

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

“Mapeamento dos domínios antigênicos compartilhados entre a apirase de batata e as isoformas de ATP difosfohidrolase de *Schistosoma mansoni*”

por

Priscila de Faria Pinto

**Tese apresentada com vistas à
obtenção do Título de Doutor em
Ciências na área de concentração
Doenças Infecciosas e Parasitárias.**

**Orientação: Dra. Eveline Gomes Vasconcelos
Dr. Paulo Marcos Zech Coelho**

**Belo Horizonte
Outubro/2008**

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

P659m Pinto, Priscila de Faria.
2008

Mapeamento dos domínios antigênicos compartilhados entre a apirase de batata e as isoformas de ATP difosfohidrolase de *Schistosoma mansoni*, ou, Mapping of the conserved antigenic domains shared between potato apyrase and ATP diphosphohydrolase isoforms from *Schistosoma mansoni* / Priscila de Faria Pinto. – Belo Horizonte, 2008.

iv, 173 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 108-127

Tese (Doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutora em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Esquistossomose mansoni/genética 2. Apirase/genética 3. Trifosfato de Adenosina/análise I. Título. II. Vasconcelos, Eveline Gomes (Orientação) III. Coelho, Paulo Marco Zech (Orientação)

CDD – 22. ed. – 616.963

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

“Mapeamento dos domínios antigênicos compartilhados entre a apirase de batata e as isoformas de ATP difosfohidrolase de *Schistosoma mansoni*”

por

Priscila de Faria Pinto

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Aulo marcos Zech Coelho (Presidente)

Prof. Dr. Edward José de Oliveira

Prof. Dr. Marcos Pezzi Guimarães

Prof. Dr. Stefan Michael Geiger

Prof. Dr. Tomaz Aroldo da Mota Santos

Suplentes: Prof. Dr. Nilton Barnabé Rodrigues

Tese defendida e aprovada em: 31/10/2008

Dedicatória

Este trabalho é dedicado às duas maiores criações de minha vida. João Marcelo e Ana Luiza, meus adorados filhos que tornam minha vida uma grande descoberta a cada dia.
Amo vocês.

Este trabalho foi realizado em duas instituições, o Centro de Pesquisas René Rachou (Laboratório de Esquistossomose) e a Universidade Federal de Juiz de Fora (Laboratório do Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas).

Gostaria de agradecer ao Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ/MG e a CAPES pelo apoio disponibilizado através da concessão de bolsa de estudo.

AGRADECIMENTOS

Talvez um dos momentos mais importantes na etapa de conclusão deste trabalho seja o reconhecimento de todas as pessoas que fizeram parte da construção desta jornada.

Eu tive o privilégio de ter duas equipes técnicas, as que compõem os laboratórios onde fui acolhida para desenvolver o trabalho, mais especificamente, o Laboratório de Esquistossomose (CPqRR) e o Laboratório de Estudo de Estrutura e Função de Proteínas (ICB/UFJF), e minha equipe doméstica, composta por meus pais, marido, filhos e familiares.

Aos meus queridos orientadores, Dra. Eveline Gomes e Dr. Paulo Marcos, que gentilmente me cederam seu tempo, esforços e dedicação. A Dra. Eveline, minha “des”, opa, corrigindo, minha orientadora “forever”, com a qual a convivência ao longo destes anos já mistura trabalho e amizade de forma muito produtiva, a maior parte de meu desenvolvimento intelectual se deve a estes 10 anos de trabalho em conjunto. Através da Dra. Eveline, cheguei até ao Dr. Paulo Marcos, que me acolheu e “adotou” como aluna, me permitindo desfrutar do alegre convívio com a equipe do Laboratório de Esquistossomose do CPqRR. Ao Dr. Paulo meu eterno carinho pela compreensão e paciência, pela presença contínua e ensinamentos em nossas longas conversas.

Quando me integrei ao CPqRR, tive a sorte de ser recebida no Laboratório de Esquistossomose pela Vanda, Áureo, Neusa, Ana Carolina, Ana Karine, Andréa, Flávia, Suedali (mãe da Isabella), Tatiane, Kika, Rafaella, Dona Vera, Martin, Raquel e Symone.... Que além do apoio e companheirismo se empenharam muito para que, mesmo me dividindo entre duas cidades, eu me sentisse realmente parte daquela família. E assim me sinto... Não posso esquecer-me da minha super secretária, emprestada, Jussara. Você me salvou várias vezes.... Você foi fantástica, muito obrigado.

Aos amigos tão queridos do Departamento de Bioquímica do ICB/UFJF, professores Amaury, Ana Cláudia, Cláudio, Elita, Everton, Jair, Walkyria, Rodrigo que sempre me fizeram sentir parte integrante do departamento. Em cada almoço, cada café, cada comemoração, por todos os dias ao longo destes anos de convívio, muito obrigado.

As alunas Carol, Michelle, Rita, Cristiane e Gabriane, alunas do Laboratório de Estudo de Estrutura e Função de Proteínas da UFJF, que foram minhas companheiras e “mãos e braços” para a realização dos “ELISAS” sem fim... Vocês foram muito importantes para que nós chegássemos até aqui.

Aos meus queridos amigos André e Bruna e a comadre Francis e ao Walter pela acolhida carinhosa a cada dia em que estive em Belo Horizonte.

Aos meus pais, Renato e Imaculada, que estiveram sempre aqui e ali, me amparando e me auxiliando com minha “prole” nas idas e vindas de Belo Horizonte, um simples obrigado seria quase nada perto dos cuidados e carinhos que recebo ao longo de todos os dias de minha existência. Tentar substituir a mamãe do João e da Ana é uma tarefa que eu só confiaria a vocês.

Ao meu irmão e melhor amigo Philipe de Faria, mesmo além mar, esteve dividindo comigo os momentos desta jornada.

Ao meu amado esposo Marcelo Silva que sempre entendeu minhas ausências, apoiou e participou ativamente desta tese, dividindo comigo cada momento de alegria e angústia. Por estar sempre aqui, por ser meu companheiro, pelo seu amor, pelos filhos, pela família que estamos construindo, obrigado. Você é a pessoa errada mais certa da minha vida....Amo você...

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS.....	13
LISTA DE ABREVIATURAS	14
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	16
1-INTRODUÇÃO.....	17
1.1-ATP difosfohidrolases ou Apirases.....	19
1.2-ATP difosfohidrolase de <i>S. mansoni</i> e sua imunoreatividade cruzada com a apirase de batata	22
1.3-A esquistossomose mansoni – aspectos gerais da infecção.....	24
1.4-Aspectos da resposta imune na esquistossomose	28
2-JUSTIFICATIVAS.....	33
3-OBJETIVOS	35
3.1-Objetivo geral.....	36
3.2-Objetivos específicos.....	36
4-MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1-Purificação de apirase de batata.....	39
4.2-Obtenção de antígenos solúveis de parasitos.....	39
4.3-Produção de soros policlonais anti-apirase de batata.....	40
4.4-Infecção experimental de camundongos.....	40
4.5-Estudo de imunoreatividade cruzada entre anticorpos anti-apirase de batata e NTPDases de mamíferos por imunohistoquímica.....	42
4.6-Seleção de pacientes de áreas endêmicas para esquistossomose.....	43
A) População de área de baixa endemicidade – áreas de Chonim de Cima e Penha do Cassiano.....	43
B) População de alta endemicidade – área do Caju.....	44
4.7-Seleção de soros de pacientes com leishmaniose cutânea e Doença de Chagas.....	45
4.8-Procedimentos usados para a execução da técnica de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assays).....	46
4.9-Análises <i>in silico</i>	47
4.10-Análise estatística dos resultados.....	48
4.11-Aspectos Éticos da Pesquisa.....	49
5-RESULTADOS.....	50

5.1-Perfil de isotipos de anticorpos reativos com a apirase de batata nos estádios agudo e crónico, pós-tratamento e re-infecção na esquistossomose experimental.	51
5.2-Propriedade imuno-estimulatória da apirase de batata.....	56
5.3-Detecção da presença de isoforma solúvel de ATP difosfohidrolase de <i>S. mansoni</i> em preparação de SEA	56
5.4-Avaliação da reatividade entre anticorpos anti-apirase de batata produzidos em coelho e as NTPDases de mamíferos	61
5.5-Análises <i>in silico</i>	63
5.6-Predição das estruturas tridimensionais da apirase de batata e da SmATPDase 2 de <i>S. mansoni</i> e análise da correlação entre elas.....	75
5.7-Avaliação dos níveis de anticorpos em soros de pacientes com doenças infecto-parasitárias reativos com a apirase de batata.....	78
5.8-Análise dos perfis de IgG e IgM para os antígenos apirase, SWAP e SEA na população do distrito de Chonim de Cima, antes e após tratamento quimioterápico.....	83
5.9-Análise dos níveis de Ig1, IgG4, IgA e IgE reativos com a apirase de batata encontrados em soros de pacientes portadores de esquistossomose mansoni, moradores do distrito de Penha do Cassiano.....	89
5.10-Análise dos níveis de anticorpos reativos com a apirase de batata encontrados em pacientes de Penha do Cassiano 180 dias após o tratamento quimioterápico com praziquantel	94
5.11-Análise dos níveis de anticorpos IgG1, IgG4, IgA e IgE reativos contra apirase de batata em amostras de soros dos pacientes da área do Caju.....	96
5.12-Análise dos níveis de anticorpos IgG1, IgG4, IgA e IgE reativos contra apirase de batata em amostras de soros de pacientes co-infectados com <i>S. mansoni</i> e ancilostomídeos.....	100
 6-DISCUSSÃO.....	 103
6.1-Resposta imune humoral aos domínios compartilhados entre a apirase de batata e as isoformas de ATP difosfohidrolase de <i>S. mansoni</i> durante a progressão da esquistossomose experimental.....	104

6.2-Mapeamento dos domínios antigênicos compartilhados entre a apirase de batata e as ATP difosfohidrolases de parasitos.....	108
6.3-Resposta imune humoral humana aos domínios compartilhados entre a apirase de batata e às ATP difosfohidrolases de <i>S. mansoni</i> em pacientes com esquistossomose.....	112
6.4-Análise da resposta imune humoral humana aos domínios conservados de ATP difosfohidrolase em pacientes com esquistossomose mansoni co-infectados com ancilostomídeos.....	117
6.5-Peptídeos sintéticos: perspectivas futuras.....	119
7-CONCLUSÕES.....	123
8-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	126

LISTA DE FIGURAS

- Mapa 1:** Região do Município de Governador Valadares, mostrando a localização dos distritos de Penha do Cassiano e de Chonim de Cima.....44
- Figura 1:** Reatividade dos anticorpos contra a apirase de batata em soros de camundongos BALB/c experimentalmente infectados.....55
- Figura 2:** Titulação de anticorpos IgG total contra apirase de batata em soro de coelho.....57
- Figura 3:** Titulação de anticorpos contra apirase de batata em soros de camundongos Balb/c.....58
- Figura 4:** Detecção da isoforma solúvel de ATP difosfohidrolase de *S. mansoni* na preparação de SEA.....59
- Figura 5:** Reatividade de IgG1 e IgG2a anti-apirase de batata de soros de camundongos com o antígeno SEA.....60
- Figura 6:** Análise da reatividade entre anticorpos anti-apirase de batata e as isoformas de ATP difosfohidrolases de ovo de *S. mansoni* ou NTPDases de células que compõem o granuloma.....62
- Figura 7:** Árvore filogenética gerada da análise das seqüências de aminoácidos de membros da família das ATP difosfohidrolases.....64
- Figura 8:** Alinhamento das estruturas primárias das isoformas de ATP difosfohidrolases de batata, parasitos e mamíferos.....69
- Figura 9:** Alinhamento das estruturas primárias da apirase de batata, SmATPDase 1 de *S. mansoni*, SmATPDase 2 e NTPDase 1 de humano.....72
- Figura 10:** Estrutura tridimensional predita para a apirase de batata e a SmATPDase 2 de *S. mansoni*.....76
- Figura 11:** Reatividade de anticorpos IgG total de pacientes com LCA, esquistossomose e doença de Chagas, contra a apirase de batata.....80
- Figura 12:** Análise comparativa da reatividade de IgG e IgM contra diferentes antígenos.....81
- Figura 13:** Análise da reatividade de anticorpos IgM de soros de pacientes de Chonim de Cima contra vários antígenos.....86
- Figura 14:** Análise da reatividade de anticorpos IgG de soros de pacientes de Chonim de Cima contra vários antígenos.....87
- Figura 15:** Análise individual dos níveis de IgG reativa com a apirase de batata em soros de crianças (A) e adultos (B) antes e pós-tratamento.....88

Figura 16: Níveis de anticorpos IgG reativos com a apirase de batata em soros de pacientes de Penha do Cassiano.....	90
Figura 17: Análise comparativa da reatividade dos anticorpos anti-apirase de batata em distintas faixas etárias dos pacientes com esquistossomose da população de Penha do Cassiano.....	93
Figura 18: Análise individual dos níveis de isotipos de anticorpos reativos com a apirase de batata antes e pós tratamento na população de Penha do Cassiano.....	95
Figura 19: Análise comparativa dos níveis de isotipos de anticorpos reativos contra a apirase de batata na população do Caju	99
Figura 20: Análise comparativa dos níveis de isotipos de anticorpos reativos contra a apirase de batata em indivíduos com <i>esquistossomose</i> e <i>co-infectados com ancilostomídeos</i>	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Níveis de anticorpos reativos com a apirase de batata durante a progressão da esquistossomose experimental.....	52
Tabela 2: Análise teórica do potencial de ligação dos domínios compartilhados entre apirase de batata e as ATP difosfohidrolases de parasitos com anticorpos e moléculas HLA-DR de humanos.....	71
Tabela 3: Análise teórica do potencial de ligação dos domínios compartilhados entre apirase de batata e a SmATPDase 1 de <i>S. mansoni</i> com anticorpos e moléculas HLA-DR de humanos.....	74
Tabela 4: Descrição da população da área do Chonim de Cima.....	84
Tabela 5: População de estudo ds isotipos de anticorpos da Região de Penha do Cassiano, segundo a faixa etária e a carga parasitária.....	91
Tabela 6: Soropositividade da População de Penha do Cassiano para os diferentes anticorpos avaliados.....	94
Tabela 7: Dados da população da área do Caju selecionada para quantificação dos níveis de anticorpos reativos contra a apirase de batata.....	96
Tabela 8: Médias das densidades ópticas dos soros das crianças que compõem a população da área do Caju.....	98

LISTA DE AREVIATURAS

ACR - “aminoacids conserved region”, regiões com sequências de aminoácidos conservadas que caracterizam a família das ATP difosfohidrolases

ADP - Adenosina difosfato

API – apirase de batata usada como antígeno

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

ATP - Adenosina trifosfato

EPI – Homogeneizado de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

HLA-DR – Complexo principal de histocompatibilidade humano que reconhece antígenos protéicos

LB – Homogeneizado de formas promastigotas de *Leishmania braziliensis*

LCA – soros de pacientes com leishmaniose cutânea americana

NDPase - Nomenclatura para nucleosídeo di- e trifosfato hidrolase ou ATP difosfohidrolases de *Leishmania*

NTPDase - nomenclatura para nucleosídeo di- e trifosfato hidrolase ou ATP difosfohidrolases de mamíferos

P2X - Receptor purinérgico de membrana associado a canal iônico (ionotrópico)

P2Y - Receptor purinérgico de membrana associado a proteína G (metabotrópico)

SEA – “soluble eggs antigen”, antígenos solúveis extraídos de ovos de *Schistosoma mansoni*

SmATPDase – abreviação para ATP difosfohidrolase de *Schistosoma mansoni*

SWAP – “soluble worms adults parasites”, antígenos solúveis extraídos de vermes adultos de *S. Mansoni*

RESUMO

Usando a apirase de batata como antígeno, as propriedades imunogênicas das isoformas de ATP difosfohidrolase de *S. mansoni* foram inicialmente exploradas em esquistossomose experimental. Elevada reatividade de anticorpos IgG2a e IgG1 contra esta proteína vegetal foi observada em soro de camundongos BALB/c na fase aguda da infecção (8-9ª semana pós-infecção). Elevada reatividade de anticorpos IgG1 com a apirase de batata, mas não de IgG2a, foi encontrada na fase crônica da infecção (17ª semana pós-infecção), diferenciando sorologicamente as fases da infecção. Adicionalmente, foi observado que o inóculo de apirase de batata em camundongos BALB/c saudáveis tem marcante atividade estimulatória, aumentando significativamente os níveis de anticorpos IgG1 e IgG2a específicos. O subtipo IgG1 de camundongo, mas não IgG2a, reage com a ATP difosfohidrolase presente na preparação de SEA. A reatividade de anticorpos contra a apirase de batata foi monitorada por um período de 11 meses em camundongos BALB/c tratados com oxaminiquina na fase crônica da doença. A reatividade de IgM, IgG total ou IgG1 contra a apirase de batata reduziu significativamente (~60%) após 11 meses, enquanto IgG2a, que esteve elevada na fase aguda, perde a significância na fase crônica e permanece inalterada na etapa do pós tratamento. Após a quimioterapia, os camundongos foram re-infectados com 100 cercárias, e nenhuma diferença significativa foi observada na soropositividade de IgG1, mas uma elevação significativa de IgG2a foi detectada nos camundongos re-infectados sugerindo uma nova fase aguda e sua participação nos mecanismos de proteção contra o *Schistosoma*. Estudos *in silico* demonstraram uma íntima relação estrutural e evolucionária entre a apirase de batata e as isoformas de ATP difosfohidrolases de *S. mansoni*. A predição de modelos tridimensionais sugeriu que os domínios conservados podem estar expostos e disponíveis para a ligação com anticorpos. O perfil de reatividade de anticorpos contra a apirase de batata foi, então, estudado em amostras de soros obtidas de pacientes com esquistossomose, moradores de três áreas endêmicas diferentes. Amostras de soros de grupos de adultos e crianças mostraram alta reatividade contra a apirase de batata, com elevação dos níveis de anticorpos IgA, IgE, IgG1 ou IgG4, com diferenças significativas entre eles. Após a quimioterapia, redução significativa ou ausência de reatividade de anticorpos contra a apirase de

batata foi observada nestes pacientes. Esses achados podem estar associados à resistência ou susceptibilidade.

ABSTRACT

Using potato apyrase as antigen, the immunogenic stimulatory properties of *S. mansoni* ATP diphosphohydrolase were initially explored in experimental schistosomiasis. Elevated reactivity of IgG2a or IgG1 antibody against this vegetable protein was observed in serum from acutely *S. mansoni*-infected BALB/c mice (8-9th wk post-infection). Elevated IgG1 antibody reactivity against potato apyrase, but not IgG2a, was found in chronically infected mice (17th wk post-infection), differentiating serologically the acute and chronic phases. In addition, we observed that inoculation of potato apyrase in healthy BALB/c mice has remarkable stimulatory activity, increasing significantly the specific IgG1 and IgG2a antibody levels. Mouse IgG1 subtype, but not IgG2a, reacts with soluble ATP diphosphohydrolase present in SEA preparation. The antibody reactivity against potato apyrase was monitored over an 11-month period in chronically infected BALB/c mice and treated with oxamniquine. The IgM, total IgG and IgG1 reactivity against potato apyrase significantly decreased (~60%) after 11 months, while IgG2a, that showed high reactivity only in the acute disease phase, remained negative throughout the study. Following chemotherapy, the mice were reinfected with 100 cercariae, and no significant difference was observed in IgG1 seropositivity, while significant IgG2a elevation in reinfected mice suggested a new acute phase and its participation in the mechanisms of protection against schistosomes. *In silico* studies demonstrated evolutionary and close structural relationships between potato apyrase and *S. mansoni* ATP diphosphohydrolases. Putative three-dimensional models suggested that the conserved domains may be exposed and available for antibody binding. The antibody reactivity profile against potato apyrase was then studied in serum samples obtained from schistosomiasis patients, inhabitant of 3 different endemic areas. Serum samples from adults and children groups showed high reactivity against potato apyrase, with elevation of IgA, IgE, IgG1 or IgG4 antibody levels, with significant differences among them. After chemotherapy, significant reduction or absence of antibody reactivity against potato apyrase was observed in these patients. This findings maybe associated to the resistance or susceptibility.

Introdução

1 - Introdução

A ATP difosfohidrolase, ou apirase, extraída da batata *Solanum tuberosum* tem uma atividade hidrolítica sobre ATP e ADP que desperta interesse como potencial biomédico. O processo de obtenção da apirase de batata pura é realizado por técnicas convencionais de fácil reprodução, capazes de gerar uma quantidade significativa de proteína com alto teor de pureza, tornando sua aplicação ainda mais atrativa (Kettlun *et al.*, 1992; Faria-Pinto *et al.*, 2004).

A concentração extracelular de nucleotídeos é capaz de estimular e/ou modular múltiplas funções nos tecidos, tais como o fluxo sanguíneo, secreções, processos inflamatórios e reações imunológicas (Robson *et al.*, 2006). Os nucleotídeos de adenosina estão envolvidos na regulação da agregação plaquetária e do processo vascular de inflamação, através da ativação de receptores purinérgicos (P2y e P2x), onde atuam como importantes sinalizadores (Marcus & Sandifier, 1993; Morrone *et al.*, 2006). A atividade da apirase de batata tem sido aplicada *in vitro* para a monitoração dos níveis de ATP ou em ensaios para o estudo da agregação plaquetária dependente de ADP (Langston *et al.*, 2003; Cattaneo *et al.*, 2007). Em estudos *in vivo*, foi demonstrado que a apirase de batata inoculada em animais com órgão transplantado, seguido de contínua perfusão do órgão com esta proteína vegetal, prolongou a sobrevivência dos animais promovendo a inibição da agregação plaquetária e a formação de microtrombos por depleção do ADP (Koyamada, 1996). Recentemente, a apirase de batata foi inoculada em ratos no momento de implantação de glioma, um tipo de tumor cerebral, e a depleção do ATP extracelular inibiu a proliferação celular do tumor (Morrone *et al.*, 2006).

Neste trabalho estão apresentados os estudos de imunoreatividade cruzada entre a apirase de batata e a ATP difosfohidrolase de *Schistosoma mansoni*, e suas possíveis aplicações nos estudos de interações entre este parasito e o sistema imune.

1.1 - ATP difosfohidrolases ou Apirases

As ATP difosfohidrolases ou apirases (EC 3.6.1.5) são enzimas que hidrolisam nucleosídeos di- e trifosfatados aos seus correspondentes mononucleotídeos, sendo ativadas por cátions bivalentes, especialmente, cálcio e magnésio. Uma das primeiras proteínas desta família a ser purificada foi a apirase de batata (Traverso-Cori *et al.*, 1965). Existem diferentes isoformas de apirase caracterizadas na batata *Solanum tuberosum*, variedades *Desirée*, *Pimpernel* e *Ultimus*. Estas isoformas possuem massa molecular de aproximadamente 49 kDa, diferindo entre elas em seus pontos isoelétricos (pI) e razão de hidrólise ATP/ADP (Kettlun *et al.*, 1982; Mancilla *et al.*, 1984). A isoforma de apirase extraída da variedade *Pimpernel* apresenta pI 8,74 e possui uma capacidade de hidrolisar ATP dez vezes maior que ADP, enquanto a isoforma extraída da variedade *Desirée* apresenta pI 6,69, com potencial de hidrólise de ATP e ADP muito semelhantes. Na variedade *Ultimus*, foram encontradas duas isoformas, uma de 48 kDa e uma segunda de 46,5 kDa, com razão de hidrólise de ATP/ADP na proporção de 1/1 e 10/1, respectivamente (Kettlun *et al.*, 1992 a, b; Kettlun *et al.*, 2005).

A identificação da família das ATP difosfohidrolases é recente (Handa & Guidotti, 1996; Vasconcelos *et al.*, 1996). Através do seqüenciamento de aminoácidos da região N-terminal da apirase de batata *Solanum tuberosum* var. *Desirée* (Vasconcelos *et al.*, 1996) e através do isolamento do cDNA de uma isoforma de apirase de *S. tuberosum* de fonte comercial (Handa & Guidotti, 1996), uma nova família de proteínas foi descoberta, a das NTPDases, que compartilham cinco regiões (ACRs; “apyrase-conserved regions”) que são altamente conservadas entre as apirases. Dois domínios similares aos motivos de ligação de nucleotídeos da família actina-hsp70-hexoquinase estavam entre aqueles conservados, indicando uma possível função nestas novas proteínas (Handa & Guidotti, 1996; Vasconcelos *et al.*, 1996).

Nos últimos anos, um progresso significativo foi obtido em estudos estruturais de membros desta família de proteínas, mas nenhuma nomenclatura uniformemente aceita ainda foi definida. Os membros desta família estão sendo classificados em sua ordem de descoberta e por suas

propriedades catalíticas (Robson *et al.*, 2006). Estas proteínas são chamadas de ATP difosfohidrolase, NTPase (nucleosídeo trifosfato hidrolase) ou NDPase (nucleosídeo difosfato hidrolase) em parasitos, NTPDase (nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase) em mamíferos, e apirase em plantas.

Oito membros desta família foram identificados e caracterizados em células de mamíferos, incluindo seis proteínas ligadas à membrana (NTPDases 1, 2, 3, 4, 7 e 8) e duas proteínas secretadas após expressão heteróloga (NTPDases 5 e 6). As NTPDases 1-4, 7 e 8 compartilham a mesma topologia, tendo dois domínios que atravessam a membrana localizados próximos às regiões N- e C-terminal, e um grande domínio extracelular contendo as 5 regiões conservadas entre as proteínas componentes desta família (ACRs). As NTPDases 5 e 6 possuem um único domínio transmembrana perto do N-terminal da proteína que pode ser clivado, liberando-as para o meio extracelular como proteínas solúveis (Robson *et al.*, 2006).

Diversas NTPDases de tecidos de humanos, bovinos, ratos e camundongos já tiveram seus genes clonados, e funcionalmente caracterizados após a expressão em linhagens de células de mamíferos. Estas proteínas foram identificadas em fígado, cérebro, pâncreas, baço, próstata, pulmão, estômago, testículos, rins, plaquetas, linfócitos, monócitos, macrófagos, células endoteliais e células de Langerhans (Kaczmarek *et al.* 1996; Gendron *et al.*, 2002; Langston *et al.*, 2003; Robson *et al.*, 2006). O possível papel das NTPDases ligadas às membranas plasmáticas, mais especificamente as NTPDases 1, 2 e 3, é regular a concentração de nucleotídeo extracelular e portanto, auxiliar, através de receptores purinérgicos, no controle de processos fisiológicos sinalizados, incluindo agregação plaquetária, percepção da dor, contração muscular, secreção hormonal, neurotransmissão e resposta imune (Gendron *et al.*, 2002; Robson *et al.*, 2006).

As ATP difosfohidrolases têm sido também caracterizadas em parasitos, tais como *S. mansoni*, *Toxoplasma gondii*, *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*, *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi* (Asai *et al.* 1992; Vasconcelos *et al.*, 1993; 1996; Barros *et al.* 2000; Coimbra *et al.* 2002; Fietto *et al.*, 2004; Faria-Pinto *et al.*, 2004). Proteínas hipotéticas encontradas nos genomas de *S. japonicum*, *L. braziliensis*, *L. major* e *L.*

infantum foram recentemente depositadas no banco de genes, e identificadas como pertencentes à família das ATP difosfohidrolases. Em insetos hematófagos, membros desta família de proteínas foram encontrados nos genomas de *Anopheles gambiae* e *Aedes aegypti* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Em *T. gondii*, a enzima encontra-se localizada em grânulos densos, vesículas secretoras do parasito e também associada à membrana do vacúolo parasitóforo, podendo ser secretada para a aquisição de nutrientes e mecanismos de evasão do parasito à célula hospedeira (Asai *et al.*, 1992). Em *E. histolytica*, a ATP difosfohidrolase pode estar envolvida na aquisição de nutrientes e na virulência, visto que foi verificado que as amebas patogênicas possuem maior atividade ecto-ATPásica que as amebas de forma de vida livre (Barros *et al.* 2000). Em *T. vaginalis*, foi proposto pelos autores que a presença desta enzima seria importante na modulação da concentração de nucleotídeos no espaço extracelular, protegendo o parasito dos efeitos citolíticos destes, principalmente do ATP (de Aguiar Matos *et al.* 2001). Em *T. cruzi*, uma ecto-NTPDase foi caracterizada enzimaticamente e localizada por microscopia confocal em todas as formas do ciclo de vida do parasito. Foi sugerido que esta proteína tem uma implicação direta nas vias de recuperação de purinas para este parasito e que pode estar envolvida com os fatores de virulência, por apresentar diferentes potenciais de hidrólise de nucleotídeos nas formas epimastigotas e tripomastigotas (Fietto *et al.*, 2004).

A primeira demonstração de uma isoforma de ATP difosfohidrolase ativa presente no gênero *Leishmania* foi realizada por Coimbra e colaboradores (2002). Esta isoforma foi localizada, através de citoquímica ultraestrutural, na superfície externa da membrana de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. (Coimbra *et al.*, 2002). Uma isoforma de massa molecular 58-63 kDa foi isolada de preparação de formas promastigotas deste parasito, sugerindo possuir níveis diferentes de glicosilação (Coimbra *et al.*, 2008). Foi sugerido que sua atividade enzimática está envolvida nos processos de aquisição de purinas por este parasito (Coimbra *et al.*, 2002).

1.2 - ATP difosfohidrolase de *S. mansoni* e sua imunoreatividade cruzada com a apirase de batata

Em *S. mansoni*, duas isoformas de ATP difosfohidrolase, com massa molecular aproximada de 63 kDa, diferindo na solubilidade em detergentes, ponto isoelétrico e razão da atividade ATPásica/ADPásica, foram identificadas em vermes adultos (Vasconcelos *et al.*, 1993; 1996). Estas isoformas mostraram dependência a íons bivalentes e insensibilidade aos inibidores clássicos de ATPases dos tipos P, F e V (Vasconcelos *et al.* 1993; 1996; Torres *et al.* 1998). Atividade ATP difosfohidrolásica foi também detectada em esquistossômulos (Vasconcelos *et al.*, 1997). A ecto-localização da ATP difosfohidrolase foi mostrada por microscopia eletrônica, que identificou depósitos de fosfato de chumbo eletro-densos na superfície externa do tegumento de verme adulto do *S. mansoni* após a hidrólise de ATP ou ADP (Vasconcelos *et al.*, 1993). Estas duas isoformas de ATP difosfohidrolase, com massa molecular aproximada de 63 kDa, foram também identificadas em homogenatos de ovos de *S. mansoni* (Faria-Pinto *et al.*, 2004).

As duas isoformas de ATP difosfohidrolase isoladas do tegumento de vermes adultos de *S. mansoni* ou do homogenato total de ovos apresentam imunoreatividade cruzada com anticorpos anti-apirase de batata, produzidos em coelhos ou camundongos (Vasconcelos *et al.*, 1996; Faria-Pinto *et al.*, 2004). Estes dados foram confirmados por ensaios de imunoprecipitação desde que anticorpos contra diferentes isoformas de apirase de batata, isoladas de diferentes variedades de *S. tuberosum*, imobilizados em Proteína A-Sepharose, imunodepletaram as atividades ATPásica e ADPásica de tegumento de verme adulto solubilizado em detergente (Vasconcelos *et al.*, 1996). Por técnicas de microscopia de imunofluorescência confocal e imunolocalização, estes anticorpos foram capazes de localizar a ATP difosfohidrolase na superfície do verme adulto (Vasconcelos *et al.*, 1996). Em ovos de *S. mansoni*, esta imunoreatividade cruzada permitiu identificar uma das isoformas na superfície externa do miracídio, possivelmente associada à membrana. A outra isoforma foi observada no envelope de von Lichtenberg e no lado externo da casca, aprisionada pelos microespinhos de superfície, confirmando que esta última é solúvel e secretada pelo ovo (Faria-Pinto *et al.*, 2004).

As isoformas de ATP difosfohidrolases isoladas do ovo do parasito foram reconhecidas por soros de camundongos infectados em ensaios de “Western blots”, mas não por soros de camundongos saudáveis, sugerindo a antigenicidade destas proteínas (Faria-Pinto *et al.*, 2004). Em adição, anticorpos IgG de soros de camundongos suíços infectados por *S. mansoni* tiveram alta reatividade com apirase de batata, usada como antígeno em técnica de ELISA (Faria-Pinto *et al.*, 2004). Esta imunoreatividade cruzada revelou a existência de domínios antigênicos compartilhados entre a proteína vegetal e as isoformas de ATP difosfohidrolase de *S. mansoni*, e ainda sugeriram o potencial de uso da apirase de batata em estudos imunológicos da esquistossomose (Vasconcelos *et al.*, 1996; Faria-Pinto *et al.*, 2004).

Recentemente foi demonstrado que novas drogas esquistossomicidas, os ácidos alquilaminoalcanotiosulfúricos, são capazes de promover a inibição da atividade hidrolítica da apirase de batata, e das isoformas presentes no tegumento do verme adulto (Penido *et al.*, 2007). Estes resultados deram novos indícios de homologia entre a apirase da batata e as isoformas de ATP difosfohidrolases de *S. mansoni*, que podem ir além das seqüências primárias de aminoácidos, envolvendo também as estruturas conformacionais destas proteínas (Penido *et al.*, 2007).

Foram publicados trabalhos que caracterizaram os genes responsáveis pela expressão das ATP difosfohidrolases neste parasito, SmATPDase 1 e SmATPDase 2. A seqüência polipeptídica transcrita pelo gene SmATPDase 1 apresenta duas porções transmembrana, de peso predito por análise *in silico* de 61,35 KDa, mostrando características muito semelhantes às NTPDases de mamíferos que se encontram associadas às membranas (DeMarco *et al.*, 2003). A proteína transcrita por SmATPDase 2 tem peso molecular predito de 63,78 KDa, e apresenta em sua região amino terminal um único sítio de ligação a membrana, que ao ser clivado origina uma proteína de 55 KDa. Esta proteína solúvel é ativamente secretada por vermes adultos (Levano-Garcia *et al.*, 2007). A presença de duas isoformas desta proteína, codificadas por genes distintos, sugeriu sua importância na manutenção dos processos fisiológicos do parasito (Levano-Garcia *et al.*, 2007).

1.3 – A esquistossomose mansoni – aspectos gerais da infecção

Os schistosomas são membros da família *Schistosomatidae*, classe *Trematoda*, subclasse Digenea. Dentro da família, o gênero *Schistosoma* é o único cujas espécies são parasitos de humanos, tendo como espécies de maior ocorrência *S. mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum*. O *S. intercalatum* e o *S. mekongi* têm distribuição restrita, sendo encontrados na África e Ásia, respectivamente.

A esquistossomose, causada pelos helmintos do gênero *Schistosoma*, é uma doença tropical milenar que afeta mais de 200 milhões de indivíduos em todo o mundo. Geograficamente, a esquistossomose abrange cerca de 80 países, distribuída entre os continentes africano, asiático e americano. Com um número superior a 100 milhões de pessoas apresentando sintomas clínicos, esta doença é considerada um grave problema em saúde pública (Coura & Amaral, 2004). A diversidade de fatores que envolvem a transmissão da esquistossomose dificulta o seu controle (De Farias *et al.*, 2007), fazendo com que todas as estratégias de controle, diagnóstico e tratamento sejam de grande relevância para os governos.

Popularmente conhecida como “barriga d’água”, “xistose”, dentre outros, a esquistossomose mansoni é uma doença crônica debilitante causada pelo helminto *S. mansoni* que tem como característica a presença de vermes adultos que habitam as veias do sistema porta-hepático de humanos e outros mamíferos. A infecção por *S. mansoni* apresenta como principal dano imunopatológico a resposta inflamatória granulomatosa formada ao redor dos ovos do parasito que ficam aprisionados no fígado e intestino (Pearce & MacDonald, 2002).

A prevalência das formas clínicas graves, observada em pacientes de áreas endêmicas, é muito variável e estas manifestações variam de acordo com a localização, intensidade do parasitismo, capacidade de resposta do indivíduo à infecção ou ao tratamento. Depois de estabelecida a infecção, os ovos dos parasitos são levados pelo sangue para o fígado, baço e pulmão, onde secretam enzimas capazes de provocar intensa reação inflamatória, a qual é acompanhada por uma eosinofilia e formação de reações inflamatórias granulomatosas ao redor destes. Durante o desenvolvimento do miracídio dentro do ovo, período que dura cerca de seis dias, várias moléculas são

liberadas para o meio externo e esta liberação persiste por mais 12 dias durante a sobrevivência do miracídio dentro dos ovos maduros. Estas moléculas se comportam como antígenos, despertando uma intensa resposta celular (Ferreira *et al.*, 1995).

A esquistossomose aguda, também conhecida como febre de Katayama, é caracterizada por uma reação de hipersensibilidade contra a presença dos esquistossômulos, durante a infecção primária por *Schistosoma*. Os sintomas desta reação podem ter início poucas semanas após a infecção, sendo detectada a partir de exames clínicos. O exame de fezes nem sempre é capaz de detectar esta fase da infecção, sendo os sintomas como perda de peso, intensa dor abdominal, diarreia e hepatoesplenomegalia utilizados na avaliação clínica da fase aguda (Gryssels *et al.*, 2006). Nesta fase a infecção se caracteriza por uma reação inflamatória granulomatosa muito intensa ao redor dos ovos presentes nos tecidos (Neves, 2005).

A fase crônica da infecção pode se apresentar de forma mais branda, com perda de apetite, dispepsia e desconforto intestinal, caracterizando a forma intestinal da doença, que é encontrada com mais frequência. Podemos observar a forma hepatointestinal é caracterizada pelo aumento do fígado, mas não do baço, e a forma mais grave que é a hepatoesplênica, onde ocorre aumento considerável do baço e do fígado. Esta forma grave é desencadeada por fibrose periportal, central e periférica, que causam a hipertensão pulmonar e hipertensão porta (Neves, 2005). Os eventos fisiopatológicos da fase crônica da infecção são também causados pela presença dos ovos nos tecidos.

Os indivíduos que respondem imunologicamente aos antígenos secretados pelos ovos são capazes de gerar áreas de fibrose ao redor destes, que ficam aprisionados nos tecidos e, em geral, irão desenvolver a forma mais branda da doença. Trabalhos mostraram que indivíduos imunologicamente comprometidos, como os portadores de HIV, apresentam uma menor eliminação de ovos nas fezes, evoluindo para formas mais graves da esquistossomose. Da mesma forma, camundongos incapazes de produzir resposta imune do tipo Th2 (com depleção da produção de IL-13) desenvolvem granulomas mais severos (Pearce & MacDonald, 2002). De alguma forma o desenvolvimento da resposta imune já nas fases iniciais da infecção é de extrema importância na evolução clínica da esquistossomose.

O granuloma esquistossomótico é uma reação inflamatória, focalizada ao redor dos ovos, que concentra uma variedade de células com capacidade fagocitária dispostas de maneira compacta e organizada com a finalidade de aprisionar e eliminar a presença dos antígenos tóxicos nesta região (Lenzi *et al.*, 1998). Nas fases aguda e crônica da esquistossomose, em modelo murino, pode-se verificar que os granulomas encontrados no tecido hepático se apresentam em uma fase exudativa-produtiva. A atividade celular ainda se mantém intensa encontrando-se células gigantes, linfócitos e alta concentração de macrófagos e eosinófilos ao redor dos ovos. Progressivamente, as lesões são ocupadas pela deposição de colágeno, realizada por fibroblastos presentes nesta região, resultando em áreas de fibrose para cada granuloma formado, podendo causar prejuízos das funções dos hepatócitos (Lenzi *et al.*, 1998).

O exame parasitológico de fezes, apesar de ser o exame laboratorial mais utilizado no diagnóstico da esquistossomose, é de baixa sensibilidade. Portanto, não pode ser considerado inteiramente satisfatório para os estudos epidemiológicos (Lambertucci & Barraviera, 1994). Os métodos diretos de detecção de ovos do parasito em material obtido por meio de biópsia são comumente empregados para controle de cura individual e avaliação da eficácia do tratamento. No entanto, a biópsia retal e hepática são métodos invasivos e também não se aplicam a estudos epidemiológicos (Lambertucci & Barraviera, 1994).

Várias reações sorológicas têm sido propostas em substituição aos exames clássicos citados. A detecção de material antigênico circulante, oriundo da renovação do tegumento multilaminar ou do material digestivo de regurgitação do verme (antígenos catódicos e antígenos anódicos circulantes), bem como a pesquisa de anticorpos circulantes, tem sido utilizada para o desenvolvimento de técnicas imunológicas que permitem o diagnóstico da esquistossomose (da Silva *et al.* 1998).

Os métodos laboratoriais sorológicos indiretos, por outro lado, procuram identificar o contato atual ou passado com o verme, através da investigação da resposta imune do hospedeiro a antígenos das várias fases do ciclo de vida do *S. mansoni*. É comum a utilização de antígenos como o extrato total de cercária, ovo ou de verme adulto, o que leva a uma alta imunoreatividade com anticorpos presentes em soros de pacientes portadores de esquistossomose

(Noya *et al.*, 2000). Algumas proteínas já foram identificadas e tiveram suas seqüências gênicas clonadas e expressadas em bactérias ou leveduras por meio de engenharia genética, permitindo a obtenção em larga escala para uma ampla aplicação em sorologia (Feldmeier & Poggense, 1993; Noya *et al.*, 1998). No entanto, o uso de proteínas recombinantes também tem encontrado limitações, uma vez que a proteína de fusão nem sempre é bem reconhecida pelo soro humano quanto o é a proteína nativa, principalmente quando epitopos de natureza glicosídica estão envolvidos na resposta imune (Feldmeier & Poggensee, 1993).

Alguns trabalhos têm mostrado que as reações de hemaglutinação têm sensibilidade entre 70 e 80% nos casos de esquistossomose aguda (Ross *et al.*, 2007), e tem parecido uma boa escolha em comparação ao teste de ELISA, no qual o antígeno mais comum é originado dos ovos do *S. mansoni*. Nesta fase da infecção, os indivíduos apresentam poucos ovos e conseqüentemente um falso negativo nas técnicas de ELISA (Ross *et al.*, 2007).

Alternativamente, existem técnicas que se baseiam na reação cruzada entre antígenos de outra origem e os soros de indivíduos infectados, como aquela que emprega o KLH (“Keyhole limpet hemocyanin”), hemocianina do caramujo *Megathura crenulata*, que compartilha epitopos de carboidratos com um antígeno de 38 kDa presente na superfície do esquistossômulo. O exame mostra-se promissor como marcador sorológico da fase aguda da doença (Wuhrer *et al.*, 2000). Em ensaios comparativos entre os antígenos KLH e SEA (antígenos solúveis de ovos), através da técnica de ELISA, os níveis IgG e IgM detectados em amostras de soros de pacientes com esquistossomose em fase aguda e crônica da infecção mostraram sensibilidades e especificidades semelhantes, estimulando a exploração do KLH como recurso diagnóstico da esquistossomose (Beck *et al.*, 2004).

A farmacoterapia é ainda a principal estratégia contra a esquistossomose para a erradicação dos parasitos em indivíduos infestados e para reduzir a incidência, a intensidade e a morbidade nas populações de áreas endêmicas. Atualmente, o fármaco de escolha é o praziquantel, um derivado pirazinoisoquinolínico, efetivo para todas as espécies de Schistosomas que infectam humanos, tendo atuação também sobre cercarias,

esquistossômulos e vermes adultos. Esta droga provoca a paralisia da contração muscular do verme, aumenta a permeabilidade da membrana a íons cálcio e podem interferir nos mecanismos de escape do parasito ao sistema imune do hospedeiro, dentre outros (Ribeiro-dos-Santos *et al.*, 2006). Outra droga comercializada no Brasil com o nome de Mansil, a oxaminiquina, é um derivado tetraidroquinoleínico, que é eficaz contra as formas adultas ou imaturas do *S. mansoni* nas fases aguda e crônica da doença. Tem atuação sobre a síntese de ácidos nucléicos do parasito, provocando a alquilação das moléculas de DNA (Ribeiro-dos-Santos *et al.*, 2006). Em função da resistência adquirida a estas drogas comumente usadas, novos esquistossomicidas estão sendo pesquisados (Ribeiro-dos-Santos *et al.*, 2006; Penido *et al.*, 1994; 2007).

1.4 - Aspectos da resposta imune na esquistossomose

As manifestações patológicas da esquistossomose mansoni levam a uma resposta inflamatória granulomatosa, decorrente da deposição de ovos no fígado e intestino, que é responsável por obstrução venosa, hepatoesplenomegalia e ascite (Pearce & MacDonald, 2002). O granuloma é formado a partir de antígenos do ovo que são continuamente apresentados às células Th (CD4+) e o conseqüente acúmulo de células efetoras da resposta imunológica em torno da região que contém os ovos do parasito. Em humanos, a esquistossomose é capaz de induzir resposta imune celular e humoral que são relacionadas diretamente aos antígenos do parasito presentes durante a infecção esquistossomótica. A infecção pelo *S. mansoni* é capaz de estimular as células Th1 e a imunidade celular, em geral, através da secreção de citocinas como o IFN- γ , enquanto que as células de perfil Th2, que se mostram acentuadas na fase crônica da infecção, mostram uma secreção predominante de IL-4 e IL-10 (Comin *et al.*, 2008; Caldas *et al.*, 2008).

Apesar de inúmeros estudos acerca da resposta imunológica humana a esquistossomose, os mecanismos que tornam os humanos resistentes a infecção pelo *S. mansoni* ainda não estão completamente esclarecidos. Anticorpos da classe IgA são detectados na fase aguda da infecção sendo correlacionados com a viabilidade e o número de ovos do parasito, enquanto anticorpos IgM e IgG são encontrados tanto na fase aguda como na fase

crônica da esquistossomose (Evengard *et al.*, 1990; Capron *et al.*, 1995). Anticorpos IgG1 e IgG3 se ligam mais eficientemente aos receptores presentes nos monócitos, macrófagos e células “Natural Killer”, sendo capazes de estimular a citotoxicidade mediada por células anticorpos-dependentes contra a penetração das cercárias. Anticorpos IgE, interagindo com eosinófilos e células fagocitárias, são efetivos na destruição dos esquistossômulos *in vitro*, e podem ser importantes no mecanismo de defesa da pele, uma vez que estes tipos celulares são encontrados durante a penetração das cercárias últimos (Khalife *et al.*, 1986; 1989; Dunne *et al.*, 1992; Hagan e Abath, 1992; Corrêa-Oliveira *et al.*, 2000 a,b; Naus *et al.* 2003).

Já foi observada a maior susceptibilidade de indivíduos jovens a reinfecção e acredita-se que este fato possa estar relacionado aos níveis elevados de IgM e com a indução precoce de anticorpos bloqueadores IgG2 e IgG4, que não são capazes de conferir proteção e interferem com a função dos anticorpos protetores como IgE, IgG1 e IgG3, bloqueando a atividade fagocítica estimulada pela presença destes últimos (Khalife *et al.*, 1986; 1989; Dunne *et al.*, 1992; Hagan e Abath, 1992; Corrêa-Oliveira *et al.*, 2000 a,b; Naus *et al.* 2003).

Apesar do sucesso obtido por vários antígenos em imunizações em modelos animais, a resposta imune para compor uma vacina humana é bem mais complexa. Dentre estes antígenos, podemos observar moléculas purificadas, peptídeos e antígenos recombinantes (Oliveira *et al.*, 2008). Dos antígenos recombinantes podemos citar a Sm23 (proteína integral da membrana de 23 kDa) e a triose fosfato isomerase (TPI). Nesta busca de moléculas vacinais surgiu a MAP3, a partir da sequência da Sm23, e a MAP4, a partir da sequência da TPI, que embora sejam capazes de produzir uma resposta humoral significativa, não foi possível relacioná-las com a resistência à infecção por *S. mansoni*. Para Sm23, uma vacina de DNA foi criada e testada em modelos experimentais, onde foi possível observar uma redução da resposta inflamatória pulmonar e aumento da secreção de INF- γ e anticorpos específicos (Ganley-Leal *et al.*, 2005; Loukas *et al.*, 2007).

Proteínas musculares dos vermes adultos como a Sm97-paramiosina e a Sm62-IrV5 (proteína com fragmento de sequência homóloga à sequência da miosina humana) são capazes de estimular uma resposta humoral eficiente no

controle da infecção, ou seja, uma resposta predominantemente Th2, com predomínio da resposta protetora a partir de anticorpos IgE específicos (Al-Sherbiny *et al.*, 2003). Especialmente a Sm97-paramiosina, é também capaz de promover estímulos de células T.

Enzimas como a Sm28-GST (glutathiona-S-transferase), Sm28-TPI (fosfato isomerase) e a SG3PDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) foram capazes de estimular uma resposta imune humoral associada ao estímulo de células B, com produção de níveis de anticorpos IgE específicos capazes de promover resistência à re-infecção em pacientes e em modelos animais (Al-Sherbiny *et al.*, 2003).

Um dos componentes protéicos dos ovos de *S. mansoni* mais abundante e melhor estudado é o Sm-p40, homólogo às proteínas de “heat shock”. Esta proteína estimula uma forte resposta Th2 em camundongos C3H e CBA, que representam linhagens caracterizadas por severa imunopatologia induzida pelo ovo, e nenhuma resposta em BL/6 (H-2b), linhagem de camundongos que formam pequenos granulomas (Stadecker *et al.*, 2001). Em trabalhos mais recentes, o estímulo de cultura de células mononucleares de sangue periférico de pacientes com esquistossomose com Sm-p40 foi capaz de estimular a secreção de níveis elevados de IL-10, estimulando a aplicação da mesma como um antígeno capaz de modular o granuloma (Abouel-Nour *et al.*, 2006). Outro antígeno presente nos ovos do parasito e já descrito é a enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (Sm-PEPCK) que, ao contrário dos antígenos Sm-p40, estimulam uma forte resposta granulomatosa em camundongos BL/6 (Stadecker *et al.*, 2001).

A tioredoxina peroxidase (Sm-TPx-1) é uma proteína da classe dos antioxidantes conhecidos como peroxiredoxinas, que está envolvida nos processos vitais do parasito. A Sm-TPx-1 foi caracterizada como um antígeno sendo secretada ativamente pelo envelope de von Lichtenberg do ovo de *S. mansoni* (Williams *et al.*, 2001; Alger *et al.*, 2002) e provocando uma resposta imune balanceada Th1/Th2 em camundongos BL/6 e CBA. O recombinante desta proteína também possui propriedades antigênicas sendo capaz de provocar uma polarização da resposta imune tipo Th1. Outra proteína conhecida como IPSE, proteína indutora de IL-4, foi purificada de ovos e

localizada nas regiões abaixo da casca do ovo, sendo secretada pelos ovos de *S. mansoni* para o meio externo (Schramm *et al.*, 2003). Estudos realizados revelaram que a IPSE foi capaz de estimular a produção de IL-4 e de IL-13 por basófilos humanos, indicando que esta proteína pode representar um fator de ligação da IgE aos basófilos. Estudos recentes revelaram que a proteína IPSE é idêntica a proteína alfa-1, descrita como sendo um dos antígenos de ovos de *S. mansoni*, sendo denominada de IPSE/alfa 1 pelos autores. Esta proteína foi caracterizada como um antígeno produzido por ovos maduros e ativamente secretado por estes, podendo estar envolvida na modulação da resposta imune para Th2 durante a infecção em função do seu íntimo contato com as células do hospedeiro e o estímulo para liberação de IL-4 pelos basófilos (Schramm *et al.*, 2007).

Existem duas outras proteínas, localizadas no tegumento de vermes adultos, que foram capazes de conferir mais de 50% de redução no número de vermes adultos em camundongos imunizados e infectados e que apresentaram potencial papel protetor na resposta imune desenvolvida em humanos, Sm-TSP-2 (tetraspanina D) e a Sm 29 (Tran *et al.*, 2006; Cardoso *et al.*, 2006). Ambas são capazes de se mostrar significativamente reativas com os isotipos IgG3 e IgG1 em amostras de pacientes resistentes a infecção e a re-infecção (Tran *et al.*, 2006; Cardoso *et al.*, 2006).

Dentre outros antígenos, a Sm14-FABP, proteína ligadora de ácidos graxos, merece destaque. É um antígeno que estimula resposta celular e humoral, onde foi avaliado seu potencial de promover a resistência a infecção através da elevação de níveis de INF- γ , este mesmo potencial foi observado para a proteína recombinante, a qual ofereceu resultados promissores em relação ao aumento da resposta imune protetora em modelos animais (Brito *et al.*, 2000; Fonseca *et al.*, 2004). Quando utilizada para vacinação, a Sm 14 recombinante foi capaz de conferir cerca de 67,9% de proteção (Oliveira *et al.*, 2008)

Como já mencionado, a família das ATP difosfohidrolases só foi descrita recentemente. Em parasitos patogênicos, a atividade catalítica destas proteínas tem sido relacionada aos processos de aquisição de purinas e/ou a virulência, e somente os genes de ATP difosfohidrolases de *T. gondii*

(Bermudes *et al.*, 1994), *T. cruzi* (Fietto *et al.*, 2004) e *S. mansoni* (Levano-Garcia *et al.*, 2007) foram publicados. Estudos preliminares de antigenicidade só foram demonstrados para as isoformas de *T. gondii* e *S. mansoni* (Johnson *et al.*, 1999; Faria-Pinto *et al.*, 2004). Portanto, são proteínas cujos estudos estão ainda em fases iniciais.

Os projetos genômico e proteômico de *S. Mansoni* têm feito a análise das seis fases do ciclo biológico, concentrando esforços na identificação dos genes correspondentes às proteínas expostas na superfície do parasito ou secretadas, e que são expressas durante a passagem no hospedeiro mamífero. Estas proteínas são de particular importância, desde que são candidatas à produção de vacinas ou alvos terapêuticos (Foster & Johnston 2002; Verjovski-Almeida *et al.*, 2003; Braschi *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2008). Interessantemente, a categorização dos genes pelo programa “Gene Ontology” identificou os genes das isoformas de ATP difosfohidrolase de *S. mansoni* entre aqueles que deverão ser investigados (Verjovski-Almeida *et al.*, 2003; Braschi *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2008).

Imunoreatividade cruzada foi observada entre a apirase de batata e as isoformas isoladas de *S. mansoni* (Vasconcelos *et al.*, 1996; Faria-Pinto *et al.*, 2004). Nesta tese, esta imunoreatividade cruzada foi explorada para a identificação dos domínios antigênicos conservados entre estas proteínas, e esclarecer qual a relação com os outros membros desta família.

Justificativas

2 – Justificativas

As ATP difosfohidrolases são membros de uma família de proteínas – a família das ATP difosfohidrolases - descrita há pouco mais de 10 anos.

Apesar de estas proteínas serem amplamente distribuídas por diversos organismos, somente em alguns parasitos patogênicos ela foi descrita, e não há qualquer relato de suas propriedades imunogênicas em doenças infecto-parasitárias. Até os dias de hoje, só existem dados a respeito da reatividade de IgG total às proteínas isoladas de *Toxoplasma gondii* (Johnson *et al.*, 1999), e de *Schistosoma mansoni* (Faria-Pinto *et al.*, 2004). A clonagem de genes das ATP difosfohidrolases de parasitos só tem sido divulgadas recentemente, muitas delas como proteínas hipotéticas no genoma.

A ATP difosfohidrolase da batata *Solanum tuberosum* é purificada com sucesso em nosso laboratório desde 1996 foi observado que os anticorpos contra esta proteína, produzidos em coelhos e camundongos, são capazes de reconhecer as isoformas desta proteína extraída de vermes adultos (Vasconcelos *et al.*, 1996) e de ovos de *Schistosoma mansoni* (Faria-Pinto *et al.*, 2004), mostrando que existem domínios comuns e antigênicos nas isoformas extraídas do vegetal e do parasito.

Considerando que a descrição desta família de proteínas é recente, foi nosso interesse dar início ao entendimento de qual a relação estrutural e evolutiva entre os membros desta família. Além disso, a imunoreatividade cruzada de fato existe, vislumbramos a possibilidade de identificação dos domínios compartilhados e qual o tipo de resposta imune é pode ser produzida por estes na infecção experimental e em pacientes com esquistossomose.

Objetivos

3 - Objetivos

3.1 - Objetivo geral

Identificar os domínios compartilhados entre a proteína vegetal e as isoformas de ATP difosfohidrolases de parasitos através da imunoreatividade cruzada entre a apirase de batata e soros de indivíduos com doenças infecto-parasitárias.

3.2 - Objetivos específicos

- a) Avaliar o perfil de isotipos de anticorpos reativos com a apirase de batata durante a progressão da esquistossomose experimental durante as fases aguda e crônica, pós-tratamento e re-infecção;
- b) Avaliar o potencial imunogênico da apirase de batata em coelho e camundongos BALB/c;
- c) Identificar a isoforma solúvel de ATP difosfohidrolase de *S. mansoni* em preparações antigênicas de ovos e vermes adultos;
- d) Verificar se existe imunoreatividade cruzada entre a apirase de batata e NTPDases de mamíferos;
- e) Determinar a relação filogenética entre os membros da família das ATP difosfohidrolases;
- f) Alinhar as seqüências primárias das ATP difosfohidrolases de diversas origens e identificar os domínios compartilhados com a apirase de batata;
- g) Determinar a estrutura tridimensional da apirase de batata e da SmATPDase 2 de *S. mansoni* por modelagem computacional;
- h) Identificar os epitopos da ATP difosfohidrolases ligantes de anticorpos e seqüências nanométricas ligantes de moléculas HLA-DR por análises *in silico*;
- i) Quantificar a reatividade de anticorpos IgG e IgM reativos com a apirase de batata em pacientes com esquistossomose, leishmaniose cutânea americana e doença de Chagas;
- j) Quantificar a reatividade de anticorpos IgM, IgA, IgE, IgG e os subtipos IgG1 e IgG4 com a apirase de batata em amostras de soros de pacientes com esquistossomose moradores de áreas de baixa e alta endemicidade, antes e pós-tratamento;

- k) Quantificar a reatividade de anticorpos IgA, IgE e os subtipos IgG1 e IgG4 em pacientes co-infectados com *S. mansoni* e ancilostomídeos reativos com a proteína vegetal.

Material e Métodos

4 - Material e Métodos

4.1 - Purificação de apirase de batata

A purificação de apirase de batata *S. tuberosum*, de origem comercial, foi realizada de acordo com método previamente descrito (Traverso-Cori *et al.*, 1965; Kettlun *et al.*, 1982). Em resumo, as batatas foram descascadas e trituradas em liquidificador, com adição de ácido tioglicólico 10 mM para inibir o escurecimento pela ação das tirosinases. A mistura foi deixada em repouso (10 minutos) e filtrada em gaze para remoção do amido. Em seguida, as em solução proteínas foram precipitadas por adição lenta e sob agitação de sulfato de amônio até que se atinja 40% de saturação. O precipitado foi descartado e ao sobrenadante foi adicionada uma quantidade de sulfato de amônio necessária para atingir 70% de saturação. Nesta etapa, o precipitado foi guardado e ressuspenso em ácido tioglicólico a 10 mM. Este procedimento foi repetido 3 vezes. Cada centrifugação foi realizada a 13.000 g por 10 min, sob refrigeração. Após a precipitação final, as amostras foram submetidas a colunas de filtração em gel (Sephadex G-25 e Sephadex G-100) e, como etapa final, coluna de troca-iônica (carboximetil celulose), seguida de diálise. Os picos de proteínas extraídas das colunas foram determinados pela medida de densidade óptica a 280 nm, e a identificação das atividades ATPásica e ADPásica pelo Método de Taussky & Shorr (1953). O rendimento da purificação foi verificado ao longo do processo através de dosagem de proteínas (Lowry *et al.*, 1951), atividade enzimática e eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% e 0,1% de SDS (Laemmli, 1970), seguida de coloração pelo Coomassie blue.

4.2 - Obtenção de antígenos solúveis de parasitos

A preparação dos antígenos solúveis de vermes adultos (SWAP) e de ovos (SEA) foi realizada de acordo com a técnica previamente descrita por Colley *et al* (1977). Os parasitos e ovos foram extraídos de animais (camundongos suíços) com 7 ou 8 semanas de infecção com aproximadamente 300 cercárias. Os ovos foram recuperados de fígados e intestinos dos animais infectados. Os tecidos foram triturados e os ovos que se desprendem destes foram recuperados por filtração em peneiras especiais para captura dos ovos. Os ovos em tampão Dulbecco's foram então rompidos

através de ciclos de 10 minutos em banho de ultrassom e banho de gelo pelo mesmo período de tempo, quando todo material solúvel foi extraído e posteriormente recuperado por centrifugação a 50.000 x g. Os vermes adultos foram extraídos por perfusão e suspensos em salina 1,7% e submetidos a ciclos de ruptura de tecido com 30 segundos de homogeneização em Potter, com 60 segundos de intervalo entre as homogeneizações. O homogeneizado obtido dos vermes foi então submetido à centrifugação por 1 h a 50.000 x g e o sobrenadante foi coletado. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), usando albumina bovina como padrão. Estas preparações foram estocadas à -20° C até o momento do uso.

A preparação de antígenos de formas promastigotas de *L. braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), obtidas de acordo com Pedras *et al.* (2003), foi gentilmente doada pelo Dr. Marcos José Marques da Universidade Federal de Alfenas/UNIFAL, Alfenas, Minas Gerais. A preparação de antígenos de formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, obtidas de acordo com método descrito por Gomes *et al.* (2005), foi gentilmente doada pela Dra. Juliana Gomes do CPqRR/Fiocruz de Belo Horizonte.

4.3 - Produção de soros policlonais anti-apirase de batata

Coelhos brancos (raça Nova Zelândia) receberam 3 inóculos subcutâneos de apirase de batata (100 µg), com intervalos de 15 dias entre eles. Fêmeas de camundongos BALB/c (n= 4), com 7 semanas de vida e pesando entre 18 e 22 g, receberam 3 doses de antígeno peritoneais de apirase de batata (10 µg), com intervalo de 15 dias. A apirase de batata foi emulsificada em Adjuvante de Freund Completo para o primeiro inóculo, e em Adjuvante de Freund Incompleto para os outros dois inóculos. O soro pré-imune e o soro imune, obtido após 15 dias do último inóculo, foram estocados a -20°C. O título de anticorpos anti-apirase de batata foi avaliado por ELISA, usando a apirase de batata como antígeno.

4.4 - Infecção experimental de camundongos

Fêmeas de camundongos BALB/c foram adquiridos do centro de Biologia da Reprodução (CBR), localizado no Instituto Ciências Biológicas da

Universidade Federal de Juiz de Fora. Cercárias obtidas de caramujos *Biomphalaria glabrata* infectados com miracídios provenientes da cepa LE de Belo Horizonte, através do centro de Pesquisas René Rachou, foram usadas para a infecção. Na 7ª semana de vida, os animais do experimento, pesando entre 18 e 22 g, foram submetidos à infecção subcutânea com 25 cercárias de *S. mansoni*. Um grupo de animais foi mantido sem infecção para controle dos experimentos.

Após 60 (8 a 9 semanas) ou 120 (17 semanas) dias da infecção, um grupo de animais infectados (n= 6) e um grupo de animais controle (n= 6) foram submetidos à coleta de sangue. Três camundongos infectados foram sacrificados e a contagem de vermes foi feita após a perfusão total do sangue com salina (NaCl a 1,7%) heparinizada, de acordo com a técnica descrita por Pellegrino & Siqueira 1956. A contagem mostrou aproximadamente 9 vermes/camundongo ($X= 9 \pm 4$). As amostras coletadas foram armazenadas a -20°C.

Aos 127 dias de infecção, camundongos infectados (n= 6) e não infectados (n= 6) foram tratados por via oral com uma dose de oxamniquina (400 mg/Kg). Amostras de soro foram obtidas aos 4 e 11 meses após o tratamento, e neste último mês, para controle da eficácia terapêutica, três camundongos foram submetidos à perfusão para a contagem de vermes. Nenhum verme foi encontrado.

Um ano após o tratamento, para testar a reversibilidade dos níveis de anticorpos após a eliminação dos vermes, animais (a) infectados e tratados e (b) não infectados e tratados foram re-infectados percutaneamente com 100 cercárias. Cinquenta dias após o desafio, sangue foi colhido para obtenção de soro. Um grupo de animais (n= 6) controle foi mantido sob as mesmas condições padrão durante todo o tempo de experimento. Camundongos infectados e não tratados, morreram durante o período do experimento.

Todos os animais de experimentação foram mantidos sob as mesmas condições padrão de cuidados de biotério. Este estudo foi aprovado pelo comitê de Ética da UFJF, Juiz de Fora/Brasil.

4.5 - Estudo de imunoreatividade cruzada entre NTPDases de mamíferos e anticorpos anti-apirase de batata

Camundongos suíços com 8 semanas de infecção experimental por cercárias (com 100 cercárias/animal) de *S. mansoni* foram sacrificados para retirada de órgãos. O fígado de cada um dos animais foram coletados e colocados em pequenos recipientes plásticos, que tiveram o fundo anteriormente revestido com uma fina camada da resina, comercialmente chamada de Tissue-Tek (OCT Compound). Os recipientes foram preenchidos com Tissue-Tek, deixando os fígados totalmente submersos na resina, e foram então envolvidos completamente com papel alumínio. Uma vez embalados, os recipientes foram colocados em garrafas contendo nitrogênio líquido para a polimerização da resina e formação dos blocos. Os blocos foram estocados a -70 °C até o momento do uso.

As peças de fígado foram retiradas dos recipientes e os blocos formados foram adaptados a um Criostato, micrótomo refrigerado (Leica CM 1800), e seccionados à temperatura de -17 °C. O micrótomo foi ajustado para obtenção de cortes com a espessura de 10 µm, que foram aderidos às lâminas previamente tratadas com poli-L-Lisina. Para este tratamento prévio com poli-L-Lisina, as lâminas foram bem lavadas com água e sabão neutro, enxaguadas com água deionizada e deixadas em poli-L-Lisina 0,01% por 30 minutos; a solução foi retirada e as lâminas enxaguadas com água deionizada e colocadas à temperatura ambiente para secar. Uma vez aderidos às lâminas, os cortes foram fixados em acetona, a temperatura de -20 °C, por cerca de 20 minutos. O fixador foi retirado e os cortes receberam uma lavagem em SSTF (Tampão salina-fosfato) e foram cobertos por uma solução bloqueadora constituída de 2% de leite desnatado, 2,5% de albumina bovina e 8% de soro fetal bovino em SSTF, durante 45 minutos. A solução de bloqueio foi retirada e os cortes foram lavados em SSTF por três vezes, em tempos de 3, 5 e 7 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados por 15 h a 4 °C com o soro de coelho contendo anticorpos anti-apirase de batata, diluído 1:250. Os cortes foram novamente lavados em SSTF por 3, 5 e 7 minutos e incubados por 60 minutos, a 37 °C em atmosfera de CO₂, com anticorpos secundários anti-IgG de coelho conjugados a rodamina (anti-rabbit-TRITC, Jackson, USA) diluídos em SSTF (1:800). Repetiram-se as lavagens e as lâminas foram montadas em

solução de DABCO (1,4-Diazobicyclo[2,2,2]octano), que continha 2,5% deste sal + 50% de glicerol, diluídos em SSTF. Como controle, algumas lâminas contendo os cortes foram processadas da mesma maneira, porém foram incubadas somente com o anticorpo secundário. Para eliminar a excessiva autofluorescência proveniente da casca dos ovos de *S. mansoni*, as lâminas foram analisadas em um Microscópio de Varredura Confocal a Laser (LSM 410-Zeiss), aplicando o filtro (LP 570) para as emissões na região da luz verde.

4.6 - Seleção de pacientes de áreas endêmicas para esquistossomose

A) População de área de baixa endemicidade – áreas de Chonim de Cima e Penha do Cassiano

Os distritos de Chonim de Cima e Penha do Cassiano pertencem ao município de Governador Valadares, composto por regiões que apresentam coleções hídricas como córregos e lagoas, as quais são utilizadas pela população local para atividades de lazer. A economia da região é baseada em atividades agrícolas, com pequenos negócios e comércio local. As comunidades possuem uma deficiente infra-estrutura básica de água tratada e captação e tratamento de esgoto, fatores que facilitam a manutenção do ciclo de vida do *S. mansoni* nestas áreas.

Da população de Chonim de Cima, foram selecionadas 30 amostras de soros de pacientes, divididas em dois grupos: soros de pacientes com idade até 17 anos (n= 10) e soros de pacientes com idade acima de 18 anos (n= 20). Todos estavam com esquistossomose, diagnóstico confirmado por exame clínico e laboratorial, usando o método Kato-katz para o exame parasitológico de fezes. Estes pacientes tiveram amostras de sangue colhidas antes e após tratamento quimioterápico com praziquantel (40 mg/Kg de peso), ao qual foram submetidos após o diagnóstico. A efetividade do tratamento quimioterápico foi observada pelos resultados negativos no exame parasitológico de fezes após 180 dias do tratamento. Estas amostras de soros foram usadas para a quantificação de IgG e IgM reativas com apirase de batata, SEA e SWAP antes e após o tratamento. Dez amostras de soros de indivíduos moradores de área não endêmica para esquistossomose e considerados clínica e laboratorialmente saudáveis foram usadas como controle.

B) População de alta endemicidade – área do Caju

A área do Caju, constituída por uma população de área rural e em condições sócio-econômicas precárias, é considerada de alta endemicidade para esquistossomose mansoni. Vários indivíduos envolvidos no estudo original estavam infectados por outros parasitos intestinais, tais como *Ascaris lumbricoides*, *Entamoeba coli* e ancilostomídeos. Desta área, foram selecionadas amostras de soros de: (a) indivíduos de 0 a 17 anos (n= 62) que apresentavam apenas ovos de *S. mansoni* no exame parasitológico; (b) indivíduos de 0 a 17 anos (n= 11) que estavam com resultado negativo no exame parasitológico de fezes; (c) indivíduos de 0 a 17 anos que apresentavam apenas ovos de ancilostomídeos em suas fezes (n= 4) e (d) indivíduos de 0 a 17 anos que estavam co-infectados com *S. mansoni* e ancilostomídeos (n= 27). Quinze amostras de soros de indivíduos moradores de área não endêmica para esquistossomose e considerados clínica e parasitologicamente saudáveis foram usadas como controle.

4.7 - Seleção de soros de pacientes com leishmaniose cutânea e doença de Chagas

A seleção dos pacientes com leishmaniose cutânea e a obtenção de soros de indivíduos de área endêmica para leishmaniose foram realizadas pelo Dr. Marcos José Marques da Universidade Federal de Alfenas. As amostras de soro (n= 21) foram obtidas de pacientes (15 homens e 6 mulheres de idade entre 20 a 45 anos) com leishmaniose cutânea provenientes de área endêmica. Esses pacientes apresentavam uma única lesão cutânea, medindo aproximadamente 12 mm de diâmetro, com um tempo de desenvolvimento \leq 60 dias. O diagnóstico da infecção por *L. (V.) braziliensis* foi confirmado através de exame parasitológico, pelo teste de intradermorreação de Montenegro, e pela reação em cadeia da polimerase (PCR), usando como padrão o DNA obtido de uma forma promastigota de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), como previamente descrito (Marques *et al.*, 2001).

Pacientes com as formas indeterminada ou cardíaca da doença de Chagas (n= 30) foram diagnosticados laboratorialmente, por imunofluorescência indireta, ELISA ou hemaglutinação indireta (Gomes *et al.*, 2005). Os soros destes pacientes foram gentilmente doados pelos nossos

colaboradores Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG e pela Dra. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau, do Laboratório de Imunologia do CPqRR/Fiocruz.

4.8 - Procedimentos usados para a execução da técnica de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assays)

A análise do perfil de isotipos de anticorpos reativos em amostras de soros de camundongos Balb/c e soros de pacientes foi realizada através de ELISA, de acordo com metodologia previamente descrita (Harlow & Lane, 1988). Os antígenos usados para estas análises foram: apirase de batata, SEA, SWAP ou preparações de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* e epimastigotas de *T. cruzi*. As diluições dos soros foram padronizadas previamente por titulação seriada. O antígeno (5 µg/poço) foi solubilizado em NaHCO₃ 0,1 M, pH 9,6, e adsorvido em placas de microtitulação (NUNC, Maxisorp), durante 12 h à 4° C. As placas foram lavadas 3 vezes com SSTF (solução salina tampão fosfato), pH 7,2. Após 1 h 30 min de bloqueio com Tween-20 (Sigma) 0,5% e caseína 2,5% em SSTF, as placas foram incubadas 15 h com os soros diluídos nesta mesma solução de bloqueio. As placas foram então lavadas 3 vezes com Tween-20 0,5% em SSTF e incubadas por 1 h e 30 min com os anticorpos secundários, ligados à peroxidase, contra cada isotipo, diluídos em uma solução de SSTF e Tween-20 0,05%. As placas foram lavadas 3 vezes com SSTF e Tween-20 0,5%. O isotipo de anticorpo ligado ao antígeno foi detectado usando OPD (o-phenylenediamine) e H₂O₂. A reação colorimétrica foi lida a 492 nm usando um leitor de ELISA (Spectra Max 190, Molecular Device, C.O). Para controle negativo, foram testados os anticorpos secundários na ausência dos soros testados. Como branco, foram usados poços contendo apenas o antígeno adsorvido e a reação colorimétrica. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas, validando aquelas leituras de densidade óptica com uma variação não maior do que 15% entre as amostras.

Para camundongos infectados, os soros dos animais em cada estágio agudo e os respectivos controles mantidos em paralelo, foram diluídos (1:100 a 1:2000) em solução de SSTF-Tween 20. Para a revelação foram usados anticorpos anti-IgG total (Sigma; St. Louis, MO), anti-IgM (Sigma; St. Louis, MO), anti-IgG1 (PharMingen; San Diego, CA) ou anti-IgG2a (PharMingen; San

Diego, CA) de camundongos, produzidos em coelho ou cabra e conjugados à peroxidase. Quando indicado, para análise de especificidade de resposta, a reatividade dos soros com albumina de ovo foi também testada.

Para a análise das amostras de soros de indivíduos saudáveis ou pacientes com leishmaniose cutânea americana, esquistossomose e doença de Chagas os soros foram diluídos (1:25 a 1:200) em solução de SSTF-Tween 20 e caseína 2,5%. Para a revelação foram usados anticorpos anti-IgG total, anti-IgG1, anti-IgG4, anti-IgM, anti-IgA ou anti-IgE (Zymed) de humanos, produzidos em camundongo conjugados à peroxidase.

4.9 - Análises *in silico*

A seqüência primária da apirase de *S. tuberosum* e de todos os outros organismos analisados nesta tese foram obtidos do NCBI (National Center for Biotechnology Information), banco de dados que mantém atualizadas as informações sobre genomas e proteínas. Para o alinhamento múltiplo e para confecção da árvore filogenética, o programa GeneBee Service (Graphical Phylogenetic Tree - GeneBee Service - <http://www.genebee.msu.su>), disponível 'on line' foi aplicado. O alinhamento das seqüências primárias dos membros da família das NTPDases, incluindo a apirase de batata, foi realizado através do programa BLASTp, e o alinhamento dos domínios compartilhados foi feito pelo programa "Blast 2 Sequences" (blseq), do NCBI, os quais executam comparações entre duas seqüências, buscando regiões de identidade e similaridade através do algoritmo de alinhamento Smith-Waterman (Smith & Waterman, 1981).

Os epítomos para células B nas proteínas dos parasitos foram analisados usando AbcPRED SERVER (www.imtech.res.in/raghava/abcpred/ABCmethod.html) que é capaz de prever epítomos com 65,93% de fidelidade. A predição de epítomos para células B é baseada em escore (até 1; Saha & Raghava, 2006), e neste trabalho somente os peptídeos com escore > 0,8 foram considerados positivos. As seqüências das proteínas dos parasitos foram também analisadas usando um algoritmo apropriado (www.imtech.res.in/raghava/propred/definations.html) que pode indicar peptídeos de 9 aminoácidos, iniciados com um resíduo hidrofóbico, que têm a probabilidade de se ligar com alta afinidade a uma ou mais (seqüências promíscuas) das 51

diferentes moléculas HLA-DR constantes nos bancos de dados (Singh & Raghava, 2001).

Os modelos tridimensionais da apirase de batata e da SmATPDase 2 de *S. mansoni* foram feitos pelo Dr. Octávio Luiz Franco da Universidade Católica de Brasília, que também identificou no alinhamento múltiplo das seqüências as regiões em α -hélice e estruturas β -pregueadas. O melhor molde para a apirase de batata ou para a SmATPDase 2 de *S. mansoni* foi determinado através do servidor BIO-info meta server (<http://bioinfo.pl/meta/>). A estrutura "PDB file 1T6C", já determinada por difração de raios-X, foi a que apresentou maior identidade com a proteína vegetal (52%) e a do parasito (37%) na ausência de "gaps". A construção da estrutura tridimensional foi feita através do programa Modeller 8.0 (Sali & Blundell, 1993; Sanchez & Sali, 1997). O programa Prosa II (Sippl, 1993) e o Swiss-PdbViewer (Guexn & Peitsch, 1997) foram usados para selecionar os modelos que apresentavam as características mais favoráveis para o empacotamento e exposição a solventes. O programa Procheck (Laskowski *et al.*, 1993) foi usado para análise adicional da qualidade estereoquímica. Baixo escore em "prosa II" e o alto fator "procheck g" definiram a alta qualidade do modelo.

4.10 - Análise estatística dos resultados

Para a comparação da soropositividade dos anticorpos, o menor limite de positividade (ponto de corte) foi definido como sendo a média da densidade ótica da amostra de soro de cada indivíduo saudável mais 2 vezes o desvio padrão. A média do valor de densidade ótica obtida da duplicata de cada amostra de paciente avaliado, igual ou maior que o ponto de corte foi considerado como soropositiva.

Para o cálculo de Unidade de Elisa, o valor da média das densidades óticas foi dividido pela média das densidades óticas obtidas do grupo controle, somada a 2 vezes o desvio padrão [média da DO de cada amostra/(X_{DO} controle + 2 DP)]. O valor obtido se refere ao número de vezes que a leitura de densidade ótica de cada paciente é maior do que o ponto de corte.

As análises estatísticas foram feitas usando o teste não paramétrico e não pareado de Mann-Whitney para dois grupos de dados e o teste Kruskal

Wallis para grupos de dados superior a dois, com o auxílio do software GraphPad Prism, versão 4 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

4.11 - Aspectos Éticos da Pesquisa

Todas as amostras de soros usadas para a realização desta tese faziam parte de sorotecas usadas para a realização de projetos previamente analisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas René Rachou, de acordo com o exigido pela resolução 196/96 (Conselho Nacional de Pesquisa para Seres Humanos). Para o uso destas amostras, um termo adicional foi solicitado sob o protocolo CEPESH/CPqRR N° 20/2007. Desta forma, constam nos protocolos CEPESH/CPqRR 06/2001 e 04/2005 as autorizações para a utilização das amostras de pacientes com doença de Chagas e esquistossomose, respectivamente. Para os pacientes com Leishmanioses, o protocolo do projeto foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, Brasil, sob número de processo nº. 141/2006.

Resultados

5 - Resultados

5.1 - Perfil de isotipos de anticorpos reativos com a apirase de batata nas fases aguda e crônica, pós-tratamento e re-infecção na esquistossomose experimental.

Os níveis de anticorpos reativos com a apirase de batata foram avaliados em amostras de soros de camundongos BALB/c infectados com 25 cercárias, usando a técnica de ELISA e a proteína vegetal como antígeno. As amostras de soro foram obtidas nas fases aguda (8-9 semanas de infecção) e crônica da infecção (17 semanas de infecção); Quatro (4MPT) e 11 (11MPT) meses após o tratamento; após a re-infecção dos camundongos tratados e após a infecção de um grupo controle (primo-infecção) que foi mantido durante todo o tempo do experimento (Tabela 1 e Fig. 1). O grupo controle para cada condição experimental tinha seis camundongos, que foram mantidos nas mesmas condições dos animais em teste (n= 6). Os soros foram testados nas diluições 1:200 a 1:2000. Os dados representativos na diluição 1:1000 do soro são mostrados na Tabela 1 e Figura 1.

Na fase aguda da infecção, os níveis de IgM ($p < 0,001$), IgG total ($p < 0,001$) e dos subtipos IgG1 ($p < 0,001$) e IgG2a ($p < 0,01$) dos camundongos infectados, reativos com a apirase de batata, estavam significativamente elevados, quando comparados àqueles encontrados em animais não infectados (controle; Tabela 1).

Na fase crônica, com exceção de IgG2a, todos os outros anticorpos estavam com o nível significativamente ($p < 0,001$) elevado quando comparado ao controle, e mantiveram-se significativamente ($p < 0,001$) elevados aos 4 e 11 meses após o tratamento. Nenhuma reatividade de IgG2a contra a apirase de batata pôde ser observada aos 4 e 11 meses após o tratamento (Tabela 1).

Após 1 ano do tratamento, os camundongos foram re-infectados. Como descrito na Tabela 1, os níveis de IgM ($p < 0,01$), IgG total ($p < 0,01$), IgG1 ($p < 0,05$) e IgG2a ($p < 0,01$) mostraram-se significativamente elevados quando comparados aos níveis encontrados no grupo de camundongos não infectados e tratados, o grupo controle para este experimento.

Um grupo de camundongos que foi mantido durante todo o tempo do experimento, sem qualquer intervenção, foi também infectado paralelamente

(primo-infecção). Este grupo mostrou níveis significativamente elevados de IgM ($p < 0,01$), IgG total ($p < 0,01$), IgG1 ($p < 0,05$) e IgG2a ($p < 0,01$).

Tabela 1. Níveis de anticorpos reativos com a apirase de batata durante a progressão da esquistossomose experimental.

		IgM (D.O.)	IgGt (D.O.)	IgG1 (D.O.)	IgG2a (D.O.)
Fase aguda	Controle	0,230 ± 0,057	0,005 ± 0,003	0,041 ± 0,009	0,027 ± 0,009
	Infectado	0,573 ± 0,038***	0,049 ± 0,015***	0,307 ± 0,058***	0,078 ± 0,036**
Fase crônica	Controle	0,107 ± 0,025	0,037 ± 0,008	0,020 ± 0,010	0,022 ± 0,006
	Infectado	0,256 ± 0,054***	0,105 ± 0,030***	0,227 ± 0,072***	0,029 ± 0,012
4MPT	Controle	0,129 ± 0,030	0,130 ± 0,035	0,044 ± 0,022	0,053 ± 0,021
	Infectado	0,263 ± 0,033***	0,231 ± 0,040***	0,204 ± 0,106***	0,050 ± 0,018
11MPT	Controle	0,126 ± 0,037	0,064 ± 0,034	0,025 ± 0,010	0,059 ± 0,037
	Infectado	0,234 ± 0,041***	0,197 ± 0,059***	0,097 ± 0,034***	0,050 ± 0,026
Re-infecção	Controle	0,134 ± 0,040	0,034 ± 0,016	0,034 ± 0,011	0,034 ± 0,007
	Infectado	0,328 ± 0,130**	0,098 ± 0,030**	0,169 ± 0,124*	0,064 ± 0,021**
Primo-infecção	Controle	0,134 ± 0,040	0,034 ± 0,016	0,034 ± 0,011	0,034 ± 0,007
	Infectado	0,359 ± 0,090**	0,123 ± 0,047**	0,082 ± 0,043*	0,058 ± 0,011**

Nível de significância quando comparado ao controle: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; $p < 0,05$

Como a quantificação de anticorpos reativos com a apirase de batata foi realizada em meses distintos, os resultados foram normalizados em Unidade de Elisa (U.E.), dividindo o valor da média de cada soro teste pelo valor da média do respectivo controle somado a dois desvios padrão. Os dados representativos na diluição 1:1000 dos soros, em cada etapa do experimento, estão mostrados na Figura 1.

Como observado, os níveis de IgM mantiveram-se elevados e similares nas fases aguda e crônica, e só mostraram redução significativa ($p < 0,001$) 11 meses após o tratamento, quando comparado a fase crônica (Fig. 1A). Na re-infecção dos camundongos tratados, o nível de IgM elevou-se novamente, similar ao encontrado na fase aguda da infecção de camundongos jovens e na primo-infecção de camundongos da mesma idade, e que foram infectados paralelamente (Fig. 1A).

O maior nível de IgG total foi observado na aguda da infecção, significativamente ($p < 0,01$) maior quando comparado a fase crônica (Fig. 1B). Após 4 ($p < 0,001$) e 11 ($p < 0,05$) meses do tratamento, foi possível observar redução significativa dos níveis de IgG total, quando comparados àquele encontrado na fase crônica. No grupo de animais tratados e re-infectados, o nível de IgG total se manteve similar ao observado após 11 meses de tratamento, sugerindo que o desafio não foi capaz de estimular significativamente a produção de IgGt. No grupo de camundongos primo-infectados, a produção de IgGt foi estimulada (Tabela 1), mas em nível significativamente ($P < 0,01$) menor quando comparado àquele observado em camundongos jovens na fase aguda da infecção (Fig. 1B).

Níveis elevados e similares de IgG1 foram observados nas fases aguda e crônica da infecção, que reduzem-se significativamente ($p < 0,001$) aos 4 e 11 meses (Fig, 1 C). A produção do anticorpo IgG1 aparentemente não é estimulada pela re-infecção, por que o nível deste anticorpo detectado no grupo de camundongos re-infectados estava similar ao encontrado 11 meses após o tratamento. Embora tenha sido possível observar elevação significativa ($p < 0,05$) do nível de IgG1 no grupo de camundongos primo-infectados (Tabela 1), ele foi menor quando comparado ao encontrado em camundongos jovens na fase aguda da infecção (Fig. 1C).

Na fase aguda, o nível de IgG2a estava significativamente maior quando comparado ao controle (Tabela 1; $P < 0,01$). Por outro lado, a reatividade de IgG2a contra a apirase de batata foi similar ao “background” (controle) durante a fase crônica e após o tratamento (4 e 11 meses), evidenciando seu desaparecimento após a fase aguda (Tabela 1; Fig. 1D). Quando os animais foram desafiados (re-infecção), o nível de IgG2a mostrou-se novamente elevado quando comparado ao controle ($p < 0,01$; Tabela 1) ou ao “background” ($p < 0,001$) encontrado aos 11 meses pós-tratamento (Fig. 1D), e em nível similar ao encontrado em camundongos jovens na fase aguda da infecção. Esta elevação significativa ($p < 0,01$) do nível de IgG2a foi também observada no grupo de camundongos primo-infectados, quando comparado ao controle (Tabela 1), e similar ao observado na fase aguda de infecção de camundongos jovens. (Fig. 1D).

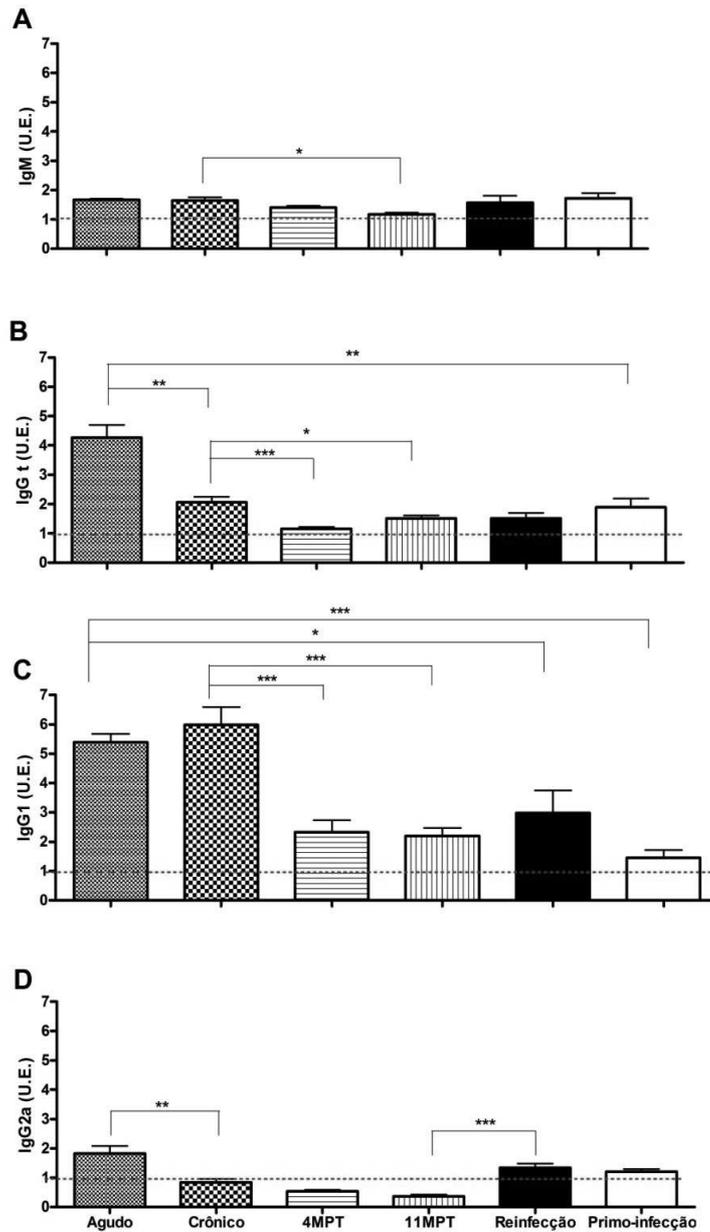


Figura 1. Reatividade dos anticorpos contra a apirase de batata em soros de camundongos BALB/c experimentalmente infectados– Os níveis de IgM (A), IgGt (B), e dos subtipos IgG1 (C) e IgG2a (D) reativos com a apirase de batata são mostrados como as médias das Unidades de ELISA (U.E) e os respectivos erros padrão. As barras correspondem aos grupos de camundongos nas fases aguda, crônica, 4 (4MPT) e 11 meses (11MPT) após o tratamento, camundongos reinfecção após o tratamento e primo-infectados

com 45 dias de infecção. A linha pontilhada indica o ponto de corte. Os níveis de significância foram ***p < 0,001, **p < 0,01 ou *p < 0,05.

5.2 - Propriedade imuno-estimulatória da apirase de batata

Coelho branco (100 µg) e camundongos BALB/c (10 µg; n= 4) receberam 3 inóculos de apirase de batata, como descrito em Material e Métodos. Altos níveis de IgG total contra apirase de batata foram produzidos pelo coelho (Fig. 2; título > 1:16000) e pelos camundongos (Fig. 3A; título 1:4000).

Os subtipos IgG1 e IgG2a contra apirase de batata foram então avaliados nos soros dos camundongos previamente inoculados com a proteína vegetal. Como observado na Figura 3, altos níveis de IgG1 (B; título > 1:6400) e IgG2a (C; título 1:1600) foram detectados nestes soros. Estes resultados mostraram que a apirase de batata é uma proteína imuno-estimulatória, capaz de induzir a produção de IgG1 e IgG2a.

5.3 - Detecção da presença de isoforma solúvel de ATP difosfohidrolase de *S. mansoni* em preparação de SEA

Para identificar a presença da isoforma solúvel de ATP difosfohidrolase na preparação de antígeno solúvel de ovo (SEA), a reatividade de anticorpos IgG anti-apirase de batata produzidos em coelho e em camundongos BALB/c foi avaliada pela técnica de ELISA, usando esta preparação como antígeno (Fig. 4, A e B). Os soros policlonais destes animais foram capazes de reagir com SEA, com título até 1:8000, enquanto a reatividade contra o antígeno controle (ovalbumina) foi insignificante (Fig. 4, A e B). Como observado previamente, a isoforma solúvel de ATP difosfohidrolase em SEA não é majoritária (Faria-Pinto et al., 2004), sugerindo que os domínios compartilhados entre a apirase de batata e esta proteína do parasito são altamente conservados e reativos.

O inóculo da proteína vegetal em camundongos BALB/c foi capaz de estimular a produção de IgG1 e IgG2a anti-apirase de batata (Fig. 3, B e C) e os soros destes animais foram usados para identificar qual o subtipo é reativo com esta preparação (Fig. 5, A e B). Foi detectado alto nível de IgG1 reativo com SEA (título > 6400), sugerindo fortemente que os epitopos compartilhados

são indutores deste subtipo de anticorpo, e que esta preparação apresenta um conteúdo significativo desta isoforma solúvel de ATP difosfohidrolase do parasito (Fig. 5A). Interessantemente, embora os soros de camundongos previamente inoculados com apirase de batata mostrassem um conteúdo significativo de IgG2a anti-apirase de batata (Fig. 3C), este subtipo não foi capaz de reconhecer em SEA a presença da isoforma solúvel desta proteína proveniente do parasito (Fig. 5B), sugerindo que os epitopos compartilhados possivelmente indutores de IgG2a são menos representativos.

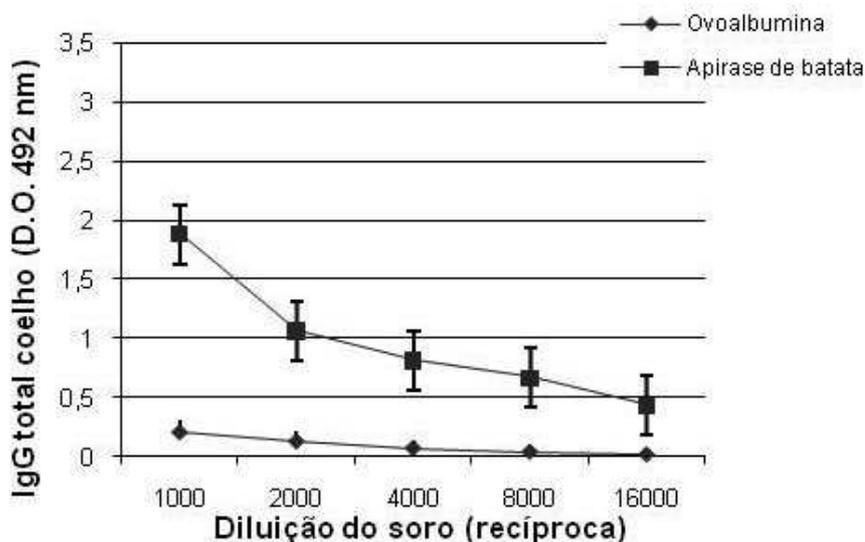


Figura 2. Titulação de anticorpos IgG total contra apirase de batata em soro de coelho- Um coelho branco recebeu 3 inóculos de apirase de batata (100 µg), como em descrito em Material e Métodos, e o soro foi titulado usando a técnica de ELISA e a proteína vegetal como antígeno. Ovalbumina foi usada como controle. A variação foi determinada pelo teste T, mostrando diferença significativa ($p < 0,001$) até a diluição 1:16000.

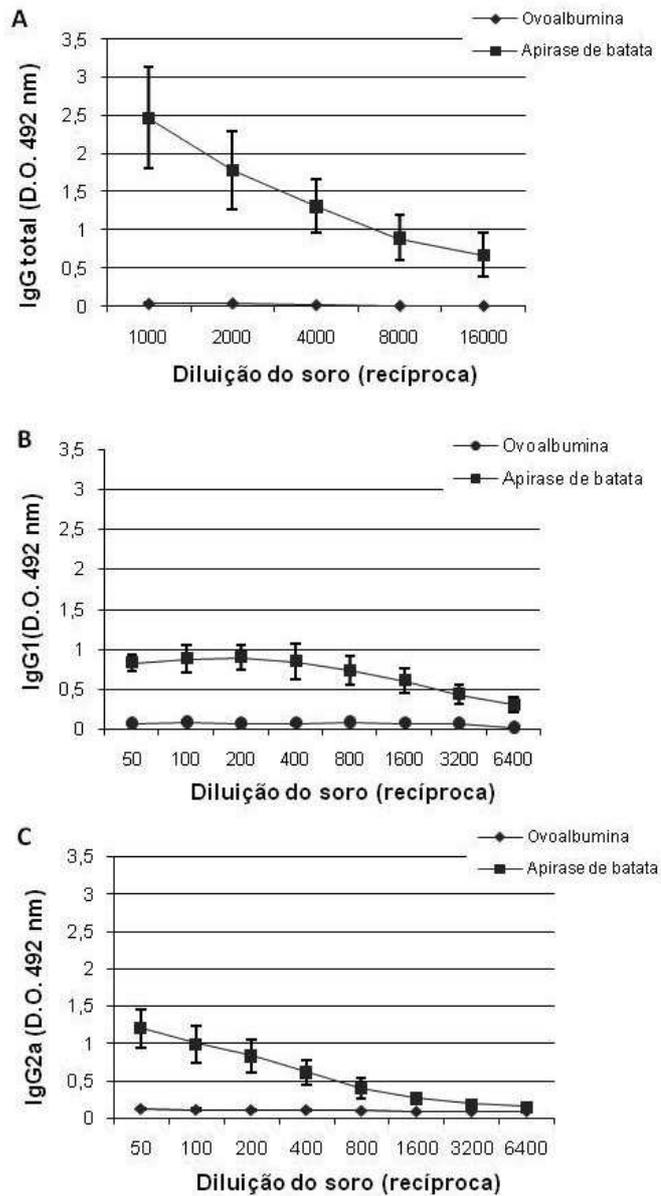


Figura 3. Titulação de anticorpos contra apirase de batata em soros de camundongos BALB/c- Camundongos BALB/c (n= 4) receberam 3 inóculos de apirase de batata (10 µg), como em descrito em Material e Métodos, e os níveis de IgG total (A), IgG1 (B) e IgG2a (C) dos soros foram titulados usando a técnica de ELISA e a proteína vegetal como antígeno. Ovalbumina foi usada como controle. A variação entre as medidas foi determinada pelo teste T. Os níveis de IgG total, IgG1e IgG2a estavam significativamente maiores que o controle até as diluições 1:16000 ($p < 0,05$), $> 1:6400$ ($p < 0,001$), e 1:1600 ($p < 0,001$), respectivamente.

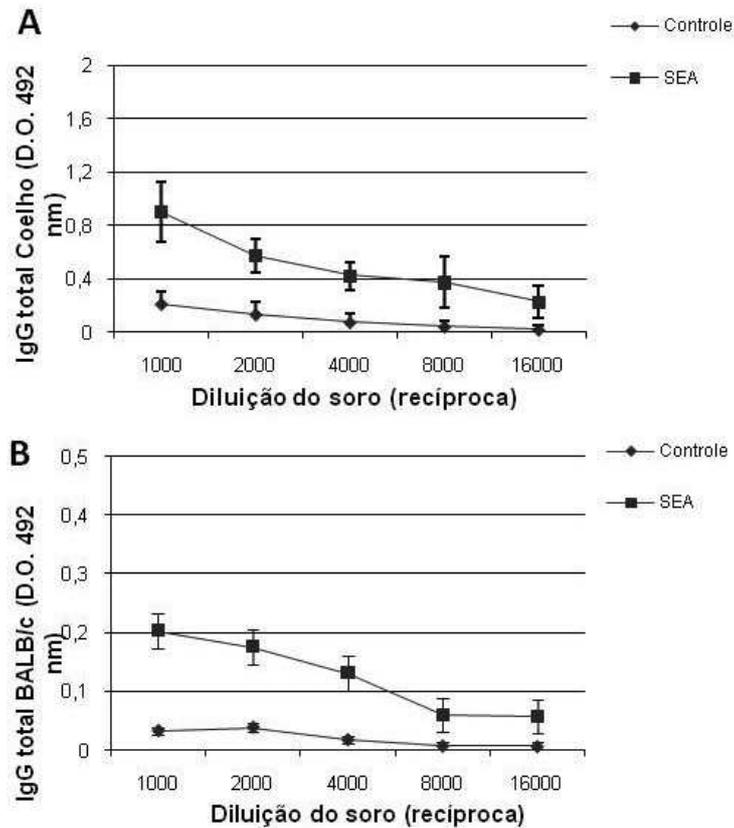


Figura 4. Detecção de isoforma solúvel de ATP difosfohidrolase de *S. mansoni* na preparação de SEA- A preparação de SEA foi usada como antígeno em técnica de ELISA, e incubada com soro de coelho (A) e camundongos BALB/c (B; n=4), previamente inoculados com a apirase de batata, e a reatividade de IgG total foi revelada. A variação da significância das leituras foi determinada pelo teste T. Os níveis de IgG total de coelho e camundongos reativos com SEA ($p < 0,01$) foram significativamente maiores que o controle até a diluição 1:16000.

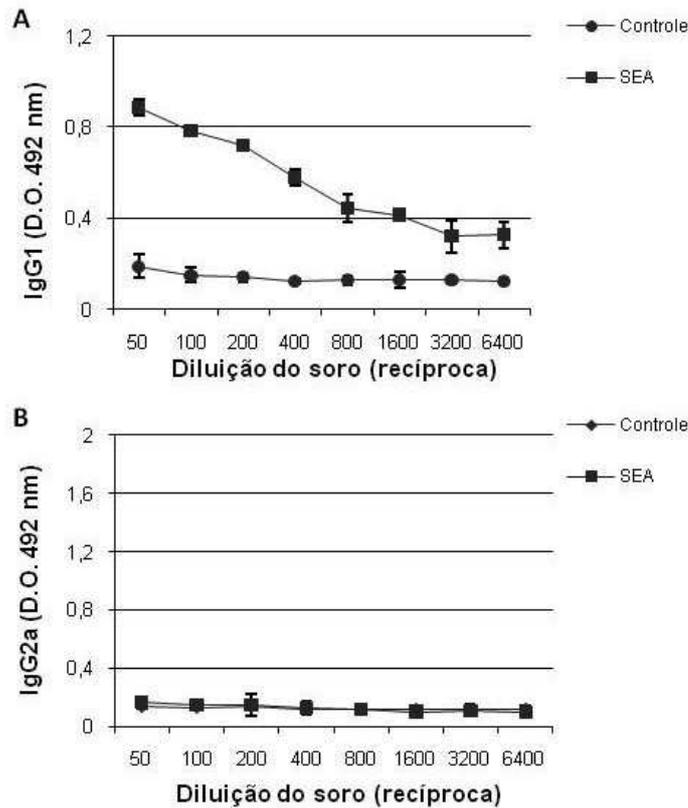


Figura 5. Reatividade de IgG1 e IgG2a anti-apirase de batata de soros de camundongos com o antígeno SEA- A preparação de SEA foi usada como antígeno em técnica de ELISA, e incubada com soros de camundongos BALB/c (B; n= 4) inoculados com a proteína vegetal. A reatividade de IgG1 (A) e IgG2a (B) anti-apirase de batata foi revelada. A variação foi determinada pelo teste T. O nível de anticorpos IgG1 reativos com SEA foi significativamente ($p < 0,001$) maior que o controle até a diluição 1:6400. Os níveis de IgG2a mantiveram-se sem alterações significativas.

5.4 - Avaliação da reatividade entre anticorpos anti-apirase de batata produzidos em coelho e as NTPDases de mamíferos

Para verificar se os anticorpos anti-apirase de batata seriam capazes de reconhecer as NTPDases de mamíferos, cortes de fígado de camundongos Suíços com 8 semanas de infecção com *S. mansoni*, contendo granulomas em sua fase exudativa-produtiva, foram incubados com o soro de coelho previamente inoculado com esta proteína vegetal. A localização da enzima *in situ* foi desenvolvida por imunofluorescência indireta, usando anticorpos anti-IgG de coelho conjugados à rodamina (TRITC) e um Microscópio de Varredura Laser Confocal. As imagens obtidas permitiram localizar a ATP difosfohidrolase ao redor de toda a superfície externa do miracídio (Fig. 6A). Material granular imunoreativo foi também observado na superfície externa da casca do ovo, região recoberta por microespinhos (Fig. 6A, seta1), sugerindo que uma isoforma solúvel da ATP difosfohidrolase de *S. mansoni* é secretada do ovo.

Ao redor do tecido granulomatoso, rico em células inflamatórias tais como macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, linfócitos, mastócitos e fibroblastos (Lenzi *et al.* 1998), nenhuma imunofluorescência foi observada (Fig. 6A, seta 2), sugerindo que não existe imunoreatividade cruzada entre os anticorpos anti-apirase de batata e as isoformas de NTPDases já descritas nestas células.

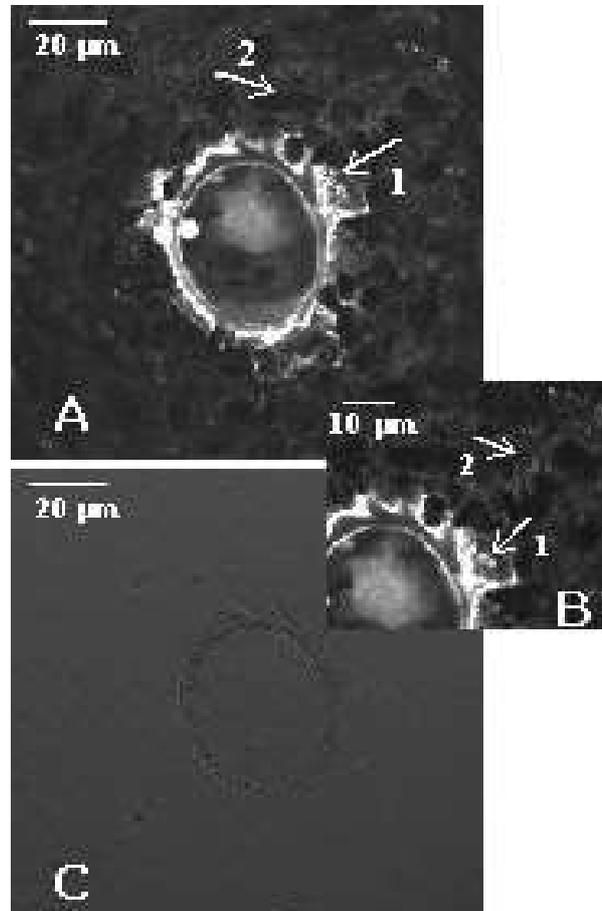


Figura 6. Análise da reatividade entre anticorpos anti-apirase de batata e as isoformas de ATP difosfohidrolases de ovo de *S. mansoni* ou NTPDases de células que compõem o granuloma– Os cortes (10 μm de espessura) congelados de fígado de camundongo suíço infectado por *S. mansoni* foi incubado com anticorpos anti-apirase de batata (diluição 1:250), revelado com anticorpos secundários acoplados à rodamina (TRITC), e analisado em microscópio de imunofluorescência confocal. Em (A), aspecto geral de ovo de *S. mansoni* mostrando fluorescência homogeneamente distribuída por toda a superfície do miracídio e imediatamente na face externa da casca do ovo (seta 1); nenhuma reação é detectada ao redor do ovo onde se encontram as células da reação inflamatória granulomatosa (seta 2). Em (B), um aumento da imagem de (A). Em (C) a imagem do ovo em DIC, mostrando a integridade das estruturas no interior e ao redor do ovo.

5.5 - Análises *in silico*

As seqüências de aminoácidos de 32 proteínas, membros da família das ATP difosfohidrolases, foram usadas para análises *in silico*. Para que a análise contemplasse uma variedade significativa de membros desta família de proteínas, foram escolhidas ATP difosfohidrolases de mamíferos, helmintos, protozoários, mosquitos e plantas, disponibilizadas no banco de dados do GeneBank do NCBI (National Center Biotechnology Information).

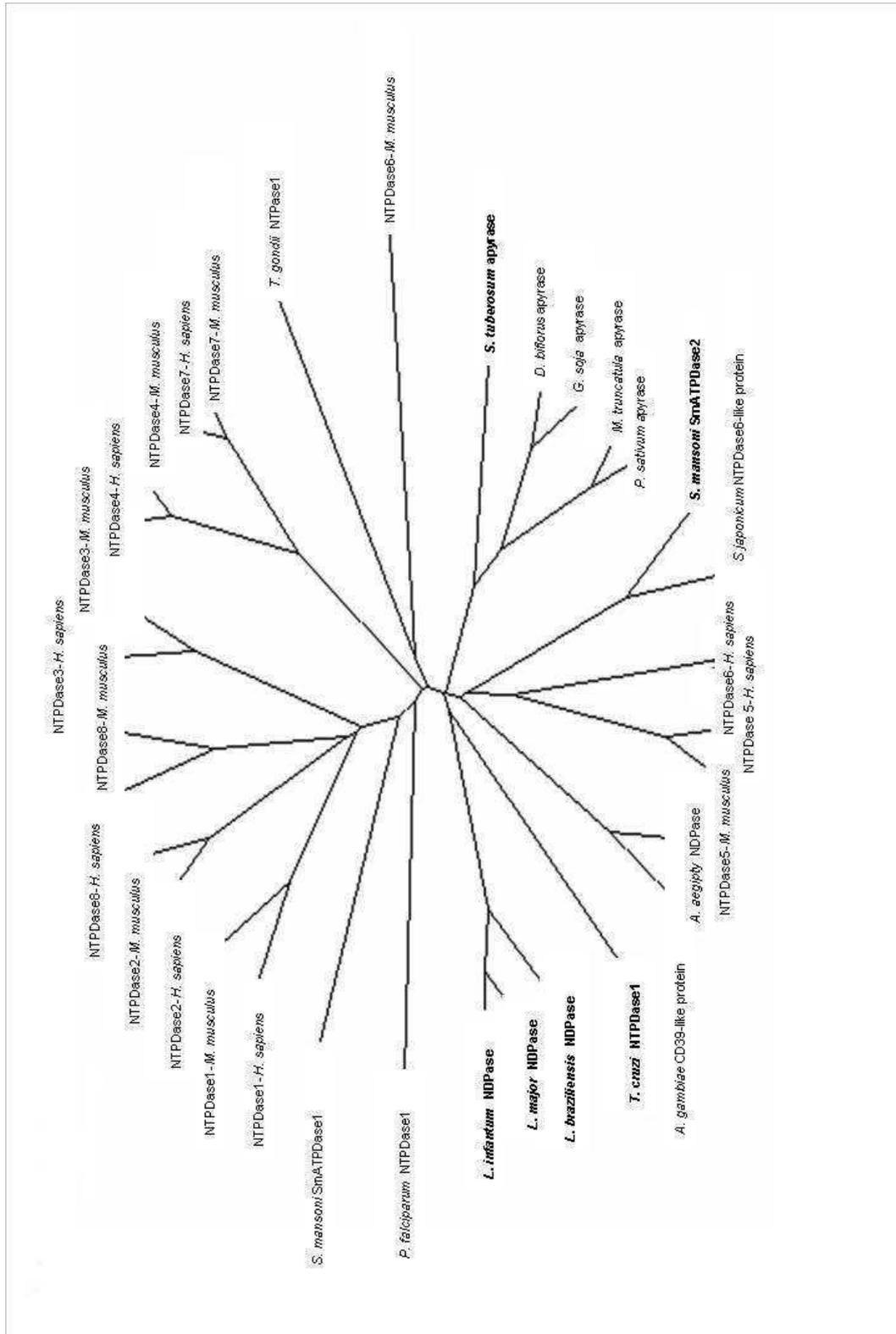
A análise filogenética gerou uma árvore (Fig.7) que mostra dois grandes ramos principais, sugerindo duas rotas evolutivas distintas. O primeiro ramo reúne as NTPDases 1-4 e 6-8 de camundongos e as NTPDases 1-4 e 7-8 de humanos, uma NTPDase hipotética de *Plasmodium falciparum*, a NTPase 1 de *Toxoplasma gondii*, além da SmATPase 1, uma isoforma que foi encontrada na membrana externa de miracídio, cercária, esquistossômulo e verme adulto de *S. mansoni*.

No segundo ramo, é possível observar as apirases de batata e de outras plantas, as NTPDases 5 e 6 de humanos, a NTPDase 1 de *Trypanosoma cruzi*, e as apirases hipotéticas encontradas nos genomas de *Aedes aegypti*, *S. japonicum*, *Leishmania major*, *L. infantum* e *L. braziliensis*. Neste segundo ramo, está também a SmATPDase 2, uma isoforma solúvel secretada de vermes adultos de *S. mansoni*.

As seqüências de aminoácidos destas proteínas foram então alinhadas para a visualização das regiões com maior nível de identidade com a apirase de batata, as quais são mostradas em colunas cinza nas Figuras 7 e 8.

As proteínas que mostraram maior homologia com a apirase de batata foram as NTPases de *Leishmania* (30-33% de identidade e 45-46% de similaridade em 401 a 408 aminoácidos analisados), seguidas da SmATPDase 2 de *S. mansoni* (28% identidade e 43% de similaridade em 433 aminoácidos analisados). Menor identidade foi encontrada com a NTPDase de *T. cruzi* (27% de identidade e 43% de similaridade em 430 aminoácidos).

Figura 7. Árvore filogenética gerada da análise das seqüências de aminoácidos de membros da família das ATP difosfohidrolases- A árvore foi construída usando o programa T-Coffee, excluindo as posições que continham “gaps”. Os números de acesso do GeneBank para as seqüências são: *Solanum tuberosum* apirase, P80595; *Dolichos biflorus* apirase, AF156781; *Glycine soja* apirase, AAG32959; *Medicago truncatula* apirase, AAO23007; *Pisum sativum* apirase, BAB85978; *Schistosoma mansoni* SmATPDase2, DQ868522; *Schistosoma japonicum* NTPDase6-like protein, AAW26231; NTPDase6-*Homo sapiens*, AAP92131; NTPDase5-*Homo sapiens*, NP_001240; NTPDase5-*Mus musculus*; NP_001021385; *Aedes aegypti* NDPase, EAT42846; *Anopheles gambiae* CD39-like protein, XP_320057; *Trypanosoma cruzi* NTPDase1, AAS75599; *Leishmania braziliensis* NDPase, CAM42020; *Leishmania major* NDPase, CAJ03227; *Leishmania infantum* NDPase, CAM66723; *Plasmodium falciparum* NTPDase1, XP_00138471; *Schistosoma mansoni* SmATPDase1, AAP94734; NTPDase1-*Homo sapiens*, NP_001767; NTPDase1-*Mus musculus*, AAAH11278; NTPDase2-*Homo sapiens*, NP_982293; NTPDase2-*Mus musculus*, O55026; NTPDase8-*Homo sapiens*, AAR04374; NTPDase8-*Mus musculus*, NP_082369; NTPDase3-*Homo sapiens*, NP_001239; NTPDase3-*Mus musculus*, NP_848791; NTPDase4-*Homo sapiens*, NP_004892; NTPDase4-*Mus musculus*, NP_080450; NTPDase7-*Homo sapiens*, NP_065087; NTPDase7-*Mus musculus*, NP_444333; *Toxoplasma gondii* NTPase1, Q27893; NTPDase6-*Mus musculus*; NP_742115.



A maior porcentagem de identidade entre a apirase de batata e as NDPases de Leishmanias (50 a 82.4%) ou a SmATPDase 2 de *S. mansoni* (41 a 70%) foi encontrada nas regiões A, B, C, D, E, F e G (Tabela 2), que são mostradas em colunas cinzas na Figura 8. As regiões A, C, D e E incluem os domínios conservados característicos da família das ATP difosfohidrolases, a ACR1, ACR2, ACR3 e ACR4, respectivamente (Fig. 8). Nenhuma identidade significativa foi observada na seqüência linear de aminoácidos da região correspondente a ACR5 (Fig. 8).

Os epitopos para células B presentes nos domínios conservados destas proteínas foram então analisados usando AbcPRED SERVER, e aqueles com escore > 0,8 foram considerados positivos para ligar anticorpos (Tabela 2). Os peptídeos nanoméricos iniciados com um resíduo hidrofóbico, que têm a probabilidade de se ligar com alta afinidade a uma ou mais (seqüências promíscuas) das 51 diferentes moléculas HLA-DR constantes no banco de dados, foram também analisados por um algoritmo apropriado (PROPRED SERVER).

Os peptídeos encontrados nas regiões A e D da NDPase da *L. braziliensis*, SmATPDase 2 de *S. mansoni* ou NTPDase de *T. cruzi* mostraram alto escore (> 0,8) para ligar anticorpos (Fig. 8 e Tabela 2). Na Região C, somente as proteínas de *L. braziliensis* e *T. cruzi* têm peptídeos com alto escore (> 0,8) para reatividade com anticorpos. Análise da Região E sugere que ela pode ser um domínio contendo epitopos na NDPase de *L. braziliensis* ou na SmATPDase 2 de *S. mansoni* (Fig. 8 e Tabela 2). Com exceção da Região E, que inclui a ACR4, todas as outras foram preditas como promíscuas, desde que elas têm peptídeos nonaméricos capazes de ligar 10 (20%) a 47 (92%) das 51 diferentes (HLA)-DR moléculas e, portanto, teoricamente com uma alta probabilidade de induzir resposta imune de células T (Fig. 8 e Tabela 2).

A região F, mas não a G, na NDPase de *L. braziliensis* e na NTPDase 1 de *T. cruzi* tem alto escore para ligar anticorpos (> 0.8; Fig. 8 e Tabela 2). De acordo com a predição, estas regiões F e G da SmATPDase 2 não ligam anticorpos (Fig. 8 e Tabela 2). Para todas estas proteínas analisadas, as Regiões F e G têm peptídeos promíscuos capazes de ligar moléculas HLA-DR (Fig. 8 e Tabela 2). As regiões F e G não são características da família das ATP difosfohidrolases, mas também compartilham identidade com as

NTPDases 5 e 6 de mamíferos, e/ou com a NTPDase 1, uma proteína associada à membrana de células de humanos (Fig.7).

Por outro lado, a Região B da NDPase de *L. braziliensis* (50% identidade e 57% de similaridade em 38 aminoácidos) ou da SmATPDase 2 de *S. mansoni* (48% identidade e 67% de similaridade em 37 aminoácidos) mostra alta identidade com a apirase de batata em ausência de gaps (Fig. 8). Ela tem alto escore para ligar anticorpos (> 0.8) e vários peptídeos promíscuos capazes de ligar as moléculas de HLA-DR (Fig. 8 e Tabela 2). Esta região B da apirase de batata é também compartilhada com as NDPases hipotéticas de *S. japonicum*, *L. infantum* ou *L. major* (Fig. 7), e com outras isoformas de apirase de plantas encontradas no banco de dados de proteínas (dados não mostrados). Interessantemente, ela mostra menor identidade com as NTPDases 5 e 6 (32-40%), proteínas solúveis, ou com a NTPDase 1 (20%), uma proteína associada à membrana, encontradas em mamíferos. Nenhuma similaridade foi encontrada com a NTPDase 1 de *T. Cruzi*. Portanto, esta seqüência particular de aminoácidos da Região B é compartilhada entre as apirases de plantas e àquelas isoformas de *Leishmania* e *Schistosoma*.

A SmATPDase 1 de *S. mansoni* mostrou maior homologia (33% de identidade e 52% de similaridade em 505 aminoácidos analisados) com a NTPDase 1 de humanos, e menor com a apirase de batata (25% de identidade e 42% de similaridade em 439 aminoácidos analisados) (Figura 9).

Maior identidade (18 a 50%) entre apirase de batata e a SmATPDase 1 foi também encontrada nas regiões A (Pot 46-64), C (Pot 120-147), D (Pot 162-181) e E (Pot 192-212), que incluem as regiões conservadas da família das apirases, ACR1, ACR2, ACR3 e ACR4, respectivamente, e em outras regiões tais como B (Pot 80-106), F (Pot 236-256) e G (394-408) (Figura 9 e Tabela 3).

As regiões A, D e E, mas não a C, da SmATPDase 1 mostram alto escore (>0,80) para ligar anticorpos (Tabela 3). As regiões A, C, D e E da SmATPDase 1 foram preditas como promíscuas, desde que elas são capazes de ligar quase 34% (17/51), 90% (46/51), 34% (17/51) e 12% (6/51), respectivamente, das moléculas HLA-DR do banco de dados e, portanto, com alta probabilidade de induzir resposta imune de células T (Tabela 3). Nenhum resultado significativo foi observado na região correspondente a ACR5 da SmATPDase 1.

A região B da SmATPDase1 (106-133) mostrou menor identidade (42,9%) com a apirase de batata (79-106) quando comparada à região B da SmATPDase 2 (55,2%). Esta região B é potencialmente ligadora de anticorpos (>0,8) e a 45% das moléculas HLA-DR (23/51) (Tabela 3). As regiões F (34-44%) e G (48-59%) da SmATPDase 1, que mostrou alto nível de identidade com outras seqüências de aminoácidos analisadas, são também potencialmente capazes de ligar anticorpos (>0,8) e altamente promíscuas, desde que a Região F é capaz de ligar 35% (18/51), e a Região G, 100% (51/51) das moléculas HLA-DR (Tabela 3).

Figura 8. Alinhamento das estruturas primárias das isoformas de ATP difosfohidrolases de batata, parasitos e mamíferos- As regiões conservadas entre as seqüências estão marcadas por linhas pretas nas bases das seqüências, nomeadas de A-G. Os boxes verticais correspondem às regiões conservadas (ACRs) da família das ATP difosfohidrolases. Todos os aminoácidos idênticos aos da apirase de batata, localizados nas outras seqüências foram destacados em cinza. O resíduo de aminoácido hidrofóbico inicial de cada peptídeo nonamérico capaz de se ligar ao HLA-DR de humanos, está marcado em preto e os outros resíduos de aminoácidos componentes destas seqüências estão em negrito. Os boxes horizontais representam as seqüências peptídicas com maiores potenciais de ligação a anticorpos. Os cilindros em cor cinza correspondem às regiões que tem conformação estrutural em α -hélice e as setas as regiões em folhas β -pregueadas. As linhas pretas horizontais indicam seqüências que foram omitidas no alinhamento. Os números de acesso do GeneBank para as seqüências estão indicados na Figura 5, acrescidas das seqüência de: *L. braziliensis* GDPase, CAM37219; *L. major* GDPase, Q4HK3 e *L. infantum* GDPase, CAM66031.

S.tuberosum apirase (40) -----S**H**ES**H**Y**M**A**I**F**D**A**G**S**T**G**S**R**V**H**V****F**R**F**D**E**---K**L**G**L**L---P**I**G**N**-----N**I**
L.braziliensis NDPase(50) -----S**N**V**Y**D**L**V**I**D**A**G**S**T**G**S**R**V**H**V**F**Q**Y**E**R**---S**S**T**G**V-----I**L**L**R**
L.major NDPase (48) -----A**Y**A**N**V**Y**D**V**V**I**D**A**G**S**T**G**S**R**V**H**V**F**Q**Y**E**R**---G**R**T**G**F-----V**L**L**R**
L.infantum NDPase (48) -----A**Y**A**N**V**Y**D**V**V**I**D**A**G**S**T**G**S**R**V**H**V**F**Q**Y**E**R**---G**R**T**G**L-----V**L**L**R**
S.mansoni SmATPDase2 (113) -G**V**A**T**I**K**T**N**Y**V**Y**G**V**V**F**D**A**G**S**T**G**S**R**V**H**I**F**K**L**I**H**N**P-----L**D**P**F**K**P**----F**T**L**L**D
S.japonicum NTPDase (114) --S**A**M**T**T**E**N**Y**V**Y**G**V**V**F**D**A**G**S**T**G**S**R**V**H**I**F**K**L**I**Y**N**P**-----L**D**S**S**K**P**----F**T**L**L**D
L.braziliensis GDPase(200) -R**K**A**C**V**D**A**V**A**K**Y**S**V**V**F**D**I**G**S**T**G**N**R**V**H**V**Y**K**Y**R**V**N**P**L**T**Q**I**S**A**P**D**E**L**S**K-----I**D**L**V**G
L.major GDPase (185) -G**A**C**A**K**S**S**V**K**Y**S**V**V**F**D**I**G**S**T**G**N**R**V**H**V**Y**K**Y**R**V**A**P**A**T**R**T**A**A**A**G**S**E**L**S**D-----I**D**L**V**E
L.infantum GDPase (185) -A**C**T**K**T**K**T**S**D**K**Y**S**V**V**F**D**I**G**S**T**G**N**R**V**H**V**Y**K**Y**R**V**A**P**A**T**H**T**A**A**A**G**S**E**L**S**D**-----I**D**L**V**E
T.cruzi NTPDase1 (192) -L**T**N**C**N**A**M**R**R**S**T**S**V**F**D**A**G**S**T**G**S**R**V**E**V**R**Y**N**L**T**S**T**P**H**A**G**N**F**S**W**N**G**T**R**P**S**l**t**s**f**L**R**L**D**D
Human NTPDase 5 (44) -----S**A**S**T**L**Y**G**I**M**F**D**A**G**S**T**G**T**R**I**H**V**Y**T**F**V**Q**K**M**P**G**Q**L**P**I**-----L**E**G
Human NTPDase 6 (90) -G**T**A**D**A**G**H**E**V**F**Y**G**I**M**F**D**A**G**S**T**G**T**R**V**H**V**F**Q**F**T**R---P**P**R**E**T**P**T-----L**T**H
Human NTPDase 1 (45) -----E**N**V**K**Y**G**I**V**L**D**A**G**S**S**H**T**S**L**Y**I**Y**K**W---P**A**E**K**E**N**D**T**G**V**V-----H-----Q**V**

Region-A

S.tuberosum apirase (78) **E**V**M**A**T**E**P**G**L**S**S****A**E**D**P**K**A**A**A**N**S**L**E**P**L**L**D**G**A**E**G**V**V**P**Q**E**T**O**S**E**T**P**L**E**T**G**A**T**A**G****R**M**K**G
L.braziliensis NDPase(83) **E**R**F**K**R**I**E**P**G**L**S**S**F**A**T**D**O**E**G**A**K**O**S****L**A**G**L**R**F**A**E**K**A**V**P**R**S**V**O**R**C**T**S**V**T**L**K**A**T**A**G**R**L**L**P**E**
L.major NDPase (83) **E**R**F**K**R**A**E**P**D**L**S**S**F**A**T**D**L**D**G**A**K**A**S**L**E**G**L**L**R**F**A**D**T**V**V**P**Q**S**Y**Q**K**C**T**S**V**T**L**K**A**T**A**G**R**L**L**P**E**
L.infantum NDPase (83) **E**R**F**K**R**V**E**P**G**L**S**S**F**A**T**D**D**G**A**K**E**S**L**A**G**L**L**R**F**A**D**K**V**V**P**Q**S**Y**Q**K**C**T**F**V**T**L**K**A**T**A**G**R**L**L**P**E
S.mansoni SmATPDase2 (156) **D**K**F****H**V**O**P**G**L**S**S**Y**A**E**K**P**E**E**A**A****S**L**T**K**L**I**N**I**A**E**T**S**L**P**V**D**V**C**R**N**T**P**V**L**R**A**T**A**G****R**L**I**S**A**
S.japonicum NTPDase (157) **D**N**Y**H**H**I**K**P**G**L**S**S**Y**A**E**K**P**E**E**A**A****S**L**T**K**L**I**N**I**A**E**T**S**L**P**R**G**V**C**R**D**T**P**V**M**L**R**A**T**A**G**R**L**L**I**S**S
L.braziliensis GDPase(251) **E**L**F**E**L**N**H**K**A**L**S**E**L**N**P**V**Q**D**A**P**E**A**L**W**E**L**F**A**K**A**K**N**F**V**P**A**E**L**H**A**C**T**P**I**E**F**K**A**T**A**G**R**L**M**L**G**L**
L.major GDPase (236) **E**L**F**E**L**N**H**K**A**L**S**E**L**N**S**V**Q**D**A**P**E**A**L**W**E**L**F**V**K**A**K**D**F**V**P**A**E**L**H**A**C**T**A**E**F**K**A**T**A**G**R**L**M**L**G**M
L.infantum GDPase (236) **E**L**F**E**L**N**H**K**A**L**S**E**L**D**N**P**V**Q**D**A**P**E**A**L**W**E**L**F**M**K**A**K**Y**F**V**P**A**E**L**H**A**C**T**A**V**E**F**K**A**T**A**G**R**L**M**L**G**M
T.cruzi NTPDase1 (248) **E**L**F**V**E**N**Y**E**P**L**S**G**L**A**N**---P**N**D**A**V**A**S**L**S**P**L**I**E**A**A**K**A**Y**I**P**E**S**L**H**A**C**V**E****E**M**K**A**T**A**G****R**I**R**I**G**R
Human NTPDase 5 (81) **E**V**F**D**S**V**K**P**G**L**S**A**F**V**D**Q**P**K**O**G**A**E**T**V**Q**G**L**L**E**V**A**K**D**S**I**P**R**S**H**W**K**T**P**V**V**L**K**A**T**A**G**L**R**L**L**P**E**
Human NTPDase 6 (133) **E**T**F**K**A**L**K**P**G**L**S**A**Y**A**D**D**V**E**K**S**A**Q**I**R**E**L**L**D**V**A**K**Q**D**I**P**F**D**F**W**K**A**T**P**V**L**K**A**T**A**G**L**R**L**L**P**E
Human NTPDase 1 (83) **E**E**C**R**V**K**G**P**G**I**S**K**F**V**Q**K**V**N**E**I**G**I**Y**L**T**D**C**M**E**R**A**R**E**V**I**P**R**S**Q**H**O**E**T**P**V**Y**L**G**A**T**A**G**M**L**L**R**M**

Region-B

Region-C

S.tuberosum apirase (136) **D**A**E**A**K**I**L**Q**A**V**R**N**L**V**K**N**Q**S**T**F**H**S**K**D**Q****N**---V**T**I**L**D**G**T**O**E**G**S**Y**M**M**A**A**I**N**Y**L**L**G**N**T**---G---
L.braziliensis NDPase(140) **A**D**Q**V**L**L**D**A**A**Q**O**T**L**K---A**P**F**F**O**S**R**G**A**S**---I**V**S**G**A**O**E**G**V**Y**G**W**L**T**V**N**Y**L**L**N**R**L**-----
L.major NDPase (140) **S**A**Q**Q**A**L**L**D**V**A**O**H**T**L**N**---A**P**F**F**O**S**R**G**A**S**---I**I**S**G**A**O**E**G**V**Y**G**W**L**T**V**N**Y**L**L**D**R**L**-----
L.infantum NDPase (140) **S**V**Q**V**L**L**D**A**A**O**H**T**L**N---A**P**F**F**O**S**R**G**A**S**---I**I**S**G**A**O**E**G**V**Y**G**W**L**T**V**N**Y**L**L**N**R**L**-----
S.mansoni SmATPDase2 (213) **H**K**A**E**N**M**L**K**A**V**R**H**R**L**S**---Q**T**C**F**K**Q**L**P**N**A**---V**T**I**M**D**G**F**Y**E**G**L**Y**L**W**I**T**L**N**F**L**N**R**L**S**M**G**K**A**R
S.japonicum NTPDase (214) **H**K**A**E**N**I**L**K**A**V**R**H**R**L**S**---Q**T**C**F**K**Q**L**P**N**T**---V**T**I**M**D**G**F**Y**E**G**L**Y**L**W**I**T**L**N**F**L**N**D**R**L**S**H**R---K**V**
L.braziliensis GDPase(308) **E**K**A**T**E**I**L**A**E**I**R**A**R**Y**R**---K**E**T**F**W**L**R**G**S**A**---P**V**R**I**L**D**S**H**E**E**G**L**M**A**W**L**T**V**N**F**L**L**G**T**F**A**R**N**---T
L.major GDPase (293) **E**K**A**N**E**I**L**A**G**I**R**A**R**Y**R**---N**E**T**F**W**L**R**G**N**A**---S**V**R**I**L**D**A**C**E**G**P**M**A**W**L**T**V**N**Y**L**L**G**A**F**S**R**G---A**T**
L.infantum GDPase (293) **E**K**A**T**E**I**L**D**G**I**R**A**R**Y**R**---N**E**T**F**W**L**R**G**N**A**---P**V**R**I**L**D**A**C**E**G**P**M**A**W**L**T**V**N**Y**L**L**G**V**F**S**R**G---T
T.cruzi NTPDase1 (304) **E**H**A**E**A**V**L**D**V**V**R**L**F**A---R**G**P**F**W**M**Q**S**E**L**D**S**V**R**I**L**E**G**W**E**E**G**P**L**A**W**L**T**V**N**Y**L**L**G**A**L**---N**G**
Human NTPDase 5 (138) **H**K**A**K**A**L**L**F**E**V**K**E**I**F**R**---K**S**P**F**L**V**P**K**G**S**---V**S**I**M**D**G**S**D**E**G**I**L**A**W**V**T**V**N**F**L**T**G**Q**L**---H**G**---
Human NTPDase 6 (190) **E**K**A**Q**K**L**L**Q**K**V**K**E**V**F**K**---A**S**P**F**L**V**G**D**D**C**---V**S**I**M**N**G**T**D**E**G**V**S**A**W**I**T**I**N**F**L**T**G**S**L**---K**T**
Human NTPDase 1 (140) **E**S**E**L**A**D**R**V**L**D**V**V**E**R**S**L**S**N**Y**P**D**F**Q**G---A**R**I**T**I**T**Q**O**E**E**G**A**Y**G**W**I**T**I**N**Y**L**L**G**K**F**S**Q**K**T**R**W

Region-D

S.tuberosum apirase (194) **A**T**I**D**L**G**G**G**S**T**Q**I**V**F**P**E**G**E**D**T**F**Y**K**M**R**A**D**---V**R**G**S**A**T**L**G**G**R**S---K**V**Y**Q**H**S**Y**E**G**Y**G
L.braziliensis NDPase(195) **A**T**I**D**L**G**G**A**S**T**Q**I**V**F**E**T**K**F**T**S**G**E**W**L**P**F**N**---Y**A**H**Q**L**R**T**P**K**R**T**I**---A**M**Y**Q**H**S**M**L**G**L**G
L.major NDPase (195) **A**T**I**D**M**G**G**A**S**T**Q**I**V**F**E**T**T**P**T**S**G**E**W**L**P**F**N**---Y**A**Y**Q**L**R**T**P**K**R**T**I**---A**M**Y**Q**H**S**Y**L**G**L**G
L.infantum NDPase (195) **A**T**I**D**M**G**G**A**S**T**Q**I**V**F**E**T**T**P**T**S**G**E**W**L**P**F**N**---Y**A**H**Q**L**R**T**P**K**R**T**I**---T**M**Y**Q**H**S**Y**L**G**L**G
S.mansoni SmATPDase2 (283) **G**T**L**D**L**G**G**G**S**T**Q**I**T**F**I**P**T**E**L**N**T**F**N**N**A**P**N**G**F**I**T**Y**P**D**V**Q**N**S**N**D**K**P**K**Q---K**V**Y**S**R**S**M**L**G**L**G
S.japonicum NTPDase (282) **G**T**L**D**L**G**G**G**S**T**Q**I**T**F**I**P**T**E**L**D**T**F**N**N**A**P**S**G**F**I**T**Y**F**D**G**Q**K**H**N**I**K**D**N**L**S**g**k**I**Y**S**H**S**Y**L**G**L**G**
L.braziliensis GDPase(370) **A**I**I**D**L**G**G**G**S**T**Q**I**V**F**E**P**E**G**E**D**T**F**Y**K**M**R**A**D---V**R**G**S**A**T**L**G**G**R**S---K**V**Y**Q**H**S**Y**E**G**Y**G
L.major GDPase (355) **A**V**I**D**L**G**G**G**S**T**Q**I**V**F**E**P**E**G**E**S**T**F**H**G**M**R**D**---F**R**Y**A**A**T**L**G**S**R**S**V**---R**A**Y**Q**H**S**Y**E**G**Y**G
L.infantum GDPase (355) **A**V**I**D**L**G**G**G**S**T**Q**I**V**F**E**P**E**G**S**A**F**H**G**M**R**D---L**R**Y**S**A**T**L**G**S**R**S**V**---S**A**Y**Q**H**S**Y**E**G**Y**G
T.cruzi NTPDase1 (363) **T**I**L**D**L**G**G**G**S**T**Q**I**V**M**H**P**S**D**P**K**A**I**E**A**Y**A**E**---F**S**Y**A**L**K**V**N**G**R**S**F**---V**V**Y**Q**H**S**Y**E**G**N**G
Human NTPDase 5 (196) **G**T**L**D**L**G**G**A**S**T**Q**I**T**F**L**P**Q**F**E**K**T**L**E**Q**T**P**R**G---Y**L**T**S**F**E**M**F**N**S**T**Y**---K**L**Y**T**H**S**Y**L**G**F**G
Human NTPDase 6 (248) **G**M**L**D**L**G**G**G**S**T**Q**I**A**F**L**P**R**V**E**G**T**L**Q**A**S**P**P**G---Y**L**T**A**L**R**M**F**N**R**T**Y**---K**L**Y**S**Y**S**Y**L**G**L**G
Human NTPDase 1 (210) **G**A**L**D**L**G**G**A**S**T**Q**I**V**T**F**P**Q**N**Q**T**I**E**S**P**D**N**A**L**Q**---F---R**L**Y**G**K**D**Y---N**V**Y**T**H**S**F**L**C**Y**G

Region-E

Region-F

S.tuberosum apirase (391) **E**V**L**C**M**D**L**I**V**E**Y**T**L**L**V**D**G**F**L**N**P**H**K**E**I**T**V**I**H**D**V**q**Y**K**N**Y**L**V**g**a**A**W**P**L**G**C**A**I**D**L**V**S**S**T**N**---
L.braziliensis NDPase(374) **E**T**T**C**M**E**L**A**Y**M**S**F**L**T**H**G**L**S**D**D**R**T**L**E**V**P**N**R**I**---E**G**I**A**V---S**W**S**L**G**S**L---S**F**V**L**K---
L.major NDPase (374) **E**T**A**C**M**E**L**A**Y**M**S**F**L**T**Y**G**L**S**D**A**T**V**L**T**V**P**N**R**I**---E**G**M**A**V---S**W**S**L**G**S**L---S**F**L**L**K---
L.infantum NDPase (374) **E**T**A**C**M**E**L**A**Y**M**S**F**L**T**Y**G**L**S**D**A**T**A**L**T**V**P**N**R**I**---E**G**M**A**V---S**W**S**L**G**S**L---S**F**L**L**K---
S.mansoni SmATPDase2 (514) **P**F**D**C**M**D**L**S**F**I**T**A**L**L**H**S**G**Y**G**F**P**A**D**K**K**I**G**F**F**R**K**V---N**S**F**E**I---N**N**S**L**G**A**L**F**---S**E**M**Y**H---
S.japonicum NTPDase (518) **P**F**D**C**M**D**L**S**F**I**T**A**L**L**H**N**G**Y**G**F**P**L**D**K**K**I**G**F**F**R**K**V---K**S**F**E**I---N**N**S**L**G**A**L**F**---S**E**M**P**H---
L.braziliensis GDPase(643) **E**Y**E**C**M**Y**S**Y**T**V**A**L**L**R**Y**G**Y**E**V**P**E**G**R**V**L**H**V**A**K**K**I**---S**G**Y**E**T---A**W**P**L**G**A**S**L**---I**S**V**T**---
L.major GDPase (626) **E**Y**E**C**M**Y**S**Y**V**V**A**L**L**R**Y**G**Y**E**V**P**E**D**R**V**L**H**V**A**K**K**I**---R**G**Y**E**T---A**W**S**L**G**A**S**L**---L**S**L**T**---
L.infantum GDPase (629) **E**Y**E**C**M**Y**S**Y**V**V**A**L**L**R**Y**G**Y**E**V**P**E**D**R**V**L**H**V**V**K**K**I**---R**G**Y**E**T---A**W**S**L**G**A**S**L**---L**S**L**T**---
T.cruzi NTPDase1 (584) **E**M**E**C**F**E**S**Y**T**F**T**L**R**Y**G**F**G**F**P**E**Q**K**L**H**I**A**K**K**I**---N**G**F**E**T---A**W**A**L**G**A**S**L**---V**S**L**E**G---
Human NTPDase 5 (374) **P**F**L**C**M**D**L**S**Y**I**T**A**L**L**K**D**G**F**G**F**A**D**S**T**V**L**Q**L**T**K**K**V---N**N**I**E**T---G**W**A**L**G**A**T**F**H**L**L**Q**S**L**G**I**---
Human NTPDase 6 (427) **P**F**S**C**M**D**L**T**Y**V---S**L**L**L**Q**E**F**G**F**P**R**S**K**V**L**K**L**T**R**K**I---D**N**V**E**T---S**W**A**L**G**A**I**P**H**Y**I**D**S**L**N**R**---
Human NTPDase 1 (411) **E**Y---C**F**S**G**T**Y**I**L**S**L**L**L**Q**Y**H**T**A**D**S**W**E**H**I**H**F**I**G**K**I**Q**G**S**D**A**---G**W**T**L**G**Y**M**L**N**L**---T**N**M**I**P---

Region-G

ACR5

Tabela 2. Análise teórica do potencial de ligação dos domínios compartilhados entre apirase de batata e as ATP difosfohidrolases de parasitos com anticorpos e moléculas HLA-DR de humanos.

Região da apirase de batata	<i>L. braziliensis</i> NDPase		<i>S. mansoni</i> SmATPDase2		<i>T. cruzi</i> NTPDase 1	
	Anticorpos (escore)	Moléculas HLA-DR	Anticorpos (escore)	Moléculas HLA-DR	Anticorpos (escore)	Moléculas HLA-DR
A (46-64)	> 0.8	12/51 (24)	> 0.8	25/51 (50)	> 0.8	10/51 (20)
B (78-117)	> 0.8	42/51 (83)	> 0.8	22/51 (43)	NS	NS
C (120-133)	> 0.8	33/51 (65)	< 0.8	47/51 (92)	> 0.8	10/51 (20)
D (164-185)	> 0.8	19/51 (37)	> 0.8	39/51 (76)	> 0.8	32/51 (63)
E (194-204)	> 0.8	02/51 (04)	> 0.8	01/51 (02)	< 0.8	01/51 (02)
F (240-252)	> 0.8	15/51 (29)	< 0.8	40/51 (78)	> 0.8	27/51 (53)
G (392-410)	< 0.8	27/51 (53)	< 0.8	12/51 (24)	< 0.8	27/51 (53)

NS: Não significativo.

Os domínios que apresentaram escore > 0,8 foram considerados como potencialmente ligadores de anticorpos. A porcentagem foi calculada a partir da análise de 51 moléculas de HLA-DR de humanos disponíveis no banco de dados. O valor da porcentagem está mostrado entre parênteses.

Figura 9. Alinhamento das estruturas primárias da apirase de batata, SmATPDase 1 de *S. mansoni*, SmATPDase 2 e NTPDase 1 de humano- Os boxes verticais correspondem às regiões conservadas (ACRs) da família de ATP difosfohidrolases. Todos os aminoácidos idênticos aos da apirase de batata, localizados nas outras seqüências foram destacados em cinza. O resíduo de aminoácido hidrofóbico inicial de cada peptídeo nanométrico capaz de se ligar ao HLA-DR de humanos, está marcado de preto e os outros resíduos de aminoácidos componentes destas seqüências estão em negrito. Os boxes horizontais representam as seqüências peptídicas com maiores potenciais de ligação a anticorpos. Os cilindros em cor cinza correspondem às regiões que tem conformação estrutural em α -hélice e as setas as regiões em folhas β -pregueadas. As linhas pretas horizontais indicam seqüências que foram omitidas no alinhamento. Os números de acesso ao GeneBank estão indicados na Figura 7.

ACR1

Potato apyrase (45)	HMAVILDAGSTGSRVHMFRRFDEKIGLLLEIG--NNIEYFMATEPGLSSYAEDPKAAANSL
SmATPase2 (121)	VYGVVLDAGSTGSEVHIFKLIHNP-LDEFKPFLLDDKPHHVQVPLGSSYAEKPEEAAVLSL
SmATPase1 (72)	VMSVLDAGSTSSKLLHYKWIDEP-FRNSG--KVDEVTKNEKLSPGISDVIINDTKAYDTL
NTPDase1 human (48)	KMGIVLDAGSSHTSLYIYKWPAAEK-ENDTG-VVHQVRECRVKGPGIEKRVQKVNEIGIY

Region-A
Region-B

ACR2

Potato apyrase (102)	EPLLDGAEQVVEQELQSETPLEHATAGFRMKGDA---AEKILQAVRNLYKNQSTFHSK
SmATPase2 (180)	TKLLINIAETSLVDVCRNFPVILRATAGRLISAHK---AENMLKAVRHLSQTCFKQLP
SmATPase1 (129)	KKLLKLTNSLTFEQKQHTPIVLRATAGMRLLKLIEDPLGSLDLFSVTRQVLRKQSGFQIET
NTPDase1 human (106)	TDCMERAREVIFERSHQETPVYLQATAGMRLRMSEELADRVLDVVERSLSNVPPDFQG

Region-C

	ACR3	ACR4
Potato apyrase (159)	DQ-WVTLLIGTQEGSMVAATNYLLGNLQKDYK-----SITTATIDLGGGSVQM	
SmATPase2 (237)	NA-VVIMIGFYEGLYLWFTLNFLNRLSYGKARKNNAMAENSLAQTIETLDLGGSTCI	
SmATPase1 (189)	PNERIRLLYGSEEGLYGVVSVNYILGLIIEGKQ-----TNPSDIVGSLDLGGASTCI	
NTPDase1 human (166)	---ARITIGQEEGAMGIIITNYLLGKFSQKTRWFSIVPYETNNQETFGALDLGGASTOV	

Region-D
Region-E

Potato apyrase (206)	AYASISNEQFAKAPQNEEDGEPVYQQKHLMSKLDNLYVHSYLNLYGQ-LAGRAEIKKASRNES
SmATPase2 (295)	TFIPTELNIFNNAPNGFITYFDVQNSNDKPKQKIVSRSYLGLLMSARVSMLEHNATEHF
SmATPase1 (241)	AETPKVYSNIPKEKLDLYP-LRLYGN---DFSVMSHSELQYKSEFERVITSIAAASL
NTPDase1 human (222)	TFVPCNQ---TIESPDNALQFRLYGK---DYNVYTHSFLCYGK-DQALWQKLAQDIQVA

Region-F

Potato apyrase (392)	YLQMDLLVEYLLVDGFCGLNPHKEIVLHVVQYKLYLGAAPLQCAILLVSSTTNKIRVAS--
SmATPase2 (515)	FDQMDLSPITALLHSYGRPAD--KKTGFFRQVNS--SEIHWLGLALFSEMYHK-----
SmATPase1 (444)	KYCFDGLYIILLLKMYGFTTDESWKIITFDKVNQ--KSVSWALQYMLDQSGHLFSESPKVSVS--
NTPDase1 human (411)	EYCFSGTILSLLLQGYHFTADSWEHTHFIGKIQG--SDAQWTLGYMLNITNMI PAEQPLS TPLS-

Region-G
ACR5

Tabela 3. Análise teórica do potencial de ligação dos domínios compartilhados entre apirase de batata e a SmATPDase 1 de *S. mansoni* com anticorpos e moléculas HLA-DR de humanos.

Região da apirase de batata	<i>S. mansoni</i> SmATPDase1	
	Anticorpos (escore)	Moléculas HLA-DR
A (46-64)	> 0.8	17/51 (34)
B (78-117)	> 0.8	23/51 (45)
C (120-133)	< 0.8	46/51 (90)
D (164-185)	> 0.8	17/51 (34)
E (194-204)	> 0.8	6/51 (12)
F (240-252)	> 0.8	18/51 (35)
G (392-410)	> 0.8	51/51 (100)

Os domínios que apresentaram escore > 0,8 foram considerados como potencialmente ligadores de anticorpos. A porcentagem foi calculada a partir da análise de 51 moléculas de HLA-DR de humanos disponíveis no banco de dados. O valor da porcentagem está mostrado entre parênteses.

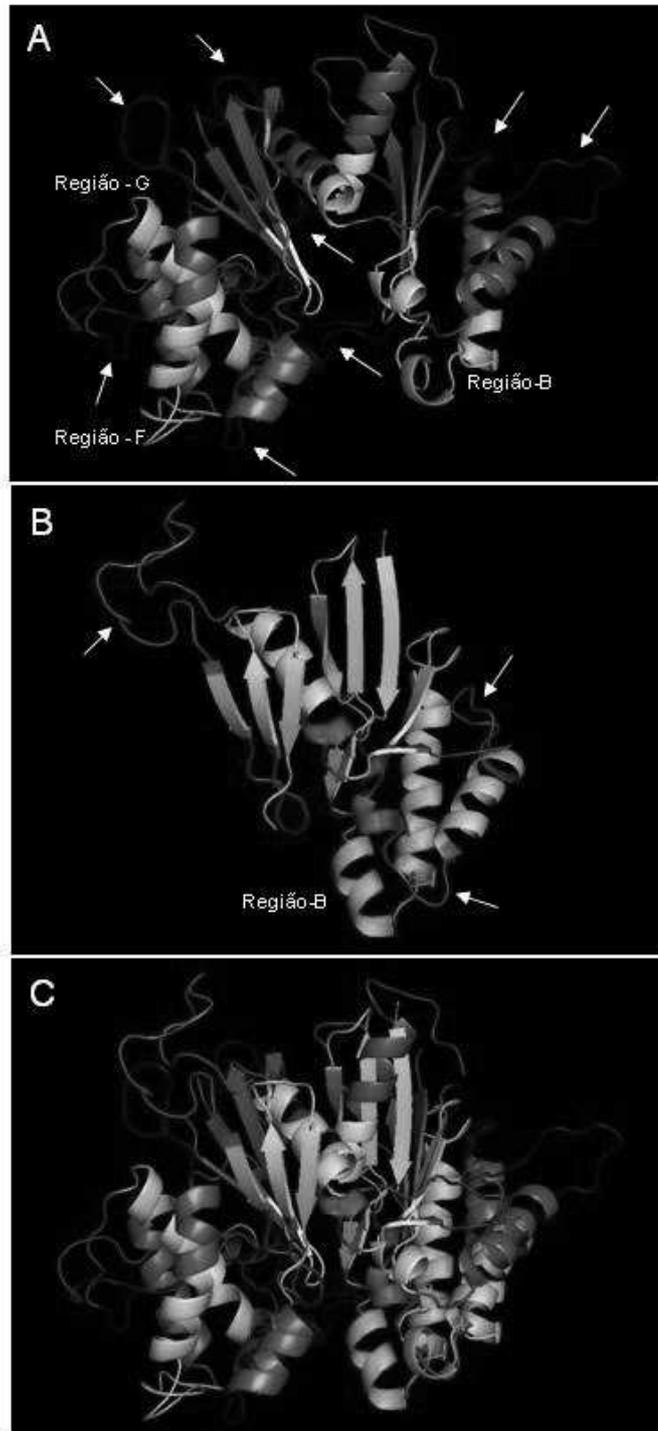
5.6 - Predição das estruturas tridimensionais da apirase de batata e da SmATPDase 2 de *S. mansoni* e análise da correlação entre elas

Os modelos tridimensionais hipotéticos das estruturas da apirase de batata e da SmATPDase 2 de *S. mansoni* foram construídos e estão mostrados na Figura 10. Estas estruturas são globulares, onde se observam fitas em folhas paralelas e antiparalelas e estruturas helicoidais. As conexões entre os filamentos 1 e 4, e entre os filamentos 4 e 5, contêm segmentos em hélice, todos do mesmo lado das pregas. As conexões são significativamente maiores no domínio C-terminal do que no domínio N-terminal. Cinco hélices estão presentes no domínio C terminal e somente duas no domínio N-terminal (Fig. 10).

É interessante observar os altos níveis de homologia que existem entre a estrutura tridimensional da SmATPDase 2 (Fig. 10B) de *S. mansoni* e da apirase de batata (Fig. 10A), e a coincidente localização das regiões mostradas nos alinhamentos de suas seqüências de aminoácidos (Figs. 8 e 9). Como visualizado no modelo, essas regiões são expostas e capazes de ligar anticorpos. Para melhor entendimento da relação estrutural entre estas proteínas, as regiões ACRs da apirase de batata (Fig. 10A) estão marcadas em branco e da SmATPDase 2 de *S. mansoni* (Fig. 10B) em vermelho, e setas brancas foram adicionadas para indicar os locais antigênicos. As três outras regiões indicadas nesta tese - B, F e G – foram destacadas por outras tonalidades de azul na apirase de batata (A) e verde na SmATPDase 2 de *S. mansoni* (Fig. 10A e 10B).

A Figura 10C mostra a superposição dos modelos tridimensionais o que gera uma visão mais clara da semelhança estrutural entre elas.

Figura 10. Estrutura tridimensional predita da apirase de batata e da SmATPDase 2 de *S. mansoni*– As estruturas tridimensionais das proteínas da batata (A) e da isoforma solúvel de *S. mansoni* – SmATPDase 2 (B) são mostradas. Em (C) a superposição dos modelos revela a homologia entre as estruturas das duas proteínas. As regiões ACRs foram destacadas nos modelos, em branco (A) e em vermelho (B), e as regiões antigênicas preditas foram indicadas por setas brancas (A, B). As regiões que apresentaram identidade entre as proteínas foram também destacadas por outras tonalidades – regiões B, F e G – em azul (A) ou verde (B).



5.7 - Avaliação dos níveis de anticorpos em soros de pacientes com doenças infecto-parasitárias reativos com a apirase de batata

Os níveis de anticorpos IgG e IgM foram quantificados em amostras de soros (dil. 1:200) de pacientes portadores de leishmaniose cutânea americana (LCA), esquistossomose e doença de Chagas, usando como antígeno a apirase de batata em técnicas de ELISA. Os valores obtidos foram expressos em unidades de ELISA (U.E). Níveis significativos de anticorpos IgG reativos com a apirase de batata (Fig. 11) foram detectados nos soros de pacientes com LCA (mediana 1,485) quando comparados com os níveis encontrados em pacientes com esquistossomose (mediana 0,879; $p < 0,05$) ou doença de Chagas (mediana 0,637; $p < 0,001$; Fig.11).

Para efeito de comparação, preparações antigênicas destes parasitos foram avaliadas usando os mesmos procedimentos. A Figura 12 (A e B) mostra as reatividades dos anticorpos IgG e IgM, expressas em U.E, dos soros dos pacientes portadores de LCA contra os diferentes antígenos: apirase de batata (API) e preparação de antígenos de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (LB). Foi observado que a reatividade de anticorpos IgG contra a apirase de batata (mediana= 1,485) foi significativamente ($p < 0,001$) superior a reatividade contra a preparação de antígenos de *Leishmania* (mediana= 0,424). A soropositividade encontrada para os pacientes com LCA (n= 21) foi de 90% (n= 19) para a apirase de batata e de 43% (n= 9) para o antígeno LB, sugerindo que a reatividade à NDPase de *L. braziliensis* contribui com a reatividade encontrada contra a preparação de antígenos deste parasito (LB; Fig. 12A). A reatividade dos anticorpos IgM foi em proporções menores para os antígenos API (mediana 0,678) e LB (mediana 0,020), apresentando uma soropositividade de 19% (n= 4) para a proteína vegetal e de 5% (n= 1) para o antígeno LB (Fig. 12B).

Para a avaliação dos níveis de anticorpos IgG e IgM dos pacientes portadores de esquistossomose (n= 31), foram usados três antígenos: apirase de batata (API), antígenos solúveis de ovos (SEA) e de vermes adultos (SWAP; Fig. 12, C e D). Os níveis de IgG reativos contra a apirase de batata apresentaram perfil similar para as preparações de SEA (mediana= 2,197) e SWAP (mediana= 1,942), ambas com 100% de soropositividade, e foram significativamente superiores à reatividade contra a apirase de batata

(mediana= 0,879; 39% de soropositividade). A reatividade dos anticorpos IgM para SEA (mediana= 0,979; 42% de soropositividade) e para SWAP (mediana= 1,126; 68% de soropositividade) foram similares e significativamente ($p < 0,001$) superiores aos valores encontrados com a proteína da batata (mediana= 0,610; 10% de soropositividade; Fig. 12D). Para as análises dos pacientes com doença de Chagas ($n= 30$), foi usada uma preparação de formas epimastigotas de *T. Cruzi* (EPI) e a apirase de batata, ambos para detecção dos níveis de IgG e IgM (Fig. 12, E e F). A soropositividade de IgG para a preparação de epimastigotas (EPI) foi de 97% ($n= 29$; mediana= 3,224), e para proteína da batata, apenas 17% ($n= 5$; mediana 0,637). A reatividade dos anticorpos IgM para EPI (mediana= 0,465) e apirase de batata (mediana= 0,323) foi baixa, ambos com 3% de soropositividade.

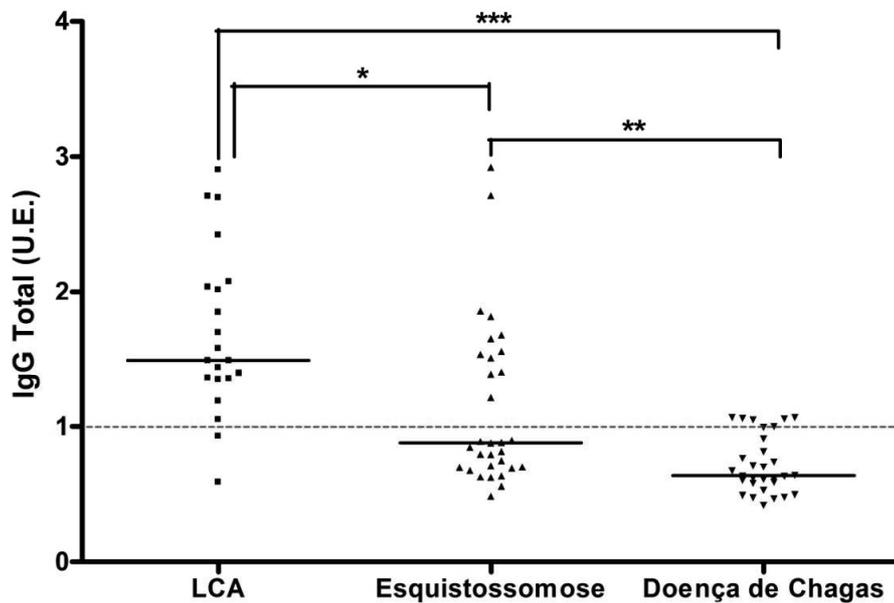
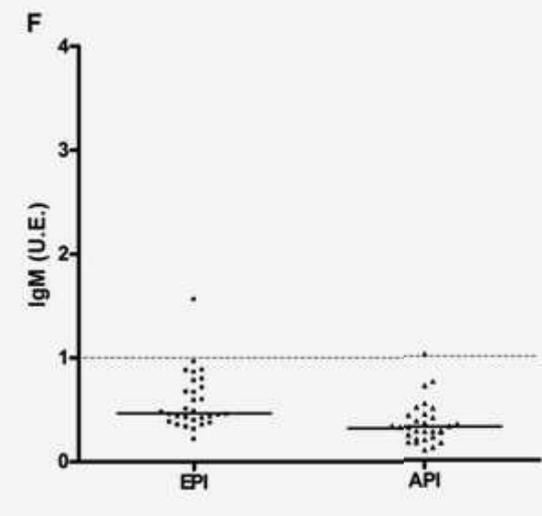
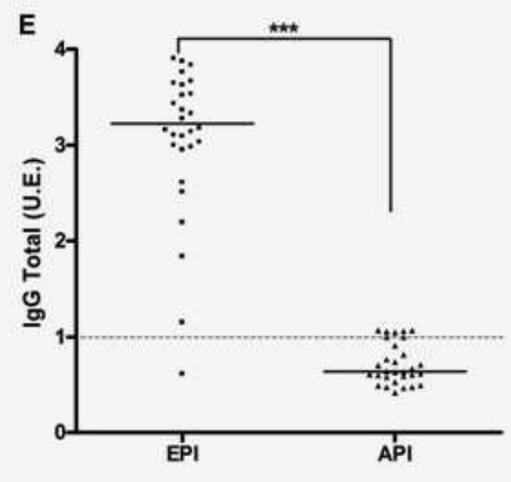
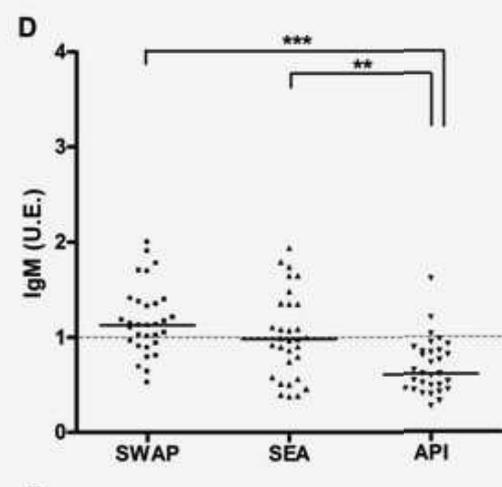
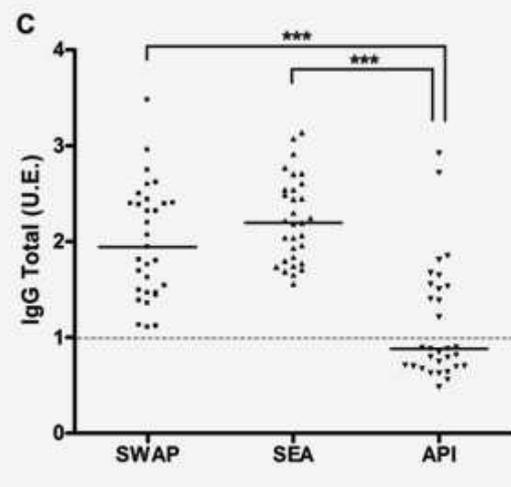
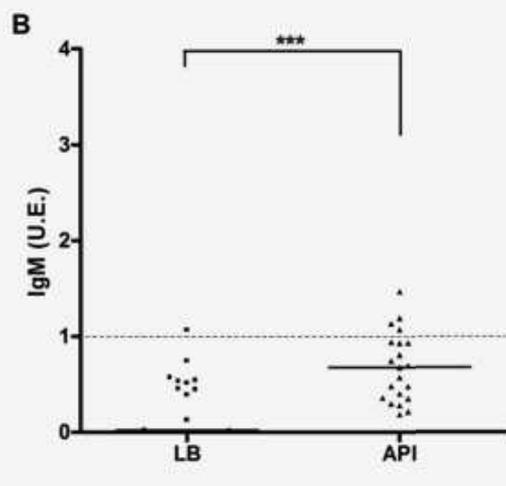
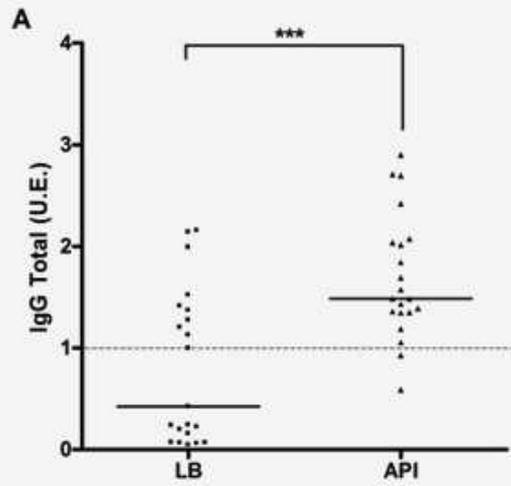


Figura 11. Reatividade de anticorpos IgG total de pacientes com LCA, esquistossomose e doença de Chagas, contra a apirase de batata- Os níveis de IgG foram medidos pela técnica de ELISA usando a apirase de batata como antígeno, e soros diluídos 1:200. Os níveis de anticorpos foram apresentados em unidades de ELISA (U.E). A linha pontilhada representa a linha de corte calculada a partir dos valores médios de densidade óptica obtidos de indivíduos saudáveis (n= 10), somados a 2 valores de desvio padrão. A significância dos resultados obtidos foi avaliada através do Kruskal-Wallis e os valores de $p < 0,05^*$; $< 0,01^{**}$ e $< 0,001^{***}$ foram considerados significativos.

Figura 12. Análise comparativa da reatividade de IgG e IgM contra diferentes antígenos- A reatividade de IgG (A, C, E) ou IgM (B, D, F) contra apirase de batata foi avaliada em amostras de soros (dil. 1:200) de pacientes com leishmaniose cutânea americana (A, B), esquistossomose (C, D) ou doença de Chagas (E, F). Preparações antigênicas de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (LB, A e B), antígenos solúveis de vermes adultos (SWAP, C e D) e ovos (SEA, C e D) de *S. mansoni*, ou de formas epimastigotas de *T. cruzi* (EPI, E e F) foram também usadas. Os níveis de anticorpos foram apresentados em U.E (unidades de ELISA). A linha pontilhada representa a linha de corte calculada a partir dos valores médios de densidade óptica obtidos de indivíduos saudáveis (n= 10), somados a 2 valores de desvio padrão. O grau de significância entre os grupos foi determinado usando os testes Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis e os valores de $p < 0,01^{**}$ e $< 0,001^{***}$ foram considerados significativos.



5.8 - Análise dos perfis de IgG e IgM para os antígenos apirase, SWAP e SEA na população do distrito de Chonim de Cima, antes e após tratamento quimioterápico

Amostras de soros de pacientes do distrito de Chonim foram selecionadas para avaliação dos níveis de anticorpos IgG e IgM reativos com a apirase de batata, comparados àqueles encontrados contra os antígenos classicamente testados em estudos imunológicos, SWAP (antígenos solúveis de vermes adultos) e SEA (antígenos solúveis de ovos). Esta população em estudo foi composta de 31 indivíduos que tiveram diagnóstico parasitológico positivo para esquistossomose, sendo 10 crianças de 0-17 anos e 21 adultos, com idade acima de 18 anos. As amostras foram analisadas antes e 180 dias após a administração de praziquantel. A Tabela 4 mostra os dados obtidos para estes pacientes, incluindo a carga parasitária média. O número de ovos por grama de fezes (OPG) variou de 0 a 1296, com a maior porcentagem (73%) de indivíduos apresentando baixa carga parasitária (até 50 OPG), característico de uma área de baixa endemicidade.

A Figura 13 apresenta a reatividade de anticorpos IgM contra os diferentes antígenos: apirase (A), SWAP (B) e SEA (C). Os níveis de IgM reativos contra a apirase de batata dos pacientes antes (D.O.= $0,229 \pm 0,096$) ou 180 dias após o tratamento (D.O.= $0,262 \pm 0,107$) foram similares entre eles e quando comparados aos níveis encontrados no grupo controle (Fig. 13A; D.O.= $0,216 \pm 0,058$). A análise de soropositividade de IgM contra a apirase foi de 10% (n= 3) antes do tratamento e de 32% (n= 10) após o tratamento.

Para SWAP (Fig. 13B), os níveis de IgM antes (D.O.= $0,590 \pm 0,182$; $p < 0,001$) e após o tratamento (D.O.= $0,514 \pm 0,161$; $p < 0,01$) foram similares entre eles e significativamente maiores do que aqueles encontrados em indivíduos do grupo controle (D.O.= $0,311 \pm 0,096$). A análise de soropositividade de IgM contra SWAP foi de 68% (n= 21) antes do tratamento e de 48% (n= 15) após o tratamento.

Tabela 4. Descrição da população da área do Chonim de Cima

Pacientes	Gênero	Faixa Etária	Nº médio de OPG (DP)
Total (n= 31)	20 M/ 11 F	37 (9 - 80)	118 (262)
Adultos (n= 21)	13 M/ 8 F	48 (9 -16)	137 (311)
Crianças (n= 10)	7 M/ 3 F	13 (21 - 80)	56 (90,5)

Masculino, M; feminino, F. DP – desvio padrão

A tabela descreve aspectos etários, de gênero e carga parasitária da população usada como amostra. Os valores representam a média de cada grupo.

Os níveis de IgM contra SEA mostraram valores similares entre eles e significativamente maiores nos pacientes antes (D.O.= $0,730 \pm 0,320$; $p < 0,001$) e após o tratamento (D.O.= $0,619 \pm 0,260$; $p < 0,05$) quando comparados àqueles encontrados no grupo controle (Fig. 13C; D.O.= $0,372 \pm 0,155$). Análise de soropositividade de IgM contra SEA foi de 58% (18/31) antes do tratamento, e de 42% (13/31) após o tratamento.

Portanto, os níveis de IgM contra apirase de batata, SEA ou SWAP se mantiveram similares antes e 180 dias após o tratamento quimioterápico (Fig. 13; A, B e C).

Para a análise da reatividade de IgG total, os soros dos pacientes foram testados contra os mesmos antígenos, antes e 180 dias após o tratamento. A Figura 14 mostra os resultados obtidos. Em (A), os níveis de IgG antes (D.O.= $0,355 \pm 0,190$; $p < 0,01$) e 180 dias após tratamento (D.O.= $0,267 \pm 0,080$; $p < 0,05$) foram significativamente superiores quando comparados aos níveis encontrados no grupo controle (D.O.= $0,227 \pm 0,058$). A soropositividade de IgG para a apirase de batata foi de 39% (12/31) antes do tratamento, e de 10% (3/31) após o tratamento.

Quando SWAP (Fig. 14B) foi o antígeno usado, os níveis de IgG foram significativamente superiores para os pacientes antes (D.O.= $0,514 \pm 0,152$; $p < 0,001$) e após o tratamento (D.O.= $0,519 \pm 0,170$; $p < 0,001$) em relação ao

grupo controle (D.O.= $0,171 \pm 0,038$). A soropositividade de IgG (100%) para o SWAP manteve-se a mesma antes e pós-tratamento.

Para SEA (Fig. 14C), os níveis de IgG total dos pacientes antes (D.O.= $0,742 \pm 0,148$; $p < 0,001$) e após o tratamento (D.O.= $0,403 \pm 0,107$; $p < 0,001$) foram significativamente superiores ao controle (D.O.= $0,226 \pm 0,051$). Como observado, há uma redução significativa ($p < 0,05$) dos níveis de IgG total após o tratamento, o que pode ser também verificado pela redução da soropositividade de 100% antes do tratamento para 68% (21/31) após o tratamento.

Analisados em conjunto, após o tratamento não ocorreu uma redução significativa da reatividade de IgG contra a apirase. No entanto, quando os 12 pacientes que estavam soropositivos antes do tratamento foram analisados isoladamente, foi possível observar que 2 das 3 crianças e 7 dos 9 adultos que apresentavam IgG reativa com a apirase de batata, reduziram esta reatividade para níveis abaixo do “cut off” estabelecido (D.O.= $0,343$). A criança e os 2 adultos que se mantiveram soropositivos após o tratamento, tiveram uma redução drástica de seus níveis de reatividade contra a apirase de batata.

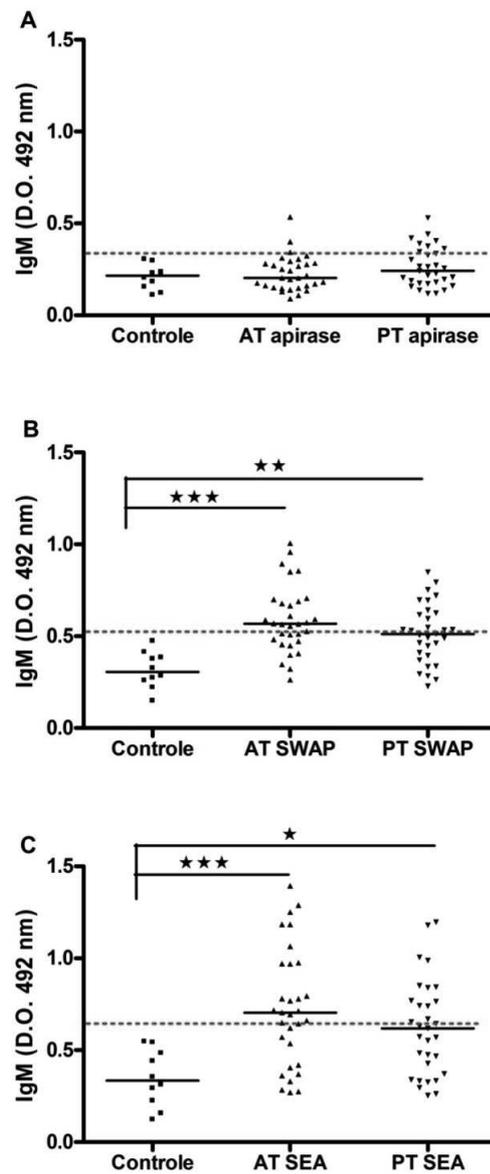


Figura 13. Análise da reatividade de anticorpos IgM de soros de pacientes de Chonim de Cima contra vários antígenos– Os níveis de IgM de soros de pacientes antes (AT) e 180 dias após o tratamento (PT) reativos contra apirase de batata (API; A), SWAP (B) e SEA (C) foram avaliados pela técnica de ELISA. Soros de dez indivíduos saudáveis foram utilizados como controle. A diluição dos soros foi de 1:200 nesta análise. A linha vermelha pontilhada corresponde ao ponto de corte, calculada para cada experimento. ***P < 0,001; **P < 0,01; *P < 0,05.

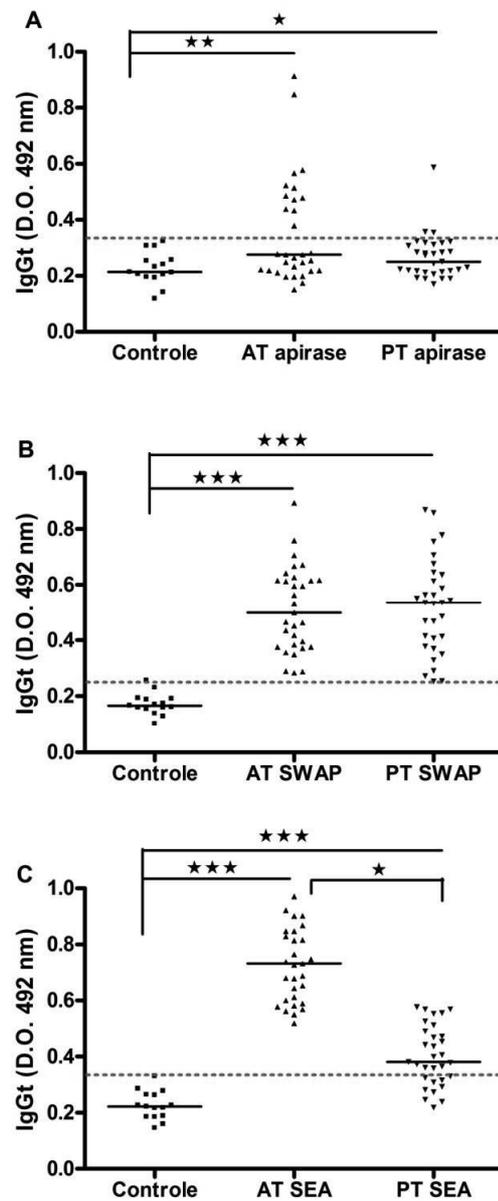


Figura 14. Análise da reatividade de anticorpos IgG de soros de pacientes de Chonim de Cima contra vários antígenos– Os níveis de IgG de soros de pacientes antes (AT) e 180 dias após o tratamento (PT) reativos contra apirase de batata (API; A), SWAP (B) e SEA (C) foram avaliados pela técnica de ELISA. Soros de dez indivíduos saudáveis foram utilizados como controle. A diluição dos soros foi de 1:200 nesta análise. A linha vermelha pontilhada corresponde ao ponto de corte, calculada para cada experimento. ***P < 0,001; **P < 0,01; *P < 0,05.

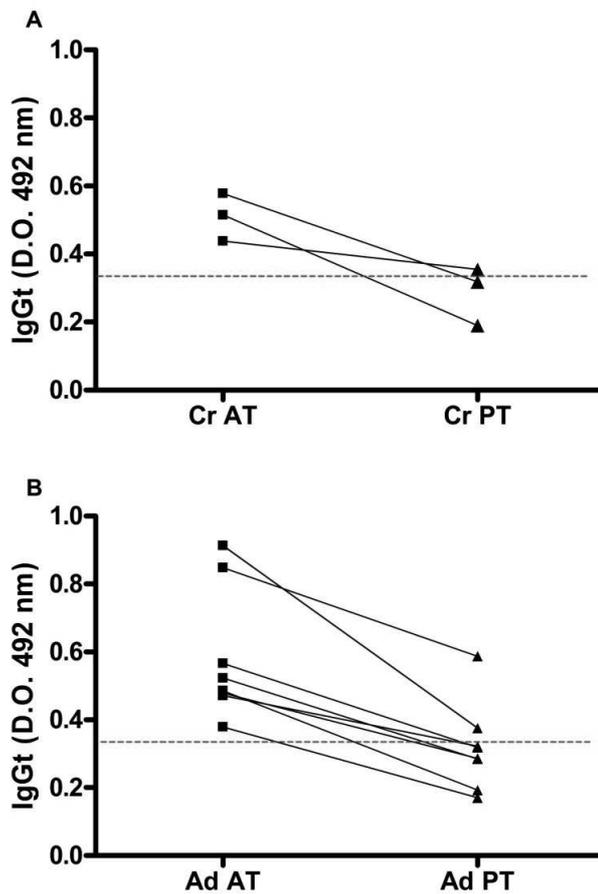


Figura 15. Análise individual dos níveis de IgG reativa com a apirase de batata em soros de crianças (A) e adultos (B) antes e pós-tratamento– Os pacientes foram divididos em 2 grupos pela faixa etária e analisados individualmente. Os níveis de IgG total em soros de crianças até 17 anos (Cr; A; n=3) e em adultos maiores de 18 anos (Ad; B; n=9), reativos com a apirase de batata, foram avaliados antes (AT) e 180 dias após o tratamento (PT).

5.9 - Análise dos níveis de Ig1, IgG4, IgA e IgE reativos com a apirase de batata encontrados em soros de pacientes portadores de esquistossomose mansoni, moradores do distrito de Penha do Cassiano.

Para a quantificação dos níveis de IgG total reativos contra a apirase de batata, foram selecionadas 49 amostras de soros de pacientes de Penha do Cassiano que possuíam diagnóstico clínico para esquistossomose. Todos os pacientes possuíam apenas ovos de *S. mansoni* nas amostras de fezes e nenhum outro parasito. Estes pacientes foram submetidos ao tratamento com praziquantel nas doses de 40 mg/Kg de peso corporal.

Como observado na Figura 16, os níveis de anticorpos IgG reativos com a apirase de batata mostraram-se significativamente maiores nos pacientes com esquistossomose ($n = 49$; D.O.= $0,246 \pm 0,187$; $p < 0,01$), quando comparados aos níveis encontrados no grupo controle (D.O.= $0,080 \pm 0,030$). Foi possível observar 61% (30/49) de soropositividade entre os pacientes com esquistossomose.

A reatividade com a apirase de batata, comparada ao controle, manteve-se significativa tanto no grupo de crianças (D.O.= $0,313 \pm 0,2396$; $p < 0,05$), quanto no grupo de adultos (D.O.= $0,217 \pm 0,153$; $p < 0,01$), quando avaliados isoladamente (Fig. 16). Foi observado 67% (10/15) de soropositividade no grupo de crianças e 59% (20/34) no grupo de adultos (Fig. 16).

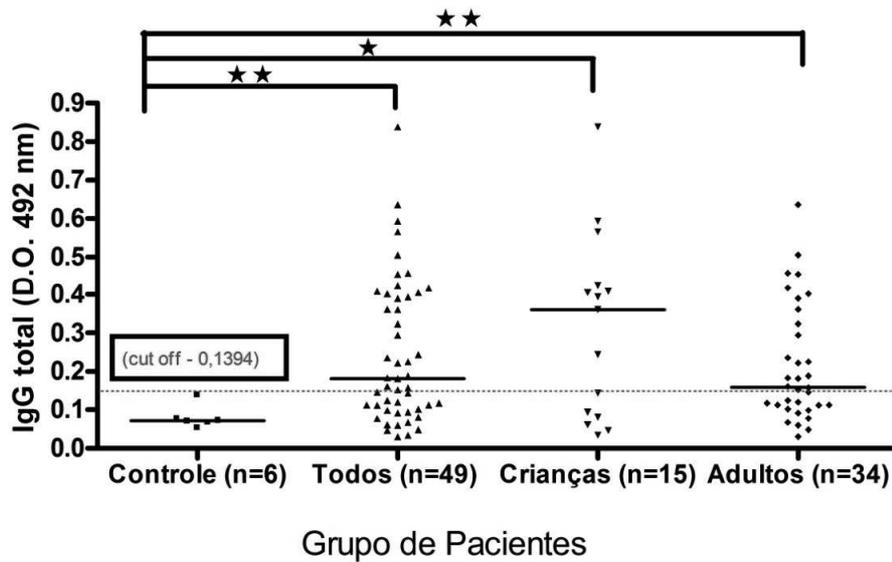


Figura 16. Níveis de anticorpos IgG reativos com a apirase de batata em soros de pacientes de Penha do Cassiano– Quantificação dos níveis de IgG total em soros (diluição 1:200) de pacientes com esquistossomose, usando a apirase de batata como antígeno em técnica de ELISA. *p < 0,05; **p < 0,01.

Das 49 amostras iniciais, cujos níveis de IgG total reativos com apirase de batata foram quantificados (Fig. 16), apenas 34 foram selecionados para a avaliação dos níveis de IgG1, IgG4, IgA e IgE nas amostras de soros diluídas 1:50. Os dados destes 34 pacientes, mostrados na Tabela 5, caracterizam esta população como de uma área de baixa endemicidade.

Tabela 5. População de estudo ds isotipos de anticorpos da Região de Penha do Cassiano, segundo a faixa etária e a carga parasitária.

População	Nº Indivíduos	Média de Idades	Média de Nº
		(faixa)	OPG
Total	34	32 (10-83)	176 ± 402,5
Crianças	8	13,5 (10-16)	89 ± 90,5
Adultos	26	37,5 (18-83)	199 ± 450

Os níveis de IgG4 encontrados em todas as amostras de soro diluídas 1:50 (n=34; D.O.= 0,323 ± 0,295) são significativamente ($p < 0,001$) maiores quando comparados àqueles encontrados no grupo controle (D.O.= 0,032 ± 0,0302), o mesmo sendo observado quando o grupo de crianças (D.O.= 0,599 ± 0,453) e o grupo de adultos (D.O.= 0,238 ± 0,160) foram analisados isoladamente, refletindo em uma grande soropositividade para o antígeno apirase de batata nesta população (Tabela 5). Os resultados foram calculados em unidades ELISA (U.E.), como descrito em Material e Métodos, e o valor máximo e a mediana estão mostrados na Figura 17A.

Os níveis de IgG1 encontrados quando todas as amostras (dil.1:50) foram analisadas em conjunto (D.O.= 0,445 ± 0,520) e mostraram valores significativamente ($p < 0,01$) superiores aos níveis encontrados no grupo controle (D.O.= 0,012 ± 0,016). Foi possível observar níveis significativamente elevados de IgG1 no grupo de crianças (D.O.= 0,940 ± 0,634; $p < 0,001$) e adultos (D.O.= 0,293 ± 0,377; $p < 0,05$) quando comparados ao controle, refletindo na alta soropositividade encontrada para crianças (88%) e adultos (Tabela 6; 65%). Os resultados foram calculados em unidades ELISA (U.E.), como descrito em Material e Métodos, e o valor máximo e a mediana estão

mostrados na Figura 17B. Como observado, o grupo de crianças mostrou reatividade de IgG1 significativamente ($p < 0.05$) superior àquela encontrada no grupo de adultos (Figura 17 B).

Níveis de IgA (dil. 1:25) significativamente superiores ao controle (D.O.= $0,160 \pm 0,020$) foram encontrados no grupo de pacientes adultos (D.O.= $0,223 \pm 0,056$; $p < 0,01$), o que refletirá nos valores obtidos para a população total ($n= 34$; D.O.= $0,236 \pm 0,103$; $p < 0,05$). Para o grupo de crianças, os níveis de IgA anti-apirase (D.O.= $0,279 \pm 0,190$) são similares ao controle. A soropositividade para crianças foi de 38% e para adultos foi de 65% (Tabela 6). Os resultados foram plotados em unidades ELISA (U.E.)(Fig. 17C).

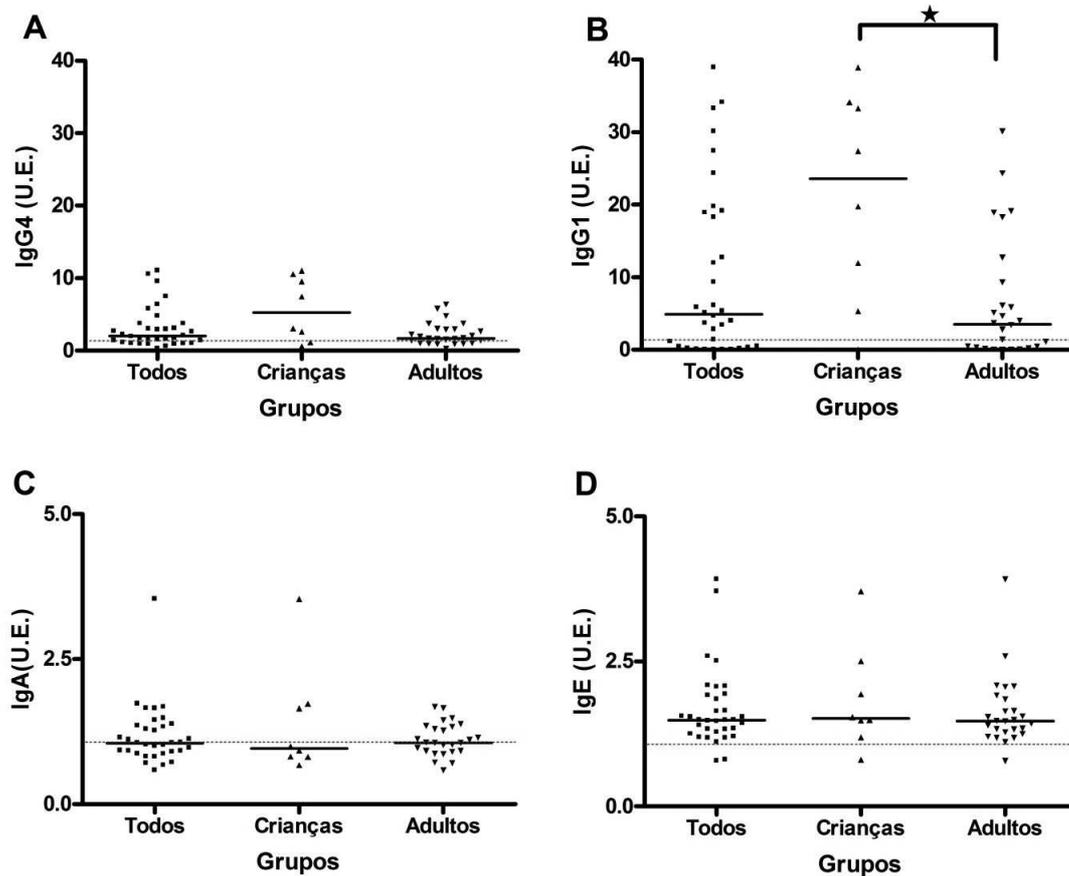


Figura 17. Análise comparativa da reatividade dos anticorpos anti-apirase de batata em distintas faixas etárias dos pacientes com esquistossomose da população de Penha do Cassiano – A linha pontilhada corresponde ao valor 1 (um), considerada a linha de base, através da qual foram geradas as unidades de ELISA (U.E). Os grupos foram divididos por faixa etária, sendo que o grupo de crianças é composto de indivíduos de 0-17 anos e o grupo de adultos por indivíduos de mais de 18 anos de idade.

Todas as amostras de soros (dil. 1:50) de pacientes analisadas em conjunto (n= 34; D.O.= 0,470 ± 0,177), ou de crianças (D.O.= 0,592 ± 0,293) e adultos (D.O.= 0,433 ± 0,106) analisadas isoladamente, mostram valores significativamente ($p < 0,001$) maiores de IgE quando comparados aos níveis encontradas no grupo controle (D.O.= 0,280 ± 0,021) (Fig. 17D).

A soropositividade da população do Distrito de Penha do Cassiano para os diferentes isotipos de anticorpos reativos contra a apirase de batata está indicada na Tabela 6. É interessante observar que 88% (7/8) crianças foram soropositivas para IgG1, IgG4 e IgE, enquanto apenas 38% (3/8) foram soropositivas para IgA. Quanto aos pacientes adultos, 65 a 73% (17-19 em 26) foram soropositivos para IgG1 e IgG4, 88% (23 em 26) para IgE e 65% (17 em 26) para IgA (Tabela 6).

Tabela 6 - Soropositividade da População de Penha do Cassiano para os diferentes anticorpos avaliados. A soropositividade foi calculada subtraindo-se da média da densidade óptica de cada paciente, a média da densidade óptica das amostras de indivíduos saudáveis mais 2 vezes o desvio padrão. Os valores iguais ou acima deste, foram considerados soropositivos.

População	IgG1	IgG4	IgA	IgE
Todos	71% (24/34)	77% (26/34)	59% (20/34)	88% (30/34)
Crianças	88% (7/8)	88% (7/8)	38% (3/8)	88% (7/8)
Adultos	65% (17/26)	73% (19/26)	65% (17/26)	88% (23/26)

5.10 - Análise dos níveis de anticorpos reativos com a apirase de batata encontrados em pacientes de Penha do Cassiano 180 dias após o tratamento quimioterápico com praziquantel

O grupo inicial de pacientes consistia de 34 indivíduos. Após 180 dias do tratamento com praziquantel, apenas 17 indivíduos, 5 crianças e 12 adultos, apresentaram exame parasitológico de fezes negativo para quaisquer

parasitos. Destes pacientes tratados e curados, 11 eram soropositivos para IgG1, 14 para IgG4, 8 para IgA e 15 para IgE contra a apirase de batata.

A comparação individual entre os níveis de IgG1, IgG4, IgA e IgE reativos com a apirase de batata antes e pós-tratamento está mostrada na Figura 18. Para IgG1 (A), 7 dos 11 pacientes soropositivos mostraram redução de reatividade e 3 deles tornaram-se soronegativos. Para IgG4 (B), há uma redução significativa ($p < 0,001$) da soropostividade após o tratamento, sendo que 9 dos 14 pacientes tornaram-se soronegativos. Para IgA (C) 3 dos 8 pacientes tornaram-se soronegativos e 2 mostraram redução de reatividade. Quanto a IgE (D), 3 pacientes tornaram-se soronegativos e é possível observar uma redução discreta em 8 dos 15 pacientes após o tratamento.

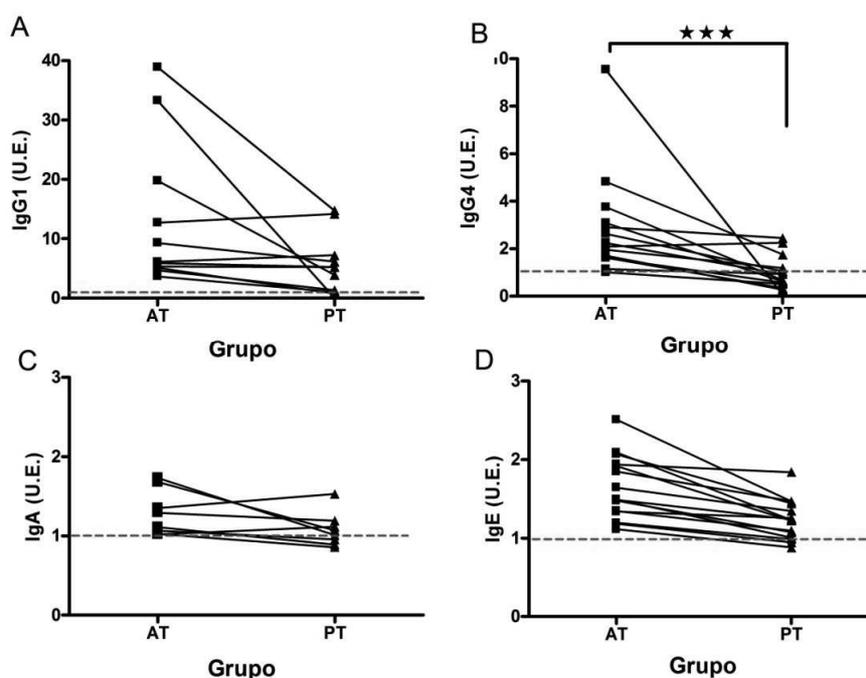


Figura 18. Análise individual dos níveis de isotipos de anticorpos reativos com a apirase de batata antes e pós tratamento na população de Penha do Cassiano – Os gráficos mostram as reatividades em Unidades de ELISA (U. E.) para cada anticorpo testado em dois pontos distintos, antes (AT) e 180 dias após o tratamento (PT). O grupo de pacientes foi composto de adultos e crianças. A linha tracejada é considerada a linha de corte, que corresponde ao valor 1. Análise de variância indicou $p < 0,001^{***}$.

5.11 - Análise dos níveis de anticorpos IgG1, IgG4, IgA e IgE, reativos contra apirase de batata, em amostras de soros dos pacientes da área do Caju.

A área denominada área do Caju é uma região de alta endemicidade. Nesta avaliação, os soros de crianças de 0 a 17 anos, que tiveram diagnóstico parasitológico positivo apenas para *S. mansoni* em suas amostras de fezes foram utilizados nos ensaios imunológicos. Outro grupo de pacientes, no qual o exame parasitológico mostrava ausência de qualquer parasito, foram selecionados para análise dos anticorpos reativos com a apirase de batata (PN = parasitológico negativo). As características de gênero, faixas etárias e o resultado do exame parasitológico foram relatados na Tabela 7. Para análise comparativa, foram selecionados soros de indivíduos não moradores desta área endêmica como controle dos ensaios imunológicos.

Tabela 7. Dados da população da área do Caju selecionada para quantificação dos níveis de anticorpos reativos contra a apirase de batata.

População	Gênero (M/F)	Faixa das Idades	Média N° OPG (DP)
Crianças PN (n= 11)	9 M/ 2 F	8,5 (5 -15)	0
Crianças (n= 62)	34 M/ 28 F	10,5 (5 – 17)	324,5 (531,74)

A tabela mostra os dados dos pacientes que foram incluídos no estudo da população do Caju. Os dados apresentados se referem à média dos valores para cada variável, e entre parênteses é mostrado o desvio padrão. OPG – N° de ovos por grama de fezes. M= masculino e F= feminino. PN= indivíduos com exame parasitológico negativo.

Os níveis de IgG1, IgG4, IGA e IgE reativos com a apirase de batata foram avaliados em 62 crianças, e os valores obtidos foram relatados na Tabela 8. Elevadas soropositividades de IgE (89%; 55/62) e IgG1 (76%; 47/62) para esta proteína vegetal pôde ser observada (Fig. 19 B e C). Para IgG4, foi

observada uma soropositividade de 55% (34/62), enquanto para IgA a soropositividade foi de 32% (20/62; Fig. 19 A e D).

As análises foram também realizadas em um grupo de crianças moradoras desta mesma área endêmica, e com o resultado parasitológico de fezes negativo (PN; Fig. 19). Embora com diagnóstico parasitológico negativo para esquistossomose, este grupo de crianças mostra alta reatividade de IgE e IgG1 contra a apirase de batata, maior do que aquela encontrado para o grupo controle. É possível observar na Figura 19(B e C), 91 e 55% de soropositividade para IgE e IgG1 respectivamente. A soropositividade de IgA e IgG4 para estes indivíduos foi de 18% (Fig. 19A e D).

Tabela 8. Médias das densidades ópticas dos soros das crianças que compõem a população da área do Caju.

Anticorpos	Controle (n= 15)	PN (n= 11)	Pacientes (n= 62)
IgG1	0,038 ± 0,027(0,091)	0,312 ± 0,432***	0,376±0,456***
IgG4	0,024 ± 0,008(0,040)	0,0268 ± 0,015	0,066±0,076***
IgA	0,259 ± 0,088(0,434)	0,280 ± 0,160	0,413±0,260
IgE	0,044 ± 0,019(0,080)	0,207 ± 0,186***	0,222 ± 0,202***

Na tabela estão representadas as médias das densidades ópticas ± desvio padrão obtidas para os grupos em cada um dos isotipos de anticorpos analisados. Entre parênteses estão os valores dos pontos de corte. Este foi obtido a partir das medias das leituras dos controles acrescidas de dois desvios padrão. Os asteriscos mostram as leituras significativamente superiores aos controles. ***p < 0,001.

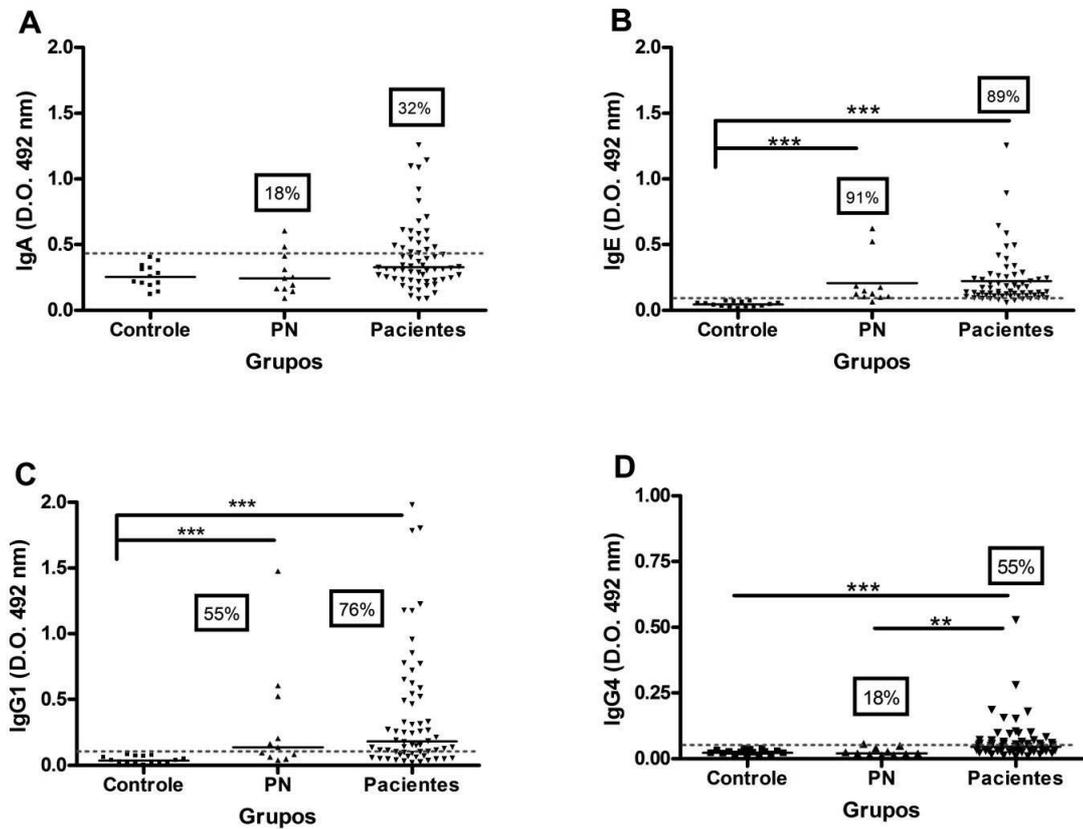


Figura 19. Análise comparativa dos níveis de isotipos de anticorpos reativos contra a apirase de batata na população do Caju - Os dados mostram as médias das leituras em densidade óptica dos níveis de isotipos de anticorpos na população de 0 a 17 anos da área do Caju. A linha vermelha pontilhada refere-se a linha de corte, calculada pela somatória da média das densidade ópticas do grupo controle e dois desvios padrão. As caixas acima de cada grupo mostra a porcentagem de soropositividade em relação ao controle. PN = crianças com exame parasitológico negativo. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.12 - Análise dos níveis de anticorpos IgG1, IgG4, IgA e IgE, reativos contra apirase de batata, em amostras de soros de pacientes co-infectados com *S. mansoni* e ancilostomídeos

Os níveis de anticorpos IgG1, IgG4, IgA e IgE reativos com a apirase de batata foram avaliados em soros (diluídos 1:50) de 27 crianças que estavam co-infectadas com *S. mansoni* e ancilostomídeos, e comparados com aqueles resultados obtidos de 62 crianças mono-infectadas com *S. mansoni* (n= 62), todos eles moradores da área do Caju. Amostras de soros de 4 crianças parasitadas apenas com ancilostomídeos e amostras de soros de 16 indivíduos saudáveis moradores de área não endêmica e não infectados com quaisquer parasitos foram usadas como controle.

Os resultados mostraram que pacientes com ancilostomose (D.O.= $0,231 \pm 0,128$; $P < 0,05$), esquistossomose (D.O.= $0,376 \pm 0,456$; $P < 0,001$), ou co-infectados com esquistossomose e ancilostomídeos (D.O.= $0,362 \pm 0,415$; $P < 0,001$) apresentam níveis de IgG1 significativamente superiores quando comparados aos níveis de IgG1 dos soros controle (D.O.= $0,038 \pm 0,027$; Fig. 20A). Não foi possível observar nenhuma diferença significativa quando os pacientes com esquistossomose foram comparados àqueles co-infectados com ancilostomídeos. A soropositividade de IgG1 foi de 76% (47/62) entre as crianças com esquistossomose, 75% (3/4) para as crianças com ancilostomose e de ~89% (24/27) entre as crianças que apresentavam co-infecção com ancilostomídeos (Fig. 20A).

Pacientes com esquistossomose (D.O.= $0,066 \pm 0,076$; $p < 0,001$) ou co-infectados com esquistossomose e ancilostomídeos (D.O.= $0,060 \pm 0,031$; $p < 0,001$) apresentaram níveis de IgG4 significativamente maiores quando comparados aos níveis de IgG4 dos soros controle (D.O.= $0,024 \pm 0,008$; Fig. 20B). Não foi possível observar nenhuma diferença significativa quando os pacientes com ancilostomose (D.O.= $0,120 \pm 0,140$) foram comparados ao controle de indivíduos saudáveis, ou quando pacientes com esquistossomose foram comparados àqueles co-infectados com ancilostomídeos. A soropositividade de IgG4 foi de 55% (34/62) entre as crianças com esquistossomose, de 50% (2/4) para as crianças com ancilostomose e de

66,6% (18/27) entre as crianças que apresentavam co-infecção com ancilostomídeos (Fig. 20B).

Os níveis de IgA reativa com apirase de batata são similares entre os grupos de pacientes com ancilostomose (D.O.= $0,400 \pm 0,206$), esquistossomose (D.O.= $0,413 \pm 0,260$), e co-infectados com *S. mansoni* e ancilostomídeos (D.O.= $0,363 \pm 0,185$), quando comparados entre si ou com o grupo controle (D.O.= $0,259 \pm 0,088$). Apenas 20 (32%) entre os 62 pacientes com esquistossomose mostraram soropositividade para IgA (Figura 20C). As crianças com ancilostomose apresentaram uma soropositividade de 50% (2/4) para IgA e as crianças co-infectadas apresentaram apenas 26% (7/27).

Os níveis de IgE reativa com apirase de batata em crianças com esquistossomose (D.O.= $0,222 \pm 0,202$; $p < 0,01$), ancilostomose (D.O.= $0,151 \pm 0,058$, $p < 0,05$) e co-infectadas (D.O.= $0,100 \pm 0,062$; $p < 0,001$) são significativamente maiores do que aqueles encontrados no grupo Controle (D.O.= $0,044 \pm 0,018$; Fig. 20D). Curiosamente, é possível observar que pacientes co-infectados com *S. mansoni* e ancilostomídeos possuem níveis de IgE reativa com apirase de batata significativamente ($p < 0,001$) inferiores àqueles encontrados em pacientes infectados apenas com *S. mansoni*. A soropositividade de IgE reativa com a apirase de batata foi de 89% (55/62) entre as 62 crianças com esquistossomose, de 100% (4/4) nas crianças com ancilostomose e apenas de 33,5% (n= 9) das 27 crianças que se apresentavam co-infectadas com ancilostomídeos (Fig. 20D).

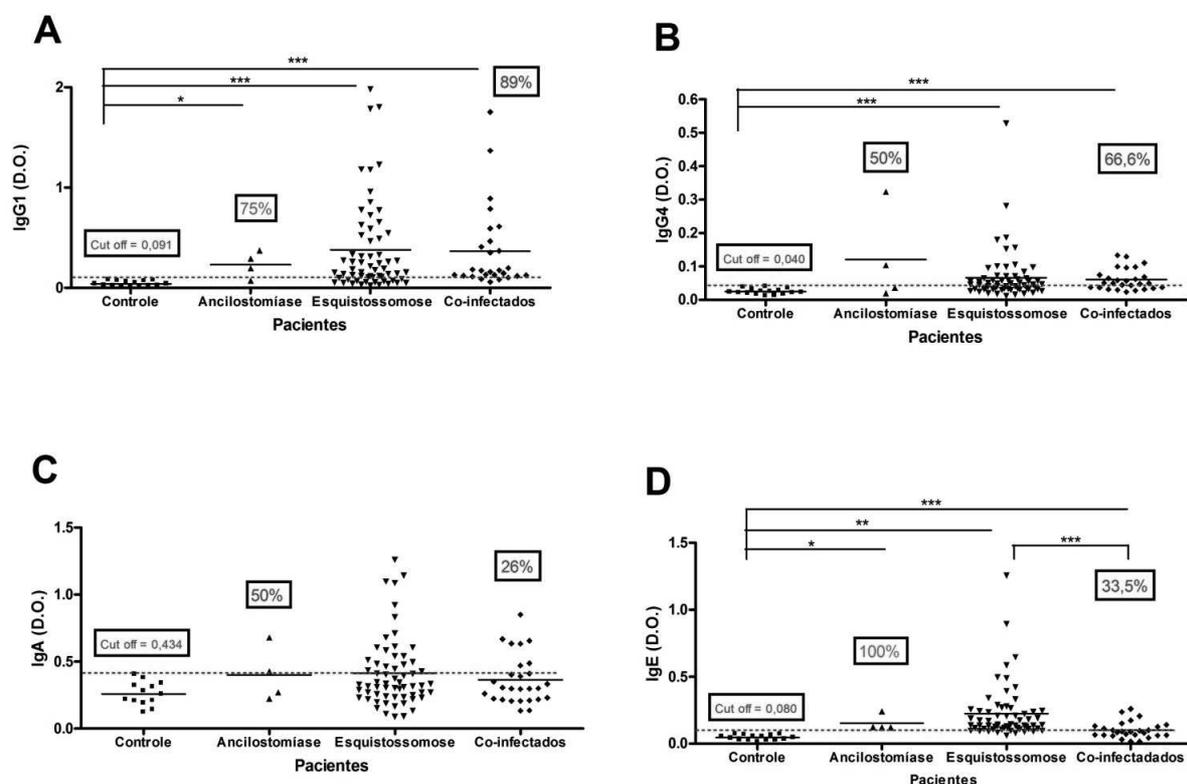


Figura 20. Análise comparativa dos níveis de isotipos de anticorpos reativos contra a apirase de batata em indivíduos com esquistossomose e co-infectados com ancilostomídeos- Os dados mostram as médias das leituras em densidade óptica dos níveis de isotipos de anticorpos na população de 0 a 17 anos da área do Caju e que apresentam infecção apenas por ancilostomídeo, *S.mansoni* ou co-infectados por ambos parasitos. A linha vermelha pontilhada refere-se a linha de corte, calculada pela somatória da média das densidade ópticas do grupo controle e dois desvios padrão. Os valores destes pontos estão mostrados nas caixas de texto sobre o grupo controle. As caixas acima de cada grupo de pacientes mostra a porcentagem de soropositividade em relação ao controle. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Discussão

6 - Discussão

6.1 - Resposta imune humoral aos domínios compartilhados entre a apirase de batata e as isoformas de ATP difosfohidrolase de *S. mansoni* durante a progressão da esquistossomose experimental.

Visando determinar o tipo de resposta imune humoral que é estimulada pelos epitopos compartilhados entre a apirase de batata e as ATP difosfohidrolases de *S. mansoni*, iniciamos os nossos estudos em camundongos BALB/c experimentalmente infectados.

Altos níveis de anticorpos IgM e IgG, e dos isotipos IgG1 e IgG2a, reativos contra a apirase de batata foram observados no estágio agudo da infecção (8-9 semanas). O nível de IgG total reativo com a apirase de batata foi ~3 vezes maior quando comparado ao nível de IgM, este último, um anticorpo que tem sido encontrado competindo e bloqueando a ligação de anticorpos efetores à superfície do parasito (Yi *et al.*, 1986). O nível do isotipo IgG1 foi ~3 vezes maior do que o nível de IgG2a. Por outro lado, na fase crônica da infecção experimental, enquanto o nível do isotipo IgG1 reativo com a apirase de batata foi mantido elevado e similar ao encontrado na fase aguda, a reatividade do isotipo IgG2a desapareceu. Uma direta correlação entre a fase aguda da doença e a produção de IgG1 e IgG2a foi observada, enquanto nenhuma IgG2a foi detectada nos camundongos na fase crônica da infecção. Aparentemente, a imunoreatividade cruzada entre a apirase de batata e os isotipos de IgG presentes nos soros de camundongos experimentalmente infectados com *S. mansoni* foi capaz de diferenciar as fases aguda e crônica da infecção, sugerindo que a apirase de batata pode ser usada como um marcador molecular de valor preditivo para a evolução clínica da esquistossomose. Se comprovado, este é um dado importante para avaliação de pacientes em fase aguda, desde que a esquistossomose diagnosticada precocemente impedirá a progressão da doença, reduzindo a morbidade (Coelho *et al.*, 1993; Massara *et al.*, 2008; Enk *et al.*, 2008).

Em experimentos clássicos de esquistossomose experimental, as fases iniciais da doença são caracterizadas por um perfil de resposta Th1. A exposição a novos antígenos, durante a oviposição, induz uma mudança do perfil Th1 para uma resposta predominantemente Th2 (Cheever *et al.*, 2002).

Estudos mais recentes mostram que esta regulação da mudança do perfil de resposta imune Th1/Th2 se inicia antes mesmo da oviposição, sendo desencadeada a partir de moléculas secretadas/excretadas nas fases larvais do *S. mansoni* (Stadecker *et al.*, 2004; Jenkins *et al.*, 2005). O isotipo IgG2a, derivado de resposta imune celular do tipo Th1, tem sido descrito como anticorpo funcional na resposta imune protetora contra esquistossômulos e vermes adultos, possivelmente atuando no estímulo da fagocitose dependente de anticorpos e em mecanismos citotóxicos em modelo murino (Mountford *et al.*, 1994; James *et al.*, 1998; Carvalho-Queiroz *et al.*, 2004). Uma vez que os anticorpos IgG1 e IgG2a de camundongos estão associados à respostas imune dos tipos Th2 e Th1, respectivamente (Hoffman *et al.*, 1999), os resultados sugeriram que durante a fase aguda da infecção, diferentes epitopos compartilhados entre a apirase de batata e as isoformas de ATP difosfohidrolase de *S. mansoni* sejam capazes de induzir os dois tipos de resposta imune. Alguns domínios compartilhados entre a apirase de batata e as isoformas de ATP difosfohidrolase de *S. mansoni* (Vasconcelos *et al.*, 1996; 1997; De Marco *et al.*, 2003; Faria-Pinto *et al.*, 2004 e 2008) podem ser indutores específicos anticorpos IgG2a na fase aguda da infecção experimental, e podem ter relação com proteção em fases iniciais da mesma. Esta possibilidade estimula a identificação destes epitopos particulares desta isoforma do parasito, e o homólogo na apirase de batata, para testes como antígenos vacinais.

Na fase crônica, por outro lado, o desaparecimento de reatividade de IgG2a e a manutenção da alta reatividade de IgG1, sugerem que nesta fase os domínios compartilhados estimulam uma resposta do tipo Th2. Os antígenos solúveis secretados de ovo de *S. mansoni*, mais do que os antígenos de verme adulto, são potentes imunógenos durante a fase crônica da esquistossomose (Kusel *et al.*, 2007) e a ATP difosfohidrolase está sendo apresentada ao sistema imune do hospedeiro mamífero na fase crônica por ser uma proteína presente também nos ovos do parasito. Estes resultados justificam a imunoreatividade cruzada observada previamente entre IgG total anti-apirase de batata e as isoformas solúveis e de membrana de ATP difosfohidrolase de *S. mansoni* (Vasconcelos *et al.*, 1996; Faria-Pinto *et al.*, 2004).

Decidimos, então, explorar o tipo de resposta imune induzida pela proteína vegetal em camundongos de mesma linhagem usados para a infecção experimental com o *S. mansoni*. O inóculo de apirase de batata em camundongos BALB/c saudáveis revelou que esta proteína vegetal possui propriedades imunoestimulatórias, induzindo a produção de anticorpos IgG1 e IgG2a. A reatividade dos anticorpos IgG1 e IgG2a anti-apirase de batata produzidos em camundongos foi testada contra a preparação de SEA e a isotipo IgG1, mas não IgG2a, deste soro policlonal de camundongos reagiu com a preparação de SEA. É provável que as isoformas de ATP difosfohidrolase que estão presentes nos ovos do parasito tenham domínios capazes de contribuir para o aumento de IgG1 e mudança do perfil de resposta imune para Th2.

Os genes das duas isoformas de ATP difosfohidrolase de *S. mansoni* foram recentemente descritos (De Marco *et al.*, 2003; Levano-Garcia *et al.*, 2007). As proteínas recombinantes obtidas foram inoculadas em camundongos BALB/c e os anticorpos produzidos foram quantificados. A SmATPDase 1 recombinante, isoforma ligada à membrana de vermes adultos, induziu a elevação dos níveis de IgG2a e IgG1 contra esta proteína, com predomínio de IgG2a. Os camundongos imunizados com a isoforma SmATPDase 2 recombinante, isoforma solúvel e que é secretada de vermes adultos, induziu a elevação do nível de IgG1 e, em menor proporção, do nível de IgG2a (Levano-Garcia, 2008). Portanto, estes dados corroboram com nossos resultados, e é possível que os epitopos das isoformas de ATP difosfohidrolase, que são compartilhados com a apirase de batata, sejam imunodominantes para estas proteínas do parasito. A identificação destes epitopos usando como estratégia a análise de quais deles são particularmente compartilhados com a proteína vegetal poderá ser de fundamental auxílio, abreviando a identificação de potenciais epitopos vacinais.

Em nossos experimentos, os camundongos BALB/c na fase crônica da infecção foram tratados com oxaminiquina, e a produção de anticorpos contra os domínios compartilhados foram monitorados durante um período de 11 meses. Após 11 meses de tratamento nós observamos uma redução de aproximadamente 60% nos níveis de IgM e de IgG total, e do isotipo IgG1 na mesma proporção. Como o tratamento quimioterápico eliminou todos os

vermes adultos, possivelmente o decréscimo dos níveis de anticorpos foi devido à ausência de estímulo imunológico contínuo. Não foi possível manter em paralelo um grupo controle de camundongos infectados vivos, desde que somente os camundongos submetidos à quimioterapia sobreviveram até o final do experimento e, portanto, não podemos descartar que esta redução de anticorpos pode ser independente da quimioterapia. No entanto, se esse foi o caso, é interessante observar a longevidade do isotipo IgG1 no curso da doença, sugerindo que os domínios compartilhados contribuem na manutenção de uma resposta do tipo Th2, que tem sido descrita por outros autores como associada à redução da hipersensibilidade granulomatosa aos ovos de *S. mansoni* (Coelho *et al.*, 1996; Zouain *et al.*, 2001).

Um desafio com 100 cercárias após a quimioterapia não alterou os níveis de anticorpos IgG1 contra os domínios compartilhados sendo que os mesmos níveis já estavam presentes aos 11 meses de tratamento. Por outro lado, a ausência de IgG2a, na fase crônica até 11 meses após o tratamento, foi substituída por uma significativa elevação deste anticorpo após a re-infecção. Esta elevação dos níveis de IgG2a sugeriu fortemente uma nova fase aguda, com um aumento da secreção de citocinas do tipo Th1 estimulado pelos epitopos compartilhados entre as proteínas do vegetal e do parasito, contribuindo, portanto, com a proteção do hospedeiro contra o *S. mansoni*. Foi previamente demonstrado por exames histológicos de cortes de fígado que camundongos albinos infectados, tratados com oxaminiquina na fase crônica, e re-infectados após 140 dias do tratamento, são capazes de manter a modulação da resposta inflamatória granulomatosa, assim prevenindo uma nova fase aguda (Coelho *et al.*, 1996), o que torna nossos dados ainda mais interessantes. Nossos resultados sugerem, portanto, que esta permanente imunomodulação por aproximadamente 6 meses pode ser revertida após 1 ano de quimioterapia.

Como previamente discutido, a fase aguda de camundongos jovens infectados com *S. mansoni* mostrou simultânea elevação de IgG1 e IgG2a. Na fase aguda, ocorreu manutenção do nível elevado de IgG1 e desaparecimento da resposta de IgG2a. Neste trabalho, nós mostramos que camundongos BALB/c de 20 meses de idade, infectados com 100 cercárias, e que haviam sido usados como grupo controle, paralelo ao desafio de camundongos

previamente tratados, montaram uma típica resposta imune humoral de fase aguda contra os domínios compartilhados. Como observado, estes camundongos de 20 meses, primo-infectados, mostraram soropositividade para os anticorpos IgM, IgG, e seus isotipos IgG1 e IgG2a, com cinética de indução resultando em razão de ~1 para IgG total/IgM ou IgG1/IgG2a, menor portanto que aquela encontrada na fase aguda de camundongos BALB/c infectados com 7 semanas de idade (IgG/IgM ou IgG1/IgG2a igual a ~3). Este resultado pode ser devido à idade destes camundongos, o que os faz menos responsivos ao estímulo antigênico, ou à carga de cercaria recebida, que foi maior nesta etapa do experimento. Neste último caso, nós antecipamos que a carga antigênica recebida (infecção com maior número de cercarias), pode ser um determinante para o tipo de resposta imune induzida por aqueles domínios compartilhados.

Existe uma ampla expressão de ATP difosfohidrolase em todas as fases do ciclo de vida no hospedeiro (Vasconcelos *et al.*, 1993; 1996; 1997; De Marco *et al.*, 2003; Faria-Pinto *et al.*, 2004; Levano-Garcia *et al.*, 2007). Estes estudos iniciais sugeriram que as isoformas de ATP difosfohidrolase de *S. mansoni* são antigênicas e podem contribuir com a resposta imune contra o parasito e/ou imunomodulação da esquistossomose. Os domínios compartilhados podem ser particularmente úteis na avaliação de mudanças na incidência à re-infecção no curso de operações de controle da esquistossomose.

6.2 - Mapeamento dos domínios antigênicos compartilhados entre a apirase de batata e as ATP difosfohidrolases de parasitos

Da infecção experimental concluímos que a imunoreatividade cruzada entre a apirase de batata e as isoformas de ATP difosfohidrolase de *S. mansoni* de fato existe. Tivemos a curiosidade, então, de avaliar se anticorpos gerados em mamíferos contra a apirase de batata, reconheceriam as NTPDases de tecidos de mamíferos. Nenhuma reatividade com os anticorpos anti-apirase de batata foi observada ao redor do tecido granulomatoso (Lenzi *et al.* 1998). Estes anticorpos também não reagiram com as NTPDases já descritas em parênquima hepático e epitélio vascular. Estes resultados sugeriram que existem epitopos antigênicos particularmente compartilhados

entre a apirase de batata e as ATP difosfohidrolases de *S. mansoni*, e que tais epitopos não seriam possíveis indutores de resposta auto-imune.

Previamente foi demonstrado que existe imunoreatividade cruzada entre as NTPases de *T. gondii* e a isoforma de ATP difosfohidrolase de *S. mansoni* associada à membrana, sendo reconhecidas por anticorpos policlonais anti-NTPase 1 recombinante de *T. gondii*. Por outro lado, esta imunoreatividade cruzada não existe entre a apirase de batata e a NTPase recombinante de *T. gondii* (Vasconcelos *et al.*, 1996).

Iniciamos então análises *in silico* para avaliar qual era a relação estrutural e filogenética entre as proteínas da família das ATP difosfohidrolases cujas seqüências de aminoácidos das estruturas primárias estavam disponíveis no banco de dados, algumas delas ainda como proteínas hipotéticas encontradas nos genomas. A árvore filogenética gerada foi capaz de mostrar dois ramos distintos, indicando uma divergência ancestral responsável por caminhos evolucionários distintos entre elas, mas determinando nitidamente uma relação estrutural entre as isoformas associadas às membranas ou entre as solúveis. Alto grau de identidade foi observado entre as seqüências primárias da apirase de batata, SmATPDase 2 de *S. mansoni*, e as proteínas hipotéticas encontradas nos genomas de *S. japonicum*, *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major*, revelando regiões particulares de alta identidade entre elas. Estudo preditivo das estruturas tridimensionais da apirase de batata e da SmATPDase 2 de *S. mansoni* mostrou um alto grau de semelhança entre elas na estrutura primária bem como na estrutura tridimensional. Além disso, foram identificados os domínios compartilhados e com alto potencial para ligação de anticorpos. Análise preditiva de peptídeos de nove aminoácidos contidos nestes domínios compartilhados, possivelmente capazes de ligar-se a antígenos leucocitários humanos (HLA-DR), evidenciou alta porcentagem de promiscuidade, sugerindo que podem ser também estimuladores de células T e, portanto, indutores de resposta imune celular na esquistossomose.

A SmATPDase 1 de *S. mansoni* mostrou maior homologia com outras proteínas de membrana. Esta proteína, portanto, tem uma proximidade muito maior com as NTPDases de humanos. No entanto, de forma curiosa, existem epitopos particularmente compartilhados com a apirase de batata e, portanto,

com alta probabilidade de serem os responsáveis pelo estímulo de produção de IgG2a observada na fase aguda da infecção experimental.

Destes estudos concluímos que existem domínios funcionais relacionados à resposta imune, que são altamente conservados entre as ATP difosfohidrolases de parasitos. Este fato pode estar relacionado ao sucesso do parasitismo através de mimetismo molecular e/ou imunomodulação da doença. Esta hipótese ganha força à medida que se observa que os hospedeiros e os parasitos têm co-evoluído por milhares de anos e que em mamíferos, especialmente, o hospedeiro e o parasita coexistem por anos. Esta convivência está associada aos mecanismos imunomoduladores que o parasito usa para escapar do sistema imune do hospedeiro e, ainda, ao aproveitamento de metabólitos para a sua sobrevivência (Requena *et al.*, 2000; Dunne & Cooke, 2005).

Em vista dos resultados obtidos da infecção experimental e desta análise teórica efetuada, soros de pacientes com esquistossomose, leishmaniose cutânea americana e doença de Chagas foram analisados em técnica de ELISA, usando a apirase de batata como antígeno. Os resultados obtidos comprovaram que esta imunoreatividade cruzada também existe em humanos, bem como a presença de epitopos conservados e antigênicos. A reatividade entre a apirase de batata e os anticorpos IgG presentes nos soros dos pacientes foi maior naqueles com leishmaniose cutânea americana, seguido de pacientes com esquistossomose e, em menor escala, com os pacientes com Doença de Chagas. Estes resultados experimentais foram corroborados pelas análises teóricas, que mostraram maior homologia entre a apirase de batata e a NDPase de *L. braziliensis* e a SmATPDase 2 de *S. mansoni*.

Desde que entre os domínios compartilhados entre a apirase de batata e as proteínas dos parasitos, existem aqueles que contêm regiões altamente conservadas (ACRs) que caracterizam a família das ATP difosfohidrolases, respostas imunes dirigidas ou induzidas por eles podem causar auto-imunidade e/ou resposta imune regulatória de células B e/ou T. No entanto, estes domínios não devem ser os responsáveis pela resposta imune humoral observada, desde que os nossos estudos não revelaram reatividade entre os anticorpos anti-apirase de batata e as NTPDases de mamíferos. Por outro lado,

os parasitos *T. cruzi* e *Leishmania* possuem diversos antígenos associados à indução de resposta auto-imune (Requena *et al.*, 2000), e os domínios identificados pelo alinhamento podem ser alvos de estudos futuros.

As evidências de que as isoformas de ATP difosfohidrolase de *Leishmania* também tem domínios compartilhados com a apirase de batata nos fizeram iniciar trabalhos paralelos em nosso laboratório. Através de “Western blots” utilizando anticorpos anti-apirase de batata, produzidos em coelhos e em camundongos, e de ensaios de imunoprecipitação de atividades ATPásica e ADPásica, foi possível isolar uma isoforma de ATP difosfohidrolase de 48 kDa em preparação antigênica de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (Rezende-Soares, 2007). Em outro trabalho, soros de camundongos BALB/c infectados por amastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram capazes de reconhecer em “Western blots” uma isoforma de ATP difosfohidrolase purificada do parasito, bem como a apirase de batata, confirmando a antigenicidade da proteína do parasito (Coimbra *et al.*, 2008). Usando a técnica de ELISA e a apirase de batata como antígeno, alto nível do isotipo IgG2a reativo com a apirase de batata foi detectado no início da infecção experimental. Durante a progressão da doença, ao final de 90 dias, o nível de IgG2a reduziu, com simultânea elevação do nível de IgG1, coincidente com o estágio mais grave da doença (Coimbra *et al.*, 2008). Estes resultados apóiam os dados obtidos na avaliação da esquistossomose experimental, que também mostraram reatividade entre a apirase de batata e anticorpos IgG1 e IgG2a dos soros de camundongos BALB/c infectados, sugerindo ainda que existem epitopos compartilhados que induzem resposta imune celular dos tipos Th1 e Th2.

O perfil distinto de resposta imune humoral detectado pela reatividade dos anticorpos IgG de soros de pacientes com leishmaniose cutânea americana, esquistossomose e doença de Chagas contra a apirase de batata, associado aos diferentes ciclos de vidas destes parasitos, sugeriram que os domínios antigênicos compartilhados entre estas proteínas são processados e apresentados às células efectoras do sistema imune do hospedeiro por diferentes caminhos. Acreditando nesta hipótese, iniciamos o estudo da resposta imune humoral humana a estes domínios compartilhados.

6.3 - Resposta imune humoral humana aos domínios compartilhados entre a apirase de batata e às ATP difosfohidrolases de *S. mansoni* em pacientes com esquistossomose.

Amostras de soros de pacientes residentes na área de Chonim de Cima, uma área considerada como de baixa endemicidade, foram selecionados para avaliação dos níveis de anticorpos IgG e IgM reativos com a apirase de batata, comparados àqueles reativos ao SEA e SWAP, antes e após 180 dias do tratamento quimioterápico. Antes do tratamento, estes pacientes mostraram alta soropositividade de IgG e IgM para os antígenos SEA e SWAP (IgM_{SEA}= 58%; IgM_{SWAP}= 68%; IgG_{SEA}= 100%; IgG_{SWAP}=100%) e, após o tratamento, somente a soropositividade de IgG contra o SEA (IgG_{SEA}= 68%) reduziu significativamente. Comparada à reatividade de SEA e SWAP antes do tratamento, a soropositividade de IgM (3/31; 10%) ou IgG (12/31; 39%) contra a apirase foi baixa na população do Chonim. No entanto, é possível supor que esta reatividade aos epitopos compartilhados entre a apirase de batata e as ATP difosfohidrolases de *S. mansoni* contribui com a reatividade dos soros contra SEA e SWAP. Como observado na infecção experimental, foi possível observar em pacientes com esquistossomose a redução do nível de anticorpos IgG reativos contra a apirase de batata após o tratamento quimioterápico dos pacientes. Dos 12 pacientes com soropositividade para IgG, 9 deles tornaram-se soronegativos, e os outros 3 tiveram uma redução drástica de seus níveis de reatividade contra esta proteína.

É interessante observar que, similar à infecção experimental dos camundongos, a soropositividade de IgG para apirase de batata é maior do que aquela encontrada para IgM. Anticorpos das classes IgM e IgG são encontrados nos estágios agudo e crônico da esquistossomose para alguns antígenos já descritos (Evengard *et al.*, 1995; Capron *et al.*, 1995). Já foi observada a maior susceptibilidade de indivíduos jovens à infecção e acredita-se que este fato está relacionado ao nível elevado de IgM, anticorpos que não são capazes de conferir proteção, e ainda bloqueiam a atividade fagocítica estimulada pela IgE, IgG1 e IgG3 (Yi *et al.*, 1986; Khalife *et al.*, 1986; 1989; Dunne *et al.*, 1992; Hagan e Abath, 1992; Corrêa-Oliveira *et al.* 2000 a,b; Naus *et al.* 2003).

O nível de IgG total reativa com a apirase de batata foi também avaliado em soros de pacientes (n= 49) moradores do distrito de Penha do Cassiano, outra região considerada de baixa endemicidade para a esquistossomose. Foi possível observar 61% (30/49) de soropositividade para IgG entre os pacientes com esquistossomose, sendo soropositivas 67% das crianças (10/15) e 59% dos adultos (20/34). Nesta população a porcentagem de soropositividade foi maior do que aquela encontrada entre os pacientes de Chonim de Cima (39%; 12/31), mas não foi possível fazer qualquer correlação com os dados de faixa etária, sexo ou número de ovos, que justificasse esta diferença entre as duas populações analisadas. Essa diferença pode estar relacionada ao maior número de pacientes avaliados e/ou às condições sócio-econômica, nutricional e genética desta população.

Em função do maior número de pacientes soropositivos para a apirase de batata entre estes pacientes de Penha do Cassiano, optamos por avaliar nesta população a reatividade dos isotipos IgG1 e IgG4, bem como a de IgA e IgE, contra a apirase de batata. Nossos resultados mostraram que 88% (7/8) crianças foram soropositivas para IgG1, IgG4 e IgE, enquanto apenas 38% (3/8) foram soropositivas para IgA. Quanto aos pacientes adultos, 65 a 73% (17-19/26) foram soropositivos para IgG1 e IgG4, 88% (23/26) para IgE e 65% (16/26) para IgA. Em crianças, a reatividade do isotipo IgG1 contra a apirase de batata foi significativamente maior, em média 4 vezes mais, quando comparada àquela encontrada para IgG4, e significativamente maior quando comparada à reatividade de IgG1 de adultos. Após 180 dias de quimioterapia, pacientes de Penha do Cassiano que mostravam exame parasitológico de fezes negativo para quaisquer parasitos, tiveram a soropositividade de IgG1 ou IgG4 eliminada ou reduzida. A reatividade de IgE, embora menor em alguns pacientes, permaneceu positiva para a apirase de batata.

Para comparação, amostras de soros de crianças (n= 62) moradoras do distrito do Caju, uma área considerada como sendo de alta endemicidade para esquistossomose, e que apresentavam somente ovos de *S. mansoni* no exame parasitológico de fezes, foram também avaliadas quanto à sua reatividade contra a apirase de batata. Elevada soropositividade de IgE (89%), IgG1 (76%), IgG4 (55%), e em menor escala para IgA (32%; 20/62) pôde ser observada. Crianças moradoras desta mesma área (n= 11), mas que apresentavam exame

parasitológico negativo, mostraram soropositividade para IgE (91%) e IgG1 (55%), em níveis próximos àqueles obtidos para os pacientes com esquistossomose. Por outro lado, os níveis de soropositividade para IgA e IgG4 mostraram-se menores (18%).

A alta soropositividade de IgE contra a apirase de batata em pacientes de área de alta ou baixa endemidade, mantidos após a quimioterapia, ou naqueles que apresentavam o exame parasitológico negativo para esquistossomose, apontam para a existência de epitopos compartilhados entre as proteínas do vegetal e do parasito que podem estar associados com a resistência à reinfeção. A infecção crônica por *S. mansoni* é caracterizada por uma intensa resposta imune do tipo Th2 em humanos e em modelos experimentais. Dentre as citocinas envolvidas, a IL-4 é um dos fatores mais importantes de estímulo para que as células B produzam grandes quantidades de IgE (Haisch *et al.*, 2001). A associação entre os anticorpos humanos IgE específicos contra o parasito e a eosinofilia sérica produz um mecanismo de citotoxicidade celular mediado por anticorpos capaz de matar os esquistossômulos de *S. mansoni* em ensaios *in vitro*. Portanto, a resposta de anticorpos IgE está associada com a resistência à reinfeção após a quimioterapia, e é considerada um anticorpo de proteção contra a esquistossomose em humanos (Fitzsimmons *et al.*, 2004, Satti *et al.*, 2004). A resposta de anticorpos IgE específicos é predominantemente protetora, independente da cinética de produção dos outros anticorpos (Fitzsimmons *et al.*, 2004). O tegumento dos vermes adultos de *S. mansoni* é um local dinâmico de interação entre o parasito e o hospedeiro que envolve sua nutrição, escape do sistema imune e modulação da excreção, osmorregulação e recepção sensorial, sendo uma estrutura de importância crucial para a escolha de antígenos vacinais e alvos terapêuticos (Loukas *et al.*, 2007; Kussel *et al.*, 2007). Em comparação com as reatividades para IgG e outros isotipos, existem poucos antígenos capazes de promover uma resposta de IgE humana em extratos antigênicos oriundos de *S. mansoni* e *S. japonicum*, a maioria deles localizados nas membranas celulares (Fitzsimmons *et al.*, 2004). Sendo assim, os resultados mostrados aqui estimulam a busca dos domínios particularmente compartilhados entre as proteínas do vegetal e de *S. mansoni*, e que são ligadores de IgE. Estes domínios poderão ser uma ferramenta para o

diagnóstico e prognóstico da esquistossome. É interessante ressaltar que os ensaios descritos nesta tese foram também realizados com soros de pacientes com leishmaniose cutânea americana, nas mesmas condições experimentais e em paralelo, e estes pacientes não mostraram reatividade de IgE com a apirase de batata.

Níveis elevados de IgG4 reativos com a apirase de batata foram observados nas 2 populações estudadas, Chonim de Cima e Caju, indicando a presença de epitopos compartilhados entre as proteínas do vegetal e do parasito capazes de estimular a produção deste anticorpo. Tem sido descrito que existe uma correlação direta entre os níveis elevados de IgG4 contra SEA ou SWAP e a intensidade da infecção, ou seja, com o aumento do número de ovos presente nas fezes (Abd El-Aal *et al.*, 2005). Elevado nível de IgG4 contra os antígenos do SEA tem sido também relacionado com a gravidade da doença e o aparecimento de fibrose (Silveira *et al.*, 2002). Em nosso trabalho, não foi possível ainda estabelecer a relação entre a carga parasitária e/ou a gravidade da esquistossomose e a presença de anticorpo IgG4 reativo contra os domínios compartilhados entre as proteínas vegetal e do parasito, e estes estudos poderão ser efetuados.

Na esquistossomose mansoni, em indivíduos jovens, nível elevado de anticorpo IgG4 contra antígenos de *S. mansoni*, quando comparado ao de IgE, indica susceptibilidade após o tratamento quimioterápico, enquanto alta razão IgE/IgG4 está relacionada à imunidade adquirida após o tratamento (Corrêa-Oliveira *et al.* 2000 a,b; Mutapi *et al.*, 2005). Al-Sherbiny e cols. (2003) mostraram que indivíduos jovens (entre 10 e 19 anos) não são capazes de montar um perfil de respostas celular e humoral contra a esquistossomose, o que confere maior susceptibilidade à reinfeção após o tratamento, enquanto os adultos se comportam como resistentes. A aparente resistência à reinfeção destes indivíduos mais idosos é atribuída ao efeito protetor dos anticorpos IgE contra antígenos de vermes adultos. Este efeito protetor também é observado em indivíduos que residem em áreas endêmicas e não apresentam a infecção por *S. mansoni* (indivíduos com exame parasitológico negativo) e em pacientes resistentes à reinfeção no pós-tratamento, ambos apresentando níveis elevados de IgE capazes de eliminar os parasitos (Dunne *et al.* 1992; Hagan e Abath, 1992; Corrêa-Oliveira *et al.* 2000 a,b ; Demeure *et al.*, 1993).

É interessante observar que após o tratamento quimioterápico de pacientes de Penha do Cassiano, o nível de IgE manteve-se elevado, sofrendo apenas uma discreta redução, enquanto a redução do nível de IgG4 nestes pacientes foi mais acentuada, desaparecendo a reatividade contra a apirase de batata em alguns deles. É interessante observar também que aquelas crianças moradoras do Caju, e que tinham o exame parasitológico de fezes negativo para quaisquer parasitos, estavam com os níveis de IgG1 e IgE elevados, similar aos encontrados em pacientes infectados, enquanto o nível de IgG4 estava baixo. Estes pacientes ou tiveram contato prévio com o *S. mansoni*, mas não desenvolveram a doença, ou apresentavam poucos ovos não detectados pelo exame parasitológico. Sendo os anticorpos IgE de efeito protetor, oriundos de resposta imune do tipo Th2, e os anticorpos da classe IgG1, oriundos de resposta protetora do tipo Th1, o balanço destas pode ter contribuído para a resistência à infecção ou com a manutenção de uma baixa carga parasitária. Resultados semelhantes foram encontrados por Viana (1997) em seu trabalho de Doutorado, que verificou altos níveis de IgE e níveis baixos de IgG4 contra antígenos de esquistossômulos em amostras de soros de pacientes que possuíam o mesmo perfil aqui descrito, isto é, exame parasitológico negativo para esquistossomose. Estes dados reforçam a idéia de que existem epitopos compartilhados entre a apirase de batata e as ATP difosfohidrolases de *S. mansoni* capazes de contribuir com a resistência à infecção. A análise de epitopos específicos, compartilhados entre as proteínas da batata e de *S. mansoni*, que demonstrem a supressão da reatividade de IgG4, com manutenção da reatividade de IgE, podem ser utilizados como marcadores de resistência à esquistossomose em métodos imunodiagnósticos. Esta é uma hipótese a ser testada.

Foi uma constante em nossos ensaios a presença de níveis elevados de IgG1 e IgA, tanto em crianças e adultos de Penha do Cassiano, como nas crianças do Caju. E após o tratamento, ocorre redução de seus níveis mas com manutenção de soropositividade para estes anticorpos. Existe uma dicotomia em relação a produção de anticorpos IgA e IgG1, fazendo com que a produção de IgA seja capaz de intervir na produção de IgG1, e vice-versa. Esta dicotomia é provocada pela variação dos níveis de TGF- β , os quais interferem na secreção de IL-10 (Mutapi *et al.*, 2005). A produção de níveis séricos de IgA

é estimulada por IL-10, e esta mesma citocina é responsável por estimular os linfócitos B a produzirem IgG1, fazendo com que apenas um destes dois anticorpos possa estar elevado (Mutapi *et al.*, 2005). A IgG1, um anticorpo relacionado ao aumento de resposta imune celular humana do tipo Th1, que é protetora contra infecção por helmintos, junto à IgE e IgG3, estimula atividade fagocítica (Khalife *et al.*, 1986; 1989; Dunne *et al.*, 1992; Hagan e Abath, 1992; Corrêa-Oliveira *et al.* 2000 a,b; Naus *et al.* 2003). Anticorpos IgG1 e IgG3 se ligam mais eficientemente aos receptores presentes nos monócitos, macrófagos e células “Natural Killer”, sendo capazes de estimular a citotoxicidade mediada por células anticorpos-dependentes contra a penetração das cercárias (Khalife *et al.*, 1986; 1989; Dunne *et al.*, 1992; Hagan e Abath, 1992; Corrêa-Oliveira *et al.* 2000 a,b; Naus *et al.* 2003). Anticorpos da classe IgA são detectados no estágio agudo da infecção, e estão correlacionados com a viabilidade e o número de ovos do parasito, desencadeando resposta imune protetora, reduzindo a intensidade da infecção (Capron *et al.*, 1995; Evengard *et al.*, 1995; Corrêa-Oliveira *et al.*, 2000 a,b). Os níveis de IgA contra SWAP foram descritos como protetores, gerando resistência à reinfecção, sendo observados com maior intensidade e frequência em indivíduos adultos (Vereecken *et al.*, 2007). Portanto, existem epitopos compartilhados entre as proteínas do vegetal e do parasito que podem estimular a produção de IgG1 e IgA em adultos e em crianças. Como demonstrado neste trabalho, a soropositividade de IgA foi maior em adultos, enquanto a soropositividade de IgG1 foi maior em crianças, e estes resultados podem estar relacionados à resistência destes pacientes à esquistossomose, estimulando estudos com uma maior amostragem de pacientes, antes e pós-tratamento.

6.4 - Análise da resposta imune humoral aos domínios conservados de ATP difosfohidrolase em pacientes com esquistossomose mansoni co-infectados com ancilostomídeos.

A ancilostomose é uma parasitose intestinal causada pelo *Ancylostoma duodenale* ou *Necator americanus* ou ainda, por uma associação dos dois helmintos, sendo o *Necator americanus* a espécie mais comum no Brasil (Rey, 2001). São geo-helmintos que podem viver alimentando-se de sangue por 1-5

anos no intestino delgado e cujas fêmeas produzem 10 a 20 mil ovos por dia. Ocorre em 20 a 25% de toda a população mundial. No Brasil a prevalência é variável, sendo mais comum na zona rural (Rey, 2001). Como em áreas endêmicas para *S. mansoni* é freqüente a alta prevalência de outros parasitos, resultando em co-infecção, a possível ocorrência de interferência ou alterações causadas por outras infecções parasitárias sobre a resposta imune dirigida ao *S. mansoni*, ou o contrário, tem sido explorada (Corrêa-Oliveira *et al.*, 2002; Quinnell *et al.*, 2004; Fleming *et al.*, 2006).

A imunologia da infecção por ancilostomídeos tem recebido atenção especial e crescente devido ao seu papel imunomodulador da patologia de outras doenças infecciosas, tal como a esquistossomose. Tem sido demonstrado que paciente com ancilostomose apresenta anticorpos em seus soros que têm imunoreatividade cruzada com SEA e SWAP, e as mudanças imunológicas induzidas podem ter importantes efeitos na susceptibilidade do indivíduo a outras infecções (Corrêa-Oliveira *et al.*, 2002; Quinnell *et al.*, 2004; Fleming *et al.*, 2006). Atividade ATP difosfohidrolásica tem sido caracterizada por nosso grupo em espécies de ancilostomídeos. Assim, foi de interesse verificar se a co-infecção com ancilostomídeos e *S. mansoni* interfere com a resposta imune humoral contra os domínios compartilhados entre as proteínas da batata e do *S. mansoni*.

Pacientes mono-infectados com ancilostomídeos, moradores da mesma área endêmica que os pacientes com esquistossomose, mostraram soropositividade de IgG1 ou IgG4 contra a apirase de batata, sugerindo que os ancilostomídeos também induzem uma resposta imune contra sua isoforma de ATP difosfohidrolase ou que foi devido a um contato prévio daqueles pacientes com o *S. mansoni*, e estas hipóteses deverão ser adequadamente avaliadas. É interessante observar que a reatividade de IgA, ou dos isotipos IgG1 ou IgG4, contra a apirase de batata em pacientes com esquistossomose é similar àquela encontrada em pacientes co-infectados com as duas parasitoses. Estes resultados sugeriram que a resposta imune nos pacientes co-infectados foi dirigida contra os domínios compartilhados entre a apirase de batata e as isoformas protéicas do *S. mansoni*, e não a uma isoforma de ATP difosfohidrolase presente no ancilostomídeo, sugerindo que a co-infecção não interfere na produção de IgG1 ou IgG4.

Por outro lado, é curioso observar que os níveis de IgE reativo contra a apirase de batata é significativamente menor em pacientes co-infectados com *S. mansoni* e ancilostomídeos, quando comparados àqueles encontrados em pacientes infectados apenas com *S. mansoni*. Portanto, é possível que a produção de IgE contra os epitopos compartilhados entre a apirase de batata e as isoformas de ATP difosfohidrolase de *S. mansoni* seja de fato relacionada a resistência à esquistossomose, e que a co-infecção com ancilostomídeos reduz a resposta imune protetora desencadeada via produção deste anticorpo, tornando os pacientes mais susceptíveis à re-infecção. Estes dados são preliminares e deverão ser explorados, relacionando dados clínicos e laboratoriais, antes e pós-tratamento, e a ativação diferencial de células Th em pacientes mono- ou co-infectados com estes parasitosos.

6.5 - Peptídeos sintéticos: perspectivas futuras.

Dos estudos de reatividade cruzada entre a apirase de batata e os soros de camundongos infectados experimentalmente ou soros de pacientes com esquistossomose ficou claro a existência de epitopos importantes nas ATP difosfohidrolases de parasitos que podem estar envolvidos na resistência e/ou susceptibilidade para esquistossomose. O mapeamento das seqüências primárias da apirase de batata e das isoformas de ATP difosfohidrolase de *S. mansoni* permitiu definir os domínios conservados e com alta probabilidade de ligar anticorpos nestas proteínas e/ou a moléculas HLA-DR.

Para determinar os epitopos antigênicos, dois peptídeos de 22 aminoácidos, equivalentes ao domínio B da apirase de batata, e os 2 peptídeos da isoforma solúvel de ATP difosfohidrolase de *S. mansoni* (SmATPDase 2) homólogos àqueles da proteína vegetal, foram sintetizados e testados na técnica de ELISA. Foi possível, já nos primeiros ensaios, identificar um peptídeo que tem alta reatividade com IgG4, e um outro cuja predominante reatividade foi com o isotipo IgG1 presente em soros de pacientes com esquistossomose.

Com base na intensidade da resposta imune a estes peptídeos, nós decidimos sintetizar 2 outros peptídeos menores da proteína do *S. mansoni*, visando rastrear o verdadeiro epitopo para os respectivos isotipos. No entanto, aqueles peptídeos maiores foram identificados como a seqüência peptídica

mínima requerida para se obter o reconhecimento pelos soros, desde que para estes últimos encontramos uma reatividade significativamente menor.

Estas seqüências não são ainda as seqüências particularmente conservadas que observamos entre a apirase de batata e as proteínas de *S. mansoni*, sendo também homólogos a domínios da NDPase de *L. braziliensis*, desde que a prioridade nesses ensaios iniciais era identificar epitopos antigênicos que comprovassem aquela imunoreatividade cruzada entre as proteínas do vegetal e a dos parasitos. Interessantemente, a intensidade de reatividade a estes peptídeos por soros de pacientes com leishmaniose é diferente daquela observada para pacientes com esquistossomose, fazendo crer que esses domínios são diferentemente apresentados ao sistema imune do hospedeiro nas diferentes parasitoses e que a resposta imune a eles poderá ser específica.

Estes resultados são preliminares e estamos agora otimizando nossos métodos de análise dos peptídeos sintéticos. Expandiremos nossas análises para ensaios de proliferação celular e estímulo de produção de citocinas. Além disso, os outros peptídeos, particulares entre cada uma das ATP difosfohidrolases de parasitos, serão também sintetizados. A definição dos epitopos de células B e T nas ATP difosfohidrolases de *S. mansoni* e de outros parasitos será importante para selecionar aqueles que serão testados em testes específicos e sensíveis de imunodiagnóstico, ou para estudos de proteção contra a esquistossomose.

Os mecanismos que tornam os humanos resistentes à infecção pelo *S. mansoni* não estão ainda completamente esclarecidos. Os estudos que avaliam os perfis da resposta imune na esquistossomose mansoni humana mostram que uma resposta imune simples, que tendencie exclusivamente para um perfil Th1 ou Th2 pode não ser capaz de promover o efeito protetor ou imunomodulador adequado (Mutapi *et al.*, 2005; Vereecken *et al.*, 2007). A resposta imune à infecção deve contemplar fatores celulares e humorais, promovendo um balanço capaz de gerar resistência (Mutapi *et al.*, 2005). A identificação da qualidade e da quantidade de isotipos de anticorpos produzidos pela esquistossomose em pacientes moradores de áreas endêmicas é muito importante para compreensão da relação parasito-

hospedeiro e avaliação de protocolos adequados para o controle e combate a infecção (Abd El-Aal *et al.*, 2005).

As preparações antigênicas comumente aplicadas em estudos epidemiológicos são compostas por uma diversidade de moléculas antigênicas. Em especial, SEA e SWAP de *S. mansoni*, homogeneizados de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* ou de epimastigotas de *T. cruzi*, são amplamente aplicados em estudos imunológicos populacionais. A avaliação da resposta imune de populações de áreas endêmicas a estes antígenos complexos é muito importante na detecção do perfil imunológico geral destas populações. No entanto, em estudos comparativos, o uso de um único antígeno permite definir não só o perfil da resposta imune humoral, mas também do papel deste antígeno na modulação da resposta imune celular (Mutapi, 2001; Kedzierski *et al.*, 2006). Todas estas preparações citadas contêm isoformas de ATP difosfohidrolases (Fietto *et al.*, 2004; Faria-Pinto *et al.*, 2004; Levano-Garcia *et al.*, 2007; Rezende-Soares, 2007) e, portanto, o estudo destes antígenos poderá ser de relevância.

Nossos resultados sugeriram fortemente que os epitopos compartilhados entre a apirase de batata e a isoforma solúvel da ATP difosfohidrolase do parasito, secretada ativamente de ovos (Faria-Pinto *et al.*, 2004) e de vermes adultos (Levano-Garcia *et al.*, 2007), são predominantemente indutores de resposta imune do tipo Th2. Por outro lado, os epitopos compartilhados entre a apirase de batata e a isoforma de ATP difosfohidrolase associada à membrana, presente em vermes adultos e esquistossômulos (Vasconcelos *et al.*, 1996; De Marco *et al.*, 2003), são predominantemente indutores de resposta imune do tipo Th1. Nossos estudos permitiram indicar ainda quais são estes possíveis epitopos compartilhados entre as proteínas do vegetal e de parasitos. O estudo das ATP difosfohidrolases de parasitos em diferentes doenças parasitárias será de interesse para a determinação se estes epitopos compartilhados com a proteína vegetal são imunodominantes. Os domínios conservados poderão ser testados ainda em ensaios de proliferação de células e em ensaios *in vitro* de ligação aos antígenos leucocitários humanos (HLA)-DR em populações com alta variabilidade genética, determinando assim a habilidade daqueles epitopos estimularem respostas imunes e serem apresentados por uma grande variedade de moléculas HLA.

A apirase de batata tem propriedades estimulatórias induzindo a formação de anticorpos, como mostrados neste trabalho, e de citocinas de perfil Th1 e Th2 (dados não publicados). A formação do granuloma é mediada por imunidade celular capaz de direcionar o sistema imune para um papel protetor na infecção por *S. mansoni* (Lenzi *et al.*, 1998). Tem sido descrito que ambas as respostas Th1 e Th2 estão envolvidas na redução da fibrose hepática na esquistossomose, ou na imunomodulação, resistência e resposta imune protetora contra parasitos (James *et al.*, 1998; Hoffmann *et al.* 1999; Zouain *et al.* 2001; Cheever *et al.*, 2002; Leenstra *et al.* 2006; Kedzierski *et al.* 2006) e que moléculas produzidas pelo *S. mansoni* contribuem para a prevenção de várias desordens imunes (Araujo *et al.*, 2004; Fitzsimmons *et al.*, 2004; Yang *et al.* 2007). Novas moléculas estimulatórias oriundas de plantas, que aumentam ou dirigem uma apropriada resposta imune estão sendo investigadas para o tratamento e prevenção de várias doenças (Spelman *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007). Portanto, estudos futuros dos domínios conservados e compartilhados entre as proteínas do vegetal e do parasito, obtidos por síntese química ou por clonagem e expressão heteróloga, poderão ser explorados como marcadores moleculares sensíveis e específicos para o estudo de doenças parasitárias, para implementação de métodos imunodiagnósticos, ou para a composição de vacinas ou imunoterápicos. Estes epitopos poderão ser alvos também de drogas esquistossomicidas, reduzindo a atividade da enzima (Penido *et al.*, 2007), e alterando o seu potencial imunológico .

Conclusões

7 - Conclusões

- a) A reatividade cruzada entre os subtipos IgG1 e IgG2a de soros de camundongos experimentalmente infectados e a apirase de batata as isoformas de ATP difosfohidrolase de *S. mansoni* têm propriedades antigênicas distintas durante a evolução da esquistossomose.
- b) A apirase de batata pode ser usada como um marcador molecular de valor preditivo para a evolução clínica da esquistossomose.
- c) Os resultados sugeriram que os diferentes epitopos compartilhados entre a apirase de batata e as isoformas de ATP difosfohidrolase de *S. mansoni* são capazes de induzir resposta imune celular e humoral, bem como o inóculo da proteína vegetal em camundongos saudáveis.
- d) A reinfecção de camundongos tratados e curados mostrou que as isoformas de ATP difosfohidrolase de *S. mansoni* estimulam a produção de níveis elevados de IgG2a. Os domínios compartilhados podem ser particularmente úteis na avaliação de mudanças na incidência à reinfecção no curso de operações de controle da esquistossomose.
- e) Análises *in silico* permitiram observar que existe uma conservação entre as apirases de planta e de parasitos, e que estes domínios conservados podem estar relacionados à resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro
- f) O perfil de reatividade de anticorpos contra a apirase de batata avaliado em amostras de soros de adultos e crianças com esquistossomose, moradores de três áreas endêmicas diferentes, mostrou elevação dos níveis de anticorpos IgA, IgE, IgG1 e IgG4, com diferenças significativas entre os grupos de pacientes adultos e crianças.

- g) Após a quimioterapia, uma redução significativa ou ausência de reatividade de anticorpos contra a apirase de batata foi observada em alguns pacientes, podendo estar associada à resistência ou susceptibilidade a infecção.

- h) A alta soropositividade de IgE contra a apirase de batata em pacientes de área de alta ou baixa endemidade, mantidos após a quimioterapia, ou naqueles que apresentavam o exame parasitológico negativo para esquistossomose, apontam para a existência de epitopos compartilhados entre as proteínas do vegetal e do parasito que podem estar associados com a resistência à reinfeção.

- i) Nossos estudos permitiram indicar ainda quais são os possíveis epitopos compartilhados entre as proteínas do vegetal e de parasitos, que poderão ser obtidos por síntese química ou por clonagem e expressão heteróloga, e explorados como marcadores moleculares sensíveis e específicos para o estudo de doenças parasitárias, para implementação de métodos imunodiagnósticos, ou para a composição de vacinas ou imunoterápicos.

Referências
Bibliográficas

8 - Referências Bibliográficas

1. ABD EL-AAL AA, EL-AROUSY MH, EL-GENDY AM, TUNKUL AEL-K, ISMAIL SA, EL-BADRY AA 2005. Early post-treatment immunoglobulin profile in human schistosomiasis. *J Egypt Soc Parasitol* **35(1)**:167-80.
2. ABOUEL-NOUR MF, LOTFY M, ATTALLAH AM, DOUGHTY BL 2006. *Schistosoma mansoni* major egg antigen Smp40: molecular modeling and potential immunoreactivity for anti-pathology vaccine development. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **101**:365-372.
3. ALGER HM, SAYED AA, STADECKER MJ, WILLIAMS DL 2002. Molecular and enzymatic characterisation of *Schistosoma mansoni* thioredoxin. *Int J Parasitol.* **32(10)**:1285-92.
4. AL-SHERBINY M, OSMAN A, BARAKAT R, MORSHEDY HE, BERGQUIST R, OLDS R 2003. *In vitro* cellular and humoral responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens. *Acta Tropica* **88**: 17-130.
5. ARAÚJO M I, HOPPE BS, MEDEIROS JR M, CARVALHO E M 2004. *Schistosoma mansoni* infection modulates the immune response against allergic and auto-immune diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **99**: 27-32.
6. ASAI T, MIZUNO F, KOJIMA S, TAKEUCHI T, KOBAYASHI A, SUZUKI Y 1992. High correlation in antibody titers between Sabin-Feldman dye test and an enzyme linked immunosorbent assay detecting immunoglobulin G antibodies to the nucleoside triphosphate hydrolase of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* **30**:1291-3.
7. BARROS FS, DE MENEZES LF, PINHEIRO AAS, SILVA E, LOPES AHCS, DE SOUZA W, MEYER-FERNANDES JR 2000. Ectonucleotide diphosphohydrolase activities in *Entamoeba histolytica*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **375**: 304-314.

8. BECK L, VAN-LÜME DS, SOUZA JR, MORAIS CN, MELO WG, XAVIER E, BARBOSA CS, AROUCHA ML, DOMINGUES AL, FAVRE T, PIERI O, ABATH FG, MONTENEGRO SM 2004. Evaluation of tests based on the antibody response to keyhole limpet haemocyanin and soluble egg antigen to differentiate acute and chronic human schistosomiasis mansoni. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **99**(5 Suppl 1):97-8.
9. BERMUDES D, PECK KR, AFIFI MA, BECKERS CJM, JOINER KA 1994. Tandemly repeated genes encode nucleoside triphosphate hydrolase isoforms secreted into the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* **269**: 29252-29260.
10. BRASCHI S, CURWEN RS, ASHTON PD, VERJOVSKI-ALMEIDA S, WILSON A 2006. The tegument surface membranes of the human blood parasite *Schistosoma mansoni*: A proteomic analysis after differential extraction. *Proteomics* **6**:1471-1482.
11. BRITO CF, FONSECA CT, GOES AM, AZEVEDO V, SIMPSON AJ, OLIVEIRA SC 2000. Human IgG1 and IgG3 recognition of *Schistosoma mansoni* 14kDa fatty acid-binding recombinant protein. *Parasite Immunol* **22**(1):41-8.
12. CALDAS IR, CAMPI-AZEVEDO AC, OLIVEIRA LF, SILVEIRA AM, OLIVEIRA RC, GAZZINELLI G 2008. Human schistosomiasis mansoni: Immune responses during acute and chronic phases of the infection. *Acta Trop.* Jun 5. [Epub ahead of print].
13. CAPRON A, RIVEAU G, GRZYCH JM, BOULANGER D, CAPRON M, PIERCE R 1995. Development of a vaccine strategy against human and bovine schistosomiasis. Background and update. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **90**(2): 235-240.
14. CARDOSO FC, PACÍFICO RN, MORTARA RA, OLIVEIRA SC 2006. Human antibody responses of patients living in endemic areas for schistosomiasis to the tegumental protein Sm29 identified through genomic studies. *Clin Exp Immunol.* **144**(3):382-391.
15. CARVALHO-QUEIROZ C, COOK R, WANG CC, CORREA-OLIVEIRA R, BAILEY NA, EGILMEZ NK, MATHIOWITZ E, LOVERDE PT. 2004. Cross-

reactivity of *Schistosoma mansoni* cytosolic superoxide dismutase, a protective vaccine candidate, with host superoxide dismutase and identification of parasite-specific B epitopes. *Infect Immun* **72**: 2635-2647.

16. CATTANEO M, LECCHI A, ZIGHETTI ML, LUSSANA F 2007. Platelet aggregation studies: autologous platelet-poor plasma inhibits platelet aggregation when added to platelet-rich plasma to normalize platelet count. *Haematologica* **92**, 694-697
17. CHEEVER AW, LENZI AL, LENZI HL, & ANDRADE ZA 2002. Experimental models of *Schistosoma mansoni* infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **97**, 917-940.
18. COELHO PM, DE MELLO RT, GERKEN SE. 1993. *Schistosoma mansoni*: evaluation of the activity of oxamniquine on schistosomules, at 24 hours after infection. *Rev Inst Med Trop São Paulo* **35**: 557-561.
19. COELHO PMZ, TOPPA NH, FELDMANN JS, GONÇALVES R, MELLO RT. 1996. *Schistosoma mansoni*: permanence of modulation of the granulomatous inflammatory response in mice cured in the chronic phase. *Int. J. Parasitol.* **26**:1393-1395.
20. COIMBRA ES, GONÇALVES DA COSTA SC, CORTE-REAL S, FREITAS FGR, DURÃO A, SOUZA CSF, SILVA SANTOS MI, VASCONCELOS EG 2002. Characterization and cytochemical localization of an ATP diphosphohydrolase from *Leishmania amazonensis* promastigote. *Parasitology* **124**: 137-143.
21. COIMBRA ES, GONÇALVES DA COSTA SC, COSTA BLS, GIAROLA NLL, SOARES FAR, FESSEL MR, FERREIRA AP, SOUZA CSF, ABREU-SILVA AL, VASCONCELOS EG 2008. A *Leishmania* (L.) *amazonensis* ATP diphosphohydrolase isoform and potato apyrase share epitopes: antigenicity and correlation with disease progression. *Parasitology* **135**, 327-335.
22. COLLEY DG, COOK JA, FREEMAN GL, BARTHOLOMEW RK, JORDAN P 1977. Immune responses during human schistosomiasis mansoni. *In vitro* lymphocyte blastogenic responses to heterogeneous antigenic preparations

from schistosome eggs worms and cercariae. *International Archives of Allergy and Applied Immunology* **53**: 420-443.

23. COMIN F, SPEZIALI E, CORREA-OLIVEIRA R, FARIA AM 2008. Aging and immune response in chronic human schistosomiasis. *Acta Trop.* May 18. [Epub ahead of print]
24. CORRÊA-OLIVEIRA R, CALDAS IR, GAZZINELLI G 2000a. Natural versus Drug-induced Resistance in *Schistosoma mansoni* Infection. *Parasitol Today* **16**: 397-399.
25. CORRÊA-OLIVEIRA R, CALDAS IR, MARTINS-FILHO O, QUEIROZ CC, LAMBERTUCCI JR, CUNHA-MELO JR, SILVEIRA AS, PRATA A, WILSON A, GAZZINELLI G 2000b. Analysis of the effects of treatment of human *Schistosoma mansoni* infection on the immune response of patients from endemic areas. *Acta Trop* **77**:141-146.
26. CORREA-OLIVEIRA R, GOLGHER DB, OLIVEIRA GC, CARVALHO OS, MASSARA CL, CALDAS IR, COLLEY DG, GAZZINELLI G. 2002. Infection with *Schistosoma mansoni* correlates with altered immune responses to *Ascaris lumbricoides* and hookworm. *Acta Trop* **8**: 123-132.
27. COURA JR, AMARAL RS 2004. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **99**:13-9.
28. DA SILVA RM, KANAMURA HY, CAMARGO ED, CHIODELLI SG, NAKAMURA PM, GARGIONI C, VELLOSA SA, ANTUNES JL 1998. A comparative study on IgG-ELISA, IgM-IFT and Kato-Katz methods for epidemiological purposes in a low endemic area for schistosomiasis *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **93**:279-82.
29. DE AGUIAR MATOS JA, BORGES FP, TASCA T, BOGO MR, DE CARLI GA, FAUTH MG, DIAS RD, BONAN CD 2001. Characterisation of an ATP diphosphohydrolase (Apyrase, EC 3.6.1.5) activity in *Trichomonas vaginalis*. *Int. J. Parasitol.* **31**: 770-775.

30. DE FARIAS LM, RESENDES AP, SABROZA PC, SOUZA-SANTOS R 2007. Preliminary analysis of the Information System in the Brazilian Schistosomiasis Control Program, 1999-2003. *Cad Saude Publica* **23(1)**:235-239.
31. DEMARCO R, KOWALTOWSKI AT, MORTARA RA, VERJOVSKI-ALMEIDA S 2003. Molecular and characterization of *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **307**: 831-838.
32. DEMEURE CE, RIHET P, ABEL L, OUATTARA M, BOURGOIS A, DESSEIN AJ 1993. Resistance to *Schistosoma mansoni* in humans: influence of the IgE/IgG4 balance and IgG2 in immunity to reinfection after chemotherapy. *J Infect Dis* **168(4)**:1000-8.
33. DUNNE DW & COOKE A 2005. A worm's eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* **5**: 420-426.
34. DUNNE DW, BUTTERWORTH AE, FULFORD AJC, KARIUKI HC, LANGLEY JG, OUMA JH, CAPRON A, PIERCE RJ, SURROCK RF 1992. Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection. *Eur J Immunol* **22**: 1483-1494.
35. ENK MJ, KATZ N, COELHO PMZ 2008. A case of *Schistosoma mansoni* infection treated during the prepatent period. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* **5**: 112-115
36. EVENGARD B, HAMMARSTROM L, SMITH CIE, LINDER E 1990. Early antibody response in human schistosomiasis. *Clin Exp Immunol* **80**: 69-76.
37. FARIA-PINTO P, MEIRELLES MNL, LENZI HL, MOTA EM, PENIDO MLO, COELHO PMZ & VASCONCELOS EG 2004. ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni* egg: characterization of a new antigen. *Parasitology* **129**: 51-57.

38. FARIA-PINTO P, MEIRELLES MNL, LENZI HL, MOTA EM, PENIDO MLO, COELHO PMZ & VASCONCELOS EG 2006. Cross-immunoreactivity between anti-potato apyrase antibodies and mammalian ATP diphosphohydrolases: potential use of the vegetal protein in experimental schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **101**: 359-363.
39. FELDMEIER H, POGGENSEE G, KRANTZ I 1993. A synoptic inventory of needs for research on women and tropical parasitic diseases. II. Gender-related biases in the diagnosis and morbidity assessment of schistosomiasis in women. *Acta Trop.* **55(3)**:139-69.
40. FERREIRA AP, FAQUIM ES, ABRAHAMSOHN IA AND MACEDO MS 1995. Immunization with *Ascaris suum* extract impairs T cell functions in mice. *Cellular Immunology* **162**, 202-210.
41. FIETTO JL, DeMARCO R, NASCIMENTO IP, CASTRO IM, CARVALHO TM, DE SOUZA W, BAHIA MT, ALVES MJ & VERJOVSKI-ALMEIDA S 2004. Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun* **316**: 454-460.
42. FITZSIMMONS CM, STEWART TJ, HOFFMANN KF, GROGAN JL, YAZDANBAKHS M, DUNNE DW. 2004. Human IgE response to the *Schistosoma haematobium* 22.6 kDa antigen. *Parasite Immunol.* **26**:371-376.
43. FLEMING FM, BOOKER S, GEIGER SM, CALDAS IR, CORREA-OLIVEIRA R, HOTEZ PJ, BETHONY M. (2006. Synergistic associations between hookworm and other helminth species in a rural community in Brazil. *Trop Med Int Health*, **2**: 56-64.
44. FONSECA CT, BRITO CF, ALVES JB, OLIVEIRA SC 2004. IL-12 enhances protective immunity in mice engendered by immunization with recombinant 14 kDa *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding proteins through an IFN-gamma and TNF-alpha dependent pathway. *Vaccine* **22(3-4)**:503-10.
45. FOSTER JM, JOHNSTON DA 2002. Helminth genomics: from gene discovery to genome sequencing. *Trends in Parasitol* **18**: 241-242.

46. GANLEY-LEAL LM, GUARNER J, TODD CW, DA'DARA AA, FREEMAN GL JR, BOYER AE, HARN DA, SECOR WE 2005. Comparison of *Schistosoma mansoni* irradiated cercariae and Sm23 DNA vaccines. *Parasite Immunol* **27(9)**:341-9.
47. GENDRON FP, BENREZZAK O, KRUGH BW, KONG Q, WEISMAN GA & BEAUDOIN AR 2002. Purine signaling and potential new therapeutic approach: possible outcomes of NTPDase inhibition. *Curr Drug Targets* **3**: 229-245.
48. GOMES JAS, BAHIA-OLIVEIRA LMG, ROCHA MOC, BUSEK SCU, TEIXEIRA MM, SILVA JS, CORREA-OLIVEIRA R 2005. Type 1 chemokine receptor expression in Chaga's disease correlates with morbidity in cardiac patients. *Infect Immun* **73**: 7960-7966.
49. GRYSEELS B, POLMAN K, CLERINX J, KESTENS L 2006. Human schistosomiasis. *Lancet* **368**(9541):1106-18.
50. GUEX N & PEITSCH MC 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**: 2714-2723.
51. HAGAN P AND ABATH FG 1992. Recent advances in immunity to human schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **4**: 95-98.
52. HAISCH K, SCHRAMM G, FALCONE FH, ALEXANDER C, SCHLAAK M, HAAS H 2001. A glycoprotein from *Schistosoma mansoni* eggs binds non-antigen-specific immunoglobulin E and releases interleukin-4 from human basophils. *Parasite Immunol* **23(8)**:427-34.
53. HANDA M & GUIDOTTI G 1996. Purification and cloning of soluble ATP diphosphohydrolase (apyrase) from potato tuber (*Solanum tuberosum*). *Biochem Biophys Res Commun* **218**: 916-923.
54. HARLOW E & LANE D 1988. Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

55. HOFFMANN KF, JAMES SL., CHEEVER AW AND WYNN TA 1999. Studies with double cytokine-deficient mice reveal that highly polarized Th1- and Th2-type cytokine and antibody responses contribute equally to vaccine-induced immunity to *Schistosoma mansoni*. *Journal of Immunology* **163**: 927-938.
56. JAMES SL, CHEEVER AW, CASPAR P AND WYNN TA 1998. Inducible nitric oxide synthase-deficient mice develop enhanced type 1 cytokine-associated cellular and humoral immune responses after vaccination with attenuated *Schistosoma mansoni* cercariae but display partially reduced resistance. *Infection and Immunity* **66**: 3510-3518.
57. JENKINS SJ, HEWITSON JP, JENKINS GR AND MOUNTFORD AP 2005. Modulation of the host's immune response by schistosome larvae. *Parasite Immunology* **27**: 385-393.
58. JOHNSON MS, BROADY KW, JOHNSON AM 1999. Differential recognition of *Toxoplasma gondii* recombinant nucleoside triphosphate hydrolase isoforms by naturally infected human sera. *Int J Parasitol* **29**:1893-1905.
59. KACZMAREK E, KOZIAK K, SÉVIGNY J, SIEGEL JB, ANRATHER J, BEAUDOIN AR, BACH FH, ROBSON SC 1996. Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase. *J Biol Chem*. **271(51)**:33116-33122.
60. KEDZIERSKI L ZHU Y & HANDMAN E 2006. *Leishmania* vaccines: progress and problems. *Parasitology* **133**: S87-S112.
61. KETTLUN AM, URRRA R, LEYTON M, VALENZUELA MA, MANCILLA M AND TRAVERSO-CORI A 1992b. Purification and characterization of two isoapyrases from *Solanum tuberosum* var. Ultimeus. *Phytochemistry* **31**: 3691-3696.
62. KETTLUN AM, ESPINOSA V, GARCIA L, VALENZUELA MA 2005. Potato tuber isoapyrases: substrate specificity, affinity labeling, and proteolytic susceptibility. *Phytochemistry* **66**, 975-982.

63. KETTLUN AM, LEYTON M, VALENZUELA MA, MANCILLA M, TRAVERSO-CORI A 1992a. Identification and subcellular localization of two isoenzymes of apyrase from *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry* **31**, 1889-1894.
64. KETTLUN AM, URIBE L, CALVO V, SILVA S, RIVERA J, MANCILLA M, VALENZUELA MA, TRAVERSO-CORI A 1982. Properties of two apyrases from *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry* **21**, 551-558.
65. KHALIFE J, CAPRON M, CAPRON A, GRZYCH JM, BUTTERWORTH AE, DUNNE DW, OUMA JH 1986. Immunity in human schistosomiasis mansoni. Regulation of protective immune mechanisms by IgM blocking antibodies. *J Exp Med* **164(5)**:1626-40.
66. KHALIFE J, DUNNE DW, RICHARDSON BA, MAZZA G, THORNE KJ, CAPRON A, BUTTERWORTH AE 1989. Functional role of human IgG subclasses in eosinophil-mediated killing of schistosomes of *Schistosoma mansoni*. *J Immunol* **142(12)**:4422-7.
67. KOYAMADA N, MIYATAKE T, CANDINAS D, HECHENLEITNER P, SIEGEL J, HANCOCK WW, BACH FH, ROBSON SC 1996. Apyrase administration prolongs discordant xenograft survival. *Transplantation* **62**, 1739-1743.
68. KUSEL JR, AL-ADHAM BH, DOENHOFF MJ .2007. The schistosome in the mammalian host understanding the mechanisms of adaptation. *Parasitology* **134**, 1477-1526.
69. LAEMMLI UK 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophages T4. *Nature (London)* **227**: 680-685.
70. LANGSTON HP, KE Y, GEWIRTZ AT, DOMBROWSKI KE, KAPP JA 2003. Secretion of IL-2 and IFN-gamma, but not IL-4, by antigen-specific T cells requires extracellular ATP. *J Immunol* **170(6)**:2962-70.

71. LASKOWSKI R, MACARTHUR M, MOSS D & THORNTON J 1993. PROCHECK: a program to check stereochemical quality of protein structures. *J Appl Crystallogr* **26**: 283–290.
72. LEE JC, LEE KY, SON YO, CHOI KC, KIM J, KIM SH, CHUNG GH, JANG YS 2007. Stimulating effects on mouse splenocytes of glycoproteins from the herbal medicine *Atractylodes macrocephala* Koidz. *Phytomedicine* **14**, 390-395.
73. LEENSTRA T, ACOSTA LP, WU HW, LANGDON GC, SOLOMON JS, MANALO DL, SU L, JIZ M, JARILLA B, PABLO AO, MCGARVEY ST, OLVEDA RM, FRIEDMAN JF, KURTIS JD 2006. T-helper-2 cytokine responses to Sj97 predict resistance to reinfection with *Schistosoma japonicum*. *Infection and Immunity* **74**, 370-381.
74. LENZI HL, KIMMEL E, SCHECHTMAN H, PELAJO-MACHADO M, ROMANHA WS, PACHECO R, MARIANO M, LENZI JA 1998. Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biomechanical approaches. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **93**, 141-151.
75. LEVANO-GARCIA J 2008. Caracterização bioquímica e imunológica das enzimas recombinantes ATP difosfohidrolases 1 e 2 do parasita *Schistosoma mansoni*. Tese de Mestrado defendida no Instituto de Química da Universidade de São Paulo – 107 páginas.
76. LEVANO-GARCIA J, MORTARA RA, VERJOVSKI-ALMEIDA S & DEMARCO R 2007. Characterization of *Schistosoma mansoni* ATPDase2 gene, a novel apyrase family member. *Biochem Biophys Res Commun* **352**: 384-389.
77. LOUKAS A, TRAN M, PEARSON MS. 2007. Schistosome membrane proteins as vaccines. *Int. J. Parasitol.* **37**:257-263.

78. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL AND RANDALL, RJ 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
79. MANCILLA M, KETTLUN AM, VALENZUELA MA, TRAVERSO-CORI A 1984. Structural studies of two apyrases from *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry* **23**, 1397-1400.
80. MARCUS AJ, SAFIER LB 1993. Thromboregulation: multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. *The FASEB Journal* **7**, 516-522.
81. MARQUES MJ, VOLPINI AC, GENARO O, MAYRINK W, ROMANHA AJ 2001. Simple form of clinical sample preservation and Leishmania DNA extraction from human lesions for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis via polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* **65(6)**:902-6.
82. MASSARA CL, AMARAL GL, CALDEIRA RL, ENK MJ, CARVALHO OS 2008. Esquistossomose em área de ecoturismo do Estado de Minas Gerais, Brasil. *Cad. Saúde Pública.* **24**:1709-1712.
83. MORRONE FB, OLIVEIRA DL, GAMERMANN P, STELLA J, WOFCHUK S, WINK MR, MEURER L, EDELWEISS MIA, LENZ G, BATTASTINI AMO 2006. *In vivo* glioblastoma growth is reduced by apyrase activity in a rat glioma model. *BMC Cancer* **6**, 226.
84. MOUNTFORD AP, FISHER A AND WILSON RA 1994. The profile of IgG1 and IgG2a antibody responses in mice exposed to *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunology* **16**: 521-527.
85. MUTAPI F 2001. Heterogeneities in anti-schistosome humoral responses following chemotherapy. *Trends Parasitol* **17**: 518-524.
86. MUTAPI F, MDULUZA T, RODDAM AW 2005. Cluster analysis of schistosome-specific antibody responses partitions the population into distinct epidemiological groups. *Immunol Lett* **96(2)**:231-40.

87. NAUS CW, VAN REMOORTERE A, OUMA JH, KIMANI G, DUNNE DW, KAMERLING JP, DEELDER AM, HOKKE CH 2003. Specific antibody responses to three schistosome-related carbohydrate structures in recently exposed immigrants and established residents in an area of *Schistosoma mansoni* endemicity. *Infect Immun* **71(10)**:5676-81.
88. NEVES DP, DE MELO AL, LINARDI PM, VITOR RWA 2005. *Parasitologia Humana*. 11 ed. Editora Atheneu. São Paulo. Cap. 22.
89. NOYA BA, COLMENARES C, LANZ H, CARACCILO MA, LOSADA S, NOYA O 2000. *Schistosoma mansoni*: immunodiagnosis is improved by sodium metaperiodate which reduces cross-reactivity due to glycosylated epitopes of soluble egg antigen. *Exp Parasitol* **95**: 106-112.
90. NOYA O, DE NOYA BA, BALLÉN D, ZERPA N, COLMENARES C, LOSADA S, BERMÚDEZ H 1998. Use of synthetic peptides derived from adult worm proteins of *Schistosoma mansoni*, in the diagnosis of schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. **93**:157-8.
91. OLIVEIRA SC, FONSECA CT, CARDOSO FC, FARIAS LP, LEITE LC 2008. Recent advances in vaccine research against schistosomiasis in Brazil. *Acta Trop*. Jun 5. [Epub ahead of print].
92. PEARCE EJ, MACDONALD AS 2002. The immunobiology of schistosomiasis. *Nature Immunol*. **2**, 499-511.
93. PELLEGRINO J & SIQUEIRA AF 1956. A perfusion technic for recovery of *Schistosoma mansoni* from experimentally infected guinea pigs. *Rev Bras Malariol Doencas Trop*. **8(4)**:589-97.
94. PENIDO MLO, NELSON DL, VIEIRA LQ, COELHO PMZ 1994. Schistosomicidal activity of alkylaminoethanethiosulphuric acids. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **89**:595-602.
95. PENIDO MLO, RESENDE DM, VIANELLO MA, BORDIN FHS, JACINTO AA, DIAS WD, MONTESANO MA, NELSON DL, COELHO PMZ & VASCONCELOS EG 2007. A new series of schistosomicide drugs, the

alkylaminoalkanethiosulfuric acids, partially inhibit the activity of *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase. *Eur J Pharmacol* **570**: 10-17.

96. QUINNELL RJ, PRITCHARD DI, RAIK, A, BROWN AP, SHAW, MA
Immune responses in human necatoriasis: association between interleukin-5 responses and resistance to reinfection. *Journal of Infectious Diseases* **190**:430-438.
97. REQUENA JM, ALONSO C & SOTO M 2000. Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during Leishmania infections. *Parasitol Today* **16**: 246-250.
98. REY L 2001. Um século de experiência no controle da ancilostomíase. *Rev. Soc. Bras. Med. Tropical*, **34**:61-67.
99. REZENDE-SOARES FA 2007. ATP difosfohidrolase de promastigotas de *Leishmanis (Viannia) braziliensis*: caracterização e análise dos domínios compartilhados com a apirase de batata de *Solanum tuberosum*. Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).
100. RIBEIRO-DOS-SANTOS G, VERJOVSKI-ALMEIDA S, LEITE LCC 2006. Schistosomiasis-a century searching for chemotherapeutic drugs. *Parasitol. Res.* **99**: 505-521.
101. ROBSON SC, SEVIGNY J, ZIMMERMANN H 2006. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signalling* **2**, 409-430.
102. ROSS AG, VICKERS D, OLDS GR, SHAH SM, MCMANUS DP 2008. Katayama syndrome. Comment in: *Lancet Infect Dis.* **8(1)**: 9-10.

103. SAHA S & RAGHAVA GP 2006. Prediction of continuous B cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. *Proteins* **65**: 40-48.
104. SALI A & BLUNDELL TL 1993. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* **234**: 779-815.
105. SANCHEZ R & SALI A 1997. Evaluation of comparative protein structure modeling by MODELLER-3. *Proteins* **1**: 50-58.
106. SATTI MZ, CAHEN P, SKOV PS, JOSEPH S, JONES FM, FITZSIMMONS C, HOFFMANN KF, REIMERT C, KARIUKI HC, KAZIBWE F, MWATHA JK, KIMANI G, VENNERVALD BJ, OUMA JH, KABATEREINE NB, DUNNE DW 2004. Changes in IgE- and antigen-dependent histamine-release in peripheral blood of *Schistosoma mansoni*-infected Ugandan fishermen after treatment with praziquantel. *BMC Immunol* **5(1)**:6.
107. SCHRAMM G, FALCONE FH, GRONOW A, HAISCH K, MAMAT U, DOENHOFF MJ, OLIVEIRA G, GALLE J, DAHINDEN CA, HAAS H 2003. Molecular characterization of an interleukin-4-inducing factor from *Schistosoma mansoni* eggs. *J Biol Chem.* **16**;278(20):18384-92.
108. SCHRAMM G, MOHRS K, WODRICH M, DOENHOFF MJ, PEARCE EJ, HAAS H, MOHRS M 2007. Cutting edge: IPSE/alpha-1, a glycoprotein from *Schistosoma mansoni* eggs, induces IgE-dependent, antigen-independent IL-4 production by murine basophils in vivo. *J Immunol.* **78**(10):6023-7.
109. SILVEIRA AM, BETHONY J, GAZZINELLI A, KLOOS H, FRAGA LA, ALVARES MC, PRATA A, GUERRA HL, LOVERDE PT, CORREA-OLIVEIRA R, GAZZINELLI G 2002. High levels of IgG4 to *Schistosoma*

mansoni egg antigens in individuals with periportal fibrosis. *Am J Trop Med Hyg* **66**(5):542-9.

110. SINGH H & RAGHAVA GP 2001. Proped: prediction of HLA-DR binding sites. *Bioinformatics* **17**: 1236-1237.
111. SIPPL MJ (1993) Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Proteins* **17**: 355–362.
112. SPELMAN K, BURNS JJ, NICHOLS D, WINTERS N, OTTERSBERG S, STENBORG M 2006. Modulation of cytokine expression by traditional medicines: a review of herbal immunomodulators. *Alternative Medicine Review* **11**, 128-150
113. STADECKER MJ, ASahi H, FINGER E, HERNANDEZ HJ, RUTIZKY LI, SUN J. 2004. The immunobiology of Th1 polarization in high-pathology schistosomiasis. *Immunol Rev* **201**:168-179.
114. STADECKER MJ, HERNANDEZ HJ, ASahi H 2001. The identification and characterization of new immunogenic egg components: implications for evaluation and control of the immunopathogenic T cell response in schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. **96**:29-33.
115. TASCA T, BONAN CD, DE CARLI GA & SARKIS JJ 2004. *Trichomonas vaginalis*: cytochemical localization of a NTPDase1 and an ecto-5'-nucleotidase and effects of adenine nucleotides on cellular viability. *Parasitol Res* **93**: 300-303.
116. TAUSSKY HM & SHORR E 1953. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J Biol Chem* **202**: 675-685.
117. TORRES CR, VASCONCELOS EG, FERREIRA ST, VERJOVSKI-ALMEIDA S 1998. Divalent cation dependence and inhibition of

Schistosoma mansoni ATP diphosphohydrolase by fluorosulfonylbenzoyl adenosine. *Eur J Biochem* **251**:516-21.

118. TRAN MH, PEARSON MS, BETHONY JM, SMYTH DJ, JONES MK, DUKE M, DON TA, MCMANUS DP, CORREA-OLIVEIRA R, LOUKAS A 2006. Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis. *Nat Med* **12(7)**:835-40.
119. TRAVERSO-CORI A, CHAIMOVICH H & CORI O 1965. Different molecular forms of potato apyrase. *Arch Biochem Biophys* **137**:133-142.
120. VASCONCELOS EG, FERREIRA ST, CARVALHO TMU, SOUZA W, KETTLUN AM, MANCILLA M, VALENZUELA MA & VERJOVSKI-ALMEIDA S 1996. Partial purification and immunohistochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni*. Immunological cross-reactivities with potato apyrase and *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase. *J Biol Chem* **271**: 22139-22145.
121. VASCONCELOS EG, NASCIMENTO PS, MEIRELLES MNL, VERJOVSKI-ALMEIDA S, FERREIRA ST 1993) Characterization and localization of an ATP-diphosphohydrolase on the external surface of the tegument of *Schistosoma mansoni*. *Molecular and biochemical parasitology* **58**, 205-214.
122. VASCONCELOS EG, TORRES, CR, MARTINS SM, VERJOVSKI-ALMEIDA S AND FERREIRA ST 1997. "The ATP-diphosphohydrolase of *Schistosoma mansoni*: Ecto-localization and possible roles in host-parasite interactions" In "Ecto-ATPases", (L. Plesner, T.L. Kirley, and A.F. Knowles, eds). *Plenum Publishing Corp.*, 221-226.
123. VEREECKEN K, NAUS CW, POLMAN K, SCOTT JT, DIOP M, GRYSEELS B, KESTENS L 2007. Associations between specific antibody responses and resistance to reinfection in a Senegalese population recently exposed to *Schistosoma mansoni*. *Trop Med Int Health* **12(3)**:431-44.
124. VERJOVSKI-ALMEIDA S, DeMARCO R, MARYNS EAL *et al.* 2003. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. *Nature Genetics* **35**: 148-157.

125. VIANA IRC 1997. Imunidade a esquistossomose mansoni em indivíduos residentes em área endêmica: relação entre resistência a infecção e respostas celular e humoral. Tese apresentada para obtenção de grau de Doutor, apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
126. WILLIAMS DL, ASAHI H, BOTKIN DJ, STADECKER MJ 2001. Schistosome infection stimulates host CD4(+) T helper cell and B-cell responses against a novel egg antigen, thioredoxin peroxidase. *Infect Immun.* **69(2)**:1134-41.
127. WUHRER M, DENNIS RD, DOENHOFF MJ, GEYER R 2000. A fucose-containing epitope is shared by keyhole limpet haemocyanin and *Schistosoma mansoni* glycosphingolipids. *Mol Biochem Parasitol.* **110(2)**:237-46.
128. YANG J, ZHAO J, YANG Y, ZHANG L, YANG X, ZHU X, JI M, SUN N, SU C 2007. *Schistosoma japonicum* egg antigens stimulate CD4⁺CD25⁺ T cells and modulate airway inflammation in a murine model of asthma. *Immunology* **120**, 8-18.
129. YI XY, SIMPSON AJ, ROSSI R, SMITHERS SR 1986. The presence of antibody in mice chronically infected with *Schistosoma mansoni* which blocks *in vitro* killing of schistosomula. *J Immunol* **137**:3955-58.
130. ZOUAIN CS, GUSTAVSON S, OLIVEIRA SC, AZEVEDO V, ALVES JB AND GOES AM 2001. The role of IL-10 and IgG1 in the protection and granulomatous response in *Schistosoma mansoni* P24-immunized mice. *Vaccine* **19**:1218-1224.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.