

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA**

**RENATA RUSSO FRASCA CANDIDO**

**AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DA SUPERFÍCIE DO OVO DE  
*Schistosoma mansoni* Sambon, 1907**

**PORTO ALEGRE – RS – BRASIL**

**2010**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**RENATA RUSSO FRASCA CANDIDO**

**AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DA SUPERFÍCIE DO OVO DE  
*Schistosoma mansoni* SAMBON, 1907**

**Dissertação apresentada como requisito  
para obtenção do grau de Mestre pelo  
Programa de Pós-graduação da Faculdade  
de Biociências da Pontifícia Universidade  
Católica do Rio Grande do Sul.**

**Orientador: Dr. Carlos Graeff-Teixeira**

**PORTO ALEGRE – RS – BRASIL**

**2010**

**RENATA RUSSO FRASCA CANDIDO**

**AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DA SUPERFÍCIE DO OVO DE  
*Schistosoma mansoni* SAMBON, 1907**

**Dissertação apresentada como requisito  
para obtenção do grau de Mestre pelo  
Programa de Pós-graduação da Faculdade  
de Biociências da Pontifícia Universidade  
Católica do Rio Grande do Sul.**

**BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Dr. Pedro Paulo Chieffi – USP**

**Dra. Graziela Maria Zanini – FIOCRUZ**

**Dr. José Roberto Machado e Silva - UERJ**

Em memória a um grande herói que dedicou a maior parte de sua vida para a minha criação e formação, tornando possível a realização de um sonho, Renato Frasca Candido; Maria Rita Russo Frasca Candido, mulher, esposa e mãe guerreira que a cada dia faz da minha vida uma jornada incrível; Cristiano Wolf, meu grande amor, companheiro e amigo, e Dunga, meu cachorro gente eu dedico.

## AGRADECIMENTOS

São poucos os momentos na vida que temos a oportunidade de agradecer a todos que fizeram diferença ao longo da nossa trajetória. É com imenso prazer e grande satisfação que aproveito esta chance para agradecer do fundo do meu coração a todas as pessoas que me ajudaram ou colaboraram de alguma forma para eu pudesse concluir mais esta etapa.

Aos meus colegas do Laboratório de Parasitologia Alessandra Morassutti, prof. Ana Cristina Arámburu da Silva, Bárbara Rodrigues, Camila Krug, Candida Fagundes Teixeira, Carolina Veríssimo, Cristiane Franceschina, Joana Borges, Letícia Fonseca, Mariana Teixeira, Rafael Maurer, Raquel Ramos, Renata Ben e Thaís Pereira, por toda ajuda, paciência e amizade.

Aos técnicos de laboratório Juliano Romanzini e Priscila Pedersen por todo apoio técnico, colaboração e amizade.

Ao grupo do Laboratório de Imunologia do IPB da PUCRS.

Aos técnicos Tiago Giuliani, do Laboratório de Anatomia Patológica e Daniel Marinowic, do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do HSL da PUCRS, pela ajuda nos experimentos.

Aos camundongos que deram a vida para que este experimento fosse realizado.

A uma grande amiga que admiro tanto, prof. Dra. Betina Blochtein, que desde que ingressei na faculdade sempre me deu suporte, me apoiou e acreditou em mim.

Ao prof. Dr. Júlio César Bicca-Marques, também um grande amigo que sempre me deixava “invadir” sua sala para bater papo (fala pelos cotovelos!) e por estar sempre disposto a me ouvir e me ajudar.

A todos os professores que contribuíram para a conclusão deste trabalho e também pela minha formação acadêmica, mas especialmente: Arno A Lise, Gervásio S Carvalho, Roberto E dos Reis, Guendalina T Oliveira, Eduardo Eizirik, Cláudio A Mondim, Maria R Conter, Beatriz G Menegotto, Cláudia L Dornelles, Nelson F Fontoura e Tabajara K Moreira.

Aos colegas do curso de pós-graduação que se tornaram amigos no decorrer do meu mestrado: Cristiano Minuzzo Marin, Lucas Gonçalves da Silva, Tanilene Sotero Pinto, Tatiana Guterres Kaehler e Elenara Vêras.

Às secretárias do curso de pós-graduação Maria Luiza Moreira e Josilene Rocha que sempre foram prestativas e muito queridas.

Aos meus grandes amigos de infância que são parte importante da minha vida: Vico, Ramiro, Guto, Guilherme e Ema; e Ronaldo, também um grande amigo.

À minha tia Miryam, meus primos Mauro e Marcos, que sempre apostaram na minha capacidade e acreditaram no meu potencial, sem sua ajuda muito do que alcancei não seria possível.

Aos meus tios Hélio e Clair, meus primos Cláudio, Luciano e Lucas; que também tanto me ajudaram e colaboraram na busca deste sonho.

Aos amigos Daniel Barth Segalla e Luciana Dulinski pelo apoio e amizade.

À Juliana Valim Demoliner que está sempre presente no meu coração.

Aos amigos Wilson Muller; Rosângela Valiente Umann e Leonidia Signorini; Rosane e Genésio Mengue; Figueiró; Juliana Wingert e Ana Carolina Anés; Cláudia, Simon e pequeninos; Elaine, Edécio e princesinhas: obrigada por serem tão especiais e compartilharem este momento comigo.

Às minhas tias do coração Sônia Rosenhain Wolf e Vera Lidia Wolf, que amo tanto: vocês são exemplos de vida para mim e contribuíram imensamente nesta jornada.

Aos amigos João Carpes, Sabrina Monteiro e Rodrigo pela amizade e apoio.

À Lucimere Hilgert Weber, por todo carinho, amizade e ajuda nos meus piores momentos, mas também pela presença nos bons.

À Arianne Amanda Weidmann, por ser sempre tão amiga e leal, me escutar e me apoiar nas horas que mais necessito de um ombro.

À minha família que mora em São Paulo que eu amo muito: tia Angela, minha madrinha que está sempre torcendo por mim; vô Angelo, que fez parte de toda a minha infância e adolescência e sempre foi como um pai para mim; vó Cida, que também como uma mãe, me criou e me ensinou muitos dos valores que hoje trago comigo; Rafael e Maurício, meus primos amados que são como irmãos.

À minha nova família Christopher Wolf, o guri mais lindo do planeta; Eduarda Wolf, a menininha mais linda e companheira do planeta; Zilma Tereza dos Santos, a melhor sogra do planeta e Erick dos Santos, o melhor cunhado do planeta; grandes amigos e companheiros, adoro ter vocês sempre tão presentes.

Aos meus cachorros Dunga, Kiki, Preta, Maria Cuja, Meg, Cébera e Vivi; minha gatinha Branquinha; meus outros gatos: Amarelo, Negrinho, Cinzinha e Negrona; meu coelho Tonha; meus ratos Toquinho, Tinoca, Pafúncio, Furdúncio e Tibúrcio.

Ao meu orientador Dr. Carlos Graeff-Teixeira pela oportunidade de realizar este trabalho, pela paciência e dedicação, mas principalmente pela confiança a mim depositada: *“Àquele que quando deveria ser simplesmente professor, foi mestre, transmitindo seus conhecimentos e experiências; que quando deveria ser mestre foi amigo, e em sua amizade me compreendeu e me incentivou a seguir meu caminho, expresse meu maior agradecimento e profundo respeito, que sempre será pouco diante do muito que foi oferecido.”* (autor desconhecido)

Ao meu grande amor Cristiano Wolf, com certeza a minha maior conquista, com quem compartilho meus sonhos, meus medos, meus erros, minha vida. A cada dia que passa sou mais apaixonada e feliz por você me amar desse jeito tão especial e único. Te amo com todo o meu coração.

E finalmente aos meus pais Renato Frasca Candido e Maria Rita Russo Frasca Candido por toda paciência, carinho, amor, dedicação, tolerância, paixão e por todo sacrifício para investir na minha educação. Vocês sempre estiveram ao meu lado nas horas que chorei e que sorri e por sempre estarem tão presentes na minha vida, aqui presto uma homenagem:

*Cisne*

*A vida, manso lago azul algumas  
Vezes, algumas vezes mar fremente,  
Tem sido para nós constantemente  
Um lago azul sem ondas, sem espumas,  
Sobre ele, quando, desfazendo as brumas  
Matinais, rompe um sol vermelho e quente,  
Nós dois vagamos indolentemente,  
Como dois cisnes de alvacentas plumas.  
Um dia um cisne morrerá, por certo:  
Quando chegar esse momento incerto,  
No lago, onde talvez a água se tisque,  
Que o cisne vivo, cheio de saudade,  
Nunca mais cante, nem sozinho nade,  
Nem nade nunca ao lado de outro cisne!*

*Júlio Salusse  
1872 - 1948*



## RESUMO

A esquistossomose mansônica é uma infecção parasitária crônica endêmica que ocorre em países na África, América do Sul, no Caribe e no Mediterrâneo Oriental. A principal patologia é o granuloma, uma resposta imune contra os antígenos secretados pelos ovos do parasito principalmente no fígado e intestinos. Estes antígenos estão crucialmente envolvidos na modulação das respostas imunológica celular e humoral do hospedeiro e podem estar envolvidos na estratégia de passagem do ovo através da mucosa intestinal. Este trabalho teve origem nos resultados de um experimento realizado por Candida Fagundes Teixeira do Grupo de Parasitologia Biomédica da PUCRS, cujas tentativas de se obter anticorpos do ovo que interagissem com partículas paramagnéticas, revelaram alguma dificuldade em obter níveis elevados de anticorpos contra a superfície do ovo. O objetivo principal do presente trabalho foi verificar a produção de anticorpos contra a superfície do ovo de *Schistosoma mansoni*. O *S. mansoni*, isolado Esteio, foi mantido em laboratório através de passagens em *Biomphalaria glabrata* e camundongos da cepa *Swiss*. Os vermes foram recuperados, lavados com tampão e utilizados para a produção de antígeno solúvel de membrana de vermes adultos. Os ovos foram coletados de fezes humanas infectadas e utilizados para a imunização de camundongos e produção de antígenos secretados pelo ovo (SEA). Os grupos experimentais foram divididos em 4 grupos com 6 camundongos cada, da seguinte forma: grupo 1 imunizado com solução salina 0,9%; grupo 2 imunizado com ovos sonicados e adjuvante; grupo 3 imunizado com ovos sonicados sem adjuvante e grupo 4 imunizado com ovos inteiros. Através da técnica de ELISA e imunofluorescência indireta foi verificada reatividade na imunização com ovos sonicados, e não foi verificada reatividade na imunização com ovos inteiros. A abordagem sistêmica e complexa da interação parasito-hospedeiro é uma proposta interessante de estudo e permanece aberta para futuras investigações que poderão auxiliar na compreensão e tratamento da patogenia.

Palavras-chave: esquistossomose mansônica; antígenos do ovo; resposta imunológica.

## ABSTRACT

Schistosomiasis mansoni is an endemic chronic parasitic infection that occurs in countries in Africa, South America, the Caribbean and the eastern Mediterranean. The main pathology is the granuloma, an immune response against the antigens secreted by the parasite eggs primarily in the liver and intestines. Those antigens are crucially involved in the modulation of the humoral and cellular immunological responses of the host and may be involved in the strategy of the egg passage through intestinal mucosal. This work had its origin in the results of an experiment realized by Candida Fagundes Teixeira of the PUCRS Biomedical Parasitology Group, which the attempts to obtain egg antibodies that could make interaction with paramagnetic particles revealed some difficulty in obtaining high levels of antibodies against the egg surface. The main goal of the present work was to verify the production of antibodies against the egg surface of *Schistosoma mansoni*. *S. mansoni*, Esteio isolated, was maintained in laboratory through passages in *Biomphalaria glabrata* and Swiss strain mice. The worms were recovered, washed in buffer and used for production of adults worm soluble membrane antigens. The eggs were collected from human infected feces and used for mice immunization and production of secreted egg antigens (SEA). The experimental groups were separated in 4 groups with 6 mice each, as follow: group 1 immunized with saline solution 0,9%; group 2 immunized with sonicated eggs and adjuvant; group 3 immunized with sonicated eggs without adjuvant and group 4 immunized with whole intact eggs. Through the ELISA and immunofluorescence techniques it was verified reactivity in immunization with sonicated eggs and it was not verified reactivity in immunization with whole intact eggs. The systemic and complex approach of the parasite-host interaction is an interesting study proposal and remains open for future investigations which may assist in the comprehension and treatment of the pathogenesis.

Key-words: schistosomiasis mansoni, egg antigens, immunological response.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Ciclo do <i>Schistosoma mansoni</i> .....	4
Figura 2: Formação do granuloma de <i>Schistosoma</i> sp.....	6
Figura 3: Ovo de <i>Schistosoma mansoni</i> visto em microscópio eletrônico de varredura 1500x.....	13
Figura 4: Precipitação perioval das proteínas secretadas por ovos maduros vivos.....	14
Figura 5: Reação de Imunofluorescência Indireta. 5a – IFI soro de coelho imunizado com ovos sonicados; 5b – IFI soro de coelho não imunizado....	15
Figura 6: Cronograma de imunização em dias.....	20
Figura 7: Média da resposta humoral ao ovo de <i>S. mansoni</i> utilizando-se <i>pool</i> dos soros dos camundongos imunizados.....	25
Figura 8: Média da resposta humoral ao ovo de <i>S. mansoni</i> utilizando-se soros individuais dos camundongos imunizados.....	26

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição dos grupos de 6 camundongos com diferentes esquemas de imunização e preparações de ovos de <i>Schistosoma mansoni</i> .....	20
Tabela 2: Estimativas da média e limites de intervalo de confiança dos resultados aos 58 dias pós-infecção.....	26

## LISTA DE SÍMBOLOS

mm	Milímetro
µm	Micrômetro
nm	Nanômetro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
mL	Mililitro
°C	Graus Celsius
T CD4+	Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T
MHC II	Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe II
IFN-γ	Interferon gama
TNF- γ	Fator de Necrose Tumoral gama
TNF-β	Fator de Necrose Tumoral beta
Th1	Células T CD4+ secretoras de perfil 1 de citocinas
Th2	Células T CD4+ secretoras de perfil 2 de citocinas
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-9	Interleucina 9
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IgA	Imunoglobulina A

PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico
SEA	Antígenos Secretados pelo Ovo (do inglês: <i>secreted egg antigens</i> )
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
IFI	Reação de Imunofluorescência
pH	Potencial Hidrogeniônico
PBS	Tampão Fosfato Salínico
PBS-T	Tampão Fosfato Salínico com Tween 20
UV	Radiação Ultravioleta
OPD	O-Phenylenediamine
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1.	O <i>Schistosoma mansoni</i> .....	1
1.2.	Ciclo de vida do parasito.....	2
1.3.	A patogenia da esquistossomose mansônica.....	5
1.4.	Resposta imunológica celular e humoral.....	7
1.4.1.	Resposta imunológica celular.....	7
1.4.2.	Resposta imunológica humoral.....	9
1.5.	O ovo de <i>Schistosoma mansoni</i> .....	12
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
2.1.	Objetivo geral.....	16
2.2.	Objetivos específicos.....	16
<b>3.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
3.1.	Manutenção do <i>Schistosoma mansoni</i> em laboratório.....	17
3.2.	Obtenção dos antígenos.....	17
3.2.1.	Recuperação de vermes.....	17
3.2.2.	Produção de antígeno de membrana de vermes adultos .....	18
3.2.3.	Obtenção de ovos.....	18
3.2.4.	Produção de antígenos secretados pelo ovo (SEA) .....	19
3.3.	Imunização.....	19
3.4.	Grupos de estudo.....	19
3.5.	Cronograma de imunização.....	20
3.6.	Coleta e estoque do soro.....	21
3.7.	Avaliação de anticorpos reativos a antígenos de <i>S. mansoni</i> no soro.....	21

3.7.1.	Ensaio imunoenzimático (ELISA – IgG).....	21
3.7.2.	Reação de imunofluorescência indireta (IFI).....	22
3.8.	Considerações éticas.....	22
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>24</b>
4.1.	ELISA com antígeno de membrana de vermes adultos .....	24
4.2.	ELISA com antígenos secretados pelo ovo (SEA) .....	24
4.3.	Reação de imunofluorescência indireta.....	27
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>28</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>31</b>



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. O *Schistosoma mansoni*

Na família Schistosomatidae encontramos os Trematoda de sexo separados, parasitos de vasos sanguíneos de mamíferos e aves. Essa família é dividida em duas subfamílias: Bilharziellinae, que acomoda os vermes sem dimorfismo sexual parasitos de aves e alguns animais domésticos ou silvestres; e Schistosomatinae, que abrange os vermes com nítido dimorfismo sexual parasitos do homem e animais (Neves *et al*, 1997). O *Schistosoma mansoni*, descrito por Sambon em 1907, é um helminto causador de uma infecção humana denominada esquistossomose mansônica ou intestinal (Rey, 2001).

A esquistossomose mansônica é uma infecção parasitária crônica endêmica que ocorre em países na África, América do Sul, no Caribe e no Mediterrâneo Oriental (Tortora *et al*, 2003; Gonçalves *et al*, 2006; Caldas *et al*, 2008). É também conhecida como bilharzía, em homenagem a Theodore Bilharz, que descreveu um parasito intravascular para o qual deu o nome de *Distoma haematobia*, em 1852. Posteriormente, Weinland denominou o mesmo helminto de *Schistosoma*, uma vez que o macho apresenta o corpo fendido (*schisto* = fenda; *soma* = corpo), sendo este gênero aceito até hoje. O nome fenda é algo incorreto, uma vez que o sulco é na realidade formado pelas extremidades laterais do macho, que se dobram no sentido ventral (Neves *et al*, 1997). Quarenta anos mais tarde o renomado médico inglês Patrick Manson levantou a hipótese da existência de duas espécies de *Schistosoma* parasitas do homem. Hoje sabe-se que são muitas: *S. japonicum* (esquistossomose japonesa); *S. haematobium* (esquistossomose hematobia, vesical ou urinária); *S. intercalatum* (esquistossomose intestinal, típica de países da África Central); *S. mekongi* (esquistossomose intestinal, comum no vale do rio Mekongi, no Laos e Camboja); *S. bovis*, *S. mattheei* e *S. rodhaini* (esquistossomose de animais que, eventualmente, parasitam o homem na África) e *S. mansoni* (esquistossomose mansônica ou intestinal) (Katz & Almeida, 2003).

É uma infecção tropical muito antiga que permanece endêmica em 54 países (Pontes *et al*, 2003), afetando de 200 a 300 milhões de pessoas no mundo todo (Linder, 1986; Coura & Amaral, 2004; Stavitsky, 2004; Turner *et al*, 2004; King *et al*, 2005;

Conceição *et al*, 2007; Liang & Spear, 2008), causando 200.000 mortes a cada ano (Rutitzky *et al*, 2005). No Brasil, acredita-se que existam mais de 6 milhões de indivíduos infectados principalmente nos estados do Nordeste e em Minas Gerais (Katz & Almeida, 2003), porém dados recentes estimam que este número pode chegar a 14 milhões de infectados por *S. mansoni* (Conceição *et al*, 2007) e cerca de 25 milhões vivem em áreas onde a transmissão desta helmintíase é possível (Vendrame *et al*, 2001).

Os vermes adultos vivem nos vasos sanguíneos que ligam o intestino ao fígado (sistema porta-hepático) do hospedeiro. O macho mede de 6 a 13 mm de comprimento por 1,1 mm de largura (Katz & Almeida, 2003). Tem cor esbranquiçada, com tegumento recoberto de minúsculas projeções (tubérculos) e apresenta o corpo dividido em duas porções: anterior, na qual encontramos a ventosa oral e a ventosa ventral (acetábulo), e a posterior (que se inicia logo após a ventosa ventral), onde encontramos o canal ginecóforo. Em seguida à ventosa oral encontra-se o esôfago e um ceco único e logo atrás do acetábulo encontramos de sete a nove massas testiculares (Neves *et al*, 1997). A fêmea é cilíndrica, mais fina e longa que o macho, medindo de 10 a 20 mm de comprimento por 0,16 mm de largura (Katz & Almeida, 2003). Tem cor esbranquiçada com tegumento liso (Neves *et al*, 1997) mas parece mais escura que o macho devido a um pigmento contido em seu tubo digestivo, a hemozoína, derivado da digestão do sangue (Rey, 2001). Na metade anterior, encontramos a ventosa oral e o acetábulo e seguinte a este encontra-se a vulva, depois o útero e o ovário. A metade posterior é preenchida pelas glândulas vitelogênicas e o ceco (Neves *et al*, 1997). Como não apresentam órgão copulador, a cópula ocorre pela justaposição dos orifícios genitais feminino e masculino quando a fêmea está alojada no canal ginecóforo (Katz & Almeida, 2003).

## **1.2. Ciclo de vida do parasito**

O *Schistosoma mansoni* é a única espécie dentro do grupo de interesse médico e sanitário nas Américas, e desenvolve sua fase adulta como parasito da luz dos vasos sanguíneos do homem e de outros mamíferos, habitando as vênulas do plexo hemorroidário superior e as ramificações mais finas das veias mesentéricas inferiores (Rey, 2001).

Quando as águas tornam-se contaminadas com ovos de *Schistosoma* excretados em dejetos humanos e/ou de certas espécies de roedores de hábitos semi-aquáticos e de bovinos, uma forma larval móvel e ciliada denominada miracídio é liberada dos ovos e penetra em determinadas espécies de moluscos (Xavier *et al*, 1998; Tortora *et al*, 2003). Os miracídios de *S. mansoni*, que medem cerca de 60 µm por 160 µm, devem encontrar o hospedeiro intermediário, um caramujo do gênero *Biomphalaria* Preston, 1910, em até 12 horas. No Brasil, as principais espécies que atuam como hospedeiros intermediários são *Biomphalaria tenagophila*, *B. straminea* e *B. glabrata*, com grande ênfase para esta última espécie (Pessoa & Martins, 1982). Após a penetração no caramujo, os miracídios alojam-se em diversos tecidos do molusco e transformam-se em esporocistos que, por poliembrionia, geram esporocistos filhos e depois cercárias (Rey, 2001). As cercárias têm cerca de 500 µm de comprimento, dos quais três quintos correspondem à cauda com extremidade bifurcada (Ferreira *et al*, 2003; Gryseels *et al*, 2006).

Voltando ao meio líquido, as cercárias que abandonaram o hospedeiro invertebrado ficam nadando na água, quase sempre em direção à superfície, enquanto não tem oportunidade de entrar em contato com a pele de um hospedeiro vertebrado (Xavier *et al*, 1998; Rey, 2001). Quando elas entram em contato com a pele de uma pessoa, fixam-se entre os folículos pilosos com auxílio das duas ventosas e de uma substância mucoprotéica secretada por suas glândulas acetabulares. Em seguida, tomam a posição vertical, apoiando-se na pele pela ventosa oral. Por ação lítica (glândulas de penetração) e ação mecânica (movimentos vibratórios intensos), promovem a penetração do corpo cercariano e a concomitante perda da cauda (Neves *et al*, 1997). O corpo transforma-se em esquistossômulo, que penetra nos vasos sanguíneos da pele e do tecido subcutâneo e atinge as câmaras cardíacas direitas, os capilares pulmonares e o coração esquerdo. Levados pela circulação sistêmica, os esquistossômulos disseminam-se para vários órgãos e tecidos. Somente os esquistossômulos que chegam ao sistema porta hepático, cerca de três semanas depois da penetração das cercárias, são capazes de amadurecer, transformando-se em machos e fêmeas trinta dias após a penetração (Neves *et al*, 1997; Rey 2001). Nesses vasos, os adultos acasalam-se, migrando posteriormente, aos pares e contra o fluxo sanguíneo, até as vênulas do plexo mesentérico inferior, onde se inicia a oviposição (Brindley & Sher, 1987; Ashton *et al*, 2001; Ferreira *et al*, 2003; Baptista & Andrade, 2005) (Figura 1). A idade do parasito interfere na postura. Assim, até um a dois anos, cada fêmea põe cerca de 400 ovos por dia. Cinco anos é a idade

média do *S. mansoni*, porém alguns casais podem viver até trinta anos eliminando poucos ovos (Neves *et al*, 1997).

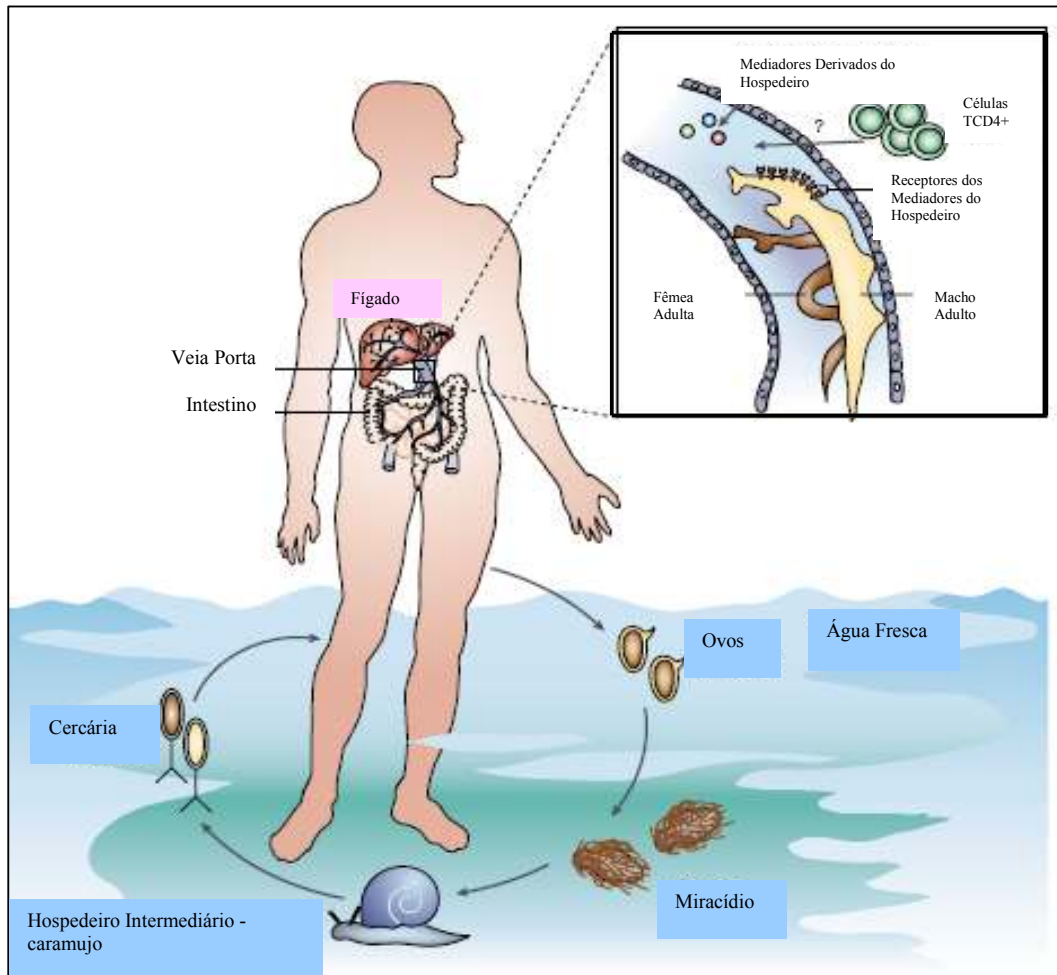


Figura 1: Ciclo do *Schistosoma mansoni* (adaptado de Pearce & MacDonald, 2002).

A migração do ovo até a luz intestinal pode levar desde seis dias (tempo necessário para que ocorra a maturação do ovo) até vinte dias. Se, decorridos vinte dias os ovos não conseguirem atingir a luz intestinal, ocorrerá a morte dos mirácios. Os ovos podem ficar presos na mucosa intestinal ou serem arrastados pela corrente sanguínea para o fígado (Neves *et al*, 1997) despertando reação inflamatória intensa (Ferreira *et al*, 2003).

### 1.3. A patogenia da esquistossomose mansônica

A infecção humana por *S. mansoni* costuma ser, em geral, assintomática ou oligossintomática (Rey, 2001). A susceptibilidade do hospedeiro à infecção está ligada a vários fatores, tais como cepa do parasito, carga parasitária adquirida, idade, estado nutricional e resposta imunitária da pessoa. De todos estes fatores são considerados os mais importantes a carga parasitária e a resposta do sistema imune do paciente (Pordeus *et al*, 2008). Há duas fases imunologicamente distintas durante a infecção da esquistossomose: fase aguda e fase crônica (Caldas *et al*, 2008).

Na fase aguda da infecção, pode ocorrer a dermatite cercariana que é uma inflamação da pele no local da penetração da cercária. Essa reação dura cerca de dois dias e depois regride. Esse mesmo processo de inflamação pode ocorrer no pulmão, durante a etapa de migração dos esquistossômulos. Nessa fase podem ocorrer ainda sintomas como febre alta, tosse, cefaléia, esplenomegalia, linfadenopatia, diarreia e quadros de alergia. Os sintomas da fase aguda coincidem com o início da deposição de ovos pela fêmea (Mathieson & Wilson, 2009).

Na fase crônica da doença, a lesão típica é o granuloma formado ao redor dos ovos retidos no fígado e intestinos do indivíduo infectado, uma resposta imune celular aos antígenos secretados pelo ovo do *S. mansoni* (Goes *et al*, 1994; Dalton *et al*, 1996; Hirsch *et al*, 1997; Fallon & Dunne, 1998; Rumbley *et al*, 1998; Stadecker & Hernandez, 1998; Tristão *et al*, 2000; Lundy *et al*, 2001; Pearce & MacDonald, 2002; Stavitsky, 2004; Sarvel *et al*, 2006) (Figura 2). Inicialmente, os ovos maduros presentes nos tecidos são imobilizados e envoltos por uma reação inflamatória. Em torno deles surgem os macrófagos e depois aparecem eosinófilos, neutrófilos, linfócitos, plasmócitos e fibroblastos, e o recrutamento e migração destas células para o local de inflamação são controlados pelas citocinas (Kaplan *et al*, 1998). Assim que o miracídio morre, os neutrófilos diminuem, porém os macrófagos ativados envolvem e destroem os restos parasitários; em seguida, fibras reticulares são depositadas formando camadas concêntricas, e os macrófagos transformam-se em fibroblastos, que também se dispõem concentricamente, envolvendo a casca do ovo e formando um tecido cicatricial, ao conjunto do qual se dá o nome de granuloma (Boros & Warren, 1970; Byram & Von Lichtenberg, 1977; Neves, 2006).

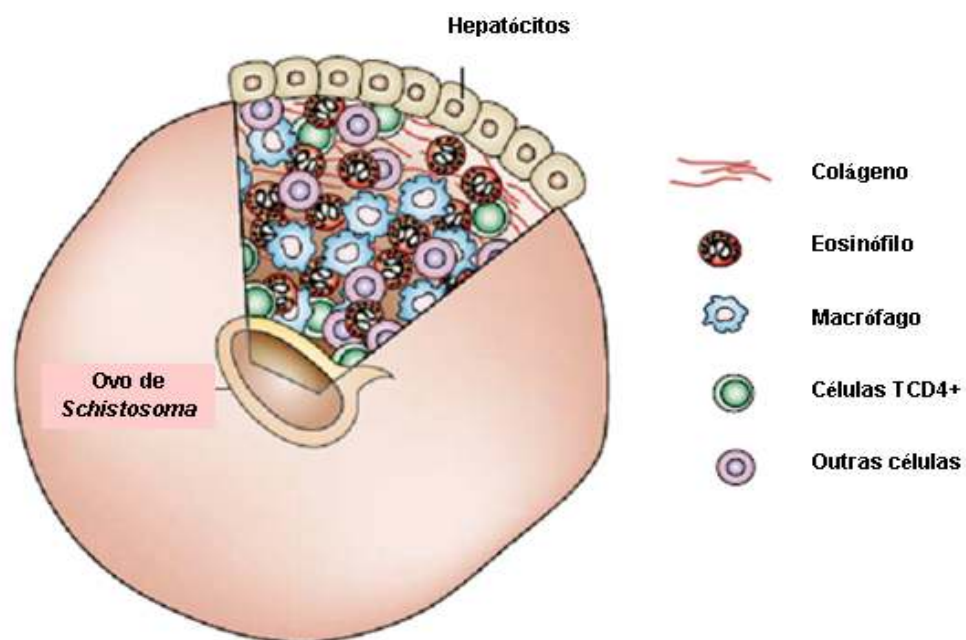


Figura 2: Formação do granuloma de *Schistosoma* sp. (adaptado de Pearce & MacDonald, 2002).

Pode haver progressão para fibrose, culminando na hipertensão do sistema porta. Variações clínicas podem ocorrer nessa fase gerando três formas principais da doença: intestinal (predominante), hepatointestinal e hepatoesplênica (Savioli *et al*, 1997; King, 2009).

A forma mais branda ocorre na maioria dos pacientes infectados cronicamente, enquanto que a forma mais severa, hepatoesplênica, é usualmente encontrada em 5 a 8% da população não tratada (Rutitzky *et al*, 2005; Watanabe *et al*, 2009).

A forma intestinal ocorre após a regressão dos sintomas da fase aguda e apresenta sintomas geralmente inespecíficos como perda de apetite, desconforto abdominal, pequenos quadros diarreicos ou prisão de ventre, e em alguns casos, eliminação de fezes com sangue. Há ocorrências em que, na forma hepatointestinal, os sintomas são mais acentuados que os da forma intestinal, sendo a principal diferença o surgimento de lesões hepáticas (Katz & Almeida, 2003).

A forma hepatoesplênica caracteriza-se pelo comprometimento progressivo do fígado e do baço devido à resposta imune granulomatosa aos ovos presos nos tecidos (Colley, 1975; Boros, 1989; Rumbley *et al*, 1998; Caldas *et al*, 2008; Mathieson &

Wilson, 2009). Apresenta-se sob duas formas: compensada e descompensada. Na forma compensada predominam as lesões hepáticas caracterizadas por fibrose periportal com obstrução dos ramos intra-hepáticos da veia porta (Pessoa & Martins, 1982; Rey, 1991). Na forma descompensada ocorre fibrose periportal podendo ocasionar bloqueio da microcirculação, hipertensão porta e desenvolvimento de circulação colateral. Esta forma clínica, embora rara, é a causa mais comum de morbidade causada pela esquistossomose (Andrade & Van Marck, 1984).

#### **1.4. Resposta imunológica celular e humoral**

Estudos vêm demonstrando que as respostas celular e humoral são mecanismos chave para entender o desenvolvimento da patologia da esquistossomose. As infecções produzidas por *S. mansoni* induzem uma resposta imunológica complexa, que varia no decorrer da infecção devido à evolução do parasito e migração por diferentes órgãos ou tecidos do hospedeiro (Fittipaldi, 2006).

A descoberta de uma divisão funcional nos conjuntos de células T CD4+ com base nos padrões de secreção de citocinas levou à uma compartimentalização das respostas imunológicas. Esta descoberta é particularmente relevante para a imunoregulação de muitos patógenos virais, bactérias e parasitos, e muitas doenças hoje são consideradas mediadas por citocinas do tipo 1 ou do tipo 2 (Fallon, 2000).

##### **1.4.1. Resposta imunológica celular**

Durante o curso da infecção da esquistossomose mansônica, a resposta imunológica celular progride por, pelo menos, três fases. Na primeira fase, de 3 a 5 semanas pós-infecção, ocorre a migração dos parasitos imaturos, e a resposta imunológica observada nos hospedeiros é predominantemente caracterizada por um aumento de citocinas de perfil Th1 (Rumbley *et al*, 1998; Pearce & MacDonald, 2002), direcionada aos antígenos do verme (Schramm *et al*, 2006). De 6 a 8 semanas após a

infecção, coincidentemente com o início da deposição de ovos, a resposta Th1 é regulada e substituída por uma resposta Th2 direcionada aos antígenos do ovo (Velupillai & Harn, 1994; Rumbley *et al*, 1998; Chen & Boros, 1999; Cheever *et al*, 2000; Lundy *et al*, 2001; Pearce & MacDonald, 2002; Schramm *et al*, 2006; Mohrs *et al*, 2007).

A fase de ativação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> virgens é dada pelo reconhecimento de determinantes antigênicos apresentados ao complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC II), expressos na superfície de células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas, linfócitos B e macrófagos. A especificidade da resposta imune induzida por estes linfócitos T CD4<sup>+</sup> é iniciada pela expansão seletiva de clones capazes de reconhecer determinantes antigênicos específicos e de diferenciação em células efetoras que contribuem para a proteção do organismo contra agentes infecciosos (López-Moreno, 2002).

Uma das observações chave para o controle e o favorecimento da infecção por *S. mansoni* é a polarização da resposta imune dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> em Th1 ou Th2. Esta classificação se dá de acordo com o padrão de citocinas produzidas por estas células. Os linfócitos Th1 secretam interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleucina-2 (IL-2) e fator de necrose tumoral- $\beta$  (TNF- $\beta$ ). Estas citocinas participam na ativação de macrófagos e na hipersensibilidade retardada. Por sua vez, os linfócitos Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13, cooperando com a resposta imune humoral através da proliferação de linfócitos B, produção de IgE e IgG4 em humanos e promovendo a diferenciação de eosinófilos e mastócitos (Mosmann *et al*, 1986; Boom *et al*, 1988; Abbas *et al*, 1996; Okano *et al*, 1999; López-Moreno, 2002; Rutitzky *et al*, 2005; Mohrs *et al*, 2007).

As citocinas são importantes fatores na formação e modulação da resposta imune granulomatosa ao ovo de *S. mansoni*. Pacientes com fibrose severa estão associados com altos níveis de TNF- $\gamma$ , IL-5, IL-10 e IL-13 e pacientes com fibrose baixa apresentam altos níveis de IFN- $\gamma$ , porém a associação de IL-13 com o desenvolvimento da fibrose ainda não está clara se altos níveis de IL-13 favorecem o desenvolvimento de fibrose ou se as células mononucleares do sangue periférico (PBMC – do inglês *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) de pacientes com fibrose produzem altos níveis de IL-13 (Oliveira *et al*, 2006). Malaquias *et al* (1997 e 1998a) e Montenegro *et al* (1999) mostraram que o bloqueio da IL-10 aumenta a resposta proliferativa *in vitro* de PBMC de pacientes com a forma intestinal da doença aos antígenos secretados pelo ovo, mas não altera a resposta de PBMC de indivíduos na fase aguda ou com a forma



hepatoesplênica da esquistossomose, sugerindo que a IL-10 pode desempenhar um papel regulatório importante no controle da morbidade de pacientes com a forma crônica intestinal.

Em um estudo desenvolvido por De Jesus *et al* (2002), no qual eles avaliaram a resposta imunológica de 31 pacientes na fase aguda da infecção, foi verificado que as pessoas que residiam em áreas onde a esquistossomose é endêmica geralmente não apresentavam a fase aguda, sugerindo que a resposta imune adaptativa protege os hospedeiros de desenvolver uma condição toxêmica aguda. Neste mesmo estudo foi verificado que pacientes na fase aguda da esquistossomose apresentam níveis de IFN- $\gamma$  muito mais altos do que pacientes na fase crônica da infecção. Entretanto, poucos pacientes com a forma aguda produziam IL-10 em resposta aos antígenos secretados do ovo, quando comparados com pacientes na fase crônica.

Análises da resposta proliferativa de PBMC de pacientes que se encontravam na fase aguda da infecção, na presença de anticorpos bloqueadores de IL-4 e IL-5 revelaram que anticorpos anti-IL-4 reduz significativamente a resposta proliferativa celular aos antígenos secretados pelo ovo (SEA – do inglês *Secreted Egg Antigens*). Resultados similares foram obtidos em ensaios de granuloma *in vitro*, salientando o papel das citocinas durante a fase aguda e na modulação do granuloma (Malaquias *et al*, 1998b).

#### **1.4.2. Resposta imunológica humoral**

No que diz respeito à resposta imunológica humoral, a composição das classes e subclasses de anticorpos anti-*Schistosoma* variam com a idade, intensidade e duração da infecção (Dunne *et al*, 1988). Remoortere *et al* (2001) demonstraram que carboidratos em glicoproteínas, glicolipídios e glicosilaminoglicanos sintetizados por esquistossomos são alvos da imunidade humoral e podem desempenhar um importante papel na modulação da resposta imune do hospedeiro.

Enquanto a infecção esquistossomótica evolui no hospedeiro vertebrado, a liberação de antígenos pelo parasito provoca uma resposta imune produzindo anticorpos específicos em todas as suas fases de vida, principalmente enquanto ovo e verme adulto. Porém nem todas as classes de anticorpos são relevantes na resposta imune e alguns

podem até prevenir a ocorrência desta imunidade (Demeure *et al*, 1993). Elevados níveis de IgE, incluindo anticorpos IgE anti-*Schistosoma* e eosinofilia sanguínea e tecidual são as características predominantes da resposta imunológica da esquistossomose (Capron & Dessaint, 1992).

Devido à secreção de diferentes citocinas por células Th1 ou Th2, a resposta imune humoral mostra um padrão característico de isotipos de anticorpos. Respostas mediadas por células Th1 estão associadas a anticorpos IgG2a, IgG2b, IgG3 e respostas mediadas por células Th2 estão associadas a isotipos IgG1 e IgE. Em adição, estudos mostraram que IL-12 está envolvida na redução dos níveis de IgE total do soro e no aumento dos níveis de IgG2a e IgG2b parasito-específico em 3 vezes, em camundongos imunizados (Wynn *et al*, 1996).

A composição de isotipos de respostas anti-esquistossomo pode ter uma maior influência na eficiência de mecanismos efetores citotóxicos anticorpo-dependente e conseqüentemente na expressão da imunidade protetora durante a infecção (Dunne *et al*, 1993). Interações de seres humanos com esquistossomos e outros helmintos estão caracteristicamente associadas com IgE elevado e eosinofilia provenientes de resposta de citocinas tipo 2, e um estudo com seres humanos recém-nascidos mostrou que as células B de neonatos de mães infectadas com helmintos, incluindo *S. mansoni*, são induzidos *in utero* a produzir IgE e IgG parasito-específico (Fallon, 2000).

Pesquisas em humanos resistentes à reinfeção por *S. mansoni* revelaram que estes pacientes possuíam um alto nível de anti-parasito IgE e que a reinfeção ocorreu somente em pacientes que produziam níveis elevados de anticorpo que competiam com IgE, particularmente IgG4 e IgG2 (Rihet *et al*, 1991). Estudos similares comprovaram que o nível de resistência à infecção depende da ponderação de dois efeitos antagônicos: a ação protetora de IgE; e o efeito bloqueador de IgG4 da função de proteção mediada por IgE durante o mecanismo efetor citotóxico de anticorpo-dependente (Rihet *et al*, 1992, Grogan *et al*, 1996; Ramirez *et al*, 1996; Caldas *et al*, 2000),

Butterworth *et al* (1987), já haviam demonstrado que a classe de anticorpos IgM e certos isotipos IgG podem agir como bloqueadores de anticorpos, impedindo a expressão de uma resposta imunológica eficaz. Estes anticorpos parecem ser produzidos em resposta a antígenos polissacarídeos do ovo e possuem reatividade cruzada com epitopos glicosilados presentes na superfície do esquistossômulo.

A imunoglobulina mais abundantemente produzida nas mucosas dos mamíferos é IgA com função principalmente de defesa, prevenindo a aderência de antígenos. É

produzida por células T independentes, por subpopulações de linfócitos B, e derivam de células peritoniais B1 (Macpherson *et al*, 2000).

Olds *et al* (2003), na tentativa de identificar as respostas contra antígenos específicos e suas associações com a resistência à infecção, revelaram dados interessantes: o antígeno *Sm97-paramiosina* estimula fortemente a resposta imune celular e não está correlacionado com a resistência à infecção e à resposta IgG; *Sm37-SG3PDH* está associado com a resistência à reinfeção em humanos; *Sm62-IrV5* é dependente de resposta Th2 e evidencia uma forte dependência de anticorpos IgE; *Sm28-GST* possui função de indução de IgE e IgA; Sm14-FABP está correlacionado com a resistência mediada por IFN- $\gamma$ , com a suscetibilidade mediada por IgG3 e possivelmente com a modulação da resposta através de um adjuvante estimulador da imunidade mediada por célula. Por outro lado, anticorpos IgG3 específicos são comuns em seres humanos que vivem em áreas endêmicas.

Dentre os principais antígenos secretados pelo ovo, o *Sm28-GST* e o seu correspondente *rSm28-GST* induzem uma alta proteção através da imunização de hospedeiros permissivos como hamsters, camundongos e babuínos ou hospedeiros semipermissivos, como os ratos (Balloul *et al*, 1987), além de reduzirem o tamanho do granuloma (Boulanger *et al*, 1991). Em um estudo desenvolvido por Grzych *et al* (1993), eles verificaram que IgA desempenha um papel crucial ao antígeno *Sm28-GST* durante a infecção por *S. mansoni*. Neste estudo, em todos os pacientes foi verificada a presença deste anticorpo, embora em pacientes com menos de 10 anos o nível de IgA era menor e aumentava conforme a idade do grupo estudado aumentava. Acredita-se que esta resposta atrasada possa estar relacionada com a natureza do antígeno envolvido ou com a localização do parasito no hospedeiro, já que a IgA representa um componente principal da imunidade da mucosa.

Estudos relacionados com a resposta deste anticorpo na esquistossomose humana são quase inexistentes e é difícil especular as rotas envolvidas na sua regulação. Devido ao fato deste anticorpo estar fortemente presente no exato local aonde o ovo é aderido no intestino antes de sua passagem para o lúmen intestinal, a IgA pode estar relacionada com o mecanismo de estratégia de escape do ovo e é possível que antígenos do ovo possam estar envolvidos na indução da produção de IgA.

### 1.5. O ovo de *Schistosoma mansoni*

As interações entre *Schistosoma mansoni* e os hospedeiros vertebrados são mediadas através dos antígenos liberados pelo parasito e as células do sistema imunológico. Na literatura há uma enorme quantidade de estudos que evidenciam a importância do ovo na patologia da esquistossomose por ser este a maior fonte antigênica apresentada pelo verme, pois o granuloma é uma resposta imune mediada por linfócitos T CD4+ aos antígenos solúveis do ovo secretado pelo miracídio vivo.

O ovo do *S. mansoni* é muito típico, medindo em média 150 µm de comprimento por 65 µm de largura. Tem o pólo anterior mais delgado e o posterior mais volumoso, com um espinho lateral saliente e agudo em suas proximidades (Rey, 2001) (Figura 3). A casca do ovo é transparente e amarelada, formada por duas camadas protetoras; a camada externa é aparentemente lisa, porém ao exame em microscopia de varredura nota-se que é recoberta de microespinhos (Race *et al*, 1971; Rey, 2001; Neves, 2006). O ovo não possui opérculo e, assim, ao entrar em contato com a água, o miracídio sai por uma fenda oblíqua, que ele próprio abre na casca (Neves, 2006). Os ovos de *Schistosoma mansoni* são classificados de acordo com suas características morfológicas, como segue: ovos maduros viáveis e imaturos; ovos mortos maduros e imaturos; cascas e granulomas (ovo mais reação granulomatosa que o envolve) (Sarvel *et al*, 2006).

Embora os granulomas formados em volta do ovo preso nos tecidos possam ser prejudiciais ao hospedeiro infectado, está claro que estas lesões também possuem função de proteção durante a infecção por *S. mansoni* (Pearce & MacDonald, 2002). Se os antígenos secretados pelo ovo não forem neutralizados efetivamente, eles podem danificar os tecidos afetados, particularmente os hepatócitos. A formação do granuloma, entretanto, parece ser uma resposta imune protetora que permite que o hospedeiro viva por muitos anos, tornando os efeitos associados ao granuloma uma melhor alternativa tanto para o parasito quanto para o hospedeiro, do que a morte prematura do hospedeiro após a oviposição pelo parasito (Wilson *et al*, 2007).

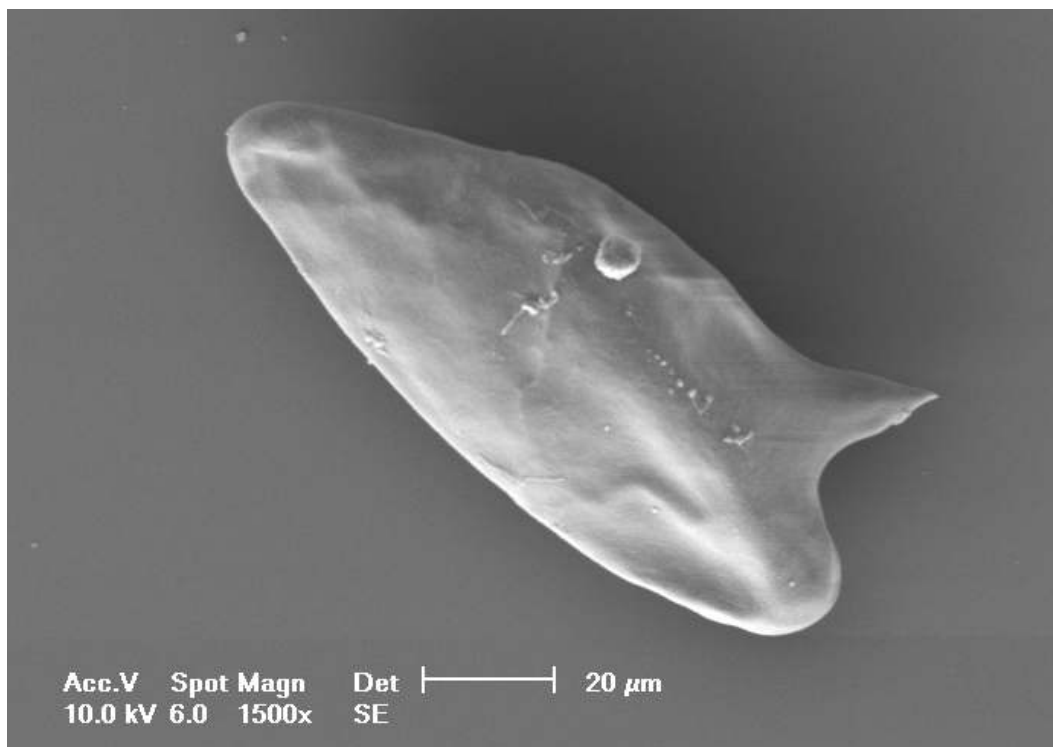


Figura 3: Ovo de *Schistosoma mansoni* visto em microscópio eletrônico de varredura 1500x (foto cedida por Rafael Lucyk Maurer).

Dentre as proteínas secretadas pelo ovo, duas importantes glicoproteínas com função imunogênica já foram identificadas: Omega-1, que possui um domínio de ribonuclease que condiciona células dendríticas a induzir uma mudança de células Th1 para células Th2 (Fitzsimmons *et al*, 2005; Everts *et al*, 2009; Steinfelder *et al*, 2009); e IPSE/alpha-1 proteína altamente glicosilada que induz basófilos a secretarem IL-4 sugerindo um possível papel na manutenção da resposta Th2 (Jang-Lee *et al*, 2007). Mathieson & Wilson (2009) revelaram que a IPSE/alpha-1 sequestra outras proteínas para perto do ovo com ajuda da Omega-1, causando efeitos citolíticos nos leucócitos do hospedeiro durante a migração do ovo.

Apenas as proteínas secretadas pelo ovo podem interagir com o sistema imunológico do hospedeiro enquanto o ovo ainda está vivo (Figura 4). As proteínas endógenas miracidiais somente se tornam acessíveis ao sistema imune quando o ovo morre e libera seu conteúdo, portanto não podem estar envolvidas nem nos estágios iniciais da formação do granuloma e nem na passagem do ovo através da parede do intestino (Kariuki *et al*, 2008; Mathieson & Wilson, 2009).

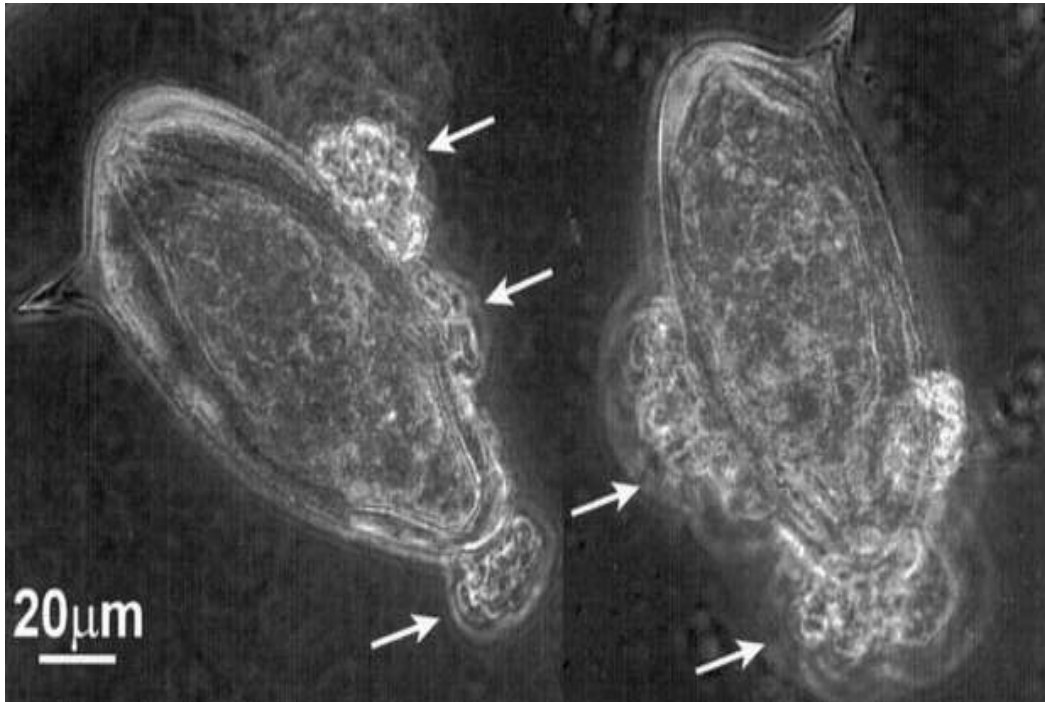


Figura 4: Precipitação perioval das proteínas secretadas por ovos maduros vivos (adaptado de Ashton *et al*, 2001).

A hipótese a ser testada teve origem nos resultados do trabalho de doutoramento de Candida Fagundes Teixeira do Grupo de Parasitologia Biomédica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (Teixeira *et al.*, 2007), no qual foram realizados experimentos para se obter anticorpos do ovo que fizessem interação com partículas paramagnéticas na tentativa de estabelecer um novo método de diagnóstico da esquistossomose. Naquele estudo foi constatada uma dificuldade em obter, de forma consistente, níveis elevados de anticorpos contra a superfície do ovo (Figura 5). Após várias tentativas alterando doses de imunizantes e adjuvantes, foi considerada a hipótese que deu origem ao presente trabalho.

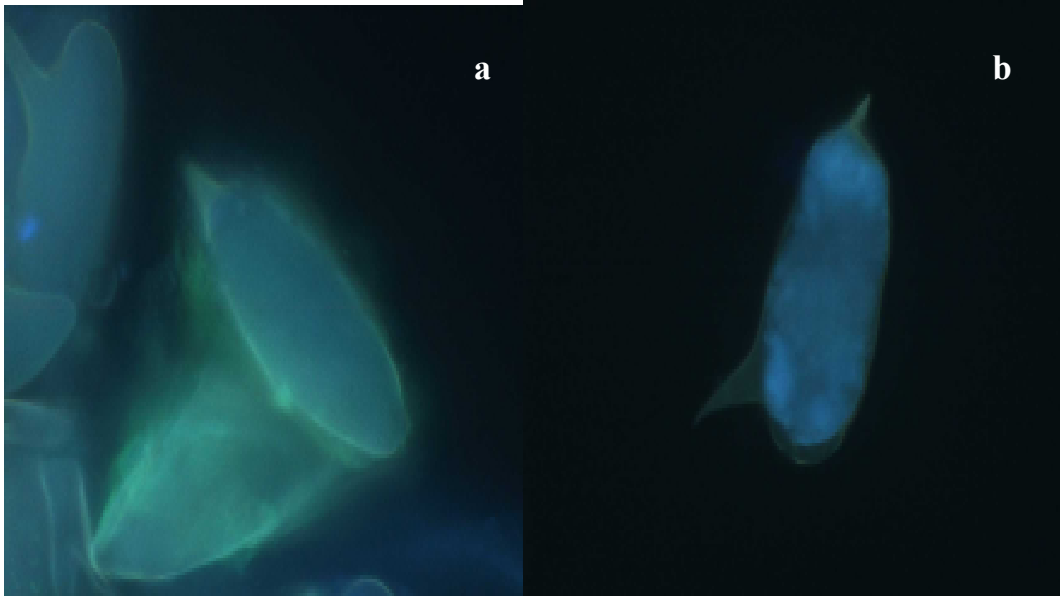


Figura 5: Reação de Imunofluorescência Indireta. 5a – IFI com soro de coelho imunizado com ovos sonicados; 5b – IFI com soro de coelho não-imunizado (fotos cedidas por CF Teixeira, dados não publicados).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

- Verificar a hipótese de que a superfície do ovo de *Schistosoma mansoni* é pouco imunogênica.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Comparar os níveis de anticorpos produzidos nos diferentes grupos de camundongos imunizados;
- Verificar produção de anticorpos contra a superfície externa do ovo.



### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

Este estudo foi realizado no Laboratório de Biologia Parasitária da Faculdade de Biociências da PUCRS. Trata-se de um estudo experimental em modelo animal.

#### **3.1. – Manutenção do *Schistosoma mansoni* em laboratório**

O *S. mansoni*, isolado Esteio, foi mantido em laboratório através de passagens em *Biomphalaria glabrata* e camundongos da cepa *Swiss*. Os moluscos criados em laboratório para manutenção do ciclo foram infectados com miracídios provenientes de ovos do parasito liberados pelas fezes e, após algumas semanas, expostos a luz artificial por no mínimo duas horas para liberação de cercárias. As cercárias coletadas foram usadas para infectar os camundongos. Um lote de camundongos foi utilizado para a manutenção do ciclo e o outro, após 45 dias, sacrificado e os vermes coletados.

#### **3.2. – Obtenção de antígenos**

##### **3.2.1. Recuperação de vermes**

Os camundongos da cepa *Swiss* com aproximadamente 45 dias pós-infecção foram anestesiados com isoflurano e sacrificados com dióxido de carbono e posterior deslocamento cervical. Após o sacrifício, as vísceras foram expostas e os vermes adultos foram coletados com pinças cirúrgicas mediante corte longitudinal das veias mesentéricas inferiores. Estes foram lavados com tampão e armazenados a -20 °C para a produção de antígeno de membrana de vermes adultos, conforme método descrito por Silva *et al* (1993), modificado como é descrito abaixo.

### **3.2.2. Produção de antígeno de membrana de vermes adultos**

Para a produção de antígeno de membrana de vermes adultos, foram utilizados 80 vermes adultos machos e 40 vermes adultos fêmeas, conforme disponibilidade. Os vermes foram lavados e homogeneizados com tampão 0.05M Tris-HCL com pH ajustado para 8,0 em banho de gelo. O material foi submetido à centrifugação a 100 x g por trinta minutos à 4°C, e o sobrenadante foi centrifugado a 30.000 x g por trinta minutos à 4°C (Hawk 15/05, Sanyo, UK). O sedimento foi então suspenso em tampão, sonicado no gelo com 3 ciclos de trinta segundos à amplitude de 30% (Vibracell, 70 Watts, Connecticut, USA) e então novamente centrifugado a 30.000 x g por trinta minutos à 4°C. O sobrenadante resultante constitui o antígeno solúvel de membrana de *Schistosoma mansoni*. A estimativa da concentração protéica foi realizada através do método de Bradford (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) e o material foi estocado a -20°C até o seu uso.

### **3.2.3. Obtenção de ovos**

Ovos de *Schistosoma mansoni* foram obtidos a partir de uma amostra de 300 g de fezes humanas infectadas, obtidas por colaboração com a Gerência Regional do Programa de Controle da Esquistossomose de Minas Gerais.

Os ovos foram isolados das fezes através da dissolução das mesmas em solução salina resfriada na geladeira e com pH ajustado para 6,2, na proporção de 1 g para 10 mL. Após, foram filtradas em malha de nylon com 500 µm de abertura para um copo cônico, com sucessivas lavagens por sedimentação espontânea, até o sobrenadante ficar limpo. Levado o sedimento para o microscópio, os ovos foram isolados por pipetagem um a um, contados e transferidos para microtubos VetaSpin (Whatman, USA) de 1,5 mL. No total foram coletados 48 mil ovos separados da seguinte forma: 36 microtubos contendo 500 ovos cada para as imunizações no tempo 0 e tempo 1 e 18 microtubos contendo 1.000 ovos cada para a imunização do tempo 2. O restante dos ovos foi utilizado para a preparação de antígenos secretados pelo ovo (SEA).

### **3.2.4. Produção de antígenos secretados pelo ovo (SEA)**

No total, 12.000 ovos de *S. mansoni* foram utilizados para a produção de SEA de acordo com o método descrito por Boros & Warren (1970), modificado como segue: os ovos foram suspensos em solução salina 0,9%, acondicionados em banho de gelo e então triturados por sonicação com 15 ciclos de dois minutos à amplitude de 30%. Foi adicionado ao material um tampão contendo PBS 10 x com pH ajustado para 7,4 e o material foi centrifugado a 30.000 x g por cento e vinte minutos à 4°C. A estimativa protéica foi realizada através do método de Bradford e o material foi estocado a -20°C até o seu uso.

### **3.3. Imunização**

Os ovos utilizados para a imunização dos camundongos passaram por duas centrifugações a 440 x g por três minutos com hipoclorito de sódio 0,25% seguidos de mais duas centrifugações a 440 x g por três minutos com solução salina 0,9%. Este procedimento foi necessário por ser, a maior parte dos ovos, coletada a partir de fezes humanas. Sendo assim, a inoculação de ovos sem um tratamento de descontaminação poderia causar a morte prematura dos camundongos, como ficou demonstrado através de um experimento piloto previamente realizado.

### **3.4. Grupos de estudo**

Os grupos do presente experimento foram separados conforme a Tabela 1, cada grupo com 6 camundongos. Para o grupo 2, os ovos foram emulsificados com Adjuvante Completo de Freund (Gibco, EUA) na primeira imunização e, nas subsequentes foi utilizado o Adjuvante Incompleto de Freund (Gibco, EUA), na proporção de 200 µL de adjuvante para 200 µL de antígeno. Os ovos submetidos à sonicação passaram por 4 ciclos de dois minutos à amplitude de 30% no gelo. A cada

inoculação, cada camundongo recebeu uma carga com 500 ovos com exceção da última imunização, onde foram inoculados 1.000 ovos.

Tabela 1: Composição dos grupos de 6 camundongos com diferentes esquemas de imunização e preparações de ovos de *Schistosoma mansoni*.

Grupos de Estudo	Imunizações
grupo 1	solução salina 0,9%
grupo 2	ovos sonicados + Adjuvante de Freund
grupo 3	ovos sonicados sem Adjuvante de Freund
grupo 4	ovos inteiros

### 3.5. – Cronograma de imunizações

Para as imunizações, seguiu-se um cronograma que previa a primeira dose no tempo 0 e doses subsequentes a cada vinte dias, até a obtenção de resposta imune humoral ou no mínimo até quatro repetições em caso de ausência de resposta imune (Figura 6).

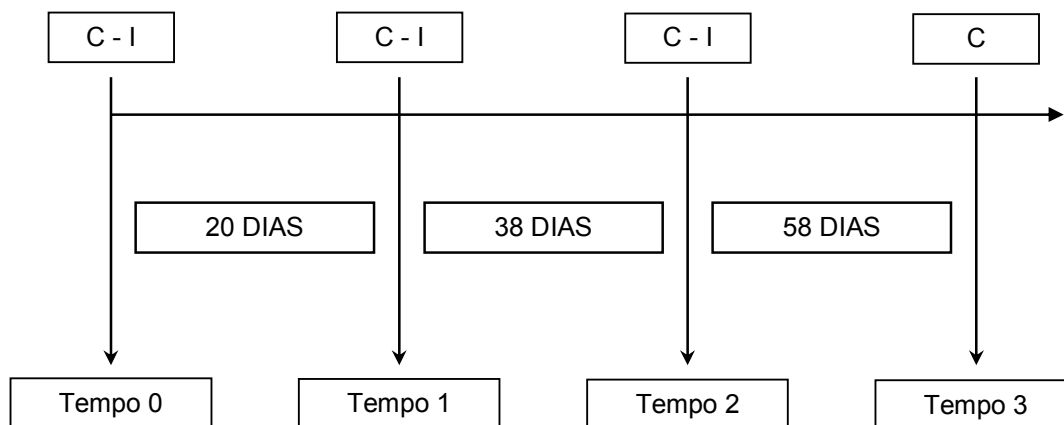


Figura 6: Cronograma de imunização em dias. C = coleta de sangue; I = Imunização.

Ao todo foram realizadas 3 imunizações sendo que no tempo 3 foi realizada somente a coleta de sangue. A antecipação de dias do tempo 1 para o Tempo 2 foi devido a impossibilidade de coleta no final de semana coincidente com o quadragésimo dia do experimento.

### **3.6. – Coleta e estoque do soro**

Previamente a cada imunização, inclusive no tempo 0, foram retirados 100 µL de sangue, coletados por contato de tubo capilar de vidro com o seio venoso retro-orbitário. O soro foi separado por centrifugação a 4800 x g e estocado a -20 °C até a sua utilização para os testes imunológicos.

### **3.7. - Avaliação de anticorpos reativos a antígenos de *S. mansoni* no soro**

#### **3.7.1.– Ensaio imunoenzimático (ELISA – IgG)**

Para a realização do ELISA, foram utilizadas placas de poliestireno de fundo chato de 96 poços (Nunc F16 Polysorp). Para a sensibilização das placas, foram adicionados 100 µl de antígeno SEA e antígeno de membrana de vermes adultos, em placas separadas, diluídos em tampão carbonato com pH ajustado para 9,6, incubados por duas horas à temperatura ambiente e vinte e quatro horas overnight a 4°C. Cada placa foi lavada três vezes com PBS 1x Tween 0,05% pH 7,2 (PBS-T) para a retirada de antígeno não adsorvido. O bloqueio das placas foi feito com 100 µl de solução bloqueadora (PBS 1x Tween 0,05% + leite em pó desnatado 5%) incubadas por três horas à temperatura ambiente. Novamente seguiu-se uma série de três lavagens com PBS-T.

Os anticorpos primários foram diluídos 1:100 em solução bloqueadora e adicionados 100 µl de anticorpo em cada poço. Todos os ensaios foram feitos em duplicata. Após incubação por mais duas horas à temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas cinco vezes com PBS-T. Após, foram acrescentados 100 µl em cada poço de anticorpo secundário (HRP Goat Anti-Mouse IgG, Invitrogen, CA, USA) diluído 1:1000 em solução bloqueadora e as placa novamente incubadas por mais duas horas à temperatura ambiente. Após mais cinco lavagens com PBS-T, foram adicionados 100 µl de OPD (O-Phenylenediamine) com 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em 0.02M de

ácido cítrico, e as placas foram incubadas por quinze minutos ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com a adição de 100 µl de ácido clorídrico 2N.

A densidade ótica foi medida em espectrofotômetro (Anthos, Zenyth 340r) utilizando-se filtro de 450nm.

### **3.7.2. – Reação de imunofluorescência indireta (IFI)**

Para a verificação de produção de anticorpos através de IFI, ovos de *S. mansoni* foram fixados em acetona PA e incubados por dez minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi então aspirado e os ovos foram resuspendidos em PBS 1x, e passaram por duas centrifugações a 4800 x g, cada uma com a duração de dois minutos. Após, os ovos foram incubados em lâmina escavada com os soros dos 4 grupos anteriormente definidos obtidos no acompanhamento da imunização, em PBS 1x com as seguintes diluições: soro puro, 1:10, 1:50 e 1:100, à 37°C em câmara úmida por sessenta minutos. As lâminas foram lavadas com PBS-T e foram novamente incubadas com anticorpo fluoresceinado anti-IgG de camundongo (Zymed, San Francisco, USA) em PBS 1x (1:100) à 37°C por mais trinta minutos. Após a remoção do conjugado, as lâminas foram montadas com reagente comercial (ProLong Gold) e o resultado da fluorescência foi obtido mediante exame das lâminas ao microscópio de fluorescência Zeiss com lâmpada de mercúrio UV.

### **3.8. – Considerações éticas**

Durante a pesquisa foram utilizados 24 camundongos da cepa *Swiss*, de ambos os sexos. Os animais eram mantidos em sistema de gaiolas com isolamento individual (Tecniplast, Itália), com ar filtrado e temperatura controlada, receberam ração e água e a serragem era devidamente trocada uma vez por semana. Os camundongos foram previamente anestesiados com isoflurano inalatório e eutanasiados com dióxido de carbono e posterior deslocamento cervical.

Este uso refere-se à manutenção do parasito *in vivo*, o que é feito não somente para o desenvolvimento do presente projeto, mas de todos os demais projetos vinculados ao projeto “Desenvolvimento de metodologias de vigilância e diagnóstico da esquistossomose mansônica em focos de baixa endemicidade e verificação da sua aplicabilidade pela rede básica de serviços de saúde”, com a devida aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS (Protocolo 07/03599).

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. ELISA com antígeno de membrana de vermes adultos**

Para os experimentos com antígeno de membrana de vermes adultos foram utilizados *pools* dos soros dos 4 grupos, obtidos na imunização dos camundongos. Foram realizados três ensaios de titulação, variando as concentrações do antígeno de 1 a 5 µg/mL e variando as diluições dos anticorpos primários e secundários, sem resultados satisfatórios, provavelmente por sub-estimativa da concentração protéica (dados não mostrados).

### **4.2. ELISA com antígenos secretados pelo ovo (SEA)**

Para os experimentos com SEA foram utilizados *pools* dos soros obtidos na imunização dos camundongos e soros individuais de cada camundongo.

As tentativas para obter reatividade contra a superfície do ovo utilizando SEA na concentração de 5µg/mL diluição de 1:100 para anticorpo primário e 1:1000 para anticorpo secundário foram satisfatórias e mostraram que tanto o grupo imunizado com ovos sonicados e adjuvante (grupo 2) quanto o grupo imunizado com ovos sonicados sem adjuvante (grupo 3) obtiveram reatividade bem maior do que o conjunto de soros dos animais imunizados com ovos inteiros (grupo 4) (Figura 7) .



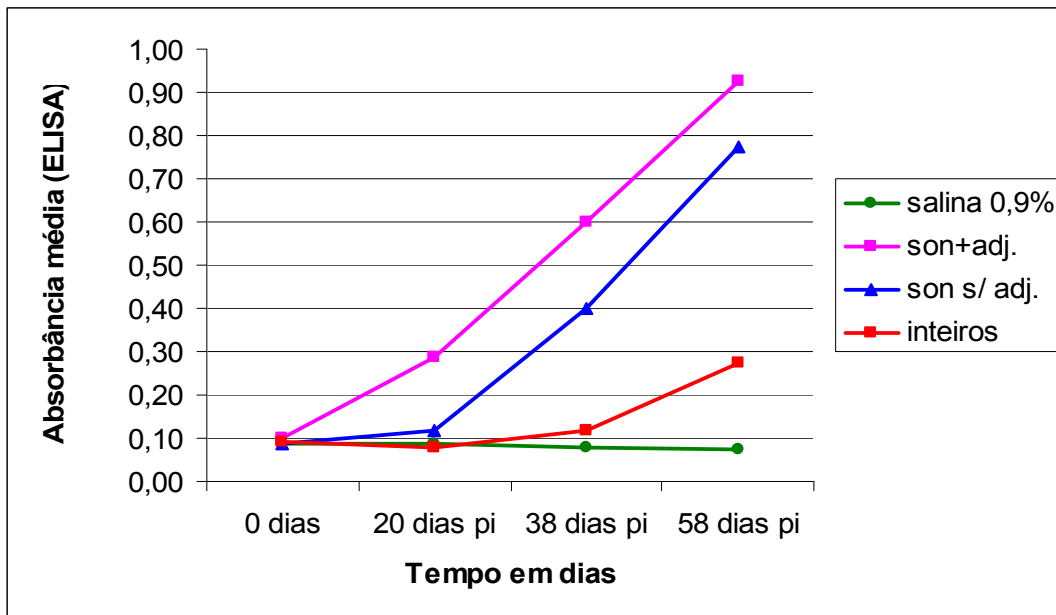


Figura 7: Média da resposta humoral ao ovo de *S. mansoni* utilizando-se *pool* dos soros dos camundongos imunizados (pi = pós-infecção).

Para comprovar a reatividade obtida neste experimento, repetiu-se o ELISA utilizando a mesma concentração de SEA do experimento anterior e as mesmas diluições dos anticorpos primário e secundário, porém utilizando os soros individuais de cada camundongo imunizado. Neste ensaio também pode-se notar que os mesmo grupos que mostraram reatividade no experimento anterior, foram também reativas neste experimento, porém o grupo imunizado com ovos sonicados sem adjuvante (grupo 3) mostrou uma redução na resposta em relação ao experimento realizado com o *pool* dos soros (Figura 8).

A diminuição da reatividade no grupo 3 do primeiro ensaio para este acredita-se ser devido ao fato de, no momento deste experimento, já não haver soro disponível de todos os camundongos imunizados.

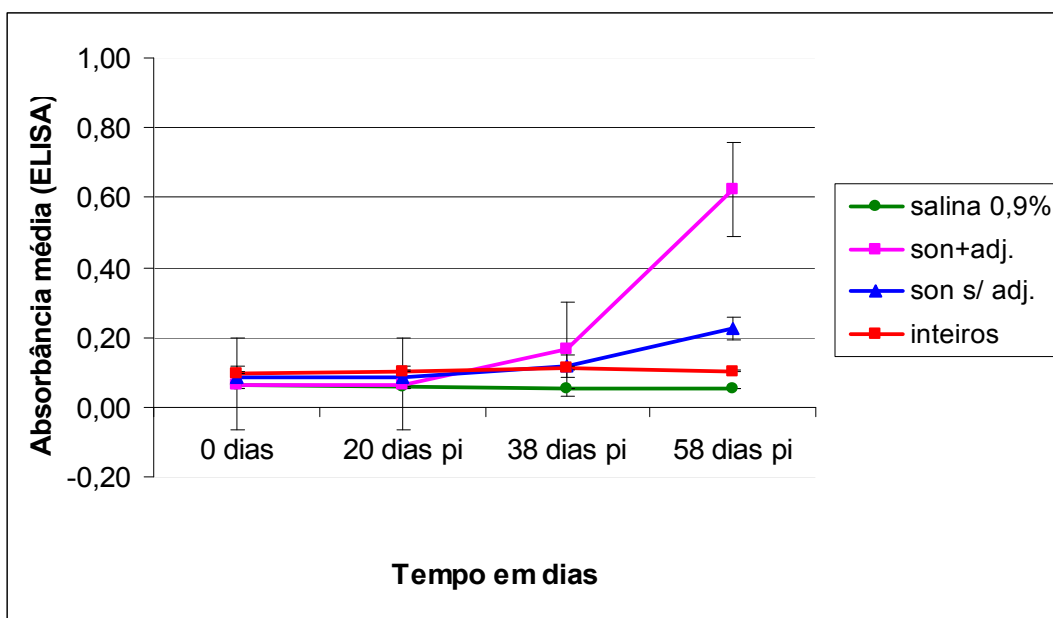


Figura 8: Média da resposta humoral ao ovo de *S. mansoni* utilizando-se soros individuais dos camundongos imunizados (pi = pós-infecção).

Para testar a confiabilidade do experimento, foram calculados a média e os limites de intervalo de confiança dos resultados aos quinquagésimo oitavo dias pós-infecção (Tabela 2). Na análise da tabela fica evidente a semelhança da reatividade do grupo controle negativo (grupo 1) com o grupo imunizado com ovos inteiros (grupo 4), e a diferença na reatividade dos grupos imunizados com ovos sonicados e adjuvante (grupo 2) e ovos sonicados sem adjuvante (grupo 3).

Tabela 2: Estimativas da média e limites de intervalos de confiança dos resultados dos grupos aos 58 dias pós-infecção.

	valor abaixo	média	valor acima
salina 0,9%	0,03388	<b>0,053</b>	0,07112
ovos sonicados + adjuvante	0,57699	<b>0,624</b>	0,67135
ovos sonicados s/ adjuvante	0,20238	<b>0,227</b>	0,25062
ovos inteiros	0,07156	<b>0,104</b>	0,13610

### **4.3. Reação de imunofluorescência indireta**

Foi observada ao exame microscópico uma tênue fluorescência verde na superfície de ovos tratados com soros de camundongos imunizados com ovos sonicados e adjuvante (grupo 2) e com ovos sonicados sem adjuvante (grupo 3), porém estas observações não ficaram evidenciadas na imagem digitalizada. Em contrapartida, não foi observada nenhuma fluorescência nos ovos que foram tratados com soro dos camundongos imunizados com ovos inteiros (grupo 4).

## 5. DISCUSSÃO

Pouco se sabe sobre as secreções dos ovos que facilitam sua passagem através dos tecidos, mas o processo é conhecido por ser dependente de resposta imune, tanto em roedores quanto em humanos. Acredita-se que a migração através dos tecidos é facilitada por secreções solúveis do interior do ovo através de microporos presentes na casca do ovo (Bogitsh & Carter, 1975; Neill *et al*, 1988; Deelder *et al*, 1994; Die *et al*, 2003; Pearce, 2005). Os ovos aderem à parede capilar e são excluídos do vaso, em geral, sem que haja hemorragia (Rey, 2001).

Uma caracterização mais completa do proteoma do ovo de *Schistosoma mansoni* tem sido alvo de muitos estudos, pois a interação das moléculas derivadas do ovo com o sistema imunológico do hospedeiro, sua passagem através dos tecidos para sair nas fezes e as conseqüências patogênicas desta interação ainda são muito mal compreendidas. Ainda não se sabe aonde dentro do ovo ou quando durante o seu desenvolvimento, alguma determinada proteína é expressa (Kariuki *et al*, 2008).

As interações entre as proteínas do *Schistosoma mansoni* e o sistema imunológico tem sido estudadas durante décadas, frequentemente utilizando antígenos secretados pelo ovo (SEA). Vários componentes do SEA já foram purificados e caracterizados para determinadas funções, incluindo antígenos das células T p40 (*Sm-p40*) e fosfoenolpiruvato carboxiquinase, a proteína de choque térmico de 70 kDa antigênica humoral (HSP70) e uma proteína de ligação de cálcio com função ainda desconhecida conhecida por *Sm-E16* (Mathieson & Wilson, 2009).

O interesse no proteoma do ovo de *S. mansoni* ainda é recente, principalmente o conjunto de proteínas do SEA que são secretadas pelo ovo. Ashton *et al* (2001) descrevem uma mistura de proteínas, chamada de Proteínas Secretadas pelo Ovo (ESP), sendo que ao menos uma destas proteínas seria uma protease, provavelmente com função de degradação da parede do intestino tornando possível a passagem do ovo através da mucosa do mesmo.

Há inúmeras razões pelas quais o ovo libera glicoproteínas potencialmente imunogênicas. Os ovos são depositados pelas fêmeas nas paredes da mucosa intestinal ainda imaturos, e o miracídio leva de cinco a sete dias para se desenvolver antes do ovo atingir o lúmen intestinal para ser excretado junto com as fezes. Este processo requer um sistema imunológico hospedeiro intacto, pois a excreção dos ovos via fezes é

altamente reduzida em humanos e camundongos imunocomprometidos com o HIV. A partir destas conclusões pode-se inferir que a potente imunogenicidade das secreções do ovo é uma parte integrante do seu mecanismo de eliminação do hospedeiro (Jang-Lee *et al*, 2007).

Linder, já em 1986, em um trabalho com o propósito de descrever um método de identificação de ovos do parasito através da detecção de moléculas, concluiu que uma direta demonstração imunológica dos ovos do parasito só é possível quando os ovos sofrem ruptura e os antígenos são expostos, pois os ovos são envoltos por uma casca antigênica.

A idéia do presente trabalho teve fundamento nos resultados obtidos nos experimentos conduzidos por Candida Fagundes Teixeira no seu trabalho de doutoramento no grupo de Parasitologia Biomédica da PUCRS. Ao imunizar coelhos com ovos sonicados na tentativa de obter anticorpos que interagissem com partículas paramagnéticas, não conseguiu produção elevada e consistente de anticorpos contra a superfície do ovo de *S. mansoni*.

Os resultados obtidos neste estudo contribuem para as tentativas de esclarecer o mecanismo de passagem do ovo através da mucosa intestinal. Apesar da superfície do ovo ainda ser muito pouco estudada, nossos resultados preliminares indicam que a superfície externa do ovo é pouco imunogênica e coincidem tanto com algumas raras considerações de que a superfície é pouco antigênica (Linder, 1986), quanto com as inúmeras demonstrações de que são elementos do interior do ovo que são antigênicos (Ashton *et al*, 2001; Jang-Lee *et al*, 2007).

Seria de esperar que o mecanismo de passagem do ovo pelo tecido da parede intestinal incluísse estratégias de evasão do reconhecimento pelo sistema imune. A mucosa do intestino já é um ambiente onde ocorre certo grau de tolerância a antígenos (Brandtzaeg, 1996; Valencia *et al*, 2006), o que poderia se somar a reduzida antigenicidade da superfície intacta do ovo. Outro fator ainda pouco estudado é o caráter fugaz da passagem do ovo pelo tecido intestinal, situação contrária a retenção dos ovos na rede capilar hepática e intestinal, principais sítios de patogenia centrada por este elemento parasitário na esquistossomose (Cass *et al*, 2007).

Enquanto a maioria das parasitoses humanas vai diminuindo de importância, em função do desenvolvimento econômico e dos métodos de controle disponíveis, a esquistossomose encontra-se em expansão (Rey, 2001). Apesar dos inúmeros esforços para o mínimo controle da doença, a prevalência da esquistossomose ainda é

considerada extremamente alta, e como ainda não existem vacinas preventivas, a busca de novos tratamentos e medidas de prevenção da esquistossomose torna-se de extrema importância, uma vez que os índices de morbidade e mortalidade desta patologia continuam crescentes.

A abordagem sistêmica e complexa da interação parasito-hospedeiro é uma proposta interessante de estudo que permitirá avanços na compreensão da biologia do parasito e no desenvolvimento de novos métodos diagnósticos e preventivos para o controle desta parasitose e sua patologia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS AK, MURPHY KM & SHER A. 1996. **Functional diversity of helper T lymphocytes.** *Nature*, 383(6603): 787-793.

ANDRADE ZA & VAN MARCK EAE. 1984. Schistosomal glomerular disease (a review). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 79: 499-506.

ASHTON PD, HARROP R, SHAH B & WILSON RA. 2001. The schistosome egg: development and secretions. **Parasitology**, 122: 329-338.

BALLOUL JM, SONDERMEYER P, DREYER D, CAPRON M, GRZYCH JM, PIERCE J, CARVALHO D, LECOCQ JP & CAPRONA. 1987. Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes. **Nature**, 326: 149-153.

BAPTISTA AP & ANDRADE ZA. 2005. Angiogenesis and granuloma formation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 100(2): 183-185.

BOGITSH BJ & CARTER CE. 1975. Immunocytochemical studies on *Schistosoma mansoni*. I. Soluble egg antigen in eggshell-enclosed miracidium. **The Journal of Parasitology**, 61(6): 1031-1040.

BOOM WH, LIANI D & ABBAS AK. 1988. Heterogeneity of helper/inducer T lymphocytes. II. Effects of interleukin 4- and interleukin 2-producing T cell clones on resting B lymphocytes. **The Journal of Experimental Medicine**, 167(4): 1350-1363.

BOROS DL. 1989. Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection. **Clinical Microbiology Reviews**, 2(3): 250-269.

BOROS DL & WARREN KS. 1970. Delayed hypersensitivity-type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by a soluble factor isolated from *Schistosoma mansoni* eggs. **The Journal of Experimental Medicine**, 132: 488-507.

BOULANGER D, REID GDF, STURROCK RF, WOLOWEZUK I, BALLOUL JM, GREZEL D, PIERCE RJ, OTIENO MF, GUERRET S, GRIMAUD JA, BUTTERWORTH AE & CAPRON A. 1991. Immunization of mice and baboons with

the recombinant Sm28GST affects both worm viability and fecundity after experimental infection with *Schistosoma mansoni*. **Parasite Immunology**, 13: 473-490.

BRANDTZAEG P. 1996. History of oral tolerance and mucosal immunity. **Annual New York Academy Society**, 778: 1-27.

BRINDLEY PJ & SHER A. 1987. The chemotherapeutic effect of praziquantel against *Schistosoma mansoni* is dependent on host antibody response. **The Journal of Immunology**, 139:215-220.

BUTTERWORTH AE, BENSTED-SMITH R, CAPRON A, CAPRON M, DALTON PR, DUNNE DW, GRZYCH JM, KARIUKI HC, KHALIFE J, KOECH D, MUGAMBI M, OUMA JH, SIOKONK A TK & STURROCK RF. 1987. Immunity in human schistosomiasis: Prevention by blocking antibodies of the expression of immunity in young children. **Parasitology**, 94: 281-300.

BYRAN JE & VON LICHTENBERG FV. 1977. Altered schistosoma granuloma formation in nude mice. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 26(5): 944-956.

CALDAS IR, CORREA-OLIVEIRA R, COLOSIMO E, CARVALHO OS, MASSARA CL, COLLEY DG & GAZZINELLI G. 2000. Susceptibility and resistance to *Schistosoma mansoni* reinfection: parallel cellular and isotypic immunologic assessment. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 62(1): 57-64.

CALDAS IR, CAMPI-AZEVEDO AC, OLIVEIRA LFA, SILVEIRA MAS, OLIVEIRA RC & GAZZINELLI G. 2008. Human schistosomiasis mansoni: Immune responses during acute and chronic phases of the infection. **Acta Tropica**, 108: 109-117.

CAPRON A & DESSAINT JP. 1992. Immunologic aspects of schistosomiasis. **Annual Review of Medicine**, 43: 209-218.

CASS CL, JOHNSON JR, CALIFF LL, XU T, HERNANDEZ HJ, STADECKER MJ, YATES JR & WILLIAMS DL. 2007. Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* egg secretions. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 155: 84-93.

CHEEVER AW, JOFFMANN KF & WYNN TA. 2000. Immunopathology of schistosomiasis mansoni in mice and men. **Immunology Today**, 21(9): 465-466.



CHEN Y & BOROS DV. 1999. Polarization of the immune response to the single immunodominant epitope of p38, a major *Schistosoma mansoni* egg antigen, Generates Th1- or Th2-Type cytokines and granulomas. **Infection and Immunity**, 6(9): 4570-4577.

COLLEY DG. 1975. Immune responses to a soluble schistosomal egg antigen preparation during chronic primary infection with *Schistosoma mansoni*. **The Journal of Immunology**, 115: 150-156.

CONCEIÇÃO MJ, BORGES-PEREIRA J, COURA R. 2007. A thirty years follow-up study on Schistosomiasis mansoni in a community of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 102(8): 1007-1009.

COURA JR & AMARAL RS. 2004. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in brazilian endemic areas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 99(1): 13-19.

DALTON JP, DAY SR, DREW AC & BRINDLEY PJ. 1996. A method for the isolation of schistosome eggs and miracidia free of contaminating host tissues. **Parasitology**, 115: 29-32.

DE JESUS AR, SILVA A, SANTANA LB, MAGALHÃES A, DE JESEUS AA, ALMEIDA RP, REGO MAV, BURATTINI MN, PEARCE EJ & CARVALHO EM. 2002. Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. **The Journal of Infectious Disease**, 185: 98-105.

DEELDER AM, SAAD M, DIN N, KORNELIS D, RENE JM & ZEYL V. 1994. Immunologic characterization of two monoclonal antibodies reactive with repetitive carbohydrate epitopes of circulating *Schistosoma mansoni* egg antigen. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 50(4): 487-498.

DEMEURE CE, RIHET P, ABEL L, OUTTARA 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. **The Journal of Infected Diseases**, 168: 1000-1008.

DIE IV, VLIET SJV, NYAME AK, CUMMINGS RD, BANK CMC, APPELMELK B, GEIJTENBEEK TBH & KOOYK YV. 2003. The dendritic cell-specific C-type lectin DC-SIGN is a receptor for *Schistosoma mansoni* egg antigens and recognizes the glycan antigen Lewis x. **Glycobiology**, 13(6): 471-478.

DUNNE DW, GRABOWSKA AM, FULLFORD AJC, BUTTERWORTH AE, STURROCK RF, KOECH D & OUMA JH. 1988. Human antibody responses to *Schistosoma mansoni*: the influence of epitopes shared between different life-cycle stages on the response. **European Journal of Immunology**, 18: 123-131.

DUNNE DW, RICHARDSON BA, JONES FM, CLARK M, THORNE KJI & BUTTERWORTH AE. 1993. The use of mouse/human chimaeric antibodies to investigate the roles of different antibody isotypes, including IgA2, in the killing of *Schistosoma mansoni* schistosomula by eosinophils. **Parasite Immunology**, 15: 181-185.

EVERTS B, PERONA-WRIGHT G, SMITS HH, HOKKE CH, HAM AJVD, FITZSIMMONS CM, DOENHOFF MJ, BOSCH JVD, MOHRS K, HAAS H, MOHRS M, YAZDANBAKSHI M & SCHRAMM G. 2009. Omega-1, a glycoprotein secreted by *Schistosoma mansoni* eggs, drives Th2 responses. **The Journal of Experimental Medicine**, 206(8): 1673-1680.

FALLON PG & DUNNE DW. 1998. Tolerization of mice to *Schistosoma mansoni* egg antigens causes elevated Type 1 and diminished type 2 cytokine responses and increased mortality in acute infection. **The Journal of Immunology**, 162: 4121-4132.

FALLON PG. 2000. Immunopathology of schistosomiasis: a cautionary tale of mice and men. **Immunology Today**, 21(1): 29-34.

FERREIRA MU, FORONDA AS & SCHUMAKER TTS. 2003. **Fundamentos Biológicos da Parasitologia Humana**. Manole, São Paulo, 1ªed: 155p.

FITTIPALDI J. 2006. Relação entre níveis de imunoglobulinas – IgE e IgG – e a forma clínica da esquistossomose mansônica em pacientes do município de Padre Paraíso, Minas Gerais. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 145p.

FITZSIMMONS CM, SCHRAMM G, JONES FM, CHALMERS IW, HOFFMANN KF, GREVELDING CG, WUHRER M, HOKKE CH, HAAS H, DOENHOFF MJ & DUNNE DW. 2005. Molecular characterization of omega-1: a hepatotoxic ribonuclease from *Schistosoma mansoni* eggs. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 144: 123-127.

GOES AM, REZENDE AS, GAZZINELLI G & DOUGHTY BL. 1994. Granulomatous hypersensitivity to *Schistosoma mansoni* egg antigens in human schistosomiasis. IV. A role for prostaglandin-induced inhibition of in vitro granuloma formation. **Parasite Immunology**, 16: 11-18.

GONÇALVES MML, BARRETO MGM, PERALTA RHS, GARGIONI C, GONÇALVES T, IGREJA RP, DOARES MS & PERALTA JM. 2006. Immunoassays as an auxiliary tool for the serodiagnosis of *Schistosoma mansoni* infection in individuals with low intensity of egg elimination. **Acta Tropica**, 100: 24-30.

GROOGAN JL, KREMSNER PG, VAN DAM GJ, METZGER W, MORDMULLER B, DEELDER AM & YAZDANBAKHS M. 1996. Anti-schistosome IgG4 and IgE responses are affected differentially by chemotherapy in children versus adults. **The Journal of Infectious Diseases**, 173: 1242-1247.

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

GRZYCH JM, GREZEL D, XU CB, NEYRINCK JL, CAPRON M, OUMA JH, BUTTERWORTH AE & CAPRON A. 1993. IgA antibodies to a protective antigen in human schistosomiasis mansoni. **The Journal of Immunology**, 150: 527-535.

HIRSCH C, CARVALHO-QUEIROZ C, FRANCO GR, PENA SDJ, SIMPSON AJG & GOES AM. 1997. Evidentiation of paramyosin (Sm-97) as a modulating antigen on granulomatous hypersensitivity to *Schistosoma mansoni* eggs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 92(5): 663-667.

JANG-LEE J, CURWEN RS, ASHTON PD, TISSOT B, MATHIESON W, PANICO M, DELL A, WILSON RA & HASLAM SM. 2007. Glycomics analysis of *Schistosoma mansoni* egg and cercarial secretions. **Molecular and Cellular Proteomics**, 6: 1485-1499.

KAPLAN MH, WHITFIELD JR, BOROS DL, GRUSBY MJ. 1998. Th2 cells are required for the *Schistosoma mansoni* egg-induced granulomatous response. **The Journal of Immunology**, 160: 1850-1856.

KARIUKI TM, FARAH IO, WILSON RA & COULSON OS. 2008. Antibodies elicited by the secretions from schistosome cercariae and eggs are predominantly against glycan epitopes. **Parasite Immunology**, 30: 554-562.

KATZ N & ALMEIDA K. 2003. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. **Ciência e Cultura**, São Paulo, 55(1): 38-43.

KING CH, DICKMAN K & TISCH D. 2005. Reassessment of the cost of chronic helminthic infection: a meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis. **Lancet**, 365: 1561-1569.

KING CH. 2009. Toward the elimination of schistosomiasis. **The New England Journal of Medicine**, 360(2): 106-109.

LIANG S & SPEAR RC. 2008. Model-based insights into multi-host transmission and control of schistosomiasis. **Plos Medicine**, 5(1): 0014-0015.

LINDER E. 1986. Identification of schistosomal eggs. Description of an immunological spot assay for hatch fluid antigen. **The Journal of Immunological Methods**, 88: 137-140.

LÓPEZ-MORENO HS. 2002. Cestodiasis tisulares: participación de los linfócitos T cooperadores 1 y 2. **Salud Pública de México**, 44(2): 145-152.

LUNDY SK, LERMAN SP & BOROS DL. 2001. Soluble Egg Antigen-Stimulated T Helper Lymphocyte Apoptosis and Evidence for Cell Death Mediated by FasL+ T and B Cells during Murine *Schistosoma mansoni* Infection. **Infection and Immunity**, vol. 9(1): 271-280.

MACPHERSON AJ, GATTO D, SAINSBURY E, HARRIMAN GR, HENGARTNER H & ZINKERNAGEL RM. 2000. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. **Science**, 288: 2222-2226.

MALAQUIAS LCC, FALCÃO PL, SILVEIRA AMS, GAZZINELLI G, PRATA A, COFFMANN RL, PIZZIOLO V, SOUZA CP, COLLEY DG & CORREA-OLIVEIRA R. 1997. Cytokine regulation of human immune response to *Schistosoma mansoni*: analysis of the role of IL-4, IL-5 and IL-10 on peripheral blood mononuclear cell responses. **Scandinavian Journal of Immunology**, 46: 393-398.

MALAQUIAS LCC, FALCÃO PL, MARTINS-FILHO OA, SILVEIRA AM, PASSOS VM, PRATA A, GAZZINELLI G, COFFMAN RL, CORREA-OLIVEIRA L. 1998(a). Human Schistosomiasis mansoni: IL-10 modulates de in vitro granuloma formation. **Parasite Immunology**, 20(10): 447-454.

MALAQUIAS LC, CORREA-OLIVEIRA R, FALCÃO PL, VIANA IRC, BAHIA-OLIVEIRA LMG, SILVEIRA AMS, FRAGA LAO, PRATA A, COFFMAN RL, LAMBERTUCCI JR, CUNHA-MELO JR, MARTINS-FILHO OA, WILSON RA & GAZZINELLI G. 1998(b). Citokines as determinants of resistance and pathology in human *Schistosoma mansoni* infection. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 31: 171-177.

MATHIESON W & WILSON RA. 2009. A comparative proteomic study of the undeveloped and developed *Schistosoma mansoni* egg and its contents: the miracidium, hatch fluid and secretions. **International Journal for Parasitology**, *in press*, doi: 10.1016/j.ijpara.2009.10.014.

MOHRS M, SCHRAMM G, MOHRS K, WODRICH M, DOENHOFF MJ, PEARCE EJ & HAAS H. 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. **The Journal of Immunology**, 178: 6023-6027.

MONTENEGRO SML, MIRANDA P, MAHANTY S, ABATH FGC, TEIXEIRA KM, COUTINHO EM, BRINKMAN J, GONÇALVES I, DOMINGUES LAW, DOMINGUES ALC, SHER A & WYNN TA. 1999. Citokine production in acute versus chronic human schistosomiasis mansoni: the cross regulatory role of interferon- $\gamma$  and interleukine-10 in the responses of periferal blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. **The Journal of Infectious Diseases**, 179: 1502-1514.

MOSMANN TR, CHERWINSKI H, BOND MW, GIEDLIN MA & COFMANN RL. 1986. Two types of murine helper T cell clones. I. Definition according to profiles of lymphonine activities and secreted proteins. **The Journal of Immunology**, 136: 2348-2357.

NEILL PJG, SMITH JH, DOUGHTY BL & KEMP M. 1988. The ultrastructure of the *Schistosoma mansoni* egg. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 39(1): 52-65.

NEVES DP. 2006. **Parasitologia Dinâmica**. Atheneu, São Paulo, 2<sup>a</sup>ed.: 227-247.

NEVES DP, MELO AL, GENARO O & LINARDI PM. 1997. **Parasitologia Humana**. Atheneu, São Paulo, 9<sup>a</sup>ed.: 212-237.

OKANO M, SATOSKAR AR, NISHIZAKI K, ABE M & HARN DA. 1999. Induction of Th2 responses and IgE is largely due to carbohydrates functioning as adjuvants on *Schistosoma mansoni* egg antigens. **The Journal of Immunology**, 163: 6712-6717.

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

OLIVEIRA LFA, MORENO EC, GAZZINELLI G, MARTINS-FILHO OA, SILVEIRA AMS, GAZZINELLI A, MALAQUIAS LCC, LO VERDE P, LEITE PM & CORREA-OLIVEIRA R. 2006. Cytokine production associated with periportal fibrosis during chronic schistosomiasis mansoni in humans. **Infection and Immunity**, 74(2): 1215-1221.

PEARCE EJ & MACDONALD AS. 2002. The Immunobiology of schistosomiasis. **Nature Reviews/Immunology**, 85: 499-511.

PEARCE EJ. 2005. Priming of the immune response by schistosome eggs. **Parasite Immunology**, 27: 265-270.

PESSOA SB & MARTINS AV. 1982. **Parasitologia Médica**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 11<sup>a</sup>ed.

PONTES LA, OLIVEIRA LC, KATZ N, DIAS-NETO E & RABELLO A. 2003. Comparison of a polymerase chain reaction and the Kato-katz technique for diagnosing infection with *Schistosoma mansoni*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 68(6): 652-656.

PORDEUS LC, AGUIAR LR, QUININO LRM & BARBOSA CS. 2008. A ocorrência das formas aguda e crônica da esquistossomose mansônica no Brasil no período de 1997 a 2006. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, 17(3): 163-175.

RACE GJ, MARTIN JH, MOORE DV & LARSH JR JE. 1971. Scanning and transmission electronmicroscopy of *Schistosoma mansoni* eggs, cercarie and adults. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 20(6): 914-924.

RAMIREZ RM, CEBALLOS E, NOYA BA, NOYA O & BIANCO N. 1996. The immunopathology of human schistosomiasis-III. Immunoglobulin isotype profiles and response to praziquantel. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 91(5): 593-599.

REMOORTERE AV, DAM GV, HOKKE CH, DIRK H, EIJNDEN VD, DIE IV & DEELDER AM. 2001. Profiles of Immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies against defined carbohydrate epitopes in sera of *Schistosoma*-infected individuals determined by surface plasmon resonance. **Infection and Immunity**, 69(4): 2396-2401.

REY L. 1991. *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: O Parasito. **In Parasitologia. Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nas Américas e na África**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2<sup>a</sup> ed.: 389-410.

REY L. 2001. **Parasitologia**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 3<sup>a</sup>ed.: 413-441.

RIHET P, DEMEURE E, BOURGOIS A, PRATA A & DESSEIN AJ. 1991. Evidence for no association between human resistance and to *Schistosoma mansoni* and high anti-larval IgE levels. **The Journal of Immunology**, 21: 2679-2686.

RIHET P, DEMEURE CE, DESSEIN AJ & BOURGOIS A. 1992. Strong serum inhibition of specific IgE correlated to competing IgG4, revealed by a new methodology in subjects from a *S. mansoni* endemic area. **The European Journal of Immunology**, 22(8): 2063-2070.

RUMBLEY CA, ZEKAVAT AS, SUGAYA H, PERRIN PJ, RAMADAN MA & PHILLIPS SM. 1998. The schistosome granuloma: characterization of lymphocyte migration, activation, and cytokine production. **The Journal of Immunology**, 161: 4129-4137.

RUTITZKY LI, HERNANDEZ HJ, YOUNG-SUN Y, RICKLAN DE, FINGER E, MOHAN C, PETER I, WAKELAND EK & STADECKER MJ. 2005. Enhanced egg-induced immunopathology correlates with high IFN- $\gamma$  in murine schistosomiasis: identification of two epistatic genetic intervals. **The Journal of Immunology**, 174: 435-440.

SARVEL AK, KUSEL JR, ARAÚJO N, COELHO PMZ & KATZ N. 2006. Comparison between morphological and staining characteristics of live and dead eggs of *Schistosoma mansoni*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 101(1): 289-292.

SAVIOLI L, RENGANATHAN E, MONTRESOR A, DAVIS A & BEHBEHANI K. 1997. Control of schistosomiasis – A global picture. **Parasitology Today**, 13(11): 444-448.

SCHRAMM G, GRONOW A, KNOBLOCH J, WIPPERSTEG V, GREVELDING CG, GALLE J, FULLER H, STANLEY RG, CHIODINI PL, HAAS H & DOENHOFF MJ. 2006. IPSE/alpha-1: A major immunogenic component secreted from *Schistosoma mansoni* eggs. **Molecular & Biochemical Parasitology**, 147: 9-19.

SILVA AJ, PIUVEZAM MR, MOURA H, MADDISON S & PERALTA JM. 1993. Rapid competitive enzyme linked-immunosorbent assay using monoclonal antibody reacting with a 15 kDa tegumental antigen of *Schistosoma mansoni* for serodiagnosis of schistosomiasis. **The Journal of Clinical Microbiology**, 31: 2315-2319.

STADECKER MJ & HERNANDEZ HJ. 1998. The Immune response and immunopathology in infection with *Schistosoma mansoni*: a key role of major egg antigen *Sm-p40*. **Parasite Immunology**, 20: 217-221.

STAVITSKY AB. 2004. Regulation of granulomatous inflammation in experimental models of schistosomiasis. **Infection and Immunity**, 72:1-12.

STEINFELDER S, ANDERSEN JF, CANNONS JL, FENF CG, JOSHI M, DWYER D, CASPAR P, SCHWARTZBERG PL, SHER A & JANKOVIC D. 2009. The major component in schistosome eggs responsible for conditioning dendritic cells for Th2 polarization is a T2 ribonuclease (omega-1). **The Journal of Experimental Medicine**, 206(8): 1681-1690.

TEIXEIRA CF, NEUHAUSS E, BEN R, ROMANZINI J & GRAEFF-TEIXEIRA C. 2007. Detection of *Schistosoma mansoni* eggs in feces through their interaction with paramagnetic beads in a magnetic field. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 1(2): 1-5.

TORTORA GJ, FUNKE BR & CASE CL. 2003. **Microbiologia**. Artmed, Porto Alegre, 6<sup>a</sup>ed.: 622-623.

TRISTÃO AR, MELO, AL, VASCONCELOS AC & GROSSI FM. 2000. Apoptose na modulação da resposta inflamatória aos ovos do *Schistosoma mansoni*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 52(6): 586-591.

TURNER P, LALLOO K, ARMSTRONG M, BLIGH J, WHITTY CJM, DOENHOFF MJ & CHIODINI PL. 2004. Serological speciation of human schistosome infections by ELISA with a panel of three antigens. **The Journal of Clinical Pathology**, 57: 1193-1196.

VALENCIA A, BASTOS ES, CONCEIÇÃO V, CAMPOS SMN, CARVALHO IP, MADI K & TEIXEIRA G. 2006. Avaliação da interferência da tolerância oral na rejeição do transplante de coração alogênico avascular na orelha de camundongo. **The Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, 21(1): 75-84.

VELUPILLAI P & HARN DA. 1994. Oligosaccharide-specific induction of interleukin 10 production by B220+ cells from schistosome-infected mice: A mechanism for regulation of CD4+ T-cell subsets. **Immunology**, 91: 18-22.

VENDRAME CMV, CARVALHO MDT, YAMAMOTO CRF, NAKHLE MC, CARVALHO AS & CHIEFFI PP. 2001. Evaluation of anti-*Schistosoma mansoni* IgG antibodies in patients with chronic schistosomiasis mansoni before and after specific treatment. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 43(3): 153-159.



XAVIER EM, LUCENA-SILVA N, WERKHAUSER RP, FRANCO GR, SANTOS RAAL, SIMPSON AJG & ABATH FGC. 1998. The tegument of *Schistosoma mansoni*: genes, antigens and the host-parasite relationship. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 93(1): 85-86.

WATANABE K, CARTER JM, NEELY-BURNAM M & COLLEY DG. 2009. Relative imbalance between T regulatory cells and activated T cells in mice with differential morbidity in chronic *Schistosoma mansoni* infections. **Parasite Immunology**, 31: 440-446.

WILSON MS, MENTINK-KANE MM, PESCE JT, RAMALINGAM TR, THOMPSON R & WYNN TA. 2007. Immunopathology of schistosomiasis. **Immunology and Cell Biology**, 85: 148-154.

WYNN TA, REYNOLDS A, JAMES S, CHEEVER AW, CASPAR P, HIENY S, JANKOVIC D, STRAND M & SHER A. 1996. IL-12 enhances vaccine-induced immunity to schistosomes by augmenting both humoral and cell-mediated immune responses against the parasite. **The Journal of Immunology**, 157: 4068-4078.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)