

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

Danielle Gomes Marconato

**EFEITOS DE ANTICORPOS ANTI-NTPDases NA PROLIFERAÇÃO
DE CÉLULAS IMUNES E SUAS IMPLICAÇÕES NA
ESQUISTOSSOMOSE MANSONI**

Juiz de Fora

2016

DANIELLE GOMES MARCONATO

**EFEITOS DE ANTICORPOS ANTI-NTPDases NA PROLIFERAÇÃO
DE CÉLULAS IMUNES E SUAS IMPLICAÇÕES NA
ESQUISTOSSOMOSE MANSONI**

Dissertação de mestrado do Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Priscila de Faria Pinto

Juiz de Fora

2016

DANIELLE GOMES MARCONATO

**EFEITOS DE ANTICORPOS ANTI-NTPDases NA PROLIFERAÇÃO
DE CÉLULAS IMUNES E SUAS IMPLICAÇÕES NA
ESQUISTOSSOMOSE MANSONI**

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas – ênfase em Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias)

Aprovado em: ___/___/___

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Priscila de Faria Pinto - UFJF
Orientadora

Prof^a. Dr^a Juciane Maria de Andrade Castro - UFJF
Membro interno

Prof^a. Dr^a Naira Ligia Lima Giarola - UFRJ
Membro externo

Dedico este trabalho a minha família, amigos e orientadora pelo incentivo e apoio durante essa trajetória acadêmica, sem os quais não teria sido possível a conclusão desta etapa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, presente em todos os momentos.

Aos meus pais, Jorge e Soraia, pelo amor incondicional, por estarem sempre ao meu lado, incentivando e me apoiando nas conquistas pessoais e profissionais. Amo vocês!

Aos meus irmãos, Daniel e Daiane, que acompanharam de perto essa jornada, torcendo sempre pelo meu sucesso.

Um agradecimento especial à minha orientadora, Dra. Priscila, pelo estímulo constante e conhecimento compartilhado, pelos conselhos e paciência. Agradeço de todo coração a confiança que depositou no meu trabalho.

Ao Dr. Gilson Costa Macedo, do laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas/UFJF, pelas conversas, conselhos e por estar sempre disposto a ajudar, contribuindo para o enriquecimento desse trabalho.

A Dra. Eveline, exemplo de profissional dedicado, agradeço pelo apoio e pelos ensinamentos. Obrigada por ter me acolhido em sua equipe.

Ao Dr. Carlos Magno Maranduba, que gentilmente disponibilizou seu laboratório de cultura de células.

As alunas Danielle Zimmermann e Juliana Melo, do laboratório de Imunologia da UFJF, e ao Francisco Guia pela ajuda nos experimentos.

Aos amigos do Laboratório de Estrutura e Função de Proteínas pela companhia e auxílio em várias horas e por todos os momentos de descontração.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação e do Departamento de Bioquímica/ICB/UFJF que contribuíram direta ou indiretamente para a composição desta dissertação.

Aos amigos de todas as horas agradeço pelas palavras de conforto que nunca faltaram, pela presença constante, por dividir risadas, brincadeiras e experiências.

Ao CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

E a todos que contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho!

RESUMO

Nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares podem funcionar como moléculas de sinalização dos processos inflamatórios e da resposta imune. Nesse contexto, as NTPDases representam uma importante família de enzimas capazes de hidrolisar nucleosídeos di e tri-fosfatados, responsáveis por regular a sinalização purinérgica na maioria dos seres vivos. A homologia entre diferentes enzimas dessa família estimula investigações das interações dos anticorpos direcionados contra as isoformas destas enzimas presentes em parasitos e sua conexão com as isoformas expressas em seus hospedeiros mamíferos. As isoformas de NTPDases do helminto *Schistosoma mansoni*, denominadas SmATPDases 1 e 2 são antigênicas e exibem uma homologia significativa com as isoformas de NTPDases presentes em células de mamíferos. O objetivo do trabalho foi verificar se anticorpos anti-SmATPDase 1 presentes no soro de animal infectado com *S. mansoni* podem ter imunorreatividade cruzada com isoforma NTPDase 1 das células do sistema imune de mamíferos. Essa imunorreatividade pode afetar a proliferação e sinalização celular, justificando uma modulação direta da sinalização purinérgica desenvolvida durante a progressão da esquistossomose. Na primeira etapa, foi detectado que os anticorpos contra a isoforma de SmATPDase 1 presente no “pool” de soros de animais infectados foram capazes de reconhecer a isoforma NTPDase 1 em preparações de macrófagos e esplenócitos, resultando na visualização de bandas nítidas com peso molecular de aproximadamente 53 e 58 kDa. A isoforma NTPDase 1 também foi identificada na superfície destas células por imunofluorescência. A reatividade entre preparações de células e anticorpos anti-IgG presentes no soro de animais com esquistossomose (diluições 1:50 e 1:100) também sugeriu a existência de proteínas homólogas entre o parasito e as células imunes, podendo estar relacionadas às NTPDases. Estes anticorpos utilizados foram capazes de reduzir a atividade fosfohidrolítica nas preparações de macrófagos (22%) e esplenócitos (58%), assim como os anticorpos anti-CD39 promoveram decréscimo nessa atividade em 40% e 83%, respectivamente. Em ensaios de proliferação celular, houve redução na proliferação de macrófagos em 24 h (14%), 48 h (14%) e 72 h (11%) em células incubadas com “pool” soros de animais infectados e com anti-CD39 29%, 12% e 90%, respectivamente. A atividade proliferativa de esplenócitos incubadas com anti-CD39 aumentou nos tempos de 48h (45%) e 72h (70%) e nas células mantidas com soro imune de animal infectado não foi observada nenhuma diferença significativa. Em ensaio de proliferação de linfócitos por citometria de fluxo houve um aumento significativo do número de linfócitos T nos grupos incubados com soro imune (36%) e anti-CD39 (>100%). Por sua vez, houve um decréscimo de 44% na proliferação de linfócitos B tratados previamente com soro de animal infectado e de 34% no grupo tratado com anti-CD39. Com esses resultados sugerimos que a inibição da NTPDase 1 de células imunes por anticorpos produzidos contra a isoforma da enzima do *S. mansoni* pode ser responsável pela modulação da resposta imune que ocorre na esquistossomose, contribuindo para um perfil Th2. Porém, outros testes são necessários para corroborar essa hipótese. A inibição das NTPDases pode contribuir para o estudo dos mecanismos envolvidos em diversas disfunções relacionadas a defeitos na sinalização purinérgica.

Palavras-chave: NTPDase 1, sinalização purinérgica, SmATPDases, esquistossomose

ABSTRACT

Extracellular nucleotides and nucleosides may act as signaling molecules that control inflammation and immune response. In this context, NTPDases represent an important family of enzymes capable of hydrolyzing di- and tri-phosphate nucleosides which regulate purinergic signaling in most living beings. The homology between different enzymes from the NTPDase family supports new investigations about the interactions of antibodies directed against isoforms of these enzymes in parasites and the connection to their isoforms expressed in mammalian hosts. The NTPDase isoforms in *Schistosoma mansoni*, called SmATPDases 1 and 2 are antigenic and display a significant homology with the NTPDases isoforms found in mammalian cells. The aim of this work was to verify if anti-SmATPDase 1 antibodies from serum of animals infected with *S. mansoni* show cross-immunoreactivity with the NTPDase 1 isoform from immune system cells of mammals. This cross-immunoreactivity could affect cell proliferation and cell signalization, justifying a direct modulation of the purinergic signaling developed during the progression of schistosomiasis. Through western blotting technique we verified that antibodies against SmATPDase isoforms from serum of infected animals were able to recognize NTPDase isoform 1 from homogenized splenocytes and macrophages, resulting in clear display of bands with molecular weights of approximately 53 and 58 kDa. Additionally, NTPDase 1 was identified and localized in these cells by immunofluorescence. The reactivity between preparations of cells and anti-IgG antibodies present in the serum of animals with schistosomiasis (dilutions 1:50 and 1: 100) also suggested the existence of homologous proteins between the parasite and the immune cells that could be related to NTPDases. Antibodies were also able to reduce activity enzyme in preparations of macrophages (22%) and splenocytes (58%). Anti-CD39 promoted decrease in this activity by 40% and 83%, respectively. In cell proliferation assays, there was a reduction in the proliferation of macrophages in 24 h (14%), 48 h (14%) and 72 h (11%) in cells incubated with pool infected animal sera and with anti-CD39 29%, 12% and 90%, respectively. When the splenocytes culture was incubated with anti-CD39, proliferative activity increased in 48h (45%) and 72 h (70%) and in cells maintained with immune serum of the infected animal, it observed no significant difference. The lymphocyte proliferation assay by flow cytometry there is a significant increase in the number of T lymphocytes incubated with immune serum (36%) and anti-CD39 (> 100%). In turn, there was a 44% decrease in proliferation of B cells previously treated with infected animal serum and 34% in the group treated with anti-CD39. These results suggest that inhibition of NTPDase 1 of immune cells by antibodies produced against the isoforms of the *S. mansoni* could be responsible for modulation of the immune response during the schistosomiasis, conducting to a Th2 response. However, more tests should be carried out to confirm this hypothesis. The NTPDases inhibition may contribute for studies of the mechanisms involved in various disorders related to defects in purinergic signaling.

Keywords: NTPDase 1, purinergic signaling, SmATPDases, schistosomiasis

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Ciclo biológico do helminto <i>Schistosoma mansoni</i>	14
Figura 2. Perfil da resposta imune na esquistossomose.....	16
Figura 3. Papel de macrófagos e linfócitos na patogênese da esquistossomose	19
Figura 4. Componentes da sinalização purinérgica.....	20
Figura 5. Representação esquemática das ectonucleotidases.....	23
Figura 6. Liberação e sinalização de nucleotídeos durante inflamação.....	26
Figura 7. Sinalização purinérgica na ativação de célula T.....	30
Figura 8. Vias de conversão de ATP a adenosina por enzimas do tegumento de <i>Shistosoma sp</i>	34
Figura 9. Identificação de isoformas de NTPDases presentes em macrófagos e esplenócitos pela técnica de “Western blot”	49
Figura 10. Atividade fosfohidrolítica em preparações de macrófagos RAW 264.7 e identificação de isoformas de NTPDase 1 pela técnica de “Western blot”	51
Figura 11. Reatividade de anticorpos IgG total em amostras de soro de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> contra homogeneizado de macrófagos e esplenócitos isolados de animais saudáveis.....	52
Figura 12. Identificação da isoforma de NTPDase 1 presente em macrófagos da linhagem RAW 264.7 por microscopia de imunofluorescência usando anticorpos anti- CD39 comercial.....	54
Figura 13. Identificação da isoforma de NTPDase 1 na superfície de macrófagos da linhagem RAW 264.7 por microscopia de imunofluorescência usando anticorpos anti- SmATPDase 1 presentes em soro imune de camundongos infectados com <i>S.</i> <i>mansoni</i>	55
Figura 14. Identificação da isoforma de NTPDase 1 (CD39) presente em esplenócitos por microscopia de imunofluorescência por meio do soro imune de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> contendo anti-SmATPDase 1 e anticorpos anti-CD39 comerciais	56
Figura 15. Inibição da atividade fosfohidrolítica em preparações de macrófagos e esplenócitos por ligação de anticorpos anti-CD39 e anti-SmATPDase 1 presentes no soro imune de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i>	58

Figura 16. Efeitos dos anticorpos anti-CD39 e soro imune de animais infectados com <i>S. mansoni</i> sobre a proliferação de macrófagos da linhagem RAW 264.7.....	59
Figura 17. Avaliação do nível de TNF- α , IL-12 e NO produzidos pela cultura de macrófagos incubados com anticorpos anti-CD39 e pool de soros de animais infectados com <i>S. mansoni</i>	61
Figura 18. Efeitos dos anticorpos anti-CD39 e soro imune de animal infectado com <i>S. mansoni</i> sobre a proliferação de esplenócitos.....	62
Figura 19. Avaliação da proliferação de linfócitos por citometria de fluxo	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Perfis de expressão e respostas funcionais dos subtipos de receptores P2 em células imunes.....	27
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACRs	Apyrase Conserved Regions
ADA	Adenosina desaminase
Arg1	Arginase 1
ATP	Adenosina trifosfato
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
AP	Fosfatase alcalina
APCs	Células apresentadoras de antígenos
AR	Receptor de adenosina
ConA	Concanavalina A
DAMP	Padrão molecular associado ao dano
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindol
D.O.	Densidade ótica
DOC	Deoxicolato de sódio
ENPPs	Ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiasterase
E-5'NT	5' ecto-nucleotidase
fMLP	N-formil-Met-Leu-Phe
<i>g</i>	Força gravitacional
GMP	Guanina monofosfato
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
h	Hora
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina

IFN	Interferon
kDa	kiloDalton
M	Molar
mM	Milimolar
MGCs	Células gigantes multinucleadas
NFAT	Fator nuclear de células T ativadas
NO	Óxido nítrico
NTPDase	Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase
nm	Nanômetro
SmATPDase	ATP difosfohidrolase de <i>Schistosoma mansoni</i>
µg	Micrograma
pH	Potencial hidrogeniônico
PBS	Tampão fosfato
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
P2XR	Receptor ionotrópico do tipo P2
P2YR	Receptor metabotrópico do tipo P2
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TNF	Fator de necrose tumoral
T reg	Célula T regulatória
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
UMP	Uridina monofosfato

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Esquistossomose mansoni	13
1.1.1 Aspectos gerais	13
1.1.2 Resposta imune	15
1.2. Sinalização purinérgica	18
1.2.1 Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (NTPDases).....	23
1.2.2 Sinalização purinérgica em células imunes	25
1.2.3 Sinalização purinérgica e doenças.	31
1.2.4 Sinalização purinérgica em <i>Schistosoma</i> sp.....	33
2. OBJETIVOS	37
2.1. Objetivo geral	37
2.2. Objetivos específicos	37
3. MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1. Infecção experimental por <i>Schistosoma mansoni</i>	39
3.2. Isolamento de esplenócitos, cultura de macrófagos RAW 264.7 e preparação de homogeneizado de células	39
3.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida e identificação por “Western blot”	40
3.4. Purificação parcial da NTPDase 1 de preparação de células RAW 264.7 por eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante e identificação por “Western blot”	41
3.5. Quantificação de anticorpos no soro imune de camundongos com esquistossomose por técnica de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assays)	42
3.6. Identificação da isoforma de NTPdase 1 por imunofluorescência.....	42
3.7. Efeitos do soro imune de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> sobre a atividade fosfohidrolítica.....	43
3.8. Avaliação dos efeitos de anticorpos na proliferação celular	44
3.9. Detecção de citocinas por ELISA e dosagem de NO em sobrenadante da cultura de macrófagos	45
3.10. Avaliação da proliferação de linfócitos Te B por citometria de fluxo	46

3.11. Análise estatística	47
4. RESULTADOS.....	48
4.1. Identificação de isoformas de NTPDases de macrófagos e esplenócitos utilizando soro imune de animais infectados com <i>Shistosoma mansoni</i>	48
4.2 Purificação parcial de NTPDase 1 em preparações de células RAW 264.7 por gel de eletroforese não desnaturante e identificação por “Western blot”	50
4.3 Análise da reatividade de IgG total de soro de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> contra homogeneizado de macrófagos e esplenócitos.....	52
4.4 Identificação da NTPDase 1 (CD39) em macrófagos e esplenócitos por imunofluorescência	53
4.5 Inibição da atividade fosfolitolítica em preparações de macrófagos e esplenócitos	57
4.6 Efeitos de anticorpos na proliferação celular de macrófagos	58
4.7 Avaliação do perfil de citocinas em sobrenadante da cultura de macrófagos..	60
4.8 Efeitos de anticorpos anti-CD39 e soro imune de animais infectados com <i>S. mansoni</i> na proliferação celular de esplenócitos	61
4.9. Análise da proliferação de linfócitos por citometria de fluxo.....	62
5. DISCUSSÃO	65
5.1. Imunorreatividade cruzada entre anticorpos anti-SmATPDases e a isoforma NTPdase 1 de células imunes	65
5.2. Efeitos de anticorpos anti-NTPdases	68
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	73
7. REFERÊNCIAS.....	75
ANEXOS.....	89

1. INTRODUÇÃO

1.1 ESQUISTOSSOMOSE MANSONI

1.1.1 ASPECTOS GERAIS

A esquistossomose é uma doença parasitária causada por platelmintos da classe *Trematoda*, família *Schistosomatidae* e gênero *Schistosoma*. As formas adultas do parasito se instalam nos vasos mesentéricos do hospedeiro definitivo e as formas intermediárias se desenvolvem em caramujos do gênero *Biomphalaria spp* (CHISTULO et al., 2000; ROSS et al., 2002; GRYSEELS et al., 2006). A doença é endêmica em 78 países tropicais e subtropicais (OMS, 2013). Nas Américas, o agente etiológico da doença é o *S. mansoni* (GRYSEELS et al., 2006), cujo ciclo biológico está representado na Figura 1.

O quadro clínico da doença relaciona-se com as fases aguda e crônica. Inicialmente podem ser observadas manifestações na pele provocadas pela penetração das cercárias, a dermatite cercariana, podendo chegar, em algumas semanas, ao desenvolvimento do quadro conhecido como febre de Katayama. Essa é caracterizada por sintomas como mal-estar geral, febre, anorexia, dor abdominal, tosse seca, sudorese, mialgia, diarreia, linfadenopatia, cefaleia e prostração (GRYSEELS et al., 2006; 2012; SOUZA et al., 2011). Na fase crônica da esquistossomose os principais problemas clínicos desenvolvidos estão relacionados com a retenção dos ovos nos tecidos. Os ovos liberam proteínas que promovem uma reação granulomatosa, com deposição progressiva de fibras. A gravidade da doença está relacionada ao grau de infecção e a resposta imune do hospedeiro (GRYSEELS et al., 2006; BARSOUM, ESMAT e EL-BAZ, 2013).

Na rotina, o diagnóstico da esquistossomose mansoni é realizado através de um método simples e rápido: o Kato-Katz (KATZ, CHAVES e PELLEGRINO, 1972). O emprego desta técnica permite um menor custo-benefício e uma análise quantitativa

através da contagem dos ovos por grama de fezes analisado (GRYSEELS et al., 2006).

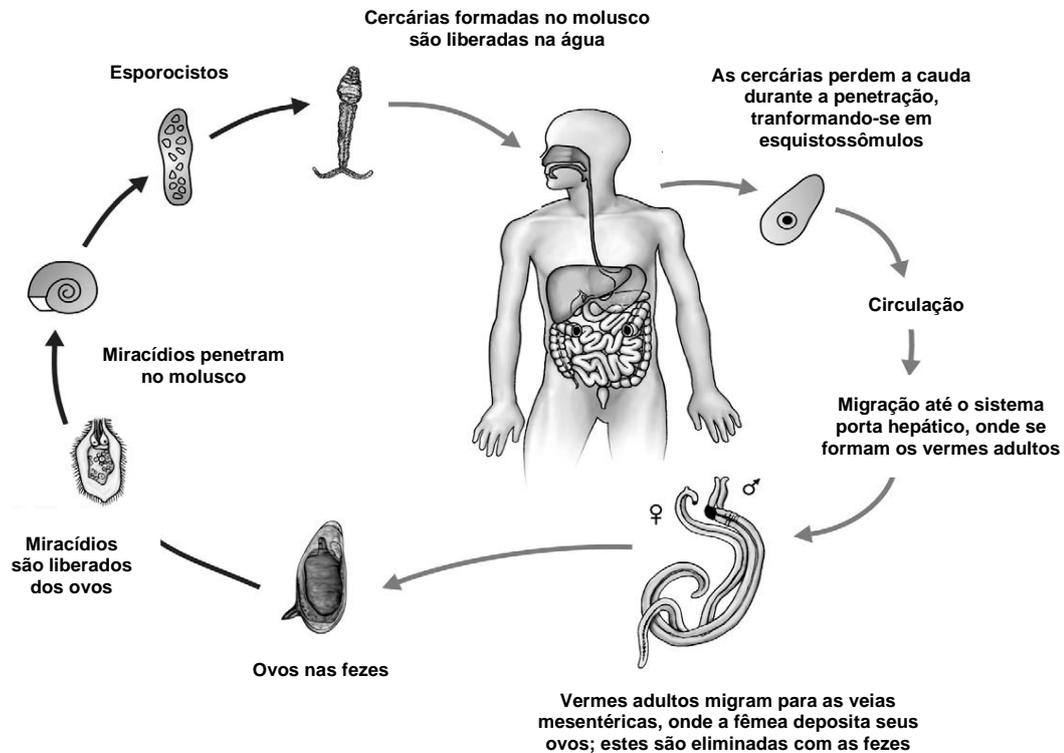


Figura 1. Ciclo biológico do helminto *Schistosoma mansoni*. Extraído e adaptado de SOUZA et. al, 2011.

A droga de escolha para o tratamento da doença é o praziquantel (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). O mecanismo de ação do praziquantel ainda não foi bem elucidado, porém foi observado que a exposição ao fármaco promove um influxo de Ca^{2+} , levando a contração da musculatura do parasito e posterior paralisia (GREENBERG, 2004; ABDUL-GHANI et al., 2009; ESMAT e RAZIKY, 2009). O fármaco pode também induzir ruptura do tegumento do verme, promovendo a liberação de antígenos do parasita. Estes são reconhecidos pelo sistema imune que, por sua vez, desenvolve mecanismos para combater a infecção (GREENBERG, 2004; ABDUL-GHANI et al., 2009; ESMAT & RAZIKY, 2009).

Outras drogas também estão sendo estudadas para o combate da doença, visto que a resistência aos medicamentos disponível já foi documentada (ESMAT & RAZIKY, 2009; FENWICK et al., 2003). Entre novas possibilidades terapêuticas, foram

avaliados os efeitos esquistossomicidas de derivados da artemisina em diferentes estágios de desenvolvimento do parasito (EL-BESHBISHI et al., 2011), os efeitos da dexametasona sobre a redução do número de granulomas hepáticos de animais tratados (PYRRHO et al., 2004) e os efeitos hepatoprotetor, antioxidante, antifibrótico e imunomodulador após o tratamento com silimarina (MATA-SANTOS et al., 2010).

1.1.2 RESPOSTA IMUNE

A esquistossomose desencadeia uma resposta imune tanto humoral como celular. O tipo de resposta desenvolvida está associado aos antígenos liberados pelo parasita e as fases da doença (Figura 2) (PEARCE e MCDONALD, 2002).

Na fase aguda, entre as semanas 3-5, a resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro é dirigida aos antígenos dos esquistossômulos e vermes imaturos. Estes antígenos são apresentados às células TCD4⁺, estimulando uma resposta do tipo Th1 (PEARCE e MCDONALD, 2002). Essa fase, portanto, é caracterizada pela secreção de citocinas pró-inflamatórias INF- γ , TNF- α , IL-1. Diante desse perfil, observa-se um depósito de imunocomplexos no endotélio, ativação do sistema complemento e recrutamento de células polimorfonucleares do sangue periférico, responsáveis pela maioria dos sinais e sintomas desenvolvidos nesse período (CALDAS et al., 2008; SILVA, SANTANA e JESUS, 2008)

Com o início da oviposição, que ocorre entre a 5-6^a semana após a infecção, o perfil de resposta imune é alterado, observando-se um predomínio de uma sinalização Th2, que é mantida durante a fase crônica da doença. Nesse período, é exacerbada a produção de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, produção de IgE e eosinofilia (PEARCE e MCDONALD, 2002; SCHRAMM e HASS, 2010).

A IL-4 é uma citocina essencial nessa polarização, desempenhando papel crucial na formação e desenvolvimento do granuloma. O granuloma é uma estrutura necessária para proteção do tecido, uma vez que isola e neutraliza as toxinas secretadas pelos ovos (GOES et al, 2004; HAMS, AVIELLO e FALLON, 2013). Além disso, estimula a produção de IgE e aumenta os efeitos da IL-13 sobre fibrinogênese

(BURKE et al., 2009). Estudos têm mostrado que na ausência de IL-4, não se estabelece uma resposta Th2 adequada, instituindo uma infecção polarizada na direção Th1, que pode provocar danos aos tecidos do hospedeiro (PEDRAS-VASCONCELOS, CALDAS et al., 2008).

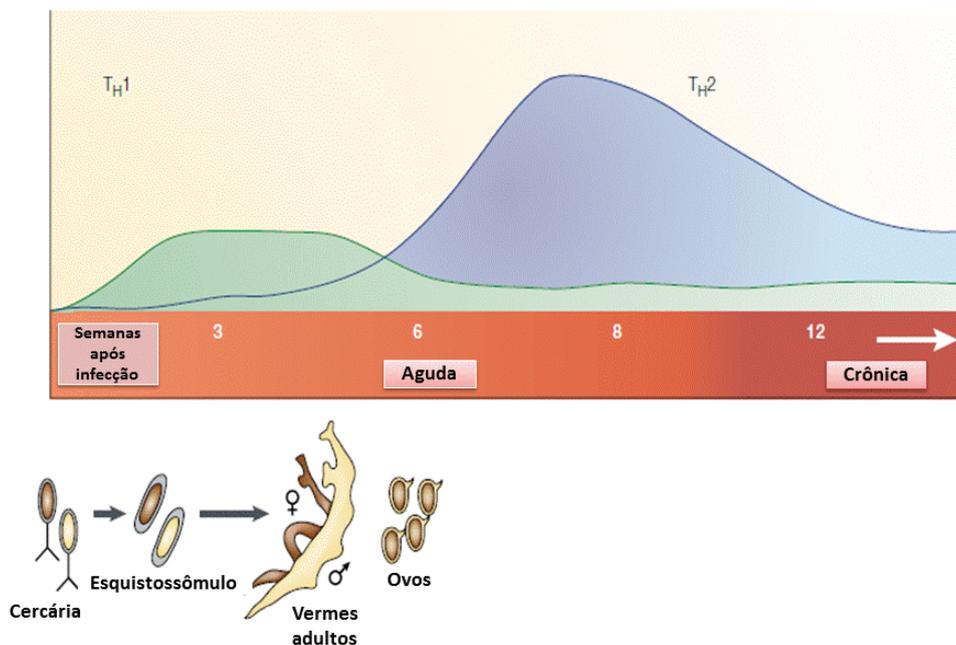


Figura 2. Perfil da resposta imune na esquistossomose. Extraído e adaptado de PEARCE & McDONALD, 2002.

A alteração no perfil imunológico impede que as toxinas produzidas pelos ovos e pelas células recrutadas danifiquem o tecido. Porém, uma resposta Th2 prolongada contribui para um quadro de fibrose severa. Nesse contexto, a manutenção da homeostase do hospedeiro é dependente do equilíbrio entre as respostas do tipo Th1 e Th2 e depende de fatores como a carga parasitária e o sistema imunológico do indivíduo (SADLER et al., 2003; ABATH et al., 2006).

A IL-10 também desempenha uma importante função na imunomodulação na esquistossomose. Essa citocina pode agir sobre células apresentadoras de antígeno, via modulação de moléculas de MHC II, moléculas co-estimulatórias (B7) e a produção de citocinas, influenciando na resposta da célula T efetora. Também pode agir diretamente sobre as células T, suprimindo a produção de IL-2. A ausência dessa

citocina contribui para o aumento da morbidade e mortalidade na doença (WYNN & CHEEVER, 1995; SADLER et al., 2003; ABATH et al., 2006).

Pesquisas voltadas para o estudo de uma terceira população de células T, as células T regulatórias, também estão em desenvolvimento. As Tregs participam na imunomodulação na esquistossomose, sendo capazes de impedir tanto uma excessiva resposta Th1 quanto uma resposta Th2. Estas células agem diretamente sobre as células efectoras ou inibem a resposta através da produção de citocinas como IL-10 (EL-AHWANY et al., 2012). Foi definido também o papel das células Th17 na imunologia da esquistossomose. Uma vez que IL-17, secretada por essas células, é inibida ocorre redução da imunopatologia, corroborando seu papel na formação da resposta granulomatosa (BURKE et al., 2009; RUTITZKY e STADECKER, 2011).

Com relação à resistência, estudos apontam que indivíduos moradores de áreas endêmicas são resistentes a reinfecção. Os autores propõem que esses indivíduos apresentem uma resposta Th2 exacerbada, com os altos títulos de IgE, evidenciando a ação protetora dessa imunoglobulina (DUTRA et al., 2002; SCHRAMM e HASS, 2010). Em contrapartida, níveis elevados de IgG4 relacionam-se com susceptibilidade a reinfecção (CORREA-OLIVEIRA et al., 2000).

Os macrófagos também desempenham papéis importantes em ambas as fases da esquistossomose. A Figura 3 resume algumas funções exercidas por essas células e os linfócitos na patogênese da doença em escala celular, de granuloma e tecidual. Em uma resposta normal ao *S. mansoni*, IL-4 e IL-13 produzidas por linfócitos Th2 promovem reparação tecidual e ativação alternativa de macrófagos (HERBERT et al., 2004; BARRON & WYNN, 2011). Estes liberam IL-10, Arg1 e outros fatores que limitam a proliferação e ativação de células T. A resposta Th2 gera granulomas ricos em eosinófilos, rodeados por uma matriz de colágeno depositada por fibroblastos, protegendo os hepatócitos de produtos tóxicos derivados do ovo do parasito. A inflamação granulomatosa normal e macrófagos ativados alternativamente promovem a cicatrização de feridas, mantendo a integridade da barreira intestinal e protegendo o hospedeiro de infecção por bactérias entéricas. No entanto, a acumulação de granulomas provoca fibrose e deposição de colágeno que impedem o fluxo de sangue através do fígado, criando a hipertensão portal (BARRON e WYNN, 2011).

Se uma resposta Th1 exacerbada se desenvolve contra os ovos de *S. mansoni*, IFN- γ ativa macrófagos pela via clássica, que libera IL-12 e NO, gerando um ciclo de “feedback” positivo que pode danificar os tecidos. A resposta Th1 excessiva gera

granulomas com poucos eosinófilos e não consegue ativar fibroblastos para sintetizar o colágeno, causando danos aos hepatócitos. Além disso, células Th1 e macrófagos ativados pela via clássica são menos eficazes na cicatrização de feridas e no transporte de ovos através da parede do intestino. Isso pode promover ruptura da barreira epitelial e, conseqüente, septicemia, uma vez que bactérias do lúmen intestinal penetram pelo tecido não íntegro. Imunidade dependente de Th1, por sua vez, induz pouca fibrose e não interrompe o fluxo de sangue significativamente, reduzindo o quadro de hipertensão portal. Portanto, um misto de resposta Th1/Th2 ou um pequeno desvio para uma resposta Th1 parece ser ideal para proporcionar maior grau de proteção durante infecção crônica com *S. mansoni*, minimizando a fibrose e, ao mesmo tempo, os danos intestinais e hepáticos (BARRON e WYNN, 2011).

1.2 SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA

A sinalização purinérgica possui uma longa história evolutiva por utilizar transmissores químicos purínicos e pirimidínicos fundamentais para conversão de energia e que fornecem base para a formação de nucleosídeos e, portanto, base para o DNA e RNA (BURNSTOCK, 2012).

Até o final da década de 30, os estudiosos acreditavam que o ATP possuía apenas papéis intracelulares. Em 1929, dois pesquisadores da Universidade de Cambridge (UK), Drury e Szent-Gyorgyi, descreveram os efeitos biológicos da adenosina sobre células cardíacas. Décadas depois, Burnstock (1972) propôs o ATP como um novo transmissor em células neuronais, introduzindo o termo purinérgico. Com o tempo, novas pesquisas corroboraram o papel dos nucleotídeos purínicos e pirimidínicos como compostos de sinalização extracelular (KÖLES, FÜRST e ILLES, 2007; BURNSTOCK, 2012).

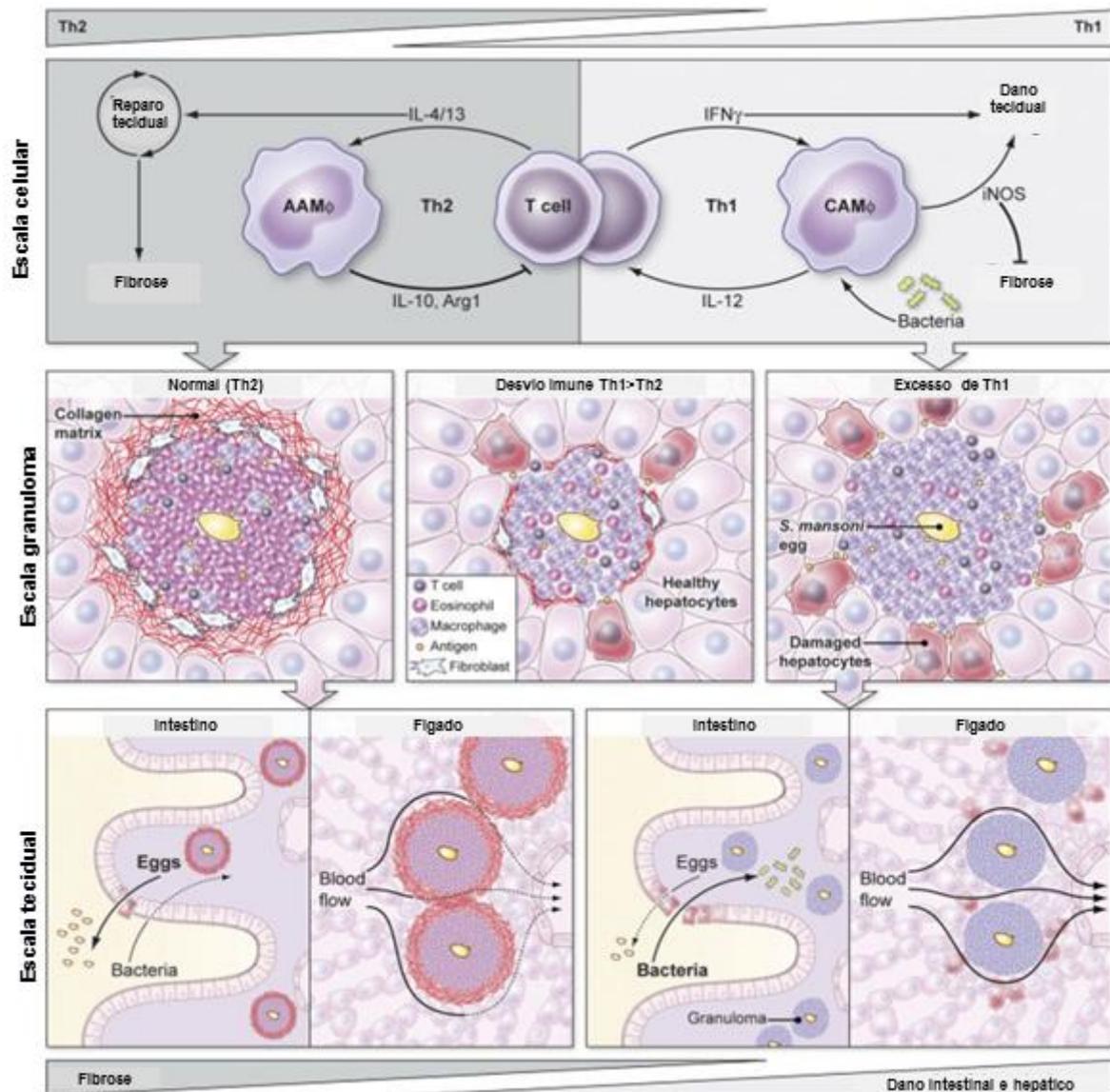


Figura 3. Papel de macrófagos e linfócitos na patogênese da esquistossomose. Um misto de resposta Th1/Th2 ou um pequeno desvio para uma resposta Th1 parece ser ideal para reduzir a fibrose e os danos intestinais e hepáticos. AAMφ: Macrófagos ativados alternativamente; CAMφ: Macrófagos ativados classicamente. Adaptado de BARRON e WYNN, 2011.

O sistema de sinalização purinérgica possui três componentes principais que são responsáveis pela liberação, recepção e inativação dos mensageiros químicos: canais de liberação de nucleotídeos, receptores purinérgicos e ectonucleotidases (Figura 4) (VERKHRATSKY e BURNSTOCK, 2014).

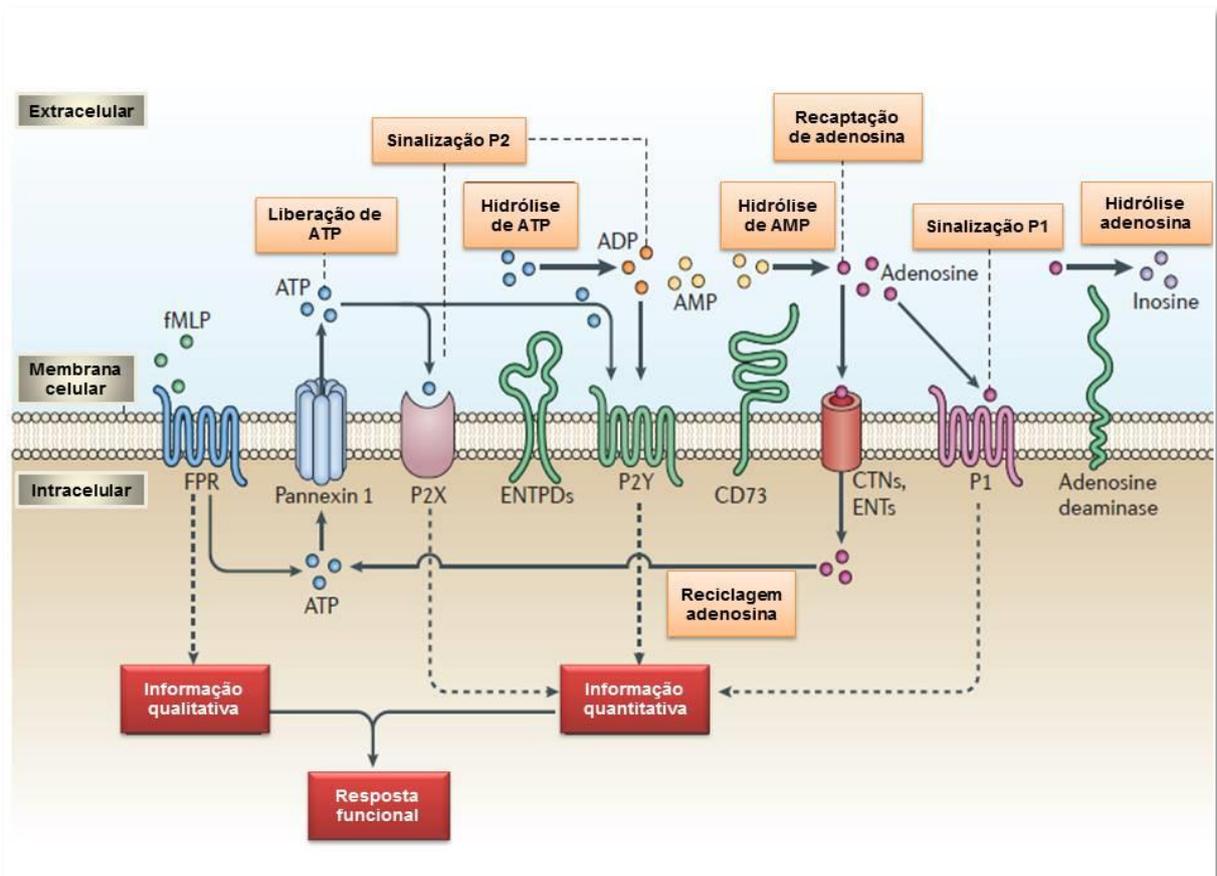


Figura 4. Componentes da sinalização purinérgica. Extraído e adaptado de JUNGER, 2011)

Os principais nucleotídeos que exercem função biológica são o ATP, ADP e AMP. Essas moléculas são formadas a partir de uma base nitrogenada e uma pentose (ribose), constituindo os nucleosídeos, que posteriormente são fosforilados por quinases (ATKINSON et al., 2006).

O ATP possui vários papéis no organismo: participa da neurotransmissão, da contração muscular, função cardíaca, vasodilatação, metabolismo ósseo, metabolismo do glicogênio no fígado e processos inflamatórios. Estas moléculas podem ser liberadas no espaço extracelular em resposta à lesão tecidual ou patógeno exógeno e são necessárias para iniciar respostas imunológicas primárias, bem como para controlar o curso e resolução dos processos inflamatórios (BOURS et al., 2006).

O produto da hidrólise do ATP, o ADP, além de ser um importante sinalizador na inflamação, é capaz de induzir a agregação plaquetária, alterar a forma das plaquetas, ativar a adenilato ciclase e aumentar os níveis de Ca^{2+} intracelular. Quando

um vaso é danificado, o ADP é liberado de grânulos presentes nas plaquetas, sendo responsável pela indução de trombos no interior do vaso (ATKINSON et al., 2006).

O AMP também é um metabólito intermediário da hidrólise do ATP que funciona como importante molécula sinalizadora intracelular, além de ser substrato para a formação de adenosina (SOUZA, 2011).

A adenosina também desempenha inúmeras funções em diferentes tecidos. No sistema cardiovascular, o nucleosídeo promove vasoconstrição e vasodilatação. No sistema nervoso central, modula a liberação de neurotransmissores e auxilia na proteção em casos de isquemia, hipóxia e estresse oxidativo. Adenosina também regula a proliferação e produção de citocinas por células do sistema imune, estimula a broncoconstrição e inibe a lipólise (JUNGER, 2011; SHETH et al., 2014).

Nucleotídeos e nucleosídeos exercem diferentes efeitos pela interação com receptores presentes nas membranas celulares, denominados P1 e P2. No início dos anos 70, esses receptores foram chamados de “purinérgicos”, porém, mais tarde, observou-se que nucleotídeos pirimidínicos também agiam na mesma classe de receptores. Assim, foram renomeados como “receptores de nucleotídeos”, embora a primeira denominação ainda seja muito utilizada (CZAJKOWSKI e BARAŃSKA, 2002; BURNSTOCK, 2007).

Os receptores de adenosina (AR) ou do tipo P1 foram os segundos a aparecerem na evolução, caracterizados primeiramente em moluscos e insetos. Receptores P1 são subdivididos em receptores A₁, A_{2a}, A_{2b} e A₃ (BURNSTOCK, 2007; VERKHRATSKY e BURNSTOCK, 2014). A estimulação dos receptores de adenosina desencadeia a ativação de vias da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) que podem levar ao aumento ou redução de Ca²⁺ e de cAMP dentro da célula. Além disso, por ser capaz de atravessar a membrana celular, a adenosina pode ter efeitos independente de receptor, ativando outras vias intracelulares (ANTONIOLI et al., 2013).

Receptores P2, por sua vez, são classificados em dois grupos distintos: receptores ionotrópicos P2X e receptores metabotrópicos P2Y (RALEVIC e BURNSTOCK, 1998).

Os receptores P2X (P2XR₁₋₇) foram os primeiros a surgirem na escala evolutiva, presentes desde protozoários a organismos multicelulares, mantendo suas propriedades funcionais conservadas durante a evolução (VERKHRATSKY & BURNSTOCK, 2014). Apresentam duas regiões hidrofóbicas ancoradas na

membrana celular, TM1 e TM2, e o loop extracelular contém um sítio de ligação de ATP e dez resíduos de cisteína formando pontes dissulfeto (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998; KÖLES, FÜRST & ILLES, 2007). Receptores P2X funcionais são trímeros, compostos por homotrímeros, heterotrímeros ou multímeros dispostos ao redor de um poro central. A ligação com o ATP promove um rearranjo estrutural permitindo a abertura do canal iônico e o fluxo de cátions monovalentes e bivalentes (VERKHRATSKY & BURNSTOCK, 2014; IDZKO, FERRARI & ELTZSCHIG, 2014).

Em contrapartida, receptores metabotrópicos P2Y apareceram muito mais tarde na evolução e compartilham sua estrutura com os receptores de adenosina (VERKHRATSKY e BURNSTOCK, 2014). Apresentam 7 domínios (TM) que atravessam a membrana ligados por 3 loops intracelulares e 3 extracelulares. A região C-terminal é intracelular e a N-terminal se localiza fora da célula. Até o momento, oito receptores P2Y foram identificados (P2YR_{1,2,4,6,11,12,13,14}) e são sensitivos a nucleotídeos purínicos (ATP, ADP) e pirimidínicos (UDP e UTP) (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998; JACOBSON, JAYASEKARA & COSTANZI, 2012), sendo o P2Y₁₄ responsivo a UDP-glicose (ABBACCHIO et al., 2003).

Os últimos componentes da sinalização purinérgica são representados pelas ectonucleotidases (Figura 5). Os nucleotídeos extracelulares podem ser hidrolisados por um complexo multienzimático formado por membros da família da nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (NTPDases), da fosfatase alcalina (AP), da ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPPs) e 5' ecto-nucleotidase (E-5'NT). Outra enzima importante nesse processo é a adenosina desaminase (ADA), que converte a adenosina em inosina (ZIMMERMANN, 2001; ZIMMERMANN, ZEBISCH e STRÄTER, 2012).

A família das E-NPPs é composta por sete isoformas, incluindo proteínas de membrana e enzimas solúveis. São capazes de hidrolisar ligações pirofosfato ou fosfodiéster de diferentes substratos: nucleotídeos, ácidos nucleicos, ésteres de colina e fosfolípidos. Apenas três membros desta família - NPP1, NPP2 e NPP3 - são capazes de hidrolisar vários nucleotídeos e são os mais relevantes na cascata de sinalização purinérgica (STEFAN, JANSEN e BOLLEN, 2006).

As fosfatases alcalinas são ectoenzimas presentes em bactérias, fungos, protozoários e mamíferos e se apresentam ancoradas em glicosilfosfatidilinositol (GPI) ou na forma solúvel. Catalisam a hidrólise de monoésteres de fosfato e realizam reações de transfosforilação na presença de altas concentrações de fosfato (MILLAN,

2006; YEGUTKIN, 2008). São proteínas homodiméricas, com cerca de 80 kDa, mas heterodímeros também já foram descritos. O pH ótimo da enzima encontra-se entre 8 e 11 e cada sítio catalítico contém 3 íons metálicos, dois Zn^{2+} e um Mg^{2+} , necessários para a atividade (YEGUTKIN, 2008; ZIMMERMANN, ZEBISCH e STRÄTER, 2012).

A cascata de hidrólise de ATP (e de outros nucleosídeos tri-fosfatados) é concluída pela ecto-5'-nucleotidase (CD73). As enzimas da família das E-5'NT de vertebrados hidrolisam AMP, CMP, UMP e GMP, tendo mais afinidade pelo AMP (ZIMMERMANN, ZEBISCH e STRÄTER, 2012). O trabalho concomitante das enzimas E-5'NT e ADA, envolvidas na via de recuperação de purinas, regulam as concentrações de adenosina no plasma e na região pericelular (RESTA, YAMASHITA e THOMPSON, 1998; ROBSON, SEVIGNY e ZIMMERMANN, 2006).

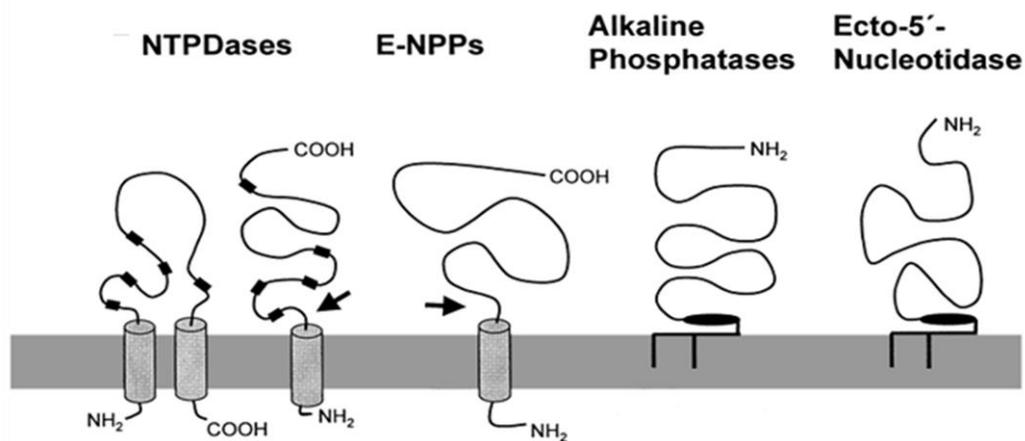


Figura 5. Representação esquemática das ectonucleotidasas. Extraído e adaptado de ZIMMERMANN, 2001)

1.2.1 NUCLEOSÍDEO TRIFOSFATO DIFOSFOHIDROLASES (NTPDases)

As NTPDases, foco deste trabalho, são enzimas capazes de hidrolisar nucleosídeos di e trifosfatados em seus respectivos mononucleotídeos. São ativadas por íons bivalentes, principalmente Ca^{2+} e Mg^{2+} e não são sensíveis a inibidores de ATPases do tipo F, P ou V (ZIMMERMANN, 2001; ROBSON, SEVIGNY e

ZIMMERMANN, 2006; KNOWLES, 2011). Essa família foi identificada por meio da clonagem do gene da apirase extraída da batata *Solanum tuberosum* (HANDA & GUIDOTTI, 1996) e do sequenciamento de aminoácidos desta proteína vegetal (VASCONCELOS et al., 1996).

As isoformas de ATP difosfohidrolases foram localizadas em diferentes organismos e recebem diferentes denominações: apirases, em plantas; ATPDases ou ATP difosfohidrolases, em parasitos; NTPDases, em mamíferos. O alinhamento das sequências de aminoácidos dessas isoformas revelou cinco domínios conservados (ACRs) responsáveis pela atividade catalítica desta família, demonstrando a importância dessas enzimas na manutenção dos níveis de nucleotídeos e sinalização purinérgica em vários seres vivos (VASCONCELOS et al., 1996, 2009; KETTLUN et al., 2005; FARIA-PINTO et al., 2004, 2008; KNOWLES, 2011).

Entre os parasitos, as ATP difosfohidrolases foram caracterizadas em *Leishmania (L.) amazonensis*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania infantum*, *Toxoplasma gondii*, *Legionella pneumophila* e outros (COIMBRA et al., 2002; FIETTO et al., 2004; ASAI et al., 2005; SANSOM et al., 2007; REZENDE-SOARES et al., 2010; MAIA et al., 2011; PORCINO et al., 2012).

Em mamíferos são descritas oito isoformas de NTPDases. As NTPDases 1, 2, 3 e 8, denominadas ecto-NTPDases, estão presentes na superfície celular. As NTPDases 5 e 6 são intracelulares e possuem um domínio transmembrana que pode ser clivado, originando proteínas solúveis. As isoformas 4 e 7 estão situadas no complexo de Golgi e em vesículas intracelulares, respectivamente (ROBSON, SEVIGNY e ZIMMERMANN, 2006). Além da localização, essas isoformas se diferenciam pela especificidade de substrato.

De acordo com a nomenclatura atual, os membros da família são denominados na ordem de descoberta e caracterização. Porém, o termo CD39 usado para designar a NTPDase 1 ainda é utilizado na imunologia (ROBSON, SEVIGNY e ZIMMERMANN, 2006). A NTPDase 1 foi caracterizada primeiramente como um marcador de linfócitos B (MALISZEWSKI et al., 1994). Contém cerca de 510 resíduos de aminoácidos e massa molecular de monômeros glicosilados de 70 a 80 kDa. Possui dois domínios transmembranas próximos as regiões carbono e amino terminais e um loop extracelular contendo o domínio catalítico (ZIMMERMANN, ZEBISCH e STRÄTER, 2012). Mais tarde, a NTPDase 1 foi identificada em células T ativadas, em células natural killer, Tregs, macrófagos, monócitos, neutrófilos, mastócitos e células

dendríticas, mostrando possível função da sinalização purinérgica na resposta imune. Nesse contexto, participam da adesão celular, proliferação, apoptose mediada por ATP e secreção de citocinas (DWYER et al., 2007). Estas proteínas são as principais responsáveis pela regulação de nucleotídeos no endotélio vascular, mantendo a fluidez e regulando o processo de trombose pela hidrólise de ADP (ATKINSON et al., 2006).

1.2.2 SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA EM CÉLULAS IMUNES

Como descrito anteriormente, nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares podem funcionar como moléculas de sinalização que controlam a inflamação e a resposta imune. A modulação desses processos inflamatórios é complexa e resulta de efeitos específicos sobre uma ampla variedade de células (BOURS et al., 2006).

Durante certas condições, tais como inflamação, isquemia e hipóxia, vários tipos de células liberam, por exemplo, ATP e ADP a partir de seus depósitos intracelulares para o espaço extracelular (RAYAH, KANELLOPOULOS e DI VIRGILIO, 2012). Nucleotídeos podem ser liberados durante lesão mecânica, necrose, apoptose ou ativação de células inflamatórias (Figura 6) (IDZKO, FERRARI e ELTZSCHIG, 2014).

Diferentes células inflamatórias apresentam receptores de nucleotídeos, demonstrando o papel da sinalização purinérgica na indução de diversas respostas imunes (Tabela 1).

Os neutrófilos, por exemplo, expressam RNAm para todos os subtipos de receptores de adenosina. Além disso, apresentam NTPDase 1 e E-5'NT na superfície da membrana, possibilitando a modulação de nucleotídeos extracelulares. Nessas células, a adenosina inibe a geração de ânion superóxido, a degranulação e o poder fagocitário via receptor AR, que promove uma redução do “burst” respiratório em associação com um aumento de cAMP e redução de Ca^{2+} (JACOB et al., 2013; BURNSTOCK e BOEYNAEMS, 2014).

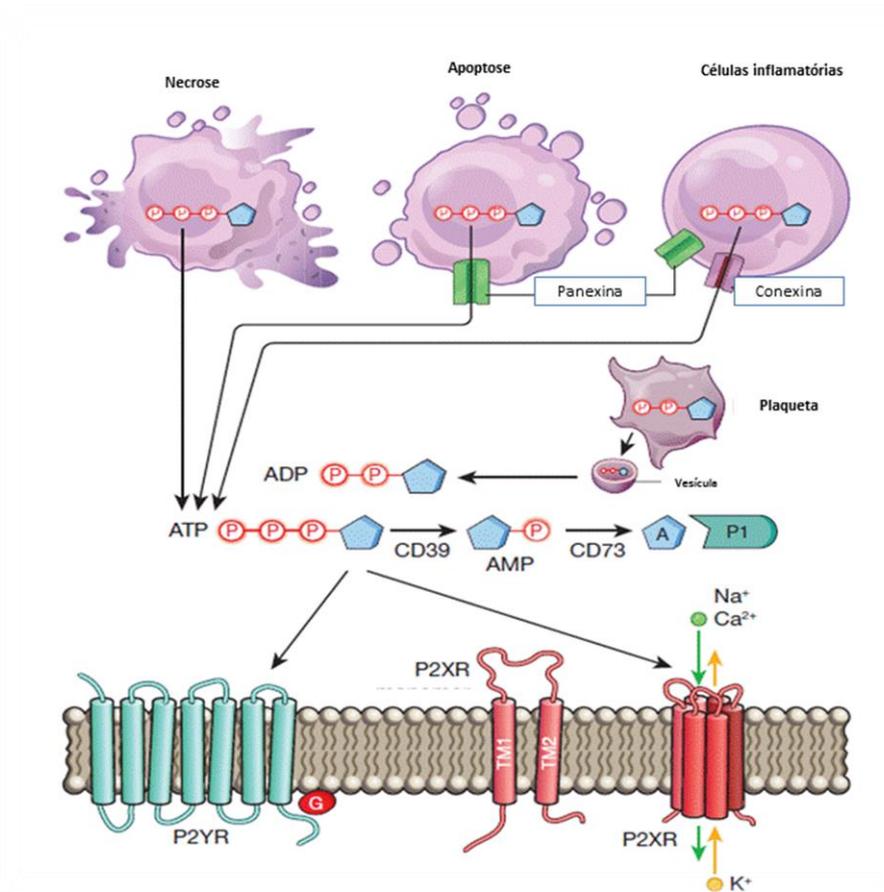


Figura 6. Liberação e sinalização de nucleotídeos durante inflamação. Extraído e adaptado de IDZKO, FERRARI e ELTZSCHIG, 2014

Receptores P2Y também foram identificados em neutrófilos e trabalhos mostram o papel do P2Y₂ na elevação dos níveis de Ca²⁺ intracelular, desencadeada pela ativação da fosfolipase C e consequente geração de inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃). Além disso, a ativação desse receptor por ATP está relacionada a polimerização de actina, processo envolvido na motilidade, quimiotaxia e fagocitose da célula (RAYAH, KANELLOPOULOS e DI VIRGILIO, 2012; JACOB et al., 2013). O ATP e a ativação de P2Y₂ também são necessários para que a IL-8 liberada de macrófagos induza a migração de neutrófilos e potencialize a produção de IL-8 por estes, mecanismo controlado pela ação da NTPDase 1 (KUKULSKI et al., 2009, 2011).

Tabela 1. Perfis de expressão e respostas funcionais dos subtipos de receptores P2 em células imunes (Adaptado de JACOB et al., 2013)

Tipo de célula inflamatória	Resposta funcional a purinas	Subtipo de P2 receptor
Neutrófilos	Indefinida	P2Y ₁ , P2Y ₄ , P2Y ₁₁ , P2Y ₁₄ e P2X ₇
	Mobilização de Ca ²⁺	P2Y ₂
	Liberação de grânulo primário	P2Y ₂
	Polimerização de actina	P2Y ₂
	Quimiotaxia	P2Y ₂ , P2Y ₆ e P2X ₁
	Retardo na apoptose	P2Y ₁₁
Macrófagos	Indefinida	P2Y ₄ , P2Y ₆ , P2Y ₁₁ , P2Y ₁₂ , P2Y ₁₃ , P2Y ₁₄ e P2X ₁₋₆
	Aumento do Ca ²⁺ intracelular	P2Y ₁ , P2Y ₂ , P2Y ₄ , P2Y ₁₁ , P2X ₄ e P2X ₇
	Maturação/liberação de IL-1β/IL-18 via inflamossomo NRLP3, caspase 1 e depleção de K ⁺ citosólico	P2X ₇
	Liberação de catequinas, PGE ₂ , fosfatidilserina	P2X ₇
	Promotor de fagocitose/quimiotaxia	P2Y ₂ , P2Y ₁₂ , P2X ₁ e P2X ₃
	Regulação de autofagia	P2X ₄ e P2X ₇
	Formação de células gigantes multinucleadas	P2X ₇
Células dendríticas	Indefinida	P2Y ₁ , P2Y ₄ , P2Y ₆ , P2Y ₁₁ , P2X ₁ , P2X ₄ , P2X ₅ e P2X ₇
	Regulação na liberação de citocinas	P2Y ₁₁
	Maturação	P2Y ₁₁ , P2Y ₁₂ e P2Y ₁₄
	Apoptose	P2X ₇
	Migração	P2Y ₂ e P2Y ₁₁
Linfócitos B e T	Indefinidas	P2X ₂ , P2X ₃ , P2X ₅ e P2X ₆ e todos P2Y
	Ativação de célula T (ativação p38 MAPK e transcrição do gene IL-2)	P2X ₁ , P2X ₄ e P2X ₇
	Ativação de célula T (CD62L)	P2X ₇
	Aumento cAMP	P2Y ₁₄
	Inibição do potencial imunossupressivo de células Tregs	P2X ₇
Natural killer	Regulação de citotoxicidade e quimiotaxia	P2Y ₁₁
Eosinófilos	Indefinidas	P2Y ₁ , P2Y ₄ , P2Y ₆ , P2Y ₁₁ , P2Y ₁₄ , P2X ₁ , P2X ₄ e P2X ₇
	Quimiotaxia	P2Y ₂
	Liberação de citocinas e quimiocinas	P2Y ₂ , P2X ₁ , P2X ₆ e P2X ₇
Mastócitos	Indefinidas	P2Y ₁ , P2Y ₂ , P2Y ₁₁ , P2Y ₁₂ , P2Y ₁₃ , P2X ₁ , P2X ₄ , P2X ₆ e P2X ₇

No estudo de Vaughan e colaboradores (2008) observou-se que o ATP, via receptor P2Y₁₁, causou um aumento na sobrevivência do neutrófilo, retardando o processo de apoptose. Considerando outras células granulocíticas, os eosinófilos, a estimulação de P2Y₂ é essencial para a liberação de proteína catiônica eosinofílica (ECP), de IL-6 e IL-8, enquanto receptores P2X₁, P2X₇, e P2Y₆ estão implicados apenas na liberação de IL-8 (JACOB et al., 2013).

Outras células do sistema imune importantes na sinalização purinérgica são as células dendríticas (DCs), principais células apresentadoras de antígenos. Em humanos, expressam RNAm para receptores P2X₁, P2X₄, P2X₅, P2X₇, P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₄ (JACOB et al., 2013), bem como para A₁, A_{2A} e A₃; (BURNSTOCK & BOEYNAEMS, 2014). O estímulo purinérgico promove a maturação de DCs e liberação de citocinas como IL-1 β e TNF- α , IL-12 e IL-10 por meio da ativação de receptores P2X, P2Y₁₁, P2Y₁₂ e P2Y₁₄ (BOURS et al., 2006; JACOB et al., 2013). A exposição prolongada a ATP provoca alterações morfológicas e, eventualmente, apoptose e efeitos citotóxicos nas DCs. Esses efeitos são mediados pelo receptor P2X₇ e depende da ativação da caspase 1 e caspase 3, contribuindo para a remoção de DCs após a apresentação do antígeno aos linfócitos (BOURS et al., 2006).

Em células dendríticas maduras, a adenosina é capaz de aumentar os níveis de AMPc, inibiu a produção de IL-12 e de TNF- α , promovendo um acréscimo na secreção de IL-10. Estes resultados mostram que esse nucleosídeo pode reduzir a capacidade de indução de uma resposta polarizada do tipo Th1. Este mecanismo também mostrou uma redução da capacidade das DCs em ativar células T CD8⁺ (PANTHER et al., 2003; BURNSTOCK e BOEYNAEMS, 2014).

Macrófagos também expressam inúmeros receptores P2: P2Y_{1,2,4,6,11,12} e P2X_{1,4,5,7}. A expressão do receptor P2 depende da natureza da ativação celular. A expressão do receptor P2X₇, por exemplo, parece aumentar após a ativação clássica de macrófagos por IFN- γ , TNF- α ou LPS. Em contraste, a ativação de macrófagos alveolares por citocinas clássicas de perfil Th2, IL-4 e IL-10, mostrou redução da expressão de receptores P2X₇ funcionais (BOURS et al., 2006). A atividade fagocítica dos macrófagos também é influenciada pela sinalização purinérgica, por meio da estimulação dos receptores P2Y₂, P2Y₁₂, P2X₁ ou P2X₃ (MARQUES-DA-SILVA et al., 2011).

Nucleotídeos extracelulares podem contribuir também para o recrutamento de células para locais de inflamação ao promover o aumento da produção de quimiocinas. O nucleotídeo UDP, por meio da ativação de receptores P2Y₆, é capaz de aumentar a secreção de CXCL8, CXCL10 e CCL2 por monócitos ativados na presença de LPS. Além disso, a estimulação dos receptores P2X₇ também promoveu aumento da expressão de moléculas de adesão como a L-selectina na superfície celular dos monócitos (BOURS et al., 2006; JACOB et al., 2013).

Sinalização por ATP via receptores P2X₇ fornece um sinal secundário para a conversão de pró-IL-1 β e pró-IL-18 em citocinas ativas (PELEGRIN, BARROSO-GUTIERREZ e SURPRENANT, 2008). P2X₇ também está relacionado à liberação de catequinas, fosfatidilserina, prostaglandina E₂ (PGE₂) e metaloproteinase de matriz-9 (MMP-9) (JACOB et al., 2013).

Macrófagos e monócitos expressam RNAm para todos os subtipos de receptores de adenosina. Esse nucleosídeo é capaz de inibir a síntese de TNF- α e aumentar a expressão de IL-10 em macrófagos via receptores A_{2A} e A_{2B}. Adenosina também pode impedir a acumulação excessiva de macrófagos nos tecidos inflamados, uma vez que em altas concentrações é capaz de inibir a quimiotaxia destas células (BURNSTOCK e BOEYNAEMS, 2014).

Em relação à expressão de ectonucleotidases, foi mostrado que macrófagos pró-inflamatórios (M1) tem uma baixa expressão de NTPDases e E-5NT em comparação com macrófagos anti-inflamatórios M2 (ZANIN et al., 2012).

Os linfócitos T, importantes células do sistema imune adaptativo, também apresentam um repertório de receptores de nucleotídeos. Receptor A_{2A} ativado por adenosina promove a apoptose, contribui para a manutenção do número normal de células T *naive* por inibir a ativação do TCR, reduz a mobilidade, a migração para os linfonodos e a adesão de linfócitos ao endotélio (BURNSTOCK e BOEYNAEMS, 2014). Essas células também expressam receptores P2X e P2Y, bem como ectonucleotidases, entre elas a NTPDase 1 (CD39). Com o objetivo de aumentar a sensibilidade e a seletividade da resposta, as células T possuem mecanismos que permitem a amplificação de sinais. Filippini, Taffs & Sitkovsky (1990) foram os primeiros a mostrarem o papel do ATP na ativação de linfócitos. Estimulação via TCR e CD28 estimula a liberação de ATP por meio de canais de panexina, promovendo sinalização autócrina via receptores P2X₁, P2X₄ e P2X₇. Receptores P2 e ATP liberado por APCs podem ter papéis importantes no reconhecimento do antígeno (Figura 7). A

entrada de Ca^{2+} pelos canais P2X também auxilia nessa amplificação do sinal, ativando o fator nuclear de células T ativadas (NFAT) (FILIPPINI, TAFFS e SITKOVSKY, 1990; JUNGER, 2011). O papel dos receptores P2Y nos linfócitos ainda é pouco esclarecido, mas foi observado um aumento na expressão de RNAm do receptor P2Y₂ em timócitos ativados e que este está envolvido na migração induzida por células T. Além disso, receptores P2Y₁₄ foram expressos por linfócitos T derivados de baço de camundongos e nucleotídeos de adenina inibiram a ativação das células T CD4⁺ através do aumento de AMPc induzido por um receptor P2Y (DUHANT et al., 2002; BURNSTOCK e BOEYNAEMS, 2014).

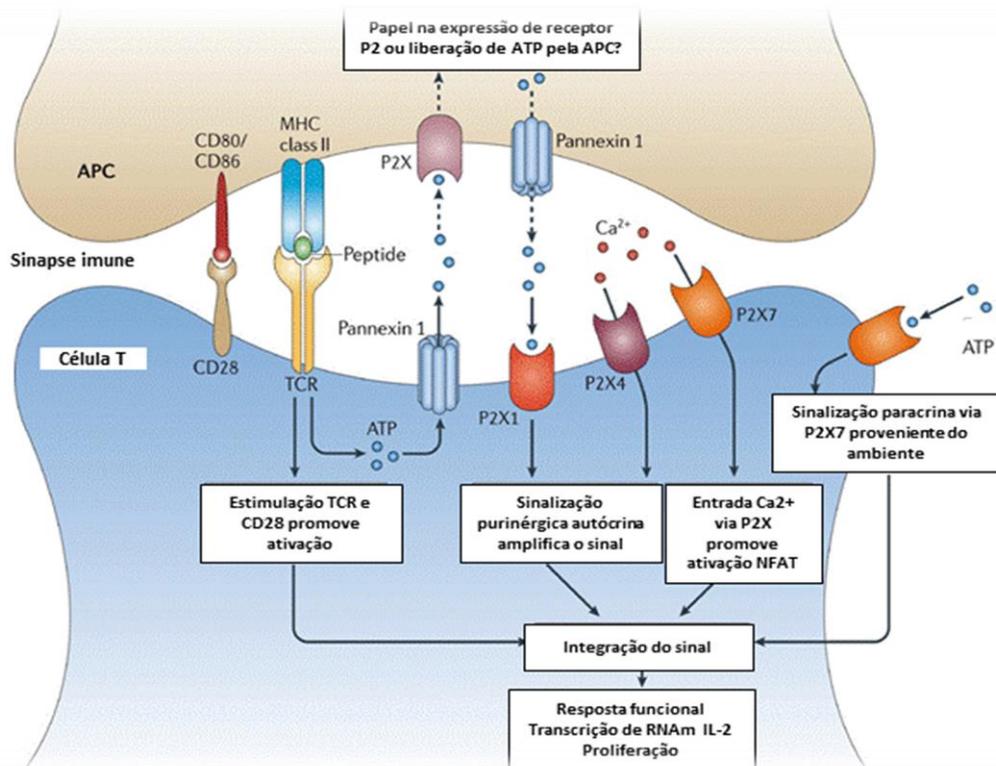


Figura 7. Sinalização purinérgica na ativação de célula T. Receptores P2X e ATP desempenham papel importante na amplificação de sinais desencadeados pela ativação do linfócito. Extraído e adaptado de JUNGER, 2011

As células T e B exibem baixa atividade de E-NT, mas têm uma elevada expressão de NTPDase 1, que pode ser aumentada com a ativação da célula. NTPDases também podem exercer outras funções, agindo como moléculas

sinalizadora com papel na regulação de funções efetoras de linfócitos ativados (BOURS et al., 2006).

Células T regulatórias (Treg) são caracterizadas por um aumento da expressão de NTPDase 1 e da taxa de produção de adenosina, importante para a atividade imunossupressora dessas células. Em colaboração com CD73, essa enzima facilita geração de adenosina, o que resulta na ativação de receptores A_{2A} de células T efetoras, inibindo a atividade destas (ANTONIOLI et al., 2013). Corroborando essa ideia, Wang e colaboradores (2012) mostraram que a expressão de NTPDase 1 por Treg contribuiu para um papel protetor em modelo murino de lesão renal.

A adenosina também promove o aumento de células Treg e potencializa sua atividade imunossupressora. Assim, a interação entre esse nucleosídeo e as Tregs sugere um mecanismo de feedback positivo: adenosina estimula células Tregs, essas expressam mais ectonucleotídeos, gerando mais adenosina (OHTA e SITKOVSKY, 2014).

1.2.3. SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA E DOENÇAS

Muitas disfunções na sinalização purinérgica podem gerar patologias e auxiliar na progressão de doenças. Nos casos de epilepsia, as convulsões provocam um aumento da atividade neuronal, induzindo a elevação de K^+ no espaço extracelular. Em resposta a essas alterações, ATP é liberado de neurônios, estimulando os receptores de nucleotídeos e hiperativando as células. Nesse contexto, $P2X_7$ tem um papel crucial, uma vez que sua expressão é aumentada na doença. Como consequência, ativa-se um mecanismo de “feedback” positivo, prolongando a duração das convulsões (PUCHALOWICZ et al., 2014).

Outras doenças do sistema nervoso central também são influenciadas pela sinalização purinérgica, uma vez que neurônios e células gliais expressam receptores $P2X$ e $P2Y$. O ATP liberado no processo de neurodegeneração e neuroinflamação desempenha o papel de molécula sinalizadora, ativando esses receptores e agravando o quadro patológico (PUCHALOWICZ et al., 2014).

No câncer, já é estabelecido que o ATP acumula-se no microambiente do tumor, agindo como padrão molecular associado ao dano (DAMP) e mediador pró-inflamatório. No entanto, recentes descobertas mostram que a liberação desse nucleotídeo não é apenas um subproduto da ativação das células imunes, mas está relacionada ao metabolismo celular do tumor e da imunidade antitumoral. O acúmulo de ATP pode ser benéfico ou prejudicial para o hospedeiro dependendo da taxa de degradação para adenosina, modulada pelas enzimas CD39 e CD73, e dos receptores de nucleotídeos expressos pelas células tumorais e as células imunes (DI VIRGILIO, BOEYNAEMS e ROBSON, 2009; DI VIRGILIO, 2012).

A expressão de ectoenzimas pode estar associada com a evasão do tumor. Como descrito em diversos trabalhos, CD39 é expressa em células Treg e causa supressão de células T efectoras pela geração de adenosina em distúrbios linfoproliferativos. Além disso, suprime atividade de células natural killer (NK), provocando o crescimento do tumor. Adicionalmente, CD73 é mais expressa por células tumorais, como mecanismo de escape. A adenosina produzida por essa enzima contribui para a redução da ativação de células efectoras e também promove a apoptose de células T (ANTONIOLI et al., 2013; BURNSTOCK e DI VIRGILIO, 2013). Com essas descobertas, CD73 e CD39 tornaram-se alvos clinicamente relevantes, sendo demonstrada a eficácia da terapia com anticorpos anti-CD73 e anti-CD39 na redução do crescimento tumoral no câncer de mama e de ovário (STAGG et al., 2010; HÄUSLER et al., 2014).

Loza et al (2011) testaram se a redução do número de Tregs e, especificamente, de Tregs expressando CD39 está associada com o desenvolvimento de lúpus. Os autores observaram que indivíduos com lúpus e defeito na expressão de CD39 apresentaram a supressão mediada por Treg quase ausente. Assim, concluíram que defeitos funcionais das Tregs são responsáveis pela perda da tolerância periférica na doença e podem ser utilizados como marcadores na doença (LOZA et al., 2011).

Na infecção por *Toxoplasma gondii*, Tonin et al (2013) observaram um aumento na hidrólise de ATP e ADP por linfócitos de ratos infectados. Baseado no aumento da atividade de NTPDase e E-ADA, os autores propuseram a participação dessas enzimas em uma resposta anti-inflamatória, prevenindo os danos teciduais excessivos causados pela infecção com *T. gondii* (TONIN et al., 2013). Jaques et al (2012) também observaram um aumento da atividade E-NTPDase e uma atividade reduzida de E-ADA em pacientes com artrite reumatoide, sugerindo um esforço orgânico para

manter o nível de adenosina, supressor potente da resposta imune (JAQUES et al., 2012).

Em contrapartida, trabalhos do mesmo grupo mostraram a redução da atividade de NTPDase e E-ADA em linfócitos de indivíduos com doença de Chagas na forma indeterminada (IFCD), com diminuição dos níveis de ATP no soro e aumento nos níveis de adenosina e AMP, sugerindo uma modulação da resposta imune, com o desenvolvimento de um perfil Th2 (SOUZA, 2011; SOUZA et al., 2011).

Na infecção por *M. tuberculosis*, Dubois-Colas e colaboradores (2014) mostraram um papel não conhecido na sinalização purinérgica nesse tipo de infecção. O ATP diminuiu a secreção de mediadores inflamatórios, como TNF- α e quimiocinas responsáveis pelo recrutamento de células efetoras e aumentou a expressão de VEGF e TGF- α . Ativação alternativa de macrófagos, mediada pela degradação de ATP em AMP pela CD39, forneceu evidências de que o AMP estimula receptor A_{2A}. De acordo com os autores, estes diferentes resultados mostram que um microambiente rico em AMP extracelular, semelhante ao que provavelmente acontece no granuloma, modula a resposta de macrófagos à infecção por *M. tuberculosis* e pode limitar o dano tecidual como também favorecer o escape da bactéria do sistema imune (DUBOIS-COLAS et al., 2014).

1.2.4 SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA EM *Schistosoma sp.*

Purinas parecem ser os mensageiros químicos mais primitivos nos reinos animal e vegetal. Estudos recentes têm utilizado técnicas de biologia molecular para clonar receptores de nucleotídeos caracterizados em invertebrados primitivos, tais como *Dictyostelium* e o platelminto *Schistosoma* (VERKHRATSKY & BURNSTOCK, 2014).

Em *Schistosoma mansoni*, o único receptor de nucleotídeos identificado até o momento é ionotrópico e responsivo a ATP, denominado SchP2X ou SmP2X. Esse receptor apresenta cerca de 25-36% de homologia com receptores P2X humanos, sendo mais semelhantes aos receptores P2X₄ e P2X₅ (AGBOH et al., 2004, RAOUF

et al. 2005). Esse receptor primitivo está relacionado à regulação de Ca^{2+} no meio intracelular, que desempenha um papel crítico na sobrevivência do parasito. Influxo de Ca^{2+} pode levar a contração e paralisia do verme (BURNSTOCK e VERKHRATSKY, 2009).

O tegumento do verme adulto de *Shistosoma sp.* apresenta diferentes enzimas capazes de converter ATP em adenosina: fosfatase alcalina (SmAP), ectofosfodiasterase (SmPDE) e SmATPDase (Figura 8). A presença dessas enzimas facilita a locomoção intravascular e a alimentação do parasito, reduzindo a trombose pela hidrólise do ADP e o ataque do sistema imune (BHARDWAJ e SKELLY, 2009).

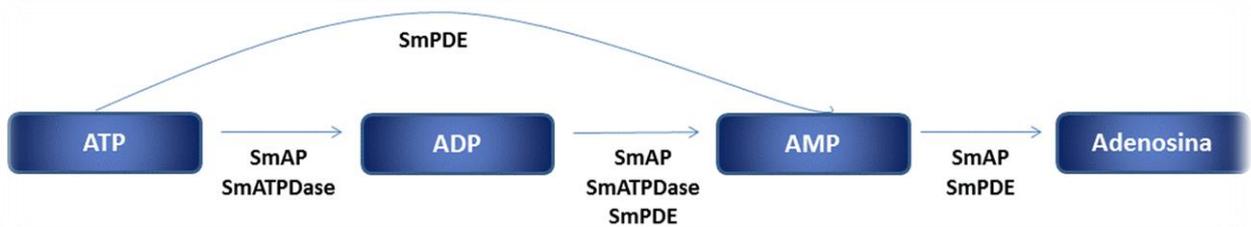


Figura 8. Via de conversão de ATP a adenosina por enzimas do tegumento de *Shistosoma sp.* Extraído e adaptado de BHARDWAJ & SKELLY, 2009

Dentre essas enzimas, destacam-se as ATP difosfohidrolases (ou SmATPDases), que são alvos de estudos em nosso laboratório. Foram caracterizadas e clonadas duas isoformas dessa proteína: SmATPDase 1 e SmATPDase 2 (VASCONCELOS et al., 1993; 1996; DEMARCO et al., 2003; LEVANO-GARCIA et al., 2007). A primeira possui peso predito de 61,35 kDa, localiza-se na superfície externa do tegumento e possui duas regiões transmembranas, apresentando uma estrutura semelhante a NTPDase 1 de mamíferos. A SmATPDase 2, por sua vez, tem massa molecular de 63,78 kDa e possui apenas uma região transmembrana. Esta pode originar uma proteína solúvel com cerca de 55 kDa, por processamento pós-traducional, que foi identificada sendo secretada pelo parasito, vermes adultos em cultura e ovos (DEMARCO et al., 2003; FARIA-PINTO et al., 2004; LEVANO-GARCIA et al., 2007; MENDES et al.; 2011).

Trabalhos anteriores do nosso grupo mostraram que as isoformas de ATPDases extraídas de *S. mansoni* apresentam imunorreatividade cruzada com

anticorpos anti-apirase de batata (*Solanum tuberosum*). Estes anticorpos foram capazes de identificar a proteína na superfície do tegumento de vermes adultos e nos miracídios, no envelope de Von Lichtenberg's e na superfície externa da casca do ovo, sugerindo que uma das isoformas poderia ser secretada (VASCONCELOS et al, 1993; 1996; FARIA-PINTO et al., 2004). Em 2011, Mendes e cols. localizaram esta proteína sendo secretada pelos ovos do parasito ao redor do granuloma hepático, utilizando anticorpos anti-SmB2LJ, peptídeo derivado da isoforma solúvel (MENDES et al., 2011). Anticorpos anti-SmB2LJ, anti-apirase de batata e anticorpos contra outros peptídeos derivados também foram capazes de inibir a atividade e imunoprecipitar as isoformas de ATP difosfohidrolases de preparações antigênicas do parasito *S. mansoni* (MENDES et al., 2011; MAIA et al., 2011).

O alinhamento da sequência primária de NTPDases de parasitos e vegetais foi avaliada por Faria-Pinto e colaboradores (2008), mostrando domínios compartilhados entre as diferentes enzimas, o que permitiu o mapeamento de regiões preditas como antigênicas, entre elas a denominada rDomB (MAIA et al., 2011; 2012). Assim, as proteínas do vegetal e dos parasitos compartilham epitopos conservados que podem ser utilizados como ferramenta para o estudo dessa família de proteínas (FARIA-PINTO et al., 2008).

A esquistossomose, como outras helmintoses, induz uma resposta imunológica do perfil Th2. Os vermes de *S. mansoni* são capazes de imunomodular a resposta imune do tipo Th1 e apresentam um papel protetor nas respostas às doenças autoimunes, tais como asma e encefalomielite autoimune (LA FLAMME et al., 2004). As SmATPDases podem estar diretamente relacionadas a esses mecanismos de escape e adaptação do parasito. A interferência na sinalização purinérgica, seja reduzindo as concentrações de ATP lítico e sinalizador ou diminuindo a agregação plaquetária pela degradação de ADP, constitui uma forma de imunomodulação da resposta imune do hospedeiro, restringindo eventos como a trombose e aumentando a sobrevivência do patógeno (BHARDWAJ & SKELLY, 2009).

Embora já descritas em *S. mansoni*, as isoformas de NTPDases ainda não tem sua função fisiológica completamente elucidada, mas se apresentam como antígenos para o hospedeiro mamífero. Desta forma, acreditamos que a presença de anticorpos direcionados contra as isoformas de NTPDases presentes e expressas em todas as fases do ciclo de vida deste helminto possam influenciar de forma expressiva a condução da resposta imune. Esta hipótese ganha força à medida que a

imunoreatividade cruzada é observada entre os anticorpos produzidos contra as proteínas desta família de enzimas. Regiões homólogas entre a isoforma SmATPDase 1 e a isoforma NTPDase 1 - presente em células do sistema imune de mamíferos - podem ser alvos desta imunoreatividade cruzada entre anticorpos, o que justificaria uma modulação direta da sinalização purinérgica desenvolvida durante a progressão da doença.

Neste trabalho, avaliamos a reatividade cruzada de anticorpos anti-NTPDases de diferentes origens com NTPDase 1 de células imunes. Analisamos também a influência desses anticorpos sobre a proliferação e sinalização purinérgica, sugerindo um possível mecanismo de imunomodulação da resposta imune durante a esquistossomose.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos dos anticorpos anti-NTPDases produzidos contra as isoformas da enzima do parasito *Schistosoma mansoni* na proliferação e sinalização de células do sistema imune.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Identificar a presença de isoformas de NTPDases em macrófagos da linhagem RAW 264.7 e esplenócitos utilizando a reatividade cruzada dos anticorpos anti-NTPDase de *S. mansoni*;

2.2.2. Identificar a atividade fosfolitolítica nas preparações de células RAW 264.7 em gel não desnaturante;

2.2.3. Identificar por microscopia confocal de varredura a laser a NTPDase 1 de células imunes utilizando anticorpos anti-CD39 e anti-NTPDases presentes no soro de animais infectados com *S. mansoni*;

2.2.4. Verificar a reatividade de anticorpos presentes no soro imune de camundongo com esquistossomose em preparações de macrófagos e esplenócitos por técnica de ELISA;

2.2.5. Avaliar a inibição da atividade enzimática da NTPDase de células imunes por anticorpos anti-NTPDases presentes no soro de animais infectados com o helminto;

2.2.6. Avaliar os efeitos de anticorpos do soro imune de camundongos infectados com *S.mansoni* na proliferação de macrófagos e esplenócitos;

2.2.7. Quantificar os níveis de TNF- α , IL-12 e NO em sobrenadante de culturas de macrófagos;

2.2.8. Verificar os efeitos de anticorpos anti-NTPDases na proliferação de linfócitos T e B por citometria de fluxo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Schistosoma mansoni*

Os soros empregados nesta dissertação foram coletados e estocados de acordo com as normas de ética em experimentação animal, aprovadas pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Juiz de Fora, sob os números de protocolo: 017/2009, 025 e 026/2012. Para isso, cercárias obtidas de caramujos *Biomphalaria glabrata* infectados com miracídeos provenientes da cepa LE de Belo Horizonte, do centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR/FIOCRUZ), foram usadas para a infecção. Os camundongos da linhagem C57BL/6 foram submetidos à infecção subcutânea com cinquenta cercárias de *S. mansoni*. Após cinquenta e cinco dias, amostras de soro de animais saudáveis e com esquistossomose foram obtidas por centrifugação e estocadas a -20°C até o uso.

3.2. ISOLAMENTO DE ESPLÊNOCITOS, CULTURA DE MACRÓFAGOS RAW 264.7 E PREPARAÇÃO DE HOMOGENEIZADO DE CÉLULAS

Baços de camundongos C57BL/6 saudáveis foram macerados com telas de metal empregando 10 mL de PBS estéril. A suspensão foi centrifugada a 1500 rpm por 10 minutos. As células foram ressuspensas em 2 mL de tampão ACK (0,15 M NH₄Cl, 1,0 mM KHCO₃, 0,1 mM Na₂EDTA, pH 7,2) e incubadas por 5 minutos para realização da lise osmótica de hemácias. Após esse tempo, o volume foi completado para 30 mL e a suspensão foi novamente centrifugada a 1500 rpm por 10 minutos. As células foram, então, ressuspensas em meio RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, São Paulo) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado por calor (Cultilab, Campinas, São Paulo), penicilina G sódica (100 U/mL) e sulfato de estreptomicina

(100 µg/mL) (Cultilab, Campinas, São Paulo). Após a determinação da concentração celular em câmara de Neubauer, uma alíquota dessas células foi utilizada em ensaios de proliferação celular e outra alíquota foi lavada com PBS estéril e centrifugada para ser utilizada no preparo do homogeneizado.

Macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram gentilmente doados pelo Prof. Dr. Gilson Costa Macedo, do Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Juiz de Fora. As células foram cultivadas em estufa a 37°C e 5% CO₂ por 5 dias em garrafas de cultivo de 25 cm² com meio RPMI (Cultilab, Campinas, São Paulo) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado por calor (Cultilab, Campinas, São Paulo), penicilina G sódica (100 U/mL) e sulfato de estreptomicina (100 µg/mL) (Cultilab, Campinas, São Paulo). No terceiro dia, o meio foi trocado e ao final do quinto dia as células foram submetidas à tripsinização, coletadas e centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos, depois lavadas em PBS estéril e novamente centrifugadas.

Macrófagos e esplenócitos, após lavagem, foram ressuspensos em tampão Tris-HCL 50 mM, pH 7,4, com sacarose 8% e inibidores de proteases (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) leupeptina (0,5 µg/mL), pepstatina (0,07 µg/mL), inibidor de tripsina (50 µg/mL) e fluoreto de fenilmetilsufonil (2 µg/mL). O rompimento da membrana celular e liberação de proteínas foram obtidos por meio de 5 ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido e 5 ciclos no UltraSonic Cleaner (Unique) por 10 minutos. O homogeneizado de células foi estocado a -20°C até o momento de uso. A determinação de proteínas totais foi realizada pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951).

3.3. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA E IDENTIFICAÇÃO POR “WESTERN BLOT”

Alíquotas de homogeneizado de células RAW 264.7 e preparação de esplenócitos (100 µg) foram solubilizadas em tampão de amostra, aquecidas por 5 minutos a 100°C e aplicadas em gel de poliacrilamida 10% com 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS), de acordo com Laemmli (1970). Também foi aplicado um

padrão de peso molecular pré-corado. A corrida foi realizada por cerca de 2 h a 100 V em um sistema de eletroforese (Mini Protean III, BioRad). Uma parte do gel foi corada com Azul de Comassie (1% de azul de comassie R (m/v), 30% de ácido acético glacial e 40% de metanol) e as proteínas da outra parte foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose (Mini Trans-Blot III, BioRad). As membranas foram cortadas, bloqueadas por 2 h com tampão fosfato (PBS) acrescido de 3% de caseína e 0,05% Tween 20 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) e incubadas com soro imune de camundongos infectados com *S. mansoni*, soro de animais saudáveis ou anticorpos anti-CD39 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Califórnia, USA) na diluição de 1:500. Os ensaios foram revelados por quimioluminescência utilizando anticorpos secundários anti-IgG de camundongo conjugados a peroxidase (Bethyl Laboratories INC., Montgomery, TX, USA) e o luminol como substrato, seguido de exposição a filmes de raio-X, de acordo com as instruções do fabricante (ECL Western blotting System; GE Healthcare Life Sciences, Brasil).

3.4. PURIFICAÇÃO PARCIAL DA NTPDase 1 DE PREPARAÇÃO DE CÉLULAS RAW 264.7 POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA NÃO DESNATURANTE E IDENTIFICAÇÃO POR “WESTERN BLOT”

Alíquotas de 600 µg de proteína total de células RAW 264.7 foram solubilizadas em tampão de amostra composto por Tris-HCl 0,125 M pH 6,8, glicerol 10%, deoxicolato de sódio (DOC) 0,2%, Triton X-100 0,2% e azul de bromofenol. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 6% com Triton X-100 0,1%, DOC 0,1% e submetidas à eletroforese a 130 V por 3 h usando o sistema Mini Protean III (BioRad). Após a corrida, o gel foi lavado 2 vezes por 20 minutos em tampão MOPS 50 mM, pH 7,4 e incubado a 37°C com MOPS 50 mM, pH 7,4, suplementado CaCl₂ 10 mM e 5 mM do substrato ATP. Após 12 h, a atividade fosfohidrolítica foi identificada pela formação de um precipitado de fosfato de cálcio no gel e fotografada sobre um fundo escuro. As bandas foram cortadas, imersas em tampão de amostra e aplicadas em gel de poliacrilamida 10% com 0,1% de SDS. Após a corrida, as proteínas foram

eletrotransferidas, a membrana bloqueada e incubadas com soro imune de camundongos infectados com *S. mansoni*, soro de animais saudáveis ou anticorpos anti-CD39 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) na diluição de 1:500, como descrito no item 3.3.

3.5. QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS DO SORO IMUNE DE CAMUNDONGOS COM ESQUISTOSSOMOSE POR TÉCNICA DE DE ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAYS)

Preparações de macrófagos e esplenócitos foram solubilizadas em tampão NaHCO₃ 0,1 M, pH 9,6 (1µg/mL) e incubadas overnight a 4°C em placas de microtitulação (Costar, 3590, Corning Inc., NY, USA). As placas foram, então, lavadas com PBS e Tween 0,05% (3 vezes) e bloqueadas 1 h com tampão fosfato (PBS) 0,15 M, pH 7,2, caseína 3% e Tween-20 0,05%. O “pool” de soros de camundongos infectados com *S. mansoni* e de animais saudáveis foram diluídos em tampão de bloqueio em diferentes concentrações (1:50 a 1:6400). Após 3 h, as placas foram lavadas 3 vezes com solução de PBS e Tween 0,05% e incubadas por 1 h e 30 minutos com anticorpos anti-IgG total de camundongos conjugados com peroxidase na diluição 1:1000 em PBS. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS e Tween-20 0,05%. A revelação foi realizada por OPD (o-fenilenediamino) e H₂O₂. A reação colorimétrica foi interrompida com adição de H₂SO₄ 1N e mensurada por espectrofotometria, em leitor de microplacas no comprimento de onda 492 nm. O ensaio foi realizado em duplicatas e poços na ausência de soro foram considerados brancos da reação.

3.6. IDENTIFICAÇÃO DA ISOFORMA DE NTPDase 1 POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para a detecção de NTPDase 1 por imunocitoquímica, macrófagos foram cultivados sobre lamínulas inseridas em placas de 24 poços. Após 24 h de cultura, as

células aderidas nas lamínulas foram lavadas com PBS. Para o preparo de lâminas de esplenócitos, uma alíquota de 2×10^6 de células foi colocada em lâminas de vidro previamente tratadas com silane. Macrófagos e esplenócitos foram, então, fixados em paraformaldeído 4% por 10 min à temperatura ambiente. Após 3 lavagens em solução contendo PBS e Tween 0,05%, as células fixadas foram bloqueadas com solução de PBS contendo 4% de soro fetal bovino por 60 min à temperatura ambiente, seguido de novas lavagens (3 vezes). As lâminas foram incubadas durante 12 h à 4°C com soro imune de camundongo infectado com *S. mansoni*, diluído 1:50. Anticorpos anti-CD39 foram adicionados na diluição 1:100. As lâminas foram lavadas 3 vezes em PBS e Tween 0,05% e incubadas por 60 min com anticorpos anti-IgG de camundongo conjugados ao Alexa 488 (Alexa Fluor 488; Invitrogen), diluído 1:1000. Após incubação, as lâminas foram novamente lavadas 5 vezes, e incubadas com DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol/Invitrogen), seguido de novas lavagens (5 vezes). Como controle, as células foram incubadas com o soro de camundongo saudável. Após secagem e montagem, as lâminas foram examinadas no microscópio de imunofluorescência, um microscópio confocal de varredura a laser (TCS SP5, Leica, Alemanha). Para captação de sinal para Alexa Fluor 488, amostras foram excitadas pelo Laser de Argônio na faixa de 488 nm. A marcação com DAPI foi excitada a 405 nm. As imagens foram processadas por meio do software Leica Application Suite (LAS 260).

3.7. EFEITOS DO SORO IMUNE DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *S. mansoni* SOBRE A ATIVIDADE FOSFOHIDROLÍTICA

Alíquotas da preparação de células (3 mg/mL) foram incubadas por 3 h com pool de soro imune de camundongo infectado com *S. mansoni*, pool de soro de animal saudável ou anti-CD39, todos na diluição 1:50. Ao final desse tempo, amostras foram utilizadas para quantificar a atividade enzimática da NTPDase como previamente descrito (KUKULSKI et al., 2005). Alíquotas contendo a preparação proteica (0,05 mg/mL) foram adicionadas a uma solução padrão de reação contendo 80 mM de Tris

(Tris-hidroximetil-aminometano), pH 7,4, 5 mM de CaCl₂, totalizando um volume de 0,5 ml. Essa mistura foi incubada a 37°C e a reação foi iniciada pela adição de ATP (0,5 mM). Após 60 min, a reação foi interrompida com 0,125 mL de reagente verde malaquita. A liberação de fosfato inorgânico (Pi) foi avaliada de acordo com método de Baykov et al. (1988), adaptado.

3.8. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE ANTICORPOS NA PROLIFERAÇÃO CELULAR

Macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram cultivados em placas de microtitulação de 96 poços (EasyPath) na concentração de 1×10^5 células/poço em meio RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, São Paulo) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, São Paulo), penicilina G sódica (100 U/mL) e sulfato de estreptomicina (100 µg/mL) (Cultilab, Campinas, São Paulo). Após 24 h em estufa a 37°C e 5% CO₂, as células foram lavadas com PBS estéril para retirada de células não aderentes e estas foram estimuladas com LPS (1 µg/mL) e IFN (4 U/poço) por 1 h. Por sua vez, os esplenócitos utilizados nesse ensaio foram isolados conforme item 3.2. e plaqueados (10^6) em placas de 96 poços de fundo em "U" (Sarstedt) em meio RPMI 1640 suplementado com 10% SFB e 1% de antibióticos. As células foram estimuladas com 5 µg/ml de concanavalina A (ConA) (Sigma, St. Louis, MO). Adicionalmente, soro imune de camundongo saudável, infectado com *Shistosoma mansoni* ou anti-CD39 na diluição 1:50 foi acrescentado nas culturas dos dois tipos celulares.

A atividade proliferativa foi avaliada nos tempos de 24 h, 48 h e 72 h para os macrófagos e 48 h e 72 h para os esplenócitos. Para análise da proliferação foi empregado o método de MTT, que se baseia na redução do sal tetrazólico (3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) a formazan (cristais roxos e insolúveis) por desidrogenases mitocondriais (MOSMANN, 1983). As células foram incubadas com 10% de MTT (5 mg/mL) em relação ao volume final do poço por 3 h em estufa a 37°C e 5% CO₂. Os sais de formazan foram diluídos com DMSO (100 µL) e a absorbância

foi medida a 570 nm em leitor de microplacas. O índice de proliferação celular foi obtido pela razão da D.O. dos grupos testes versus D.O. obtida com soro de animais não infectados.

3.9. DETECÇÃO DE CITOCINAS POR ELISA E DOSAGEM DE NO EM SOBRENADANTE DA CULTURA DE MACRÓFAGOS

Para determinar a concentração de TNF- α e IL-12 por ELISA, macrófagos foram plaqueados (10^6) em placas de 96 poços com meio RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, São Paulo) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, São Paulo), penicilina G sódica (100 U/mL) e sulfato de estreptomicina (100 μ g/mL) (Cultilab, Campinas, São Paulo). Após 24 h em estufa a 37°C e 5% CO₂, as células foram lavadas com PBS estéril e estas foram estimuladas com LPS (1 μ g/ml) por 1 h ou não estimuladas. Diferentes tratamentos foram, então, empregados: um grupo foi tratado com soro de camundongo saudável, outro com soro de camundongo infectado com *S. mansoni* e um terceiro com anticorpos anti-CD39, todos na diluição de 1:50. Sobrenadantes foram recolhidos após 48 h de cultura para dosagem de IL-12 e 72 h de cultura para dosagem de TNF- α . Os níveis dessas citocinas foram detectados por ELISA utilizando os kits Duoset (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

Quantificação de nitrito pelo método de Griess, como uma medida da produção de óxido nítrico (GREEN et al., 1981) também foi avaliada. Para isso, 50 μ L do sobrenadante de células incubadas com soro de camundongo infectado com *S. mansoni* ou não estimuladas foram incubadas com 50 μ L do reagente de Griess (v/v de Sulfanilamida a 1% e de N-naphthylethylenediamine (NEED) a 0,1%) à temperatura ambiente por 5 minutos. A curva padrão foi realizada com NO₂ (200 μ g) em diluições seriadas. A leitura da absorbância foi obtida em leitor de microplacas, em 570 nm. Soro de animal não infectado foi utilizado como controle.

3.10. AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS T E B POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para avaliar o índice de proliferação celular de linfócitos, esplenócitos foram plaqueados (1×10^6) em placas de 96 poços de fundo em "U" (Sarstedt) em meio RPMI 1640 (Gibco, Gran Island, NY, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 μ g/mL). Após 48 h de incubação a 37°C e sob atmosfera com 5% de CO₂, iniciou-se o processo de marcação. Primeiramente, as placas foram centrifugadas a 250 g por 5 minutos e o sobrenadante removido por inversão rápida da placa. As células foram então ressuspensas em 100 μ l de solução de bloqueio constituída de PBS e soro de camundongo, mantidas em refrigeração a 4°C e, na sequência, centrifugadas a 250 g, 5 minutos.

Lavagem com tampão FACS (PBS com 1% de soro fetal bovino e 0,09% de azida). Em seguida, as placas de cultura foram submetidas a uma nova centrifugação (250 g, 10 minutos) e foram adicionados, a cada poço, 20 μ L de solução tampão de FACS acrescido de anticorpo anti-CD3 e anti-CD19 (B&D Biosciences, San Diego, CA), na diluição de 1:200. Estes anticorpos estavam acoplados aos fluorocromos APC-Cy7 e PE, respectivamente. Essa etapa foi sucedida pela incubação por 30 minutos à 4°C. Após esse tempo, acrescentou-se 100 μ L/poço de tampão de FACS, seguido de centrifugação (250 g, 5 minutos), sendo esse procedimento realizado 2 vezes. As células foram então ressuspensas em 150 μ l de tampão de FACS e transferidas para tubos específicos para leitura no citômetro (Corning Inc., Corning, NY, USA). As amostras foram coletadas em citômetro de fluxo FACScanto II (B&D Biosciences, San Diego, CA), onde 30.000 eventos foram adquiridos. Os resultados foram analisados pelo software FlowJo. A zona de linfócitos foi demarcada de acordo com o tamanho (FSC) x granulosidade (SSC) característicos destas células. O índice de proliferação celular foi obtido pela razão do percentual de células marcadas dos grupos testes versus percentual de células marcadas do grupo controle.

3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Análise da reatividade de anticorpos IgG contra preparação de células foi realizada pelo teste t de “Student” e os dados foram expressos como densidade ótica \pm desvio padrão. Os resultados da inibição fosfolitolítica, dosagem de citocinas e ensaios de proliferação celular foram apresentados como a média \pm desvio padrão. Esses dados foram analisados por ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, no software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Todos os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1. IDENTIFICAÇÃO DE ISOFORMAS DE NTPDases DE MACRÓFAGOS E ESPLÊNOCITOS UTILIZANDO SORO IMUNE DE ANIMAIS INFECTADOS COM *Shistosoma mansoni*

Alíquotas de preparação de macrófagos da linhagem RAW 264.7 e de esplenócitos (100 µg) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 10%. Após a corrida, as proteínas foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas com diferentes anticorpos.

Os resultados obtidos mostraram que os anticorpos anti-CD39 e soro de animal infectado com *S. mansoni* foram capazes de reconhecer duas bandas tanto no homogeneizado de macrófagos (Figura 9, Wb-I;) quanto no de esplenócitos (Figura 9, Wb-II), com massa molar aproximada de 53 kDa e 58 kDa. Esse resultado sugere a reatividade cruzada de anticorpos anti-SmATPDases presentes no soro imune de camundongo com esquistossomose com a NTPDase 1 presente em células imunes (Figura 9, Wb-I, C; Wb-II, C). Este dado foi confirmado por meio da reatividade dos anticorpos anti-CD39 comerciais identificando bandas na mesma altura no ensaio realizado (Figura 9, Wb-I, D; Wb-II, D). Interessante notar que soros de animais sadios também reconheceram as bandas (Figura 9, Wb-I, B; Wb-II, B).

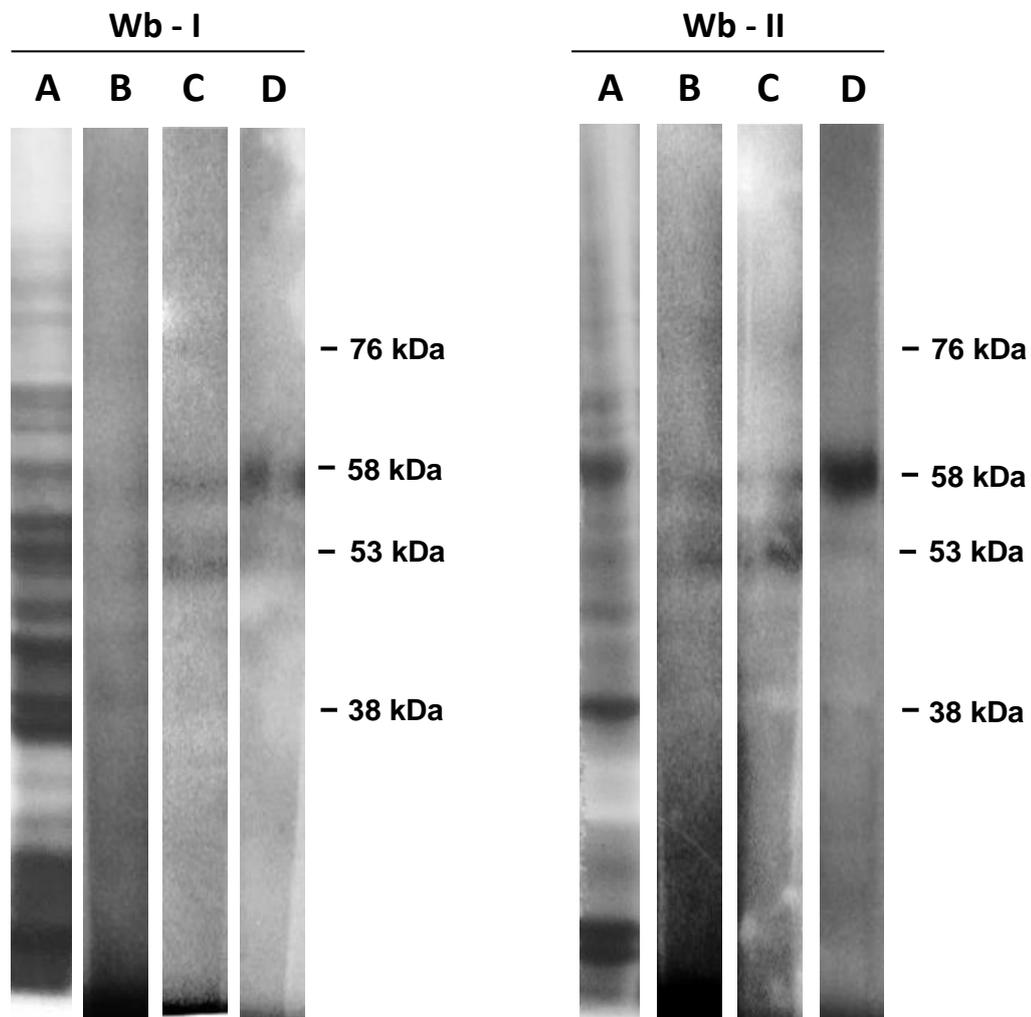


Figura 9. Identificação de isoformas de NTPDases presentes em macrófagos (Wb-I) e esplenócitos (Wb-II) pela técnica de “Western blot”. Alíquotas de proteínas extraídas de homogeneizado de células (100 μ g) foram submetidas a corrida eletroforética em gel de poliacrilamida e parte do gel foi corado por Comassie blue, evidenciando o perfil total de proteínas (Wb-I e II: A). A outra parte foi eletrotransferida para membranas de nitrocelulose e reveladas por soro de animal saudável (Wb-I e II: B), soro de animal infectado com *S. mansoni* (Wb-I e II: C) e anticorpos anti-CD39 (Wb-I e II: D) na diluição 1:500.

4.2 PURIFICAÇÃO PARCIAL DA NTPDase 1 DE PREPARAÇÕES DE CÉLULAS RAW 264.7 POR GEL DE ELETROFORESE NÃO DESNATURANTE E IDENTIFICAÇÃO POR “WESTERN BLOT”

Visando preservar a atividade de isoformas de NTPDases e separá-las de outras proteínas, alíquotas de preparações de macrófagos (600 µg) foram submetidas a eletroforese em gel não desnaturante com os detergentes Triton X-100 e deoxicolato de sódio. Posteriormente, o gel foi lavado e incubado a 37°C com solução contendo íons cálcio e ATP como substrato. Após incubação por 12 horas, foi possível visualizar a formação de um depósito de fosfato de cálcio (Figura 10, A), revelando no gel uma região contendo enzimas com atividade fosfohidrolítica evidente.

As bandas foram cortadas, submetidas a uma nova eletroforese em gel contendo detergentes desnaturantes. A coloração do gel pela impregnação com prata mostrou uma purificação parcial das NTPDases presentes nas bandas extraídas do gel não desnaturante (Figura 10, B) quando comparado ao gel de proteínas totais do homogeneizado de célula (Figura 9, Wb-I, A). Uma parte das proteínas parcialmente purificadas foi eletrotransferida para membrana de nitrocelulose e foi incubada com “pool” de soros de camundongos infectados com *S. mansoni*. Este foi capaz de revelar duas bandas: uma com cerca de 53 kDa e outra com 58 kDa. Estas bandas identificadas têm massa similar às reveladas pelo "western blot" realizado com homogeneizado total de macrófagos e esplenócitos (Figura 9, Wb-I; Wb-II), sugerindo e corroborando a hipótese de que anticorpos direcionados contra as isoformas de ATP difosfohidrolases do *S.mansoni* podem reconhecer a isoforma de NTPDase 1 de células imunes. Os soros contendo anticorpos oriundos de animais sadios não foram capazes de identificar nenhuma banda neste ensaio.

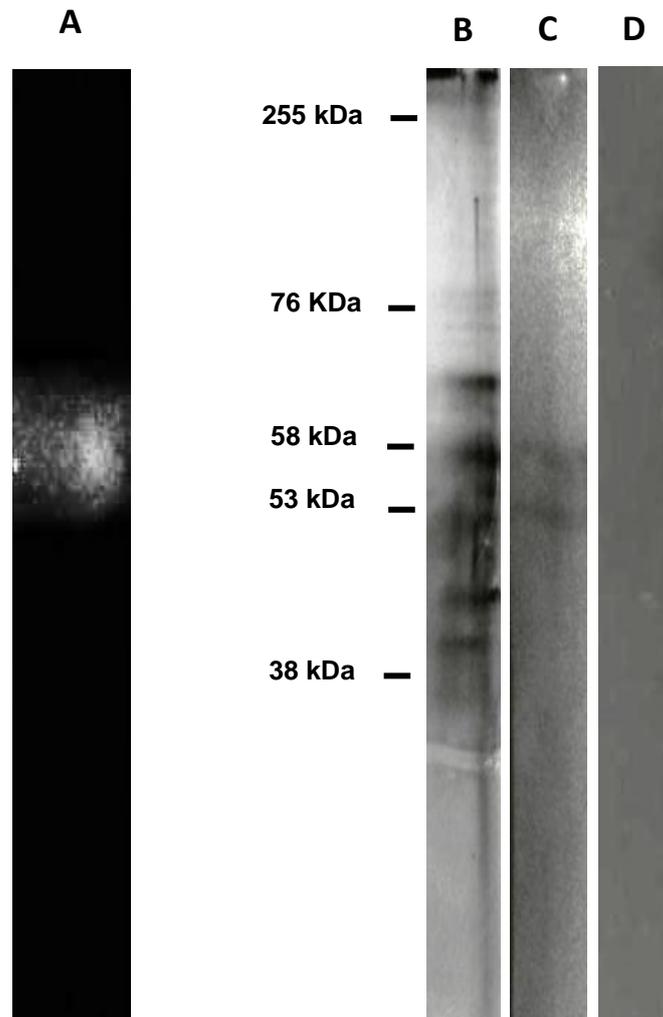


Figura 10. Atividade fosfohidrolítica em preparações de macrófagos RAW 264.7 e identificação da NTPDase 1 pela técnica de “Western blot”. Alíquotas contendo 600 µg de homogeneizado de células RAW 264.7 foram submetidas a eletroforese em gel não desnaturante por 3 h. O gel foi incubado por 12 h a 37°C com CaCl₂ e substrato ATP. (A) Atividade fosfohidrolítica visualizada pela deposição de fosfato de cálcio. Bandas de atividade foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose para análise por “Western blot”. Em B, gel corado pela prata com bandas parcialmente purificadas. Em C, membrana incubada com soro (1:500) de animal infectado com *S. mansoni*, identificando uma banda em torno de 53 kDa e outra de 58 kDa. (D) soro pré-imune na mesma diluição não evidenciou nenhuma banda.

4.3 ANÁLISE DA REATIVIDADE DE IgG TOTAL DE SORO DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *S. mansoni* CONTRA HOMOGENEIZADO DE MACRÓFAGOS E ESPLÊNOCITOS

Para testar a concentração ideal de soro para os ensaios posteriores, o nível de anticorpos IgG em diferentes titulações foi quantificado em amostras de soro de camundongos infectados com *S. mansoni* usando homogeneizado de macrófagos e esplenócitos como antígenos de cobertura em ELISA. Anticorpos presentes no soro de animais sadios foram utilizados como controle.

Como mostrado na Figura 11A, o “pool” de soro de animais infectados contra o homogeneizado de macrófagos apresentou valor de IgG significativamente maior que o do grupo controle nas diluições 1:50 ($0,285 \pm 0,0035$) e 1:100 ($0,175 \pm 0,0047$). Resultado semelhante foi observado para a titulação desse “pool” contra homogeneizado de esplenócitos (Figura 11B), em que a reatividade de IgG total do soro de camundongos infectados também foi estatisticamente maior que a do grupo controle nas diluições 1:50 ($0,458 \pm 0,0697$) e 1:100 ($0,339 \pm 0,0731$).

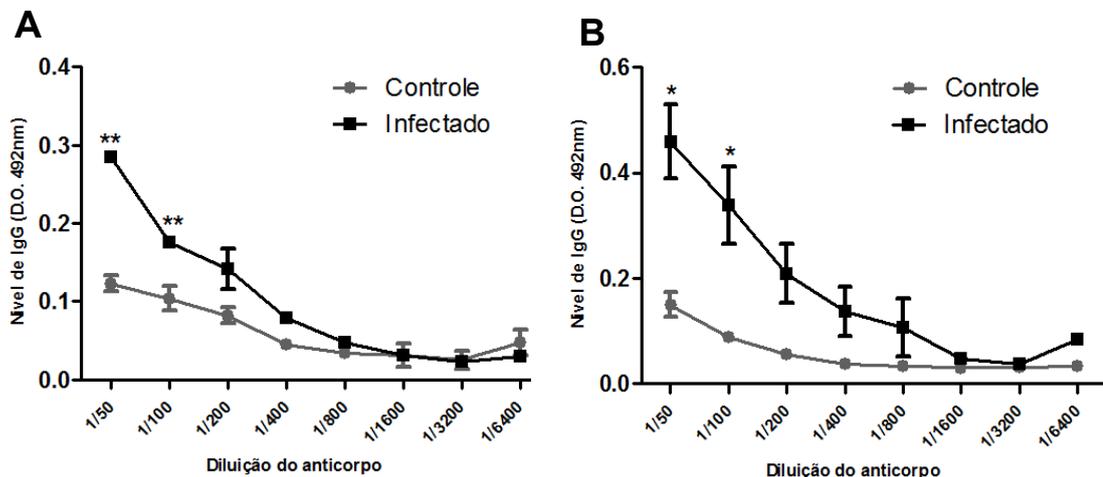


Figura 11. Reatividade de anticorpos IgG de amostras de soro de camundongos infectados com *S. mansoni* contra homogeneizado de macrófagos e esplenócitos isolados de animais sadios. “Pool” de amostras de soro de camundongos C57BL/6 infectados por *S. mansoni* e de animais saudáveis foram titulados (1:50 a 1:6400) utilizando homogeneizado de macrófagos (A) e esplenócitos (B) (10 µg/ml) como antígeno de cobertura em técnica de ELISA. A reação foi revelada por anticorpos anti-IgG (1:1000) de camundongos acoplados à peroxidase. A análise foi realizada em duplicata e os resultados foram expressos como a média das densidades óticas \pm desvio padrão. Significância estatística foi determinada pelo teste *t*. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

4.4 IDENTIFICAÇÃO DA NTPDase 1 (CD39) EM MACRÓFAGOS E ESPLÊNOCITOS POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para a detecção da presença da isoforma de NTPDase 1 (CD39) nos macrófagos e esplenócitos empregados, foi utilizada a técnica de microscopia de imunofluorescência com a leitura das lâminas em microscópio confocal de varredura a laser. Para identificação foram utilizados anticorpos anti-CD39 comercial e soro imune de camundongo infectado com *S. mansoni*.

O núcleo das células foi evidenciado pelo DAPI (Figuras 12A; 13A; 14 A, C), uma sonda que se liga ao DNA nuclear. Essas imagens foram também capturadas em DIC (Contraste Interferencial – Nomarski), permitindo a visualização das células distribuídas pelo campo (Figuras 12B; 13B). Nos macrófagos, anticorpos anti-CD39 (Figuras 12C; 12E) e anti-SmATPDases presentes no soro de animal infectado (Figuras 13C; 13E) foram capazes de identificar a isoforma de NTPDase 1, evidenciada pelas marcações puntiformes verdes distribuídas pela membrana plasmática (setas), revelados por anticorpos anti-IgG de camundongo ligados ao Alexa Fluor 488. As marcações também foram observadas pela captura da imagem em DIC (Figuras 12 e 13; D e F).

Nos esplenócitos, anticorpos anti-CD39 comercial (1:100 – Figuras 14B) e soro imune de camundongo infectado (1:50 – Figuras 14D), revelados com anticorpos anti-IgG conjugados ao Alexa Fluor 488 também identificaram a NTPDase 1. Nenhum sinal foi detectado quando o soro de camundongo saudável foi usado (dados não mostrados).

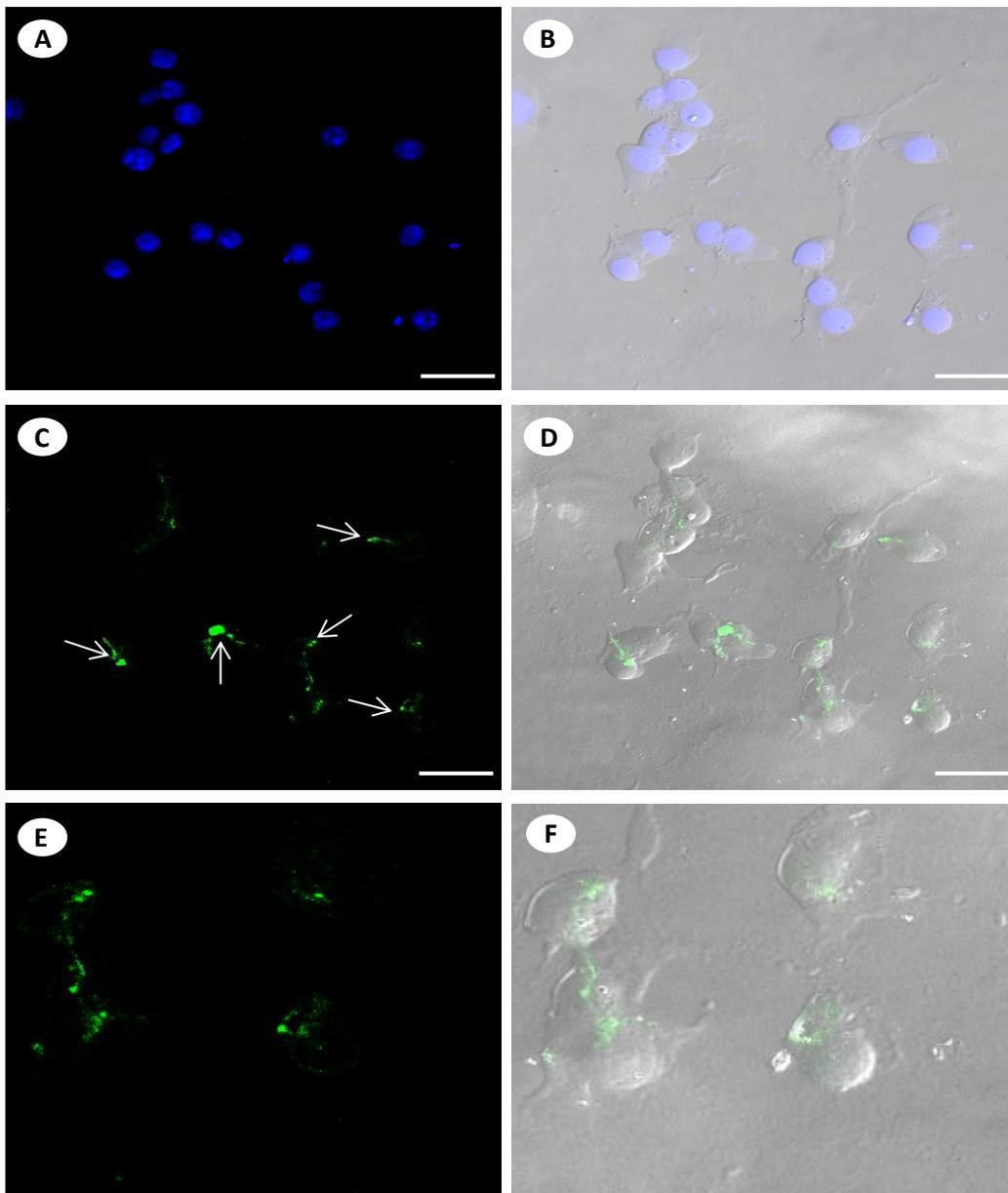


Figura 12. Identificação da isoforma NTPDase 1 presente em macrófagos da linhagem RAW 264.7 por microscopia de imunofluorescência usando anticorpos anti-CD39 comercial. Macrófagos da linhagem RAW 264.7 aderidos a lamínulas de vidro foram fixados, permeabilizados e, em seguida, incubados com anticorpos anti-CD39 (diluição 1:100) e anticorpos secundários anti-IgG conjugados ao Alexa Fluor 488 (diluição 1:1000). A análise foi feita através de um microscópio de varredura confocal a laser (Leica SP5), usando para excitação o laser de diodo (405 nm) para DAPI (azul; A, B) e laser de argônio (488 nm) para Alexa Fluor 488 (verde; C, D, E, F). As imagens obtidas em DIC (B, D, F) mostram o aspecto geral das células. A-D, aumento 400X. E-F, secção de C. Barra: 25 μ m.

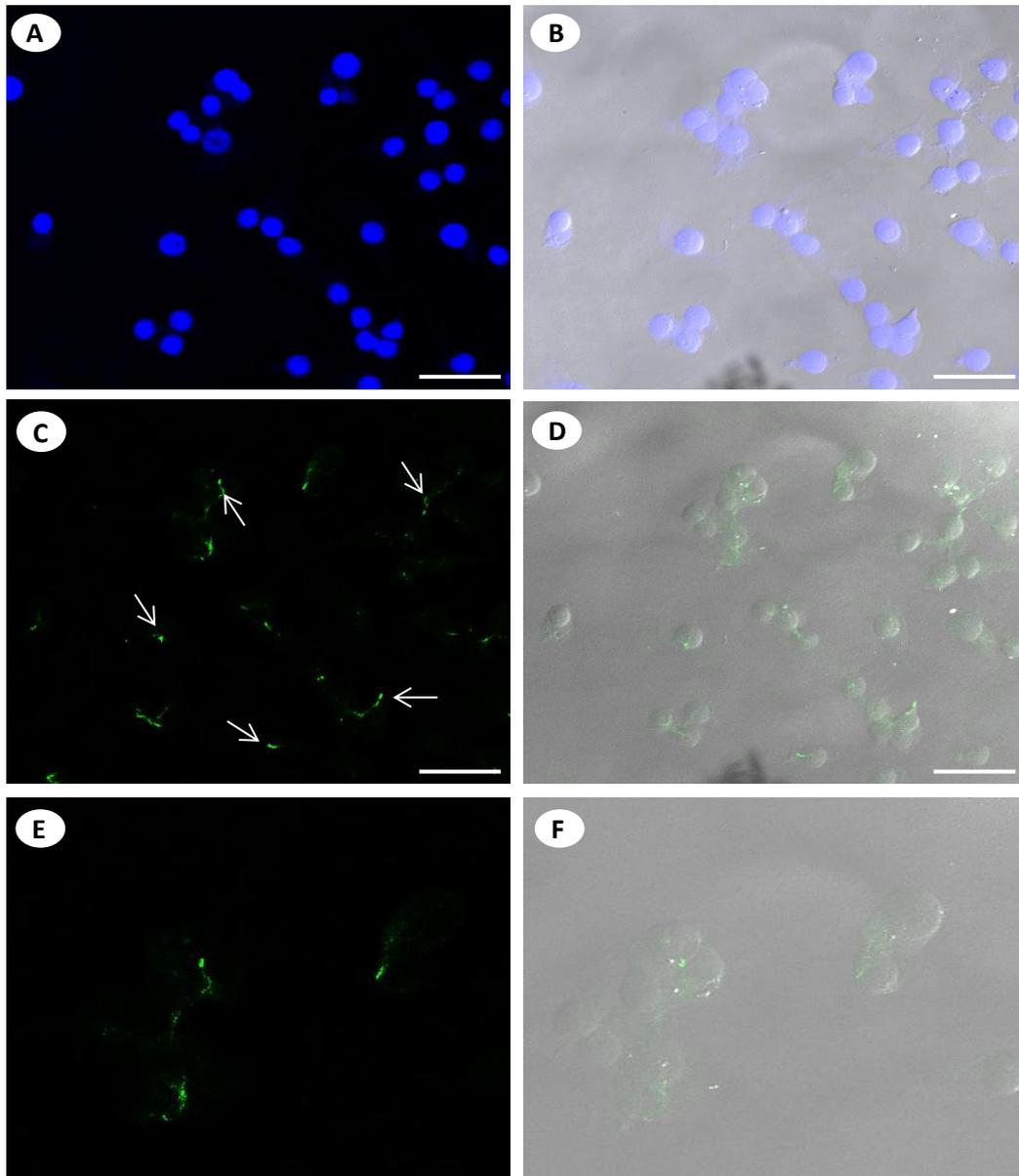


Figura 13. Identificação da isoforma de NTPDase 1 na superfície de macrófagos da linhagem RAW 264.7 por microscopia de imunofluorescência usando soro imune de camundongos infectados com *S. mansoni*. Macrófagos da linhagem RAW 264.7 aderidos a lamínulas de vidro foram fixados, permeabilizados e, em seguida, incubados com soro de camundongo infectado (1:50) e anticorpos secundários anti-IgG conjugados ao Alexa Fluor 488 (diluição 1:1.000). A análise foi feita através de um microscópio de varredura confocal a laser (Leica SP5), usando para excitação o laser de diodo (405 nm) para DAPI (azul; A, B) e laser de argônio (488 nm) para Alexa Fluor 488 (verde; C, D, E, F). As imagens obtidas em DIC (B, D, F) mostram o aspecto geral das células. A-D, aumento 400X. E-F, secção de C. Barra: 50µm.

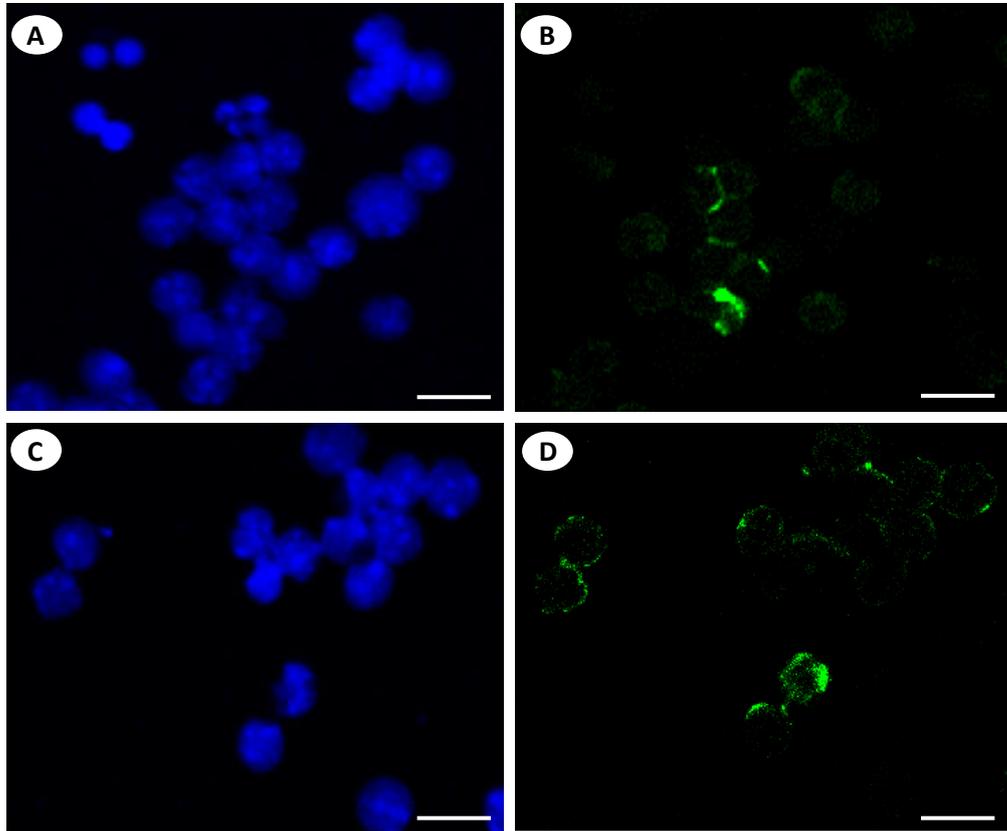


Figura 14. Identificação da isoforma NTPDase 1 (CD39) presente em esplenócitos por microscopia de imunofluorescência por meio do soro imune de camundongos infectados com *S. mansoni* contendo anti-SmATPDase 1 e anticorpos anti-CD39 comerciais. As células foram isoladas e aderidas a lamínulas, fixadas e permeabilizadas, em seguida, incubadas com anticorpos anti-CD39 comercial (1:100 – A,B) e soro imune de camundongo infectado (1:50 – C, D) e revelados com anticorpos anti-IgG conjugados ao Alexa Fluor 488 (1:1000). A análise foi feita por microscopia confocal de varredura usando para excitação o laser de diodo (405 nm) para DAPI (azul; A e C) e laser de argônio (488 nm) para Alexa Fluor 488 (verde; B e D). Barra: 10 μ m.

4.5 INIBIÇÃO DA ATIVIDADE FOSFOHIDROLÍTICA EM PREPARAÇÕES DE MACRÓFAGOS E ESPLÉNOCITOS

Para avaliar a capacidade de ligação dos anticorpos anti-CD39 e seu potencial de inibição da atividade ATP difosfolásica, alíquotas da preparação de macrófagos e esplenócitos foram incubadas com anticorpos anti-CD39 comercial ou soro imune de camundongo infectado com *S. mansoni* (diluição 1:50) por 3 h. Ao final desse tempo, foram adicionados às amostras tampão padrão de reação e substrato (ATP). Após incubação por 60 min a 37°C, a quantidade de fosfato inorgânico liberado foi medida por espectrofotômetro.

Na Figura 15A, é possível observar uma redução significativa de 40% da atividade fosfolásica de macrófagos incubados com anticorpos anti-CD39 e um decréscimo de 22% da atividade na preparação incubada com soro de animal infectado, comprovando que a presença dos anticorpos conectados a NTPDase 1 são capazes de interferir na atividade enzimática. A redução da atividade ATPásica nos esplenócitos foi ainda mais acentuada, com decréscimo de cerca de 83% e 58%, respectivamente (Figura 15B). Esses resultados sugerem que os anticorpos anti-SmATPDases que estão presentes no soro imune de camundongos infectados com *S. mansoni* são capazes de interagir com a NTPDase 1 das células imunes, bloqueando parcialmente a hidrólise de ATP.

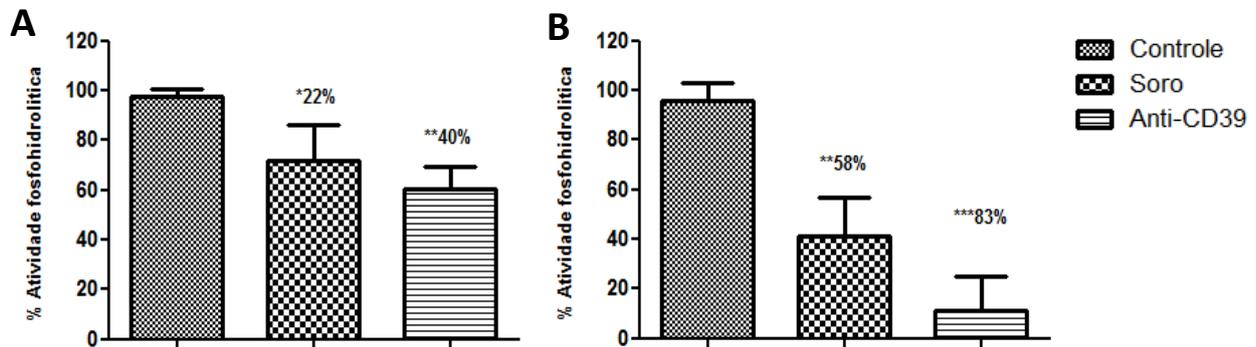


Figura 15. Inibição da atividade fosfohidrolítica em preparações de macrófagos e esplenócitos por ligação de anticorpos anti-CD39 e anti-SmATPDase1 presentes no soro imune de camundongos infectados com *S. mansoni*. Alíquotas da preparação proteicas de macrófagos da linhagem RAW 264.7 (A) e esplenócitos (B) foram incubadas por 3 h com os anticorpos (diluição 1:50). Após a incubação, as amostras foram acrescidas a tampão padrão de reação com ATP como substrato, incubados por 60 min a 37°C. A quantidade de fosfato inorgânico liberado foi medida por espectrofotômetro (630 nm). A atividade do controle foi de 24,62 nmol Pi/mg/min (macrófagos) e 13, 22 nmol Pi/mg/min (esplenócitos).

4.6 EFEITOS DE ANTICORPOS NA PROLIFERAÇÃO CELULAR DE MACRÓFAGOS

Após verificar que o soro imune de camundongos infectados com *S.mansoni* reconhecem isoformas de NTPDase de células imunes em ensaio de “Western blot” e imunocitoquímica e interferem na atividade desta enzima, foram avaliados os efeitos desses anticorpos sobre a proliferação de macrófagos e de esplenócitos.

Para o ensaio, macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram estimulados com LPS e, posteriormente, tratados com anticorpos anti-CD39 (diluição 1:50) e soro imune de camundongos com esquistossomose (diluição 1:50). A proliferação foi analisada após 24 h, 48 h e 72 h de incubação. A taxa de proliferação foi avaliada pelo método de MTT.

Os resultados mostraram que os grupos testes exibiram uma redução da proliferação dos macrófagos em todos os tempos empregados. Em 24 h, houve

decréscimo significativo de 29% da atividade proliferativa das células mantidas com anticorpos anti-CD39 e de 14% no grupo com soro imune de animais infectados (Figura 16A). Após 48h, esses valores sofreram poucas alterações, mantendo-se em 21% e 10%, respectivamente (Figura 16B). No período de 72 h, houve uma redução de 90% da proliferação dos macrófagos incubados com anti-CD39 enquanto que no grupo incubado com “pool” de soros imune de animais infectados o índice se manteve em 11% (Figura 16C).

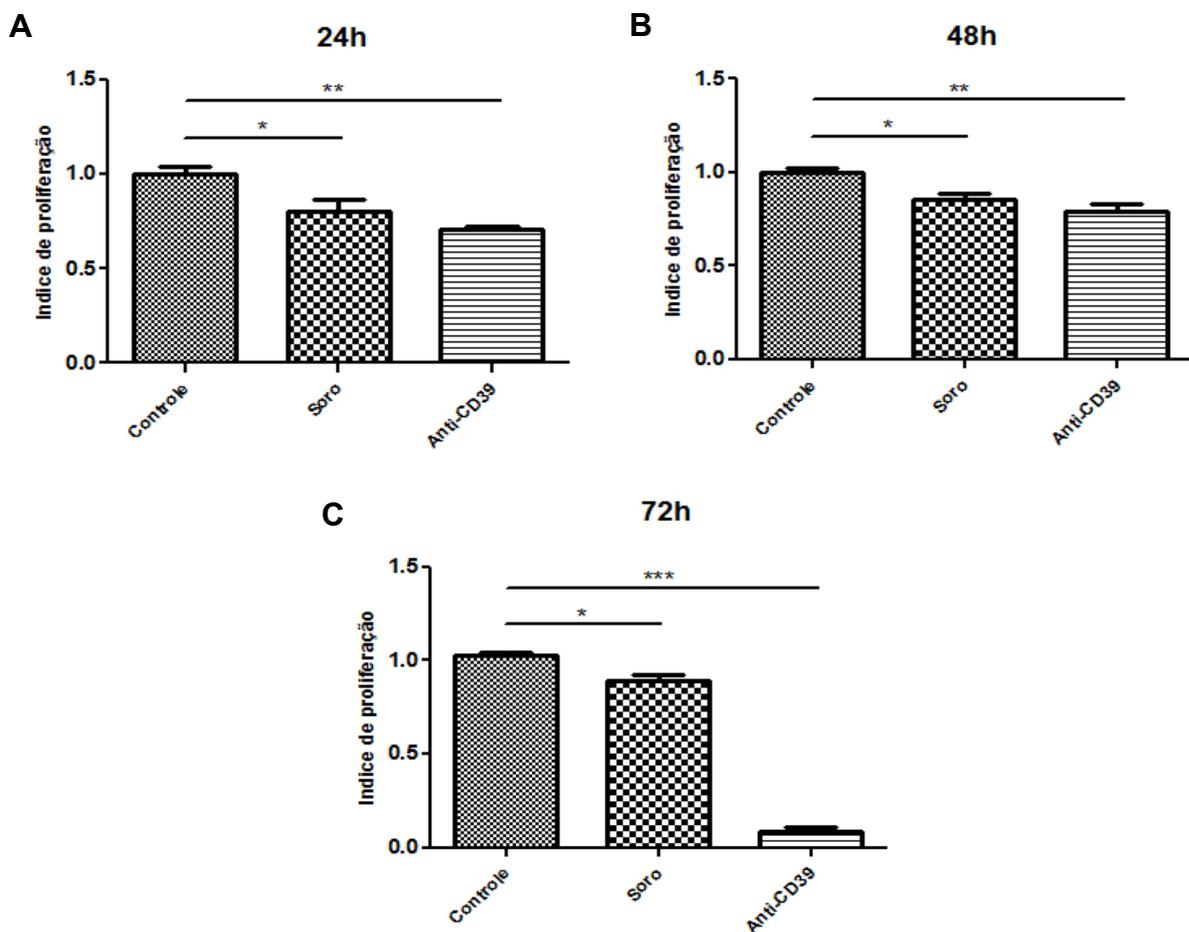


Figura 16. Efeitos dos anticorpos anti-CD39 e soro imune de animais infectados com *S. mansoni* sobre a proliferação de macrófagos da linhagem RAW 264.7. As células foram cultivadas em microplacas de 96 poços a 37°C por 24h (A), 48h (B) e 72h (C) na presença de anticorpos anti-CD39 (1:50) e soro imune de camundongos C57BL/6 infectados com *S. mansoni* (1:50). O ensaio de proliferação foi avaliado pelo método colorimétrico MTT. O índice de proliferação foi calculado pela razão da D.O. dos grupos testes versus D.O. do controle. A significância estatística foi determinada pelo teste de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.7 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CITOCINAS EM SOBRENADANTE DA CULTURA DE MACRÓFAGOS

Para ensaio do perfil de citocinas, macrófagos foram incubados com pool de soros de camundongos C57BL/6 infectados com *S.mansoni*, pool de soros de animais saudáveis e anticorpos anti-CD39, todos na diluição 1:50.

Por ensaio imunoenzimático (ELISA), TNF- α foi mensurado no sobrenadante após 72 h de incubação e não foi possível observar diferença significativa entre os grupos (Figura 17A). Análise semelhante foi realizada para quantificação de IL-12 e, no tempo de 48 h, foi observada uma redução do nível dessa citocina no sobrenadante das células incubadas com soro infectado e anticorpos anti-CD39, porém não significativa (Figura 17B). A dosagem de NO, realizada pelo método de Griess, foi estatisticamente relevante no sobrenadante de macrófagos incubados por 48 h com o soro infectado, apresentando uma redução de 25% quando comparado ao controle (Figura 17C).

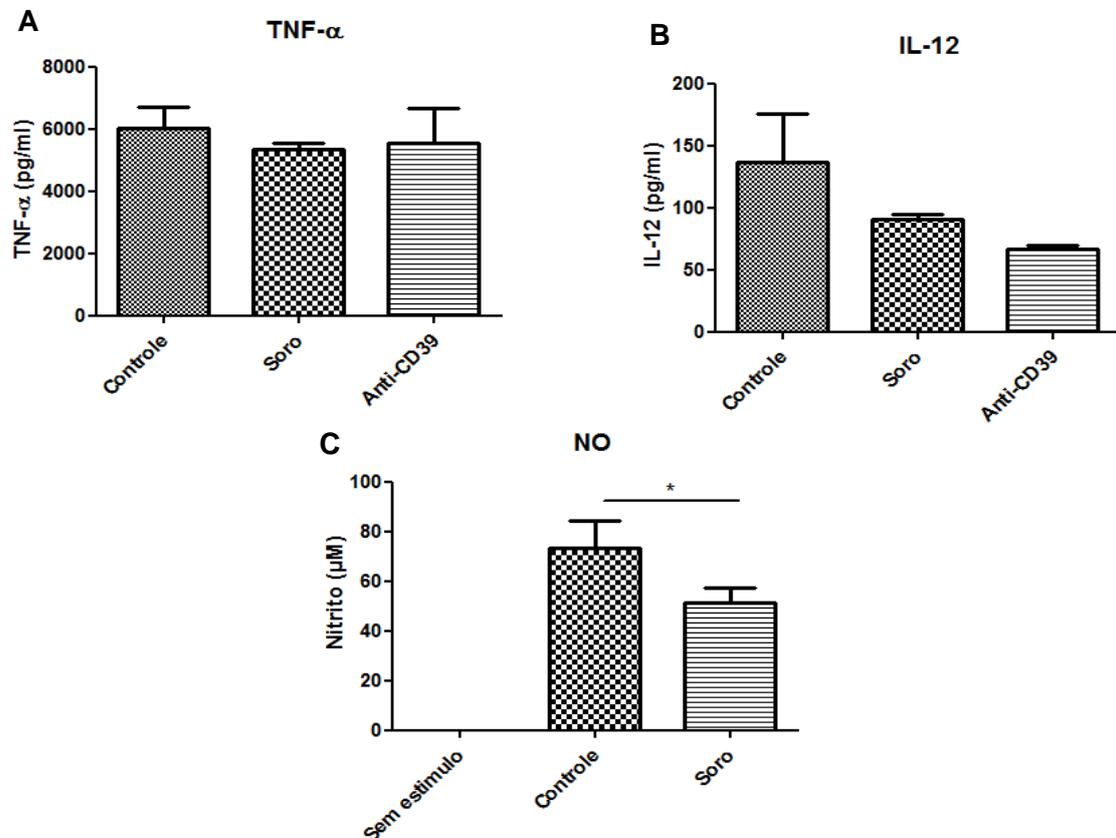


Figura 17. Avaliação do nível de TNF- α , IL-12 e NO produzidos pela cultura de macrófagos incubados com anticorpos anti-CD39 e pool de soros de animais infectados com *S. mansoni*. Células da linhagem RAW 264.7 foram incubadas com soro imune de camundongo C57BL/6 infectado com *S. mansoni*, soro imune de animal saudável (controle) e anticorpos anti-CD39 (diluição 1:50). Perfil de TNF- α (A) e IL-12 (B) foram mensurados por ensaio imunoenzimático (ELISA) após incubação de 72h e 48h, respectivamente. Dosagem indireta de NO foi realizada pelo método de Griess (C), após 48 h de incubação. A significância estatística foi determinada pelo teste de Tukey. *p<0,05.

4.8 EFEITOS DE ANTICORPOS ANTI-CD39 E SORO IMUNE DE ANIMAIS INFECTADOS COM *S. mansoni* NA PROLIFERAÇÃO CELULAR DE ESLENÓCITOS

O efeito de anticorpos sobre a proliferação de esplenócitos foi avaliado. Para a realização do ensaio, esplenócitos isolados de camundongos foram estimulados com ConA e cultivados em placas de microtitulação de 96 poços. Aos poços, foram

adicionados anticorpos anti-CD39 e “pool” de soro imune de camundongos infectados com *S.mansoni* na diluição 1:50. Após 48 h e 72 h, a proliferação foi avaliada pelo método de MTT.

Na diluição empregada, houve um acréscimo significativo de cerca de 45% e 70% da atividade proliferativa em esplenócitos incubados com anti-CD39 nos tempos de 48 h e 72 h, respectivamente (Figura 18A). Já nas células mantidas com soro imune de animal infectado, não foi observada nenhuma diferença significativa do índice de proliferação entre os grupos (Figura 18B).

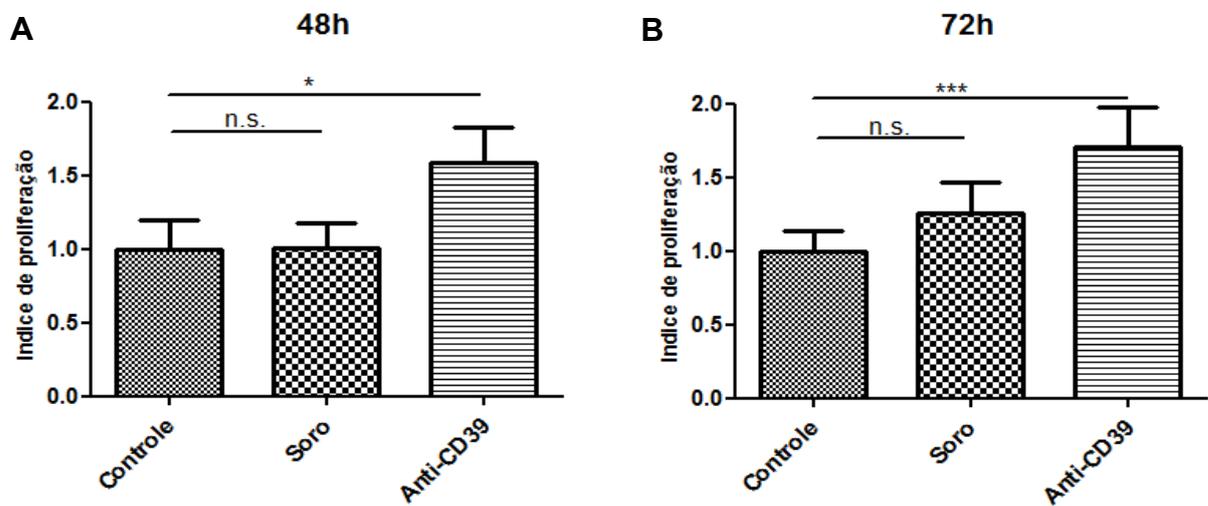


Figura 18. Efeitos dos anticorpos anti-CD39 e soro imune de animal infectado com *S. mansoni* sobre a proliferação de esplenócitos. As células foram extraídas de animais sadios e cultivadas em microplacas de 96 poços a 37°C por 48 h (A) e 72 h (B) em meio contendo anticorpos anti-CD39 e “pool” de soros de animais infectados na diluição 1:50. O ensaio de proliferação foi avaliado pelo método colorimétrico MTT. O índice de proliferação foi calculado pela razão da D.O. dos grupos testes versus D.O. do grupo controle. A significância estatística foi determinada pelo método de Tukey. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

4.9. ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para avaliar a proliferação de linfócitos T e linfócitos B por citometria de fluxo, esplenócitos foram incubados com “pool” de soros imune de camundongos infectados

com *S.mansoni*, “pool” de soros de animais saudáveis e anticorpos anti-CD39, todos utilizados na diluição 1:50. Após 48 h de incubação, as células de cada grupo foram marcadas com anticorpos anti-CD3 e anticorpos anti-CD19 acoplados aos fluorocromos APC-Cy7 e PE, respectivamente.

A análise dos resultados mostrou que houve um aumento significativo do número de linfócitos T nos grupos incubados com soros de animais infectados (36%) e anti-CD39 (>100%) quando comparados ao controle (Figura 19A). Por sua vez, houve um decréscimo de 44% na proliferação de linfócitos B tratados previamente com soro de animal infectado, efeito semelhante ao encontrado no grupo tratado com anti-CD39 comercial (34%) (Figura 19B). Os mesmos dados também foram representados em relação ao índice de proliferação (Figura 19C). Esses resultados sugerem que os anticorpos anti-SmATPDase 1 presente no soro de animais infectados, bem como os anticorpos anti-CD39, são capazes de interagir com a isoforma NTPDase 1 e regular a sinalização purinérgica, influenciando no funcionamento das células imunes durante a progressão da esquistossomose.

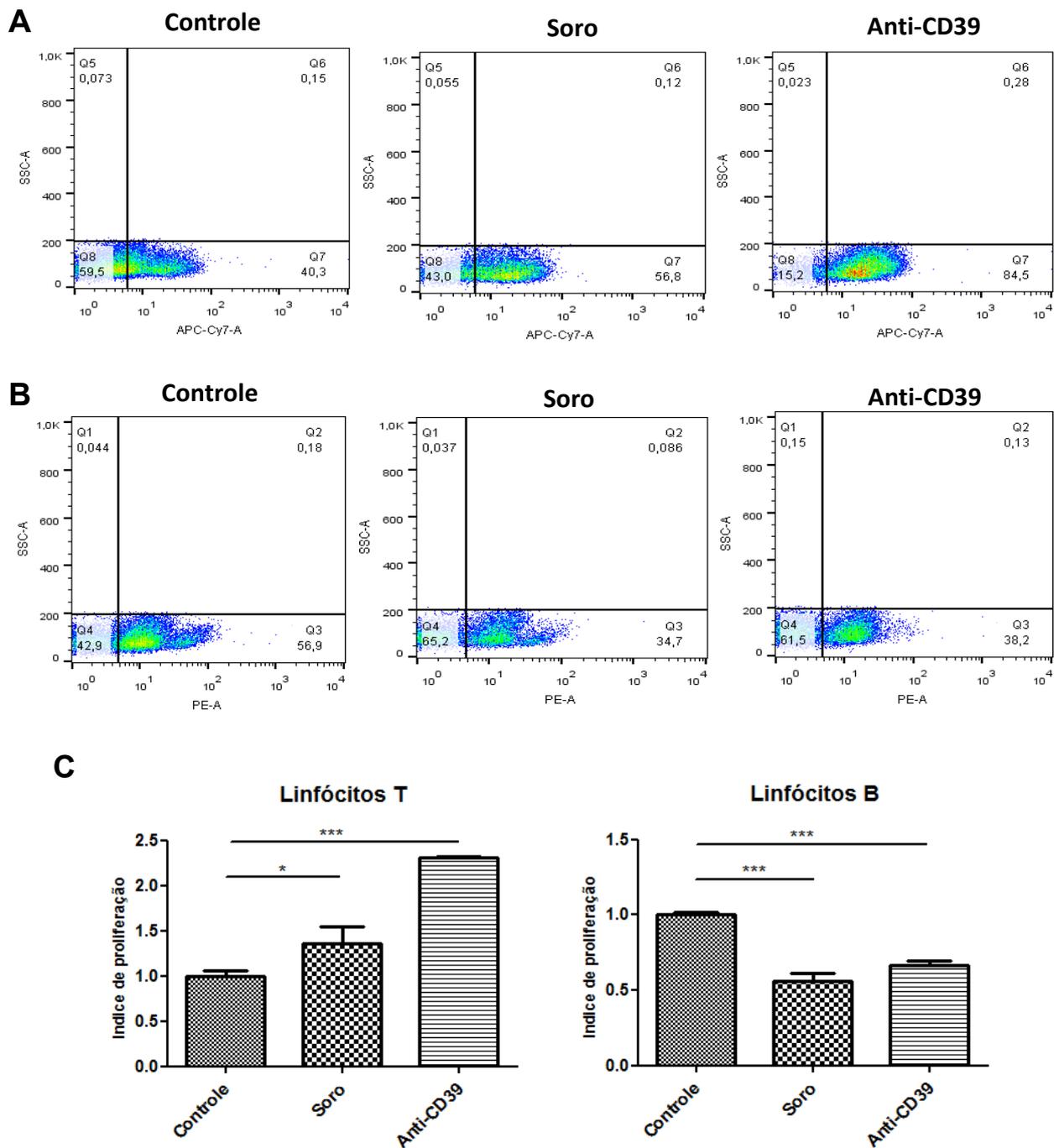


Figura 19. Avaliação da proliferação de linfócitos por citometria de fluxo. Esplenócitos foram incubados com “pool” de soros imune de camundongos infectados com *S.mansoni*, “pool” de soro imune de animais saudáveis e anticorpos anti-CD39, todos na diluição 1:50. Após 48h, as células de cada grupo foram marcadas com anticorpos anti-CD3 e anticorpos anti-CD19 acoplados aos fluorocromos APC-Cy7 e PE, respectivamente. As amostras foram coletadas e analisadas em citômetro de fluxo onde 30.000 eventos foram analisados. A zona de linfócitos foi selecionada baseada nos parâmetros FSC x SSC e delineamento das marcações baseadas na população negativa. A e B: diagrama representativo das triplicatas, mostrando perfil linfócitos T (APC-Cy7) e linfócitos B (PE). Os dados da citometria também form expressos pelo índice de proliferação (C). A significância estatística foi determinada pelo teste de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5. DISCUSSÃO

5.1. IMUNORREATIVIDADE CRUZADA ENTRE ANTICORPOS ANTI-SmATPDASES E A ISOFORMA NTPDase 1 DE CÉLULAS IMUNES

Em todas as fases do ciclo de vida do helminto *Shistosoma mansoni*, duas isoformas de ATPDases com massa molecular aproximada de 63 kDa foram identificadas: SmATPDase 1 e SmATPDase 2 (VASCONCELOS et al., 1993; 1996; DEMARCO et al., 2003; LEVANO-GARCIA et al., 2007). Trabalhos prévios de nosso laboratório demonstraram a existência de imunoreatividade cruzada entre os anticorpos produzidos contra as enzimas do parasito e os anticorpos produzidos contra a apirase de batata (VASCONCELOS et al., 1996; FARIA-PINTO et al., 2004; 2010). Os anticorpos produzidos contra a proteína vegetal foram capazes de imunolocalizar as isoformas de SmATPDases presentes na superfície de vermes adultos, na superfície externa dos miracídios, no envelope de von Lichtenberg e no lado externo da casca dos ovos, sendo secretada no granuloma (VASCONCELOS et al., 1996; FARIA-PINTO et al., 2004). A presença dessas enzimas em todas as fases do ciclo sugere sua importância significativa para a sobrevivência do helminto.

Com o aumento do número de sequências no banco de dados e a clonagem dos 2 genes que codificam a expressão das duas isoformas de SmATPDases foi possível verificar uma homologia maior entre a isoforma 2 (SmATPDase 2), que é uma proteína solúvel e secretada, e a apirase de batata utilizada nos ensaios de nossa equipe (FARIA-PINTO et al., 2008). A homologia observada entre regiões antigênicas está relacionada com a imunoreatividade cruzada observada em todos os trabalhos anteriores. Esta homologia entre a isoforma SmATPDase 2 e as isoformas solúveis de NTPDase, incluindo as isoforma 5 e 6 de mamíferos, foi detalhada por modelagem comparativa destas estruturas em um recente trabalho que revela a semelhança entre as sequências lineares e tridimensionais destas proteínas (DE SOUZA et al., 2014).

A análise das sequências lineares das NTPDases oriundas de parasitos permitiu a identificação de outras regiões conservadas diferentes das ACRs, utilizadas para a descrição da família (FARIA-PINTO et al., 2008). Um polipeptídeo

recombinante (rpotDomB) proveniente de uma dessas regiões foi obtido e provou ser antigênico (MAIA et al., 2011), assim como os peptídeos sintéticos derivados da sequência linear da isoforma SmATPDase 2 (MENDES et al., 2011).

A homologia entre diferentes enzimas da família das NTPDases estimula investigações das interações dos anticorpos direcionados contra as isoformas de NTPDases dos parasitos e sua conexão com as isoformas desta família de proteínas em seus hospedeiros. As isoformas de SmATPDases são antigênicas ao longo da evolução da esquistossomose e a isoforma 1 (SmATPDase 1) exhibe uma homologia significativa com a isoforma de NTPDase 1 presente em células de mamíferos. Em especial, esta proteína, também denominada CD39, tem um envolvimento grande com as funções desempenhadas pelas células do sistema imune (DWYER et al., 2007). A proposta central deste trabalho se concentra em mostrar os efeitos da presença de anticorpos anti-SmATPDases e de anticorpos anti-CD39 na proliferação e secreção de citocinas de macrófagos e esplenócitos murinos. Esta hipótese ganha mais força a partir do momento em que outros membros de nossa equipe comprovaram que a homologia na sequência primária da SmATPDase 1 e a NTPDase 1 também se refletem na estrutura tridimensional destas enzimas (NUNES et al., 2015), revelando que uma reatividade cruzada entre os anticorpos direcionados a estas proteínas pode estar ocorrendo *in vivo* ao longo da progressão da doença.

Nossa primeira etapa de trabalho foi verificar se anticorpos anti-NTPDases de outras origens são capazes de reconhecer a isoforma NTPDase 1 presente no homogeneizado de macrófagos e esplenócitos. Nas condições experimentais usadas, os “Western blots” com homogeneizado total dessas células mostrou duas bandas, de 58 kDa e 53 kDa, reconhecidas pelos anticorpos do soro imune de animais infectados com *S. mansoni*. A identificação da enzima foi confirmada realizando o ensaio com anticorpos anti-CD39 comercial, que revelou bandas de mesma massa nas preparações de células. A NTPDase 1 contém aproximadamente 510 resíduos de aminoácidos e peso molecular estimado de monômeros glicosilados na ordem de 70 a 80 kDa. A diferença entre a massa molecular encontrada e a massa predita pode ter ocorrido devido a um processo de deglicosilação. Segundo Zimmermann, Zebisch e Sträter (2012), nesses casos, até 30% da massa molecular da proteína pode ser reduzida, sem perda da atividade catalítica.

Outro método utilizado para confirmar a identidade da enzima foi a purificação parcial da proteína através do gel não desnaturante. Esse tipo de gel, também

denominado nativo ou de atividade, mantém a conformação nativa da enzima, associando sua atividade bioquímica à visualização de manchas brancas (precipitados) de fosfato de cálcio localizadas nas regiões onde a proteína foi imobilizada no gel de eletroforese. Assim, após a corrida eletroforética, o gel contendo o homogeneizado de células foi incubado com substrato da NTPDase, ATP, e sob condições capazes de manter a atividade fosfohidrolítica. As bandas contendo o precipitado foram submetidas a uma nova eletroforese, seguida de preparo destas para análise por “Western blots”. Este ensaio resultou na visualização de bandas com aproximadamente 53 e 58 kDa reveladas com soros de animais infectados por *S. mansoni*, os quais contêm anticorpos contra a isoforma SmATPDase1. Como mostrado anteriormente, essas bandas possuem massas moleculares semelhantes às identificadas no ensaio realizado com as proteínas totais de macrófagos e esplenócitos, confirmando a identidade da enzima e corroborando a hipótese de que anticorpos direcionados contra as isoformas de ATP difosfohidrolases do *S. mansoni* podem reconhecer a isoforma de NTPDase 1 presente na superfície das membranas celulares de células imunes.

Interessante notar que no primeiro experimento o soro controle também reagiu com as bandas descritas, enquanto que, na purificação parcial, esse mesmo soro não foi capaz de reconhecê-las. A identificação de bandas no homogeneizado total de células pelo soro de animais saudáveis sugere a presença de anticorpos naturais nestes soros. Anticorpos naturais são produzidos sem a necessidade de estimulação antigênica e demonstram autorreatividade não patogênica em indivíduos saudáveis, sendo mantidos constantes ao longo da vida. Além disso, agem como moduladores celulares, mostrando especificidade a antígenos conservados (LUTZ e MIESCHER, 2008). Desta forma, apenas após a purificação parcial os ensaios de “Western blots” poderão ser conduzidos, reduzindo a interferência destes anticorpos naturais.

A quantificação de anticorpos anti-IgG total no soro de animais infectados com *S. mansoni* reativos a preparações de macrófagos e esplenócitos sugeriu a existência de epitopos antigênicos de proteínas das células imunes homólogos a proteínas do parasito, uma vez que a doença promoveu um aumento significativo dos níveis de IgG nas diluições 1:50 e 1:100. Como já apontado, exemplo dessas proteínas são as SmATPDases, já que foi comprovada a antigenicidade dessas enzimas. Em seu trabalho, Levano-Garcia (2008) verificou que a inoculação de SmATPDase 1 e 2 em camundongos induz um aumento dos níveis de diferentes classes de IgG. A

reatividade de anticorpos anti-CD39, mais específico, também foi significativa nas concentrações de 1:50 e 1:100 (dados não mostrados).

A reatividade de anticorpos presentes no soro de animais com esquistossomose com a isoforma NTPDase 1 de células imunes pode ser visualizada por imunocitoquímica na superfície de células do sistema imune, reafirmando a interação entre os anticorpos anti-SmATPDases produzidos ao longo da infecção e a proteína do hospedeiro.

5.2. EFEITOS DE ANTICORPOS ANTI-NTPDases

O controle da atividade de isoformas de NTPDases tem sido apontado como forma de tratamento de diversas doenças (VASCONCELOS et al., 2009). Anticorpos anti-peptídeos (LbB1LJ e LbB2LJ) derivados da NTPDase 1 de *Leishmania braziliensis*, por exemplo, foram capazes de reduzir as atividades ATPásicas e ADPásicas dessa enzima, promovendo também um efeito leishmanicida (PORCINO et al., 2012).

Neste trabalho, preparações de macrófagos e esplenócitos tiveram sua atividade fosfolitolítica reduzida por soro de camundongo infectado com *S. mansoni* em 22% e 58%, respectivamente, efeito semelhante ao observado no grupo incubado com anti-CD39. A partir dessa inibição, pode-se sugerir o envolvimento de anticorpos anti-SmATPDases com a resposta imune desenvolvida durante a esquistossomose.

Macrófagos da linhagem RAW 264.7 são derivados de tumores induzidos pelo vírus murino Abelson, causador de leucemia em camundongos BALB/c. Essas células são muito utilizadas em pesquisas de avaliação de citotoxicidade de compostos e modelos de ativação de macrófagos. Por motivos éticos, o uso dessa linhagem é vantajoso, além de possuir muitas das propriedades dos macrófagos peritoneais e consistir na linhagem que melhor mimetiza macrófagos oriundos da medula óssea (BERGHAUS et al., 2010). Em nosso trabalho, esta mesma linhagem de células foi utilizada em ensaios de proliferação celular. Observando-se os resultados, pode-se sugerir que anticorpos produzidos contra isoformas das NTPDases de *S. mansoni* presentes no soro dos animais infectados são capazes de inibir parcialmente a ação da enzima NTPDase 1, resultando em uma diminuição da proliferação.

Nucleotídeos como ATP, UTP e ADP e seus nucleosídeos derivados são liberados de maneira controlada pela maioria das células, fornecendo o mediador primário para a ativação da resposta purinérgica (DWEYER et al., 2007). Estudos revelaram que macrófagos da linhagem RAW 264.7 quando estimulados com agonistas de receptores Toll-like (TLR), como o LPS, secretam ATP para o meio extracelular por meio dos canais de panexinas (COHEN et al., 2013). A isoforma NTPDase 1 é a principal isoforma de NTPDase expressa por macrófagos e monócitos, sendo a principal enzima responsável pelo controle dos níveis de nucleotídeos na região pericelular (ANTONIOLI et al., 2007; DWEYER et al., 2007). Assim, a inibição da atividade dessa enzima por anticorpos levaria a um aumento da concentração de ATP. A partir do conjunto de observações levantadas pela literatura, notamos efeitos opostos da ação desse nucleotídeo na estimulação do receptor do tipo P2X₇: ativação de vias de liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias. ATP pode, então, ser interpretado como um DAMP e desencadear uma resposta inflamatória. Porém, a manutenção dos níveis de ATP pelo bloqueio enzimático da NTPDase, também pode induzir a apoptose dependente de caspase (JACOB et al., 2013). Esse último efeito parece ter se sobressaído no ensaio realizado, uma vez que a proliferação de macrófagos foi reduzida nos grupos incubados com os anticorpos.

Recentemente, amostras de meio de cultura de linhagens de células de glioma foram utilizadas para avaliar o papel deste na diferenciação dos macrófagos e a participação de ATP e adenosina na liberação de citocinas por estas células presentes no ambiente tumoral. Os autores mostraram que quando o meio de células tumorais é utilizado para incubação de macrófagos, há uma redução de 27% da hidrólise de ATP por essas células, acompanhada de uma redução da atividade das NTPDases. Os macrófagos mantidos neste meio apresentaram um aumento na produção de citocinas anti-inflamatórias como MCP-1 e IL-10, sendo essa secreção estimulada por ATP via P2X₇ (BERGAMINI et al., 2015). Assim, a ativação de macrófagos de fenótipo M2 consiste em um mecanismo de modulação e proliferação de células tumorais.

Fazendo um paralelo com os resultados encontrados, a inibição das NTPDases de células imunes por anticorpos do soro imune de animal com esquistossomose pode levar a excitação de macrófagos com um perfil M2. Macrófagos M2 tem um papel direto sobre o processo de fibrose, manutenção do granuloma, reparo tecidual e sobrevivência do hospedeiro (HESSE et al., 2000). Essa hipótese é confirmada parcialmente pela análise do padrão de citocinas que mostrou uma redução de NO e

IL-12, portanto um perfil menos inflamatório. A avaliação da expressão de marcadores de macrófagos M2 deve ser realizada para confirmar esses resultados.

A estimulação de receptores P2X₇ pode, ainda, desempenhar um papel importante na geração de células gigantes multinucleadas (MGC). Presente em inflamações crônicas, o mecanismo de fusão nuclear de macrófagos ainda não foi completamente elucidado, porém estudos de Lemari e colaboradores (2006) mostraram evidências da estimulação da via do receptor P2X₇ em macrófagos alveolares de ratos mediando o aumento da formação de MGC durante reações inflamatórias crônicas. Na esquistossomose, MGCs podem ser vistas nos granulomas hepáticos de camundongos entre 45 e 55 dias de infecção (LENZI et al., 1998) e trabalhos do nosso laboratório sugerem que a imunização com apirase de batata, da família da NTPDases, aumentam o estímulo para a ocorrência deste evento (SOUZA, 2012). Esses efeitos podem estar relacionados aos dados obtidos neste trabalho, em que anticorpos direcionados contra as SmATPDases, nas diluições testadas, inibem as isoformas de NTPDases de macrófagos, promovendo aumento de ATP extracelular e maior ativação de P2X₇.

No ensaio de proliferação de esplenócitos observou-se um crescimento significativo da atividade proliferativa em 45% e 70% em células incubadas com anti-CD39 nos tempos de 48 h e 72 h, respectivamente. Porém, o grupo tratado com soro imune de animal infectado não apresentou diferença expressiva do índice de proliferação. Esses resultados podem ser reflexos da técnica empregada, uma vez que o método colorimétrico descrito por Mosmann (1983), embora simples, é considerado genérico e pode não ter sido capaz de identificar diferenças mais sutis entre os grupos. O grupo incubado com anti-CD39 exibiu um resultado positivo por conter anticorpos específicos em maior quantidade.

A indução rápida da expressão de NTPDase 1 após a ativação de células T *naïve* sugere que esta enzima desempenha um importante papel na cascata de transdução de sinal mediada por TCR (JUNGER, 2011). Portanto, alterações que interfiram em sua função podem comprometer de forma significativa a resposta efetora. Quando se avaliou a proliferação de linfócitos, os grupos incubados com soro imune de animal infectado com *S. mansoni* e anti-CD39 apresentaram um acréscimo da atividade proliferativa de linfócitos T em 36% e maior que 100%, respectivamente, quando comparados ao controle. Por sua vez, observou-se uma redução de 44% na proliferação de linfócitos B tratados previamente com soro de animal infectado, efeito

também encontrado no grupo tratado com anti-CD39 comercial (34%). Esses resultados podem ser explicados pela inibição da atividade supressora das células T regulatórias. Jenabian e colaboradores (2013) mostraram que linfócitos Treg CD39⁺ são capazes de suprimir a expressão de IL-2 de células T CD4⁺ ativadas de forma mais eficiente do que Treg CD39⁻. Interessante notar que essa inibição ocorre devido à desmetilação de um sítio essencial do promotor do gene IL-2, efeito que foi revertido pela utilização de anticorpos anti-CD39 (JENABIAN et al., 2013). Além disso, o decréscimo na proliferação de linfócitos B também pode ter contribuído para o aumento de células T efectoras, pois sob condições normais, células B produzem AMP e adenosina (resultado da hidrólise por CD39 e CD73) que inibem a ativação de células T (SAZE et al., 2013).

O efeito de nucleotídeos sobre população de linfócitos isolados foi também avaliado em trabalho de Duhant e colaboradores (2001), em que os autores observaram a inibição da ativação das células TCD4⁺ por nucleotídeos de adenina, induzida por um receptor P2Y não identificado. Resultado semelhante foi encontrado por Langston e colaboradores (2002) que notaram efeito inibidor de nucleotídeos de adenina sobre secreção de citocinas e proliferação celular. Adicionalmente, estes últimos comprovaram que a hidrólise do ATP é necessária para a produção de citocinas como INF- γ e IL-2, mas não de IL-4. Assim, a inibição da NTPDase 1 por anticorpos anti-SmATPDase 1 pode interferir na proliferação, inibir o desenvolvimento de um perfil de resposta Th1, favorecendo uma resposta Th2. O efeito do ATP também foi observado por La Sala e colaboradores (2001) em células dendríticas. Os autores confirmaram que o ATP é capaz de estimular a maturação dessas células e reduzir a produção de IL-12, levando à perda da capacidade de iniciar responder do tipo Th1. Além disso, o ATP em sinergia com LPS e CD40L parece estimular a produção de IL-10 por meio da ativação de P2Y₁₁, direcionando a resposta imune para um perfil mais Th2 ou tolerogênico (WILKIN et al., 2002). Os esplenócitos são constituídos de diversos tipos celulares (linfócitos, macrófagos, células dendríticas) e as diferenças encontradas neste trabalho com os dados da literatura apresentados acima podem refletir a ação da inibição de NTPDase 1 em todas as populações de células. Por isso, é necessário analisar o efeito de anticorpos anti-NTPDases em grupos celulares separadamente, para evitar a sobreposição de efeitos.

Em vista dos resultados encontrados, nós sugerimos o papel da inibição da NTPDase 1 por anticorpos produzidos contra as isoformas da enzima do *S. mansoni*

como mecanismo de modulação da resposta imune na esquistossomose. Anticorpos direcionados contra as SmATPDases podem inibir a atividade da NTPDase 1 presente nas células imunes e levar a uma redução da proliferação e/ou ativação de células com perfil regulatório. Porém, mais ensaios devem ser realizados futuramente para suportar esta hipótese.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

1) Anticorpos anti-SmATPDases presentes em soro de animais infectados com *S. mansoni* reagiram cruzadamente com a NTPDase 1 de preparações de macrófagos e de esplenócitos, mostrando bandas proteicas de 53 kDa e 58 kD, que, possivelmente, correspondem a isoformas de NTPDase presentes nas células imune.

2) Isoformas da NTPDase foram identificadas na superfície de macrófagos e esplenócitos incubados com soro de animal infectado com *S. mansoni* e anticorpos anti-CD39, evidenciada por marcações puntiformes verdes distribuídas pela membrana plasmática em imagens captadas por microscopia de imunofluorescência.

3) Os anticorpos anti-SmATPDase presentes no soro de animal infectado foram capazes de reduzir a atividade fosfolítica da enzima NTPDase 1 presente em preparações de macrófagos e esplenócitos, bem como de promover a redução da proliferação destas células.

4) No ensaio de proliferação de linfócitos por citometria de fluxo houve um aumento significativo do número de linfócitos T nos grupos incubados com soro imune (36%) e anti-CD39 (>100%). Por sua vez, houve um decréscimo de 44% na proliferação de linfócitos B tratados previamente com soro de animal infectado e de 34% no grupo tratado com anti-CD39.

Com esses resultados sugerimos que a inibição da isoforma NTPDase 1 por anticorpos produzidos contra as isoformas da enzima SmATPDase 1 do *S. mansoni*, imunorreatividade cruzada, podem estar envolvidos diretamente na modulação da resposta imune que ocorre na esquistossomose, tendenciando a uma resposta imune global de perfil Th2. Porém, outros testes são necessários para corroborar essa hipótese.

A inibição da atividade enzimática de NTPDases pode contribuir para o desenvolvimento de diferentes doenças e o estudo dos mecanismos que geram essas disfunções é importante para o estabelecimento de medidas que pode prevenir a

progressão dessas enfermidades. Assim, este trabalho abre caminho e perspectivas para estudos de outras doenças desencadeadas por alterações na sinalização purinérgica.

Como perspectivas futuras, temos:

- 1) Repetir a análise do perfil de citocinas em sobrenadante de cultura de macrófagos para obter um resultado mais conclusivo;
- 2) Realizar a dosagem de citocinas no sobrenadante de cultura de esplenócitos;
- 3) Avaliar a expressão de marcadores de macrófagos M1 e M2 e analisar da população de células T regulatórias;
- 4) Utilizar anticorpos monoclonais anti-peptídeos derivados da sequência da SmATPDase 1 em ensaios de identificação e localização da NTPDase 1 e na análise de proliferação de células imunes;
- 5) Verificar a sinalização purinérgica após a inibição pelos anticorpos.

7. REFERÊNCIAS

ABATH, F.G.; MORAIS, C.N.; MONTENEGRO, C.E.; WYNN, T.A.; MONTENEGRO, S.M.L. 2006. Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? **Parasitology**, **22 (2)**: 85-91.

ABDUL-GHANI, R.; LOUTFY, N.; EL SAHN, A.; HASSAN, A. 2009. Current chemotherapy arsenal for schistosomiasis mansoni: alternatives and challenges. **Parasitology Resources** **104**: 955–965.

ABBRACCHIO, M.P.; BOEYNAEMS, J.; BARNARD, E.; BOYER, J.; KENNEDY, J.; MIRAS-PORTUGAL, MT, KING, B.F.; GACHET,C.; JACOBSON, K.A.; WEISMAN, G.A.; BURNSTOCK, G. Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y14 receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. 2003. **Trends in Pharmacological Sciences**, **24(2)**: 52-5.

AGBOH, K.C.; WEBB, T.E.; EVANS, R.J.; ENNION, S.J. 2004. Functional characterization of a P2X receptor from *Schistosoma mansoni*. **Journal of Biological Chemistry**, **279**:41650–41657.

ANTONIOLI, L.; BLANDIZZI, C.; PACHER, P.; HASKO, G. 2013. Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. **Nature Reviews Cancer**, **13**: 842–857.

ASAI, T., S. MIURA, et al. 1995. Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. **Journal of Biological Chemistry**, **270(19)**:11391-7.

ATKINSON, B.; DWYER, K.; ENJYOJI, K.; ROBSON, C.S. 2006.Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic targets. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, **36**: 217–222.

BARRON, L & WYNN, T.A. Macrophage activation governs schistosomiasis-induced inflammation and fibrosis. **European Journal of Immunology**, **.41(9)**: 2509–2514.

BARSOUM, R. S.; ESMAT, G.; EL-BAZ, T. 2013. Human Schistosomiasis: Clinical Perspective: Review. **Journal of Advanced Research** **4**: 433–444.

BAYKOV, A.A; EVTUSHENKO, O.A. ; AVAEVA, S.M. 1988. A Malachite Green Procedure for Orthophosphate Determination and Its Use in Alkaline Phosphatase-Based Enzyme Immunoassay. **Analytical Biochemistry**, **171** : 266-270.

BERGAMIN, L.S.; BRAGANHOL,E; FIGUEIRO, F.; CASALI, E.A.; ZANIN, R.F.; SEVIGNY, J. ;BATTASTINI, A.M.O. 2015. Involvement of Purinergic System in the Release of Cytokines by Macrophages Exposed to Glioma-Conditioned Medium. **Journal of Cellular Biochemistry**, **116**:721–729.

BERGHAUS, LJ; MOORE JN; HURLEY DJ; VANDENPLAS, ML; FORTES, BP; WOLFERT, MA; BOONS, GJ. 2010. Innate immune responses of primary murine macrophage-lineage cells and RAW 264.7 cells to ligands of Toll-like receptors 2, 3, and 4. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, **33(5)**: 443-54.

BHARDWAJ, R. & SKELLY, P. 2009. Purinergic signaling and immune modulation at the schistosome surface?. **Trends in Parasitology**, **25(6)**: 256-260.

BOURS, M. J., SWENNEN, E. L., DI VIRGILIO, F., CRONSTEIN, B. N. & DAGNELIE, P. C. 2006. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacological Therapy**. **112**: 358–404.

BURNSTOCK, G. 1972. Purinergic nerves. **Pharmacological Reviews** **24**: 509–81.

BURNSTOCK, G. 2007. Purine and pyrimidine receptors. **Cellular and Molecular Life Sciences**, **64**:1471-1483

BURNSTOCK, G. 2012. Purinergic signalling: Its unpopular beginning, its acceptance and its exciting future. **Bioessays** **34**: 218–225.

BURNSTOCK, G; DI VIRGILIO, F. 2013. Purinergic signalling and cancer. **Purinergic Signalling**, **9(4)**: 491-540.

BURNSTOCK, G.; BOEYNAEMS, J. 2014. Purinergic signalling and immune cells. **Purinergic Signalling**, **10**:529–564.

BURKE, M.L.; JONES, M.K.; GOBERT, G.N.; LI, Y.S.; ELLIS, M. K.; McMANUS, D.P. 2009. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. **Parasite Immunology**, **31(4)**:163-176.

CALDAS, I.R.; CAMPI-AZEVE D.O.A, A.C.; OLIVEIRA, L.F.A.; SILVEIRA, A.M.S.; OLIVEIRA, R.C.; GAZZINELLIA,G. 2008. Human schistosomiasis mansoni: Immune responses during acute and chronic phases of the infection. **Acta Tropica**, **108**: 109-117.

CHITSULO, L.; ENGELS, D.; MONTRESOR, A.; SAVIOLI, L. 2000.The global status of schistosomiasis and its control. **Acta Tropica**, **77**: 41–51.

COHEN,H.B.; BRIGGS, K.T.; MARINO, J.P.; RAVID,K.; ROBSON, S.C.; MOSSER, D.M. 2013. TLR stimulation initiates a CD39-based autoregulatory mechanism that limits macrophage inflammatory responses. **Blood**,**122(11)**:1935-1945.

COIMBRA, E.S.; GONÇALVES DA COSTA, S.C.; CORTE-REAL, S.; FREITAS, F.G.R.; DURÃO, A.; SOUZA, C.S.F.; SILVA SANTOS, M.I.; VASCONCELOS, E.G. 2002. Characterization and cytochemical localization of an ATP diphosphohydrolase from *Leishmania amazonensis* promastigote. **Parasitology**, **124**: 137-143.

CORRÊA-OLIVEIRA, R.; CALDAS, I.R.; GAZZINELLI, G. 2000. Natural versus Drug-induced Resistance in *S. mansoni* Infection. **ParasitologyToday**, **16**: 397-399.

CZAJKOWSKI, R. & BARAÑSKA, J. 2002. Cross-talk between the ATP and ADP nucleotide receptor signalling pathways in glioma C6 cells. **Acta Biochimica Polonica**, **49(4)**: 877-889.

DE MARCO, R.; KOWALTOWSKI, A.T.; MORTARA, R.A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. 2003. Molecular characterization and immuno-localization of *S. mansoni* ATP-diphosphohydrolase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **307**: 831-838.

DE SOUZA, V. C.; NUNES, V. S.; VASCONCELOS, E. G.; FARIA-PINTO, P., CAPRILES, P. V. 2014. Structural Comparative Analysis of Secreted NTPDase Models of *Schistosoma mansoni* and *Homo sapiens*. **Advances in Bioinformatics and Computational Biology**, **8826**: 91-98.

DI VIRGILIO F. ; BOEYNAEMS J. M. ; ROBSON, S. C. 2009. Extracellular nucleotides as negative modulators of immunity. **Current Opinion Pharmacology**, **9**: 507-13.

DI VIRGILIO F. 2012. Purines, Purinergic Receptors, and Cancer. **Cancer Research**; **72(21)**: 5441–7.

DRURY, A. N. & SZENT-GYORGYI, A. 1929. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. **The Journal of Physiology** **68**: 213–37.

DUHANT, X.; SCHANDENE, L.; BRUYNS, C.; GONZALEZ, N.S.; GOLDMAN, M.; BOEYNAEMS, J.; COMMUNI, D. 2002. Extracellular Adenine Nucleotides Inhibit the Activation of Human CD4₊ T Lymphocytes. **The Journal of Immunology**, **169**: 15–21.

DUBOIS-COLAS, N.; PETIT-JENTREAU, L.; BARREIRO, L.B DURAND, S.; SOUBIGOU, G; LECOINTE, C; KLIBI, J; REZAI, K; LOKIEC, F; COPPEE, J; GICQUEL, B; TAILLEUX, L. 2014. Extracellular Adenosine Triphosphate Affects the Response of Human Macrophages Infected With Mycobacterium tuberculosis. **The Journal of Infectious Diseases**, **210**: 824–33.

DUTRA, W.O.; CORREA-OLIVEIRA, R.; DUNNE, D.; CECCHINI, L.F.; FRAGA, L.; ROBERT, M.; SOARES-SILVEIRA, A. M.; WEBSTER, M.; YSSEL, H.; GOLLOB, K.J. 2002. Polarized Th2 like cells, in the absence of Th0 cells, are responsible for lymphocyte produced IL-4 in high IgE-producer schistosomiasis patients. **BMC Immunology**, **3**:1-8.

DWYER, K. M.; DEAGLIO, S.; GAO, W.; FRIEDMAN, D.; STROM, T.B.; ROBSON, S.C. 2007. CD39 and control of cellular immune responses. **Purinergic Signalling**, **3**: 171–180.

EL-BESHBISHI, S. N.; TAMAN, A.; EL-MALKY, M. A.; AZAB, M. S.; EL-HAWARY, A. K.; EL-TANTAWY, D. A. 2013. In vivo effect of single oral dose of artemether against early juvenile stages of *Schistosoma mansoni* Egyptian strain. **Experimental Parasitology** **135**: 240–245.

EL-AHWANY, E.; BAUIOMY, I. R.; NAGY, F.; ZALAT, R.; MAHMOUD, O.; ZADA, S et al. 2012. Regulatory Cell Responses to Immunization with a Soluble Egg Antigen in *Schistosoma mansoni*-Infected Mice. **Korean Journal Parasitology**, **50**: 29-35.

ESMAT, G; RAZIKY M. 2009. Antischistosomal therapy: Current status and recent developments. **Arab Journal of Gastroenterology**, **10**:1-3.

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

FARIA-PINTO, P.; MONTESANO, M.A.; JACINTO, A.A.; SANTOS, R.S.; BORDIN, F.H.S; FERREIRA, A.P.; PENIDO, M.L.O.; COELHO, P.M.Z.; VASCONCELOS, E.G. 2010. Antibody reactivity against potato apirase, a protein that shares epitopes with *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase isoforms, in acute and chronically infected mice, after chemotherapy and reinfection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **105**: 370-3.

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. et al. 2008. Mapping of the conserved antigenic domains shared between potato apyrase and parasite ATP diphosphohydrolases: potential application in human parasitic diseases. **Parasitology** **135**: 943-953.

FENWICK, A. & WEBSTER, J.P. Schistosomiasis: challenges for control, treatment and drug resistance.2006. **Current Opinion in Infectious Diseases**, **19**: 577–582.

FIETTO, J.L.; DE MARCO, R.; NASCIMENTO, I.P.; CASTRO, I.M.; CARVALHO, T.M.; DE SOUZA, W; BAHIA, M.T.; ALVES, M.J.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. 2004. Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical Biophysical Research Communications**, **316**: 454-460.

FILIPPINI, A., TAFFS, R. E. & SITKOVSKY, M. V. 1990. Extracellular ATP in T lymphocyte activation: possible role in effector functions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**,**87**: 8267–8271.

GOES, AM; REZENDE, SA; 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(1)**:11-8.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; RUIZ DE LUZUREAGA, K.; ISTFAN, N.; YOUNG, V.R.; TANNENBAUM, S.R. 1981. Nitrate biosynthesis in man. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, **78(12)**: 7764-8.

GREENBERG, R.M. 2004. Are Ca²⁺ channels targets of praziquantel action? **International Journal for Parasitology** **35**: 1–9.

GRYSEELS, B.; POLMAN, K.; CLERINX, J.; KESTENS, L. 2006. Human schistosomiasis. **Lancet**, **368 (9541)**: 1106-1118.

HAMS, E.; AVIELLO, G.; FALLON, P.G. 2013. The *Schistosoma* granuloma: friend or foe? **Frontiers in Immunology**, **4**:1-8.

HANDA, M.; GUIDOTTI, G. 1996. Purification and cloning of soluble ATP diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **218**: 916-923.

HÄUSLER, S.F.; DEL BARRIO I.M.; DIESSNER J, STEIN RG; STROHSCHHEIN J; HÖNIG A; DIETL J; WISCHHUSEN J. 2014. Anti-CD39 and anti-CD73 antibodies A1 and 7G2 improve targeted therapy in ovarian cancer by blocking adenosine-dependent immune evasion. **American Journal of Translational Research**, **6(2)**: 129-39.

HERBERT, D. R., C. HOLSCHER, C.; MOHRS M, ARENDSE, B; SCHWEGMANN, A; RADWANSKA, M; LEETO, M; KIRSCH, R; HALL, P; MOSSMANN, H; CLAUSSEN, B; FÖRSTER, I; BROMBACHER, F. 2004. Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. **Immunity**, **20(5)**: 623-35.

HESSE, M.; CHEEVER, A. W.; JANKOVIC, D.; WYNN, T. A. 2000. NOS-2 mediates the protective anti-inflammatory and antifibrotic effects of the Th1-inducing adjuvant, IL-12, in a Th2 model of granulomatous disease. **The American Journal of Pathology**, **157**: 945–955.

IDZKO, M.; FERRARI, D. & ELTZSCHIG, H. K. 2014. Nucleotide signalling during inflammation. **Nature**, **509**: 310-317.

JACOB, F.; NOVO, C.P.; BACHERT, C.; CROMBRUGGEN, K.V. 2013. Purinergic signaling in inflammatory cells: P2 receptor expression, functional effects, and modulation of inflammatory responses. **Purinergic Signalling**, **9**: 285–306.

JENABIAN M-A; SEDDIKI N; YATIM A; CARRIERE M; HULIN A; Younas, M.; GHADIMI, E.; KOK, A.; ROUTY, J.; TREMBLAY, A.; SEVIGNY, J.; LELIEVRE, J.; LEVY, Y. 2013. Regulatory T Cells Negatively Affect IL-2 Production of Effector T Cells through CD39/Adenosine Pathway in HIV Infection. **PLoS Pathogen** **9(4)**: e1003319.

JAQUES, J.A.S.; BECKER, L.V.; SOUZA, V.C.G.; LEAL, C.A.M.; BERTOLDO, T.M.D.; PINHEIRO, K.V.; MORSCH, V.M.; SCHETINGER, M.R.C.; LEAL, D.B.R. 2013. Activities of enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. **Cell Biochemistry and Function**, **31**: 395–399.

JUNGER, W. G. 2011. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. **Nature Reviews**, **11**: 201-212.

KÖLES, L.; FÜRST, S. & ILLES, P. 2007. Purine Ionotropic (P2X) Receptors. **Current Pharmaceutical Design**, **13**: 2368-2384.

KATZ, N., CHAVES, A., PELLEGRINO, J. 1972. A simple device for quantitative stool thicksmeat technique in schistosomiasis mansoni. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** **14**: 397–400.

KETTLUN, A.M.; ESPINOSA, V.; GARCIA, L.; VALENZUELA, M.A. 2005. Potato tuber isoapyrases: substrate specificity, affinity labelling and proteolytic susceptibility. **Phytochemistry**, **66**: 975-982.

KUKULSKI, F; LEVESQUE ,S.A.; LAVOIE, E.G.; LECKA1, J; BIGONNESSE, F.; KNOWLES, A.F.; ROBSON, S.C.; KIRLEY, T.L.; SÉVIGNY, J. Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. 2005. **Purinergic Signalling**, **1**: 193–204.

KUKULSKI, F.; BEN, Y.F., LECKA, J.; KAUFFENSTEIN, G.; LEVESQUE, S.A.; MARTÍN-SATUÉ, F.; SÉVIGNY, J. 2009. Extracellular ATP and P2 receptors are required for IL-8 to induce neutrophil migration. **Cytokine** **46(2)**: 166–170.

KUKULSKI, F.; BAHRAMI, F BEN, Y.F., LECKA, J.; MARTÍN-SATUÉ, F.; LEVESQUE, S.A.; SÉVIGNY, J. 2011. NTPDase1 controls IL-8 production by human neutrophils. **The Journal of Immunology**, **187(2)**: 644-653.

KNOWLES, A. 2011. The GDA1_CD39 superfamily: NTPDases with diverse functions. **Purinergic Signalling**, **7**: 21–45.

LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophages T4. **Nature**, **227**: 680-685.

LA FLAMME, A.N.; CANAGASABEY, K; HARVIE,M; BÄCKSTRÖM,T. Schistosomiasis protects against multiple sclerosis. 2004. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, **93 (I)**: 33-36.

LANGSTON, H.P.; KE, Y.; GEWIRTZ, A.T.; DOMBROWSKI, K.E.; KAPP, J.A. 2003. Secretion of IL-2 and IFN- γ , But Not IL-4, by Antigen-Specific T Cells Requires Extracellular ATP. **The Journal of Immunology**, **170**: 2962–2970.

LA SALA, A; FERRARI, D; CORINTI, S; CAVANI, A; DI VIRGILIO, F; GIROLOMONI, G. 2001. Extracellular ATP induces a distorted maturation of dendritic cells and inhibits their capacity to initiate Th1 responses. **The Journal of Immunology**, **166**: 1611–1617.

LEMAIRE, I.; FALZONI, S.; LEDUC, N.; ZHANG, B.; PELLEGGATTI, P.; ADINOLFI, E.; CHIOZZI, P.; DI VIRGILIO, F. 2006. Involvement of the purinergic P2X7 receptor in the formation of multinucleated giant cells. **The Journal of Immunology**, **177**: 7257–7265.

LENZI, H.L.; KIMMEL, E.; SCHECHTMAN, H.; PELAJO-MACHADO, M.; ROMANHA, W.S.; PACHECO, R.J.; MARIANO, M.; LENZI, J.A. 1998. Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biomechanical approaches. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **93 (I)**: 141-151.

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

LOZA, M.; ANDERSON, A.S.; O'ROURKE, K.S.; WOOD, J.; KHAN, I.U. 2011. T-cell specific defect in expression of the NTPDase CD39 as a biomarker for lupus. **Cellular Immunology**, **271**: 110–117.

LOWRY, O.H. ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal Biology Chemistry**, **193**: 265-275.

LUTZ, H. U. ; MIESCHER, S. 2008. Natural antibodies in health and disease: An overview of the first international workshop on natural antibodies in health and disease. **Autoimmunity Reviews**, **7**: 405–409.

MALISZEWSKI, CR; DELESPESE, GJ; SCHOENBORN, MA, ARMITAGE, RJ; FANSLAW, WC; NAKAJIMA, T; BAKER, E; SUTHERLAND, GR; POINDEXTER, K; BIRKS, C. 1994. The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. **The Journal of Immunology**, **153(8)**: 3574-3583.

MATA-SANTOS, H.A.; LINO, F.G.; ROCHA, C.C.; CASTELO BRANCO, M.T.; PYRRHO, A.S. 2010. Silymarin treatment reduces granuloma and hepatic fibrosis in experimental schistosomiasis. **Parasitological Research**, **107**: 1429-1434.

MAIA, A.C.R.G.; DETONI, M.L.; PORCINO, G.N.; SOARES, T.V.; GUSMÃO, M.A.N.; FESSEL, M.R.; MARQUES, J.M.; SOUZA, M.A. COELHO, P.M.Z; ESTANISLAU, J.A.S.G.; ROCHA, M.O.C.; SANTOS, M.O.; FARIA-PINTO, P.; VASCONCELOS, E.G. 2011. Occurrence of a conserved domain in ATP diphosphohydrolases from pathogenic organisms associated to antigenicity in human parasitic diseases. **Developmental and Comparative Immunology**, **35**: 1057-1065.

MAIA, A.C.R.G.; PORCINO, G.N.; DETONI, M.L.; EMIDIO, N.B.; MARCONATO, D.G.; FARIA-PINTO, P.; FESSEL, M.R.; REIS, A.B.; JULIANO, L.; JULIANO, M.A.; MARQUES, M.J.; VASCONCELOS, E.G. 2012. An antigenic domain within a catalytically active *Leishmania infantum* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1) is a target of inhibitory antibodies. **Parasitology International**, **62**: 44-52.

MENDES, R.G.P.; GUSMÃO, M.A.N.; MAIA, A.C.R.G.; DETONI, M.L.; PORCINO, G.N.; SOARES, T.V.; JULIANO, M.A.; JULIANO, L.; COELHO, P.M.Z.; FARIA-PINTO, P.; VASCONCELOS, E.G. 2011. Immunostimulatory property of a synthetic peptide belonging to the soluble ATP diphosphohydrolase isoform (SmATPDase2) and immunolocalization of this protein in the *Schistosoma mansoni* egg. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **106**: 808-813.

MILLAN, J. L. 2006. Alkaline phosphatases: structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. **Purinergic Signal** **2**: 335–341.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de Vigilância Epidemiológica. **Ministério da Saúde**, 7ª ed., 2010.

MOSMANN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods** **65(1-2)**: 55-63.

NUNES, V. S. P.; VASCONCELOS, E. G.; FARIA-PINTO, P.; BORGES, C. C. H.; CAPRILES, PRISCILA V.S.Z. Structural comparative analysis of Ecto-NTPDase models from *S. mansoni* and *H. sapiens*. 2015. **Lecture Notes in Computer Science**, **9096**: 247-259.

OHTA, A. & SITKOVSKY, M. 2014. Extracellular adenosine-mediated modulation of regulatory T cells. **Frontiers in Immunology**, **5**: 304.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAUDE. 2013. **Schistosomiasis: progress report 2001 - 2011, strategic plan 2012 - 2020**. Geneva, 64 p.

PEARCE, E.J.; MACDONALD, A.S. 2002. The immunobiology of schistosomiasis. **Nature Immunology**, **2**: 499-511.

PEDRAS-VASCONCELOS, J.A.; BRUNET, L.R.; PEARCE, E.J. 2001. Profound effect of the absence of IL-4 on T cell responses during infection with *Schistosoma mansoni*. **Journal of Leukocyte Biology**, **70**: 737-744.

PORCINO GN, CARVALHO-CAMPOS C, MAIA AC, DETONI ML, FARIA-PINTO P, COIMBRA ES, MARQUES MJ, JULIANO MA, JULIANO L, DINIZ VÁ, CORTE-REAL S, VASCONCELOS EG. 2012. *Leishmania (Viannia) braziliensis* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1): localization and in vitro inhibition of promastigotes growth by polyclonal antibodies. **Experimental Parasitology**. **132(2)**: 293-299.

PYRRHO, A. S. LENZI, H. L.; RAMOS, J. A.; MOURA-NETO, R.; CACHED, F. C. O. F.; SILVA, C. S.; TAKIYA, C. M.; GATTASS, C. R..2004. Dexamethasone treatment improves morphological and hematological parameters in chronic experimental schistosomiasis. **Parasitology Research**, **92 (6)**: 478-483.

PANTHER, E.; CORINTI, S; IDZKO, M; HEROUY, Y; NAPP, M;, LA SA ; GIROLOMONI, G; NORGAUER, J. 2003. Adenosine affects expression of membrane molecules, cytokine and chemokine release, and the T cell stimulatory capacity of human dendritic cells. **Blood**, **101**: 3985–3990.

PELEGRIN, P; BARROSO-GUTIERREZ, C; SURPRENANT, A. 2008. P2X7 receptor differentially couples to distinct release pathways for IL-1beta in mouse macrophage. **The Journal of Immunology**, **180(11)**: 7147-7157.

PUCHALOWICZ, K; TARNOWSKI, M; BARANOWSKA-BOSIACKA, I; CHLUBEK, D; DZIEDZIEJKO, V. 2014.P2X and P2Y Receptors-Role in the Pathophysiology of the Nervous System. **International Journal of Molecular Sciences**, **15**: 23672-23704.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK G. 1998. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacological Review**, **50**: 413–92.

RAOUF, R.; BLAIS, D.; SEGUELA, P. 2005. High zinc sensitivity and pore formation in an invertebrate P2X receptor. **Biochimie Biophysic Acta**, **1669**: 135–141.

RAYAH, A.; KANELLOPOULOS, J.M. & DI VIRGILIO, F. 2012. P2 receptors and immunity. **Microbes and Infection**, **14**: 1254-1262.

RESTA, R.; YAMASHITA, Y.; THOMPSON, L.F. 1998. Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. **Immunological Review**, **161**: 95–109.

REZENDE-SOARES, F.A.; CARVALHO-CAMPOS, C.; MARQUES, M.J.; PORCINO, G.N.; GIAROLA, N.L.; COSTA, B.L. TAUNAY-RODRIGUES, A.; FARIA-PINTO, P.; SOUZA, M.A; DINIZ, V.A.; CORTE-REAL, S.; JULIANO, M.A.; JULIANO, L.; VASCONCELOS, E.G. 2010. Cytochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes and partial identification of an catalytically active isoform. **Parasitology**, **135**:773-783.

ROBSON, S.C.; SEVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. 2006. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure, function relationship and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**, **2**: 409-430.

ROSS, A.G.P.; BARTLEY, P.B.; SLEIGH, A.C.; OLDS, G.R.; LI, Y.; WILLIAMS, G.M.; McMANUS, D.P. 2002. Schistosomiasis. **New England Journal of Medicine**, **346 (16)**: 1212-1220.

RUTITZKY, L.I.; STADECKER, M.J. 2011. CD4 T cells producing pro-inflammatory interleukin-17 mediate high pathology in schistosomiasis. **Mémoires do Instituto Oswaldo Cruz**, **101**: 327-330.

SADLER, C. H.; RUTITZKY, L.I.; STADECKER, M.J.; WILSON, R.A. 2003. IL-10 is crucial for the transition from acute to chronic disease state during infection of mice with *Schistosoma mansoni*. **European Journal Immunology**, **33**: 880-888.

SANSOM, F. M.; NEWTON, H. J. et al. 2007. A bacterial ecto-triphosphate diphosphohydrolase similar to human CD39 is essential for intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. **Cellular Microbiology**, **9**: 1922-35.

SAZE, Z.; SCHULER, P.J.; HONG, C.; CHENG, D.; JACKSON, E.K.; WHITESIDE, T.L. Adenosine production by human B cells and B cell-mediated suppression of activated T cells. **Blood**, **122** : 09-18.

SCHRAMM, G.; HAAS, H. 2010. Th2 immune response against *S. mansoni* infection. **Microbes and Infection** **12**: 881-888.

SHETH, S.; BRITO, R.; MUKHERJEA, D.; RYBAK, L.P.; RAMKUMAR, V. 2014. Adenosine Receptors: expression, function and regulation. **International Journal of Molecular Sciences**, **15**: 2024-2052.

SILVA, A.; SANTANA, L.B.; JESUS, A.M. 2008. A resposta imune na forma aguda da esquistossomose mansoni. In: **Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Org.: CARVALHO, O.S.; COELHO, P.M.Z.; LENZI, H.L., p. 687-700.

SOARES, T.V. 2012. **Aplicação da apirase de batata e de polipeptídeo recombinante derivado no estudo da ATPDase 2 de Schistosoma mansoni e da esquistossomose mansoni**. Dissertação acadêmica, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais.

SOUZA, V.; SCHLEMMER, K. B.; NOAL, C.B.; JAQUES, J.A.; ZIMMERMANN, C.E; LEAL, C.A., FLECK, J; CASALI, E.A.; MORSCH, V.M; SCHETINGER, M.R.; LEAL D.B. 2011. E-NTPDase and E-ADA activities are altered in lymphocytes of patients with indeterminate form of Chagas' disease. **Parasitology International**, **61(4)**: 690-696.

SOUZA, F. P. C; VITORINO, R. R.; COSTA, A. P.; FARIA, F. C.; SANTANA, L. A.; GOMES, A. P. 2011. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, **9**: 300-307.

STAGG, J; DIVISEKERA, U; MCLAUGHLIN, N; SHARKEY, J; POMMEY, S; DENOYER, D; DWYER, KM; SMYTH, MJ. 2010. Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, **107(4)**: 1547-1552.

STEFAN, C. JANSEN, S. & BOLLEN, M. 2006 ; Modulation of purinergic signaling by NPP type ectophosphodiesterases. **Purinergic Signalling**, **2**: 361–370.

TONIN, A.A.; DA SILVA, A.S.; RUCHEL, J.B.; REZER, J.F.P.; CAMILLO, G.; FACCIO, L.; FRANÇA, R.T.; LEAL, D.B.R.; DUARTE, M.M.F.; VOGEL, F.F.; DE LA RUE, M.L.; LOPES, S.T.A. 2013. E-NTPDase and E-ADA activities in lymphocytes associated with the immune response of rats experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. **Experimental Parasitology**, **135**: 325–330.

VASCONCELOS, E; NASCIMENTO, P.S.; MEIRELLES, M.N.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; FERREIRA, S.T. 1993. Characterization and localization of an ATP-diphosphohydrolase on the external surface of the tegument of *S. mansoni*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, **58**: 205-214.

VASCONCELOS, E.; FERREIRA, S. T.; CARVALHO, T.; DE SOUZA, W.; KETTLUN, A.M.; MANCILLA, M.; VALENZUELA, M.A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. 1996. Partial purification and immunohistochemical localization of ATP Diphosphohydrolase from *S. mansoni*. **Journal of Biological Chemistry**, **271**: 22139-22145.

VASCONCELOS, E.G.; FARIA-PINTO, P.; RESENDE-SOARES, F.A.; PENIDO, M.L.O.; GONÇALVES-COSTA, S. C.; COELHO, P.M.Z. 2009. Potato Apyrase: a New Tool for Parasitic Disease Research. **Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology**, **3**: 80-88.

VERKHRATSKY, A. & BURNSTOCK, G. 2014. Biology of purinergic signalling: Its ancient evolutionary roots, its omnipresence and its multiple functional significance. **Bioessays**: 697–705.

WANG, Y.M; MCRAE, J.L; ROBSON, S.C; COWAN, P.J; ZHANG, G.Y; HU, M; POLHILL, T; WANG, Y; ZHENG, G; WANG, Y; LEE, V.W.S; UNWIN, R.J; HARRIS, D.C.H; DWYER, K.M; ALEXANDER, S.I. 2012. Immunomodulation Regulatory T cells participate in CD39-mediated protection from renal injury. **European Journal of Immunology**, **42**: 2441–2451

WILKIN, F; STORDEUR, P; GOLDMAN, M; BOEYNAEMS, JM; ROBAYE, B. 2002. Extracellular adenine nucleotides modulate cytokine production by human monocyte-derived dendritic cells: dual effect on IL-12 and stimulation of IL-10. **European Journal of Immunology** **32**: 2409–2417.

WYNN, T.A.; CHEEVER, A.W. 1995. Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. **Current Opinion in Immunology**, **7**: 505-511.

YEGUTKIN, G. G. 2008. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1783**:673–694.

YEGUTKIN, G.G. 2008. Nucleotide-and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade **Biochimica et Biophysica Acta**, **1783**: 673–694.

ZANIN, R.F.; BRAGANHOL, E.; BERGAMIN, L.S.; INGRASSIA, L.F.; CAMPESATO, ZANOTTO FILHO, A.; MOREIRA, J.C.F.; MORRONE, F.B.; SEVIGNY, J.; SCHETINGER, M.R.C; WYSE, A.T.S.; BATTASTINI, M.O. 2012. Differential

Macrophage Activation Alters the Expression Profile of NTPDase and Ecto-59-Nucleotidase. **PLoS ONE 7(2)**: e31205.

ZIMMERMANN, H. 2001. Ectonucleotidases: Some Recent Developments and a Note on Nomenclature. **Drug Development Research, 52**: 44-56.

ZIMMERMANN, H.; ZEBISCH, M. & STRÄTER, N. 2012. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. **Purinergic Signalling, 8**:437–502.

ANEXO A – CARTA DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
 Comissão de Ética na Experimentação Animal

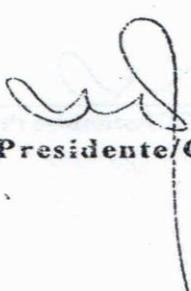
CERTIFICADO –

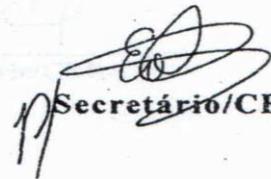
Certificamos que o Protocolo nº 017/2009 – CEEA sobre “Estudo do potencial imunomodulador da apirase de batata e do óleo de Candeia sobre a resposta inflamatória granulomatosa na esquistossomose mansoni experimental”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de Priscila de Faria Pinto, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 06/10/2009.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 017/2009 - CEEA about “Estudo do potencial imunomodulador da apirase de batata e do óleo de Candeia sobre a resposta inflamatória granulomatosa na esquistossomose mansoni experimental” – Priscila de Faria Pinto - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 06/10/2009.

Juiz de Fora, 06 de outubro de 2009


 Presidente/CEEA


 Secretário/CEEA

ANEXO B – CARTA DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética na Experimentação Animal

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 025/2012 – CEEA sobre “ESTUDO DO POTENCIAL IMUNOMODULATOR DA BATATA PURIFICADA E SEUS PEPTÍDEOS SOBRE AS RESPOSTAS HUMORAL, DE CITOCINAS E INFLAMATÓRIA GRANULOMATOSA NA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI EXPERIMENTAL”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de PRISCILA DE FARIA PINTO, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 20/03/2012. Para o desenvolvimento da pesquisa foram liberados 200 animais, conforme solicitado.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 025/2012- CEEA about “STUDY OF THE POTENCIAL IMUNOMODULATORY OF PURIFIED POTATO APYROSE AND ITS PEPTIDES ABOUT THE HUMORAL GRANULOMATUS INFLAMMATORY AND CYTOKINSES RESPONSES IN EXPERIMENTAL SCHISTOSOMIASES” - PRISCILA DE FARIA PINTO - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 20/03/2012. For the development of this research 200 animals were released, as requested

Juiz de Fora, 20 de março de 2012.

Presidente/CEEA

Secretário/CEEA

ANEXO C – CARTA DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética na Experimentação Animal

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 026/2012 – CEEA sobre “OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DE PARASITO SCHISTOSOMA MANSONI EM CAMUNDONGOS SWISS FÊMEOS PARA EXPERIMENTOS LABORATORIAIS”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de PRISCILA DE FARIA PINTO, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 20/03/2012. Para o desenvolvimento da pesquisa foram liberados 360 animais, conforme solicitado.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 026/2012- CEEA about “OBTAINING AND MAINTAINING THE SCHISTOSOMA MANSONI PARASITE IN SWISS MICE FEMALES FOR LABORATORY EXPERIMENTS” - PRISCILA DE FARIA PINTO - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 20/03/2012. For the development of this research 360 animals were released, as requested

Juiz de Fora, 20 de março de 2012.

Presidente/CEEA

Secretário/CEEA