ERRATA

Levano-Garcia, J. **Caracterização bioquímica e imunológica das enzimas recombinantes ATP-diphosphohidrolases 1 e 2 do parasita *Schistosoma mansoni***. 2008. 109p. Tese doutoral. Programa de Pós-graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

ALTERAÇÕES NO TEXTO

Onde se lê (pagina vii, linhas 13-15)

No estagio ovo ambos os genes estão altamente expressados sugerindo um possível envolvimento das ATPDases na resposta de proteção contra o sistema imune humano.

Leia-se:

Onde se lê (pagina ix, linhas 10-12)

In the egg stage both genes were highly expressed suggesting a possible involvement of the ATPDases in the protection response of eggs against the human immune system.

Leia-se:

Onde se lê (pagina 1, linhas 1-2)

Em cerca de 10% dos casos, fatal.

Leia-se:

Em muitos casos, fatal.(WHO, 2002).

Onde se lê (pagina 3, linha 19)

Mascaramento de possíveis antígenos de superfície do parasita

Leia-se:

Mascaramento de possíveis antígenos de superfície do parasita (Braschi e Wilson, 2006).

Onde se lê (pagina 3, linha 19)

Sangue

Leia-se

Sangue (Gryseels *et al.* 2006).

Onde se lê (pagina 4, linha 20-21)

e tetraspanin (TSP) (Tran *et al.* 2006);

JULIO C. LEVANO GARCIA

Leia-se:
e tetraspanin (TSP) (Tran *et al.* 2006), Sm97 paramiosina (Ribeiro de Jesus *et al.* 2000), Sm29 (Cardoso *et al.* 2006), CT-SOD (Shalaby *et al.* 2003);

Onde se lê (pagina 14, linha 12)
Caracterização imunológica das duas SmATPDases recombinantes usando o sistema murino: teste de proteção

Leia-se:
Avaliação imunológica das duas SmATPDases recombinantes no sistema murino.

Onde se lê (pagina 15, linha 4)
camundongos com injeções subcutâneas de cercarias.

Leia-se
camundongos com injeções subcutâneas de cercárias no laboratório da Dra. Toshie Kawano no Instituto Butantan.

Onde se lê
Sangria

Leia-se: Coleta de sangue.

Onde se lê: (pagina 42, linha 22)
Interação

Leia-se:
elução

Onde se lê (pagina 43, legenda figura 8, linha 4)
Cromatografia de troca iônica da fração de eluição de Ni-NTA

Leia-se
Cromatografia de troca iônica da fração de eluição de Ni-NTA usando Q-sefarose com um gradiente de 0 a 1M de NaCl

Onde se lê (pagina 44, linha 4)
Após clonagem no vetor de expressão,

Leia-se
Após clonagem no vetor de expressão pET21b,

Onde se lê (pagina 63, linhas 6-7)
Sugerindo uma função

JULIO C. LEVANO GARCIA

Leia-se
Sugerindo uma possível função

Onde se lê (pagina 71, legenda figura 30 A, linha 5)
Anticorpos secundários conjugados a FITC (verde) ou Cy3 (vermelho)

Leia-se
Anticorpos secundários conjugados a Cy3 (vermelho) ou FITC (verde)

Onde se lê (pagina 86, linha 5)
Subclasses de anticorpos IgG (IgG1, IgG2a, IgG 2b e IgG3).

Leia-se
Subclasses de anticorpos IgG,

Onde se lê (pagina 88, linha 12)
18% e 22%

Leia-se
16% e 20%,

Onde se lê :
Comprimento de onda

Leia-se :
Comprimento de onda

Onde se lê
Th1/ Th2

Leia-se
Th0

Novas referencias adicionadas (pagina 100)

Braschi, S. and Wilson, R.A. (2006). Proteins exposed at the adult schistosome surface revealed by biotinylation. *Mol Cell Proteomics* 5(2): 347-56.

Cardoso, F.C., R.N. Pacifico, R.A. Mortara, and S.C. Oliveira (2006). Human antibody responses of patients living in endemic áreas for schistosomiasis to the tegumental protein Sm29 identified through genomic studies. *Clin Exp Immunol*. **144**: 382-91.

Gryseels, B., Polman, K., Clerinx, J., Kestens, L. (2006). Human schistosomiasis. Lancet **368**(9541): 1106-18.

Shalaby, K.A., L.Yin, A. Thakur, L. Christen, E.G. Niles, and P.T. LoVerde (2003). Protection against *Schistosoma mansoni* utilizing DNA vaccination with genes encoding Cu/Zn cytosolic superoxide dismutase, signal peptide-containing superoxide dismutase and glutathione peroxidase enzymes. Vaccine **22**: 130-36.

Ribeiro de Jesus, A., I. Araujo, O. Bacellar, A. Magalhães, E. Pearce, D. Harn, M. Strand, and E.M. Carvalho (2000). Human immune responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens. Infect. Immun. **68**: 2797-803

ALTERAÇÕES EM FIGURAS

A página 74 deve ser substituída pela página E1 que contém a figura e tabela corrigida.

A página 77 deve ser substituída pela página E2 que contém a figura 35 A corrigida

A página 78 deve ser substituída pela página E3 que contém a figura 35 B e tabela 4 corrigidas.

A página 79 deve ser substituída pela página E4 que contém a figura 36 corrigida.

A página 81 deve ser substituída pela página E5 que contém a figura 38 e tabela 5 corrigidas.

A página 82 deve ser substituída pela página E6 que contém a figura 39 e tabela 6 corrigida.

4. 15. 1. 1 - Ensaio de proteção 1

Foi realizado o ensaio de proteção usando como antígeno a proteína recombinante obtida com a construção APIFRA6/pET21b. Camundongos BALB/c foram imunizados com a proteína recombinante apirase (10 µg/dose contendo 1000 µg de AlOH₃ - 3 doses com intervalos de 7 dias). Os resultados obtidos após o primeiro desafio mostram inicialmente uma baixa porcentagem de proteção de apirase (19%), usando como controle a proteína Sm14 que teve neste ensaio ~27 % de proteção (**figura 32, tabela 3**). Contudo, para todos os casos os *P-values* não foram estatisticamente significantes.

Figura 32. Ensaio de proteção com SmATPDase1: O gráfico mostra as médias de parasitas obtidos em cada grupo avaliado após desafio com cercárias. Api. Eno. (apirase enovelada), Api.De (apirase desnaturada), n = 10.

Tabela 3. Ensaio de proteção com SmATPDase 1.

	media	desvio	% prot	p value
AIOH	35	4,7		
Sm14 (Hen)	25	3,2	27,62	0,23
Apirase enovelada	28	4,3	19,05	0,48
SWAP	30	3,3	15,36	0,51
Apirase denaturada	32	4,0	9,21	0,70

da figura 35A e nos métodos. O oligo CpG ODN tem a sequência 5'-TCCATGACGTTCTGACGTT-3', e foi sintetizado com pontes fosfodiester modificado "phosphorothioate", sendo resistente a nucleases. Previamente ao desafio com cercárias, nos grupos de camundongos imunizados foram analisados os níveis de IgG e o tipo de resposta obtida (Th1 ou Th2) após o terceiro reforço. Os resultados de isotipagem dos anticorpos com ELISA mostraram que os grupos 1 e 3 tiveram os mais altos títulos de IgG1, característico de resposta humoral (**figura 35A**).

Figura 35A. Isotipagem das IgG1 da sangria 4 de camundongos imunizados com SmATPDase1 recombinante. Titulação de IgG1 (resposta humoral). Quatro grupos de animais foram testados (G1 a G4, em cores diferentes), cada um com um esquema de imunização diferente: G1 (apirase + alumínio; reforço com apirase + alumínio), G2 (apirase + CpG oligo; reforço com apirase + CpG), G3 (apirase + alumínio; reforço com apirase + CpG oligo), G4 (apirase + CpG; reforço com apirase + alumínio). n = 10.

A titulação das IgG2a mostrou que o grupo 2 (imunizado com o adjuvante CpG) mostrou o mais alto título, correspondendo a uma resposta imune do tipo celular mais alta, e os grupos 3 e 4 tiveram uma resposta mista Th0 quase no mesmo nível (**figura 35B**).

B

Figura 35B. Isotipagem das IgG2a da sangria 4 de camundongos imunizados com SmATPDase1 recombinante. Titulação de IgG2a (resposta celular). Quatro grupos de animais foram testados (G1 a G4, em cores diferentes), cada um com um esquema de imunização diferente: G1 (apirase + alumínio; reforço com apirase + alumínio), G2 (apirase + CpG oligo; reforço com apirase + CpG), G3 (apirase + alumínio; reforço com apirase + CpG oligo), G4 (apirase + CpG; reforço com apirase + alumínio). n = 10.

A análise dos dados do desafio do segundo experimento (**tabela 4, figura 36**), revelou que houve redução da média da carga parasitária em alguns grupos quando comparados aos animais controle. Infelizmente, não observamos diferenças estatísticas significativas. Podemos, portanto, apenas apontar para uma tendência de redução da carga parasitária dos animais imunizados com a proteína SmATPDase1 nas diferentes formulações.

Tabela 4. Desafio de camundongos C57BL/6 imunizados com a proteína recombinante apirase com diferentes adjuvantes. (n)-número de animais por grupo

	media	Desvio	% Proteção	Teste t
CpG IFA (12)	41	7,8		
Apirase CpG IFA (12)	41	9,1	0,9	0,93
Apirase CpG IFA- Apirase Alum (11)	39	18,4	6,7	0,58
Alum (11)	35	11,8		
Apirase Alum (11)	33	11,5	6,5	0,59
Apirase Alum - Apirase CpG IFA (10)	36	7,8	-3,4	0,77

Figura 36. Ensaio de proteção 2. O gráfico mostra as médias de parasitas obtidos em cada grupo avaliado após desafio com cercárias. **CpG IFA** (Oligos CpG combinado com adjuvante incompleto de Freund). **Alum** (Hidróxido de alumínio)

Assim, a imunização dos camundongos com a proteína SmATPDase1 formulada em hidróxido de alumínio pareceu ser a mais efetiva, com uma redução de 6,5 % na média da carga parasitária e com valor menor de p (0,59). O grupo imunizado com SmATPDase1 em hidróxido de alumínio e reforçado com SmATPDase1 mais oligos CpG, não apresentou uma redução de carga parasitaria e é de muita importância notar que apenas com oligos CpG, não parece ter havido efeito protetor algum.

4. 15. 1. 3 - Ensaio de Proteção 3

Um novo ensaio de proteção contra *Schistosoma mansoni* foi desenhado desta vez usando as duas isoformas separadamente e em conjunto. Baseado na estratégia descrita para ensaio com Tetraspanin (Tran *et al.* 2006), as proteínas foram injetadas junto com o adjuvante completo de Freund (CFA) (ver materiais e métodos). O ensaio possui 4 grupos: grupo 1 (SmATPDase1), grupo 2

SmATPDase2 esta desencadeou uma resposta quase totalmente Th2 ou humoral (**figura 37B**). Neste experimento, é interessante notar o fato que usando o mesmo adjuvante (CFA), cada uma das duas isoformas da enzima gerou respostas imunes diferentes (**figura 37B, esquerda e centro**). A imunização simultânea com as duas isoformas mostrou uma predominância do isotipo IgG1, ou seja novamente uma resposta quase totalmente Th2 ou humoral (**figura 37B, direita**).

Os resultados de proteção usando as duas SmATPDases 1 ou 2 como antígenos mostraram, no caso da SmATPDase1, uma redução da carga parasitária de ~13 % com respeito ao adjuvante CFA (**Tabela 5, figura 38**). No caso da SmATPDase2 e das duas em conjunto, não foi detectada redução da carga parasitária (**Tabela 5**).

Tabela 5. Ensaio de proteção usando as SmATPDases 1 e 2 e adjuvante completo de Freund (CFA).

	Media	% proteção	test- t
Apirase 1	34,8	12,6	0,21
Apirase 2	42,8	-7,899	
Api 1 + Api 2	39,55	0,28	0,98
Controle CFA	39,66

Figura 38. Ensaio de proteção 3. O gráfico mostra as médias de parasitas obtidos em cada grupo avaliado após desafio com cercárias. Camundongos imunizados com SmATPDase1 mostraram a maior redução de carga parasitária (~ 13 %), com respeito ao grupo naíve (cont.neg).

4. 15. 2 - Ensaio de proteção usando SmATPDase1 como Vacina de DNA

Foi realizado um ensaio de proteção usando a forma de vacina de DNA, na qual o cDNA que codifica para a enzima completa foi inoculado, usando-se um protocolo de imunização similar ao usado com a proteína recombinante isolada. Foi observada uma proteção de 16% (**figura 39**) a qual é baixa em termos de proteção, entretanto estes valores analisados com o teste-t mostram significância estatística (**tabela 6**). Neste ensaio somente foram aplicadas duas doses, sendo necessário avaliar três doses e uma maior concentração de DNA.

Tabela 6. Ensaio de proteção usando vacina de DNA.

	Media	desvio	% proteção	test - t
Vetor vazio	73	43	2	
Apirase	67	47	18	0,024

Figura 39. Ensaio preliminar de proteção usando vacina de DNA. O resultado mostra a contagem de parasitas recuperados de camundongos desafiados com cercárias após duas doses de transfeção com o vetor de expressão contendo o gene *SmATPDase1* (Apirase), comparado com a contagem de parasitas em camundongos controle transfectados com o vetor vazio. n = 10.