese. Em seguida, duas doses de 10µg cada da proteína foram inoculados em camundongos Balb/c – para avaliação da resposta à apirase junto ao PZQ subcurativo – e em murinos C57BL/6 para verificação da imunização com apirase frente à esquistossomose mansônica, associada ao PZQ subterapêutico. \*Momentos de avaliação da resposta humoral.

Coletas de sangue foram realizadas na veia submandibular com auxílio de uma lanceta para avaliação da resposta humoral nos dias 14 e 21. Aos 21 dias de experimento os camundongos foram eutanasiados com tiopental (150mg/Kg) via intraperitoneal. O fígado e o baço foram coletados para análise histológica e cultura de células, respectivamente.



**Figura 9. Protocolo de avaliação da resposta imune à apirase.** Os camundongos Balb/c foram divididos em 5 grupos experimentais (n=5). Os grupos apirase e apirase/PZQ receberam duas doses de 10µg da proteína vegetal com 250µg de adjuvante (hidróxido de alumínio) no intervalo de 7 dias por via subcutânea (S.C). Os grupos controle e PZQ receberam salina. O grupo adjuvante foi sensibilizado apenas com alúmen. Seguidos 7 dias os grupos PZQ e apirase/PZQ foram tratados com dose subterapêutica única de praziquantel – 200mg/Kg por via oral (V.O).A resposta humoral foi avaliada após as sensibilizações e tratamento.

**Tabela 1. Distribuição dos grupos experimentais de camundongos Balb/c e os respectivos esquemas de sensibilização e tratamento realizados em cada grupo.** A resposta imune à apirase de batata junto ao PZQ subcurativo foi avaliada em camundongos Balb/c. Duas sensibilizações com inóculos via subcutânea de 10µg da proteína adsorvida em 250µg de gel coloidal de hidróxido de alumínio Al(OH)<sub>3</sub> (alúmen) foram realizadas no intervalo de 7 dias e decorridos mais 7 dias foi realizado tratamento com 200mg/Kg de PZQ. Os animais foram divididos em grupos (n=5): controle (salina), praziquantel (tratados com PZQ), apirase (sensibilizados com apirase de batata), apirase/PZQ (sensibilizados com apirase de batata e tratados com PZQ), adjuvante (sensibilizados com alúmen), todos com o mesmo intervalo de dose anteriormente descrito.

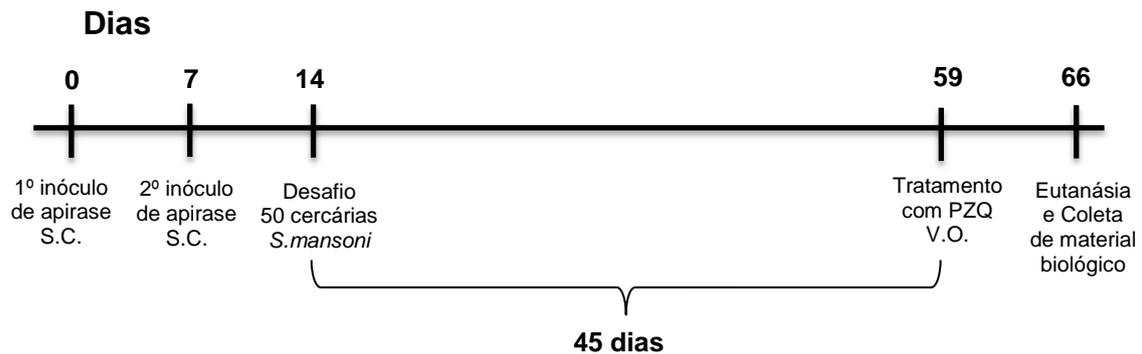
<b>GRUPOS EXPERIMENTAIS - CAMUNDONGOS Balb/c</b>			
<b>Grupos</b>	<b>n experimental</b>	<b>n examinado</b>	<b>Intervenção</b>
<b>Controle</b>	5	5	Salina
<b>PZQ</b>	5	5	Tratamento com PZQ
<b>Apirase</b>	5	5	Sensibilização com apirase/adjuvante
<b>Apirase/PZQ</b>	5	5	Sensibilização com apirase/adjuvante e tratamento com PZQ
<b>Adjuvante</b>	5	5	Sensibilização com adjuvante

### 3.7 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOLÓGICO DA APIRASE DE BATATA ALIADA AO PRAZIQUANTEL SUBTERAPÊUTICO SOBRE A ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA EXPERIMENTAL

No sentido de investigar a eventual sensibilização da apirase de batata associado ao tratamento subcurativo com praziquantel, camundongos C57BL/6 (n=5) passaram pelo mesmo protocolo de sensibilização descrito para murinos Balb/c, com as mesmas divisões de grupo e doses de proteína vegetal e adjuvante (**Figura 10 e Tabela 2**). Decorridos 7 dias da última sensibilização, os animais foram submetidos à infecção bissexual por exposição percutânea da pele abdominal durante 1h em água contendo 50 cercárias de *S.mansoni* (estirpe LE) conforme descrito por Smithers & Terry (1965). Os camundongos foram anestesiados com Ketamina (90mg/Kg) e (Xilazina 10mg/Kg) e um anel metálico de 2,5cm de diâmetro foi fixado no abdômen - previamente tricotomizado – onde a solução contendo as cercárias permaneceu por 1h. Em seguida, a solução foi recolhida a fim de verificar a ausência desta forma evolutiva.

Após 45 dias da infecção procedeu-se o tratamento com 200mg/Kg (dose subterapêutica) de praziquantel dose única V.O., sendo o PZQ solubilizado em água filtrada e administrado um volume máximo de 200µL conforme peso dos camundongos. A resposta humoral foi avaliada nos dias 7 e 66, por meio do sangue coletado na veia submandibular com auxílio de uma lanceta.

Depois de 7 dias do tratamento os camundongos foram eutanasiados com tiopental (150mg/Kg) via intraperitoneal. O fígado e o baço foram coletados para análise histológica e cultura de células, respectivamente.



**Figura 10. Protocolo de avaliação do potencial imunológico da apirase de batata junto ao praziquantel subcurativo sobre a esquistossomose murina.** Os camundongos C57BL/6 foram divididos em 5 grupos experimentais (n=5). Os grupos apirase e apirase/PZQ receberam duas doses de 10µg da proteína vegetal com 250µg de adjuvante (hidróxido de alumínio) no intervalo de 7 dias por via subcutânea (S.C). Os grupos controle e PZQ receberam salina. Seguidos 7 dias os animais foram sujeitos à infecção experimental percutânea com 50 cercárias de *S.mansoni*. Após 45 dias os camundongos receberam tratamento subterapêutico de PZQ em dose única de 200mg/Kg por via oral (V.O). Seguidos 7 dias os animais foram eutanasiados para coleta de material biológico.

**Tabela 2. Disposição dos camundongos C57BL/6 em cinco grupos experimentais e seus respectivos esquemas de sensibilização realizados.** Murinos C57BL/6 foram divididos em grupos (n=5): **controle** (salina e infecção), **adjuvante** (sensibilização com alúmen e infecção), **praziquantel** (infecção e tratamento), **apirase/PZQ** (sensibilização com apirase de batata, infecção e tratamento), **apirase** (sensibilização com apirase de batata e infecção). Para sensibilização dos grupos apirase e apirase/PZQ, 10µg de apirase de batata adsorvida em 250µg de alúmen foram realizadas em duas doses subcutâneas. Após 7 dias todos os grupos foram infectados com 50 cercárias de *S.mansoni* e decorridos 45 dias os grupos apirase/PZQ e PZQ foram tratados com dose subterapêutica de praziquantel (200mg/Kg via oral).

<b>CAMUNDONGOS C57BL/6</b>			
<b>Grupos</b>	<b>n experimental</b>	<b>n examinado</b>	<b>Intervenção</b>
<b>Controle</b>	5	3	Salina
<b>Adjuvante</b>	5	3	Sensibilização com adjuvante
<b>PZQ</b>	5	2	Tratamento com PZQ
<b>Apirase/PZQ</b>	5	3	Sensibilização com apirase/adjuvante e tratamento com PZQ
<b>Apirase</b>	5	3	Sensibilização com apirase/adjuvante

### 3.8 AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO CONTRA INFECÇÃO POR *S.mansoni* APÓS SENSIBILIZAÇÃO COM APIRASE DE BATATA E TRATAMENTO SUBCURATIVO COM PRAZIQUANTEL

Camundongos C57BL/6, submetidos ao protocolo de sensibilização e esquistossomose experimental receberam após 7 dias a quimioterapia com praziquantel, em seguida foram eutanasiados com tiopental (150mg/Kg) via intraperitoneal e os vermes adultos perfundidos com solução salina adicionada de 500 UI/L de heparina a partir do sistema portal e mesentérico, como descrito por Pellegrino e Siqueira (1956), para avaliação do nível de proteção. Os vermes recuperados foram contados manualmente. Fragmentos do lobo direito do fígado foram coletados para análise da presença de granuloma neste órgão. O baço foi coletado para isolamento e cultura dos esplenócitos para análise da resposta celular.

### 3.9 QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-APIRASE DE BATATA E ANTI-SWAP ESPECÍFICOS POR ELISA

A dosagem dos níveis de IgG, IgG1, IgG2a e IgE anti-apirase e anti-SWAP específicos foi realizada nas amostras de soro dos camundongos coletadas durante os experimentos, utilizando o método de ELISA indireto. A apirase de batata purificada e o SWAP na concentração de 1µg/mL foram empregados como antígenos em experimentos diferentes. Os antígenos foram solubilizados em tampão bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub> 0,1M, pH 9,6) e adsorvidos em placas de microdiluição (COSTAR®) incubados a 4°C *overnight*. No dia seguinte, as placas foram bloqueadas por 1h com solução de Molico® 0,3%. Em seguida soros dos camundongos Balb/c e C57BL/6 diluídos 1:100 foram adicionados e incubados por 1h a temperatura ambiente. Foi utilizada ureia por 1h a 0,1M (para Balb/c) e 0,5M (C57BL/6) como agente caotrópico também por 1h. Sucessivamente os anticorpos secundários de camundongos foram adicionados com tempo de reação de 1h. Os anticorpos IgG, IgG1 e IgE foram empregados na diluição de 1:20 000 e IgG2a a 1:1000. A cada etapa foram realizadas 3 lavagens com PBS (Tampão Fosfato-Salino pH 7,2) acrescido de Tween 20 a 0,05% (PBST) e uma lavagem apenas com PBS. Ao final as reações foram reveladas com o-fenilenodiamina (OPD) e água oxigenada, previamente diluída em tampão citrato. Ácido sulfúrico 4N foi utilizado

como agente de parada da reação. As leituras foram realizadas a 492nm em um leitor de ELISA (Molecular Devices Corp., Melon Park, CA, USA). Os experimentos foram realizados em duplicata.

### 3.10 CITOMETRIA DE FLUXO

Citometria de fluxo de esplenócitos foi utilizada para identificar linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Os anticorpos monoclonais mAbs (FITC/PE/PerCy5) foram obtidos da BD Biosciences (EUA): anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8. Após a remoção e maceração do baço, as células foram contadas na Câmara de Neubauer e plaqueadas a  $1 \times 10^6$  por poço. Seguidas 48h e 72h, o sobrenadante das células foi coletado após centrifugação e as células ressuspendidas em tampão PBS acrescido de 1% de SF bovino. A suspensão de células foi transferida para uma placa de fundo "U" e centrifugada a 1200rpm/10min/4°C. O sobrenadante foi parcialmente retirado e as marcações realizadas conforme orientações do fabricante. Ao término das marcações, as células foram ressuspendidas em 150µL PBS + 1% SF bovino, transferidas para tubos de ensaio. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo FACScanto II (Becton & Dickinson), onde 30 000 eventos foram adquiridos. Os resultados foram analisados no *Software Flowjo*.

### 3.11 CULTURA DE ESPLÊNÓCITOS E ANÁLISE DE CITOCINAS

Após eutanásia dos camundongos Balb/c e C57BL/6, o baço foi retirado e acondicionado em aproximadamente 3mL de tampão fosfato-salino pH 7,2 (PBS). Em seguida foi transferido para uma placa de Petri estéril e macerado com auxílio de uma peneira de aço e duas pinças cirúrgicas. O macerado teve o volume completado para 30 mL de PBS e encaminhado para centrifugação a 1200rpm por 10 minutos a 4°C. A seguir, o sobrenadante foi descartado e adicionado 2mL de tampão de lise cloreto de amônio potássico (ACK - para lisar as hemácias) por 5 minutos. O volume foi completado para 30mL com meio de cultura celular *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI), a fim de parar a reação de lise. A solução foi novamente centrifugada. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 2mL de meio RPMI completo (10% SFB, 1% antibiótico) e

passadas pelo *cell strainer*. Após contagem na câmara de Neubauer e diluição, as células foram plaqueadas com  $1 \times 10^6$  (Balb/c) e  $1 \times 10^5$  (C57BL/6) células/poço em placa de 96 poços (Prolab®), juntamente com os respectivos estímulos: lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* 1µg/mL (Sigma-Aldrich), concanavalina 5µg/mL (Sigma-Aldrich), antígenos solúveis do verme adulto (SWAP) 5µg/mL ou apirase de batata 5µg/mL, sendo o meio RPMI completo (10% SFB, 1% antibiótico) o controle. Os esplenócitos foram incubados a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>. Alíquotas de sobrenadante foram recolhidas após 48 e 72h de cultura para análise de citocinas. Os níveis de IFN-γ e IL-17 foram mensurados nos sobrenadante por ELISA utilizando *kit* da eBioscience e BioLegend de acordo com as especificações do fabricante, respectivamente.

### 3.12 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DOS GRANULOMAS HEPÁTICOS

Fragmentos do fígado foram fixados em solução de formol a 10% tamponado de PBS, pH 7,4 para estudo histológico. Após sucessivas lavagens com etanol a 70% para completa remoção do fixador, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol a partir de 70% até álcool absoluto. Após essa etapa, as amostras foram diafanizadas em xilol e impregnadas em parafina histológica fundida a 60 °C. Posteriormente, foram incluídas em parafina, cortadas em micrótomo obtendo-se cortes de 5µm de espessura. Os cortes destinados ao estudo histológico foram corados pela hematoxilina-eosina (HE).

Foram medidos os diâmetros dos granulomas viáveis encontrados em dez campos aleatórios para cada animal (n=5) em cada grupo. Granulomas contendo um único ovo central, encontrados nas lâminas de cada animal infectado foram examinados. As análises foram realizadas em microscópio Primo Star Zeiss, câmera Axicam ERc5s, em objetiva de 10x/0.25 (Plam-ACHROMAT).

### 3.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados alcançados foram submetidos à análise de variância ANOVA e *Dunnett ou Tukey* como pós-teste no *software GraphPad Prism* versão 5.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA) e também à análise de variância ANOVA com pós teste *SNK - Student-Newman-Keuls* no *software Sisvar* versão 5.6 (Build 86) a fim de se comparar as intervenções de sensibilização e/ou tratamento ao controle não sensibilizado e não tratado, quando submetidos ou não à infecção por *S.mansoni* (C57BL/6 e Balb/c, respectivamente).

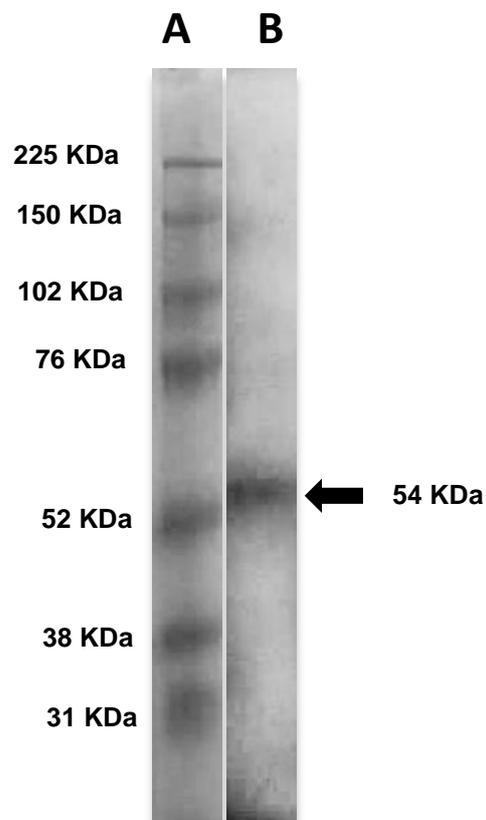
## 4 RESULTADOS

### 4.1 IDENTIFICAÇÃO E ATIVIDADE ATPásica E ADPásica DA APIRASE DE BATATA

A purificação da apirase de batata pode ser realizada por métodos convencionais, sendo obtida com alto grau de pureza para melhor reprodutibilidade nos ensaios que utilizam essa proteína (VASCONCELOS et al., 2009). Durante cada etapa do processo de purificação as atividades difosfolíticas – ATPase e ADPase – foram verificadas. Após purificação a proteína vegetal apresentou atividades ATPásica e ADPásica de **17880,75 ± 1296,50** e **18462,46 ± 1234,13 nmolPi/mg/min**, respectivamente (**Tabela 3**). No intuito de se confirmar a eficiência do processo de purificação da apirase de batata foi realizada eletroforese em gel SDS-PAGE 10%. Na **Figura 11** é possível observar a presença de uma única banda na altura de 54 KDa, correspondente à apirase de batata purificada.

**Tabela 3. Atividade ATPásica e ADPásica da apirase de batata após processo de purificação.** As atividades avaliadas com tampão succinato de potássio pH 6,5, a 37°C, por 10 minutos e empregado nos nucleotídeos ATP e ADP como substratos para a enzima. Os resultados foram expressos pela média ± desvio padrão (M±SD) da atividade enzimática em nmolPI/mg/min.

Atividade ATPásica nmolPi/mg/min (M±SD)	Atividade ADPásica nmolPi/mg/min (M±SD)	Relação ATPase/ADPase
17880,75 ± 1296,50	18462,46 ± 1234,13	0,97



**Figura 11. Eletroforese da proteína vegetal purificada.** A corrida eletroforética foi realizada em gel preparativo de poliacrilamida a 10%, com 10 $\mu$ g de proteínas/poço para apirase de batata com os parâmetros de 100V, 0,03A e 3W a corrida durou cerca 1h e 30 min. Ao término do processo o gel foi corado com Azul de *Coomassie* por 24h, em seguida descorado com solução de 40% de metanol acrescida de 10% de ácido acético e água destilada. O resultado evidencia a presença de uma banda na altura de 54kDa, correspondente à apirase de batata (**B**) e o padrão de peso molecular utilizado para comparação (**A**).

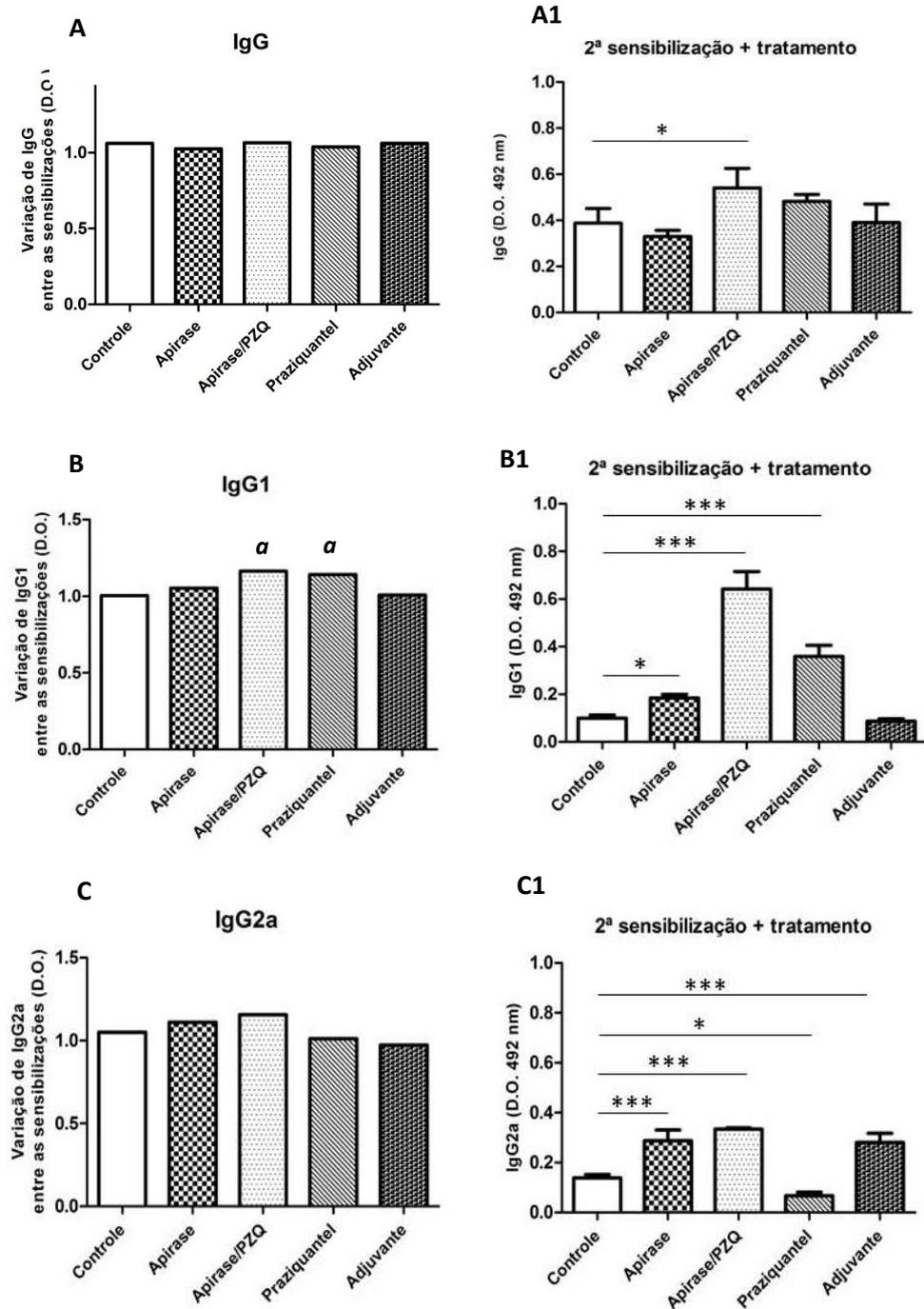
## 4.2 RESPOSTA IMUNE INDUZIDA PELA SENSIBILIZAÇÃO COM APIRASE DE BATATA ASSOCIADA AO PRAZICUANTEL SUBCURATIVO

### 4.2.1 Níveis de anticorpos anti-apirase específicos produzidos após sensibilização com apirase de batata e tratamento subterapêutico com praziquantel

A fim de investigar os níveis de anticorpos específicos (**Figura 12**) induzidos pela proteína vegetal após as sensibilizações, plasmas dos camundongos Balb/c de cada grupo foram testados por ELISA. É possível notar que a sensibilização com apirase de batata associada ao praziquantel subterapêutico induziu níveis de IgG significativamente maiores em comparação ao controle ( **$0,5403 \pm 0,08526$ ,  $p=0,006$** ) e não houve variação na produção deste anticorpo entre a sensibilização e sensibilização/tratamento de cada grupo (**C.V. 3,18%, Figura 12A e A1**).

Os níveis de IgG1 detectados foram significativos após as sensibilizações com a proteína vegetal ( **$0,1847 \pm 0,01515$** ), como também naqueles associado ( **$0,6422 \pm 0,07297$** ) ou não ao PZQ subcurativo ( **$0,3591 \pm 0,04610$** ) em relação ao controle. Além disso, a variação da produção de IgG1 entre as sensibilizações, foi significativamente maior nos grupos sensibilizados e/ou tratados com dose subcurativa do PZQ (**C.V. 5,03%**) comparados ao controle (**Figura 12B e B1**).

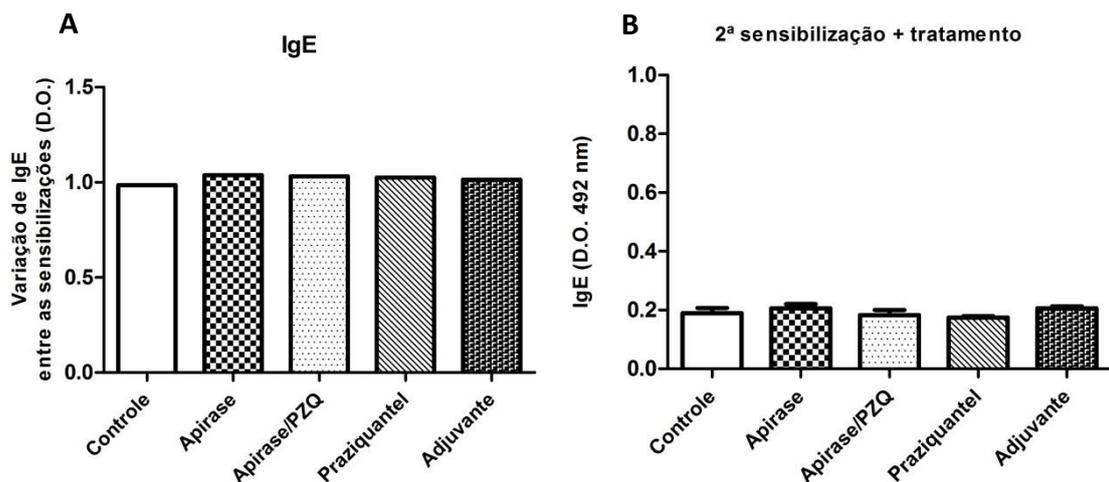
Em relação à produção de IgG2a, esta apresentou-se significativamente aumentada no grupo que recebeu apenas a proteína vegetal ( **$0,2868 \pm 0,04337$** ), ou associada ao PZQ ( **$0,3334 \pm 0,00502$** ) e também nos grupos adjuvante ( **$0,2806 \pm 0,03652$** ) e PZQ ( **$0,06718 \pm 0,01420$** ), (**Figura 12C e C1**).



**Figura 12. Reatividade de anticorpos anti-apirase específicos em soros de camundongos Balb/c sensibilizados com apirase de batata e tratados com praziquantel subcurativo.** Após sensibilização prévia com duas doses de apirase de batata (10µg) em um intervalo de 7 dias e tratamento com 200mg/Kg de PZQ, anticorpos IgG (**A e A1**) e subclasses IgG1 (**B e B1**) e IgG2a (**C e C1**) anti-apirase específicos foram quantificados por ELISA. **Controle**, grupo que recebeu solução salina. **Apirase**, grupo sensibilizado com apirase de batata/adjuvante. **Apirase + PZQ**, grupo sensibilizado com apirase de batata/adjuvante e tratado com 200mg/Kg de praziquantel em dose única. **Praziquantel**, grupo tratado com 200mg/Kg de praziquantel em dose única. **Adjuvante**, grupo sensibilizado com 250µg de hidróxido de alumínio. As amostras de plasma foram diluídas 1:100 e testadas em duplicata. Os resultados estão representados como média ± desvio padrão da densidade óptica (D.O.) \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  (ANOVA/Dunnett), e como variação das médias entre as coletas de 14 e 66 dias de experimento (ANOVA/SNK -Student-Newman-Keuls).

#### 4.2.2 Reatividade da apirase de batata com anticorpos IgE em soros de animais sensibilizados

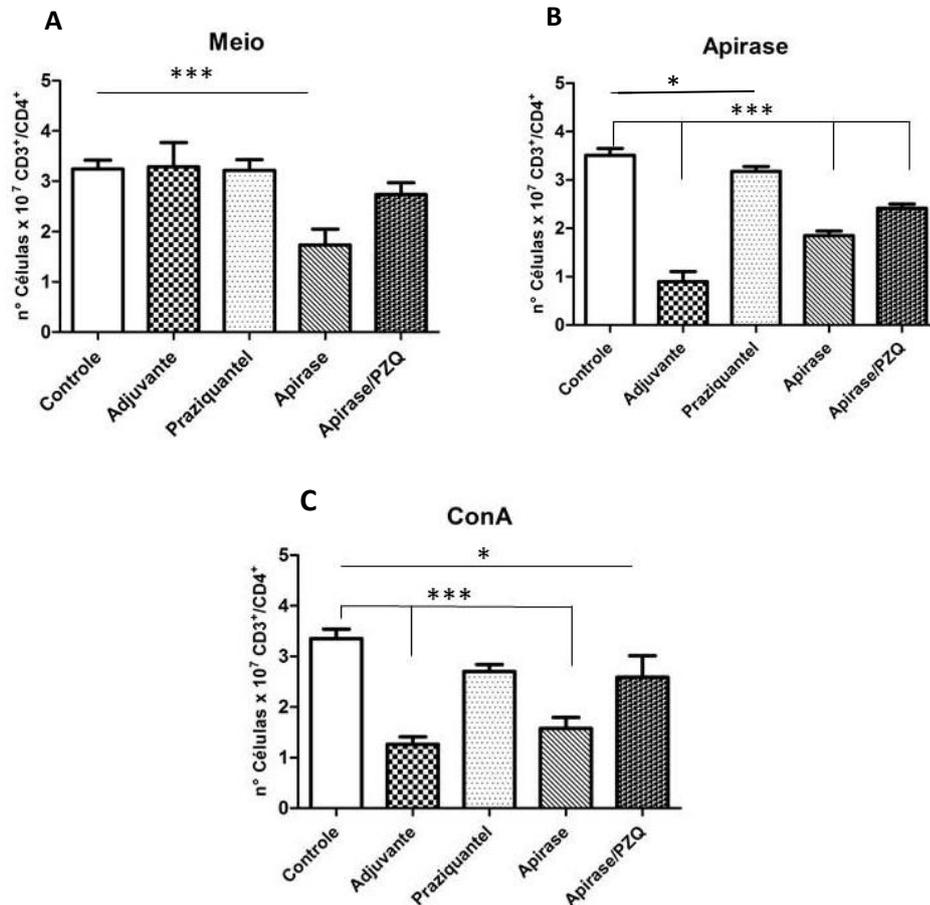
A variação de anticorpos IgE (**Figura 13A**) em camundongos Balb/c previamente sensibilizados com apirase de batata e tratados com PZQ subterapêutico não foi significativa entre as etapas de sensibilização e sensibilização/tratamento. Da mesma forma, não foram observados níveis significativos desta imunoglobulina após protocolo de sensibilização e tratamento nestes animais, quando comparados ao grupo controle.



**Figura 13.** Reatividade entre apirase de batata e anticorpos IgE presentes em amostras de plasma de camundongos Balb/c sensibilizados com proteína vegetal e tratados com praziquantel subcurativo. **Controle**, grupo que recebeu solução salina. **Apirase**, grupo sensibilizado com apirase de batata/adjuvante. **Apirase + PZQ**, grupo sensibilizado com apirase de batata/adjuvante e tratado com 200mg/Kg de praziquantel em dose única. **Praziquantel**, grupo tratado com 200mg/Kg de PZQ em dose única. **Adjuvante**, grupo sensibilizado com 250µg de hidróxido de alumínio. As amostras de plasma foram diluídas 1:100 e testadas em duplicata. Os resultados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão da densidade óptica (D.O.) - ANOVA/Dunnnett e como variação das médias entre as coletas de 14 e 66 dias de experimento (ANOVA/SNK -Student-Newman-Keuls).

### 4.2.3 Influência da sensibilização com apirase de batata e tratamento com praziquantel subterapêutico no número de células CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>

Com o intuito de determinar a ação da sensibilização prévia com a proteína vegetal associada ao PZQ subcurativo sobre o número de células CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, esplenócitos foram extraídos de camundongos Balb/c. As células foram estimuladas *in vitro* com Concanavalina (ConA) ou apirase de batata. Após 72h o número de células CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> (**Figura 14**) e CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (**Figura 15**) foram determinadas.

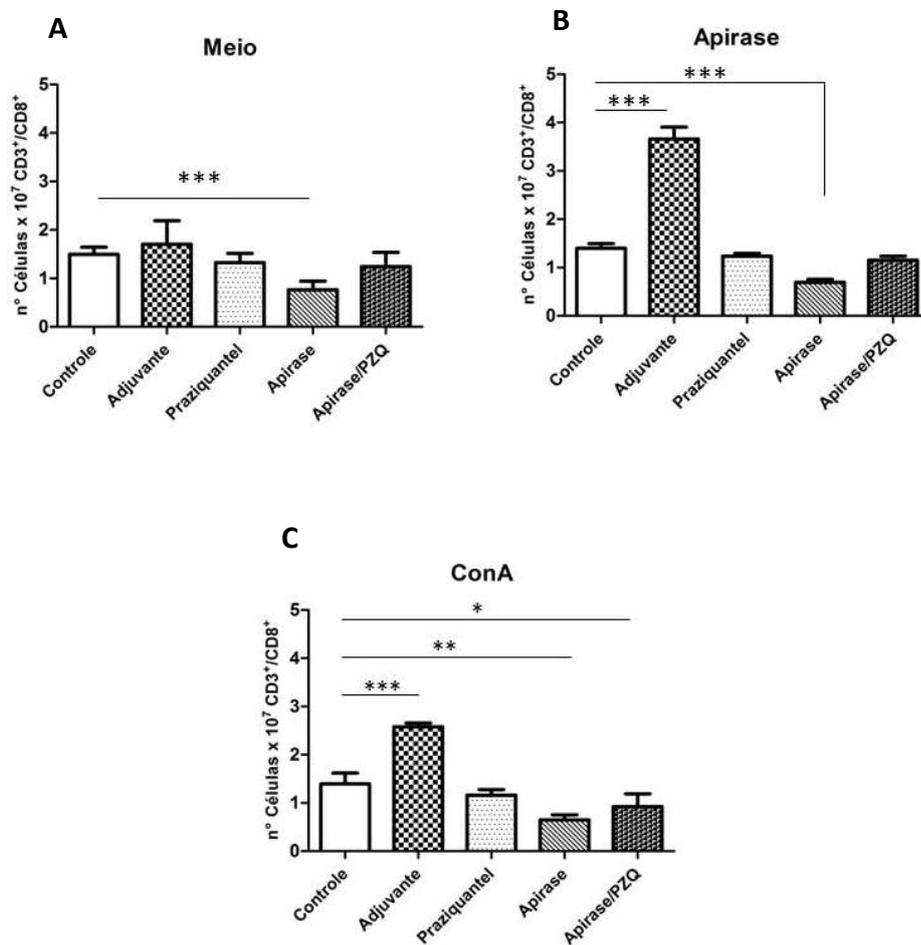


**Figura 14.** Número de linfócitos CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> em esplenócitos de murinos Balb/c após protocolo de sensibilização com apirase de batata e tratamento com praziquantel subterapêutico. Esplenócitos de camundongos Balb/c (1x10<sup>6</sup> por poço) foram cultivados na presença de 5µg/mL de Apirase de batata (**B**) e 5µg/mL de ConA (**C**), para avaliação do número de células CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>. Após 72h, a expressão dos marcadores foi determinada por citometria de fluxo. Os resultados representam a média ± desvio padrão de cada grupo, comparados ao grupo controle. \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 (ANOVA/Dunnett).

Nota-se que o grupo sensibilizado com a proteína vegetal reduziu o número de células CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> quando associada (**1,847±0,0991**) ou não ao praziquantel subterapêutico (**2,416±0,0842**) na estimulação *in vitro* com a própria apirase de batata. Resultado semelhante foi encontrado para o grupo que recebeu apenas adjuvante (**0,8999±0,2074**) e apenas PZQ (**3,176±0,1017**).

Quando aplicado estímulo com ConA a quantidade de células CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> foi significativamente menor nos animais sensibilizados com apirase de batata (**1,579±0,2135**) e quando a sensibilização foi acompanhada de tratamento posterior com PZQ (**2,589±0,4241**), tal como nos animais testados apenas com alúmen (**1,265±0,1464**).

Para as células CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (**Figura 15**) o estímulo com apirase de batata reduziu de forma significativa o número destas células nos animais que receberam essa proteína das etapas de sensibilização (**0,6944±0,0602**), enquanto que o grupo que recebeu adjuvante isoladamente esse número aumentou (**3,660±0,248**). O estímulo *in vitro* com ConA também foi capaz de promover aumento significativo de CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> neste último grupo de animais (**2,576±0,0813**), porém propiciou redução significativa nos grupos sensibilizados e tratados (**0,9212±0,2679**) e naqueles apenas sensibilizados (**0,6463±0,1074**).



**Figura 15. Número de linfócitos CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> em esplenócitos de murinos Balb/c após protocolo de sensibilização com apirase de batata e tratamento com praziquantel subterapêutico.** Esplenócitos de camundongos Balb/c ( $1 \times 10^6$  por poço) foram cultivados na presença de 5 $\mu$ g/mL de Apirase de batata (**B**) e 5 $\mu$ g/mL de ConA (Concanavalina A (**C**) para avaliação do número de células CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>. Após 72h, a expressão dos marcadores foi determinada por citometria de fluxo. Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de cada grupo, comparados ao grupo controle. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  (ANOVA/Dunnett).

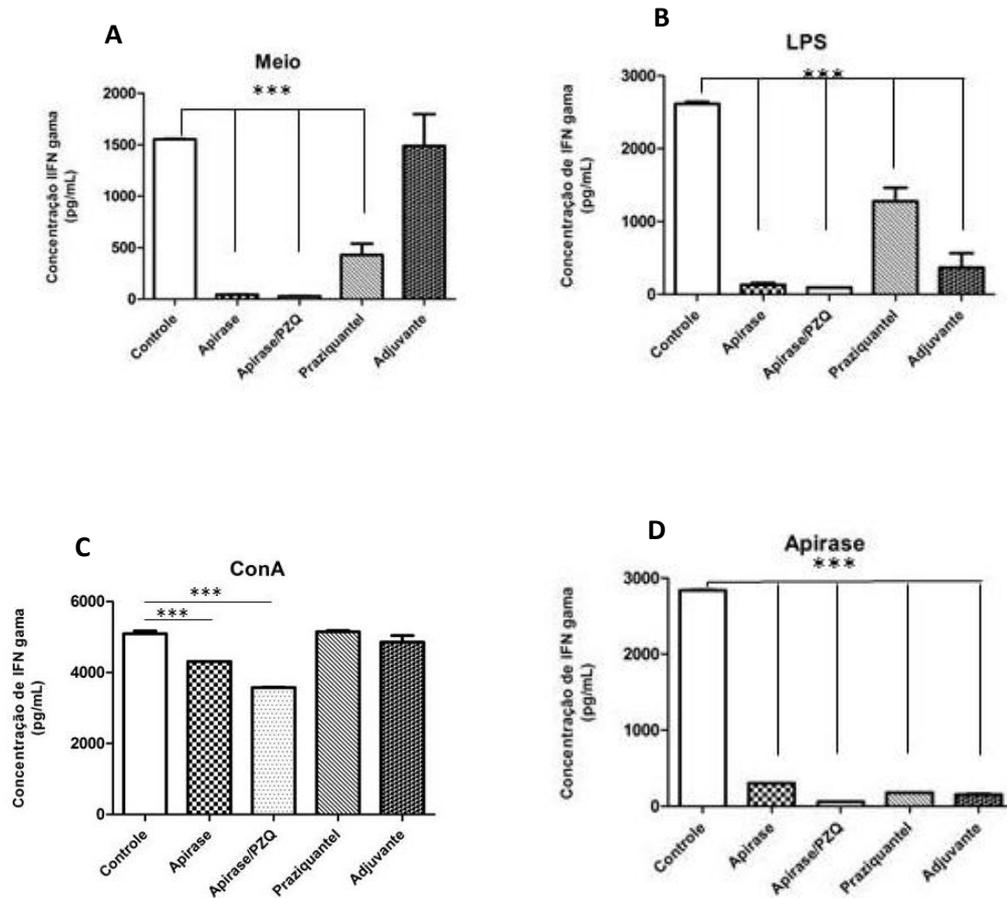
#### 4.2.4 Avaliação da produção de IFN- $\gamma$ e IL-17 induzidos pela sensibilização de camundongos Balb/c com apirase de batata e praziquantel subterapêutico

A análise da produção de citocinas induzida pela apirase de batata e PZQ subcurativo foi realizada nos grupos experimentais utilizando cultura de esplenócitos individuais de camundongos ( $n=3$  para cada grupo; 72h de cultura). Os esplenócitos foram isolados após sensibilização com apirase de batata e tratamento com praziquantel em dose subterapêutica. Como controles positivos foram empregados  $5\mu\text{g/mL}$  de ConA e  $1\mu\text{g/mL}$  de LPS. Nas **Figuras 16 e 17** estão apresentadas as médias da produção de IFN- $\gamma$  e IL-17 respectivamente, nos sobrenadantes de cultura de células do baço, cultivadas por 72h, na presença de apirase de batata.

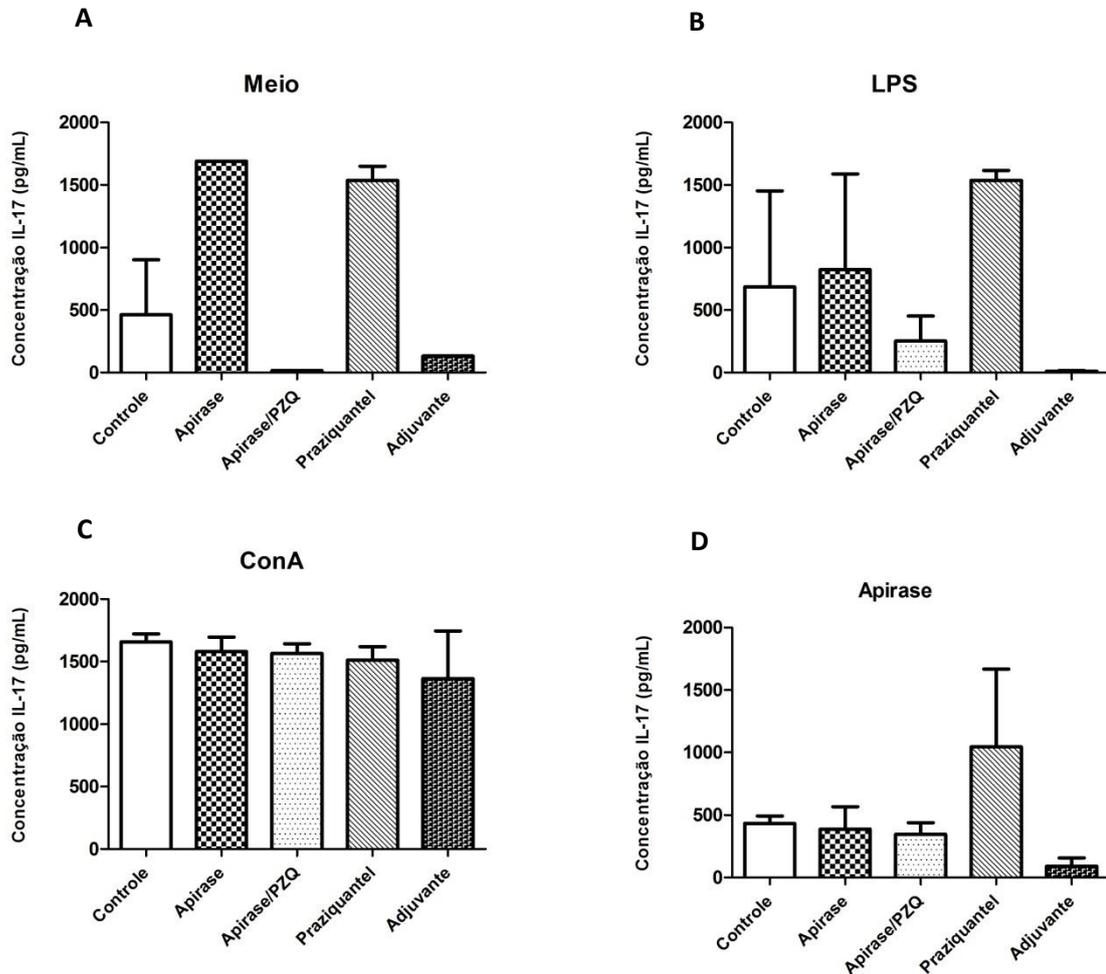
Na ausência de estímulos, os animais sensibilizados com apirase de batata e/ou tratados com PZQ subcurativo apresentaram níveis significativamente menores de IFN- $\gamma$  (grupo apirase  **$45\pm 1,010$** ; grupo apirase/PZQ  **$29,5\pm 2,121$** ; grupo PZQ  **$428,5\pm 110,5$** ) em comparação ao grupo controle. De forma semelhante o estímulo com LPS também foi capaz de ocasionar redução significativa de IFN- $\gamma$  nos grupos apirase ( **$130,9\pm 28,180$** ), grupo apirase/PZQ ( **$95,14\pm 0,707$** ), praziquantel ( **$1278\pm 186,4$** ) e no grupo adjuvante ( **$366,6\pm 196,6$** ). Já o estímulo com ConA, promoveu redução significativa de IFN- $\gamma$  apenas nos grupos sensibilizado com a proteína vegetal ( **$4312\pm 1,011$** ) e quando a sensibilização foi acompanhada de PZQ subterapêutico ( **$3575\pm 10,102$** ).

Em resposta ao estímulo com apirase de batata, tanto os grupos sensibilizados e/ou tratados reduziram significativamente a produção de IFN- $\gamma$  (grupo apirase  **$300,9\pm 2,020$** ; apirase/PZQ  **$58,71\pm 1,012$** ; PZQ  **$175,9\pm 1,024$** ), tal como o grupo que recebeu adjuvante ( **$153,7\pm 8,081$** ).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na produção de IL-17 (**Figura 17**) entre os grupos experimentais comparados ao grupo controle, frente aos estímulos empregados e nas condições experimentais testadas.



**Figura 16. Perfil de IFN- $\gamma$  em sobrenadante de esplenócitos isolados de camundongos Balb/c sensibilizados com apirase de batata e tratados com PZQ subterapêutico.** Os esplenócitos foram isolados a partir de camundongos Balb/c submetidos ao protocolo de sensibilização com duas doses de 10 $\mu$ g de apirase de batata/adjuvante, seguido de tratamento com 200mg/Kg de praziquantel. As células foram estimuladas *in vitro* com LPS (B), ConA (C) e Apirase de batata (D), para avaliar a secreção de IFN- $\gamma$ . Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de cada grupo em relação ao grupo controle. As diferenças estatisticamente significativas entre citocinas produzidas após a estimulação em comparação ao grupo controle. \*\*\* $p < 0,0001$  (ANOVA/Dunnett).

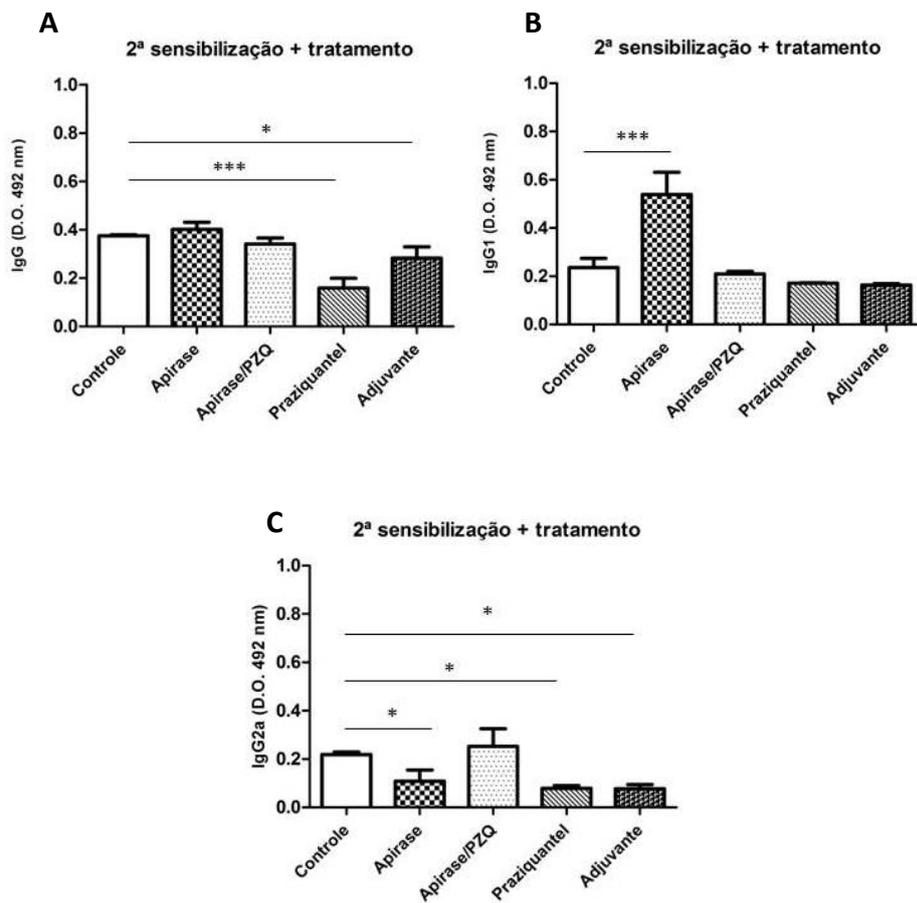


**Figura 17. Perfil de IL-17 em sobrenadante de esplenócitos isolados de camundongos Balb/c sensibilizados com apirase de batata e tratados com PZQ subterapêutico.** Os esplenócitos foram isolados a partir de camundongos Balb/c submetidos ao protocolo de sensibilização com duas doses de 10µg de apirase de batata/adjuvante, seguido de tratamento com 200mg/Kg de praziquantel. As células foram estimuladas *in vitro* com LPS (B), ConA (C) e Apirase de batata (D), para avaliar a secreção de IFN- $\gamma$ . Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de cada grupo em relação ao grupo controle.

### 4.3 EFEITO DA REATIVIDADE CRUZADA DOS ANTÍGENOS SOLÚVEIS DO VERME ADULTO (*SWAP*) SOBRE A RESPOSTA IMUNE DOS ANIMAIS SENSIBILIZADOS COM APIRASE DE BATATA E TRATADOS COM PRAZIQUANTEL SUBCURATIVO

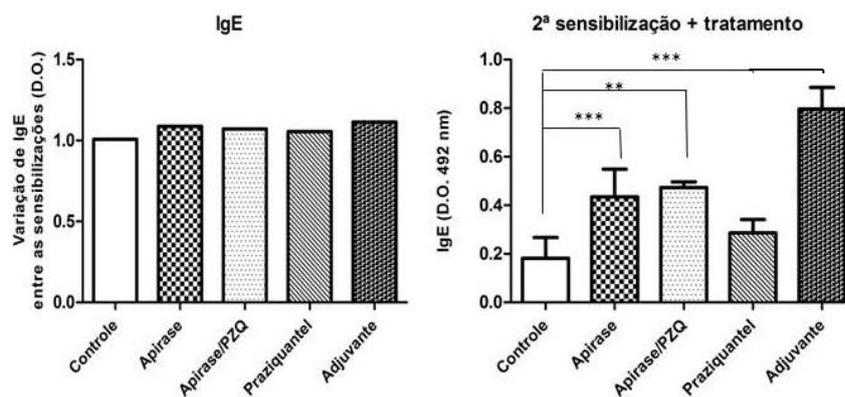
Dado que a apirase de batata exibiu efeito modulatório sobre o sistema imunológico de camundongos *Swiss* (SOARES, 2012) e com base em trabalhos anteriores do nosso grupo, que demonstraram similaridade entre a proteína vegetal e as ATP difosfohidrolases de *S. mansoni* analisamos o efeito da reatividade cruzada entre apirase de batata e antígenos solúveis do verme adulto (*SWAP*) em camundongos Balb/c sensibilizados com a proteína vegetal.

Os níveis de IgG anti-*SWAP* específicos foram significativamente menores nos animais apenas tratados com PZQ subcurativo (**0,1586±0,04100**) e naqueles que receberam somente adjuvante (**0,2833±0,04607**) em relação ao grupo controle (**Figura 18**). Quando avaliada a subclasse IgG1, os níveis desta imunoglobulina em animais apenas sensibilizados com a apirase de batata apresentou-se significativamente elevado comparado ao controle (**0,5388±0,09255**). Resultado distinto foi encontrado para IgG2a, que demonstrou níveis reduzidos em animais apenas tratados (**0,07891±0,01142**) e exclusivamente sensibilizados com a proteína vegetal (**0,1088±0,04596**), assim como naqueles que receberam somente adjuvante (**0,07677±0,01789**).



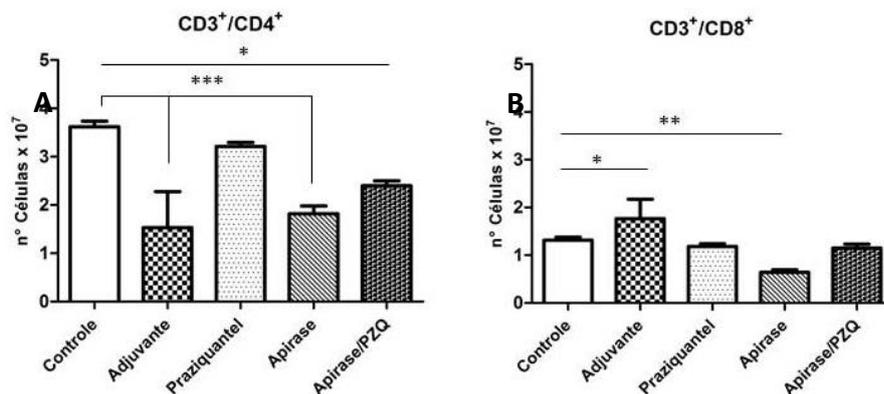
**Figura 18. Reatividade de anticorpos anti-SWAP específicos em soros de camundongos Balb/c sensibilizados com apirase de batata e tratados com praziquantel subcurativo.** Após sensibilização prévia com duas doses de apirase de batata (10µg) em um intervalo de 7 dias, anticorpos IgG (A) e subclasses IgG1 (B) e IgG2a (C) anti-SWAP específicos foram quantificados por ELISA. **Controle**, grupo que recebeu solução salina. **Apirase**, grupo sensibilizado com apirase de batata/adjuvante. **Apirase + PZQ**, grupo sensibilizado com apirase de batata/adjuvante e tratado com 200mg/Kg de praziquantel em dose única. **Praziquantel**, grupo tratado com 200mg/kg de praziquantel em dose única. **Adjuvante**, grupo sensibilizado com 250µg de hidróxido de alumínio. As amostras de plasma foram diluídas 1:100 e testadas em duplicata. Os resultados estão representados como média ± desvio padrão da densidade óptica (D.O.). \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 (ANOVA/Dunnett).

A diferença na produção de IgE anti-SWAP (**Figura 19**) específica entre sensibilização e sensibilização/tratamento foi significativa para todos os grupos de animais, se comparados ao controle. Contudo a produção de IgE foi significativa no grupo que recebeu a proteína vegetal isoladamente (**0,4348±0,1143**) ou acompanhada de tratamento posterior com PZQ (**0,4727±0,0237**) e bem como no grupo sensibilizado apenas com alúmen (**0,7965±0,0892**).



**Figura 19. Reatividade de anticorpos IgE anti-SWAP específicos em plasmas de camundongos Balb/c sensibilizados com apirase de batata e tratados com praziquantel subcurativo.** Após sensibilização prévia com duas doses de apirase de batata (10µg) em um intervalo de 7 dias, anticorpos IgE anti-SWAP específicos foram quantificados por ELISA. **Controle**, grupo que recebeu solução salina. **Apirase**, grupo sensibilizado com apirase de batata/adjuvante. **Apirase + PZQ**, grupo sensibilizado com apirase de batata/adjuvante e tratado com 200mg/Kg de praziquantel em dose única. **Praziquantel**, grupo tratado com 200mg/kg de praziquantel em dose única. **Adjuvante**, grupo sensibilizado com 250µg alúmen. As amostras de plasma foram diluídas 1:100 e testadas em duplicata. Os resultados estão representados como média ± desvio padrão da densidade óptica (D.O.). \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 (ANOVA/Dunnett).

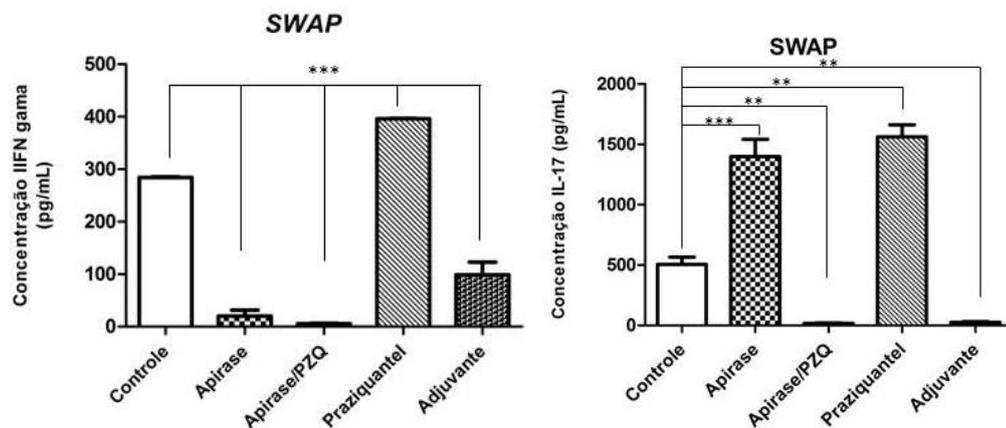
O número de células CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> (**Figura 20**) foi menor nos animais sensibilizados com apirase de batata, simultaneamente (**2,398±0,1001**) ou não (**1,818±0,1632**) ao PZQ subterapêutico, assim como para o grupo adjuvante (**1,530±0,7481**). Já na avaliação de células CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> verifica-se um aumento significativo no número deste tipo celular para o grupo que recebeu apenas adjuvante (**1,766±0,4076**), enquanto que no grupo apenas sensibilizado com apirase de batata este parâmetro foi significativamente menor (**0,6389±0,05377**).



**Figura 20. Efeito da reatividade cruzada em camundongos Balb/c sensibilizados com apirase de batata e tratados com praziquantel subterapêutico no número de células CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> em esplenócitos estimulados com antígenos solúveis do verme adulto (SWAP).** Esplenócitos de camundongos Balb/c ( $1 \times 10^6$  por poço) foram cultivados na presença de 5µg/mL de antígenos solúveis do verme adulto para avaliação do número de células CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> (A) e CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (B). Após 72h, a expressão dos marcadores foi determinada por citometria de fluxo. **Controle**, grupo que recebeu solução salina. **Apirase**, grupo sensibilizado com apirase de batata/adjuvante. **Apirase + PZQ**, grupo sensibilizado com apirase de batata/adjuvante e tratado com 200mg/Kg de praziquantel em dose única. **Praziquantel**, grupo tratado com 200mg/kg de praziquantel em dose única. **Adjuvante**, grupo sensibilizado com 250µg de alúmen. Os resultados representam a média ± desvio padrão de cada grupo, comparados ao grupo controle. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  (ANOVA/Dunnett).

O estímulo com *SWAP* (**Figura 21**) fez com que a produção de IFN- $\gamma$  no grupo que recebeu apenas PZQ fosse significativamente elevada (**395,9 $\pm$ 1,010**), ao passo que quando o tratamento foi precedido de sensibilização com a proteína vegetal essa produção foi menor se com parada ao grupo controle (**5,68 $\pm$ 0,770**), assim como ocorreu naquele grupo apenas sensibilizado (**20,14 $\pm$ 11,140**).

A produção de IL-17 foi significativamente maior nos animais apenas sensibilizados com proteína vegetal (**1399 $\pm$ 144,5**) e apenas tratados com praziquantel (**1562 $\pm$ 101,02**) e significativamente menor quando sensibilização e tratamento foram combinados (**18,24 $\pm$ 2,91**) e quando foi utilizado apenas adjuvante (**25,44 $\pm$ 7,84**).



**Figura 21: Perfil de IFN- $\gamma$  e IL-17 de esplenócitos isolados de camundongos Balb/c sensibilizados com apirase de batata e tratados com Praziquantel subterapêutico.** Os esplenócitos foram isolados a partir de camundongos Balb/c submetidos ao protocolo de sensibilização com duas doses de 10 $\mu$ g de apirase de batata/adjuvante, seguido de tratamento com 200mg/Kg de praziquantel. As células foram estimuladas *in vitro* com 5 $\mu$ g/mL de *SWAP*, para avaliar a secreção de IFN- $\gamma$  e IL-17. **Controle**, grupo que recebeu solução salina. **Apirase**, grupo sensibilizado com apirase de batata/adjuvante. **Apirase + PZQ**, grupo sensibilizado com apirase de batata/adjuvante e tratado com 200mg/Kg de praziquantel em dose única. **Praziquantel**, grupo tratado com 200mg/kg de praziquantel em dose única. **Adjuvante**, grupo sensibilizado com 250 $\mu$ g de alúmen. Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de cada grupo, comparados ao grupo controle. \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 (ANOVA/Dunnett).

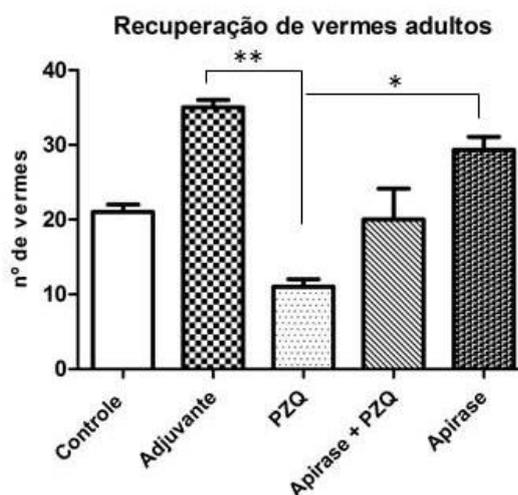
#### 4.4 ENSAIO PRELIMINAR DA POTENCIAL MODULAÇÃO DO SISTEMA IMUNE PELA APIRASE DE BATATA ASSOCIADA AO PRAZICUANTEL SUBCURATIVO NA ESQUISTOSSOMOSE MURINA

##### **4.4.1 Recuperação de vermes após infecção experimental com *Schistosoma mansoni***

Dados anteriores do nosso grupo demonstraram a ativação da resposta imune humoral em camundongos e coelhos após imunização com apirase de batata, sendo que os anticorpos gerados contra a proteína vegetal reconhecem isoformas de NTPDases de *S.mansoni* (VASCONCELOS et al., 1996; FARIA-PINTO et al., 2004). Assim sendo, dispomos a investigar a capacidade de proteção da infecção C57BL/6 com essa proteína. Como apresentado na **Tabela 4** e **Figura 22**, a sensibilização com apirase de batata não afetou a carga parasitária de forma significativa nos animais que receberam a proteína (**29,33±3,05**), mesmo quando associada ao PZQ subterapêutico (**20±5,21**), se comparadas grupo praziquantel (**11±1,26**). Resultado semelhante foi observado ao grupo que recebeu apenas adjuvante (**35±1,38**).

**Tabela 4. Avaliação da carga parasitária de camundongos C57BL/6 sensibilizados com apirase de batata, posteriormente infectados com *S.mansoni* e tratados com PZQ.** Os animais foram sensibilizados com duas doses de apirase de batata/adjuvante (10µg), seguidos 7 dias foram desafiados com 50 cercárias de *S.mansoni* (via percutânea). Após 45 do desafio, os camundongos foram tratados com dose única de 200mg/Kg de Praziquantel (via oral). E após 7 dias os animais foram eutanasiados com 150mg/Kg de tiopental (via intraperitoneal) e os vermes adultos de *S.mansoni* recuperados por perfusão pelo sistema mesentérico portal com solução salina + 500UI/L de heparina. Os resultados representam a média ± desvio padrão do quantitativo de vermes recuperados.\*p<0,05 (ANOVA/Tukey).

Grupos	Média de vermes	Machos (%)	Fêmeas (%)
Controle	21±1,40	52,38	47,64
Adjuvante	35±1,38	50	50
Praziquantel (PZQ)	11±1,26	53	47
Apirase + PZQ	20±5,21	48	52
Apirase	29,33±3,05	60,20	39,80

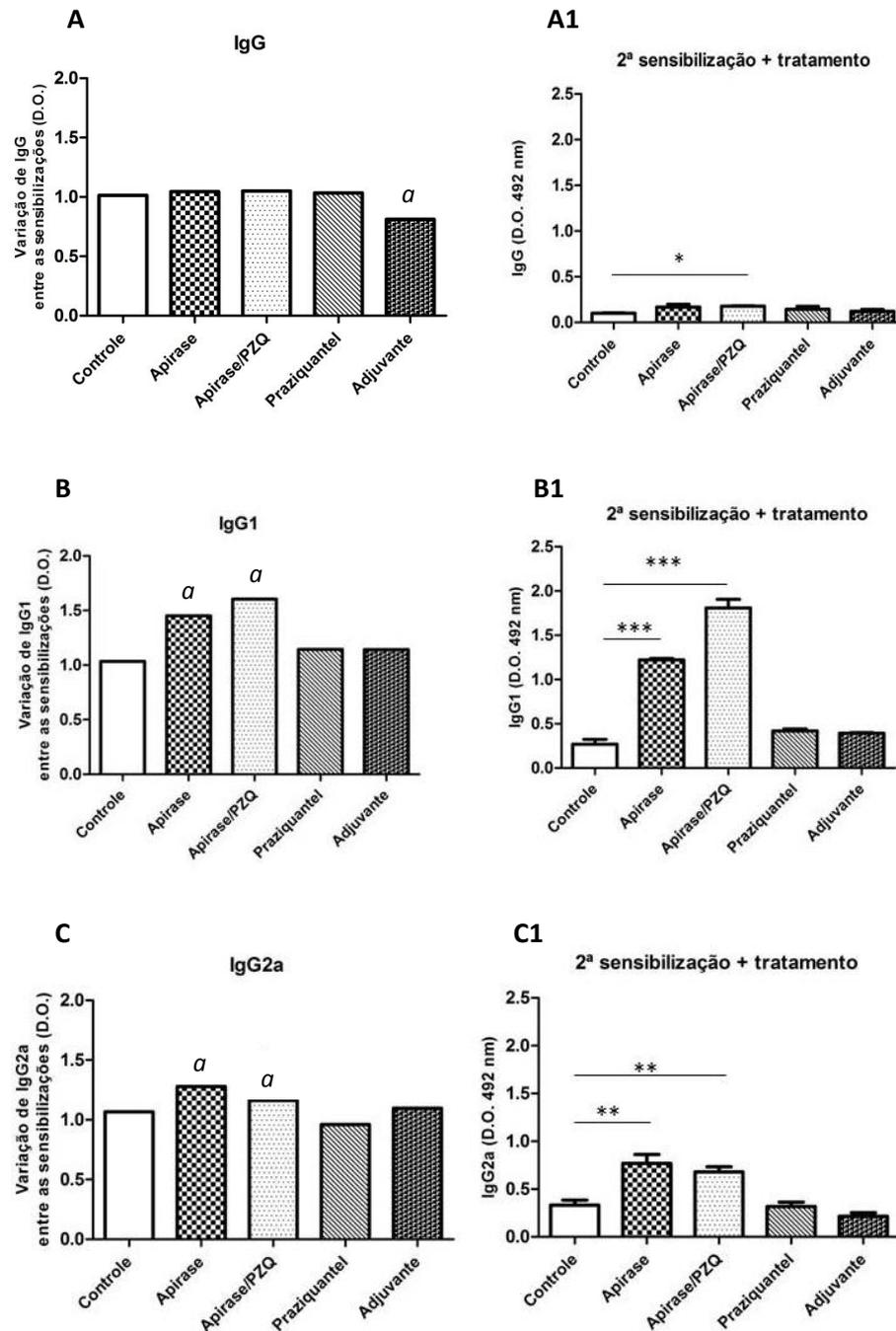


**Figura 22. Recuperação de vermes do fígado e mesentério de camundongos C57BL/6 após protocolo experimental de imunização com apirase de batata, infecção com *S.mansoni* e tratamento subcurativo com praziquantel.** Após serem eutanasiados com 150mg/Kg de tiopental, camundongos C57BL/6 previamente submetidos a sensibilização e tratamento em protocolo experimental de Esquistossomose mansoni, tiveram os vermes adultos perfundidos via sistema portal mesentérico com solução salina heparinizada (500 UI/L de). Os vermes obtidos foram contados manualmente assim como aqueles provenientes de um lobo do fígado. **Controle**, grupo que recebeu solução salina. **Apirase**, grupo sensibilizado com apirase de batata/adjuvante. **Apirase + PZQ**, grupo sensibilizado com apirase de batata/adjuvante e tratado com 200mg/Kg de praziquantel em dose única. **Praziquantel**, grupo tratado com 200mg/kg de praziquantel em dose única. **Adjuvante**, grupo sensibilizado com 250µg de alúmen \* p <0,05 e \* p <0,01 (ANOVA/Tukey) - aumento na carga de vermes dos grupos comparados ao respectivo grupo praziquantel.

#### 4.4.2 Níveis de anticorpos anti-apirase específicos produzidos após sensibilização com a proteína vegetal, infecção com *S. mansoni* e tratamento subterapêutico com praziquantel

A produção de anticorpos (**Figura 23**) IgG anti-apirase específicos foi significativamente maior no grupo sensibilizado e tratado ( **$0,1673 \pm 0,03104$** ). Apenas o grupo que recebeu adjuvante apresentou diferença na variação da produção desta imunoglobulina entre a sensibilização e infecção/tratamento (**C.V. 1,27%**).

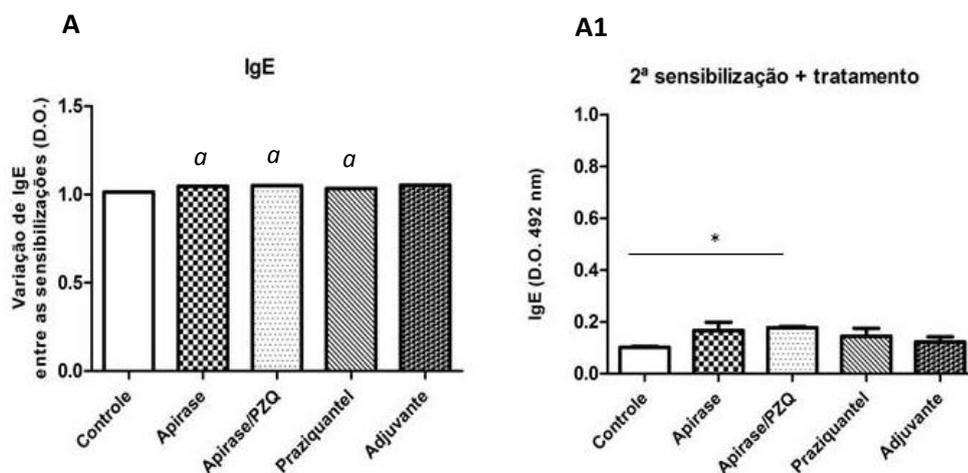
Os níveis de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-apirase específicos mostraram-se elevados no grupo apenas sensibilizado com apirase de batata ( **$1,222 \pm 0,01655$**  e  **$1,809 \pm 0,0961$** , respectivamente) e quando o tratamento subcurativo de PZQ foi combinado ( **$0,7681 \pm 0,09412$**  e  **$0,6786 \pm 0,0540$** , respectivamente), sendo que ocorreu variação na produção entre as sensibilizações para as duas classes de imunoglobulinas para estes grupos (**C.V. 1,56% e 2,48%**, respectivamente).



**Figura 23.** Reatividade de anticorpos anti-apirase específicos em soros de camundongos C57BL/6 sensibilizados com apirase de batata, infectados com *S.mansoni* e tratados com praziquantel subcurativo. Após sensibilização prévia com duas doses de apirase de batata/adjuvante (10µg), infecção experimental com *S.mansoni* e tratamento com 200mg/Kg de PZQ, anticorpos IgG (**A e A1**) e subclasses IgG1 (**B e B1**) e IgG2a (**C e C1**) anti-apirase específicos foram quantificados por ELISA. **Controle**, grupo que recebeu solução salina. **Apirase**, grupo sensibilizado com apirase de batata/adjuvante. **Apirase + PZQ**, grupo sensibilizado com apirase de batata/adjuvante e tratado com 200mg/Kg de praziquantel em dose única. **Praziquantel**, grupo tratado com 200mg/kg de praziquantel em dose única. **Adjuvante**, grupo sensibilizado com 250µg de alúmen. As amostras de plasma foram diluídas 1:100 e testadas em duplicata. Os resultados estão representados como média ± desvio padrão da densidade óptica (D.O.)  $p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$  (ANOVA/Dunnett), e como variação das médias entre as coletas de 7 e 66 dias de experimento (SNK -Student-Newman-Keuls).

#### 4.4.3 Reatividade da apirase de batata com anticorpos IgE em soros de animais sensibilizados e tratados em protocolo de esquistossomose experimental

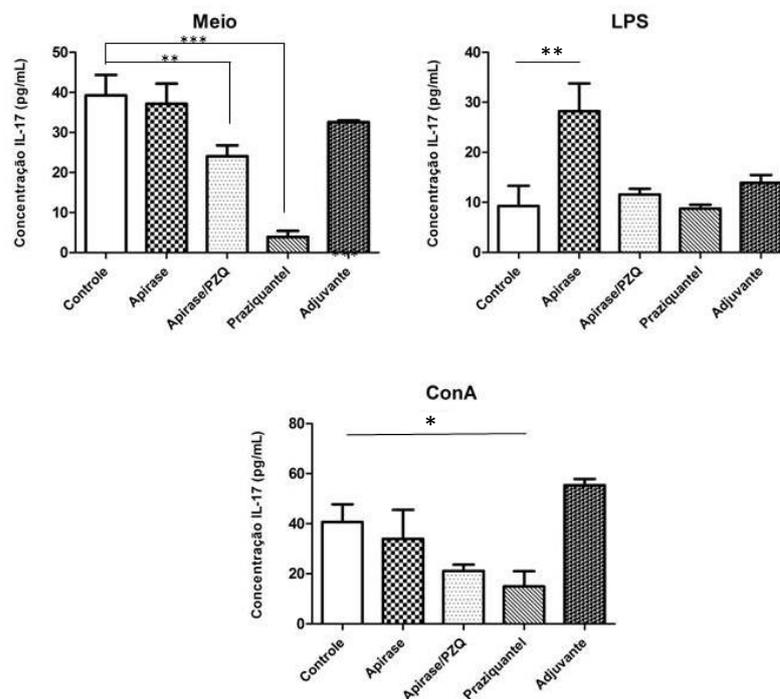
A variação de anticorpos IgE (**Figura 24**) em camundongos C57BL/6 previamente sensibilizados com apirase de batata, foi significativa entre as etapas de sensibilização e sensibilização/infecção/tratamento, como também nos animais do grupo adjuvante (**C.V. 1,19%**). Da mesma forma, níveis significativos desta imunoglobulina foram encontrados apenas quando a sensibilização foi combinada ao tratamento ( **$0,1779 \pm 0,0039$** ), se comparados ao grupo controle.



**Figura 24. Reatividade entre apirase de batata e anticorpos IgE presentes em amostras de soro de camundongos C57BL/6 sensibilizados com apirase de batata/adjuvante e tratados com praziquantel subcurativo, no protocolo de infecção por *S.mansoni*.** Após sensibilização prévia com duas doses de apirase de batata/adjuvante (10µg) em um intervalo de 7 dias, seguida de infecção com 50 cercárias de *S.mansoni* e tratamento com 200mg/Kg de PZQ, anticorpos IgE (**A e A1**) foram quantificados por ELISA após as sensibilizações e no fim do protocolo experimental. **Controle**, grupo que recebeu solução salina. **Apirase**, grupo sensibilizado com apirase de batata/adjuvante. **Apirase + PZQ**, grupo sensibilizado com apirase de batata/adjuvante e tratado com 200mg/Kg de praziquantel em dose única. **Praziquantel**, grupo tratado com 200mg/kg de praziquantel em dose única. **Adjuvante**, grupo sensibilizado com 250µg de alumínio. As amostras de plasma foram diluídas 1:100 e testadas em duplicata. Os resultados estão representados como média ± desvio padrão da densidade óptica (D.O.).\*p<0,05. ANOVA/Dunnnett.

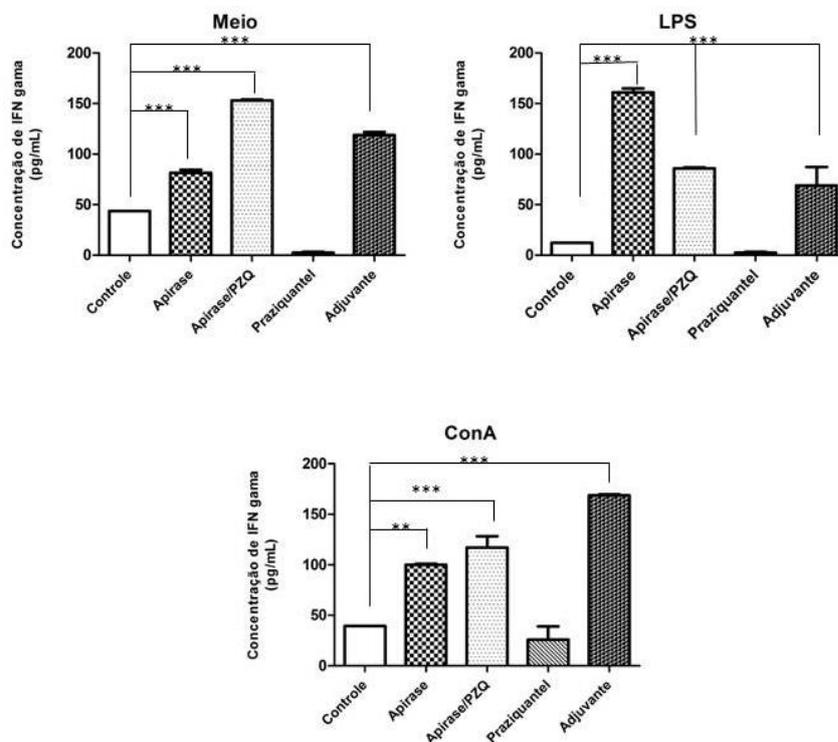
#### 4.4.4 Avaliação da produção de citocinas IFN- $\gamma$ e IL-17 em camundongos C57BL/6 sensibilizados com apirase de batata e tratados com praziquantel subcurativo em protocolo experimental de Esquistossomose mansoni

Sobrenadante de esplenócitos de animais sensibilizados com apirase de batata e tratados com PZQ em protocolo experimental de esquistossomose mansoni foram avaliados quanto à produção de IL-17 (**Figura 25**). Naqueles em que a sensibilização e tratamento foram realizados houve aumento significativo de IL-17 após serem estimuladas com LPS ( $28,21 \pm 5,556$ ). Quando estimulados com ConA os esplenócitos de murinos que receberam apenas tratamento com PZQ após serem infectados com *S.mansoni*, apresentaram redução significativa desta citocina ( $15,10 \pm 6,061$ ). Em ausência de estímulos o grupo sensibilizado com a proteína vegetal obteve redução significativa da produção de IL-17 ( $24,06 \pm 2,716$ ), assim como naquele em que o tratamento subcurativo com PZQ foi efetuado ( $3,929 \pm 1,515$ ).



**Figura 25: Perfil de IL-17 de esplenócitos isolados de camundongos C57BL/6 sensibilizados com apirase de batata e tratados com PZQ subterapêutico em protocolo de esquistossomose mansoni.** Os esplenócitos foram isolados a partir de camundongos C57BL/6 submetidos ao protocolo de sensibilização com duas doses de 10 $\mu$ g de apirase de batata/adjuvante, seguido da infecção por *S.mansoni*. e tratamento com 200mg/Kg de PZQ. Ao fim do protocolo os animais foram eutanasiados e o baço coletado para isolamento de esplenócitos que permaneceram em cultura por 48h sendo estimuladas *in vitro* com LPS (**B**), Apirase de batata (**C**), ConA (**D**) para avaliar a secreção de IFN- $\gamma$ . Os resultados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  (ANOVA/Dunnett).

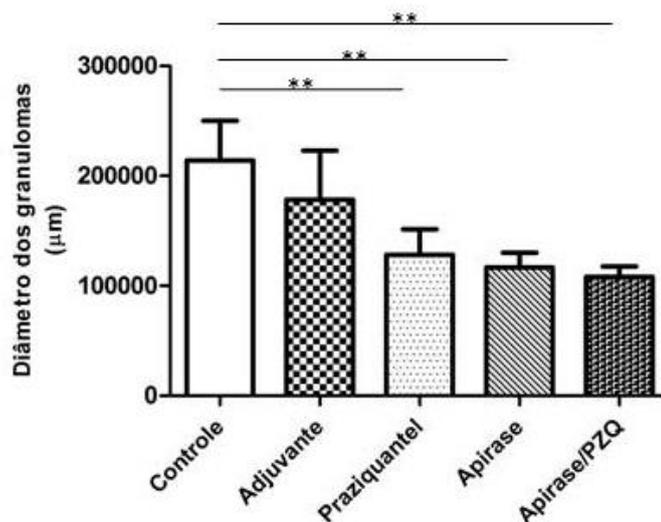
A produção de IFN- $\gamma$  (**Figura 26**) foi significativamente maior nas células do baço de camundongos C57BL/6 na ausência de estímulo *in vitro* nos grupos que receberam a proteína vegetal isoladamente (**81,57 $\pm$ 3,03**) (**Figura 26**) ou juntamente com o PZQ subterapêutico (**153 $\pm$ 1,01**) e também naquele que recebeu apenas adjuvante (**2,644 $\pm$ 0,772**). Resultado semelhante foi obtido quando as células foram estimuladas com LPS (apirase **160,9 $\pm$ 4,04**; apirase/PZQ **85,86 $\pm$ 1,01** e adjuvante **68,95 $\pm$ 18,37**) e também com ConA (apirase **100,1 $\pm$ 1,01**; apirase/PZQ **177,3 $\pm$ 11,12** e adjuvante **168,7 $\pm$ 1,013**).



**Figura 26: Perfil de IFN- $\gamma$  de esplenócitos isolados de camundongos C57BL/6 sensibilizados com apirase de batata e tratados com PZQ subterapêutico em protocolo de esquistossomose mansoni.** Os esplenócitos foram isolados a partir de camundongos C57BL/6 submetidos ao protocolo de sensibilização com duas doses de 10 $\mu$ g de apirase de batata e adjuvante, seguido da infecção percutânea com 50 cercárias de *S.mansoni*. e tratamento com 200mg/Kg de praziquantel V.O. As células foram estimuladas *in vitro* com LPS (**B**), Apirase de batata (**C**), ConA (**D**) para avaliar a secreção de IFN- $\gamma$ . As células permaneceram em contato com os estímulos por 72h. Os resultados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 (ANOVA/Dunnett).

#### 4.4.5 Efeito da sensibilização com apirase de batata e tratamento subterapêutico com PZQ sobre granulomas hepáticos de murinos C57BL/6 decorrentes da Esquistossomose mansoni

A análise morfométrica do granuloma hepático (**Figura 27**) demonstrou a redução significativa do diâmetro dos granulomas para os animais sensibilizados ( $116553 \pm 13675$  - **46% de redução**), sensibilizados e tratados ( $108090 \pm 9555$  - **41% de redução**) e apenas tratados ( $128058 \pm 23273$  - **49,6% de redução**).



**Figura 27: Análise morfométrica de granulomas hepáticos de camundongos C57BL/6 sensibilizados com apirase de batata e tratados com PZQ subterapêutico em protocolo de esquistossomose mansoni.** Após protocolo experimental de sensibilização, infecção e tratamento, camundongos C57BL/6, foram eutanasiados com tiopental (150mg/Kg) via intraperitoneal. O lobo direito do fígado foi retirado e fixado em formaldeído 10% até análise. Foram realizadas lavagens para remoção do fixador, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol a partir de 70% até álcool absoluto. Em seguida foram diafanizadas em xilol e foram incluídas em parafina, cortadas em micrótomo obtendo-se cortes de 5μm de espessura. Foram medidos os diâmetros dos granulomas viáveis encontrados em dez campos aleatórios para cada animal (n=5) em cada grupo. Granulomas contendo um único ovo central, encontrados nas lâminas de cada animal infectado foram examinados. As análises foram realizadas em microscópio Primo Star Zeiss, câmera Axicam ERc5s, em objetiva de 10x/0.25 (Plam-ACHROMAT). Os resultados estão representados como média ± desvio padrão, p=0,0027, (Kruskal-Wallis/Dunn).

## 5 DISCUSSÃO

A Esquistossomose mansoni causa uma série de morbidades graves nos hospedeiros humanos, especialmente influenciadas pela formação do granuloma nos órgãos alvo. O fígado é geralmente o mais atingido, uma vez que muitos ovos são transportados pelo intenso fluxo sanguíneo para este órgão, cujos sinusóides são pequenos demais para os ovos atravessarem, por isso morrem dentro do tecido, onde suscitam uma intensa resposta inflamatória capaz de levar a graves consequências, como: hipertensão portal, hepatoesplenomegalia, e ascite (PEARCE & MACDONALD, 2002).

A expressão, durante todo o ciclo de vida do *Schistosoma mansoni* das NTPDases, revela a possibilidade dessas enzimas exercerem importante função no metabolismo de nucleotídeos do parasito (DA'DARA et al., 2014). Trabalhos anteriores mostraram que a movimentação dos vermes adultos e/ou ovos através do endotélio vascular pode suscitar a liberação de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) como o ATP, que são capazes de estimular a resposta imune inflamatória a promover a morte do parasito. Enzimas presentes na superfície do tegumento que utilizam ATP extracelular como substrato, podem auxiliar na garantia da sobrevivência dos vermes adultos de *S.mansoni*, pois assim podem eliminar grande parte do sinal de dano. Dentre este conjunto de enzimas se encontram as isoformas de NTPDases de *S.mansoni* (VASCONCELOS et al., 1996; BHARDWAJ et al., 2009; DA'DARA et al., 2014 a e b).

No que diz respeito a estrutura e imunogenicidade, nosso grupo comprovou a produção de anticorpos contra apirase de batata (NTPDase de *Solanum tuberosum*), proteína vegetal com alta homologia com as SmTPDases (FARIA-PINTO et al., 2008), demonstrando uma reação cruzada com as isoformas presentes no parasito (VASCONCELOS et al., 1996; FARIA-PINTO et al., 2004, 2006; VASCONCELOS et al., 2009). Outros dados apontam que a proteína vegetal pode modular o sistema imunológico de murinos em modelo experimental de esquistossomose (GUSMÃO, 2017).

Neste trabalho, foi avaliada a resposta imune promovida após sensibilização com apirase de batata associada ou não ao PZQ subterapêutico em camundongos Balb/c, além disso, a potencial imunomodulação desta proteína foi

verificada em protocolo de esquistossomose experimental juntamente ou não à dose subcurativa com PZQ, em murinos C57BL/6. A escolha das linhagens em protocolos experimentais distintos se deve ao fato das diferenças existentes no *background* genético (WATANABE et al., 2004). Células T de camundongos C57BL/6 preferencialmente produzem citocinas Th1, como, interferon (IFN) e baixas concentrações de interleucina 4 (IL-4), enquanto aqueles os Balb/c favorecem a produção de citocinas Th2 com altos níveis de IL-4 e reduzidos de IFN (MILLS et al., 2000), com risco de não sobreviver até o fim do protocolo experimental. O *background* genético é importante no equilíbrio Th1/Th2 em murinos (HSIEH et al., 1995; STEWART et al., 2002). De fato, Alves e cols. (2016) encontram diferenças entre as linhagens durante a infecção experimental por *S.mansoni* (estirpe LE), neste estudo animais Balb/c apresentaram granulomas com áreas maiores e aumento significativo de IL-4 e IL-13, ao passo que os murinos C57BL/6 exibiram granulomas reduzidos e aumento de IL-10.

A obtenção da apirase de batata através da purificação aqui proposta, demonstrou-se bem sucedida, uma vez que os níveis de atividade ATPásica e ADPásica foram correspondentes àqueles já descritos na literatura por ANICH e cols. (1990) – atividade ATPásica e ADPásica de 213 e 133  $\mu\text{molPi}/\text{min}/560\text{g}$  na devida ordem. Assim como, RIEWE et al., 2008 obtiveram  $1239 \pm 363 \mu\text{molPi}/\text{min}/\text{mg}$ .

Neste estudo a sensibilização de camundongos Balb/c com apirase de batata induziu a produção de níveis significativos de IgG, quando associada ao PZQ subterapêutico. Os níveis de IgG1 e IgG2a também foram significativamente maiores neste grupo de animais, em relação ao controle não sensibilizado/tratado, além disso apenas a sensibilização com a proteína vegetal produziu níveis significativos dessas subclasses de IgG. Esses dados demonstram que a apirase de batata induz de forma significativa a produção de anticorpos, ainda mais quando combinada ao PZQ. Resultado este, semelhante ao obtido por ROFFATO e cols. (2013), quando utilizou proteínas do tegumento do verme (SmAP, SmPP-5, SmNTPDase). Isso pode indicar que a proteína esteja mais acessível ao sistema imune quando empregado praziquantel subcurativo, por um mecanismo ainda incompreendido (ROFFATO et al., 2013), corroborando com a hipótese de sinergismo entre PZQ e sistema imune anteriormente descrita (BRINDLEY et al., 1989; FALLON et al., 1994).

Nas condições em que foram realizados os ensaios deste trabalho, os murinos sensibilizados com alúmen não foram capazes de induzir a produção de IgE, bem como reduziram as células CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> e a produção de IFN- $\gamma$  após estímulo *in vitro*, mas apresentaram aumento significativo de células CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> e anticorpos IgG2a. Especulamos, que tenha ocorrido uma resposta a células B produtoras de IgG2a em decorrência da sensibilização realizada com alúmen.

Os adjuvantes de alumínio foram identificados há mais de 70 anos por GLENNY et al. (1926). Possuem uma boa liberação do antígeno e apresentam um efeito-depósito moderado (COX & COULTER, 1997), além de toxicidade mínima (MARRACK et al., 2009). O alúmen é reconhecido por células dendríticas através de lipídios contidos na membrana plasmática e desencadeia uma sinalização capaz de inibir a secreção de IL-12, por essas células, o que pode explicar a limitada capacidade deste adjuvante em induzir uma resposta Th1 (MORI et al., 2012), sendo bem conhecido por induzir uma produção significativa de IL-4 e contribuir para imunidade humoral (AUDIBERT & LISE, 1993; ULANOVA et al., 2001). Outras atividades biológicas destes sais podem ser destacadas: formação de depósito de antígenos nos tecidos para produzir uma exposição prolongada; produção de antígenos particulados para facilitar a apresentação para células apresentadoras de antígeno e ativação do sistema complemento, além da estimulação dos macrófagos para induzir retenção e ativação de linfócitos (LINDBLAD, 2004). Este adjuvante possui algumas limitações, como reações locais, produção de níveis acentuados de anticorpos do tipo IgE e a incapacidade de estimular a imunidade mediada por células (BAYLOR et al., 2002).

Neste trabalho não foram encontrados níveis significativos de IgE em murinos Balb/c nos grupos testados em relação ao grupo controle. Este achado remete a ideia de que a sensibilização com apirase de batata possa não interferir na proteção contra a infecção por *S.mansoni*, uma vez que existe correlação positiva entre a resposta específica de IgE na esquistossomose e a resistência à reinfeção (STONE et al. 2010). Diferente do que foi encontrado por Gusmão (2017), onde a sensibilização de camundongos de diversas linhagens com apirase de batata, usando adjuvante de Freund foi capaz de induzir níveis de IgE específicos anti-apirase.

A redução significativa de células CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> em camundongos Balb/c sensibilizados com apirase de batata, pode auxiliar na redução

da indução patológica, especialmente mediada por células T CD4<sup>+</sup>. Interessante notar, que essa redução foi ainda mais expressiva quando os animais foram apenas sensibilizados com a proteína vegetal para estes estímulos. A infecção por *S.mansoni* suscita a produção de diversas citocinas de forma complexa, sendo que os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, possuem papéis importantes na ativação e manutenção da resposta (PEARCE & MACDONALD, 2002).

A redução significativa de IFN- $\gamma$  nas células do baço por parte dos animais que receberam sensibilização e/ou sensibilização e tratamento remete à especulação de que a apirase de batata, especialmente quando empregada com tratamento subterapêutico de PZQ, possa diminuir o tempo de resposta predominante Th1 - própria do início da esquistossomose mansoni - já que o IFN- $\gamma$  é uma citocina característica desse tipo de resposta. Diferente dos resultados encontrados por MELO e cols. (2010), em que houve produção significativa dessa citocina no sobrenadante de esplenócitos de camundongos imunizados com Smtcg (proteínas do tegumento de *S.mansoni*).

Os níveis de IL-17 em murinos Balb/c não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos testados, comparados ao controle. Os achados de IL-17 neste estudo apresentaram-se bem variáveis entre animais de alguns grupos experimentados, impedindo que uma conclusão mais objetiva fosse obtida. Ainda assim, o fato da IL-17 não se apresentar elevada nos grupos que receberam apirase de batata, é indicativo que esta proteína possa contribuir na evolução benigna do quadro de reação granulomatosa grave na esquistossomose, com a redução precoce do infiltrado inflamatório e resolução deste.

A célula Th17 é uma classe recentemente identificada de células T CD4<sup>+</sup> efetoras e produz IL-17. Essas células exercem um papel crítico na indução e propagação da autoimunidade. A IL-17 induz a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6, além de quimiocinas que promovem recrutamento e ativação de neutrófilos e macrófagos (BERINGER et al., 2016). Em esquistossomose, a IL-17 ainda foi pouco explorada. Em modelos experimentais, os resultados indicam que altos níveis desta citocina são correlacionados com agravamento da inflamação granulomatosa, e que após a IL-17 ser neutralizada, ocorre melhora da inflamação (SMITH et al., 2009; PONICHTERA & STADECKER, 2015).

A produção significativa de anticorpos IgG1 anti-SWAP em soros de Balb/c sensibilizados com a proteína vegetal e encontrada no experimento em questão, evidencia a reatividade cruzada entre a apirase de batata e isoformas de *S.mansoni*. Fato este também relatado em outros dados do grupo, onde camundongos Swiss previamente sensibilizados com apirase de batata responderam se forma significativa com elevada produção de IgG1 a antígenos solúveis do ovo (SEA).

A reatividade cruzada para IgE anti-SWAP significativamente aumentada nos murinos Balb/c após sensibilização com apirase de batata sugere que as SmATPases e apirase de batata compartilham epítomos para anticorpo IgE, que também já foi demonstrado em trabalhos anteriores do grupo.

Os números de células CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> produzido após os esplenócitos serem estimulados com SWAP, foi muito semelhante àquele quando a apirase de batata era o estímulo *in vitro*, ou seja, a redução expressiva destas células após serem sensibilizadas com SWAP. Esta semelhança evidencia que os epítomos compartilhados entre proteínas presentes no SWAP – possivelmente NTPDases – e a apirase de batata, possuem envolvimento na resposta imune, com efeitos semelhantes.

Do mesmo modo, a produção de IFN- $\gamma$  também foi semelhante nos grupos de animais experimentados para ambos estímulos, exceto quando os animais foram apenas tratados com PZQ subterapêutico. Neste caso, a produção de IFN- $\gamma$  foi significativamente elevada após os esplenócitos serem estimulados com SWAP. Fato este pode estar relacionado à forma peculiar de sinergismo existente entre apirase de batata e PZQ subcurativo, capaz de reduzir esta citocina, especialmente a uma nova exposição antigênica, que também pode explicar e acentuada e significativa redução de IL-17 por parte do grupo sensibilizado e tratado, quando reestimulado *in vitro* com SWAP. Sakaguchi et al., (2006) demonstraram que células Th17 atuam como mediadoras da patologia durante a esquistossomose. Portanto, os achados deste trabalho quanto à IL-17, apontam para um possível efeito imunomodulador capaz de reduzir a patologia associada a doença.

No que diz respeito a estrutura e imunogenicidade, nosso grupo comprovou a produção de anticorpos contra apirase de batata (NTPDase de *Solanum tuberosum*), proteína vegetal com alta homologia com as SmTPDases

(FARIA-PINTO et al., 2008), com reação cruzada com as isoformas presentes no parasito (VASCONCELOS et al., 1996; FARIA-PINTO et al., 2004, 2006; VASCONCELOS et al., 2009).

A reatividade cruzada existente entre apirase de batata com isoformas de NTPDases de *S.mansoni*, já foi comprovada em estudos anteriores (VASCONCELOS et al., 2009; FARIA-PINTO et al. 2004, 2008, 2010) e outros dados do nosso grupo que apontam a proteína vegetal como potencial moduladora do sistema imunológico de murinos em modelo experimental de esquistossomose.

A vacinação seria a melhor maneira de obter sucesso no controle da esquistossomose em longo prazo (MOLEHIN, et al., 2016). A vacina tem o papel de estimular a imunidade específica levando a redução do número de vermes, dos ovos nos tecidos e da patologia no fígado (ROMEIH et al., 2008). Chaiworaporn e cols. (2005) verificaram que vermes adultos de *S.mansoni* foram parcialmente susceptíveis a dose subterapêutica e conseqüentemente houve redução do número de ovos. É interessante notar, que no presente estudo, o PZQ, mesmo empregado em dose subterapêutica, reduziu de forma expressiva e significativa o número de vermes quando comparado ao controle não tratado. Este achado corrobora com o estudo supracitado, que além da redução do número de vermes também demonstrou ovos não viáveis no fígado de camundongos tratados com 300mg/Kg de PZQ uma semana após tratamento. O que reforça o uso da dose subcurativa com o intuito do controle da morbidade.

Nas condições testadas no presente estudo, a sensibilização com apirase de batata não foi capaz de proteger camundongos C57BL/6 contra infecção por *S.mansoni*, se comparada ao grupo PZQ. Apesar disso, a sensibilização com a proteína vegetal induziu níveis significativos de IgG e das subclasses IgG1 e IgG2a, especialmente quando combinada ao PZQ subterapêutico. Esses dados afirmam a capacidade da apirase de batata induzir a produção de anticorpos e que esses níveis se mantêm após infecção, possivelmente, pelo estímulo induzido pelos epítomos compartilhados com SmATPDases do parasito.

Vale ressaltar que a considerável produção de IgG1 - particularmente nos animais submetidos a sensibilização e tratamento - é de extrema importância, visto que níveis elevados desta imunoglobulina estão associados à resposta Th2 em modelo murino durante a progressão da doença, e participação da regulação

negativa do granuloma e da morte do parasito (ZOUAIN et al., 2000). Além disso, Levano-Garcia e cols. (2008) verificaram indução predominante de IgG1 após imunizar murinos C57BL/6 com as isoformas de SmATPDases recombinantes do parasito, em relação à imunização com as isoformas isoladas.

Na linhagem C57BL/6 ocorre produção de IgG2c em vez de IgG2a, devido a deleção do gene responsável pela produção deste anticorpo (ZHANG et al., 2012), mas há uma reatividade cruzada entre essas subclasses. Essas subclasses de IgG também estão elencadas com a resposta Th1 e o “switching” para esses subtipos é dependente de citocinas sinalizadoras, tais como IFN- $\gamma$ . A elevação significativa desta citocina por parte dos esplenócitos de animais sensibilizados e tratados (encontrada neste estudo) após estímulo *in vitro*, juntamente com a elevação significativa da produção de IgG2a nestes mesmos animais revelam que a apirase de batata pode exercer um efeito regulador, posto que há indícios da atuação do IFN- $\gamma$  limitando o dano tecidual associado à inflamação e modula a resposta T *helper* e diferenciação de células Treg (HU et al., 2009; SOUZA-GOMES et al., 2012).

Embora na literatura a produção de IgE seja relacionada com a capacidade de proteção contra *S.mansoni* (ZHANG et al., 2006; NEGRAO-CORREA et al., 2014), neste trabalho camundongos C57BL/6 sensibilizados com apirase de batata e tratados com PZQ subcurativo apresentaram níveis significativamente aumentados de anticorpos IgE - após protocolo experimental de esquistossomose mansoni – sem redução do número de vermes. Resultados semelhantes já haviam sido observados por nosso grupo, nesta linhagem de murinos e também em camundongos *Swiss* (dados não publicados) sensibilizados com a proteína vegetal. Já foi comprovado que o aumento dos níveis de IgE específicos para antígenos do parasito na esquistossomose murina e humana aumenta após tratamento da doença devido a morte dos vermes e consequente exposição de antígenos ao sistema imune do hospedeiro (WALTER et al., 2006). Isso pode explicar a diferença estatística de produção desta imunoglobulina encontrada no grupo sensibilizado e tratado neste estudo.

Melo e cols. (2013), utilizou SmTeg (proteínas do tegumento de *S.mansoni*) para imunizar murinos C57BL/6 e observou produção significativa de

IgG2c e IFN- $\gamma$  por parte dos camundongos imunizados, além de proteção à doença (43,1%). A apirase de batata, sob nossas condições experimentais, além de aumentar significativamente os níveis de IgG2a e IFN- $\gamma$ , também foi capaz de reduzir a produção de IL-17 quando associada ao PZQ, sem a presença de estímulo *in vitro*, apesar de não fornecer proteção contra esquistossomose. Também PINTO e cols. (2010) não obtiveram proteção ao imunizar murinos com rSmlg (proteína tegumentar de *S.mansoni*), mas a patologia hepática foi amenizada, com reduções significativas do volume do granuloma hepático e do conteúdo de fibrose.

A compreensão dos mecanismos imunes relacionados à proteção na esquistossomose é complexa dada os diversos mecanismos de evasão do sistema imune – do hospedeiro mamífero - que o parasito possui. Neste contexto, várias moléculas vêm sendo exploradas como potenciais candidatos à vacina. Contudo os ovos depositados em tecidos do hospedeiro são responsáveis pela patologia da doença (THETIOT-LAURENT, 2013). Um antígeno capaz de modular a resposta imune de maneira a promover a redução da área do granuloma, pode ser muito promissor, especialmente se associado à terapia atualmente disponível, visto que esta última é muito eficiente na redução da carga parasitária. Esta associação pode levar a resultados interessantes em termos de redução da morbidade na esquistossomose.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a apirase de batata não é antígeno vacinal, mas de alguma forma foi capaz de modular a resposta imune frente à Esquistossomose mansoni, promovendo a redução do granuloma hepático. Os dados indicam ainda que a associação com praziquantel potencializou a resposta a essa proteína. Desse modo, são necessários mais estudos em modelo animal para apuração de outros parâmetros e confirmação dos dados. Assim, pois, nossos dados fornecem indícios de que a sensibilização com apirase de batata possa regular o granuloma hepático e reduzir a patologia provocados pela Esquistossomose mansoni em murinos, sendo assim uma importante ferramenta na melhor compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos no processo.

## 6 CONCLUSÕES

Dentro do modelo proposto e das condições experimentais em que foram realizados os ensaios, é possível concluir:

- A apirase de batata induziu a produção de IgG e subclasses IgG1 e IgG2a em murinos Balb/c, sendo que a associação com PZQ melhora essa resposta, indicando uma melhor acessibilidade da proteína ao sistema imunológico quando o PZQ foi combinado;
- O número de células CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> no baço de camundongos Balb/c previamente sensibilizados com apirase de batata apresentou redução, bem como os níveis de IFN- $\gamma$ , o que aponta para um possível tempo de resposta Th1 reduzido, que consequente pode reduzir a reação inflamatória focal em torno dos ovos de *S.mansoni*;
- A proteína vegetal suscita a produção de anticorpos IgG1 anti-SWAP específicos e redução de citocinas IFN- $\gamma$  e IL-17 em camundongos Balb/c sensibilizados com a proteína vegetal e tratados com dose subterapêutica de praziquantel, sugerindo um efeito sinérgico dessa combinação sobre o sistema imunológico, que possivelmente pode reduzir a patologia associada ao ovo de *S.mansoni*;
- A sensibilização com apirase de batata combinada ao tratamento com PZQ subcurativo estimulou a produção de IgG1 anti-SWAP específicos e redução de IFN- $\gamma$  e IL-17 em camundongos Balb/c, o que evidencia os epítomos compartilhados entre proteínas do verme adulto, possivelmente NTPDases, e apirase de batata, além do fato de ambas serem capazes de induzirem a resposta imune;
- A apirase de batata não induziu proteção em camundongos C57BL/6 sensibilizados e infectados com *S.mansoni*, mas pode ter efeitos imunomodulatórios sobre o granuloma nos animais sensibilizados com essa

proteína, quando associada ao PZQ subterapêutico, uma vez que o diâmetro do granuloma foi reduzido, nestes animais;

- A proteína vegetal associada ao PZQ subcurativo suscita a produção de IgG, IgG1, IgG2a e IFN- $\gamma$  no modelo de esquistossomose experimental em murinos C57BL/6 e reduz células CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> e a citocina IL-17, indicando que essa proteína pode atuar na modulação do granuloma hepático por mecanismos distintos;
- A apirase de batata induziu a produção de anticorpos IgE na esquistossomose murina de C57BL/6, sugerindo que os epítomos compartilhados entre apirase de batata e as SmATPDases podem induzir a produção desses anticorpos na progressão da doença;
- Ambas as linhagens - Balb/c e C57BL/6 – nas condições experimentais empregadas apresentaram respostas divergentes, quando os camundongos foram apenas sensibilizados com alúmen, daquelas descritas na literatura utilizando outras proteínas do tegumento, por isso são necessários mais estudos para confirmação deste achado.

## REFERÊNCIAS

ANDREWS, P. Praziquantel: Mechanisms of antischistosomal activity. **Pharmacology and Therapeutics**, v.29, n.1, p.129-156, 1985.

ANICH, M.; FANTA, N.; MANCILLA, M.; KETTLUN, A. M.; VALENZUELA, M. A.; TRAVERSO-CORI, A. Apyrase activity and changes in metabolites during germination and tuberization of *Solanum tuberosum*. **Phytochemistry**, v.29, n.5, 1411–1415, 1990.

ALAN FENWICK, A.; JOURDAN, P. Schistosomiasis elimination by 2020 or 2030? **International Journal for Parasitology**, v.46, p.385–388, 2016.

AL-QAOUUD, K.M.; FLEISCHER, B.; HOERAUF, A. The Xid defect imparts susceptibility to experimental murine filarioid association with a lack of antibody and IL-10 production by B cells in response to phosphorylcholine. **International Immunology**, v. 10, p.17-25, 1998.

ALVES, C.C.; ARAÚJO, N.; CASSALI, G.D.; FONSECA, C.T. Parasitological, pathological, and immunological parameters associated with *Schistosoma mansoni* infection and reinfection in BALB/c AND C57BL/6 mice. **Journal of Parasitology**, v.102, n.3, p.336-341, 2016.

ARAGON, A. D.; IMANI, R. A.; BLCARBURN, V. R.; CUPIT, P. M.; MELMAN, S. D.; GORONGA, T.; WEBB, T.; LOKER, E. S.; CUNNINGHAM, C. Towards an understanding of the mechanism of action of praziquantel. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.164, n.1, p.57-65, 2009.

ASAI, T.; MIZUNO, F.; KOJIMA, S.; TAKEUCHI, T.; KOBAYASHI, A.; SUZUKI, Y. High correlation in antibody titers between the Sabin- Feldman dye test and an enzyme-linked immunosorbent assay detecting immunoglobulin G antibodies to the nucleoside triphosphate hydrolase of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, p.1291–1293, 1992.

ASHOUR, A. A.; AHMED, S. A.; MAGHRABY, A. S.; ZHRAN, H. G. Immunoprophylactic effect of single and mixed schistosomal antigens on *Schistosoma mansoni* infected mice. **Egyptian Journal of Hospital Medicine**, v.14, p.86-103, 2004.

ASSARÉ, R. K.; TRA, M. B. I.; OUATTARA, M.; HURLIMANN, E.; COULIBALY, J. T.; N'GORAN, E. K.; UTZINGER, J. Sensitivity of the Point-of-Care Circulating Cathodic antigen urine cassette test for diagnosis of *Schistosoma mansoni* in low-endemicity settings in Côte d'Ivoire. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.99, n.6, p.1567-1572.

AUDIBERT, F.M.; LISE, L.D. Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. **Immunology Today**, v.14, p.281-284, 1993.

BAHARDWAJ, R.; SKELLY, J. "Purinergic signaling and immune modulation at the schistosome surface?" **Trends Parasitology**, v.25, n.6, p.237-270, 2009.

BAKER, M.C.; MATHIEU, E.; FLEMING, F.M.; DEMING, M.; KING, J.D.; GARBA, A.; KOROMA, J.B.; BOCKARIE, M.; KABORE, A.; SANKARA, D.P.; MOLYNEUX, D.H. Mapping, monitoring, and surveillance of neglected tropical diseases: towards a policy framework. **Lancet**, v.375, p.231–238, 2010.

BARSOUM, R. S.; ESMAT G.; EL-BAZ, T. Human Schistosomiasis: Clinical Perspective: Review. **Journal of Advanced Research**, v.3, p.433-444. 2013.

BAYLOR, N.M.; ERGAN, W.; RICHMAN, P. Aluminum salts in vaccines-US perspective. **Vaccine**, v.20, S18–S23, 2002.

BECKER, B.; MEHLHORN, H.; ANDREWS, P.; THOMAS, H.; ECKERT, J. Light and electron microscopic studies on the effect of praziquantel on *Schistosoma mansoni*, *Dicrocoelium dendriticum*, and *Fasciola hepática* (Trematoda) in vitro. **Z. Parasitenkd**, v.63, p.113–128, 1980.

BERHE, N. Variations in helminth faecal counts in Kato-Katz thick smears and their implications in assessing infection status with *Schistosoma mansoni*. **Acta Tropica**, v.92, n.3, p.2015-212, 2004.

BERINGER, A.; NOACK, M.; MIOSSEC, P. IL-17 in Chronic Inflammation: From Discovery to Targeting. **Trends in Molecular Medicine**, v.22, n.3, p.230-241, 2016.

BETHONY, J. M.; COLE, R. N.; GUO, S. KAMHAWI, M. W.; LIGHTOWLERS, A.; LOUKAS, W.; PETRI, S.; REED, J. G. VALENZUELA.; HOTEZ, P. J. Vaccines to combat the neglected tropical diseases. **Revista Immunology**, v.239, n.1, p.237-270, 2011.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE - Secretaria de Vigilância em Saúde/Departamento de Vigilância Epidemiológica e Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Vigilância da Esquistossomose Mansoni: diretrizes técnicas, 4. Ed., Brasília, 2014.

BRASIL. Instituto de Tecnologia de Fármacos - Farmanguinhos/FIOCRUZ. Praziquantel. DMG-FAR-PRO-PRZ-001-2017.

BRINDLEY, P. J.; SHER, A. Immunological involvement in the efficacy of Praziquantel. **Experimental Parasitology**, v.71, n.2, p.245-248, 1990.

BRINDLEY, P. J.; STRAND, M.; NORDEN, A. P.; SHER, A. Role of host antibody in the chemotherapeutic action of Praziquantel against *Schistosoma mansoni*: identification of target antigens. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.34, p.99-108, 1989.

BURKE, M. L.; JONES, M. K.; GOBERT, G. N.; LI, Y. S.; ELLIS, M. K.; MCMANUS, D. P. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. **Parasite Immunology**, v.31, p.163-176, 2009.

- BOURKE, C. D.; NAUSCH, N.; RUJENI, N.; APPLEBY, L. J.; TROTTEIN, F.; MIDZI3, N.; MDULUZA, T.; MUTAPI, F. Cytokine responses to the anti-schistosome vaccine candidate antigen Glutathione-S-transferase vary with host age and are boosted by praziquantel treatment. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.8, n.5, e2846, 2014.
- BOTROS, S.; SOLIMAN, A.; EL-GAWHARY, N.; SELIM, M.; GUIRGUIS, N. Effect of combined low dose praziquantel and oxamniquine on different stages of schistosome maturity. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.83, n.1, p.86-89, 1989.
- CARDOSO, F. C.; PACIFICO, R. N.; MORTARA, R. A.; OLIVEIRA, S. C. Human antibody responses of patients living in endemic areas for schistosomiasis to the tegumental protein Sm29 identified through genomic studies. **Clinical & Experimental Immunology**, v.144, n.3, p.382-391, 2006.
- CARDOSO, F. C.; MACEDO, G. C.; GAVA, E.; KITTEN, G. T.; MATI, V. L.; DE MELO, A. L.; CALIARI, M. V.; ALMEIDA, G. T.; VENANCIO, T. M.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; OLIVEIRA, S. C. *Schistosoma mansoni* tegument protein Sm29 is able to induce a Th1-type of immune response and protection against parasite infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, n.10, e308, 2008.
- CARNEIRO, M.; NEGRÃO-CORRÊA, D. A.; GEIGER, S. M. Evaluation of diagnostic methods for the detection of intestinal schistosomiasis in endemic areas with low parasite loads: Saline gradient, *Helmintex*, Kato-Katz and rapid urine test. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.12, n.2, e0006232, 2018.
- CARVALHO, M. E. S.; MENDONÇA, F. de A.; dos SANTOS, S. S. C. Variabilidade climática e a modelagem ecológica da *Biomphalaria glabrata*: cenários futuros (2050 e 2070) para o hospedeiro intermediário da esquistossomose no Brasil. In: CONGRESSO NACIONAL DE GEOGRAFIA FÍSICA, 2017, Campinas. Anais. Campinas: Instituto de Geociências - Unicamp, 2017.
- CARVALHO, O. dos S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. *Schistosoma mansoni* & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. 20. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008.
- CAVALCANTI, M. G.; SILVA, L. F.; PERALTA, R. H. S.; BARRETO, M. G. M.; PERALTA, J. M. Schistosomiasis in areas of low endemicity: a new era in diagnosis. **Cell Press**, v.29, n.2, p.75-82, 2013.
- CHAN, J. D.; AGBEDANU, P. N.; ZAMANIAN, M.; GRUBA, S. M.; HAYNES, C. L.; DAY, T. A.; MARCHANT, J. S. "Death and axes": unexpected  $Ca^{2+}$  entry phenologs predict new anti-schistosomal agents. **PLoS Pathogens**, v.10, n.2, e1003942, 2014.
- CHAIWORAPORN, R.; MANEERAT, Y.; ROJEKITTIKHUN, W.; RAMASOOTA, P.; JANECHARUT, T.; MATSUDA, H.; KITIKOON, V. Therapeutic effect of subcurative dose praziquantel on *Schistosoma mansoni* infected mice and resistance to challenge infection after treatment. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v.36, n.4, p.846-852, 2005.

- CHAN, J. D.; ZAROWIECKI, M.; MARCHANT, J. S. Ca<sup>2+</sup> channels and Praziquantel: a view from the free world. **Parasitology International**, v.62, n.6, p.619-628, 2013.
- CHENG, W.; CURTI, E.; REZENDE, W. C.; KWITYN, C.; ZHAN, B.; GILLESPIE, P.; PLIESKATT, J.; JOSHI, S. B.; VOLKIN, D. B.; HOTEZ, P. J. MIDDAUGH, C. R.; BOTTAZZI, M. E. Biophysical and formulation studies of the *Schistosoma mansoni* TSP-2 extracellular domain recombinant protein, a lead vaccine candidate antigen for intestinal schistosomiasis. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v.9, p.2351-2361, 2013.
- CHOFLE, A. A.; JAKA, H.; KOY, M.; SMART, L. R.; KABANGILA, R.; EWINGS, F. M.; MAZIGO, H. D.; JOHNSONJR, W. D.; FITZGERALD, D.W.; PECK, R. N.; DOWNS, J. A. Oesophageal varices, schistosomiasis, and mortality among patients admitted with haematemesis in Mwanza, Tanzania: a prospective cohort study. **BMC Infectious Diseases**, v.14, n.303, p.1-10, 2014.
- CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; ARCHER, S. Antischistosomal drugs: past, present and future? **Pharmacology & Therapeutics**, v.68, p.35-85, 1995.
- CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L. Praziquantel. **Parasitology**, res. 90, S3–S9. 2003.
- CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; BASSO, A.; GUIDI, A. Schistosomiasis control: praziquantel forever? **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.195, n.1, p.23-29, 2014.
- COELHO, P. M. Z.; JURBERG, A. D.; OLIVEIRA, Á. A.; KATZ, N. Use of a saline gradient for the diagnosis of schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, n.5, p.720-723, 2009.
- COFFMAN, R. L.; SHER, A.; SEDER, R. A. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. **Immunity**, v.33, n.4, p.492-503, 2010.
- COLLEY, D. G.; BUSTINDUY, A. L.; SECOR, W. E.; KING, C. H. Human schistosomiasis. **The Lancet**, v.383, n.9936, p.2253-2264, 2014.
- COULIBALY, J. T.; N'GBESSO, Y. K.; KNOPP, S.; N'GUESSAN, N. A.; SILUÉ, K. D.; VAN DAM, G. J.; N'GORAN, E. K.; UTZINGER, J. Accuracy of urine circulating cathodic antigen test for the diagnosis of *Schistosoma mansoni* in preschool-aged children before and after treatment. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.7, e2109, issue. 3, 2013.
- COX, J.C.; COULTER, A.R. Adjuvants - a classification and review of their modes of action. **Send to Vaccine**, v.15, n.3, p.248-56, 1997.
- CURTI, E.; KWITYN, C.; ZHAN, B.; GILLESPIE, P.; BRELSFORD, J.; DEUMIC, V.; PLIESKATT, J.; REZENDE, W. C.; TSAO, E. KALAMPANAYIL, B. HOTEZ, P. J.; BOTTAZZI, M. E. Expression at a 20L scale and purification of the extracellular domain of the *Schistosoma mansoni* TSP-2 recombinant protein: a vaccine candidate for human intestinal schistosomiasis. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v.9, n.11, p.2342-2350, 2013.

DA'DARA, A. A.; LI, Y. S.; XIONG, T.; ZHOU, J.; WILLIAMS, G. M.; MCMANUS, D. P.; GENG, Z.; YU, X. L.; GRAY, D. J.; HARN, D. A. DNA-based vaccines protect against zoonotic schistosomiasis in water buffalo. **Vaccine**, v.26, n.29/30, p.3617-3625, 2008.

DA'DARA, A. A.; BHARDWAJ, R.; ALI, Y. B.; SKELLY, P. J. Schistosome apyrase SmATPDase 1, but not SmATPDase 2, hydrolyses exogenous ATP and ADP. **Purinergic Signal**, v.10, n.7, p.573-580, 2014.

DAY, T. A.; BENNETT, J. L.; PAX, R.A. Praziquantel: the enigmatic antiparasitic. **Parasitology Today**, v.8, n.10, p.342-344, 1992.

DE JONGE, N.; KREMSNER, P. G.; KRIJGER, F. W.; SCHOMMER, G.; FILLIÉ, Y. E.; KORNELIS, D.; VAN ZEYL, R. J.; FELDMIEIER, H.; DELLDER, A. M. Detection of the schistosome circulating cathodic antigen by enzyme immunoassay using biotinylated monoclonal antibodies. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.84, n.6, p.815-818, 1990.

DeMARCO, R.; KOWALTOWSKI, A. T.; MORTARA, R.A; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. Molecular characterization and immunolocalization of *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.307, n.4, p.831-838, 2003.

DE MELO, T. T.; DE ARAUJO, J. M.; DO VALLE DURÃES, F.; CALIARI, M. V.; OLIVEIRA, S. C.; COELHO, P. M. Z.; FONSECA, C. T. Immunization with newly transformed *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument elicits tegument damage, reduction in egg and parasite burden. **Parasite Immunology**, v.32, n.11/12, p.749-759, 2010.

DE MELO, T. T.; ARAUJO, J. M.; DE SENA, I. C.; ALVES, C. C.; ARAÚJO, N.; FONSECA, C. T. Evaluation of the protective immune response induced in mice by immunization with *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument (Smteg) in association with CpG-ODN. **Microbes and Infection**, v.15, n.1, p.28-36, 2013.

DE OLIVEIRA, F. L. A.; TORRERO, M. N.; TOCHEVA, A. S.; MITRE, E.; DAVIES, S. J. Induction of type 2 responses by schistosome worms during prepatent infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v.201, n.3, p.464-472, 2010.

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

DOENHOFF, M. J.;SABAH, A. A.; FLETCHER, C.; WEBBE, G.; BAIN, J. Evidence for an immune-dependent action of praziquantel on *Shistosoma mansoni* in mice. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Higieny**, v.81, n.6, p.947-951, 1987.

DUNNE, D. W.; WEBSTER, M.; SMITH, P.; LANGLEY, J. G.; RICHARDSON, B. A.; FULFORD, A. J. C.; BUTTERWORTH, A. E.; STURROCK, R. F.; KARIUKI, H. OUMA, J. H. The isolation of a 22kDa band after SDS-PAGE of *Schistosoma mansoni* adult worms and its use to demonstrate that IgE response against the antigen(s) it contains are associated with human resistance to reinfection. **Parasite Immunology**, v.19, n.2, p.79-90, 1997.

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

EL-FAHAM, M. H.; WHEATCROFT-FRANCKLOW, K. J.; PRICE, H. P.; SAYERS, J. J. R.; DOENHOFF, M. *Schistosoma mansoni* cercarial elastase (SmCE): differences in immunogenic properties of native and recombinant forms. **Parasitology**, v.144, n.10, p.1356-1364, 2017.

EL RIDI, R. F. A.; TALLIMA, H. A. M. Novel therapeutic and prevention approaches for schistosomiasis: review. **Journal of Advanced Research**, v.4, n.5, p.467-478, 2013.

EL-RIDI, R.; TALLIMA, H. Vaccine-induced protection against murine schistosomiasis mansoni with larval excretory-secretory antigens and papain or type-2 cytokines. **Journal Parasitology**, v.99, n.2, p.194-202, 2013.

ETEWA, S. E.; ABD EL-AAL, N. F. ABDEL-RAHMAN, S. A. ABD EL BARY, E. H. EL SHAFEI, M. A. Studies on the role of tumor necrosis factor- alpha (TNF- $\alpha$ ) in hepatocytes induced apoptosis in vaccinated, *Schistosoma mansoni*-challenged mice. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v.45, n.1, p.47-60, 2015.

FALLON, P. G.; DOENHOEFF, M.J. Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.51, n.1, p. 83-88, 1994.

FALLON, P. G.; SMITH, P.; NICHOLLS, T.; MODHA, J.; DOENHOFF, M. J. Praziquantel-induced exposure of *Schistosoma mansoni* alkaline phosphatase: drug-antibody synergy which acts preferentially against female worms. **Parasite Immunology**, v.16, n.10, p.529-535, 1994.

FALLON, P. G.; FOOKES, R. E.; WHARTON, G. A. Temporal difference in praziquantel- and oxamniquine-induced tegumental damage to adult *Schistosoma mansoni*: implications of drug-antibody synergy. **Parasitology**, v.112, n.1, p.47-58, 1996.

FALLON, P. G.; EMSON, C. L.; SMITH, P.; MCKENZIE, A. N. IL-13 overexpression predisposes to anaphylaxis following antigen sensitization. **Journal of Immunology**, v.166, n.4, p.2712-2716, 2001.

FAIRFAX, K.; NASCIMENTO, M.; HUANG, S. C.; EVERTS, B.; PEARCE, E. J. Th2 responses in schistosomiasis. **Seminars in immunopathology**, v.36, n.6, p.863-871, 2012.

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

FARIA-PINTO, P.; REZENDE-SOARES, F. A.; MOLICA, A. M.; MONTESANO, M. A.; MARQUES, M. J.; ROCHA, M. O. C.; GOMES, J. A. S.; ENK, M. J.; CORREA-OLIVEIRA, R.; COELHO, P. M. Z.; NETO, S. M.; FRANCO, O. L.; VASCONCELOS, E. G. Mapping of the conserved antigenic domains shared between potato apyrase and parasites ATP diphosphohydrolases: potential application in human parasitic diseases. **Parasitology**, v.135, n.10, p.943-953, 2008.

FARIA-PINTO, P.; MENDES, R. G. P. R.; CARVALHO-CAMPOS, C.; MAIA, A. C. R. G.; OLIVEIRA, A. A.; COELHO, P. M. Z.; VASCONCELOS, E. G. Detection of IgG1 and IgG4 subtypes reactive against potato apyrase in schistosomiasis patients. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.105, n.10, p.370–373, 2010a.

FARIA-PINTO, P.; MONTESANO, M. A.; JACINTO, A. A.; SANTOS, R. S.; BORDIN, F. H. S.; FERREIRA, A. P.; PENIDO, M. L. O.; COELHO, P. M. Z.; VASCONCELOS, E. G. Antibody reactivity against potato apyrase, a protein that shares epitopes with *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase isoforms, in acute and chronically infected mice, after chemotherapy and reinfection. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.105, n.4, p.374-379, 2010b.

FENWICK, A.; JOURDAN, P. Schistosomiasis elimination by 2020 or 2030? **International Journal for Parasitology**, v.46, n.7, p.385-388, 2016.

FERRARI, M.L.A.; COELHO, P.M.Z.; ANTUNES, C.F.M.; TAVARES, C.P.A; DA CUNHA, A.S. Efficacy of oxamniquine and praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* infection: a controlled trial. **Bulletin of the World Health Organization**, v.81, n.3, p.190-196, 2003.

FETTERER, R.H.; PAX, R.A.; BENNETT, J.L. Praziquantel, potassium and 2,4-dinitrophenol: analysis of their action on the musculature of *Schistosoma mansoni*. **European Journal of Pharmacology**, v.64, n.1, p.31–38, 1980.

FITZSIMMONS, C. M.; FALCONE, F. H.; DUNNE, D. W. Helminth allergens, parasite-specific IgE, and its protective role in human immunity. **Frontiers in Immunology**, v.5, artigo 61, 2014.

FOSTER, R.; CHEETHAM, B.L; Studies with the shistosomicide oxamniquine (UK-4271). I: activity in rodents and in vitro. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene**, v.67, n.5, p.674-684, 1973.

FROTA, S. M. Combination of Kato-Katz faecal examinations and ELISA to improve accuracy of diagnosis of intestinal schistosomiasis in a low-endemic setting in Brazil. **Acta Tropica**, v.120, Suppl. 1, p.S138-S141, 2011.

GANDASEGUI, J.; FERNÁNDEZ-SOTO, P.; DACAL, E.; RODRÍGUEZ, E.; SAUGAR, J. M.; YEPES, E.; AZNAR-RUIZ-DE-ALEGRÍA, M. L.; ESPASA, M.; NINDA, A.; BOCANEGRA, C.; SALVADOR, F.; SULLEIRO, E.; MORENO, M.; VICENTE, B.; LÓPEZ-ABÁN, J.; MURO, A. Field and laboratory comparative evaluation of a LAMP assay for the diagnosis of urogenital schistosomiasis in Cubal, Central Angola. **Tropical Medicine & International Health**, v.23, n.9, p.992-1001, 2018.

GAZE, S.; DRIGUEZ, P.; PEARSON, M. S.; MENDES, T.; DOOLAN, D. L.; TRIEU, A.; MCMANUS, D. P.; GOBERT, N. G.; PERIAGO, M. V.; OLIVEIRA, R. C.; CARDOSO, F. C.; OLIVEIRA, G.; NAKAJIMA, R.; JASINSKAS, A.; HUNG, C.; LIANG, L.; PABLO, J.; BETHONY, J. M.; FELGNER, P. L.; LOUKAS, A. An immunomics approach to schistosome antigen discovery: antibody signatures of naturally resistant and chronically infected individuals from endemic areas. **Plos Pathogens**, v.10, n.3, e1004033, 2014.

GASIM, G. I.; BELLA, A.; ADAM, I. Schistosomiasis, hepatitis B and hepatitis C co-infection. **Virology Journal**, v.12, n.19, p.1-6, 2015.

GLENNY, A.; POPE, C.; WADDINGTON, H.; WALLACE, U. Immunological notes. XVII. The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v.26, p.38-39, 1926.

GOMES, L. I.; ENK, M. J.; RABELLO, A. Diagnosing schistosomiasis: where are we? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.47, n.1, p.3-11, 2014.

GONNERT, R.; ANDREWS, P. Praziquantel, a new broad-spectrum antischistosomal agent. **Z Parasitenkd**, v.52, n.2, p.129-150, 1977.

GRAY, D. J.; ROSS, A. G.; LI, Y. S.; MCMANUS, D. P. Diagnosis and management of schistosomiasis. **British Medical Journal**, v.342, p.d2651-d2666, 2011.

GREENBERG, R. M. Are Ca<sup>2+</sup> channels targets of praziquantel action? **International Journal for Parasitology**, v.35, n.1, p.1-9, 2005.

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

GUSMÃO, M. A. do N. Caracterização imunológica da apirase de batata e indução de anticorpos IgE por epítomos compartilhados entre SmATPDases de *Schistosoma mansoni* e a apirase de *Solanum tuberosum* – Tese de doutorado – Pós Graduação em Ciências Biológicas, 103f. Universidade Federal de Juiz de Fora, 2017.

HANDA, M.; GUIDOTTI, G. Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.218, n.3, p.918-923, 1996.

HARNETT, W.; KUSSEL, J. R. Increased exposure of parasite antigens at surface of adult male *Schistosoma mansoni* exposed to praziquantel *in vitro*. **Parasitology**, v.93, n.2, p.401-405, 1986.

HAWRYLOWICZ, C. M.; O'GARRA, A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. **Nature Reviews Immunology**, v.5, n.4, p.271-283, 2005.

HERBERT, D. R.; OREKOV, T.; PERKINS, C.; FINKELMAN, F. D. IL-10 and TGF-beta redundantly protect against severe liver injury and mortality during acute schistosomiasis. **Journal Immunology**, v.181, n.10, p.7214-7220, 2008.

HOFFMANN, K. F.; JAMES, S. L.; CHEEVER, A. W.; WYNN, T. A. Studies with double cytokine-deficient mice reveal that highly polarized Th1- and Th2-type cytokine and antibody responses contribute equally to vaccine-induced immunity to *Schistosoma mansoni*. **Journal of Immunology**, v.163, n.2, p.927-938, 1999.

HSIEH, C.S.; MACATONIA, S.E.; O'GARRA, A.; MURPHY, K.M. T cell genetic background determines default T helper phenotype development *in vitro*. **The Journal of Experimental Medicine**, v.181, p.713-721, 1995.

HU, X.; IVASHKIV, L.B. Cross-regulation of Signaling Pathways by Interferon-gamma: Implications for Immune Responses and Autoimmune Diseases. **Immunity**, v.31, n.4, p.539-550, 2009.

JACINTO, A. A, BORDIN, F. H. S.; SOUZA, E.E.; FERREIRA, A.P.; MONTESANO, M. A.; TEIXEIRA, H. C.; PENIDO, M. L. O.; COELHO, P. M. Z.; VASCONCELOS, E.G. Análise de anticorpos e citocinas produzidas em resposta a ATP difosfohidrolase de *Schistosoma mansoni* durante o estágio agudo da esquistossomose experimental. **Principia**, v.6, p.83-92, 2001.

JANKOVIC, D.; CHEEVER, A. W.; KULLBERG, M. C.; WYNN, T. A.; YAP, G.; CASPAR, P.; LEWIS, F. A.; CLYNES, R.; RAVETCH, J. V.; SHER, A. CD4<sup>+</sup>T cell mediated granulomatous pathology in schistosomiasis is downregulated by a B cell-dependent mechanism requiring Fc receptor signaling. **Journal of Experimental Medicine**, v.187, n.4, p.619-629, 1998.

JANKOVIC, D.; WYNN, T. A.; KULLBERG, M. C.; HIENY, S.; JAMES, S.; CHEEVER, A. W.; SHER, A. Optimal vaccination against *Schistosoma mansoni* requires the induction of both B cell and IFN $\gamma$  dependent effector mechanisms. **The Journal of Immunology**, v.162, n.1, p.345-351, 1999.

JUNBERG, A. D.; OLIVEIRA, A. A.; LENZI, H. L.; COELHO, P. M. A new miracidia hatching device for diagnosing schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, n.1, p.112-114, 2008.

KARMAKAR, S.; ZHANG, W.; AHMAD, G.; TORBEN, W.; ALAM, M. U.; LE, L.; DAMIAN, R. T.; WOLF, R. F.; WHITE, G. L.; CAREY, D. W.; CARTER, D.; REED, S. G.; SIDDIQUI, A. A. Cross-species protection: *Schistosoma mansoni* Sm-p80 vaccine confers protection against *Schistosoma haematobium* in hamsters and baboons. **Vaccine**, v.5, n.32, p.1296-1303, 2014.

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

KETTLUN, A. M.; LEYTON, M.; VALENZUELA, A.; MANCILLA, M.; TRAVERSO-CORI, A. Identification and subcellular localization of two isoenzymes of apyrase from *Solanum tuberosum*. **Phytochemistry**, v.31, n.6, p.1889-1894, 1992.

KIKUCHI, T.; FURUTA, T.; KOJIMA, S. Membrane localization and demonstration of isoforms of nucleoside triphosphate hydrolase from *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, v.122, n.1, p.15-23, 2001.

KIKUCHI, T.; FURUTA, T.; KOJIMA, S. Kinetics of the nucleoside triphosphate hydrolase of *Toxoplasma gondii* in mice with acute and chronic toxoplasmosis. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v.96, n.1, p.35-41, 2002.

KITTUR, N.; CASTLEMAN, J. D.; CAMPBELL, C. H.; KING, C. H.; COLLEY, D. G. Comparison of *Schistosoma mansoni* prevalence and intensity of infection, as determined by the circulating cathodic antigen urine assay or by the Kato-Katz fecal assay: a systematic review. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.94, n.3, p.605–610, 2016.

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.

LAMBERTON, P. H. L.; FAUST, C. L.; WEBSTER, J.P. Praziquantel decreases fecundity in *Schistosoma mansoni* adult worms that survive treatment: evidence from a laboratory life-history trade-offs selection study. **Infectious Diseases of Poverty**, v.6, n.110, p.1-12, 2017.

LENZI, H. L.; SCHECHTMAN, H.; PELAJO-MACHADO, M.; VALE, B. S.; PENASCO, M. S.; LENZI, J. A. Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biomechanical approaches. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.93, supl. 1, p.141-151, 1998.

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

LEVANO-GARCIA, J. Caracterização bioquímica e imunológica das enzimas recombinantes ATP difosfohidrolases 1 e 2 do parasita *Schistosoma mansoni*. Dissertação de mestrado defendida no Instituto de Química da Universidade de São Paulo, 2008. 127f.

LINDBLAD, E.B. Aluminium adjuvants-in retrospect and prospect. **Vaccine**, v.22, n.27/28, p.3658-3668, 2004.

LINDHOLZ, C. G.; FAVERO, V.; VERISSIMO, C. de M.; RUSSO, R.; CANDIDO, F.; SOUZA, R. P. de.; SANTOS, R. R. dos.; MORASSUTTI, A. L.; BITTENCOURT, H.R.; JONE, M. K.; PIERRE, T. J. ST.; TEIXEIRA, C. G. Study of diagnostic accuracy of Helmintex, Kato-Katz, and POC-CCA methods for diagnosing intestinal schistosomiasis in Candeal, a low intensity transmission area in northeastern Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.12, n.3, e0006274, 2018.

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

LUNDY, S. K.; LUKACS, N. W. Chronic schistosome infection leads to modulation of granuloma formation and systemic immune suppression. **Frontiers in Immunology**, v.4, artigo 39, 2013.

MAIA, A. C. R. G.; PORCINO, G. N.; DETONI, M. de L.; EMÍDIO, N. B. E.; 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. **Parasitology International**, v.62, n.1, p.44-52, 2013.

MAJLESSI, L.; LO-MAN, R.; LECLERC, C. Regulatory B and T cells in infections. **Microbes and Infection**, v.10, n.9, p.1030-1035, 2008.

MANGAN, N. E.; FALLON, R. E.; SMITH, P.; VAN ROOIJEN, N.; MCKENZIE, A. N.; FALLON, P. G. Helminth infection protects mice from anaphylaxis via IL-10-producing B cells. **Journal of Immunology**, v.173, n.10, p.6346-6356, 2004.

MARI, L.; GATTO, M.; CIDDIO, M.; DIA, E. D.; SOKOLOW, S. H.; DE LEO, G. A.; CASAGRANDI, R. Big-data-driven modeling unveils country-wide drivers of endemic schistosomiasis. **Scientific Reports**, v.7, n.489, 2017.

MARRACK, P.; MCKEE, A. S.; MUNKS, M. W. Toward an understanding of the adjuvant action of aluminium. **Nature reviews Immunology**, v.9, n.4, p-287-293, 2009.

MARWA, H.; FAHAM, E. J.; KATHERINE, J.; FRANCKLOW, W.; PRICE, H. P.; SAYER, J. R.; DOENHOFF, M.J. *Schistosoma mansoni* cercarial elastase (SmCE): differences in immunogenic properties of native and recombinant forms. **Parasitology**, v.144, n.10, p.1356-1364, 2017.

MCKEE, A. S.; PEARCE, E. J. CD25+CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. **Journal Immunology**, v.173, n.2, p.1224-1231, 2004.

MCMANUS, D.P.; LOUKAS, A. Current status of vaccines for schistosomiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.21, n.1, p.225-242, 2008.

MILLS, C.D.; KINCAID, K.; ALT, J.M.; HEILMAN, M.J.; HILL, A.M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. **Journal of Immunology**, v.164, n.12, p.6166–6173, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação Epidemiológica da Esquistossomose. Atualizado em 23 de novembro de 2017. Disponível em <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/esquistossomose/situacao-epidemiologica>>.

MEHLHORN, H.; BECKER, B.; ANDREWS, P.; THOMAS, H.; FRENKEL, J.K. *In vivo* and *in vitro* experiments on the effects of praziquantel on *Schistosoma mansoni*. A light and electron microscopic study. **Arzneimittelforschung**, v.31, n.3a, p.544–554, 1981.

MEISTER, I.; LEONIDOVA, A.; KOVAC, J.; DUTHALER, U.; KEISER, J.; HUWYLER, J. Development and validation of an enantioselective LC–MS/MS method for the analysis of the anthelmintic drug praziquantel and its main metabolite in human plasma, blood and dried blood spots. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.118, p.81-88, 2016.

MOLEHIN, A. J.; ROJO, J. U.; SIDDIQUI, S. Z.; GRAY, S. A.; CARTER, D.; SIDDIQUI, A. A. Development of a schistosomiasis vaccine. **Expert Review of Vaccines**, v.15, n.5, p.619–627, 2016.

MORI, A.; OLESZYCKA, E.; SHARP, F.A.; COLEMAN, M.; OZASA, Y.; SINGH, M.; O'HAGAN, D.T.; TAJBER, L.; CORRIGAN, O.I.; MCNEELA, E.A.; LAVELLE, E.C. The vaccine adjuvant alum inhibits IL-12 by promoting PI3 kinase signaling while chitosan does not inhibit IL-12 and enhances Th1 and Th17 responses. **European Journal of Immunology**, v.42, n.10, p.2709-2719, 2012.

MOUNTFORD, A. P.; FISHER, A.; WILSON, R. A. The profile of IgG1 and IgG2a antibody responses in mice exposed to *Schistosoma mansoni*. **Parasite Immunology**, v.16, n.10, p.521-527, 1994.

MERRIFIELD, M.; HOTEZ, P.J.; BEAUMIER, C. M.; GILLESPIEA, P.; STRYCHA, U.; HAYWARD, T.; BOTTAZZI, M. E. Advancing a vaccine to prevent human schistosomiasis. **Vaccine**, v.34, n.26, p.2988-2991, 2016.

MOIRA, A. P. de.; JONES, F. M.; WILSON, S.; TUKAHEBWA, E.; FITZSIMMONS, C. M.; MWATHA, J. K.; BETHONY, J. M.; KABATEREINE, N. B.; DUNNEA, D. W. Effects of Treatment on IgE Responses against Parasite Allergen-Like Proteins and Immunity to Reinfection in Childhood Schistosome and Hookworm Coinfections. **Infection and Immunity**, v.81, n.1, p.23-32, 2013.

MOUNTFORD, A. P., FISHER, A. AND WILSON, R. A. The profile of IgG1 and IgG2a antibody responses in mice exposed to *Schistosoma mansoni*. **Parasite Immunology**, v.16, n.10, p.521-527, 1994.

- MOUSTAPHA, M.; BRIDGET, M. L.; LYNN, M.; WAMMES, L. J.; JONG, S. E. de.; LABUDA, L. A.; CAMARA, M.; SMITS, H. H.; POLMAN, K.; DIEYE, T. N.; MBOUP, S.; STADECKER, M. J.; YAZDANBAKHS, M. T-Helper 17 cells are associated with pathology in human schistosomiasis. **Journal Infectious Diseases**, v.207, n.1, p.186-195, 2013.
- NAHUM, L.A.; MOURÃO, M. M.; OLIVEIRA, G. New Frontiers in Schistosoma Genomics and Transcriptomics. **Journal of Parasitology Research**, e849132, p.1-11, 2012.
- NEGRÃO-CORREA, D. FITTIPALDI, J.F.; LAMBERTUCCI, J.R.; TEIXEIRA, M.M.; ANTUNES, C.M.; CARNEIRO, M. Association of *Schistosoma mansoni*-specific IgG and IgE antibody proction and clinical schistosomiasis status in a rural area of Minas Gerais, Brazil". **Plos One**, v.9, n.2, e88042, 2014.
- NOGI, T.; ZHANG, D.; CHAN, J. D.; MARCHANT, J. S. A novel biological activity of praziquantel requiring voltage-operated Ca<sup>2+</sup> channel subunits: subversion of flatworm regenerative polarity. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.3, e464, 2009.
- NOVAES, M. R. C. G.; SOUZA, J. P.; ARAÚJO, H. C. Síntese do Anti-helmíntico Praziquantel, a partir da Glicina. **Química Nova**, v.22, n.1, p.5-10, 1999.
- OLIVEIRA, W. J.; MAGALHÃES, F.DO C.; ELIAS, A. M. S.; DE CASTRO, V. N.; FAVERO, V.; LINDHOLZ, C. G.; OLIVEIRA, A. A.; BARBOSA, F. B.; GIL, F.; GOMES, M. A.; TEIXEIRA, C. G.; ENK, M. J.; COELHO, P. M. Z.; CARNEIRO, M.; CORRÊA, D. A. N.; GEIGER, S. M. Evaluation of diagnostic methods for the detection of intestinal schistosomiasis in endemic areas with low parasite loads: Saline gradient, *Helmintex*, Kato-Katz and rapid urine test. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.12, n.2, e0006232, 2018.
- OKOYO, C.; SIMIYU, E.; NJENGA, S. M.; MWANDAWIRO, C. Comparing the performance of circulating cathodic antigen and Kato-Katz techniques in evaluating *Schistosoma mansoni* infection in areas with low prevalence in selected counties of Kenya: a cross-sectional study. **BMC Public Health**, v.18, n.1, e478, 2018.
- OTHMAN, A. A.; SOLIMAN, R. H. Schistosomiasis in Egypt: A never-ending story? **Acta Tropica**, v.148, n.1, p.179-190, 2015.
- PAX, R.; BENNET, J. L.; FETTERER, R. A benzodiazepine derivative and praziquantel: effects on musculature of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacology**, v.304, n.3, p.309-315, 1978.
- PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nature Reviews Immunology**, v.2, n.7, p.499-511, 2002.
- PEARCE, E. J.; CASPAR, P.; GRZYCH, J. M.; LEWIS, F. A.; SHER, A. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. **The Journal of Experimental Medicine**, v.173, n.1, p.159-166, 1991.

PELLEGRINO, J.; SIQUEIRA, A.F. Técnica de perfusão para coleta de *Shistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infestadas. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v.8, p.589-597, 1956.

PELLETREAU, S.; NYAKU, M.; DEMBELE, M.; SARR, B.; BUDGE, P.; ROSS, R.; MATHIEU, E. The field-testing of a novel integrated mapping protocol for neglected tropical diseases. **PLOS Neglected Tropical Disease**, v.5, n.11, e1380, 2011.

PICA-MATTOCCIA, L. & CIOLI, D. Sex and stage-related sensitivity os *Shistosoma mansoni* to in vivo and *in vitro* praziquantel treatment. **International Journal for Parasitology**, v.34, n.4, p.527-533, 2004.

PICA-MATTOCCIA, L.; ORSINI, T.; BASSO, A.; FESTUCCI, A.; LIBERTI, P.; GUIDI, A.; MARCATTO-MAGGI, A. L.; NOBRE-SANTANA, S.; TROIANI, A. R.; CIOLI, D.; VALLE, C. *Schistosoma mansoni*: lack of correlation between praziquantel induced intra-worm calcium influx and parasite death. **Experimental Parasitology**, v.119, n.3, p.332-335, 2008.

PINHEIRO, C. S.; RIBEIRO, A. N. D.; CARDOSO, F.C.; MARTINS, V. P.; FIGUEIREDO, B.C.P.; ASSIS, N.R.G.; MORAIS, S.B.; CALIARI, M.V.; LOUKAS, A.; OLIVEIRA, S. C. A multivalent chimeric vaccine composed of *Schistosoma mansoni* SmTSP-2 and Sm29 was able to induce protection against infection in mice. **Parasite Immunology**, v. 36, n.7, p. 303-312, 2014.

PINHO, J.M.R.; CARDOSO, F.C.; LOPES, D.O.; PINHEIRO, C.S.; CALIAR, M.V.; OLIVEIRA, F.M.S.; LEITE, L.C.; OLIVEIRA, S.C. Immunization with Smlg, a novel tegument protein from *Schistosoma mansoni*, fails to induce protection in mice but reduces liver pathology. **Parasitology**, v.137, p.1079–1088, 2010.

PONICHTERA, H.E.; STADECKER, M.J. Dendritic cell expression of the C-type lectin receptor CD209a: A novel innate parasite-sensing mechanism inducing Th17 cells that drive severe immunopathology in murine schistosome infection. **Experimental Parasitology**, v.158, p.42-47, 2015.

PONTES, L. A.; DIAS-NETO, E.; RABELLO, A. Detection by polymerase chain reaction of *Shistosoma mansoni* DNA in human fecal and serum samples. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.6, n.2, p.157-162, 2002.

PONTES, L. A.; OLIVEIRA, M. C.; KATZ, N.; DIAS-NETO, E.; RABELLO, A. Comparison of a polymerase chain reaction and the Kato-Katz technique for diagnosing infection with *Shistosoma mansoni* . **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.68, n.6, p.652–656, 2003.

RAMADAN, M. E.; YOUSEF, M. S. M. Role of TNF alpha in *Schistosoma mansoni* infection and cirrhotic liver. **International Journal of Medical Research and Pharmaceutical Sciences**, v.1, n.1, p.6-12, 2013.

REDMAN, C.A.; ROBERTSON, A.; FALLON, P.G.; MODHA, J.; KUSEL, J.R.; DOENHOFF, M.J.; MARTIN, R.J. Praziquantel: an urgent and exciting challenge. **Parasitology**, v.12, n.1, p.14–20, 1996.

- REIMAN, R. M.; THOMPSON, R. W.; FENG, C. G.; HARI, D.; KNIGHT, R.; CHEEVER, A. W.; ROSENBERG, H. F.; WYNN, T. A. Interleukin-5 (IL-5) Augments the Progression of Liver Fibrosis by Regulating IL-13 Activity. **Infection and Immunity**, v.74, n.3, p.1471–1479, 2006.
- REZENDE, S. A.; OLIVEIRA, V. R.; SILVA, A. M.; ALVES, J. B. GOES, A. M.; REIS, L. F. Mice lacking the gamma interferon receptor have an impaired granulomatous reaction to *Shistosoma mansoni* infection. **Infection and Immunity**, v.65, n.8, p.3457-3461, 1997.
- REZENDE-SOARES, F. A.; CARVALHO-CAMPOS, C.; MARQUES, M. J.; PORCINO, G. N.; GIAROLA, N. L.; COSTA, B. L.; TAUNAY-RODRIGUES, A.; FARIA-PINTO, P.; SOUZA, M. A.; DINIZ, V. A.; CORTE-REAL, S.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; VASCONCELOS, E. G. Cytochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes and identification of an antigenic and catalytically active isoform. **Parasitology**, v.137, n.5, p.773–783, 2010.
- RIBEIRO, F.; DE MELLO, R. T.; TAVARES, C. A. P.; KUSEL, J. R.; COELHO, P. M. Z. Sinergistic action of praziquantel and host specific immune response against *Shistosoma mansoni* at different phases of infection. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.46, n.4, p.231-233, 2004.
- RICCIARDI, A.; NDAO, M. Still hope for schistosomiasis vaccine. **Hum Vaccin Immunother**, v.11, n.10, p.2504-2508, 2015.
- RIEWE, D.; GROSMAN, L.; FERNIE, A. R.; ZAUBER, H.; WUCKE, C.; GEIGENBERGER, P. A cell wall-bound adenosine nucleosidase is involved in the salvage of extracellular ATP in *Solanum tuberosum*. **Plant and Cell Physiology**, v.49, n.10, p.1572–1579, 2008.
- RIMKUNAS, V. M.; GRAHAM, M. J.; CROOKE, R. M.; LISCUM, L. TNF- $\alpha$  plays a role in hepatocyte apoptosis in Niemann-Pick type C liver disease. **Journal of Lipid Research**, v.50, p.327-333. 2009.
- RINALDI, G.; LOUKAS, A.; BRINDLEY, P. J.; IRELAN, J. T.; SMOUT, M. J. Viability of developmental stages of *Schistosoma mansoni* quantified with xCELLigence worm real-time motility assay (xWORM). **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v.5, n.3, p.141-148, 2015.
- RIVEAU, G.; DEPLANQUE, D.; REMOUE, F.; SCHACHT, A.M.; VODOUGNON, H.; CAPRON, M.; THIRY, M.; MARTIAL, J.; LIBERSA, C.; CAPRON, A. “Safety and immunogenicity of rSh28GST antigen in humans: phase 1 randomized clinical study of a vaccine candidate against urinary schistosomiasis”. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.6, n.7, e1704, 2012.
- ROFATTO, H. K.; ARAUJO-MONTOYA, B. O.; MIYASATO, P. A.; LEVANO-GARCIA, J.; RODRIGUEZ, D.; NAKANO, E.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; FARIA, L. P.; LEITE, L. C. C. Immunization with tegument nucleotidases associated with a subcurative praziquantel treatment reduces wormburden following *Schistosoma mansoni* challenge. **PeerJ**, v.1, e58, 2013.

ROMEIH, M. H.; HASSAN, H. M.; SHOUSHA, T.S.; SABER, M. A. Immunization against Egyptian *Schistosoma mansoni* infection by multivalent DNA vaccine. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v.40, n.4, p.327-338, 2008.

ROSS, A. G.; CHAU, T.N.; INOBAYA, M.T.; OLVEDA, R.M.; LI, Y.; HARN, D.A. A new global strategy for the elimination of schistosomiasis. **International Journal of Infectious Diseases**, v.54, p.130-137, 2016.

SAKAGUCHI, S.; SETOGUCHI, R.; YAGI, H.; NOMURA, T. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in self-tolerance and autoimmune disease. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.305, p.51-66, 2006.

SCHRAMM, G.; HAAS, H. Th2 immune response against *Schistosoma mansoni* infection. **Microbes and Infection**, v.12, n.12/13, p.881-888, 2010.

SHANE, H. L.; VERANI, J. BERNARD, A.; MONTGOMERY, S. P.; BLACKSTOCK, A. J.; MWINZI, P. N. M.; BUTLER, S. E.; KARANJA, D. M. S.; SECOR, W. E. Evaluation of urine CCA assays for detection of *Schistosoma mansoni* infection in western Kenya. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.5, n.1, e951, 2011.

SHAW, M. K.; ERASMUS, D. A. *Schistosoma mansoni*: praziquantel-induced changes to the female reproductive system. **Experimental Parasitology**, v.65, n.1, p.31-42, 1988.

SHAW, M. K. *Schistosoma mansoni*: stage dependent damage after in vivo treatment with praziquantel. **Parasitology**, v.100, n.1, p.65-72, 1990.

SCHALL, V.; MASSARA, C. L.; ENK, M.; JOHANNES, B.; MIRANDA, H. DA S.; DA SILVA, E. Os Caminhos da Esquistossomose dentro do nosso corpo. Belo Horizonte: FIOCRUZ/Instituto René Rachou - Série Esquistossomose, n. 8, parte I, 2007.

SIQUEIRA, L. M. V. Evaluation of two coproscopic techniques for the diagnosis of schistosomiasis in a low-transmission area in the state of Minas Gerais, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.106, n.7, p.844-850, 2011.

SIQUEIRA, L. M. V.; BUBULA COUTO, F. F.; TABOADA, D.; DE OLIVEIRA, A. A.; OLIVEIRA, Á. A.; CARNEIRO, N. F. de F.; OLIVEIRA, E.; COELHO, P. M. Z.; KATZ, N. Performance of POC-CCA® in diagnosis of schistosomiasis mansoni in individuals with low parasite burden. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.49, n.3, p.341-347, 2016.

SILES-LUCAS, M.; URIBE, N.; LÓPEZ-ABÁN, J.; VICENTE, B.; ORFAO, A.; NOGAL-RUIZ, J. J.; FELICIANO, A. S.; MURO, A. The *Schistosoma bovis* Sb14-3-3zeta recombinant protein cross-protects against *Schistosoma mansoni* in BALB/c mice. **Vaccine**, v.25, n.41, p.7217-7223, 2007.

SMITH, P.M.; SHAINHEIT, M.G.; BAZZONE, L.E; RUTITZKY, L.I.; POLTORAK A.; STADECKER, M.J. Genetic control of severe egg-induced immunopathology and IL-17 production in murine schistosomiasis. **The Journal of Immunology**, v.183, n.5, p.3317–3323, 2009.

SMITHERS, S. R.; TERRY, R. J. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of adults worms, **Parasitology**, v.55, n.4, p.695-700, 1965.

SOARES, T.V. Aplicação da apirase de batata e de polipeptídeo recombinante derivado no estudo da ATPDase 2 de *Schistosoma mansoni* e da esquistossomose mansoni. 95f. 2012.

SOUZA, F. P. C. de.; VITORINO, R. R.; COSTA, A. de. P.; FARIA JÚNIOR, F.C. de.; SANTANA, L. A.; GOMES, A. P. Shistosomiasis mansoni: general aspects, immunology, pathogenesis and natural history. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v.9, n.4, p.300-307, 2011.

SOUZA-GOMES, E.C.; LEAL-NETO, O.B.; ALBUQUERQUE, J.; PEREIRA DA SILVA, H.; BARBOSA, C.S. “Schistosomiasis transmission and environmental change: a spatio-temporal analysis in Porto de Galinhas, Pernambuco-Brazil”. **International Journal of Health Geographics**, v.11, n.51, p.1-11, 2012.

STEWART, D.; FULTON, W.B.; WILSON, C.; MONITTO, C.L.; PAIDAS, C.N.; REEVES, R.H.; DE MAIO, A. Genetic contribution to the septic response in a mouse model. **Shock**, v.18, p.342–347, 2002.

STONE, K. D.; PRUSSIN, C.; METCALFE, D. D. IgE , mast cells, basophils, and eosinophils. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.125, n.2, suppl.2, p.73-80, 2010.

SUMMERS, E. L.; CUMMING, M. H.; OULAVALLICKAL, T.; ROBERTS, N.; ARCUS, V. L. Structures and kinetics for plant nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (NTPDases) support a domain motion catalytic mechanism. **Protein Science**, v.26, n.8, p.1627-1638, 2017.

TAN, F.; XIN, H.; PAN, C. W.; DING, J. Q.; CHEN, X. G. Monoclonal antibodies against nucleoside triphosphate hydrolase-II can reduce the replication of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology International**, v.59, n.2, p.141-146, 2010.

TAN, F.; HU, S.; LUO, F. J.; PAN, C. W.; CHEN, X. G. Induction of protective Th1 immune responses in mice by vaccination with recombinant *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase-II. **Vaccine**, v.29, n.15, p.2742–2748, 2011.

TAUSSKY, H.H.; SHORR, E. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. **Journal of Biological Chemistry**, v.202, n.2, p.675-685, 1953.

TEIXEIRA DE MELO, T.; MICHEL DE ARAUJO, J.; DO VALLE DURÃES, F.; CALIARI, M. V.; OLIVEIRA, S. C.; COELHO, P. M. Z.; FONSECA, C. T. Immunization with newly transformed *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument elicits tegument damage, reduction in egg and parasite burden. **Parasite Immunology**, v.32, n.11-12, p. 749-759, 2010.

TEIXEIRA DE MELO, T.; MICHEL ARAUJO, J.; DE SENA, I.C.; ALVES, C.C.; ARAÚJO, N.; FONSECA, C.T. Evaluation of the protective immune response induced in mice by immunization with *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument (Smteg) in association with CpG-ODN. **Microbes and Infection**, v.15, n.1, p.28-36, 2013.

THETIOT-LAURENT, S.A.; BOISSIER, J.; ROBERT, A.; MAUNIER, B. "Schistosomiasis chemotherapy". **Angewandte Chemie International Edition**, v.52, n.31, p. 7936-7956, 2013.

TRAVERSO-CORI, A.; CHAIMOVICH, H.; CORI, O. Different molecular forms of potato apyrase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.137, n.1, p.133-142, 1970.

ULANOVA, M.; TARKOWSKI, A.; HAHN-ZORIC, M.; HANSON, L.A. The Common vaccine adjuvant aluminum hydroxide up-regulates accessory properties of human monocytes via an interleukin-4-dependent mechanism. **Infection and Immunity**, v.69, n.2, p.1151-1159, 2001.

VALE, N.; GOUVEIA, M. J.; RINALDI, G.; BRINDLEY, P. J.; GÄRTNER, F.; da COSTA, J. M. C. Praziquantel for Schistosomiasis: Single-Drug Metabolism Revisited, Mode of Action, and Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.61, n.5, e02582-16, 2017.

VAN DAM, G. J.; BOGITSH, B. J.; VAN ZEYL, R. J.; ROTMANS, J. P.; DEELDER, A. M. *Schistosoma mansoni*: in vitro and in vivo excretion of CAA and CCA by developing schistosomula and adult worms. **Journal of Parasitology**, v.82, n.4, p. 557-564, 1996.

VAN DAM, G. J.; WICHERS, J. H.; FERREIRA, T. M.; GHATI, D.; VAN AMERONGEN, A.; DEELDER, A. M. Diagnosis of schistosomiasis by reagent strip test for detection of circulating cathodic antigen. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.12, p.5458-5461, 2004.

VAN LIESHOUT, L.; POLDERMAN, A. M.; DEELDER, A. M. Immunodiagnosis of schistosomiasis by determination of the circulating antigens CAA and CCA, in particular in individuals with recent or light infections. **Acta Tropica**, v.77, n.1, p.69-80, 2000.

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

VASCONCELOS, E. G.; FERREIRA, S. T.; CARVALHO, T. U.; 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. **The Journal of Biological Chemistry**, 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. Z. Potato apyrase: a new tool for parasitic disease research. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.1, p.80–88, 2009.

YOU, H.; MCMANUS, P.; HU, W.; SMOUT, M. J.; BRINDLEY, P. J.; GOBERT, G. N. Transcriptional responses of *in vivo* praziquantel exposure in schistosomes identifies a functional role for calcium signaling pathway member CamKII. **PLoS Pathogens**, v.9, n.3, e1003254, 2013.

WALTER, K.; FULFORD, A.J.C.; MCBEATH, R.; JOSEPH, S.; JONES, F.M.; KARIUKI, H.C.; MWATHA, J.K.; KIMANI, G.; KABATEREINE, N.B.; VENNERNALD, B.J.; OUMA, J.H.; DUNNE, D.W. Increased Human IgE Induced by Killing *Schistosoma mansoni* In Vivo Is Associated with Pretreatment Th2 Cytokine Responsiveness to Worm Antigens. **The Journal of Immunology**, v.177, n.8, p.5490-5498, 2006.

WEBBE, G.; JAMES, C. A comparison of the susceptibility to praziquantel of *Shistosoma haematobium*, *S.japonicum*, *S.mansoni*, *S.intercalatum* and *S.mattheei* in hamsters. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v.52, n.2, p.169-177, 1977.

WILSON, M. S.; MENTINK-KANE, M. M.; PESCE, J. T.; RAMALINGAM, T. R.; THOMPSON, R.; WYNN, T. A. Immunopathology of schistosomiasis. **Immunology & Cell Biology**, v.85, n.2, p.148-154, 2007.

WISCONSIN STATE LABORATORY OF HYGIENE, University of Wisconsin-Madison - USA. Disponível em: <[www.mcdinternational.org](http://www.mcdinternational.org)>. Acesso em 21 de setembro de 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The control of shistosomiasis. Technical Report Series, v.728,1985, 114p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. O controle da esquistossomose. Genebra: WHO, 1999 (Relatório técnico, 830).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report of a WHO Informal Consultation. Elimination of shistosomiasis from low transmission areas. Genebra: World Health Organization, 2009, 24p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Schistosomiasis: population requiring preventive chemotherapy and number of people treated in 2010. **The Weekly Epidemiological Record**, v.87, n.4, p.37-44, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Preventive Chemotherapy Databank. World Health Organization; Geneva: 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Schistosomiasis: progress report 2001-2011, strategic plan 2012-2020. Geneva: World Health Organization, 2013. 64p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Health Topics: Tropical Diseases. Disponível em: < [http://www.who.int/topics/tropical\\_diseases/en/](http://www.who.int/topics/tropical_diseases/en/)>. Data de acesso: 01 de agosto de 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Esquistossomose. Ficha informativa n.115. Tech. Rep., Disponível online em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>>, Data de acesso: 20 de junho de 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Health Topics: Tropical Diseases. Disponível em: < [http://www.who.int/topics/tropical\\_diseases/en/](http://www.who.int/topics/tropical_diseases/en/)>. Acesso em: 01 agosto de 2017.

XIAO, S.; CHOLLET, J.; BOOTH, M. WEISS, N. A. TANNER, M. Therapeutic effect of praziquantel enantiomers in mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene**, v.93, p.324-325, 1999.

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

ZHANG, Y. Y. Evaluation of Kato Katz examination method in three areas with low-level endemicity of schistosomiasis japonica in China: a Bayesian modeling approach. **Acta Tropica**, v.112, n.1, p.16-22, 2009.

ZHANG, Y. Y.; LUO, J. P.; WANG, Q. Z.; CHEN, J. H.; XU, M. X.; XU, J. M.; WU, G. L.; ZHANG, Z. S.; WU, H. W. Evaluation of Kato-Katz examination method in three areas with low-level endemicity of schistosomiasis japonica in China: a Bayesian modeling approach. **Acta Tropica**, v.112, n.1, p.16-22, 2009.

ZHANG, Z.; GOLDSCHMIDT, T.; SALTER. "Possible allelic structure of IgG2a and IgG2c in mice". **Molecular Immunology**, v.50, n.3, p.169-171, 2012.

ZHAO, G-H.; LI, J.; BLAIR, D.; LI, X-Y.; ELSHEIKHA, H. M.; LIN, R-Q.; ZOU, F-C.; ZHU, X-Q. Biotechnological advances in the diagnosis, species differentiation and phylogenetic analysis of *Schistosoma spp.* **Biotechnology Advances**, v.30, p.1381-1389, 2012.

ZIMMERMANN, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, v.362, n.4/5, p.299-309, 2000.

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

ZONI, A. C.; CATALÁ, L.; AULT, S. K. Schistosomiasis prevalence and Intensity of Infection in Latin America and the Caribbean Countries, 1942-2014: a systematic review in the context of a regional elimination goal. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.10, n.3, e0004493, 2016.

ZOUAIN, C.S.; GUSTAVSON, S.; OLIVEIRA, S.C.; AZEVEDO, V.; ALVES, J.B.; GOES, A.M. The role of IL-10 and IgG1 in the protection and granulomatous response in *Schistosoma mansoni* P24-immunized mice. **Vaccine**, v.19, n.9/10, p.1218-1224, 2000.

**ANEXO A – Protocolo de liberação dos animais para o experimento realizado.****SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA****CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo nº. 042/2017 – CEUA sobre “Avaliação do potencial imunoterápico da proteína apirase no modelo experimental de asma alérgica.”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de Juciene Maria de Andrade Castro com a colaboração de Priscila de Faria Pinto, Danielle Gomes Marconato e Momtchilo Russo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 14/11/2017. Para o desenvolvimento da pesquisa serão utilizados 96 machos de Camundongos isogênico BALB/c de 6-8 semanas de idade, conforme solicitado e que serão utilizados no período 01/01/2018 a 01/01/2019.

**CERTIFICATE**

We certify that protocol no. 042/2017 - CEUA on "Evaluation of the immunotherapeutic potential of the protein apirase in the experimental model of allergic asthma", a research project under the responsibility of Juciene Maria de Andrade Castro with the collaboration of Priscila de Faria Pinto, Danielle Gomes Marconato and Momtchilo Russo is in accordance with the Ethical Principles on Animal Experimentation, adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was approved by the ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE OF THE PRÓ-REITORIA DE PESQUISA / UFJF at a meeting held 11/14/2017. For the development of the research will be used 96 males of isogenic BALB / c mice of 6-8 weeks of age, as requested and that will be used in the period 01/01/2018 to 01/01/2019.

Juiz de Fora, 30 de novembro de 2017

Vice-coordenadora  
CEUA

Coordenadora  
CEUA