

HENRIQUE KRAMBECK ROFATTO

**Caracterização molecular das nucleotídeo
pirofosfatases/ fosfodiesterases de
Schistosoma mansoni e investigação como
antígenos vacinais**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Profa. Dra. Luciana Cezar de Cerqueira Leite

Versão original

São Paulo
2013

RESUMO

ROFATTO, H. K. **Caracterização molecular das nucleotídeo pirofosfatases/ fosfodiesterases de *Schistosoma mansoni* e investigação como antígenos vacinais.** 2013. 247 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A esquistossomose é uma doença com particularidades como a endemicidade, a transmissão, a patologia, a morbidade e a cronicidade, as quais devem ser consideradas no planejamento e na implementação de políticas que almejam a erradicação desse problema de saúde pública mundial. Como a quimioterapia não atua sobre todos esses fatores, o desenvolvimento de uma vacina auxiliaria na eliminação dessa doença. Neste trabalho foi caracterizada a família das nucleotídeo pirofosfatases/ fosfodiesterases (NPP) de *S. mansoni*, visando sua avaliação como antígenos vacinais. As enzimas desta família são associadas à membrana, hidrolisam ligações pirofosfato e ligações fosfodiester e são relacionadas a diversos processos biológicos como agregação plaquetária e modulação da sinalização purinérgica e da resposta imune. O *S. mansoni* possui quatro proteínas distintas pertencentes a esta família (SmNPP-5a, SmNPP-5b, SmNPP-5c e SmNPP-6), sendo que para duas delas verificamos maior expressão gênica nos estágios do parasita que infectam o homem. Os genes foram clonados a partir do mRNA de vermes adultos e as proteínas foram expressas de modo heterólogo em *E. coli* e purificadas por cromatografia de afinidade. As proteínas foram utilizadas para produção de anticorpos policlonais, porém apenas os anticorpos anti-SmNPP-5a apresentaram especificidade para a proteína nativa. Foi demonstrado que a SmNPP-5a é uma glicoproteína, cuja expressão aumenta após a infecção do homem e que está associada às membranas do tegumento dos vermes adultos do parasita. Também se verificou que os anticorpos anti-SmNPP-5a eram capazes de inibir parcialmente a atividade da enzima em parasitas vivos. Assim avaliamos a SmNPP-5a como antígeno vacinal juntamente com uma apirase (SmATPDase) e a fosfatase alcalina (SmAP), outras duas nucleotidases envolvidas no metabolismo de nucleotídeos e presentes no tegumento de parasitas adultos. Ambas as proteínas, SmNPP-5 e a SmNTDPase, apresentaram menor imunogenicidade que a SmAP. A SmNPP-5 induziu uma resposta imune celular, porém neutralizada por uma resposta regulatória; enquanto a SmNTDPase induziu uma resposta imune humoral, predominantemente Th2. A SmAP foi a proteína mais imunogênica das três estudadas, induzindo maior expressão de TNF- α e de IL-17 e alto níveis de IgG, especialmente IgG1. Porém só verificamos a redução da carga parasitária em camundongos imunizados com a SmAP, apenas quando os animais também receberam tratamento com doses subcurativas de praziquantel. Não foi observado nenhum efeito protetor devido a imunização com a SmNPP-5a ou com a SmATPDase, associadas ou não com a quimioterapia subcurativa.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*. Vacina. Tegumento. Nucleotídeo pirofosfatase/ fosfodiesterase. Fosfatase alcalina. Apirase. Praziquantel.

ABSTRACT

ROFATTO, H. K. **Molecular characterization of nucleotide pyrophosphatases/ phosphodiesterases of *Schistosoma mansoni* and their investigation as vaccine antigens.** 2013. 247 p. Ph. D. thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Schistosomiasis is a disease with features such as endemicity, transmission, pathology, morbidity and chronicity, which should be considered in the planning and implementation of policies that aim to eradicate this worldwide public health problem. As chemotherapy does not act on all these factors, the development of a vaccine would be helpful to eliminate this disease. Herein the family of nucleotide pyrophosphatases/ phosphodiesterases (NPP) from *S. mansoni* was characterized and their potential as vaccine antigens was evaluated. Enzymes of this family are membrane associated and hydrolyze pyrophosphate and phosphodiester bonds; they are associated with several biological processes such as platelet aggregation and modulation of purinergic signaling and immune responses. *S. mansoni* has four distinct proteins belonging to this family (SmNPP-5a, SmNPP-5b, SmNPP-5c and SmNPP-6), whereas two of them present higher gene expression in stages of parasites that infect humans. The genes were cloned from adult worms mRNA and the proteins were expressed in *E. coli* and purified by affinity chromatography. The proteins were used for polyclonal antibody production, although only the anti-SmNPP-5a showed specificity for the native protein. It was shown that SmNPP-5a is a glycoprotein whose expression increases after infection of humans and it is associated with the tegument membranes of adult worms. It was also found that anti-SmNPP-5a antibodies were able to partially inhibit the activity of the enzyme in live parasites. Thus we evaluated SmNPP-5a as vaccine antigen together with an apyrase (SmATPDase) and alkaline phosphatase (SmAP), two other nucleotidases involved in nucleotide metabolism and present in the tegument of adult parasites. Both proteins, SmNTDPase and SmNPP-5 were less immunogenic than SmAP. The SmNPP-5a induced a cellular immune response counterbalanced by an immunoregulatory response; while SmNTDPase induced a predominantly Th2 humoral immune response. SmAP is the most immunogenic protein of the three studied, inducing increased expression of TNF- α and IL-17 and high levels of IgG, especially IgG1. However, we only verified the reduction of parasite burden in mice immunized with SmAP, when the animals also received a subcurative treatment with praziquantel. We did not observe a protective effect due to immunization with SmNPP-5a or with SmATPDase, associated or not with subcurative chemotherapy.

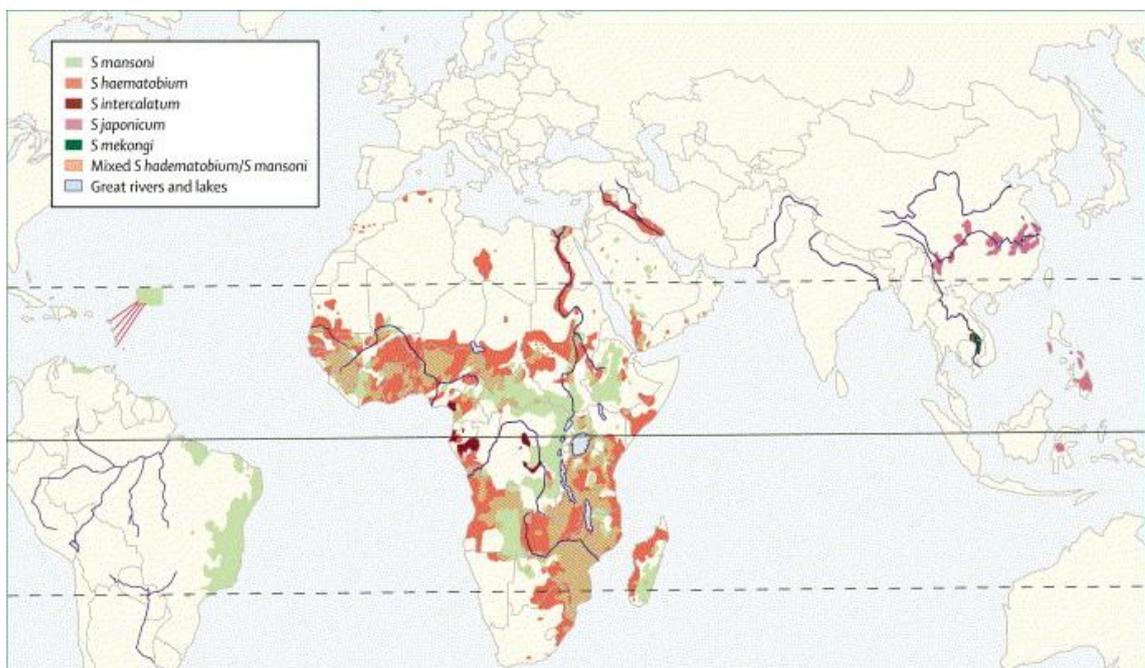
Keywords: *Schistosoma mansoni*. Vaccine. Tegument. Nucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase. Alkaline phosphatase. Apyrase. Praziquantel.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Esquistossomose

A esquistossomose é a doença helmíntica mais grave no mundo devido aos seus índices de morbidade e mortalidade. Essa doença é um problema de saúde pública mundial, pois é endêmica em 74 países, afetando mais de 200 milhões de pessoas, principalmente indivíduos de baixas condições socioeconômicas, na África, Oriente Médio, Sudeste Asiático e América do Sul (Figura 1). Além das pessoas infectadas, estima-se que aproximadamente 800 milhões de pessoas vivam em áreas com alto risco de infecção (BERGQUIST, 2002; KING; DICKMAN; TISCH, 2005; ROSS et al., 2002; STEINMANN et al., 2006). No entanto, as áreas endêmicas têm aumentado nos países em desenvolvimento, devido à criação de novos habitats para o caramujo, através de projetos de irrigação e construções de barragens, e se tornado mais povoadas por causa do crescimento e da migração populacional (AL-SHERBINY et al., 2003).

Figura 1 – Distribuição global da esquistossomose e seus principais agentes etiológicos.



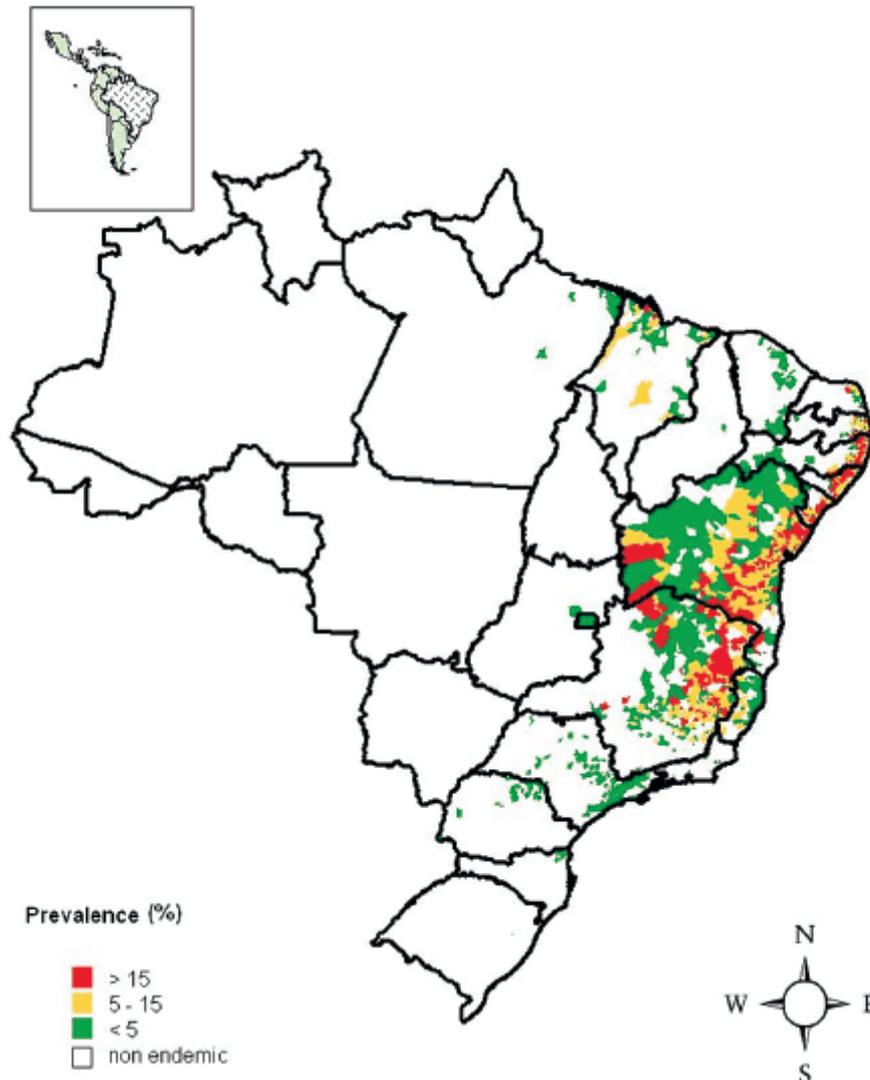
Fonte: (GRYSEELS et al., 2006).

Aproximadamente 10% dos indivíduos infectados apresentam sintomatologia severa da doença, sendo que ela é responsável por 200.000 mortes por ano no mundo (BERGQUIST,

2002). Porém, é consenso entre especialistas que a mortalidade causada por esta doença seja uma parcela pequena do problema, quando comparada aos anos de vida perdidos devido à incapacidade que ela causa (BERGQUIST, 2002). Principalmente se considerarmos que a doença atinge uma grande parcela de crianças abaixo dos 14 anos de idade, causando anemia e prejuízo no desenvolvimento cognitivo e físico, e por ser pouco reconhecida nos estágios iniciais, incapacita os indivíduos na fase mais produtiva de suas vidas (ENGELS et al., 2002). Avalia-se que o índice de DALYs (“Disability-Adjusted Life Years”) para a esquistossomose seja de 1,76 milhões. O DALY é uma medida desenvolvida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para quantificar o impacto global de uma doença sobre a saúde da população. Este índice combina em um único parâmetro os anos de vida perdidos por uma morte prematura e os anos de vida vividos com incapacidade, ou seja, um DALY pode ser considerado como um ano de vida saudável perdido (MICHAUD; GORDON; REICH, 2003). Esse quadro fez com que a esquistossomose fosse selecionada pelo Programa Especial de Treinamento em Doenças Tropicais, da Organização das Nações Unidas, Banco Mundial e OMS como uma das dez doenças tropicais mais importantes para controle (MOREL, 2000).

A esquistossomose é causada por trematódeos hematófagos do gênero *Schistosoma*. As principais espécies patogênicas para o ser humano são: *S. mansoni*, *S. japonicum* e *S. haematobium* (Figura 1). No Brasil, ela é causada exclusivamente pelo *S. mansoni*, afetando mais de seis milhões de indivíduos, em especial nas regiões Nordeste, principalmente no estado da Bahia e na região litorânea, e Sudeste, a maior parte em Minas Gerais (Figura 2; AMARAL et al., 2006). No estado de São Paulo, foram notificados mais de duzentos mil casos nos últimos dez anos, sendo que apenas 10% desse total foram classificados como autóctones (Divisão de Orientação Técnica – SUCEN, 2002).

Figura 2 – Prevalência da esquistossomose no Brasil.

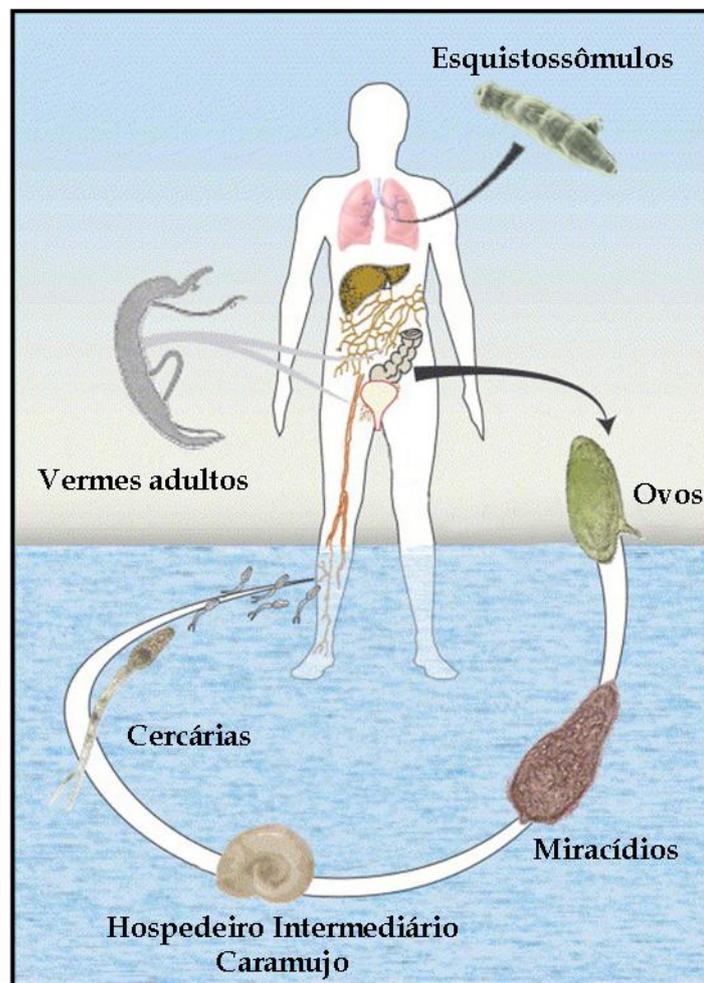


Fonte: (AMARAL et al., 2006).

O *S. mansoni* apresenta um ciclo de vida complexo compreendendo uma fase assexuada de diferenciação e multiplicação por pedogênese no caramujo hospedeiro do gênero *Biomphalaria* e uma fase de reprodução sexuada e oviposição no hospedeiro definitivo, o homem. O ciclo de vida envolve também dois estágios larvais infectantes, o miracídio e a cercária, que são importantes na transferência bem-sucedida do parasita de um hospedeiro para o outro (REY, 2001). Os vermes adultos residem nos vasos mesentéricos do ser humano onde realizam a oviposição. Cada fêmea produz cerca de 400 ovos por dia, os quais podem atingir a luz intestinal e serem excretados com as fezes. Uma vez na água, os miracídios eclodem e infectam o hospedeiro intermediário, o caramujo. No caramujo, cada miracídio se diferencia em esporocistos que originarão uma população clonal de cercárias.

Após serem liberadas na água, as cercárias infectam o homem penetrando na sua pele. Enquanto a cercária atravessa as camadas da pele, se diferencia em esquistossômulo, os quais penetram nos vasos, atingindo a corrente sanguínea. Na corrente sanguínea, os esquistossômulos migram para o pulmão e posteriormente para o sistema porta-hepático, onde eles amadurecem e se diferenciam em vermes adultos machos e fêmeas. Após o amadurecimento sexual, os vermes adultos formam casais, migram para os vasos mesentéricos e começam a produzir os ovos, reiniciando o ciclo (Figura 3; KING, 2009; KING, 2001; MOUNTFORD; HARROP, 1998; RIBEIRO-DOS-SANTOS; VERJOVSKI-ALMEIDA; LEITE, 2006)

Figura 3 – Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*.



Fonte: (adaptado de GRYSEELS et al., 2006).

A patologia da esquistossomose mansônica é decorrente da resposta inflamatória granulomatosa do hospedeiro induzida pelos ovos que não são eliminados com as fezes,

normalmente alojados no fígado e intestino. Posteriormente, essa resposta inflamatória evolui para fibrose e calcificação dos tecidos. A gravidade da doença está relacionada com a notável fecundidade do parasita associada à infecção duradoura, acarretando na deposição de milhões de ovos na mucosa e nos tecidos (CAPRON; CAPRON; RIVEAU, 2002).

Na fase aguda da doença, a reação inflamatória é exacerbada e o granuloma apresenta dimensão superior a 100 vezes o volume do ovo, sendo a sintomatologia variada, desde indivíduos assintomáticos, até os que apresentam febre, mal-estar, tosse, dores musculares, quadro de hepatite aguda, enterocolite aguda e hepatoesplenomegalia discreta. Na fase crônica, a resposta inflamatória é regulada e o granuloma apresenta dimensões bem menores, porém os granulomas hepáticos bloqueiam o sistema porta-hepático levando ao desenvolvimento da circulação colateral do plexo venoso mesentérico e de hipertensão portal. Em infestações severas, o acúmulo dos granulomas hepáticos e sua fibrose contínua, associada à pressão portal elevada, resultam no desenvolvimento de hepatoesplenomegalia. Esse quadro pode evoluir para ascite com o desenvolvimento de varizes esofágicas, as quais podem romper desencadeando hemorragias. Apesar da imensa maioria dos ovos ficarem retidos no sistema venoso portal, alguns podem ser levados pela corrente sanguínea, causando lesões ectópicas em diversos órgãos, como pulmão, miocárdio e sistema nervoso central (BOROS, 1989; CAPRON; CAPRON; RIVEAU, 2002; KING, 2001; REY, 2001).

O tratamento padrão da esquistossomose é a quimioterapia com o praziquantel, cujo desenvolvimento e a redução de seu custo de produção foram determinantes para a diminuição significativa da morbidade em áreas endêmicas (BERGQUIST, 2002; RIBEIRO-DOS-SANTOS; VERJOVSKI-ALMEIDA; LEITE, 2006). Entretanto, a quimioterapia não é eficaz contra os parasitas jovens e também não previne a reinfecção, comum em áreas endêmicas, resultando na necessidade de sucessivos tratamentos, tornando esse método terapêutico dispendioso e pouco eficiente na erradicação da doença, além de evidenciar a necessidade de uma abordagem mais duradoura (BERGQUIST; COLLEY, 1998). Outra desvantagem dessa abordagem terapêutica é que ela não reverte o quadro patológico, portanto, a quimioterapia elimina o parasita, mas não cura o paciente, apenas evita uma progressão do seu quadro clínico. Esse fator é agravado, pois a manifestação da esquistossomose antes da hepatoesplenomegalia tornar-se aparente é negligenciada ou indeterminada (WILSON; COULSON, 1999). Por último, deve-se ressaltar que o tratamento em massa e por um período indefinido das regiões endêmicas aumenta o risco da seleção de parasitas resistentes à droga, já tendo sido reportados baixos índices de cura no Egito e Senegal (FALLON et al., 1995; ISMAIL et al., 1999).

Assim, diante da ineficácia da quimioterapia sob o aspecto da saúde pública, das dificuldades políticas e da falta de recursos para investimento em saúde e em medidas de saneamento básico nos países em desenvolvimento, a estratégia mais eficiente e de menor custo para prevenir doenças severas e mortes seria vacinar os indivíduos susceptíveis à infecção (HOTA-MITCHELL et al., 1999; KATZ, 1999).

1.2 Fundamentos para uma vacina

Uma vacina eficaz contra a esquistossomose preveniria o desenvolvimento e a evolução da patologia, haja vista que os parasitas seriam eliminados antes de iniciarem a oviposição. A vacinação também acabaria com o círculo vicioso de sucessivas infecções, uma vez que interromperia o ciclo de vida do parasita. Modelos matemáticos demonstraram que a vacina não precisaria apresentar imunidade esterilizante e que uma redução de pelo menos 40% na carga parasitária reduziria a morbidade e as taxas de transmissão significativamente (CHAN; BUNDY, 1997). Desse modo, o combate à doença visando sua erradicação seria feita com abordagens complementares: a quimioterapia seria responsável pela redução da carga parasitária em curto prazo, enquanto a imunização proveria proteção à população em longo prazo (BERGQUIST, 1998; BERGQUIST; COLLEY, 1998).

A plausibilidade do desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a esquistossomose está baseada principalmente na imunização de modelos experimentais, tanto roedores quanto primatas, com cercárias atenuadas por irradiação. Nestes experimentos verificou-se que a imunização com cercárias irradiadas foi capaz de induzir até 80% de proteção contra uma infecção subsequente (COULSON, 1997; HEWITSON; HAMBLIN; MOUNTFORD, 2005). Também já foi demonstrada proteção parcial pela imunização com extrato antigênico de diferentes estágios do ciclo de vida do parasita (JAMES, 1986; SMITH; CLEGG, 1985; SMITHERS et al., 1989). Porém, uma vacina para uso em seres humanos baseada em cercárias irradiadas e/ou extratos antigênicos do parasita apresentaria problemas, devido à evidência de que seu uso levaria a um nível significativo de efeitos colaterais e reações alérgicas associadas à mesma. Além da dificuldade para produção de quantidades suficientes de cercárias e antígenos em escala comercial (HAGAN; SHARAF, 2003).

Os diversos relatos de pessoas que vivem em áreas endêmicas e são naturalmente refratárias à infecção e outras que desenvolvem resistência a reinfecção após a quimioterapia também contribuem para fundamentar o desenvolvimento de uma vacina (BUTTERWORTH et al., 1985; CORREA-OLIVEIRA; CALDAS; GAZZINELLI, 2000; DESSEIN et al., 1988;

HAGAN et al., 1991; WILKINS et al., 1987). Assim como os modelos de autocura de *Rattus norvegicus* e *Macaca mulata*, nos quais o parasita é eliminado pelo sistema imune do hospedeiro. A capacidade de *R. norvegicus* em eliminar os parasitas foi associada aos elevados níveis de IgE, induzindo a ativação e degranulação de mastócitos. Enquanto na *M. mulata*, altos níveis de IgG por um período prolongado foram considerados primordiais para inibir o metabolismo dos parasitas, levando-os a inanição e morte (WILSON; COULSON, 2009; WILSON et al., 2008). Há de se considerar ainda as vacinas recombinantes antiparasitárias de uso veterinário que estão sendo desenvolvidas com sucesso, como as vacinas contra *Taenia ovis* e *Echinococcus granulosus* (DALTON; MULCAHY, 2001); e recentemente foi divulgado o início dos testes de avaliação vacinal da proteína Sm14 de *S. mansoni* contra a fasciolose em ovinos (TENDLER; SIMPSON, 2008).

O desenvolvimento de uma vacina contra a esquistossomose é um difícil desafio em função da complexidade do ciclo de vida do parasita, no qual o homem interage com quatro estágios diferentes de desenvolvimento do *S. mansoni* (cercárias, esquistossômulos, vermes adultos e ovos), desenvolvendo respostas imunes diversas e ineficazes (DUPRE et al., 2001). Por isso o principal desafio no desenvolvimento de uma vacina contra esquistossomose é a identificação de antígenos que estimulem no indivíduo uma resposta imune apropriada, acarretando na resistência contra a infecção (YANG et al., 2000). Assim, para avaliar diversos antígenos como candidatos vacinais contra esquistossomose, a OMS em 1995 estabeleceu o desenvolvimento de uma vacina contra a esquistossomose, como uma meta prioritária e organizou testes independentes. Foram avaliados seis antígenos de *S. mansoni*, reflexo dos avanços na área de biologia molecular a partir dos anos 80: uma proteína homóloga à miosina com 63 kDa, uma paramiosina de 97 kDa, uma triose-fosfato-isomerase de 28 kDa, uma proteína integral de membrana com 23 kDa (Sm23), uma proteína ligante de ácidos graxos com 14 kDa (Sm14) e uma glutationa-S-transferase com 28 kDa (Sm28GST). Os resultados destes testes nunca se tornaram públicos, mas a OMS divulgou em nota oficial que nenhum dos antígenos atingiu o objetivo, que era induzir uma redução da carga parasitária igual ou superior a 40% (WILSON; COULSON, 2006). Uma proteína ortóloga a Sm28GST, porém proveniente de *S. haematobium* (Sh28GST), atualmente está sendo avaliada em ensaios clínicos de fase II, devido a sua ação antifecundidade, apesar dos resultados dos testes de fase I nunca terem sido reportados (CAPRON et al., 2001).

Apesar dos resultados controversos desses ensaios, diversos autores defendem a continuidade dos estudos para seleção de novos antígenos vacinais, pois as moléculas selecionadas pela OMS não foram identificadas como secretadas ou expostas na superfície do

parasita, com exceção da Sm23, e atualmente acredita-se que para os antígenos induzirem uma resposta imune protetora eles devem participar da interação parasita-hospedeiro e estar acessíveis aos mecanismos efetores da resposta imune (BERGQUIST, 1998; DOENHOFF, 1998; WILSON; COULSON, 2006).

1.3 Transcriptoma, genoma, vacinologia reversa e proteoma

Em 2003, foi publicado o transcriptoma de *S. mansoni*, aumentando significativamente as informações sobre sua expressão gênica. Foram geradas 163 mil sequências expressas marcadas (EST) de seis estágios do ciclo de vida do parasita (vermes adultos, ovos, miracídios, esporocistos, cercárias e esquistossômulos), que possibilitaram sequenciar fragmentos de 92% dos 14.000 genes expressos preditos. Analisando esses dados, verificou-se que 77% representavam novos fragmentos gênicos do parasita, sendo que 1% deles era de novos parálogos, 20% de novos ortólogos e 55% dos genes codificam para proteínas sem função conhecida (VERJOVSKI-ALMEIDA et al., 2003). Esses novos dados criaram a oportunidade de identificar potenciais candidatos vacinais e alvos para drogas esquistossomicidas (MCMANUS et al., 2004; VERJOVSKI-ALMEIDA et al., 2004).

O genoma do parasita foi sequenciado em 2009, complementando e expandindo as informações disponibilizadas pelo transcriptoma. O genoma do *S. mansoni* possui 363 milhões de bases dispostas em oito pares de cromossomos, sete pares autossômicos e um par de cromossomos sexuais. O sexo é determinado no zigoto por um mecanismo cromossomal, sendo a fêmea heterogamética (ZW) e o macho, homogamético (ZZ). Foram identificados 11.809 genes, cujo tamanho médio é 4,7 kilobases com grandes íntrons e éxons pequenos. O estudo revelou o déficit do parasita no metabolismo de lipídios e identificou receptores de membrana, canais iônicos e proteases do verme como possíveis alvos quimioterápicos. Também foram identificados os gargalos metabólicos do parasita sobre os quais drogas aprovadas para outras aplicações possam ser eficazes (BERRIMAN et al., 2009).

A publicação desses bancos de dados moleculares contendo, teoricamente, toda informação gênica do parasita abriu a perspectiva da abordagem de vacinologia reversa, que consiste na seleção de candidatos vacinais através de programas de bioinformática seguida por uma triagem em larga escala destes antígenos em ensaios de imunização (RAPPUOLI, 2000). Essa técnica foi bem sucedida para propor alvos vacinais promissores para procariotos, como *Neisseria meningitidis* e *Streptococcus agalactiae* (MAIONE et al., 2005; PIZZA et al., 2000). Porém na seleção de candidatos para o Schistosoma e outros patógenos eucariotos

mais complexos, esta abordagem apresenta alguns inconvenientes: I – eles possuem ciclo de vida complexo com diferentes estágios, de modo que nem todos eles infectam o homem, sendo esperado que muitos genes sejam estágio-específico e nunca entrem em contato com o hospedeiro definitivo; II – ao contrário de patógenos unicelulares, o parasita é multicelular e nem todas as proteínas secretadas ou de superfície seriam apresentadas na interface parasita-hospedeiro, dificultando a seleção *in silico*; III – apesar da dedução do quadro aberto de leitura (ORF – *open reading frame*) ser útil, os programas tendem a acumular muitos erros, especialmente nas extremidades de ORFs que geralmente codificam sinais de secreção, devido à *splicings* alternativos do RNA (DEMARCO; VERJOVSKI-ALMEIDA, 2009).

Portanto, a seleção de candidatos vacinais para esquistossomose necessita de uma melhor caracterização pós-genômica destes antígenos, para isso podemos comparar o nível de expressão de muitos genes simultaneamente pela técnica de microarranjo, utilizando o mRNA dos diversos estágios do parasita. Utilizando esta abordagem já foram identificados genes diferencialmente expressos no estágio de esquistossômulos (DILLON et al., 2006), que é considerado o principal alvo do sistema imune no modelo de cercárias irradiadas; os genes com diferentes níveis de expressão em vermes adultos machos e fêmeas (FITZPATRICK et al., 2005; HOFFMANN; JOHNSTON; DUNNE, 2002) e os genes envolvidos no desenvolvimento dos esporocistos (VERMEIRE et al., 2006). Ainda baseada nesta técnica foi desenvolvida uma plataforma que explora todo o transcriptoma de vermes adultos visando avaliar sua expressão gênica quando submetidos a diferentes condições experimentais (VERJOVSKI-ALMEIDA et al., 2007).

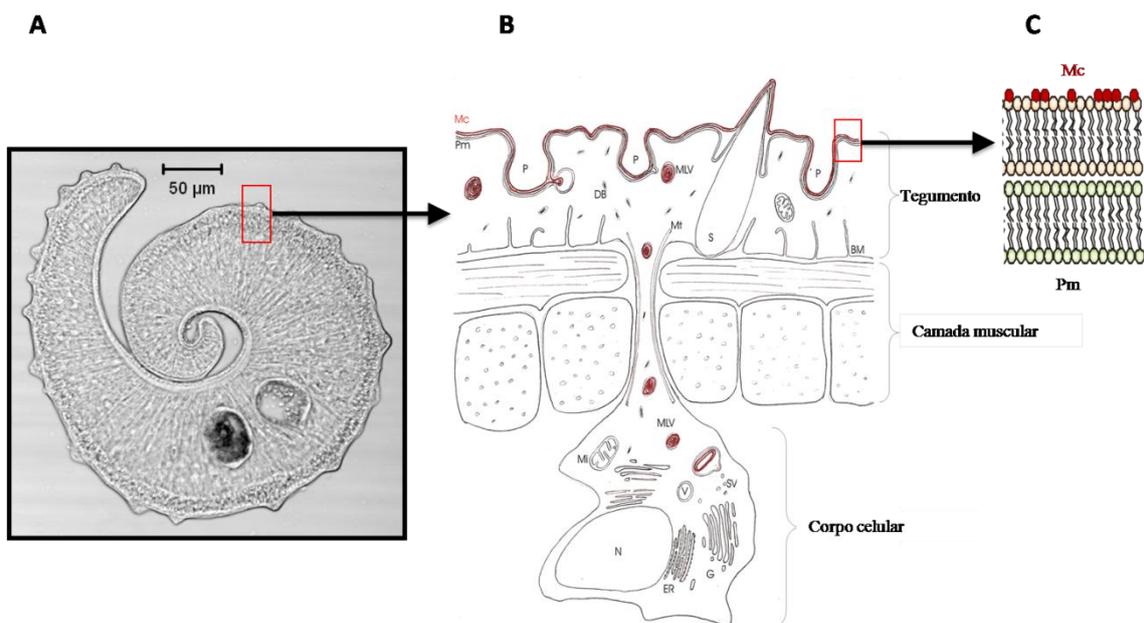
Outra forma para caracterizar e selecionar antígenos é através dos estudos de proteoma que identificam as proteínas mais abundantes em uma amostra por espectrometria de massa. Esses estudos reconheceram as proteínas secretadas por cercárias envolvidas no mecanismo de penetração através da pele e evasão ao sistema imune (CURWEN et al., 2006; HANSELL et al., 2008; KNUDSEN et al., 2005) e as proteínas secretadas por ovos, buscando correlacioná-las com o desenvolvimento da patologia da doença (CASS et al., 2007). Além desses antígenos secretados, utilizando essa técnica, estudou-se a composição protéica do tegumento de vermes adultos com diferentes abordagens: proteínas exclusivas de tegumento e aquelas presentes em vermes nos quais esta estrutura foi retirada (VAN BALKOM et al., 2005), proteínas das membranas do tegumento com relação a sua solubilidade em diferentes agentes caotrópicos. (BRASCHI et al., 2006), as proteínas do tegumento acessíveis a biotinylação, portanto mais expostas em sua superfície (BRASCHI; WILSON, 2006), e as

proteínas liberadas pela digestão enzimática da superfície do tegumento de vermes adultos vivos (CASTRO-BORGES et al., 2011a).

1.4 Tegumento do *Schistosoma mansoni*

Os parasitas adultos são recobertos por uma camada sincicial, denominada tegumento, a qual é a principal interface parasita hospedeiro. Esse sincício está interligado aos corpos celulares por estreitas conexões citoplasmáticas que atravessam as camadas musculares. Nos núcleos está situada toda a maquinaria de produção e exportação protéica, composta por ribossomos, retículo endoplasmático e complexo de Golgi, que produzem e secretam para o sincício dois tipos de vesículas, corpos discóides e vesículas multilaminadas (Figura 4; SKELLY; ALAN WILSON, 2006).

Figura 4 – Tegumento do *Schistosoma mansoni*.



A – Secção transversal de *S. mansoni* macho adulto. B – Representação do tegumento do parasita associado ao corpo celular (sem escala). C – Detalhe das membranas da superfície externa do tegumento. BM: membrana basal; DB: corpos discóides; ER: retículo endoplasmático; G: complexo de Golgi; Mc: membranocálice; Mi: mitocôndria; MLV: vesícula multilaminada; Mt: microtúbulo; N: núcleo; P: covas; Pm: membrana plasmática; S: espinho; SV: vesículas de transporte; V: vacúolo.
Fonte: (adaptado de BRASCHI; BORGES; WILSON, 2006).

A superfície externa do tegumento apresenta uma estrutura “heptalaminada”, considerada uma importante adaptação para a sobrevivência na corrente sanguínea. Esta estrutura é composta por duas bicamadas lipídicas: uma membrana plasmática mais interna e

um membranocálice secretado mais externo. O membranocálice seria formado pela fusão das vesículas multilaminadas, produzidas nos corpos celulares, com a membrana plasmática do tegumento. Essa fusão liberaria o conteúdo das vesículas multilaminadas na interface parasita-hospedeiro e renovaria constantemente a superfície do parasita, seu tempo de meia vida *in vivo* seria de cinco dias (SKELLY; ALAN WILSON, 2006; VAN HELLEMOND et al., 2006).

O tegumento está relacionado aos principais mecanismos de evasão ao sistema imune do hospedeiro como a digestão dos fatores do complemento (FISHELSON, 1995) e aquisição de antígenos do hospedeiro para sua mimetização (SKELLY; ALAN WILSON, 2006). Mas essa estrutura também é importante para outros processos fisiológicos do parasita, tais como nutrição, modulação da excreção, osmoregulação, recepção sensorial e transdução de sinais, demonstrando sua importância para a adaptação e sobrevivência no hospedeiro definitivo e constituindo-se, portanto, em uma importante fonte de potenciais candidatos vacinais (LOUKAS; TRAN; PEARSON, 2007).

1.5 Ectonucleotidases e nucleotídeo pirofosfatases/fosfodiesterases

As ectonucleotidases são enzimas que metabolizam nucleotídeos, na maioria das vezes elas estão associadas à membrana com seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular. Mas isoformas solúveis existem, sendo denominadas exonucleotidases. A máxima eficiência da atividade catalítica destas proteínas é adaptada para as condições do ambiente extracelular, requerendo a presença de cátions divalentes, como cálcio ou magnésio, e pH alcalino. As ectonucleotidases atuam no complexo metabolismo nucleotídico de modo orquestrado: várias famílias de proteínas, cada uma contendo várias espécies de enzimas semelhantes, hidrolisam diversos nucleotídeos extracelulares. Portanto, o mesmo nucleotídeo pode ser hidrolisado por diversas enzimas, dependendo do padrão de expressão gênica do tecido ou célula. É provável que enzimas pertencentes a diferentes famílias estejam colocalizadas em células individuais ou nas superfícies teciduais refutando a antiga idéia de que uma única enzima era responsável pela hidrólise de um único substrato (Zimmermann, 2000).

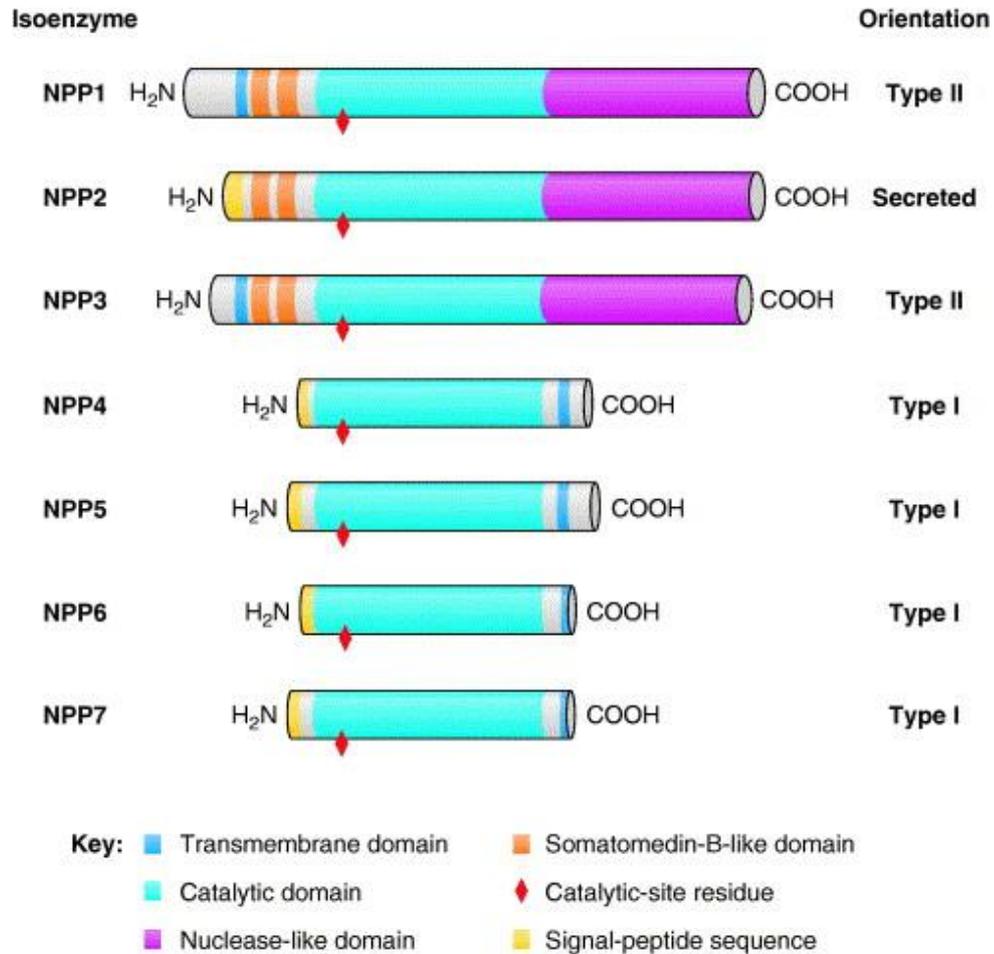
As ectonucleotidases conhecidas incluem membros das famílias E-NTPDase (“ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase”), E-NPP (“ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase”), fosfatases alcalinas e ecto-5'-nucleotidases (ZIMMERMANN, 2000). A presença de ectonucleotidases no tegumento de *S. mansoni* foi demonstrada há muito tempo por meio dos estudos de atividade enzimática (CESARI; SIMPSON; EVANS, 1981) e

confirmada recentemente pelos estudos de proteoma que identificaram três proteínas: uma ATPDase, uma fosfatase alcalina e uma NPP (BRASCHI et al., 2006; BRASCHI; WILSON, 2006; VAN BALKOM et al., 2005). A fosfatase alcalina talvez seja a enzima mais estudada de *S. mansoni* (BALLEN et al., 2002; BHARDWAJ; SKELLY, 2011; CESARI, 1974; DUSANIC, 1959; NIMMO-SMITH; STANDEN, 1963; PAYARES; SMITHERS; EVANS, 1984), sendo inclusive utilizada como marcador para extração do tegumento (ROBERTS et al., 1983). Duas isoformas de NTPDase, denominadas SmATPDase 1 e 2, foram caracterizadas como tegumentares (DEMARCO et al., 2003; LEVANO-GARCIA et al., 2007) e epítomos comuns entre elas e a apirase de batata já foram descritos (FARIA-PINTO et al., 2010; FARIA-PINTO et al., 2008), porém, não há uma melhor caracterização da NPP afora sua identificação.

As NPPs (do inglês, *nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase*) são ectoenzimas estruturalmente relacionadas, que *in vitro* são capazes de hidrolisar ligações pirofosfato, como a do ATP, e ligações fosfodiéster, como a de oligonucleotídeos, resultando na liberação de nucleosídeos 5' monofosfatados (BOLLEN et al., 2000). Atualmente estão descritas sete isoformas de NPPs em seres humanos, numeradas conforme sua ordem de descoberta; todas apresentam um domínio catalítico extracelular com aproximadamente 400 resíduos de aminoácidos. Além do domínio catalítico, as isoformas NPP4-7 apresentam um peptídeo sinal putativo N-terminal e um domínio transmembrana C-terminal. Portanto, são proteínas transmembranas do tipo I. As isoformas NPP1 e NPP3 são proteínas transmembranas do tipo II, apresentando um domínio transmembrana N-terminal, dois domínios “*somatomedin-B like*” consecutivos, o domínio catalítico e um domínio “*nuclease-like*” C-terminal. A isoforma NPP2 apresenta quase todos os domínios das isoformas NPP1 e NPP3; porém, ao invés do domínio transmembrana, apresenta um peptídeo sinal, sendo uma proteína secretada e não transmembrana (Figura 5; STEFAN; JANSEN; BOLLEN, 2005).

Figura 5 – Estrutura das sete NPPs de seres humanos.

Isoforma	Orientação
	Tipo II
	Secretada
	Tipo II
	Tipo I
	Tipo I



Fonte: (adaptado de STEFAN; JANSEN; BOLLEN, 2005).

O sítio catalítico das NPPs possui uma similaridade estrutural muito grande com a superfamília das “*phospho- or sulfo-coordinating metalloenzymes*”, que inclui também as fosfatases alcalinas, apresentando estruturas conservadas como resíduos de aminoácidos que coordenam a interação com dois metais divalentes essenciais à atividade enzimática e a disposição espacial relativa desses metais a importantes resíduos de aminoácidos do sítio catalítico. Baseando-se nestas informações foi proposta uma teoria para o mecanismo de catálise das NPPs, que aconteceria em duas etapas. Na primeira etapa da catálise, o grupamento hidroxila do sítio catalítico treonina, ativado por um dos metais divalente, atacaria o grupo fosfato do substrato, resultando na formação de uma estrutura covalente intermediária. No segundo passo, uma molécula de água ativada pelo outro metal divalente atacaria essa estrutura intermediária, restaurando o sítio catalítico da treonina e liberaria um nucleosídeo 5'-monofosfato (GIJSBERS et al., 2001).

As NPPs atuam na reciclagem de nucleotídeos, no controle dos níveis extracelulares de pirofosfato, na estimulação da motilidade celular, na modulação da sinalização de

receptores purinérgicos e possivelmente estão envolvidas no controle da sinalização dos receptores de insulina e na atividade de ecto-quinases. Essas proteínas já foram relacionadas a diversos processos biológicos: neurotransmissão, neuroproteção à isquemia e hipóxia, regulação das funções cardiovasculares, agregação plaquetária, contração da musculatura lisa, secreção de hormônios, modulação da resposta imune e controle da apoptose, da proliferação e da diferenciação celular (GODING; GROBBEN; SLEGGERS, 2003).

1.6 Sinalização purinérgica

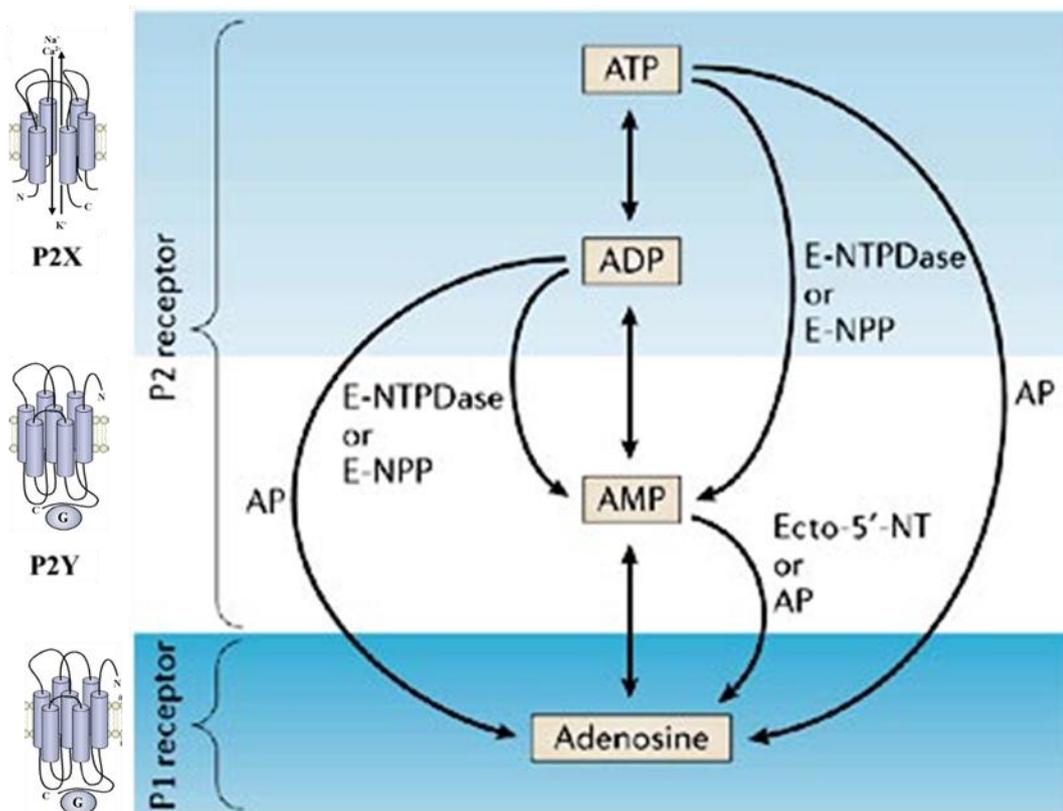
Em 1972, o termo “purinérgico” foi utilizado pela primeira vez por Burnstock para descrever a sinalização na qual o ATP era a molécula mensageira extracelular; naquela época essa foi uma idéia bastante radical. Desde então, a importância da sinalização purinérgica envolvendo não apenas ATP, mas outros nucleotídeos trifosfatados e bifosfatados, tornou-se cada vez mais evidente (ABBRACCHIO; BURNSTOCK, 1998). Atualmente, nucleotídeos extracelulares são considerados moléculas sinalizadoras autócrinas e parácrinas que modulam uma grande variedade de respostas fisiológicas em diversos tecidos de mamíferos. Essa sinalização consiste na liberação de nucleotídeos para o meio extracelular, que interagem de modo seletivo a receptores específicos; essa ligação desencadeia uma cascata de reações bioquímicas variáveis resultando em diversos efeitos fisiológicos (GOUNARIS; SELKIRK, 2005).

Os nucleotídeos sinalizadores podem ser secretados de modo regular, ou podem ser liberados por estimulação mecânica, haja vista que danos teciduais resultam em liberação massiva para os fluidos extracelulares; desse modo, nucleotídeos extracelulares são ativadores arquetípicos do sistema imune inato. Nas células hematopoiéticas, em específico, os receptores nucleotídicos estimulam diversas ações, incluindo: agregação plaquetária e liberação de mediadores; degranulação de mastócitos, neutrófilos e eosinófilos; produção de citocinas por células T, monócitos e macrófagos; ativação e diferenciação de células dendríticas (GOUNARIS; SELKIRK, 2005).

Os receptores da sinalização purinérgica são específicos e podem ser de dois tipos, P1 ou P2. Os receptores P1 são acoplados a proteína G e apresentam quatro subtipos que são ativados pela adenosina. Enquanto os receptores P2 apresentam 2 subtipos: receptores P2X, específico para ATP, e receptores P2Y ativados por ATP, ADP, UTP, UDP, ITP e açúcares nucleotídicos. Os receptores P2X são canais iônicos regulados pelo nucleotídeo ligante, enquanto receptores P2Y são receptores acoplados a proteína G (SANSOM; ROBSON;

HARTLAND, 2008). Regulando a concentração extracelular dos nucleotídeos extracelulares por meio de sua hidrólise, as ectonucleotidasas são capazes de modular a sinalização purinérgica. As NTPDases e as NPPs hidrolizam nucleosídeos 5'-trifosfatados e 5'-difosfatados liberando um grupamento fosfato inorgânico, enquanto as fosfatases alcalinas e as 5'-nucleotidasas convertem o nucleotídeo em nucleosídeo. No entanto, enquanto as 5'-nucleotidasas hidrolisam apenas nucleotídeos monofosfatados, as fosfatases alcalinas produzem nucleosídeos a partir de nucleotídeos mono, di e trifosfatados (Figura 6. ZIMMERMANN, 2000)

Figura 6 – Produtos da hidrólise do ATP pelas ectonucleotidasas e seus respectivos receptores purinérgicos.



E-NTPDase – ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase; E-NPP – ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase; Ecto-5'-NT – ecto-5'-nucleotidase; AP – fosfatase alcalina.

Fonte: (adaptado de FIELDS; BURNSTOCK, 2006).

Já foi hipotetizado que a expressão destas ectonucleotidasas na interface parasita-hospedeiro foi provavelmente uma adaptação evolutiva dos parasitas selecionada para alterar a disponibilidade e a concentração local de nucleotídeos extracelulares, visando regular a ativação de receptores purinérgicos e a resposta inflamatória subsequente. Essa estratégia

seria vantajosa para parasitas hematófagos, patógenos que causam danos aos tecidos ou espécies que residam no sistema vascular, pois inibiria a agregação plaquetária e a subsequente liberação de nucleotídeos pró-inflamatórios. Esta seria, portanto, uma característica conservada evolutivamente e subestimada em diversos organismos infecciosos, como por exemplo, o *Schistosoma* (GOUNARIS; SELKIRK, 2005).

2 CONCLUSÃO

Nesse trabalho foram identificadas quatro nucleotídeo pirofosfatases/fosfodiesterases no genoma do *S. manoni*. Verificamos que duas dessas proteínas apresentavam-se mais expressas nos estágios intramamíferos, sendo provavelmente importantes para adaptação e sobrevivência do parasita. As proteínas foram expressas de modo heterólogo em *E. coli*, mas não apresentaram atividade enzimática. Conseguimos produzir um anticorpo específico contra a SmNPP-5a, o qual foi utilizado para realizar a caracterização desta enzima como uma glicoproteína associada as membranas do tegumento do parasita, que são produzidas e secretadas para sua superfície durante a transformação cercariana no processo de infecção. Também demonstramos que essa proteína estaria acessível ao sistema imune do hospedeiro, pois conseguimos inibir parcialmente sua atividade enzimática em parasitas vivos incubando-os com anticorpos. Essas características fizeram da SmNPP-5a um promissor antígeno vacinal. Por último foram feitos ensaios de hibridização *in situ* e observado que as *smnpps* têm sua expressão associada aos tecidos reprodutores de parasitas adultos. Esses dados abriram novas perspectivas de estudos visando elucidar melhor a relação e a função destas proteínas com a reprodução do *S. mansoni* para se entender melhor o papel destas enzimas na biologia do parasita.

Em uma segunda parte do projeto nós avaliamos como antígenos vacinais, não apenas a SmNPP-5a que apresentou características tidas como importantes para um candidato vacinal, mas também as outras duas nucleotidases do tegumento previamente caracterizadas e extensivamente propostas na literatura com alvos vacinais, a SmFA e SmATPDase. A SmFA foi a proteína mais imunogênica das três, induzindo uma resposta predominantemente Th2, com altos níveis de IgG1 associados a uma maior expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-17. Apesar de somente a imunização desta proteína na formulação utilizada não ser capaz de induzir proteção nos camundongos infectados, sua associação a um tratamento com doses subcurativas de praziquantel tornou-a efetiva. Tanto a SmNPP-5a quanto a SmNTPDase apresentaram baixa imunogenicidade na formulação utilizadas e não foram capazes de conferir proteção aos animais imunizados, mesmo quando associados ao tratamento com praziquantel. A SmNPP-5a apresentou uma resposta imune caracterizada pela maior expressão relativa da citocina reguladora TGF- β , enquanto a SmATPDase induziu uma resposta predominantemente Th2. Esses dados demonstram que a SmFA é a nucleotidase do tegumento mais promissora como candidato vacinal e advoga por novos estudos, visando

otimizar sua expressão e tornar seu enovelamento mais próximo da proteína nativa, para sua avaliação como antígeno vacinal com diferentes adjuvantes e protocolos de imunização.

Os resultados indicaram que a SmFA possa vir a ser utilizada em uma vacina composta por um coquetel de antígenos, principalmente se as outras proteínas que compõe o coquetel induzirem uma resposta imune que possui como alvo o tegumento do parasita. Esses dados destacam ainda a importância de investigar diferentes regimes de imunização associados com agentes quimioterápicos.

REFERÊNCIAS*

ABBACCHIO, M. P.; BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: pathophysiological roles. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 78, n. 2, p. 113-145, 1998.

AL-SHERBINY, M.; OSMAN, A.; BARAKAT, R.; EL MORSHEDY, H.; BERGQUIST, R.; OLDS, R. In vitro cellular and humoral responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens. **Acta Tropica**, v. 88, n. 2, p. 117-130, 2003.

AMARAL, R. S.; TAUIL, P. L.; LIMA, D. D.; ENGELS, D. An analysis of the impact of the Schistosomiasis Control Programme in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 79-85, 2006.

ARAUJO-MONTOYA, B. O.; ROFATTO, H. K.; TARARAM, C. A.; FARIAS, L. P.; OLIVEIRA, K. C.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; WILSON, R. A.; LEITE, L. C. *Schistosoma mansoni*: molecular characterization of Alkaline Phosphatase and expression patterns across life cycle stages. **Experimental Parasitology**, v. 129, n. 3, p. 284-291, 2011.

BALLEN, D.; THERON, A.; POINTIER, J. P.; COUSTAU, C.; CESARI, I. M. *Schistosoma mansoni*: identification of a possible daughter sporocyst alkaline phosphatase. **Experimental Parasitology**, v. 101, n. 2-3, p. 164-167, 2002.

BASCH, P. F. Cultivation of *Schistosoma mansoni* in vitro. I. Establishment of cultures from cercariae and development until pairing. **Journal of Parasitology**, v. 67, n. 2, p. 179-185, 1981.

BERGQUIST, N. R.; COLLEY, D. G. Schistosomiasis vaccine: research to development. **Parasitology Today**, v. 14, n. 3, p. 99-104, 1998.

BERGQUIST, N. R. Schistosomiasis vaccine development: progress and prospects. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 95-101, 1998.

BERGQUIST, N. R. Schistosomiasis: from risk assessment to control. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 7, p. 309-314, 2002.

BERRIMAN, M.; HAAS, B. J.; LOVERDE, P. T.; WILSON, R. A.; DILLON, G. P.; CERQUEIRA, G. C.; MASHIYAMA, S. T.; AL-LAZIKANI, B.; ANDRADE, L. F.; ASHTON, P. D.; ASLETT, M. A.; BARTHOLOMEU, D. C.; BLANDIN, G.; CAFFREY, C. R.; COGHLAN, A.; COULSON, R.; DAY, T. A.; DELCHER, A.; DEMARCO, R.; DJIKENG, A.; EYRE, T.; GAMBLE, J. A.; GHEDIN, E.; GU, Y.; HERTZ-FOWLER, C.; HIRAI, H.; HIRAI, Y.; HOUSTON, R.; IVENS, A.; JOHNSTON, D. A.; LACERDA, D.; MACEDO, C. D.; MCVEIGH, P.; NING, Z.; OLIVEIRA, G.; OVERINGTON, J. P.; PARKHILL, J.; PERTEA, M.; PIERCE, R. J.; PROTASIO, A. V.; QUAIL, M. A.; RAJANDREAM, M. A.; ROGERS, J.; SAJID, M.; SALZBERG, S. L.; STANKE, M.; TIVEY, A. R.; WHITE, O.; WILLIAMS, D. L.; WORTMAN, J.; WU, W.; ZAMANIAN, M.; ZERLOTINI, A.; FRASER-LIGGETT, C. M.; BARRELL, B. G.; EL-SAYED, N. M. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. **Nature**, v. 460, n. 7253, p. 352-358, 2009.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICA. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BHARDWAJ, R.; SKELLY, P. J. Purinergic signaling and immune modulation at the schistosome surface? **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 6, p. 256-260, 2009.

BHARDWAJ, R.; SKELLY, P. J. Characterization of schistosome tegumental alkaline phosphatase (SmAP). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 4, p. e1011, 2011.

BHARDWAJ, R.; KRAUTZ-PETERSON, G.; DA'DARA, A.; TZIPORI, S.; SKELLY, P. J. Tegumental phosphodiesterase SmNPP-5 is a virulence factor for schistosomes. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 10, p. 4276-4284, 2011.

BOLLEN, M.; GIJSBERS, R.; CEULEMANS, H.; STALMANS, W.; STEFAN, C. Nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases on the move. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, n. 6, p. 393-432, 2000.

BOROS, D. L. Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 2, n. 3, p. 250-269, 1989.

BRASCHI, S.; BORGES, W. C.; WILSON, R. A. Proteomic analysis of the schistosome tegument and its surface membranes. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 205-212, 2006.

BRASCHI, S.; WILSON, R. A. Proteins exposed at the adult schistosome surface revealed by biotinylation. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 5, n. 2, p. 347-356, 2006.

BRASCHI, S.; CURWEN, R. S.; ASHTON, P. D.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; WILSON, A. The tegument surface membranes of the human blood parasite *Schistosoma mansoni*: a proteomic analysis after differential extraction. **Proteomics**, v. 6, n. 5, p. 1471-1482, 2006.

BRINDLEY, P. J.; SHER, A. The chemotherapeutic effect of praziquantel against *Schistosoma mansoni* is dependent on host antibody response. **Journal of Immunology**, v. 139, n. 1, p. 215-220, 1987.

BRINDLEY, P. J.; STRAND, M.; NORDEN, A. P.; SHER, A. Role of host antibody in the chemotherapeutic action of praziquantel against *Schistosoma mansoni*: identification of target antigens. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 34, n. 2, p. 99-108, 1989.

BUTTERWORTH, A. E.; CAPRON, M.; CORDINGLEY, J. S.; DALTON, P. R.; DUNNE, D. W.; KARIUKI, H. C.; KIMANI, G.; KOECH, D.; MUGAMBI, M.; OUMA, J. H.; ET AL. Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni. II. Identification of resistant individuals, and analysis of their immune responses. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 3, p. 393-408, 1985.

CAPRON, A.; CAPRON, M.; DOMBROWICZ, D.; RIVEAU, G. Vaccine strategies against schistosomiasis: from concepts to clinical trials. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 124, n. 1-3, p. 9-15, 2001.

CAPRON, A.; CAPRON, M.; RIVEAU, G. Vaccine development against schistosomiasis from concepts to clinical trials. **British Medical Bulletin**, v. 62, p. 139-148, 2002.

CARDOSO, F. C.; PACIFICO, R. N.; MORTARA, R. A.; OLIVEIRA, S. C. Human antibody responses of patients living in endemic areas for schistosomiasis to the tegumental protein Sm29 identified through genomic studies. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 144, n. 3, p. 382-391, 2006.

CARDOSO, F. C.; MACEDO, G. C.; GAVA, E.; KITTEN, G. T.; MATI, V. L.; DE MELO, A. L.; CALIARI, M. V.; ALMEIDA, G. T.; VENANCIO, T. M.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; OLIVEIRA, S. C. *Schistosoma mansoni* tegument protein sm29 is able to induce a th1-type of immune response and protection against parasite infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 10, p. e308, 2008.

CASS, C. L.; JOHNSON, J. R.; CALIFF, L. L.; XU, T.; HERNANDEZ, H. J.; STADECKER, M. J.; YATES, J. R., 3RD; WILLIAMS, D. L. Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* egg secretions. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 155, n. 2, p. 84-93, 2007.

CASTRO-BORGES, W.; DOWLE, A.; CURWEN, R. S.; THOMAS-OATES, J.; WILSON, R. A. Enzymatic shaving of the tegument surface of live schistosomes for proteomic analysis: a rational approach to select vaccine candidates. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 3, p. e993, 2011a.

CASTRO-BORGES, W.; SIMPSON, D. M.; DOWLE, A.; CURWEN, R. S.; THOMAS-OATES, J.; BEYNON, R. J.; WILSON, R. A. Abundance of tegument surface proteins in the human blood fluke *Schistosoma mansoni* determined by QconCAT proteomics. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 9, p. 1519-1533, 2011b.

CAULADA-BENEDETTI, Z.; AL-ZAMEL, F.; SHER, A.; JAMES, S. Comparison of Th1- and Th2-associated immune reactivities stimulated by single versus multiple vaccination of mice with irradiated *Schistosoma mansoni* cercariae. **Journal of Immunology**, v. 146, n. 5, p. 1655-1660, 1991.

CESARI, I. M. *Schistosoma mansoni*: distribution and characteristics of alkaline and acid phosphatase. **Experimental Parasitology**, v. 36, n. 3, p. 405-414, 1974.

CESARI, I. M.; SIMPSON, A. J.; EVANS, W. H. Properties of a series of tegumental membrane-bound phosphohydrolase activities of *Schistosoma mansoni*. **Biochemical Journal**, v. 198, n. 3, p. 467-473, 1981.

CESARI, I. M.; BOUTY, I.; BOUT, D.; DE NOYA, B. A.; HOEBEKE, J. Parasite enzymes as a tool to investigate immune responses. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, p. 55-65, 1992.

CHAN, M. S.; BUNDY, D. A. Modelling the dynamic effects of community chemotherapy on patterns of morbidity due to *Schistosoma mansoni*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, n. 2, p. 216-220, 1997.

CHURA-CHAMBI, R. M.; GENOVA, L. A.; AFFONSO, R.; MORGANTI, L. Refolding of endostatin from inclusion bodies using high hydrostatic pressure. **Analytical Biochemistry**, v. 379, n. 1, p. 32-39, 2008.

CORREA-OLIVEIRA, R.; CALDAS, I. R.; GAZZINELLI, G. Natural versus drug-induced resistance in *Schistosoma mansoni* infection. **Parasitology Today**, v. 16, n. 9, p. 397-399, 2000.

COULSON, P. S. The radiation-attenuated vaccine against schistosomes in animal models: paradigm for a human vaccine? **Advances in Parasitology**, v. 39, p. 271-336, 1997.

CURWEN, R. S.; ASHTON, P. D.; SUNDARALINGAM, S.; WILSON, R. A. Identification of novel proteases and immunomodulators in the secretions of schistosome cercariae that facilitate host entry. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 5, n. 5, p. 835-844, 2006.

DALTON, J. P.; DAY, S. R.; DREW, A. C.; BRINDLEY, P. J. A method for the isolation of schistosome eggs and miracidia free of contaminating host tissues. **Parasitology**, v. 115, p. 29-32, 1997.

DALTON, J. P.; MULCAHY, G. Parasite vaccines--a reality? **Veterinary Parasitology**, v. 98, n. 1-3, p. 149-167, 2001.

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

DEMARCO, R.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. Schistosomes--proteomics studies for potential novel vaccines and drug targets. **Drug Discovery Today**, v. 14, n. 9-10, p. 472-478, 2009.

DESSEIN, A. J.; BEGLEY, M.; DEMEURE, C.; CAILLOL, D.; FUERI, J.; DOS REIS, M. G.; ANDRADE, Z. A.; PRATA, A.; BINA, J. C. Human resistance to *Schistosoma mansoni* is associated with IgG reactivity to a 37-kDa larval surface antigen. **Journal of Immunology**, v. 140, n. 8, p. 2727-2736, 1988.

DILLON, G. P.; FELTWELL, T.; SKELTON, J. P.; ASHTON, P. D.; COULSON, P. S.; QUAIL, M. A.; NIKOLAIDOU-KATSARIDOU, N.; WILSON, R. A.; IVENS, A. C. Microarray analysis identifies genes preferentially expressed in the lung schistosomulum of *Schistosoma mansoni*. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 1, p. 1-8, 2006.

DILLON, G. P.; ILLES, J. C.; ISAACS, H. V.; WILSON, R. A. Patterns of gene expression in schistosomes: localization by whole mount in situ hybridization. **Parasitology**, v. 134, n. 11, p. 1589-1597, 2007.

DOENHOFF, M. J.; MODHA, J.; LAMBERTUCCI, J. R. Anti-schistosome chemotherapy enhanced by antibodies specific for a parasite esterase. **Immunology**, v. 65, n. 4, p. 507-510, 1988.

DOENHOFF, M. J. A Vaccine for Schistosomiasis: alternative approaches. **Parasitology Today**, v. 14, n. 3, p. 105-109, 1998.

DUPRE, L.; KREMER, L.; WOLOWCZUK, I.; RIVEAU, G.; CAPRON, A.; LOCHT, C. Immunostimulatory effect of IL-18-encoding plasmid in DNA vaccination against murine *Schistosoma mansoni* infection. **Vaccine**, v. 19, n. 11-12, p. 1373-1380, 2001.

DUSANIC, D. G. Histochemical observations of alkaline phosphatase in *Schistosoma mansoni*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 105, n. 1, p. 1-8, 1959.

EL RIDI, R.; TALLIMA, H. Vaccine-induced protection against murine schistosomiasis mansoni with larval excretory-secretory antigens and papain or type-2 cytokines. **Journal of Parasitology**, 2012. In press.

ENGELS, D.; CHITSULO, L.; MONTRESOR, A.; SAVIOLI, L. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. **Acta Tropica**, v. 82, n. 2, p. 139-146, 2002.

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

FALLON, P. G.; STURROCK, R. F.; NIANG, A. C.; DOENHOFF, M. J. Short report: diminished susceptibility to praziquantel in a Senegal isolate of *Schistosoma mansoni*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 53, n. 1, p. 61-62, 1995.

FALLON, P. G.; DOENHOFF, M. J. Active immunization of mice with *Schistosoma mansoni* worm membrane antigens enhances efficacy of praziquantel. **Parasite Immunology**, v. 17, n. 5, p. 261-268, 1995.

FARIA-PINTO, P.; REZENDE-SOARES, F. A.; MOLICA, A. M.; MONTESANO, M. A.; MARQUES, M. J.; ROCHA, M. O.; GOMES, J. A.; ENK, M. J.; CORREA-OLIVEIRA, R.; COELHO, P. M.; NETO, S. M.; FRANCO, O. L.; VASCONCELOS, E. G. Mapping of the conserved antigenic domains shared between potato apyrase and parasite ATP diphosphohydrolases: potential application in human parasitic diseases. **Parasitology**, v. 135, n. 8, p. 943-953, 2008.

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

FIELDS, R. D.; BURNSTOCK, G. Purinergic signalling in neuron-glia interactions. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 6, p. 423-436, 2006.

FISHELSON, Z. Novel mechanisms of immune evasion by *Schistosoma mansoni*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, n. 2, p. 289-292, 1995.

FITZPATRICK, J. M.; JOHNSTON, D. A.; WILLIAMS, G. W.; WILLIAMS, D. J.; FREEMAN, T. C.; DUNNE, D. W.; HOFFMANN, K. F. An oligonucleotide microarray for transcriptome analysis of *Schistosoma mansoni* and its application/use to investigate gender-associated gene expression. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 141, n. 1, p. 1-13, 2005.

FURSTENAU, C. R.; TRENTIN DDA, S.; BARRETO-CHAVES, M. L.; SARKIS, J. J. Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase as part of a multiple system for nucleotide hydrolysis by platelets from rats: kinetic characterization and biochemical properties. **Platelets**, v. 17, n. 2, p. 84-91, 2006.

GIJSBERS, R.; CEULEMANS, H.; STALMANS, W.; BOLLEN, M. Structural and catalytic similarities between nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases and alkaline phosphatases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 2, p. 1361-1368, 2001.

GODING, J. W.; GROBBEN, B.; SLEGGERS, H. Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1638, n. 1, p. 1-19, 2003.

GOUNARIS, K.; SELKIRK, M. E. Parasite nucleotide-metabolizing enzymes and host purinergic signalling. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 1, p. 17-21, 2005.

GRYSEELS, B.; POLMAN, K.; CLERINX, J.; KESTENS, L. Human schistosomiasis. **Lancet**, v. 368, n. 9541, p. 1106-1118, 2006.

HAGAN, P.; BLUMENTHAL, U. J.; DUNN, D.; SIMPSON, A. J.; WILKINS, H. A. Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*. **Nature**, v. 349, n. 6306, p. 243-245, 1991.

HAGAN, P.; SHARAF, O. Schistosomiasis vaccines. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 3, n. 8, p. 1271-1278, 2003.

HANSELL, E.; BRASCHI, S.; MEDZIHRADESKY, K. F.; SAJID, M.; DEBNATH, M.; INGRAM, J.; LIM, K. C.; MCKERROW, J. H. Proteomic analysis of skin invasion by blood fluke larvae. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 7, p. e262, 2008.

HARLAND, R. M. In situ hybridization: an improved whole-mount method for *Xenopus* embryos. **Methods in Cell Biology**, v. 36, n. 1, p. 685-695, 1991.

HEWITSON, J. P.; HAMBLIN, P. A.; MOUNTFORD, A. P. Immunity induced by the radiation-attenuated schistosome vaccine. **Parasite Immunology**, v. 27, n. 7-8, p. 271-280, 2005.

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

HOFFMANN, K. F.; JOHNSTON, D. A.; DUNNE, D. W. Identification of *Schistosoma mansoni* gender-associated gene transcripts by cDNA microarray profiling. **Genome Biology**, v. 3, n. 8, p. 01-12, 2002.

HOKKE, C. H.; FITZPATRICK, J. M.; HOFFMANN, K. F. Integrating transcriptome, proteome and glycome analyses of *Schistosoma* biology. **Trends in Parasitology**, v. 23, n. 4, p. 165-174, 2007.

HOTA-MITCHELL, S.; CLARKE, M. W.; PODESTA, R. B.; DEKABAN, G. A. Recombinant vaccinia viruses and gene gun vectors expressing the large subunit of *Schistosoma mansoni* calpain used in a murine immunization-challenge model. **Vaccine**, v. 17, n. 11-12, p. 1338-1354, 1999.

INO, H. Antigen retrieval by heating en bloc for pre-fixed frozen material. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 51, n. 8, p. 995-1003, 2003.

ISMAIL, M.; BOTROS, S.; METWALLY, A.; WILLIAM, S.; FARGHALLY, A.; TAO, L. F.; DAY, T. A.; BENNETT, J. L. Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from Egyptian villagers. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, n. 6, p. 932-935, 1999.

JAMES, S. L. Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by a nonliving vaccine. III. Correlation of resistance with induction of activated larvacidal macrophages. **Journal of Immunology**, v. 136, n. 10, p. 3872-3877, 1986.

KATZ, N. Dificuldades no desenvolvimento de uma vacina para esquistossomose mansoni. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 6, p. 705-711, 1999.

KING, C. H.; DICKMAN, K.; TISCH, D. J. Reassessment of the cost of chronic helminthic infection: a meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis. **Lancet**, v. 365, n. 9470, p. 1561-1569, 2005.

KING, C. H. Toward the elimination of schistosomiasis. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 2, p. 106-109, 2009.

KING, C. L. P.-. Initiation and regulation of disease in schistosomiasis. In: Mahmoud, A. a. F. (Ed.). **Schistosomiasis**. London: Imperial College Press, 2001. v.3, p. 213-264.

KNUDSEN, G. M.; MEDZIHRADESKY, K. F.; LIM, K. C.; HANSELL, E.; MCKERROW, J. H. Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* cercarial secretions. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 4, n. 12, p. 1862-1875, 2005.

LECHTZIER, V.; HUTORAN, M.; LEVY, T.; KOTLER, M.; BRENNER, T.; STEINITZ, M. Sodium dodecyl sulphate-treated proteins as ligands in ELISA. **Journal of Immunological Methods**, v. 270, n. 1, p. 19-26, 2002.

LEVANO-GARCIA, J.; MORTARA, R. A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; DEMARCO, R. Characterization of *Schistosoma mansoni* ATPDase2 gene, a novel apyrase family member. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 352, n. 2, p. 384-389, 2007.

LEVY, M. G.; READ, C. P. Purine and pyrimidine transport in *Schistosoma mansoni*. **Journal of Parasitology**, v. 61, n. 4, p. 627-632, 1975a.

LEVY, M. G.; READ, C. P. Relation of tegumentary phosphohydrolase to purine and pyrimidine transport in *Schistosoma mansoni*. **Journal of Parasitology**, v. 61, n. 4, p. 648-656, 1975b.

- LIANG, Y. S.; COLES, G. C.; DAI, J. R.; ZHU, Y. C.; DOENHOFF, M. J. Adult worm tegumental damage and egg-granulomas in praziquantel-resistant and -susceptible *Schistosoma mansoni* treated in vivo. **Journal of Helminthology**, v. 76, n. 4, p. 327-333, 2002.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- LOUKAS, A.; TRAN, M.; PEARSON, M. S. Schistosome membrane proteins as vaccines. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 3-4, p. 257-263, 2007.
- MAIONE, D.; MARGARIT, I.; RINAUDO, C. D.; MASIGNANI, V.; MORA, M.; SCARSELLI, M.; TETTELIN, H.; BRETTONI, C.; IACOBINI, E. T.; ROSINI, R.; D'AGOSTINO, N.; MIORIN, L.; BUCCATO, S.; MARIANI, M.; GALLI, G.; NOGAROTTO, R.; NARDI DEI, V.; VEGNI, F.; FRASER, C.; MANCUSO, G.; TETI, G.; MADOFF, L. C.; PAOLETTI, L. C.; RAPPUOLI, R.; KASPER, D. L.; TELFORD, J. L.; GRANDI, G. Identification of a universal Group B streptococcus vaccine by multiple genome screen. **Science**, v. 309, n. 5731, p. 148-150, 2005.
- MARTINS, V. P.; PINHEIRO, C. S.; FIGUEIREDO, B. C.; ASSIS, N. R.; MORAIS, S. B.; CALIARI, M. V.; AZEVEDO, V.; CASTRO-BORGES, W.; WILSON, R. A.; OLIVEIRA, S. C. Vaccination with enzymatically cleaved gpi-anchored proteins from *Schistosoma mansoni* induces protection against challenge infection. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, n., p. 962538, 2012.
- MCMANUS, D. P.; HU, W.; BRINDLEY, P. J.; FENG, Z.; HAN, Z. G. Schistosome transcriptome analysis at the cutting edge. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 7, p. 301-304, 2004.
- MICHAUD, C. M.; GORDON, W. S.; REICH, M. R. **The Global Burden Of Disease Due To Schistosomiasis**: Disease Control Priorities Project; WHO-Working Paper 19, 2003. 40 p.
- MORAES, J.; NASCIMENTO, C.; LOPES, P. O.; NAKANO, E.; YAMAGUCHI, L. F.; KATO, M. J.; KAWANO, T. *Schistosoma mansoni*: in vitro schistosomicidal activity of pipartine. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 2, p. 357-364, 2011.
- MOREL, C. M. Reaching maturity - 25 years of the TDR. **Parasitology Today**, v. 16, n. 12, p. 522-528, 2000.
- MOUNTFORD, A. P.; HARROP, R. Vaccination against schistosomiasis: the case for lung-stage antigens. **Parasitology Today**, v. 14, n. 3, p. 109-114, 1998.
- MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. The humoral immune response. In: (Ed.). **Janeway's Immunobiology**. EUA, 2008, p.379-420.
- NIMMO-SMITH, R. H.; STANDEN, O. D. Phosphomonoesterases of *Schistosoma mansoni*. **Experimental Parasitology**, v. 13, p. 305-322, 1963.

OHE, Y.; OHNISHI, H.; OKAZAWA, H.; TOMIZAWA, K.; KOBAYASHI, H.; OKAWA, K.; MATOZAKI, T. Characterization of nucleotide pyrophosphatase-5 as an oligomannosidic glycoprotein in rat brain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 308, n. 4, p. 719-725, 2003.

PAYARES, G.; SMITHERS, S. R.; EVANS, W. H. Purification and topographical location of tegumental alkaline phosphatase from adult *Schistosoma mansoni*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 13, n. 3, p. 343-360, 1984.

PIZZA, M.; SCARLATO, V.; MASIGNANI, V.; GIULIANI, M. M.; ARICO, B.; COMANDUCCI, M.; JENNINGS, G. T.; BALDI, L.; BARTOLINI, E.; CAPECCHI, B.; GALEOTTI, C. L.; LUZZI, E.; MANETTI, R.; MARCHETTI, E.; MORA, M.; NUTI, S.; RATTI, G.; SANTINI, L.; SAVINO, S.; SCARSELLI, M.; STORNI, E.; ZUO, P.; BROEKER, M.; HUNDT, E.; KNAPP, B.; BLAIR, E.; MASON, T.; TETTELIN, H.; HOOD, D. W.; JEFFRIES, A. C.; SAUNDERS, N. J.; GRANOFF, D. M.; VENTER, J. C.; MOXON, E. R.; GRANDI, G.; RAPPUOLI, R. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. **Science**, v. 287, n. 5459, p. 1816-1820, 2000.

POWNALL, M. E.; TUCKER, A. S.; SLACK, J. M.; ISAACS, H. V. eFGF, Xcad3 and Hox genes form a molecular pathway that establishes the anteroposterior axis in *Xenopus*. **Development**, v. 122, n. 12, p. 3881-3892, 1996.

PUJOL, F. H.; CESARI, I. M. Antigenicity of adult *Schistosoma mansoni* alkaline phosphatase. **Parasite Immunology**, v. 12, n. 2, p. 189-198, 1990.

PUJOL, F. H.; CESARI, I. M. *Schistosoma mansoni*: surface membrane isolation with lectin-coated beads. **Membrane Biochemistry**, v. 10, n. 3, p. 155-161, 1993.

RAMOS, C. R.; ABREU, P. A.; NASCIMENTO, A. L.; HO, P. L. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 8, p. 1103-1109, 2004.

RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, n. 5, p. 445-450, 2000.

REY, L. *Schistosoma mansoni* e esquistossomíase: a doença. In: Rey, L. (Ed.). **Parasitologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, p.426-443.

RIBEIRO-DOS-SANTOS, G.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; LEITE, L. C. C. Schistosomiasis--a century searching for chemotherapeutic drugs. **Parasitology Research**, v. 99, n. 5, p. 505-521, 2006.

ROBERTS, S. M.; MACGREGOR, A. N.; VOJVODIC, M.; WELLS, E.; CRABTREE, J. E.; WILSON, R. A. Tegument surface membranes of adult *Schistosoma mansoni*: development of a method for their isolation. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 9, n. 2, p. 105-127, 1983.

ROSS, A. G.; BARTLEY, P. B.; SLEIGH, A. C.; OLDS, G. R.; LI, Y.; WILLIAMS, G. M.; MCMANUS, D. P. Schistosomiasis. **New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 16, p. 1212-1220, 2002.

RUTITZKY, L. I.; LOPES DA ROSA, J. R.; STADECKER, M. J. Severe CD4 T cell-mediated immunopathology in murine schistosomiasis is dependent on IL-12p40 and correlates with high levels of IL-17. **Journal of Immunology**, v. 175, n. 6, p. 3920-3926, 2005.

SAKAGAMI, H.; AOKI, J.; NATORI, Y.; NISHIKAWA, K.; KAKEHI, Y.; ARAI, H. Biochemical and molecular characterization of a novel choline-specific glycerophosphodiester phosphodiesterase belonging to the nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 24, p. 23084-23093, 2005.

SANSOM, F. M.; ROBSON, S. C.; HARTLAND, E. L. Possible effects of microbial ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolases on host-pathogen interactions. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, n. 4, p. 765-781, 2008.

SILVA, J. R. S. N. **Construção de vetores para superexpressão da proteína L1 do HPV16 em *Pichia pastoris***. (Dissertação de Mestrado). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010. 104 p.

SKELLY, P. J.; SHOEMAKER, C. B. Induction cues for tegument formation during the transformation of *Schistosoma mansoni* cercariae. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 5, p. 625-631, 2000.

SKELLY, P. J.; ALAN WILSON, R. Making sense of the schistosome surface. **Advances in Parasitology**, v. 63, n., p. 185-284, 2006.

SMITH, M. A.; CLEGG, J. A. Vaccination against *Schistosoma mansoni* with purified surface antigens. **Science**, v. 227, n. 4686, p. 535-538, 1985.

SMITHERS, S. R.; HACKETT, F.; ALI, P. O.; SIMPSON, A. J. Protective immunization of mice against *Schistosoma mansoni* with purified adult worm surface membranes. **Parasite Immunology**, v. 11, n. 4, p. 301-318, 1989.

STEFAN, C.; JANSEN, S.; BOLLEN, M. NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 30, n. 10, p. 542-550, 2005.

STEINMANN, P.; KEISER, J.; BOS, R.; TANNER, M.; UTZINGER, J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **Lancet Infectious Diseases**, v. 6, n. 7, p. 411-425, 2006.

TENDLER, M.; SIMPSON, A. J. The biotechnology-value chain: development of Sm14 as a schistosomiasis vaccine. **Acta Tropica**, v. 108, n. 2-3, p. 263-266, 2008.

TRAN, M. H.; PEARSON, M. S.; BETHONY, J. M.; SMYTH, D. J.; JONES, M. K.; DUKE, M.; DON, T. A.; MCMANUS, D. P.; CORREA-OLIVEIRA, R.; LOUKAS, A. Tetraspanins

on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis. **Nature Medicine**, v. 12, n. 7, p. 835-840, 2006.

VAN BALKOM, B. W.; VAN GESTEL, R. A.; BROUWERS, J. F.; KRIJGSVELD, J.; TIELENS, A. G.; HECK, A. J.; VAN HELLEMOND, J. J. Mass spectrometric analysis of the *Schistosoma mansoni* tegumental sub-proteome. **Journal of Proteome Research**, v. 4, n. 3, p. 958-966, 2005.

VAN HELLEMOND, J. J.; RETRA, K.; BROUWERS, J. F.; VAN BALKOM, B. W.; YAZDANBAKHSH, M.; SHOEMAKER, C. B.; TIELENS, A. G. Functions of the tegument of schistosomes: clues from the proteome and lipidome. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 6, p. 691-699, 2006.

VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; DEMARCO, R.; MARTINS, E. A.; GUIMARAES, P. E.; OJOPI, E. P.; PAQUOLA, A. C.; PIAZZA, J. P.; NISHIYAMA, M. Y., JR.; KITAJIMA, J. P.; ADAMSON, R. E.; ASHTON, P. D.; BONALDO, M. F.; COULSON, P. S.; DILLON, G. P.; FARIAS, L. P.; GREGORIO, S. P.; HO, P. L.; LEITE, R. A.; MALAQUIAS, L. C.; MARQUES, R. C.; MIYASATO, P. A.; NASCIMENTO, A. L.; OHLWEILER, F. P.; REIS, E. M.; RIBEIRO, M. A.; SA, R. G.; STUKART, G. C.; SOARES, M. B.; GARGIONI, C.; KAWANO, T.; RODRIGUES, V.; MADEIRA, A. M.; WILSON, R. A.; MENCK, C. F.; SETUBAL, J. C.; LEITE, L. C.; DIAS-NETO, E. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. **Nature Genetics**, v. 35, n. 2, p. 148-157, 2003.

VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; LEITE, L. C.; DIAS-NETO, E.; MENCK, C. F.; WILSON, R. A. Schistosome transcriptome: insights and perspectives for functional genomics. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 7, p. 304-308, 2004.

VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; VENANCIO, T. M.; OLIVEIRA, K. C.; ALMEIDA, G. T.; DEMARCO, R. Use of a 44k oligoarray to explore the transcriptome of *Schistosoma mansoni* adult worms. **Experimental Parasitology**, v. 117, n. 3, p. 236-245, 2007.

VERMEIRE, J. J.; TAFT, A. S.; HOFFMANN, K. F.; FITZPATRICK, J. M.; YOSHINO, T. P. *Schistosoma mansoni*: DNA microarray gene expression profiling during the miracidium-to-mother sporocyst transformation. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 147, n. 1, p. 39-47, 2006.

WEN, X.; HE, L.; CHI, Y.; ZHOU, S.; HOELLWARTH, J.; ZHANG, C.; ZHU, J.; WU, C.; DHESI, S.; WANG, X.; LIU, F.; SU, C. Dynamics of Th17 cells and their role in *Schistosoma japonicum* infection in C57BL/6 mice. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 11, p. e1399, 2011.

WILKINS, H. A.; BLUMENTHAL, U. J.; HAGAN, P.; HAYES, R. J.; TULLOCH, S. Resistance to reinfection after treatment of urinary schistosomiasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 1, p. 29-35, 1987.

WILSON, R. A.; COULSON, P. S. Strategies for a schistosome vaccine: can we manipulate the immune response effectively? **Microbes and Infection**, v. 1, n. 7, p. 535-543, 1999.

WILSON, R. A.; CURWEN, R. S.; BRASCHI, S.; HALL, S. L.; COULSON, P. S.; ASHTON, P. D. From genomes to vaccines via the proteome. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p. 45-50, 2004.

WILSON, R. A.; COULSON, P. S. Schistosome vaccines: a critical appraisal. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 13-20, 2006.

WILSON, R. A.; LANGERMANS, J. A.; VAN DAM, G. J.; VERVENNE, R. A.; HALL, S. L.; BORGES, W. C.; DILLON, G. P.; THOMAS, A. W.; COULSON, P. S. Elimination of *Schistosoma mansoni* adult worms by rhesus macaques: basis for a therapeutic vaccine? **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 9, p. e290, 2008.

WILSON, R. A.; COULSON, P. S. Immune effector mechanisms against schistosomiasis: looking for a chink in the parasite's armour. **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 9, p. 423-431, 2009.

YANG, W.; JACKSON, D. C.; ZENG, Q.; MCMANUS, D. P. Multi-epitope schistosome vaccine candidates tested for protective immunogenicity in mice. **Vaccine**, v. 19, n. 1, p. 103-113, 2000.

YE, P.; RODRIGUEZ, F. H.; KANALY, S.; STOCKING, K. L.; SCHURR, J.; SCHWARZENBERGER, P.; OLIVER, P.; HUANG, W.; ZHANG, P.; ZHANG, J.; SHELLITO, J. E.; BAGBY, G. J.; NELSON, S.; CHARRIER, K.; PESCHON, J. J.; KOLLS, J. K. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. **Journal of Experimental Medicine**, v. 194, n. 4, p. 519-527, 2001.

ZALATAN, J. G.; FENN, T. D.; BRUNGER, A. T.; HERSCHLAG, D. Structural and functional comparisons of nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase and alkaline phosphatase: implications for mechanism and evolution. **Biochemistry**, v. 45, n. 32, p. 9788-9803, 2006.

ZHANG, M.; HAN, Y.; ZHU, Z.; LI, D.; HONG, Y.; WU, X.; FU, Z.; LIN, J. Cloning, expression, and characterization of *Schistosoma japonicum* tegument protein phosphodiesterase-5. **Parasitology Research**, v. 110, n. 02, p. 775-786, 2011.

ZHANG, Z.; XU, H.; GAN, W.; ZENG, S.; HU, X. *Schistosoma japonicum* calcium-binding tegumental protein SjTP22.4 immunization confers praziquantel schistosomulicide and antifecundity effect in mice. **Vaccine**, v. 30, n. 34, p. 5141-5150, 2012.

ZHOU, Y.; ZHENG, H.; CHEN, Y.; ZHANG, L.; WANG, K.; GUO, J.; HUANG, Z.; ZHANG, B.; HUANG, W.; JIN, K.; DOU, T.; HASEGAWA, M.; WANG, L.; ZHANG, Y.; ZHOU, J.; TAO, L.; CAO, Z.; LI, Y.; VINAR, T.; BREJOVA, B.; BROWN, D.; LI, M.; MILLER, D. J.; HU, W.; WANG, Z. Q.; ZHANG, Q. H.; SONG, H. D.; CHEN, S.; XU, X.; XU, B.; JU, C.; HUANG, Y.; FENG, Z.; REN, S.; WANG, Y.; GU, W.; KANG, H.; CHEN, J.; CHEN, X.; YAN, J.; WANG, B.; LV, X.; JIN, L.; PU, S.; ZHANG, X.; ZHANG, W.; HU, Q.; ZHU, G.; WANG, J.; YU, J.; YANG, H.; NING, Z.; BERIMAN, M.; WEI, C. L.; RUAN, Y.; ZHAO, G.; LIU, F.; LU, G.; BRINDLEY, P. J.; MCMANUS, D. P.; BLAIR, D.; ZHONG, Y.; WANG, S.; HAN, Z. G.; CHEN, Z. The *Schistosoma japonicum* genome reveals features of host-parasite interplay. **Nature**, v. 460, n. 7253, p. 345-351, 2009.

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