

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

GABRIELA AYRES FRAGOSO NASCIMENTO

**Identificação quimiluminescente do perfil de carboidratos e antígenos
teciduais em modelo experimental de Esquistossomose Mansônica**

Recife

2018

GABRIELA AYRES FRAGOSO NASCIMENTO

**IDENTIFICAÇÃO QUIMILUMINESCENTE DO PERFIL DE
CARBOIDRATOS E ANTÍGENOS TECIDUAIS EM MODELO
EXPERIMENTAL DE ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração: Biotecnologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Doutor (a) em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

Co-orientador: Prof. Dr. Mário Ribeiro de Melo Júnior

Recife

2018

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Nascimento, Gabriela Ayres Fragoso

Identificação quimiluminescente do perfil de carboidratos e antígenos teciduais em modelo experimental de esquistossomose mansônica / Gabriela Ayres Fragoso Nascimento. – 2018.

82 f. : il.

Orientador: Luiz Bezerra de Carvalho Júnior.

Coorientador: Mario Ribeiro de Melo Júnior.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas 2018.

Inclui referências e anexo.

1. Esquistossomose 2. Schistosoma mansoni 3. Antígenos I. Carvalho Júnior, Luiz Bezerra de (orientador) II. Melo Júnior, Mario Ribeiro de III. Título.

616.963

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 131

GABRIELA AYRES FRAGOSO NASCIMENTO

IDENTIFICAÇÃO QUIMILUMINESCENTE DO PERFIL DE CARBOIDRATOS E ANTÍGENOS TECIDUAIS EM MODELO EXPERIMENTAL DE ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração: Biotecnologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Aprovada em: **15/02/2018**

Banca Examinadora

Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami /UFPE

Dra. Luiza Rayanna Amorim de Lima
Universidade de Pernambuco

Dra. Adriana Silva Andrade Pereira
Universidade de São Paulo

Dr. Mário Ribeiro de Melo Junior
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami /UFPE

Dr. Leandro Batista Wanderley
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, pela vida e força dada para superar todas as dificuldades, e coragem para traçar esse caminho.

Aos meus pais Eliane (*in memorian*) e Paulo pelo amor e apoio integral de sempre, apoiando-me quando eu precisei e me ajudando em cada luta. Obrigada por toda a educação dada e por sempre batalhar junto comigo. E a minha irmã Gisela pelo amor, companheirismo e apoio sempre prestados, pela força que sempre me deu e pela amizade verdadeira e incondicional.

Ao Prof. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, pela confiança depositada em mim e pelos grandes ensinamentos e dedicação dispensados durante a realização deste trabalho. E ao Prof. Mário Ribeiro de Melo Junior, por ter aceitado o desafio de me co-orientar junto com o Prof. Luiz e por todas as verdadeiras aulas durante discussões científicas. Com certeza, o aprendizado pessoal e profissional que tive com ambos será levado para o restante da minha vida.

Aos membros da banca, por terem aceitado contribuir com as importantes considerações.

Às Profas. Maria Elizabeth Cavalcante Chaves e Maria da Paz Carvalho da Silva pelo apoio, ensinamentos, confiança e companheirismo em todos os momentos desde a época da graduação.

A Adriana Andrade e Luiza Rayanna, pelos diversos momentos de discussões científicas e também de descontração, e a grande amizade dedicada a mim durante todos esses anos de vida acadêmica. E a Ana Paula, que se tornou uma pessoa fundamental na realização desse trabalho, pela verdadeira amizade e por toda a atenção prestada a mim, todos os esclarecimentos, todo o apoio e ajuda que foram primordiais.

Aos meus amigos do IMOBIO e do GP3 que me fizeram sentir parte de ambos os grupos e me acolheram com carinho.

Às minhas amigas de infância Raquel, Maria Christina e Andréa pela grande amizade que dedicaram a mim.

A Anderson, pela paciência e compreensão de sempre, e a Camila, Divar, Maria e Rafael pelos momentos de descontração e amizade, apoio, estímulo presentes desde o início da graduação.

Aos amigos do Laboratório de Patologia do LIKA e POS-PAT, Carmelita Cavalcanti, Marina Cartaxo e Silvânia Paz pela oportunidade de trabalhar com pessoas especiais.

A CAPES pelo suporte financeiro.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi aplicar o método quimiluminescente com éster de acridina para investigação de proteínas e glicoproteínas teciduais em um modelo experimental de esquistossomose mansônica. Os resultados são expressos em Unidades de Luz Relativa (ULR). O glicofenótipo do tecido hepático em 8 semanas de infecção foi primeiro avaliado. Para isto, utilizou-se três lectinas conjugadas ao éster de acridina: Concanavalina A (Con A), wheat germ agglutinin (WGA) e *Sambucus nigra* agglutinin (SNA), as quais, respectivamente, reconhecem glicose/manose, N-Acetilglicosamina e ácido neuramínico. Foi observado que as expressões de glicose/manose e N-Acetilglicosamina estavam elevadas, quando comparadas ao grupo controle (não infectado), enquanto que a expressão de ácido neuramínico permaneceu virtualmente inalterada. A expressão de proteínas de matriz do granuloma do tecido hepático também foi avaliada através do comportamento de metaloproteinases (MMPs) e uma adamalisina (ADAM): MMP-2, MMP-9 e ADAM-10. Para tanto, três períodos da doença foram analisados: 4, 8 e 16 semanas de infecção, os quais correspondem às fases pré-patente, aguda e início da fase crônica da doença. Enquanto a expressão de MMP-2 mostrou-se reduzida e estatisticamente insignificante quando comparados tecidos infectados e controle, MMP-9 e ADAM-10 tiveram seus valores de ULR significantes. MMP-9 apresentou maior ULR para 4 e 8 semanas de infecção, enquanto ADAM-10 foi mais expresso em 8 semanas de infecção, quando contraposto os outros tempos da doença. O Antígeno Catódico Circulante (CCA) também teve sua expressão avaliada em 4, 8 e 16 semanas de infecção. A expressão desta glicoproteína foi observada em tecidos hepático, renal e esplênico. Os valores de ULR em tecido hepático foram mais expressos em 16 semanas de infecção, enquanto que no tecido renal, a expressão do CCA esteve maior em 8 semanas da doença. CCA em tecido esplênico, porém, teve maiores valores absolutos de ULR em 16 semanas de esquistossomose quando comparados às ULRs da proteína em 4 e 8 semanas. Tendo em vista o exposto, a avaliação quimiluminescente mostrou-se eficiente tanto para o estudo da variação de proteínas e glicoproteínas expressas em esquistossomose mansônica quanto em antígenos liberados pelo *Schistosoma mansoni* no hospedeiro durante a infecção. O entendimento do glicofenótipo e de proteínas do parasito e do hospedeiro é relevante para o desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico, para os novos alvos de drogas e vacinas baseadas em glicanos.

Palavras-chave: Antígenos. Glicofenótipo. Quimiluminescência. *Schistosoma mansoni*.

ABSTRACT

The aim of this work was to apply the chemiluminescent method with acridinium ester to investigate proteins and glycoproteins on tissues of experimental model of schistosomiasis mansoni. The results are expressed in Relative Light Units (RLU). The glyco phenotype of hepatic tissue at 8 weeks of infection was first evaluated. Three lectins conjugates to AE: Concanavalin A (Con A), wheat germ agglutinin (WGA) and Sambucus nigra agglutinin (SNA) were used in these work, which respectively recognize glucose / mannose, N-acetylglucosamine and neuraminic acid. It was observed that the glucose / mannose and N-acetylglucosamine expressions were elevated when compared to the control group (uninfected), whereas neuraminic acid expression remained virtually unchanged. Expression of hepatic granuloma matrix proteins was also evaluated through metalloproteinases (MMPs): MMP-2, MMP-9 and ADAM-10. Three periods of the disease were analyzed: 4, 8 and 16 weeks of infection, which correspond to the pre-patent, acute and early stages of the chronic phase of the Schistosomiasis. While MMP-2 expression was shown to be reduced and statistically insignificant when compared to infected and control tissues, MMP-9 and ADAM-10 had their significant RLU values. MMP-9 presented higher RLU for 4 and 8 weeks of infection, while ADAM-10 was more expressed at 8 weeks of infection when compared to the other times of infection. The Cathodic Circulating Antigen (CCA) also had its expression evaluated at 4, 8 and 16 weeks of infection. Expression of this glycoprotein was observed in hepatic, renal and splenic tissues. Expression of this glycoprotein was observed in hepatic, renal and splenic tissues. RLU values in hepatic tissue were more expressed at 16 weeks of infection, whereas in renal tissue, CCA expression was greater at 8 weeks of disease. CCA in splenic tissue, however, had higher absolute RLU values at 16 weeks of schistosomiasis when compared to protein RLUs at 4 and 8 weeks. The chemiluminescent evaluation proved to be efficient for the study of the variation of proteins and glycoproteins expressed in schistosomiasis mansoni and to antigens released by *Schistosoma mansoni* in the host during infection. Understanding of glyco phenotype and proteins is relevant for the development of novel diagnostic techniques for novel glycan-based drug targets and vaccines.

Keywords: Antigens. Glyco phenotype. Chemiluminescence. *Schistosoma mansoni*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Áreas endêmicas da esquistossomose mansônica no Brasil.	18
Figura 2 Ciclo de vida das espécies de <i>Schistosoma</i>	20
Figura 3 Histopatologia em esquistossomose experimental.....	22
Figura 4 Estruturas de glicanos em <i>Schistosoma mansoni</i> e <i>Haemonchus contortus</i>	26
Figura 5 Eletromicrografia de murino	28
Figura 6 Teste rápido para diagnóstico de esquistossomose	29
Figura 7 Estrutura geral de gelatinases (MMP-2 e MMP-9).....	31
Figura 8 Estrutura geral de uma ADAM (Desintegrina e Metaloproteinase).....	33
Figura 9 Histoquímica com lectinas	38
Figura 10 Mecanismo de reação do éster de acridina.....	40
Figura 11 Histoquímica quimiluminescente em tecido hepático de camundongos.....	53
Figura 12 Análise morfométrica digital de fibras de colágeno nos tecidos hepáticos de 8 e 16 semanas de infecção	56
Figura 13 Conjugação de Antígeno Catódico Circulante ao éster de acridina.....	66
Figura 14 Ensaio de quimiluminescência.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Área média do colágeno intersticial	55
Tabela 2 Classificação do granuloma hepático	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAM Desintegrina e Metaloproteinase

CAA Antígeno Anódico Circulante

CCA Antígeno Catódico Circulante

ConA Concanavalina A

ELISA Ensaio Imuno-enzimático indireto

FITC Isotiocianato de fluoresceína

HIV Vírus da imunodeficiência humana

HSC Células estelares hepáticas

IC Imunocomplexo

MMP Metaloproteinases

OMS Organização Mundial de Saúde

QL Quimiluminescência

SEA Antígeno Solúvel do Ovo

SNA *Sambucus nigra* aglutina

SWAP Soluble Worm Adult Protein (Proteína Solúvel do Verme Adulto)

ULR (RLU) Unidades de Luz Relativa

WGA Aglutinina de gérmen de trigo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 ESQUISTOSSOMOSE HUMANA E EXPERIMENTAL	17
2.1.1 Epidemiologia	17
2.1.2 Ciclo Biológico	19
2.1.3 Esquistossomose Experimental	20
2.1.4 Granuloma na Esquistossomose Experimental	22
2.2 BIOMARCADORES DO <i>Schistosoma mansoni</i> E DA ESQUISTOSSOMOSE	24
2.2.1 Glicobiologia do <i>Schistosoma mansoni</i>	24
2.2.2 Biomarcadores do <i>Schistosoma</i>	26
2.2.3 Antígeno Catódico Circulante	27
2.2.4 CCA em tecidos.....	27
2.2.5 CCA no diagnóstico da Esquistossomose	28
2.2.6 Biomarcadores do hospedeiro	30
2.3 LECTINAS.....	34
2.3.1 Concanavalina A.....	35
2.3.2 WGA	35
2.3.3 SNA	36
2.3.4 Aplicações das Lectinas.....	36
2.4 QUIMILUMINESCÊNCIA.....	38
3 OBJETIVOS	43
3.1 Objetivo Geral	43
3.2 Objetivos Específicos.....	43
4 ARTIGO PUBLICADO.....	45

5 ANÁLISE QUIMILUMINESCENTE E MORFOMÉTRICA DIGITAL DO COLÁGENO INTERSTICIAL EM ESQUISTOSSOMOSE MURINA	48
6 PERFIL QUIMILUMINESCENTE DE ANTÍGENO CATÓDICO CIRCULANTE EM TECIDOS DE CAMUNDONGOS COM ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA	64
7 CONCLUSÃO.....	73
REFERÊNCIAS	74
ANEXO - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	82

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Classificada como doença tropical mundial negligenciada, a esquistossomose humana afeta cerca de 240 milhões de pessoas, especialmente em países com baixo saneamento ambiental (Zida et al., 2016). A espécie *Schistosoma mansoni* conduz a um severo grau de inflamação crônica intestinal que acontece por ocasião da instalação de ovos em tecidos e vasos específicos. Ovos contendo miracídios liberam antígenos que vão levar à inflamação granulomatosa (Guimarães Cavalcanti et al., 2015). É uma resposta de hipersensibilidade tardia ao antígeno solúvel do ovo (SEA), liberado pelos miracídios maduros. Inicialmente, a lesão é volumosa e constituída por numerosas células de defesa em todo o ovo. Com a evolução da esquistossomose, o exsudato diminui gradualmente e é substituído por tecido conjuntivo neoformado com deposição de colágeno para formação de um nódulo fibrótico (Elbaz; Esmat, 2013).

A lesão granulomatosa irá desencadear uma intensa deposição de colágeno e poderá culminar em um processo fibrótico (Liang et al., 2011). Esta lesão é sinalizada pela atividade de proteínas conhecidas como Metaloproteinases de Matriz (MMPs), responsáveis pelo equilíbrio na síntese de colágeno hepático. Com o progresso da inflamação, a atividade desta proteína diminui, enquanto a produção de colágeno continua, o que culmina no aumento de tecido fibroso. Os mecanismos associados à modulação da resposta granulomatosa têm sido objeto de intensos estudos e têm importantes implicações para o controle da doença hepática induzida pela esquistossomose (Abdel Aziz et al., 2012).

Entre as estruturas antigênicas relatadas durante a invasão do parasita, o antígeno catódico circulante (CCA) se destaca como uma glicoproteína de 30 kDa excretada / secretada pelo *Schistosoma*. O CCA é regurgitado a partir do intestino de vermes para o sistema circulatório do hospedeiro e pode ser encontrado no soro já nas primeiras semanas de infecção (Grenfell et al., 2014). Sobre técnicas de identificação do antígeno, através da imunocitoquímica, os primeiros trabalhos com CCA demonstraram a presença deste antígeno circulante em células de Kupffer em três semanas de infecção hepática murina (de Water et al., 1987). No entanto, metodologias sensíveis, que permitem a quantificação destes antígenos, são importantes para avaliar CCA nos hospedeiros mamíferos.

Além da expressão de proteínas do hospedeiro e do parasito, pesquisas vêm mostrando a caracterização do perfil de carboidratos do processo inflamatório da esquistossomose (Guimarães et al., 2008). Esses estudos são feitos por instrumentos que permitam o reconhecimento de

carboidratos no sistema ovo-granuloma do tecido hepático. Na histoquímica analítica, essa avaliação vem sendo usualmente feita com o emprego de lectinas (Melo-Junior et al., 2008). Estas são glicoproteínas que possuem ao menos um domínio não catalítico e são capazes de reconhecer e se ligar reversivelmente a monossacarídeos específicos ou oligossacarídeos (Lam; Ng, 2011). As lectinas podem ser utilizadas como sondas bioquímicas quando associadas a compostos reveladores, os quais permitam a visualização da ligação lectina-carboidrato. Estes compostos podem ser a peroxidase, substâncias fluorescentes e quimiluminescentes (Campos et al., 2006; Araújo et al., 2011b).

A técnica de quimiluminescência (QL) é um método analítico refinado e poderoso que permite verificar a presença de antígenos com baixos limites de detecção (atomoles-fentomoles) (Kricka, 2003). Os derivados de acridina são atualmente utilizados em reações de QL para a detecção e análise de diferentes tipos de compostos ou moléculas. Os sinais de detecção dos derivados de acridina são baixos e frequentemente obtidos com elevada sensibilidade, uma vez que não são necessários catalisadores (Khan et al., 2014). Em nosso laboratório, o éster de acridina (EA) tem sido usado marcado a um anticorpo específico para realizar análises quantitativas de antígenos encontrados em tecidos malignos (Rego et al., 2013; Araujo-Filho et al., 2013). Nosso grupo de pesquisa também demonstrou a versatilidade de EA ligando este composto de quimiluminescência para lectinas e avaliou o glicofenótipo de próstata, pele e tecidos mamários (Silva et al., 2014; Lima et al., 2013; Brustein et al., 2012).

O presente estudo utilizou QL na investigação de antígenos teciduais (CCA), na avaliação de metaloproteinases em tecido hepático e na verificação do glicofenótipo hepático em camundongos infectados por esquistossomose mansônica. O entendimento do glicofenótipo e de proteínas do parasito e do hospedeiro é relevante para o desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico, para os novos alvos de drogas e vacinas baseadas em glicanos.

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ESQUISTOSSOMOSE HUMANA E EXPERIMENTAL

A esquistossomose é uma doença tropical negligenciada ocasionada por um helminto trematodo do gênero *Schistosoma*. O primeiro relato da parasitose foi feito por Theodor Bilharz, em 1852, quando, em uma expedição no Egito, realizou dissecações em múmias de camponeses e observou alterações nos tratos urinário e intestinal. Isto permitiu a descrição do gênero *Schistosoma*. Na ocasião foram observados ovos com espículo terminal, correspondentes à espécie *Schistosoma haematobium* (Katz, 2008). *Schistosoma mansoni*, por sua vez, foi descrita primeiramente em Londres por Sambon em 1907, baseado na morfologia de um verme macho e um ovo com espículo lateral (Katz; Almeida, 2003).

No Brasil, a publicação inicial sobre a esquistossomose mansônica foi feita por Manuel Pirajá da Silva quando, em 1908, publicou um trabalho no qual observou a presença de ovos característicos em autópsias e exames coprológicos. Seguiram-se três trabalhos publicados entre 1908-1909, nos quais haviam relatos de pacientes que eliminavam ovos com espículo lateral nas fezes, mas nenhum ovo na urina (Katz, 2008).

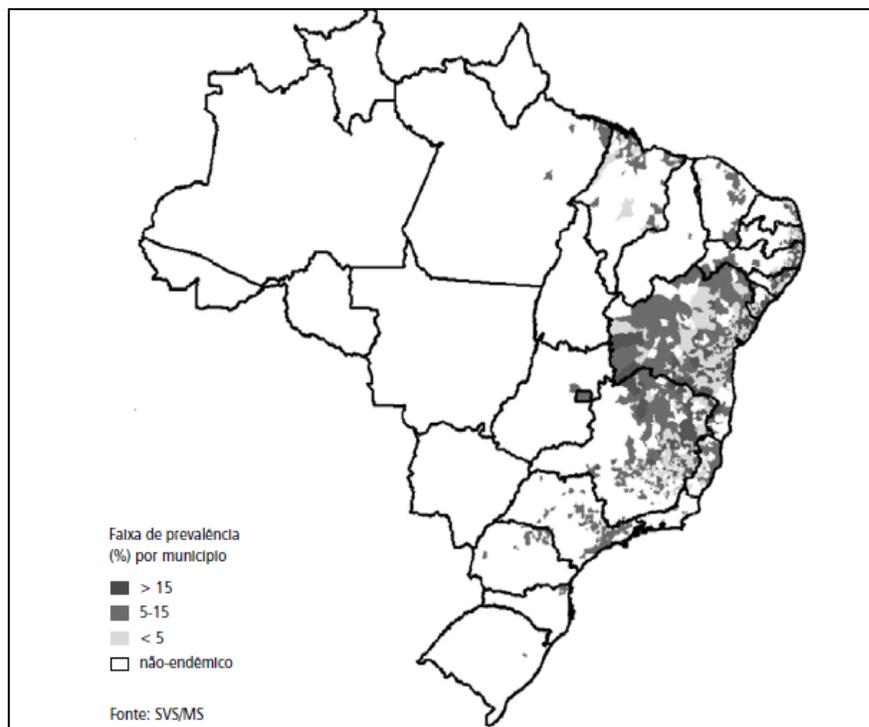
2.1.1 Epidemiologia

Existem três espécies principais de *Schistosoma* capazes de infectar seres humanos: *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma mansoni* e *Schistosoma japonicum*. A esquistossomose é altamente prevalente em regiões subtropicais da África, das Américas e Ásia, e cada continente possui espécies endêmicas (Guimarães Cavalcanti et al., 2013). *S. haematobium* e *S. mansoni*, por exemplo, ocorrem na África e no Oriente Médio, enquanto nas Américas apenas *S. mansoni* está presente. *S. japonicum* é comumente encontrado na Ásia, principalmente nas Filipinas e na China. Há ainda três espécies distribuídas em regiões específicas, que também podem causar doença humana: *Schistosoma mekongi*, na bacia do Rio Mekong, e *Schistosoma guineensis* e *Schistosoma intercalatum* na África Central e Ocidental (Colley et al., 2014).

Cada espécie de *Schistosoma* necessita de uma respectiva espécie de caramujo que funciona como hospedeiro intermediário, e sua distribuição é definida pelo habitat deste molusco. *S. mansoni* e *S. haematobium*, por exemplo, precisam de certas espécies de caramujos de água doce, os *Biomphalaria* e *Bulinus*, respectivamente. Por outro lado, *S. japonicum* utiliza o molusco *Oncomelania* spp como seu hospedeiro intermediário (Colley et al., 2014).

A diversidade de espécies também implica na variedade de manifestações clínicas. A esquistossomose urogenital é causada por infecção por *S. haematobium*, enquanto a esquistossomose intestinal é causada por *S. intercalatum*, *S. japonicum* e *S. mansoni*. No Brasil, apenas *S. mansoni*, e sua manifestação intestinal da doença, é encontrado (Mazigo et al., 2013). Brasil é considerado o país com maior área endêmica da esquistossomose mansônica. Segundo dados da Vigilância Epidemiológica do Ministério da Saúde, a parasitose é encontrada em 19 unidades federativas, especialmente, no Nordeste e Sudeste, devido à presença de moluscos *Biomphalaria* (Brasil, 2011). Destacam-se, entre os estados atingidos, Minas Gerais, Bahia e Pernambuco, devido aos aspectos históricos da economia canavieira (**Figura 1**).

Figura 1: Áreas endêmicas da esquistossomose mansônica no Brasil.



Fonte: Brasil, 2011.

No estado de Pernambuco, a doença migrou das regiões canavieiras para o litoral, e o primeiro relato da transmissão de esquistossomose litorânea remonta a 1990. Nesta ocasião, quatro estudantes de medicina apresentaram forma clínica aguda da doença após exposição acidental através de poças de águas pluviais nas ruas da praia Forte Orange em Ilha de Itamaracá, nas quais

havia inúmeros caramujos *Biomphalaria glabrata* infectados com *S. mansoni* (Gonçalves et al., 1991; Barbosa et al., 2015).

A primeira ação de controle da esquistossomose mansônica no estado data de 1977 (Barbosa et al., 2012) e recebeu atenção especial quando foi classificada, em 2011, como doença negligenciada pelo Programa de Enfrentamento às Doenças Negligenciadas, o SANAR (Pernambuco, 2016). A esquistossomose é endêmica em 102 dos 185 municípios pernambucanos, sendo a zona da mata a área mais atingida, podendo apresentar, em certas localidades, 80% de indivíduos parasitados. Acredita-se que os valores da infecção ainda são subestimados, pela fragilidade de notificações, não condizendo com a realidade (Barbosa et al., 2012).

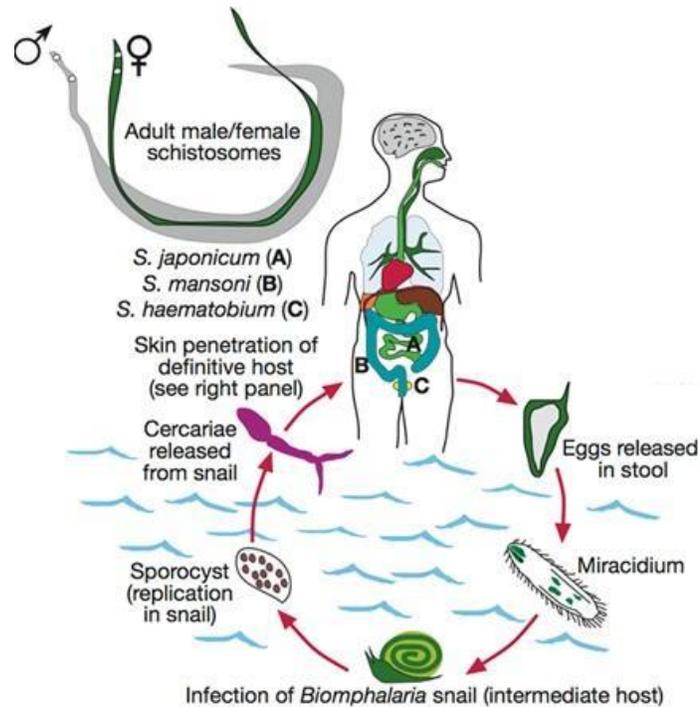
2.1.2 Ciclo Biológico

O ovo do *S. mansoni*, quando eliminado através das fezes do hospedeiro definitivo (homem) deve atingir coleções hídricas, tais como lagos, lagoas e açudes, onde o miracídio (larva ciliada), sob temperatura e luz intensas, rompe a membrana do ovo. Ao cair em meio aquático, o miracídio necessita encontrar hospedeiro intermediário do *S. mansoni*, o caramujo *Biomphalaria*, para continuar seu desenvolvimento larval. No interior do molusco, passará por estágios intermediários de esporocistos primário e secundário, até atingir a forma de cercária. Estas são liberadas pelo caramujo sob estímulos de luz intensa e temperaturas elevadas e precisam encontrar, em um prazo de até 48 horas, seu hospedeiro definitivo, preferencialmente o homem. Nadam ativamente na água, graças a sua cauda bifurcada, e, quando encontram o hospedeiro, iniciam o processo de penetração pela pele e mucosas. Essas larvas fixam-se ao hospedeiro por meio de ventosas e, por ação lítica e mecânica, promovem a penetração do corpo cercariano. Nesse momento, a cercária perde sua cauda e passa, então, a ser chamada esquistossômulo. Migram pelo tecido subcutâneo até caírem em algum vaso, sendo levadas passivamente, pela circulação, até os pulmões, e de lá para o sistema porta (Coelho et al., 2008).

Uma vez no sistema porta-hepático, os esquistossômulos se estabelecem para sua vida adulta, estando prontos para acasalamento cerca de 25 a 28 dias após a penetração. Esse processo ocorre graças ao dimorfismo sexual: o macho possui o canal ginecóforo, o qual alberga a fêmea no momento do acasalamento. Ambos, macho e fêmea, migram acasalados para a veia mesentérica inferior e iniciam a postura de ovos. Por volta do 35º dia após a penetração, os ovos são depositados nos vasos da submucosa intestinal. Esses ovos podem permanecer no tecido e provocar inflamação

do sistema gastrintestinal, ou podem ser eliminados junto às fezes. Neste caso, se as fezes, sem os devidos cuidados sanitários, forem lançadas em ambientes propícios, tais como lagos e açudes, o ciclo recomeça (**Figura 2**) (Lenzi et al., 2008).

Figura 2: Ciclo de vida das espécies de *Schistosoma*.



Fonte: Cummings; Turco, 2009.

2.1.3 Esquistossomose Experimental

O emprego de animais experimentais para o estudo da esquistossomose é bem difundido por simplificar e controlar os fenômenos envolvidos no estudo, tornando-o livre de fatores externos. Todavia, lida com inconvenientes, como modificações genéticas ao longo das gerações, o que pode levar à alteração de alguns fatores, como maior resistência à doença, por exemplo (Rose, 2001).

Dentre os animais empregados experimentalmente, os mais comumente utilizados na esquistossomose mansônica são os camundongos (*Swiss Webster*, *Mus Musculus*), pelo seu ciclo

de vida curto e semelhança imunitária e clínica com o modelo da doença em humanos. Há ainda a utilização de outros tipos de roedores (*hamsters*, marmota), primatas (chimpanzés, macacos *Rhesus*, macaco aranha) e outros mamíferos, como coelho e gambá (Lenzi et al., 2008).

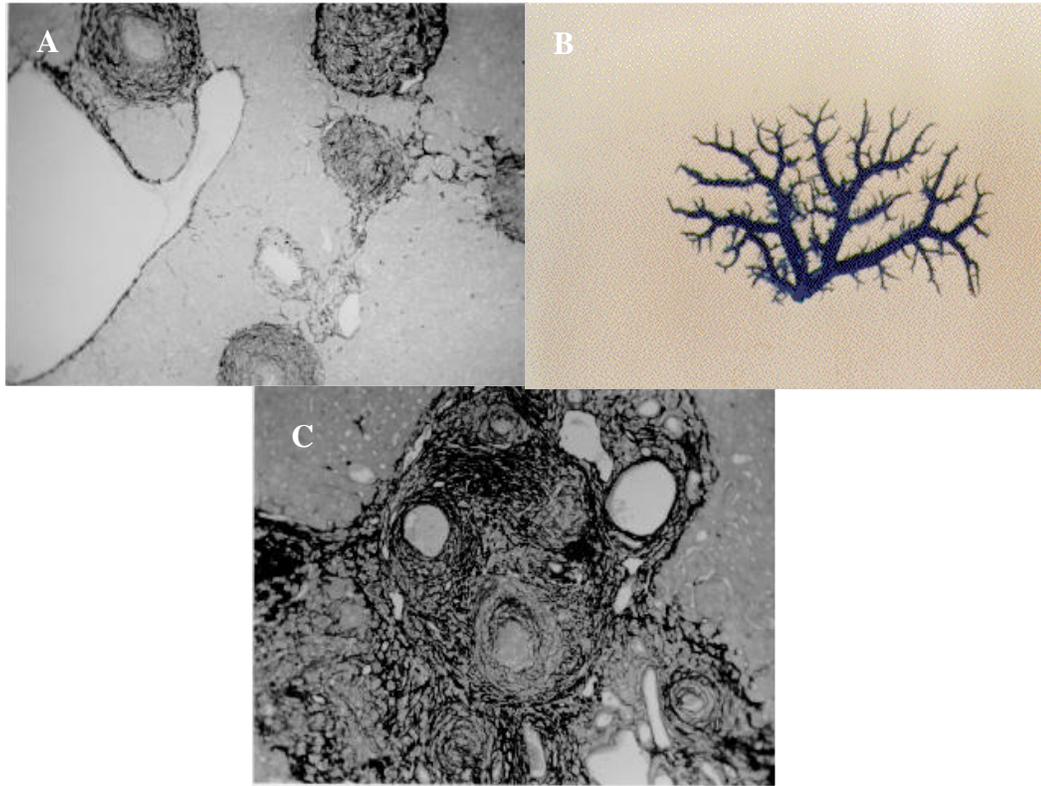
É necessário levantar considerações sobre alguns aspectos da doença em camundongos experimentais. Um único par de vermes de *Schistosoma mansoni* em modelos murinos equivale a cerca de mil pares em uma pessoa infectada (Lenzi et al, 2008), o que significa que a intensidade da infecção é extremamente alta. Além disso, a cronicidade das infecções observadas em humanos não é reproduzível para a maioria dos modelos experimentais. Isto acontece, possivelmente, pelo curto tempo de vida dos animais, e o cálculo de equivalência de idade entre humanos e camundongos é incerto (Lenzi et al., 2008). Há ainda as alterações genéticas de cepas de *S. mansoni* e dos animais, com o passar das gerações, o que pode levar a um padrão diferente de infecção (ex: alta proporção de ovos no fígado) e manifestações clínicas (Lenzi et al., 2008).

Assim como a doença em humanos, a esquistossomose experimental é uma infecção sistêmica, envolvendo órgãos frequentemente estudados, como fígado, baço, intestino, além de pulmão, pâncreas, retroperitônio, entre outros. Existem três alterações patológicas que se destacam: fibrose portal, alterações vasculares e presença de granulomas (**Figura 3**) (Bogliolo, 2016).

É importante notar que a fibrose de Symmers, observada em esquistossomose humana, não é equivalentemente reproduzível em murinos (Lenzi et al., 2008). É uma lesão representada por uma expansão fibrosa, acompanhada de lesões destrutivas e obstrutivas, com preservação do parênquima tecidual (Bogliolo, 2016). O chimpanzé é o único modelo animal capaz de reproduzir esse tipo de lesão, e o processo lesivo que acontece em camundongos é tratado como fibrose portal (Lenzi et al., 2008).

Por sua vez, as alterações vasculares decorrem da obstrução dos vasos onde são depositados os ovos do *Schistosoma*. A hipertensão portal e a formação de novos vasos são ocorrências comuns entre a doença humana e a experimental (Bogliolo, 2016). Baptista e Andrade (2005) demonstraram, *in vivo*, o estímulo de células endoteliais na área externa do granuloma na esquistossomose murina, e acreditam que a angiogênese está diretamente relacionada à fibrogênese e ao granuloma fibrótico.

Figura 3: Histopatologia em esquistossomose experimental.



Granulomas periovulares isolados, contendo abundantes fibras de colágeno e formando nódulos discretos espalhados no fígado. Método Picro-sirius-vermelho para colágeno (150X) (A); Ramo vascular do sistema portal de um rato com esquistossomose crônica (B); Fibrose portal e granulomas periovulares. Os vasos são numerosos, a maioria é pequena e representada por fendas, outras são dilatadas e engrossadas. Método Picro-sirius-vermelho para colágeno (250X) (C).

Fonte: Andrade; Silva; Souza, 1997.

2.1.4 Granuloma na Esquistossomose Experimental

Vermes adultos são incapazes de induzir danos significativos no hospedeiro. No entanto, na ocasião da morte do *Schistosoma* há liberação de enzimas líticas e aparecem lesões de necrose na parede vascular e tecidos adjacentes (Bogliolo, 2016). As reações inflamatórias mais importantes, porém, acontecem por ocasião da instalação de ovos em tecidos e vasos específicos. Ovos contendo miracídios liberam antígenos que vão levar à lesão mais significativa na esquistossomose: a inflamação granulomatosa (Guimarães Cavalcanti et al., 2015).

A reação granulomatosa é uma resposta de hipersensibilidade tardia ao antígeno solúvel do ovo (SEA), liberado pelos miracídios maduros. É constituído por uma coleção de células migrantes, organizadas de maneira compacta, que se dispõem em meio a componentes da matriz extracelular, formando uma estrutura esférica, que circunda cada ovo, individualmente (Lenzi et al., 2008). Nem a casca nem o miracídio isolado são capazes de induzir a formação de granulomas, o qual é um processo dinâmico, com mudanças de acordo com o desenvolvimento da doença (Dessein et al., 2013).

Inicialmente, a lesão é volumosa e constituída por numerosas células de defesa em todo o ovo. Com a evolução da esquistossomose, o exsudato diminui gradualmente e é substituído por tecido conjuntivo neoformado com deposição de colágeno para formação de um nódulo fibrótico (Elbaz; Esmat, 2013).

Segundo a proposta de Holland (1995), o granuloma exhibe as quatro propriedades dos sistemas complexos adaptativos: agregação, não-linearidade, fluência e diversidade. Por Agregação entende-se a interação entre moléculas homo ou heterotípicas, que permitem a célula a passar de uma fase inicial desordenada a arranjar-se em agregados selecionados. Neste processo, participam várias moléculas de adesão celular e moléculas de adesão ao substrato matricial. A Não-Linearidade relaciona-se à impossibilidade de se refazer alguma parte da lesão caso parte desta tenha sido danificada. A Fluência propõe que, embora o granuloma seja uma estrutura avascular, pode haver fluxo de células e produtos não celulares solúveis (antígenos do miracídio, por exemplo). A Diversidade refere-se à variedade de células existentes em uma lesão granulomatosa, além de variações nas moléculas de adesão e fatores de crescimento (Holland, 1995; Lenzi et al., 2008).

Ainda sobre o sistema complexo adaptativo de Holland (1995), o granuloma esquistossomótico contém três mecanismos: rotulagem, modelos internos e blocos de construção ou montagem. O mecanismo de Rotulagem está associado ao processo de Agregação, uma vez que as moléculas de adesão e seus contra-receptores comportam-se, respectivamente, como etiquetas ou rótulos, que interagem com seus receptores. O mecanismo de Modelo Interno refere-se à sequência de etapas evolutivas da lesão granulomatosa. Pode-se dizer que o granuloma tem duas fases sequenciais: uma de evolução e criação, e outra de decadência e dissolução. Por último, os Blocos de Construção ou Montagem são os componentes diretos da formação do granuloma.

Compreendem os colágenos (I, II, IV), fibronectina, laminina, proteoglicanos, fibras do sistema elástico, entre outros (Holland, 1995; Lenzi et al., 2008).

Embora o processo granulomatoso seja benéfico, por bloquear os efeitos hepatotóxicos do SEA, os danos continuados podem levar ao processo de fibrose hepática, que é um processo cicatricial (Guimarães Cavalcanti et al., 2015).

2.2 BIOMARCADORES DO *Schistosoma mansoni* E DA ESQUISTOSSOMOSE

Tanto para a vigilância quanto para o melhor tratamento de pacientes, testes diagnósticos rápidos e sensíveis para esquistossomose se fazem necessários, os quais permitem detectar a infecção logo após a exposição ao parasito e em eventuais situações de baixa carga parasitária (Silva-Moraes et al., 2014). O diagnóstico eficiente da esquistossomose está diretamente relacionado aos marcadores biológicos encontrados tanto no parasito quanto no hospedeiro.

2.2.1 Glicobiologia do *Schistosoma mansoni*

Dentre as quatro maiores classes de moléculas orgânicas, os carboidratos são os mais abundantemente encontrados na natureza, e praticamente todos os organismos possuem a capacidade de sintetizá-los e metabolizá-los. A heterogeneidade dos carboidratos em um sistema vivo é resultado de determinadas características, tais como a habilidade de diferentes tipos e números de resíduos de açúcar para formar ligações glicosídicas, as características estruturais dessas moléculas, o tipo de ligações anoméricas, a posição e a ausência ou presença de ramificações (Gorelik; Galili; Raz, 2001).

As moléculas monoméricas de carboidrato podem se juntar e formar oligossacarídeos. Estes, por sua vez, podem formar ligantes glicosídicos com proteínas e lipídios por dois principais tipos de ligação. O primeiro deles envolve a ligação de N-acetilglicosamina à cadeia lateral de asparagina e são assim chamadas N-ligantes. O segundo tipo envolve a ligação do carbono C-1 do N-acetilgalactosamina ao hidroxil da serina ou trionina e é chamado O-ligante (Gorelik; Galili; Raz, 2001).

A variabilidade estrutural dos glicanos de superfície celular permite funções diversas como sinalização, reconhecimento e adesão de moléculas. Tais glicanos estão envolvidos em papéis fisiológicos que incluem desenvolvimento embrionário, diferenciação e crescimento celular, desenvolvimento de doenças, rigidez de membrana e interação patógeno-hospedeiro. Muitos

patógenos humanos utilizam glicanos da superfície celular como receptores ou ligantes para promover adesão e infecção. Por exemplo, a *Escherichia coli* liga-se a resíduos de manose, enquanto que o vírus *influenza* a resíduos de ácido siálico (Ghazarian; Idoni; Oppenheimer, 2011).

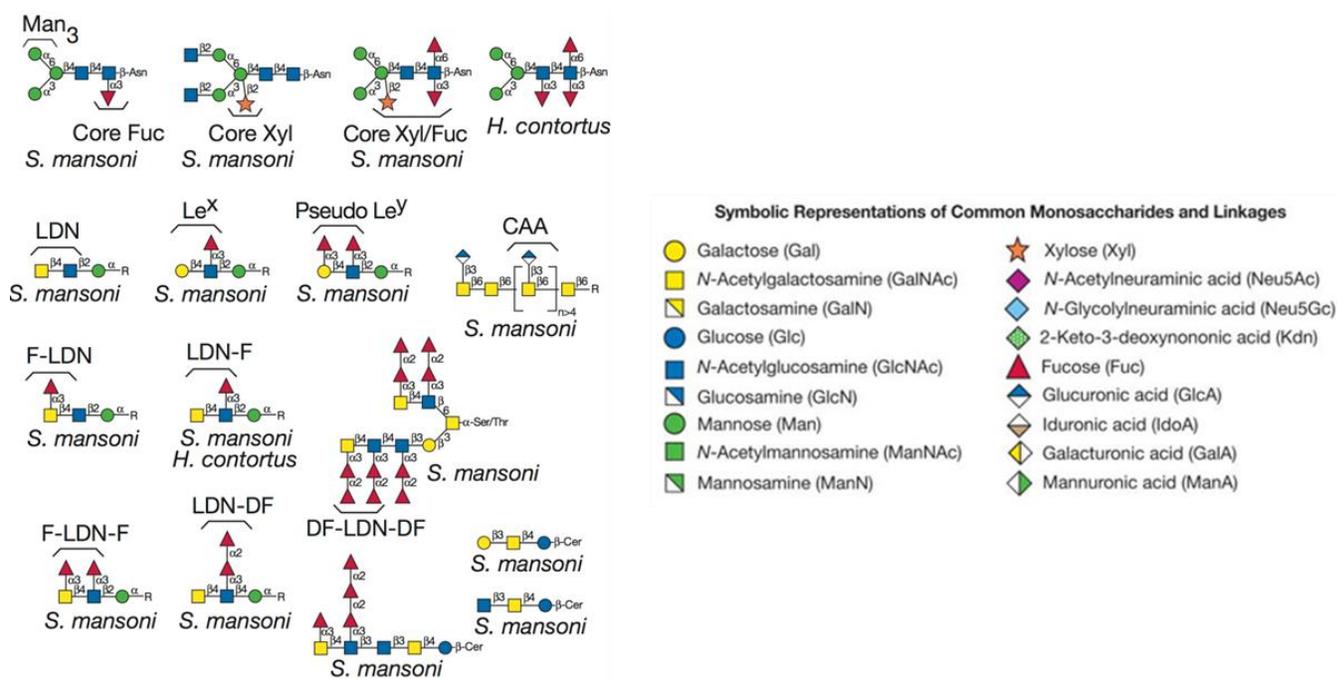
Protozoários e helmintos também sintetizam estruturas antigênicas de carboidratos e proteínas ligadoras de glicanos (GBP) como forma de invasão e para auxiliar no parasitismo. O protozoário *Trypanosoma cruzi*, por exemplo, possui um revestimento de glicanos na superfície, que possui função de proteção, permitindo ao parasita a sobrevivência em ambientes hidrolíticos, além de promover a adesão de formas evolutivas desse parasita em macrófagos do hospedeiro definitivo para posterior invasão (Cummings; Turco, 2009).

O *Schistosoma mansoni* e, particularmente seus ovos, expressam grandes quantidades de glicoproteínas, glicolipídios e ligantes de membrana circulatórios contendo antígenos fucosilados (Van Die et al., 2005). Esses glicanos possuem um importante papel na facilitação da passagem dos ovos pelos tecidos do hospedeiro, particularmente no intestino. Quando secretados pelos ovos, aprisionados nos vasos e tecidos, são altamente antigênicos e podem acelerar a resposta inflamatória (Cummings; Nyame, 1999).

Entre as estruturas antigênicas secretadas durante a invasão, estão inclusos antígenos Lewis^x (Le^x), LacdiNAc (LDN), LacdiNAc fucosilado ((LDNF) e ramificações de polifucose (**Figura 4**). Além disso, os esquistossomos são ricos em estruturas de complexo de glicanos e contêm um grande conjunto de glicoesfingolipídios e O- e N-glicanos ligados a uma grande quantidade de glicoproteínas (Nyame et al., 2003). Estudos apontam que soros de portadores de esquistossomose contêm certas quantidades de anticorpos contra Galb1-4(Fuca1-3)GlcNAc (Le^x, CD15), um epítipo de glicano existente tanto em humanos quanto nas espécies de *Schistosoma*. Esses anticorpos Le^x podem induzir respostas autoimunes no hospedeiro (Van Die et al., 2005).

A identificação de muitos desses glicoconjugados antigênicos, por meio de diversas técnicas moleculares e bioquímicas, ajudam no desenvolvimento de novos procedimentos diagnósticos para a esquistossomose. Além disso, a caracterização desses glicoconjugados e das enzimas responsáveis pela biossíntese de antígenos glicanos, juntamente com as enzimas do hospedeiro intermediário, podem ajudar na identificação de novos fármacos alvo e desenvolver vacinas baseadas em carboidratos (Cummings; Turco., 2009).

Figura 4: Estruturas de glicanos em *Schistosoma mansoni* e *Haemonchus contortus*.



Esquema representativo das estruturas. Os antígenos estão indicados pelas estruturas em parênteses: (LDN) LacdiNAc; (Lex) Lewisx; (CAA) antígeno anódico circulante; (F–) fucosilado; (DF–) difucosilado. Fonte: Varki et al., 2009.

2.2.2 Biomarcadores do Schistosoma

No que se refere aos marcadores do parasito, proteínas de superfície de seu tegumento podem ser encontrados em diversas fases evolutivas. Os biomarcadores de superfície do ovo são genericamente conhecidos como Antígenos Solúveis do Ovo (SEA), e trata-se de proteínas utilizadas em testes moleculares, porém, pouco específicas e de grande reatividade cruzada (Silva-Moraes et al., 2014).

Quanto ao *Schistosoma* adulto, as proteínas de superfície do tegumento são conhecidas como SWAP (Antígenos Solúveis do Verme Adulto), com pouca aplicabilidade diagnóstica. Porém, existe uma categoria de proteínas secretórias-excretórias que têm atividades antioxidantes

e anti-inflamatórias, as quais são liberadas pelo epitélio do *Schistosoma* ou secretadas pelo tubo digestivo do mesmo (Silva-Moraes et al., 2014). Estes antígenos, uma vez excretados pelo verme, caem na circulação do hospedeiro, e têm-se mostrado moléculas potentes de alvos de diagnóstico. São genericamente conhecidos como antígenos circulantes, cujas investigações estão centradas em, principalmente, duas glicoproteínas: o Antígeno Catódico Circulante (CCA) e o Antígeno Anódico Circulante (CAA) (Grenfell et al., 2013).

2.2.3 Antígeno Catódico Circulante

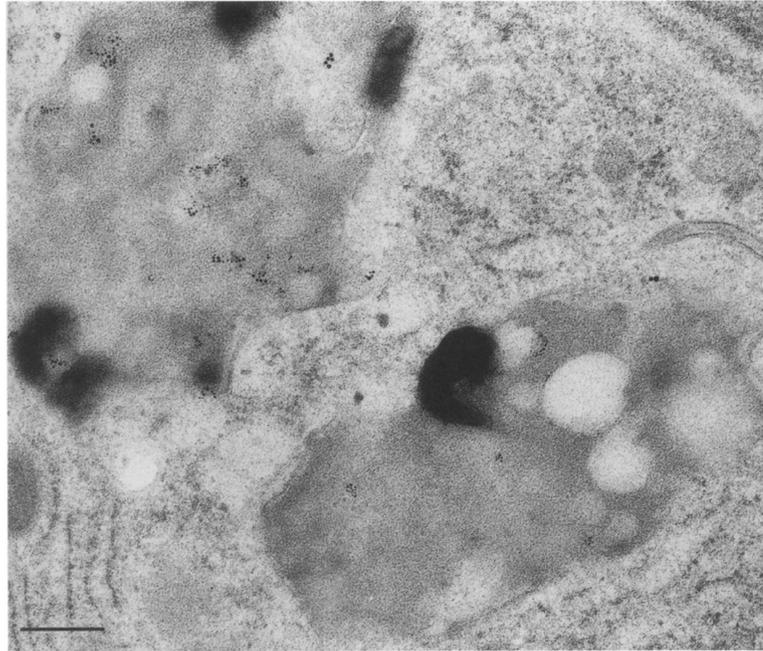
Dentre as estruturas antigênicas relatadas durante a invasão do parasito, o Antígeno Catódico Circulante se destaca entre os antígenos excretados/secretados pelo *Schistosoma* (Grenfell et al., 2013). Assim como o CAA, o CCA é uma glicoproteína carregada eletronicamente em pH neutro, proveniente do epitélio do tubo digestivo do verme adulto e regurgitados pelo parasito durante seu curso de vida no hospedeiro definitivo (Martinelli et al., 1996). Além do verme adulto, o CCA já foi isolado em esquistossômulos de *S. mansoni* (Deelder et al., 1996).

O CCA é uma proteína de peso molecular de aproximadamente 30kDa e, uma vez liberada pelo verme, pode atingir a corrente sanguínea e ser filtrada pelos glomérulos renais. O Antígeno Catódico pode, portanto, ser encontrado tanto no soro quanto na urina de infectados com esquistossomose mansônica. O desenvolvimento de ensaios para a detecção de antígenos circulantes em amostras de urina e de soro de indivíduos infectados se fundamenta na identificação e descrição de CCA como uma glicoproteína constitucional do intestino de vermes adultos. (Grenfell et al., 2013).

2.2.4 CCA em tecidos

Os primeiros trabalhos sobre CCA demonstraram, através de técnica de imunofluorescência, a presença deste antígeno em células de Kupffer no fígado murino, em três semanas de infecção (**Figura 5**) (Water et al., 1987). Através de citometria de fluxo, esta glicoproteína também foi encontrada nos glomérulos renais e no baço, além de macrófagos hepáticos, em camundongos infectados com 50 a 200 cercárias de *S. mansoni* (Deelder et al., 1985).

Figura 5: Eletromicrografia de fígado murino



Inclusões grandes de pigmentos esquistossomóticos dos antígenos ligados a partículas de ouro (5nm para CAA e 15nm para CCA).

Fonte: Water et al., 1987.

Jacobs e colaboradores (1999) observaram que camundongos previamente sensibilizados com o CCA, antes da infecção com *S. mansoni*, tiveram uma resposta granulomatosa hepática elevada quando comparados aos animais sensibilizados apenas com uma solução de 0,9% NaCl. Baseados nestas informações, os autores acreditam que os epítomos imunogênicos presentes no antígeno do verme são possíveis candidatos a mediadores positivos da modulação imunológica da doença.

2.2.5 CCA no diagnóstico da Esquistossomose

Dentre os avanços na área, os trabalhos recentes vêm mostrando a utilização do CCA no diagnóstico de esquistossomose mansônica utilizando soro e urina como materiais biológicos (Silva-Moraes et al., 2014).

Sobre as alternativas de diagnóstico, plataformas denominadas “Point-of-care” (POC), pontuados como testes rápidos para detectar o CCA, têm sido usadas em ambientes comunitários

para fins de vigilância epidemiológica (Guimarães Cavalcanti et al., 2015). A proteína catódica é utilizada como biomarcador em cassetes de testes para esquistossomose. A amostra biológica utilizada é a urina, e o princípio é semelhante aos testes rápidos para detecção do HIV e do hormônio Beta-HCG. A urina é aplicada no cassete e o CCA, uma vez estando presente na amostra, se ligará aos anticorpos imobilizados na membrana. Quando o complexo antígeno-anticorpo é formado, uma faixa de linha cor de rosa é visualizada. A segunda faixa é de controle processual, que deverá sempre aparecer para confirmar o funcionamento do cassete (**Figura 6**) (Ochodo et al., 2015).

Figura 6: Teste rápido para diagnóstico de esquistossomose



Com auxílio de uma pipeta, uma gota da amostra de urina é colocada no recipiente circular; em seguida, o tampão é colocado, e após 20 minutos aparecerão duas faixas rosa, caso a amostra seja positiva; caso contrário, apenas a faixa rosa controle irá aparecer.

Fonte: Rapidmedical Diagnosis, 2016.

Testes sorológicos para detecção de anticorpos contra o verme ou antígenos solúveis do ovo são amplamente utilizados. No entanto, estes testes têm sido muitas vezes considerados inadequados para o diagnóstico da esquistossomose, principalmente, por causa de sua aparente falta de especificidade e incapacidade de distinguir infecção ativa da infecção inativa (Smith et al., 2012). Os níveis de CCA, por sua vez, estão relacionados com presença e graus de intensidade da infecção. Em pacientes com esquistossomose aguda foram observados níveis mais baixos de

antígenos circulantes em comparação com pacientes com formas clínicas intestinais ou hepatoesplênicas, que tinham níveis semelhantes de excreção de ovos (Pereira e Silva et al., 1999).

Estudos anteriores do CCA (Deelder et al., 1992; Fernandes et al., 1988; Midzi et al., 2009) têm permitido o desenvolvimento de ensaios para a detecção de anticorpos ou antígenos circulantes em amostras de urina e de soro de indivíduos infectados. Visando driblar a baixa sensibilidade de detecção em pacientes com baixa carga parasitária, Grenfell e colaboradores (2013) utilizaram esferas magnéticas em contato com soro não diluído, e o princípio do teste baseia-se em incubação realizada em condições de rotação, permitindo um aumento da ligação antígeno-anticorpo. Os estudos foram correlacionados com métodos de ELISA (Grenfell et al., 2014) e tornaram-se um passo para diagnóstico de esquistossomose de baixa endemicidade.

O melhor entendimento da expressão de CCA durante os vários estágios agudos e crônicos da esquistossomose permitirá uma melhoria no desenvolvimento de métodos diagnósticos apurados. A utilização de procedimentos que associem precisão diagnóstica com possibilidade de quantificação, por sua vez, será importante para a acurácia de infecções de baixo grau de detecção.

2.2.6 Biomarcadores do hospedeiro

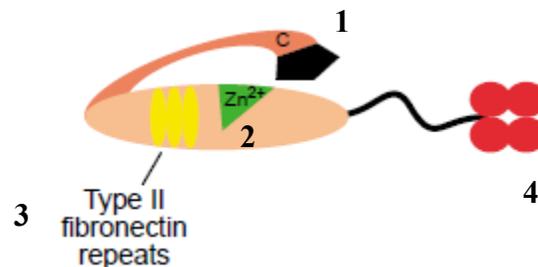
Quanto ao indivíduo infectado, o estudo de marcadores biológicos está relacionado ao aumento ou diminuição de antígenos teciduais ou séricos correspondentes às lesões que a doença irá promover. Além da alteração de imunoglobulinas e diversas citocinas, o surgimento do granuloma esquistossomótico promove alterações na composição tecidual dos órgãos afetados. A lesão granulomatosa irá desencadear uma intensa deposição de colágeno e poderá culminar em um processo fibrótico (Liang et al., 2011). Esta lesão é sinalizada pela atividade de proteínas conhecidas como Metaloproteinases de Matriz (MMPs), responsáveis pelo equilíbrio na síntese de colágeno hepático. Com o progresso da inflamação, a atividade desta proteína diminui, enquanto a produção de colágeno continua, o que culmina no aumento de tecido fibroso. Os mecanismos associados à modulação da resposta granulomatosa têm sido objeto de intensos estudos e têm importantes implicações para o controle da doença hepática induzida pela esquistossomose (Abdel Aziz et al., 2012).

Metaloproteinases

MMPs são uma família de endopeptidases Zn^{2+} - dependente e possuem participações em diversos eventos biológicos (El-Sharkaw et al., 2014). Isto deve-se à capacidade destas proteínas em influenciar o comportamento celular mediando ações como clivagem de proteínas que fazem adesão célula-célula, liberação de moléculas bioativas na superfície celular ou por clivagem de moléculas presentes na superfície celular. São importantes em todos os estágios de cicatrização (reparação e remodelação tecidual), por degradar os componentes da matriz extra-celular e sintetizar colágeno (Araújo et al., 2011a).

O estudo de MMPs começou em 1962 e hoje são conhecidos 28 tipos destas proteínas em humanos. De acordo com a especificidade estrutural e de substrato, as MMPs podem ser classificadas em: colagenases, gelatinases, estromelisinases, matrilisinas, MMPs tipo membrana, entre outras. Gelatinases (**Figura 7**) incluem, principalmente, MMP-2 e MMP-9, e sua estrutura abrange uma região de peptídeo sinal, a qual medeia cadeias nascentes de peptídeos para o citoplasma e retículo endoplasmático (Cheng et al., 2017). Ambas estas gelatinases possuem um importante papel na angiogênese fisiológica, uma vez que são essenciais na degradação de matriz de membranas celulares, durante a invasão de células endoteliais (Araújo et al., 2011a).

Figura 7: Estrutura geral de gelatinases (MMP-2 e MMP-9)



Peptídeo sinal (1); sítio de ligação ao zinco (2); repetições de fibronectina tipo II (3); um domínio hemopexina que confere especificidade ao substrato (4).

Fonte: Adaptado de Riley, GP., 2005.

MMP-2 e MMP-9 clivam, principalmente, o colágeno tipo IV, e estão envolvidas em aspectos fisiológicos, como manutenção tecidual e cicatrização, bem como desenvolvimento placentário. Além disso, ambas participam de processos patológicos, como lesões cutâneas (dermatites e psoríase) e formação de tumores sólidos. MMP-2, por exemplo, é produzida por

fibroblastos da pele, estando, assim, envolvida em lesões de pele pré-cancerosas e cancerosas, após exposição à radiação UV (Araújo et al., 2011a).

Sabe-se que, durante doenças crônicas hepáticas, a matriz extracelular sofre um processo de remodelação, levando a uma nova formação e deposição de colágeno. Estes mecanismos são coordenados por MMPs, inibidores de Metaloproteinases e fatores de crescimento. Em fígados saudáveis, há presença de colágeno dos tipos I e III, em quantidades iguais, e limitados à cápsula, em torno dos grandes vasos e na área portal. Nos espaços perisinusoidais o colágeno é pobre. Em ocasião de lesão fibrogênica, tanto o colágeno tipo I quanto o colágeno tipo III aumentam, embora o tipo I se torne mais abundante. Além disso, o colágeno fibrilar tipo IV é depositado dentro dos espaços perisinusoidais, entre as células sinusoidais endoteliais e o lado vascular dos hepatócitos (Consolo et al., 2009).

Fibrose acontece quando as respostas normais de cicatrização de feridas persistem ou não estão adequadamente reguladas, geralmente em resposta a algum tipo de lesão repetida. Por exemplo, as causas primárias da fibrose hepática incluem infecção persistente do vírus da hepatite C, infecções crônicas de helmintos *Schistosoma mansoni* e *Schistosoma japonicum*, abuso de álcool e esteatohepatites não alcoólicas (Wynn; Barron, 2010).

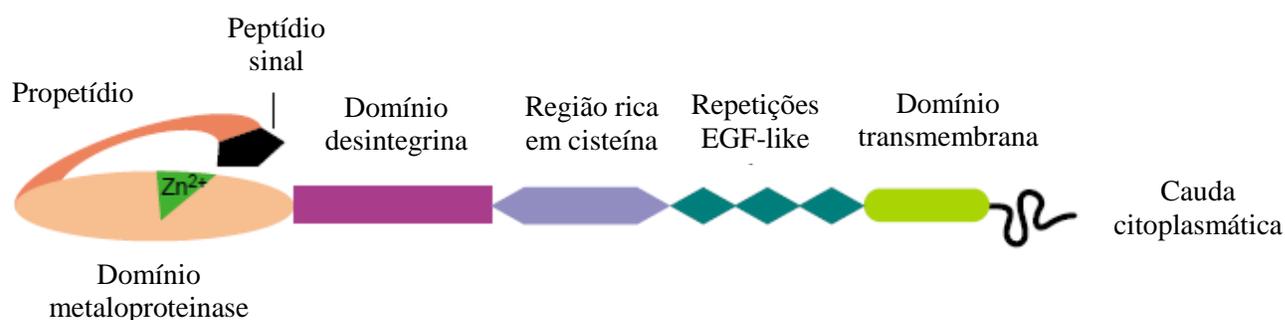
Os mecanismos que levam à fibrose hepática na esquistossomose devem ser melhor estudados. As células estelares hepáticas (HSC), por exemplo, possuem um importante papel na fibrose do fígado, e contribuem na produção de colágeno em infecções murinas e humanas de *S. mansoni* e *S. japonicum* (Anthony et al., 2013). Anthony e colaboradores (2013) demonstraram um fenótipo regulador de granuloma por HSC causado pela interação destas células com mediadores solúveis produzidos por ovos de *S. japonicum*. Isto acontece porque HSCs têm seu potencial fibrogênico desligado ao mesmo tempo que expressam níveis elevados de MMP-9 e outras citocinas, o que lhe permitiria remodelar a matriz extra-celular, atrair monócitos e outras células para próximo ao ovo.

Singh e colaboradores (2006), por sua vez, observaram expressão elevada de genes de colágeno-I, III e IV no cólon granulomatoso de camundongos infectados com *S. mansoni*, o que indica síntese contínua desses três isotipos de colágeno, mesmo no estágio crônico da infecção. Os autores observaram elevada expressão colônica de genes MMP-2, 3 e 8. A quantidade de colágeno depositada e sua conversão em tecido fibrótico compacto, por reticulação de fibras de colágeno-I, são influenciadas por MMP localmente ativa e degradativa.

Adamalisininas

ADAM (Desintegrina e Metaloproteinase) ou adamalisinina é uma família de metaloproteinases transmembrânicas zinco-dependentes envolvidas em adesão celular e proteólise, entre outros processos biológicos. Possuem um domínio rico em cisteína e responsável por atividade proteolítica, e um domínio desintegrina que interage com integrinas (**Figura 8**) (Camodeca et al., 2016).

Figura 8: Estrutura geral de ADAM (Desintegrina e Metaloproteinase)



Fonte: Adaptado de Lafleur, M.; Handsley, M; Edwards, D, 2003.

Dentre as 34 ADAMs existentes, 21 são encontradas em humanos, e destas, 13 são as que possuem atividade proteolítica. ADAMs de atividade proteolítica funcionam quebrando a região da membrana que contém substratos transmembranares, com objetivo de libertar o ectodomínio solúvel do substrato no espaço extracelular. Esta atividade lhes permite regular a disponibilidade extracelular de moléculas de sinalização autócrina e parácrina, como citocinas transmembranares, além de fatores de crescimento e seus receptores (Yang; Chanalaris; Troeberg, 2017).

Os membros da família com atividade proteolítica mais estudados são a ADAM-10 e ADAM-17, uma vez que estão envolvidas em desordens como asma, doença de Alzheimer e carcinogênese. ADAM-10, particularmente, tem sido alvo de interesse em processos alérgicos e outras doenças mediadas por resposta Th2. Dentre os substratos da ADAM-10 estão incluídos fator de necrose tumoral, fatores de crescimento epidermal, proteína precursora amilóide e um fragmento solúvel de CD23 (Camodeca et al., 2016). A molécula CD23 é o receptor IgE de baixa afinidade encontrado nas células B. IgE circulante pode exercer um autocontrole ao se ligar a CD23 em

células B, induzindo uma resposta regulatória negativa para desligar e controlar a síntese excessiva de IgE. Este mecanismo promove o aumento de ADAM-10 (Cooley; Martin; Conrad, 2015).

Reações alérgicas compartilham muitos aspectos com infecção por helmintos, incluindo respostas semelhantes de citocinas (IL-13, IL-4, IL-5), e, principalmente, uma regulação positiva de IgE. A resposta IgE em ambas tem sido associada à expressão de CD23 e, portanto, à atividade enzimática de ADAM-10 (Cooley; Martin; Conrad, 2015). O produto, neste caso, o sCD23, tem sido usado como biomarcador de diagnóstico em diferentes doenças. Em um estudo epidemiológico, indivíduos infectados com *Schistosoma mansoni* tiveram aumento nos níveis de sCD23, os quais estavam correlacionados com o aumento da intensidade da infecção, e diretamente relacionadas a IgE específico de helmintos (Black et al., 2010). Embora a atividade de ADAM-10 não tenha sido medida neste estudo, o aumento da clivagem CD23 mediada por ADAM-10 durante a infecção por helmintos pode estar induzindo essa correlação (Cooley; Martin; Conrad, 2015; Black et al., 2010).

2.3 LECTINAS

De maneira abrangente, lectinas correspondem a uma classe de proteínas, de origem não imune, caracterizadas por possuir pelo menos um domínio catalítico, que se liga reversível e especificamente a um mono ou oligossacarídeo (Bies; Lehr; Woodley, 2004). São amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em plantas, animais vertebrados e invertebrados e em microrganismos, e tem a propriedade de aglutinar eritrócitos (Garcia-Maldonado, et al., 2017). Quando em presença destes, combinam não só com açúcares da superfície dessas células, como também promovem uma ligação cruzada com outras células e sua subsequente precipitação (Sharon; Lis, 2004).

Em geral, cada molécula de lectina possui dois ou mais sítios de combinação a carboidratos, podendo ser bi ou polivalente. Baseado na sua especificidade, as lectinas que ligam monossacarídeos podem ser classificadas em cinco grupos, de acordo com o açúcar ao qual possui maior afinidade: manose, galactose/N-acetilgalactosamina, N-acetilglicosamina, fucose e ácido N-acetilneuramínico (Lis; Sharon, 1998). Certas lectinas possuem a mesma especificidade de ligação a determinados carboidratos, podendo se ligar à porção α - ou β -glicídica. Glicosídeos aromáticos ligam-se muito mais fortemente a lectinas que os alifáticos, atestando a presença de regiões hidrofóbicas fechadas para sítios de combinação a carboidratos (Sharon; Lis, 2004).

2.3.1 Concanavalina A

A Concanavalina A (Con A) foi isolada do feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) primeiramente por Summer e Howell, ocasião na qual foi observada a propriedade de hemaglutinar hemácias. É uma lectina homotetramérica, $\text{Ca}^{+2}/\text{Mn}^{+2}$ - dependente, sendo ambos os metais fundamentais para a estabilização da conformação da proteína (Vargova et al., 2016). A Con A é manose/glicose ligante e a interação com esses carboidratos acontece pela ligação dessa proteína aos metais cálcio e manganês, o que deve ocorrer em cada uma das quatro unidades monoméricas (Ma et al., 2017).

Cada monômero desta lectina é constituído por 237 resíduos de aminoácidos, os quais formam duas fitas antiparalelas, e se associa por interações polares, pontes de hidrogênio e interações eletrostáticas. A estrutura organizacional é pH dependente: para valores de pH acima de 5,5, encontra-se como tetrâmero, com as subunidades ligadas possuindo um peso molecular de aproximadamente 110.000 Da e abaixo desse valor, está no seu formato de dímero, cujo peso molecular corresponde a 55.000Da (Ballerstadt et al., 2006).

ConA é a lectina mais facilmente disponível em bases comerciais, e por este motivo, é extensivamente utilizada na biologia e na bioquímica (Ma et al., 2017). Existem muitos estudos a respeito da interação da Con A com células normais e neoplásicas, explorando seus efeitos biológicos de mitogenicidade, citotoxicidade, hepatotoxicidade e teratogenicidade (Ballerstadt et al., 2006). Sabe-se, por exemplo, que Con A possui a capacidade de agir como linfocitomitógeno e melhorar a resposta imunitária (Reis et al., 2008).

2.3.2 WGA

A lectina do germe de trigo (Wheat germ agglutinin – WGA) foi caracterizada por Nagata e Burger, em 1974, quando foi extraída de sementes de *Triticum vulgare* a partir de estudos de sedimentação e análise de aminoácidos (van Buul; Brouns, 2014). É uma proteína de massa molecular 36 kDa em pH neutro, que forma dímeros e apresenta três isoformas, denominadas WGA 1, WGA 2 e WGA 3. Preferencialmente, possui afinidade por N-acetil-glicosamina, mas também apresenta ligação a terminais de ácido N-acetil-neuramínico (Afrin; Ikai, 2014).

Quanto às suas propriedades biológicas, WGA retarda o desenvolvimento do tecido de granulação e a síntese de fibras de colágeno durante o processo de reparação tecidual em pele de ratos (Sell; Costa, 2000). Além disso, a ingestão de WGA tem efeito sobre marcadores

inflamatórios e, portanto, desempenham um papel na resposta imunológica (van Buul; Brouns, 2014). Há ainda a hipótese levantada por Jönsson e colaboradores (2005) de que o aumento da absorção de WGA na dieta afetaria o aumento de peso de camundongos por meio de resistência à leptina. A leptina é um hormônio chave na regulação da ingestão de energia e do gasto energético. A resistência a este hormônio por meio de receptores de leptina com defeito reduz os sinais de saciedade do cérebro e, com menor saciedade, leva o indivíduo à obesidade.

2.3.3 SNA

A *Sambucus nigra* Agglutinin (SNA) é uma lectina extraída do sabugueiro (*Sambucus nigra*), tendo sido primeiramente caracterizada por Broekaert, em 1984. É uma proteína de afinidade por resíduos de ácido siálico, ligados ao terminal de galactose α -2, 6 e, em menor grau α -2, 3 (Weber et al, 2015).

Apresenta cinco isoformas, de massa molecular aproximadamente 33KDa, denominadas SNA-I SNA-II, SNA-III, SNA-IV e SNA-V. Apenas SNA-I possui a forma de tetrâmero; as outras são dímeros. Estas isoformas são consideradas proteínas ribossomo-inativadoras, pois têm a capacidade de retirar um resíduo de adenina de uma região altamente conservada na subunidade maior do RNA ribossomal, interrompendo a síntese de proteínas em determinadas células (Maveyraud et al., 2009).

A SNA possui propriedades de defesa de plantas contra vírus, insetos e predadores, com papel também de armazenamento em organelas de plantas. Além disso, estas proteínas possuem um grande potencial de exploração para seres humanos, uma vez que podem atuar como agentes antivirais e inseticidas, bem como na detecção de células tumorais, através de biomarcadores e efeitos antiproliferativos (Shahidi-Noghabi et al., 2010).

2.3.4 Aplicações das Lectinas

Lectinas possuem propriedades que vão desde imunomodulação, ação antifúngica e antitumoral até inibidores de atividades da transcriptase reversa do HIV-1, podendo ser encontradas na natureza, através de extração a partir de sementes, cascas ou frutos, ou ser produzidas em laboratório através de técnicas recombinantes (Zhang et al., 2009; Lam; Ng, 2011).

Os efeitos anti-tumorais das lectinas são bem documentados na literatura, podendo atuar como drogas antineoplásicas e impedir a proliferação das células malignas. Lin e colaboradores

(2008) descobriram que a lectina da soja preta (*Glycine max*), por exemplo, impede a proliferação de células MCF7 relacionadas ao câncer de mama e células HepG2 de hepatoma. A lectina da banana Del Monte, por sua vez, retarda a proliferação das células (L1210), além de também atuar nas células do hepatoma HepG2 (Cheung; Wong; Ng, 2009).

Diversos trabalhos vêm mostrando a eficácia de lectinas em estudos contra parasitas. Cramoll 1,4 (*Cratilia mollis*), quando colocadas em meio contendo formas epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* foi capaz de reconhecer glicoconjugados na superfície dessas células, o que promoveu a aglutinação das mesmas, diminuindo sua viabilidade e proliferação (Fernandes et al., 2010). A mesma Cramoll 1,4, quando administrada em camundongos infectados com *Schistosoma mansoni*, mostrou-se eficaz como efeito anti-inflamatório, por reduzir os granulomas hepáticos provocados pela doença. Ainda, diminuiu a atividade helmíntica, reduzindo a quantidade de ovos liberados pelos vermes, quando comparado ao grupo controle (Melo et al., 2011).

A ConBr, uma lectina extraída da *Canavalia brasiliensis*, da flora brasileira e semelhante a ConA, reduziu o tamanho de lesões em camundongos BALB/c infectados por leishmaniose, além de ter estimulado a produção de IFN- γ (Barral-Neto et al., 1996). A ConBr também foi avaliada como um estimulante de células Th1 para um antígeno específico de imunização contra *Leishmania amazonensis*. Em um estudo em conjunto com mais duas lectinas, a PAA (*Pisum arvense*) e KM+ (*Artocarpus interifoliga*), observou-se uma redução no número de parasitas e uma alta resposta inflamatória (Teixeira et al., 2006).

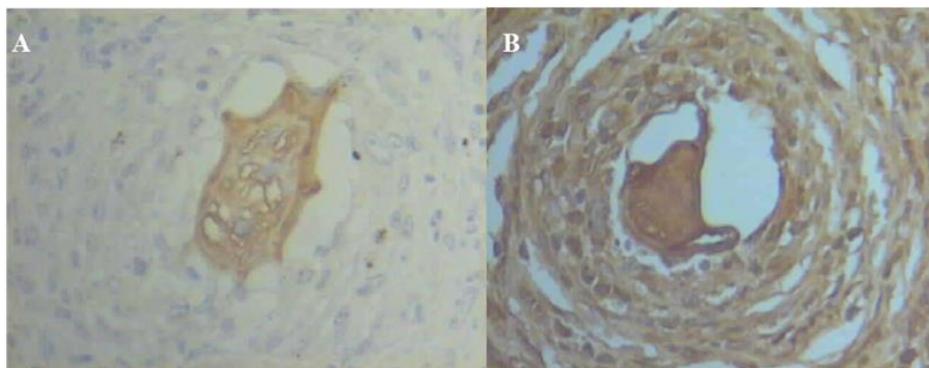
Em outro estudo utilizando a ConBr, o efeito imunomodulatório desta lectina foi observado em indivíduos com e sem infecção ativa de *S. mansoni*. Foi percebido que houve aumento na produção de IL-5, embora não tenha sido muito significativa diferença da produção entre indivíduos pertencentes ao grupo positivo e grupo negativo. Porém, o estudo indicou que a lectina testada não foi capaz de mudar a resposta Th2 típica da esquistossomose mansônica. Isto impediria sua utilização como potencial adjuvante ou agente imunomodulador em modelos experimentais da doença ou mesmo no tratamento de imunização, em contraste com os efeitos benéficos vistos na leishmaniose experimental (Reis et al., 2008).

Afora tais atividades de toxicidade, as lectinas vêm sendo empregadas também como sondas bioquímicas. Recentes trabalhos mostram a utilização de diversas lectinas comerciais em

biossensores, os quais permitem identificar proteínas em fluidos biológicos (Vargová et al., 2016; Ma et al., 2017).

O emprego de lectinas como instrumento analítico permite a identificação de glicoconjugados, devido à sua ligação específica com os mesmos. Para tanto, é necessária a conjugação dessas proteínas a substâncias reveladoras, de modo que permita a visualização da ligação lectina-carboidrato, como, por exemplo, a peroxidase, substâncias fluorescentes e quimiluminescentes (Campos et al., 2006; Ferreira et al., 2013). Com este fundamento, lectinas são capazes de detectar mudanças na glicosilação em diversos tipos de neoplasias (Brustein et al., 2012, Lima et al., 2013; Silva et al., 2014) e reconhecimento de glicoconjugados no tegumento de *Schistosoma mansoni*, além de utilizados na avaliação de granulomas hepáticos de camundongos infectados (**Figura 9**) (Melo-Junior et al., 2008; Araújo et al., 2011b).

Figura 9: Histoquímica com lectinas



Detecção de resíduos de n-acetilglicosamina (A) e galactose (B) respectivamente pelas lectinas WGA e PNA.

Fonte: Melo-Junior et al, 2008.

2.4 QUIMILUMINESCÊNCIA

Luminescência é um termo usado para descrever a emissão de luz que ocorre quando uma molécula excitada volta ao seu estado normal e libera energia na forma de luz. Essa energia pode ser fornecida por radiação magnética (fotoluminescência, também conhecida como fluorescência ou fosforescência), impacto eletrônico (catodoluminescência), calor (piroluminescência), força friccional (triboluminescência) ou cristalização (cristaloluminescência). Na quimiluminescência, a energia é produzida por uma reação química (Dodeigne; Thunus; Lejeune, 2000).

A quimiluminescência (QL), portanto, é definida como a produção de radiação eletromagnética através de uma reação química exergônica que é acompanhada pela liberação de energia maior que 45 kcal mol^{-1} . Neste processo são formados radicais que interagem e produzem intermediários instáveis que se decompõem com a formação de espécies excitadas ou são desativadas para o estado fundamental ou através da transferência de energia para moléculas luminóforas de rendimento quântico elevado (Liu; Lin; Lin, 2010).

Muito se tem dedicado a aumentar o rendimento de liberação de luz, que está diretamente relacionada com o rendimento quântico da reação. Apesar de os valores de rendimento bastante baixos (cerca de 0,01 para reações de QL), detecções de átomos podem ser alcançados quando essas marcações são utilizadas em imunoenaios ou ensaios com sondas genéticas (Roda et al., 2016).

Biossensores baseados em quimiluminescência podem explorar a medição ou a imagem latente da luz emitida por um bioquimiluminescência, termoquimiluminescência, ou quimiluminescência eletricamente gerada. Eles oferecem uma abordagem interessante, poderosa e complementar em relação a outros biossensores ópticos, com base na absorção de luz ou fotoluminescência, e transdução de princípios diferentes (Roda et al., 2012).

A principal vantagem da quimiluminescência é o seu elevado potencial de detecção. Os fótons são produzidos no escuro por uma reação química e são, portanto, eficientes e facilmente mensuráveis, sem qualquer sinal inespecífico, tal como o derivado da fonte de fotoexcitação na fotoluminescência (Roda et al., 2016).

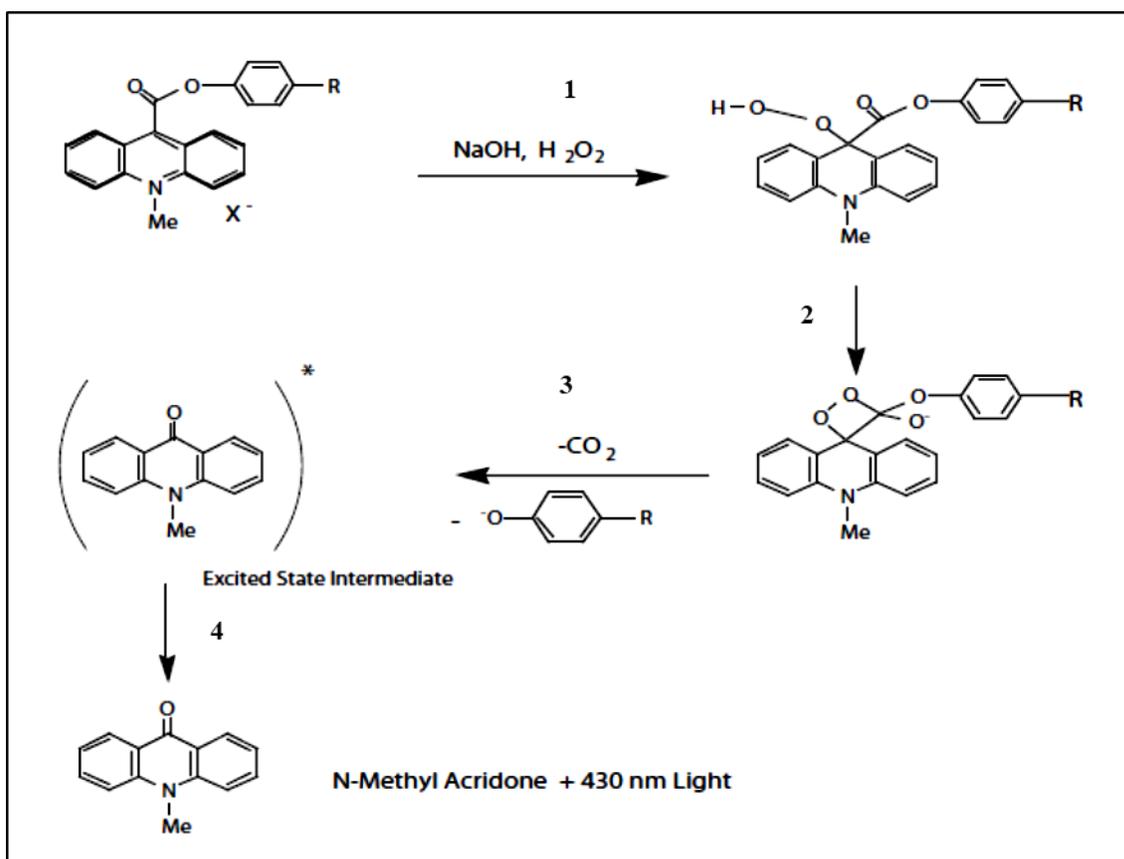
Luminol, fluoresceína, peróxido de hidrogênio, dioxetanos, coelenterazinas, derivados peroxioxálicos e derivados de acridina são atualmente utilizados em reações de QL para a detecção e a análise de diferentes tipos de compostos ou moléculas. Cada um tem suas próprias vantagens e desvantagens (Khan et al., 2014).

Os derivados de acridina possuem altos rendimentos quânticos. Altas sensibilidades são frequentemente obtidas, bem como baixos sinais de background, uma vez que catalisadores não são necessários. Porém, neste método, ocorre emissão de fótons instantaneamente, o que é considerado uma grande desvantagem, uma vez que cria problemas de medição em analisadores automáticos (Khan et al., 2014).

Em uma reação envolvendo sais de acridina, para se obter QL deve existir em solução o peróxido de hidrogênio e uma base forte (King et al., 2007). A cinética dessa reação ocorre da

seguinte forma: esses derivados, com seus anéis cíclicos, encontram-se em equilíbrio com uma base neutra não quimiluminogênica. Quando há aumento de pH, o peróxido de hidrogênio, ataca a molécula de acridina e este equilíbrio é deslocado em direção à base neutra, formando um composto intermediário. Na restauração do equilíbrio, o composto formado na reação anterior se decompõe e produz o N-metilacridona havendo a emissão de fótons de luz (**Figura 10**) (Dodeigne; Thunus; Lejeune, 2000).

Figura 10: Mecanismo de reação do éster de acridina



Equilíbrio com uma base neutra e acréscimo de Peróxido de Hidrogênio e ataque da molécula de acridina pelo H_2O_2 (1); formação de um composto intermediário (2); na restauração do equilíbrio, o composto formado na reação anterior, que está no estado excitado, se decompõe, havendo liberação de CO_2 (3) e emissão de fótons de luz (4).

Fonte: Chaichi et al., 2011.

Nos últimos anos, marcadores quimiluminescentes tiveram seu emprego aumentado significativamente na área biomédica. Dentre as aplicabilidades, além das técnicas separativas de HPLC, os sais de acridina podem ser usados em imunoenaios com ligação a estreptavidina (Hart; Taaffe, 1987), em ensaios de hibridização de ácidos nucléicos (Brown et al., 2009) e na análise de alimentos (Liu; Lin; Lin 2010). O EA vem ganhando destaque pelo emprego na histoquímica com lectinas como ferramenta para auxiliar a clínica na detecção de perfis de carboidrato (Campos et al., 2006; Brustein et al., 2012; Lima et al., 2013; Silva et al., 2014) e proteínas em tecidos tumorais (Araujo-Filho et al., 2013; Rego et al., 2013).

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Aplicar métodos histo e imunoquimiluminescentes para a identificação de carboidratos e antígenos teciduais em um modelo experimental de esquistossomose mansônica em diferentes períodos da doença.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Conjugar lectinas ConA, WGA e SNA e os anticorpos anti-CCA, anti-MMP-9, anti-MMP-2 e anti-ADAM-10 ao éster de acridina;
- b) Avaliar a expressão tecidual de carboidratos e proteínas frente às diferentes etapas de desenvolvimento do sistema ovo-granuloma hepático
- c) Avaliar histomorfometricamente a deposição das fibras colágenas nos granulomas hepáticos
- d) Classificar os granulomas hepáticos encontrados em diferentes períodos da infecção esquistossomótica

Capítulo 1

4 ARTIGO PUBLICADO**CHEMILUMINESCENT DETECTION OF GLYCOCODE ALTERATIONS IN HEPATIC GRANULOMATOUS LESIONS OF EXPERIMENTAL SCHISTOSOMIASIS.**

Artigo publicado na revista International Journal of Clinical and Experimental Pathology. Fator de Impacto: 1,706

Original Article

Chemiluminescent detection of glycode alterations in hepatic granulomatous lesions of experimental schistosomiasis

Gabriela Ayres Fragoso Nascimento¹, Luiza Rayanna Amorim de Lima¹, Adriana da Silva Andrade Pereira¹, Carmelita de Lima Bezerra Cavalcanti¹, Mário Ribeiro de Melo Junior^{1,2}, Maria Elizabeth Cavalcante Chaves^{1,3}, Luiz Bezerra de Carvalho Junior^{1,3}

¹Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), ²Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde, ³Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil

Received March 25, 2017; Accepted July 14, 2017; Epub August 1, 2017; Published August 15, 2017

Abstract: This work describes the glycophenotype evaluation of mice liver granulomatous lesion caused by infection of *Schistosoma mansoni* by using lectins labeled to acridinium ester (AE). The employed lectins were Concanavalin A (Con A), wheat germ agglutinin (WGA) and *Sambucus nigra* agglutinin (SNA) that specifically recognize α -D-glucose/mannose, N-acetyl-D-glucosamine and α -NeuNAc-[2 \rightarrow 6]-Gal/GalNAc. The chemiluminescence expressed in relative light unit (RLU) obtained from the hepatic granuloma tissues (0.25 cm²) treated with the lectins-AE was compared with control tissues. Con A-AE infected tissues showed higher statistically significant values (1,501,182 \pm 163,450 RLU) compared with the control tissue (575,280 \pm 97,216 RLU). WGA-AE results also showed higher values (189,654 \pm 20,686 RLU) than that found for the controls (82,878 \pm 24,411). SNA-AE results did not present statistical difference between granulomatous tissues (198,990 \pm 15,131) and controls (167,290 \pm 25,194). There is a significant increase in glucose/mannose residues and N-acetyl-D-glucosamine in hepatic granuloma caused by *S. mansoni*, while the sialic acid remains virtually unchanged. The understanding of schistosome glycophenotype is relevant for the development of new diagnostic methods for schistosomiasis, design of new drug targets and preparation of glycan-based vaccines.

Keywords: Carbohydrates, glycophenotype, chemiluminescence, lectins, *schistosomiasis mansoni*, acridinium ester

Capítulo 2

5 ANÁLISE QUIMILUMINESCENTE E MORFOMÉTRICA DIGITAL DO COLÁGENO INTERSTICIAL EM ESQUISTOSSOMOSE MURINA

Artigo a ser submetido na Biomarkers. Fator de Impacto: 2,006

Resumo

Este trabalho teve como objetivo descrever a expressão quimiluminescente e histomorfométrica de colágenos em lesões granulomatosas hepáticas em camundongos infectados por *Schistosoma mansoni* utilizando anticorpos ligados a éster de acridina (EA). Os anticorpos anti-MMP-2, anti-MMP-9 e anti-ADAM-10 conjugados a EA foram empregados com para reconhecimento das respectivas metaloproteinases, através da técnica quimiluminescente. Os resultados foram expressos em Unidades de Luz Relativa (ULRs). O software GIMP, por sua vez, foi utilizado na avaliação histomorfométrica do colágeno intersticial. As expressões em ULRs de MMP-9-EA e ADAM-10-2-EA mostraram-se aumentadas quando comparados os valores de ULRs tecido controle (fígado murino não infectado com esquistossomose). MMP-2-EA, por outro lado não apresentou diferença significativa. Quanto ao estudo morfométrico, a expressão de colágeno foi maior em tecidos de oito semanas de infecção. Desta forma, pode-se observar que as expressões mais significativas de metaloproteinases em granuloma hepático causado por infecção por *S. mansoni* foram das proteínas MMP-9 e ADAM-10.

Palavras-chave: Quimiluminescência. Granuloma. Metaloproteinases. Esquistossomose mansônica.

INTRODUÇÃO

Classificada como doença tropical negligenciada, a Esquistossomose afeta cerca de 240 milhões de pessoas, especialmente encontradas em países de baixo desenvolvimento sanitário (Zida et al., 2016). Além de alterações de imunoglobulinas e citocinas, a doença causa um severo grau de injúria, que culmina em mudança na composição do tecido do hospedeiro. Esta lesão – a reação granulomatosa, promove uma intensa deposição de colágeno que culmina em um processo fibrótico (Liang et al., 2011).

A lesão granulomatosa é sinalizada pela atividade de proteínas conhecidas como Metaloproteinases de Matriz (MMPs), responsáveis pelo balanço na síntese hepática de colágeno. Enquanto a inflamação se desenvolve, a atividade das Metaloproteinases diminui e a produção de colágeno continua. Mecanismos associados à modulação da resposta granulomatosa tem sido alvo de intensos estudos e têm importantes implicações no controle de lesão hepática induzida por esquistossomose (Abdel Aziz et al., 2012). MMPs podem ser mensuradas através da expressão de antígenos, por imuno-histoquímica (Gomez et al, 1999) ou pela expressão gênica, através de Reação em Cadeia da Polimerase (Anthony et al., 2013).

Dentre as técnicas disponíveis para análise de marcadores biológicos, a Quimiluminescência (QL) é uma poderosa ferramenta para a quantificação de antígenos teciduais. Por possuir baixos níveis de detecção (atomoles-zptomoles), QL mostra-se sensível no estudo das mais variadas doenças (Khan et al., 2014). A técnica quimiluminescente que utiliza éster de acridina (EA) detecta proteínas e ácidos nucleicos através da emissão de fótons. QL expõe o EA ligado ao marcador através de solução alcalina de peróxido de hidrogênio, acionada por um flash de luz. Este processo gera um dióxetano instável que forma N-Metil acridona e produz luz a um comprimento de onda de 470nm (King et al., 2007). Nosso grupo de pesquisa demonstrou a possibilidade de quantificação de antígenos teciduais em tecido maligno (Rego et al, 2013; Araujo-Filho et al, 2013) por EA-QL. A versatilidade da quimiluminescência também foi por nós demonstrada pela ligação lectinas-EA na análise do glicofenótipo de uma diversidade de neoplasias (Lima, et al., 2013, Silva et al., 2014, Brustein et al.2012).

O objetivo deste estudo foi avaliar quantitativamente a reação granulomatosa em diferentes períodos da esquistossomose. Neste trabalho foi examinado o comportamento de metaloproteinases

por meio de uma comparação quimiluminescente entre MMPs (MMP-2 e MMP-9) descritas na literatura como comumente encontrada em lesão hepática e uma adamolisina (ADAM-10). Além disso, a deposição de colágeno foi avaliada através de aspectos histopatológicos e morfométricos digitais.

METODOLOGIA

Reagentes

ADAM10 (A-20): sc-16524 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), Anti-MMP2 [6E3F8] ab86607 e Anti-MMP9 [EP1254] ab76003 (Abcam, USA) foram utilizados como anticorpos neste trabalho. O éster de acridina N-hidroxisuccinimida, coluna de filtração em gel, solução salina tamponada com citrato foi adquirido por Enzo Life Sciences (Plymouth Meeting, PA, EUA). A detecção por quimiluminescência foi realizada usando o reagente Siemens 500T (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Malvern, PA, EUA) composto por 0,5% de H₂O₂ em 0,1 N de HNO₃ e 0,25 M de NaOH. Xileno e etanol foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Todos os outros reagentes químicos utilizados foram de grau analítico.

Modelo Experimental

Camundongos fêmeas (Swiss Webster) com seis semanas de idade e pesando 30 - 35 g foram utilizados neste experimento. Os animais (n = 45) foram alojados em gaiolas (41 × 28 × 15cm) contendo maravalha estéril; dieta padrão (Presence®, Purina S.A., Recife-PE, Brasil) e água disponível *ad libitum*. A temperatura ambiente foi mantida a 25 ± 2 ° C e 12:12h ciclo claro/escuro. Trinta camundongos foram infectados individualmente pelo *Schistosoma mansoni* (cepa Belo Horizonte - BH): 50 cercárias na região abdominal sob luz artificial por pelo menos 2 horas. Os camundongos foram anestesiados por via intramuscular com cetamina: xilazina (115 mg: 10 mg por kg, respectivamente). Os animais foram eutanasiados por uma dose excessiva de anestésico de acordo com o tempo de infecção: 4, 8 e 16 semanas e seus fígados, baço e rim foram removidos com uma tesoura cirúrgica. O grupo controle (n = 15) foi submetido aos mesmos processos de estresse e eutanasiados no mesmo dia que o grupo experimental. Os protocolos experimentais estavam de acordo com os requisitos do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. (nº 23076.017619/2015-60).

Conjugação de anticorpo com Éster de Acridina (EA) e medição quimiluminescente

ADAM-10, Anti-MMP2 e Anti-MMP9 foram conjugados ao éster de acridina (DMAE-NHS) de acordo com procedimentos descritos por Enzo® Chemiluminescent Labeling kit (Catálogo N°. ADI-907-001): ADAM-10 (1 mg de proteína/mL), Anti-MMP2 (1mg de proteína /mL) e Anti-MMP9 (1 mg de proteína /mL) foram incubados com 0,3µL de solução de éster de acridina (0.1 mg diluído em 50 µL de N, N-dimetilformamida) por 30min a 25°C sob rotação constante. Os conjugados (ADAM10-EA, Anti-MMP2-EA, Anti-MMP9-EA) foram aplicados a uma coluna de filtração em gel (Enzo® Catalog No. 80-0090), previamente equilibrada com solução salina tamponada com citrato, contendo detergente a pH 5,0 e gentamicina. como conservante.

Alíquotas de 1 mL foram coletadas e seu conteúdo proteico e quimiluminescência foram, respectivamente, estabelecidos espectrofotometricamente (280 nm) e utilizando um luminômetro Modulus Single Tube 9200-001 (Turner BioSystems, EUA). Para o último procedimento, as alíquotas (100 µL contendo 100 µL de proteína) foram introduzidas em soluções de H₂O₂ a 0,5% em H₂O₂ 0,1 N (50 µL) e NaOH 0,25 M (50 µL). A intensidade de emissão de luz foi determinada como luz relativa. unidades (ULR) com um tempo de contagem de 5 segundos por amostra. As frações correspondentes aos picos de proteína e quimiluminescência foram agrupadas e usadas ao longo deste trabalho.

Histoquimiluminescência da lectina

Os tecidos foram lavados várias vezes com solução tampão fosfato 0,15 M (PBS) e todos os espécimes foram preservados em formol a 10% (solução tampão, pH 7,4) para estudo histopatológico. Os fragmentos selecionados foram submetidos a etapas de desidratação (mergulho em etanol) e diafanização (mergulho em xileno), seguido de um mergulho em parafina fundida a 60 °C.

As secções de parafina das amostras foram cortadas sequencialmente com 8 µm de profundidade cada, transferidas para lâminas de vidro, desparafinizadas em xileno (uma vez 5 min e três vezes 1 min) e reidratadas em álcoois graduados (três vezes 100% e uma vez 70% - 1 min). As lâminas foram processadas diferentemente: A lâmina A foi tradicionalmente corada com hematoxilina-eosina, enquanto a lâmina B foi processada da seguinte forma: lavada (duas vezes, 5

min de cada vez) com tampão fosfato 10mM e incubada com ADAM10-EA, anti -MMP2-EA e antiMMP9-EA por 2 h a 4°C, seguido de lavagem (três vezes 5 min) com 15 mL de PBS. A área correspondente à secção de tecido (0,25 cm²) foi cortada utilizando um molde caseiro. Em seguida, este pedaço de tecido de 0,25 cm² foi removido com um bisturi da lâmina de vidro e transferido para um tubo de teste de polipropileno contendo 50 µL de PBS. Finalmente, as ULR dos fragmentos de tecido foram analisadas como descrito acima. Medições em triplicado foram realizadas ao longo deste estudo.

Estudo Histoquímico

As lâminas para montagem histológica foram quimicamente limpas e desengorduradas com solução detergente. Após a limpeza, uma camada fina de solução de albumina foi aplicada nas lâminas para garantir a aderência e evitar o descolamento dos tecidos durante os procedimentos de coloração. Após os blocos de parafina serem submetidos a microtomia, os cortes histológicos (4 mm) foram desparafinados, hidratados e submetidos à técnica de coloração com tricrômio de Masson (MT) para mostrar a deposição de colágeno intersticial. Posteriormente, as lâminas foram desidratadas em etanol a 95%, diafanizadas em xileno e montadas com lâmina de vidro e Entellan®.

Análise Digital Morfométrica

Cinco campos foram selecionados em cada tecido, em que as imagens foram capturadas com ampliação final de 100x. O estudo histomorfométrico das imagens nas lâminas histológicas foi realizado por uma estação de trabalho composta por um sistema de câmera de vídeo CCBBW 410 (Samsung®) acoplado a um microscópio óptico (Olympus BH-2) e a um computador contendo o software MOTIC Image Plus 2.0. Foram capturados cinco campos de área de granuloma por lâmina. O parâmetro morfométrico adotado foi a distribuição da área de colágeno intersticial do granuloma (em pixels) por campo capturado na lâmina histológica pelo GIMP software - *GNU Image Manipulation Program*, versão 2.8.1.

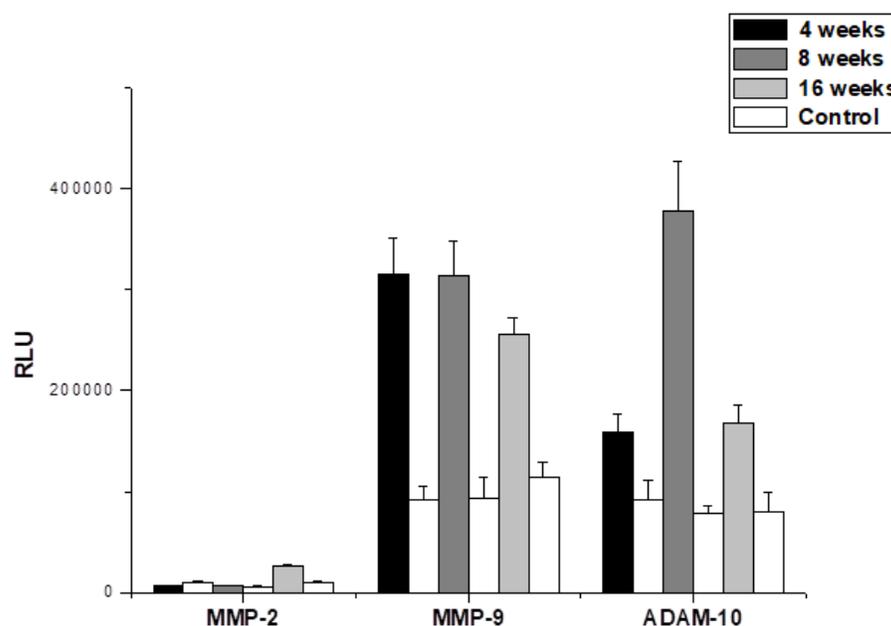
Análise estatística

O software OriginPro8 (OriginLab Corporation, One Roundhouse Plaza, Northampton, MA 01060 USA) foi utilizado para a análise estatística e os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (s.d.). As análises comparativas entre os grupos foram realizadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Análises de comparações entre tecidos infectados e controle foram realizadas usando estatística paramétrica do teste *de Mann-Whitney-Wilcoxon* e teste t de Student ($p < 0,01$) através da SigmaPlot (Califórnia, EUA).

RESULTADOS

A técnica de quimiluminescência permitiu quantificar biomarcadores nos tecidos hepáticos através da emissão de fótons. Os resultados (**Figura 1**) foram expressos por Unidades de Luz Relativa (ULR). Usando este procedimento, pudemos confrontar MMPs encontradas em lesões esquistossomóticas granulomatosas e uma adamlisina (desintegrina e metaloproteinase) pouco estudada em doenças infecciosas. Em seguida, as fibras colágenas foram analisadas nesses tecidos e quantificadas através de um Software.

Figura 11: Histoquímica quimiluminescente em tecido hepático de camundongos



Marcação quimiluminescente de metaloproteinases (MMPs) e desintegrina-e-metaloproteinase (ADAM) em tecidos hepáticos murinos infectados por esquistossomose mansônica. Três tempos de infecção estão

representados: 4, 8 e 16 semanas. A intensidade da marcação está representada por Unidades de Luz Relativa (ULRs).

Primeiramente, a MMP-2 foi avaliada em três tempos de infecção: no início da esquistossomose (4 semanas), quando não havia reação granulomatosa significativa; no pico da resposta granulomatosa (8 semanas) e no início da cronicidade da doença (16 semanas). Observou-se que 4 semanas de lesão hepática apresentam valores de ULR 6.998 ± 522 para os tecidos infectados e 9.307 ± 1.618 para o grupo controle. Para o grupo de 8 semanas, os valores de ULR foram 6.607 ± 984 para tecidos de esquistossomose e 5.506 ± 1.985 para tecidos saudáveis. Finalmente, para o grupo de 12 semanas de infecção, foram observados valores de ULR 25.779 ± 2.037 para o grupo infectado e $9.900 \pm 1,825$. Apenas 16 semanas de grupo obtiveram diferença estatística entre os tecidos controle e infectados ($p < 0,05$).

As emissões de fótons da MMP-9 também foram medidas em 4, 8 e 16 semanas de fígados infectados. Para 4 semanas de camundongos infectados, foram observados 316.128 ± 34.680 valores de ULR, enquanto o grupo controle apresentou 91.858 ± 13.142). Oito semanas de camundongos infectados apresentaram 313.822 ± 35.086 valores de ULR, enquanto o respectivo grupo controle apresentou $93.757 (\pm 20.861)$ ULR. Observou-se, para 16 semanas de camundongos, 256.394 ± 16.323 para o fígado infectado e 113.957 ± 14.432 ULR para tecidos sadios. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos controle e infectado, e entre os grupos de infecção, com exceção dos grupos 30 e 60 dias.

Também foi avaliada a expressão de ADAM 10 no grupo infectado e controle de camundongos nos três tempos de infecção. Comparações entre tecidos controle e infectados foram estatisticamente significantes ($p < 0,05$). Um grupo de quatro semanas expressou 158.943 ± 17.296 ULR para camundongos infectados e 92.639 ± 18.709 para o grupo controle. Quando analisado o grupo de 8 semanas, os tecidos hepáticos infectados apresentaram 377.378 ± 49.493 valores de ULR, enquanto o respectivo grupo controle apresentou 78.518 ± 7.110 . Finalmente, 16 semanas infectadas apresentaram 168.705 ± 16.883 ULR e 80.348 ± 18.489 ULR para o grupo não infectado. Quando os resultados entre os grupos foram analisados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$),

observou-se diferença estatística entre 4 e 8 semanas de infecção e 8 e 16 semanas de infecção. Não houve diferença significativa entre 4 e 16 semanas de infecção.

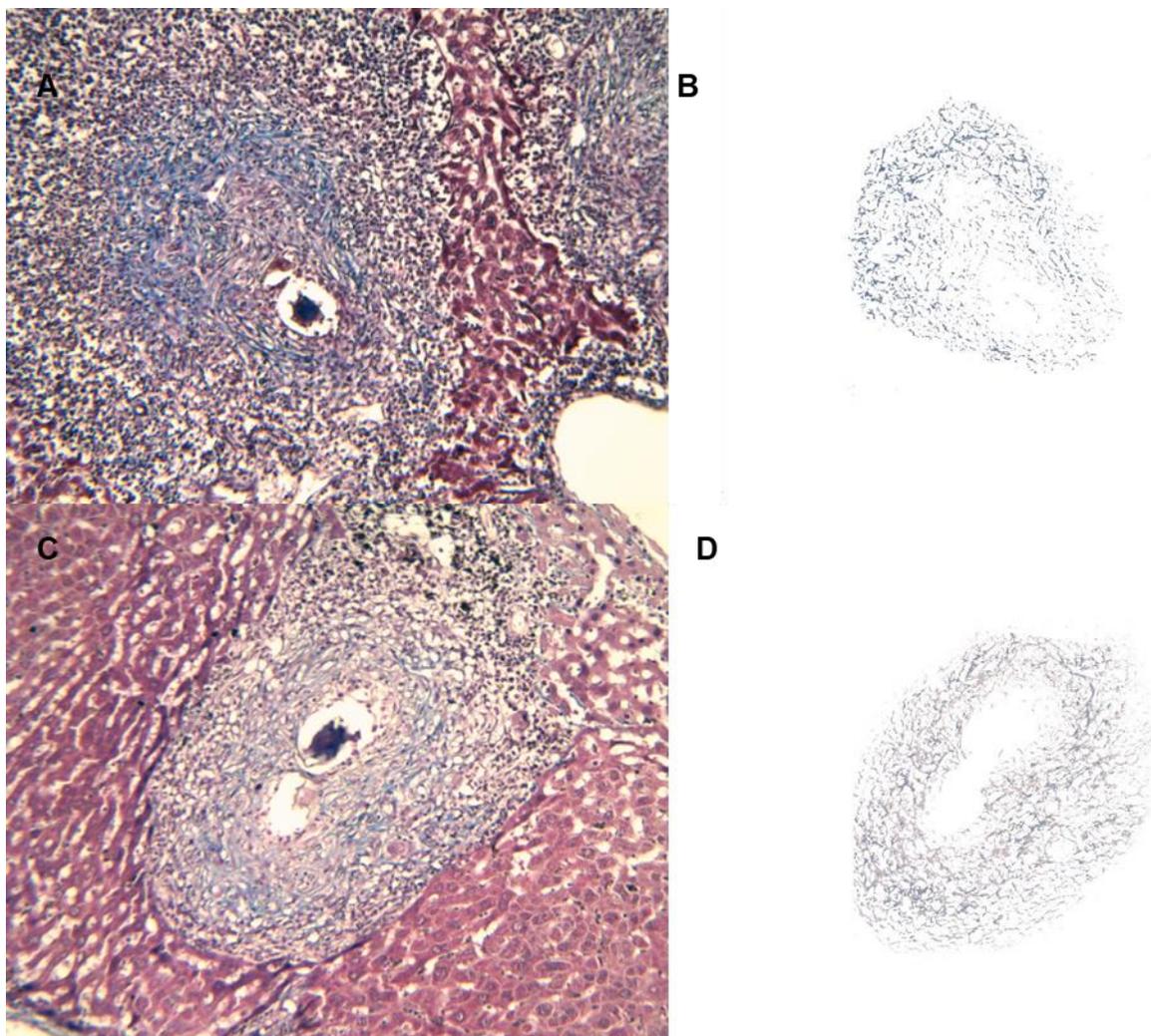
Os tecidos hepáticos também foram analisados quanto às fibras colágenas e estudo histopatológico. Através de fotomicrografias, as tonalidades de colágeno (representando azul forte e fraco) foram cortadas como áreas de interesse e a imagem resultante foi submetida à análise de histograma para quantificar a área média de colágeno intersticial por campo capturado. Não foi observada média de colágeno intersticial no grupo de 4 semanas de infecção. Por outro lado, notou-se maior área média de colágeno no fígado infectado de 8 semanas do que a encontrada em 16 semanas de infecção pelo fígado ($p < 0,05$). Estes resultados estão representados na Tabela 1. Os grupos controle (4, 8 e 16 semanas) não apresentaram densidade significativa de fibras colágenas. A Figura 2 representa um quadro original de camundongos infectados do fígado e sua respectiva morfometria e quantifica o colágeno. A tabela 2 mostra uma classificação do granuloma nos tecidos hepáticos. Apenas foram observadas lesões precoces no granuloma e não houve lesões consistentes de fibrose.

Tabela 1: Área média do colágeno intersticial

	8 semanas de infecção		16 semanas de infecção	
	Pixels	%	Pixels	%
Mínimo	26496,4	3,36	21109	2,72
Máximo	95520,2	12,22	50635,4	6,44
Média	44976,62	5,744	30804,66	3,95

Colágeno intersticial por campo histológico no fígado de camundongos infectados pelo *Schistosoma mansoni*. A análise morfométrica digital das fibras de colágeno foi realizada apenas em fígados murinos às 8 e 16 semanas de infecção. Durante o período anterior (4 semanas), não foram observadas fibras de colágeno. A comparação entre os tempos de infecção mostrou a área média de colágeno em 8 semanas maior que 16 semanas de infecção ($p < 0,05$).

Figura 12: Análise morfométrica digital de fibras de colágeno nos tecidos hepáticos de 8 e 16 semanas de infecção.



A e B representam a fotomicrografia tricrômica de Masson (8 e 16 semanas, respectivamente) e C e D representam suas respectivas análises morfométricas digitais.

Tabela 2: Classificação do granuloma hepático

	8 semanas de infecção	16 semanas de infecção
Reativo inicial	12%	4%
Exudativo	38%	22%
Exudativo-Fibrótico	42%	36%
Produtivo-Fibrótico	8%	38%

Granulomas hepáticos da esquistossomose murina foram classificados de acordo com Lenzi et al. (2008). Lesões granulomatosas foram analisadas apenas nas 8 e 16 semanas de infecção. Foram encontradas lesões nos seguintes estágios: Reagente Inicial, Exsudativo, Exsudativo-Fibrótico e Produtivo-Fibrótico. Não foram observados Granulomas no estágio involucional da lesão.

DISCUSSÃO

A clivagem de MMP-2 e MMP-9, principalmente colágeno tipo IV, está envolvida em aspectos fisiológicos, como manutenção e cicatrização de tecidos (Araújo et al., 2011). Por outro lado, ADAM (desintegrina e metaloproteinase) ou adamlisina é uma família de metaloproteinases transmembrana dependentes de zinco envolvidas na adesão e proteólise celular, entre outros processos biológicos. Elas têm um domínio rico em cisteína responsável pela atividade proteolítica e um domínio de desintegrina que interage com as integrinas (Camodeca et al., 2016).

ADAMs são metaloproteinases pouco descritas na literatura para a esquistossomose mansônica. Pouco se sabe sobre sua expressão em indivíduos infectados e como sua presença atuará na reação granulomatosa. O ADAM-10 tem sido estudado em processos alérgicos e na resposta Th2 mediada por doenças parasitárias. Entre os substratos da ADAM-10 está incluído um fragmento solúvel de CD23 (sCD23) (Camodeca et al., 2016). O CD23 é o receptor de baixa afinidade da IgE encontrado nas células B. A IgE circulante pode exercer uma ligação de auto-controle ao CD23 nas células B, induzindo uma resposta regulatória negativa a desligar e controlar a síntese excessiva de IgE. Este mecanismo promove o aumento do ADAM-10 (Cooley; Martin; Conrad, 2015).

Black et al. (2010) utilizaram a sCD23 como biomarcador da esquistossomose mansônica em uma avaliação epidemiológica. Em seu estudo, os indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni* tinham níveis aumentados de sCD23, que estavam correlacionados com o aumento da intensidade da infecção e a IgE específica para helmintos (Black et al., 2010). Embora a atividade de ADAM-10 não tenha sido medida em seu estudo, o aumento na clivagem de CD23 mediada por ADAM-10 durante a infecção por helmintos pode estar induzindo essa correlação (Cooley; Martin; Conrad, 2015; Black et al., 2010). Neste trabalho, avaliou-se a presença do próprio ADAM-10 no tecido hepático infectado. Notou-se a grande expressão de ADAM-10 no pico da resposta granulomatosa (8 semanas). Isso pode indicar a grande regulação da IgE nesse estágio da doença.

Por outro lado, a expressão de MMPs é bem abordada na literatura. Vários estudos examinaram a presença dessas proteínas em órgãos e células de mamíferos infectados (Singh et al., 2006, Yoshino et al., 2014). Ao analisar a expressão gênica de MMPs no granuloma hepático de camundongos infectados, Singh et al (2004) observaram o aumento de algumas dessas proteínas à medida que a doença progride. No entanto, eles não perceberam uma diferença significativa tanto para a MMP-2 quanto para a MMP-9, cujas expressões gênicas foram menores que as outras MMPs. Neste trabalho demonstrou-se maior acurácia, mostrando uma diferença significativa entre a infecção de 8 e 16 semanas. Além disso, também foi notada a presença dessas proteínas expressas no início da infecção (4 semanas).

Entre as proteínas expressas na reação granulomatosa, o colágeno é a mais importante. Neste trabalho, utilizou-se software de baixo custo e fácil de usar para avaliar a deposição de fibras colágenas nos tecidos de camundongos infectados. Através do software GIMP, pôde-se verificar que apenas os grupos de 8 e 16 semanas de infecção apresentaram fibras colágenas, destacadas em azul pela coloração de Tricrômio de Masson. Observou-se também deposição mais intensa de colágeno nos tecidos às 8 semanas em relação ao último grupo (16 semanas). Nos animais infectados com 4 semanas de idade, embora tivessem ovos presos no tecido hepático, as fibras de colágeno ainda não haviam sido formadas.

A avaliação tecidual pelo GIMP permitiu afirmar que a expressão das MMPs avaliadas pela imunoquimiluminescência corresponde à deposição de colágeno. As expressões de MMP-9 e ADAM-10 foram maiores às 8 semanas de infecção, o que corresponderia a intensa sinalização dessas proteínas quando o colágeno tecidual era maior. Ambas as técnicas mostram sensibilidade

para a possibilidade de quantificar os alvos em estudo. As técnicas de QL e Morfometria permitem não apenas avaliar qualitativamente o alvo estudado, mas também quantificar as proteínas de interesse e, neste caso, complementar o estudo do outro

A classificação proposta para reações granulomatosas neste trabalho foi baseada em um estudo de Lenzi et al. (2008). Esses autores classificam as lesões em lesões pré-granulomatosas (fracamente e / ou reativas e exsudativas iniciais) e granulomatosas (lesões exsudativas-produtivas, fibróticas-produtivas e fibróticas). Neste estudo, observou-se que as lesões eram características das fases iniciais do granuloma, tanto na fase pré-granulomatosa quanto no início da fase granulomatosa, em que o colágeno iniciava o processo fibrótico, mas ainda não é compacto. Os maiores valores de morfometria ocorreram nas 8 semanas de infecção, uma vez que as fibras de colágeno foram melhor estabelecidas.

Assim, o presente trabalho mostrou a eficácia da QL na quantificação de antígenos teciduais presentes no processo granulomatoso da infecção da esquistossomose. Embora a MMP-2 não tenha se mostrado significativa ao longo dos tempos analisados, a presença de MMP-9 foi elevada nos estágios iniciais do granuloma, enquanto a ADAM-10 foi elevada na fase aguda. A análise morfométrica, por sua vez, mostrou fibras colágenas presentes tanto na fase aguda quanto no início da fase crônica da doença. Foi corroborado pela análise individual dos granulomas, cujo padrão de lesão foi predominante entre exsudativo-fibrótico e fibrótico-produtivo.

REFERÊNCIAS

- Abdel Aziz MT, Atta HM, Roshdy NK, Rashed LA, Sabry D, Hassouna AA, Aboul Fotouh GI, Hasan NM, Younis RH, Chowdhury JR (2012) Amelioration of Murine *Schistosoma mansoni* Induced Liver Fibrosis by Mesenchymal Stem Cells. *J Stem Cells Regen Med.* 8(1): 28–34.
- Anthony BJ, James KR, Gobert GN, Ramm GA, McManus DP (2013) *Schistosoma japonicum* Eggs Induce a Proinflammatory, Anti-Fibrogenic Phenotype in Hepatic Stellate Cells. Fang D, PLoS ONE.;8(6) doi:10.1371/journal.pone.0068479.
- Araújo RVS, Silva FO, Melo-Júnior MR, Porto ALF. (2011) Metaloproteinases: aspectos fisiopatológicos sistêmicos e sua importância na cicatrização. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas.* 10(1): 82 – 88.
- Araújo-Filho JL, Melo-Junior MR, Beltrão EIC, de Lima LRA, Antunes CBL, de Carvalho LB (2013) Immunochemiluminescent detection of galectin-3 in tumoral tissue from prostate. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology.* 6(9):1861-1867.
- Black CL, Muok EMO, Mwinzi PMN, et al. Increases in schistosome-specific IgE and CD23+ B cells in a cohort of Kenyan children undergoing repeated treatment and reinfection with *Schistosoma mansoni*. (2010) *The Journal of infectious diseases.*202(3):399-405.
- Brustein VP, Cavalcanti CL, de Melo-Junior MR, Correia MT, Beltrão EI, Carvalho Junior LB., (2012) Chemiluminescent detection of carbohydrates in the tumoral breast diseases. *Appl Biochem Biotechnol.* 166: 268–275.
- Camodeca C, Nuti E, Tepshi L, Boero S, Tuccinardi T, Stura EA, Poggi A, Zocchi MR, Rossello A (2016) Discovery of a new selective inhibitor of A Disintegrin And Metalloprotease 10 (ADAM-10) able to reduce the shedding of NKG2D ligands in Hodgkin's lymphoma cell models *Eur J Med Chem.* 111:193-201.
- Cooley LF, Martin RK, Conrad DH (2015) A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM) 10 and 17 in Th2 Mediated Responses, *Allergic Diseases - New Insights*, Prof. Celso Pereira (Ed.), InTech, 2015.
- Gomez DE, De Lorenzo MS, Alonso DF, Andrade ZA (1999) Expression of metaloproteinases (MMP-1, MMP-2 and MMP-9) and their inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) in schistosomal portal fibrosis. *Am J Trop Med Hyg.* 61(1):9-13.

- Khan P, Idrees D, Moxley MA, Corbett JA, Ahmad F, von Figura G, Sly WS, Waheed A, Hassan MI (2014) Luminol-based chemiluminescent signals: clinical and non-clinical application and future uses. *Appl Biochem Biotechnol.* 173(2): 333-355.
- King DW, Cooper WJ, Rusak SA, Peake BM, Kiddle JJ, O'Sullivan DW, Melamed ML, Morgan CR, Theberge SM (2007) Flow Injection Analysis of H₂O₂ in Natural Waters Using Acridinium Ester Chemiluminescence: Method Development, *Analytical Chemistry*, 79: 4169-4176.
- Lenzi HL, Kimmel E, Schechtman H, Machado MP, Romanha WSR, Pacheco RG, Mariano M, Lenzi JA (1998) Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and Involution: morphogenetic and biomechanical approaches. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 93: 141-151.
- Liang YJ, Luo J, Yuan Q, Zheng D, Liu YP, Shi L, Zhou Y, Chen AL, Ren YY, Sun KY, Sun Y, Wang Y, Zhang ZS (2011) New insight into the antifibrotic effects of praziquantel on mice in infection with *Schistosoma japonicum*. *PLoS One.* 6(5).
- Lima LRA, Bezerra MF, Almeida SMV, Silva LPBG, Beltrão EIC, Carvalho Júnior LB (2013) Glycophenotype Evaluation in Cutaneous Tumors Using Lectins Labeled with Acridinium Ester. *Disease markers.* 35(3):149-154.
- Rego, M. J. B. M. Cordeiro MF, Cavalcanti Cde L, de Carvalho Junior LB, Beltrão EI (2013) Immunohistochemiluminescence detection: A quantitative tool in breast cancer HER-2 status evaluation. *Disease Markers (Print)*, 34: 373-377.
- Silva LPBG, de Almeida SMV, de Lima LRA, Bezerra CLC, Lira MMM, Silva MPC, Beltrão EIC, Carvalho Junior LB (2014) Evaluation of glycophenotype in prostatic neoplasm by chemiluminescent assay. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 7(7): 3800-3808.
- Silva AP, Mello LA, Santos ER, Paz ST, Cavalcanti CL, de Melo-Junior MR. (2016) Histopathological and Digital Morphometrical Evaluation of Uterine Leiomyoma in Brazilian Women. *Obstet Gynecol Int.* . doi: 10.1155/2016/2968410.
- Singh KP, Gerard HC, Hudson AP, Boros DL (2004) Dynamics of collagen, MMP and TIMP gene expression during the granulomatous, fibrotic process induced by *Schistosoma mansoni* eggs. *Ann Trop Med Parasitol.* 98(6):581-593.
- Singh KP, Gerard HC, Hudson AP, Boros DL (2006) Differential expression of collagen, MMP, TIMP and fibrogenic-cytokine genes in the granulomatous colon of *Schistosoma mansoni*-infected mice, *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 100 (7): 611-620.

Yoshino TP, Brown M, Wu XJ, Jackson CJ, Ocadiz-Ruiz R, Chalmers IW, Kolb M, Hokke CH, Hoffmann KF (2014) Excreted/secreted *Schistosoma mansoni* venom allergen-like 9 (SmVAL9) modulates host extracellular matrix remodelling gene expression. *Int J Parasitol.* 44(8):551-563.

Zida A, Briegel J, Kabré I, Sawadogo MP, Sangaré I, Bamba S, Yacouba A, Ouédraogo A, Yonli D, Drabo F, Traoré LK, Ouédraogo-Traoré R, Guiguemdé RT, Wacker J (2016) Epidemiological and clinical aspects of urogenital schistosomiasis in women, in Burkina Faso, West Africa. *Infect Dis Poverty.* 5(1):81 doi: 10.1186/s40249-016-0174-1.

6 PERFIL QUIMILUMINESCENTE DE ANTÍGENO CATÓDICO CIRCULANTE EM TECIDOS DE CAMUNDONGOS COM ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA

Artigo a ser submetido na revista *Molecular and Biochemical Parasitology*. Fator de Impacto: 2,536

Resumo

O Antígeno Catódico Circulante (CCA) é uma glicoproteína do metabolismo do *Schistosoma mansoni*. Neste trabalho, sua expressão foi avaliada em tecidos hepáticos, renais e esplênicos da esquistossomose murina. O éster de acridina (EA) foi conjugado a CCA (CCA-EA) e esta glicoproteína foi observada em três tempos de infecção: 30, 60 e 120 dias de infecção por técnica quimiluminescente. Os resultados foram expressos em Unidades de Luz Relativa (ULR) e foi observado o comportamento diferente de CCA entre os tecidos estudados. Valores de ULR no tecido hepático foram maiores expressos em 60 dias de infecção, enquanto no tecido renal a expressão de CCA foi maior em 30 dias de esquistossomose. A CCA em tecido esplênico apresentou maiores valores de ULR em 120 dias de esquistossomose quando comparada às ULRs de proteínas aos 30 e 60 dias. Assim, a técnica quimiluminescente mostrou-se eficiente na avaliação da expressão de CCA. Pode ser usado no soro e usado no futuro como um diagnóstico da esquistossomose mansônica.

Palavras chave: Éster de Acridina Ester, Antígeno Catódico Circulante, Esquistossomose mansônica.

O Antígeno Catódico Circulante (CCA) é uma glicoproteína de 30kDa excretada / secretada pelo *Schistosoma mansoni* durante a invasão do parasita. É regurgitado do intestino de vermes para o sistema circulatório do hospedeiro e pode ser encontrado nas primeiras semanas de infecção [1]. O CCA é uma proteína bem estabelecida usada como biomarcador na investigação da esquistossomose por kits de teste rápido [2,3]. No entanto, esses testes fornecem apenas identificação qualitativa de CCA em amostras de urina. É necessário alcançar técnicas sensíveis que permitam quantificar esses antígenos.

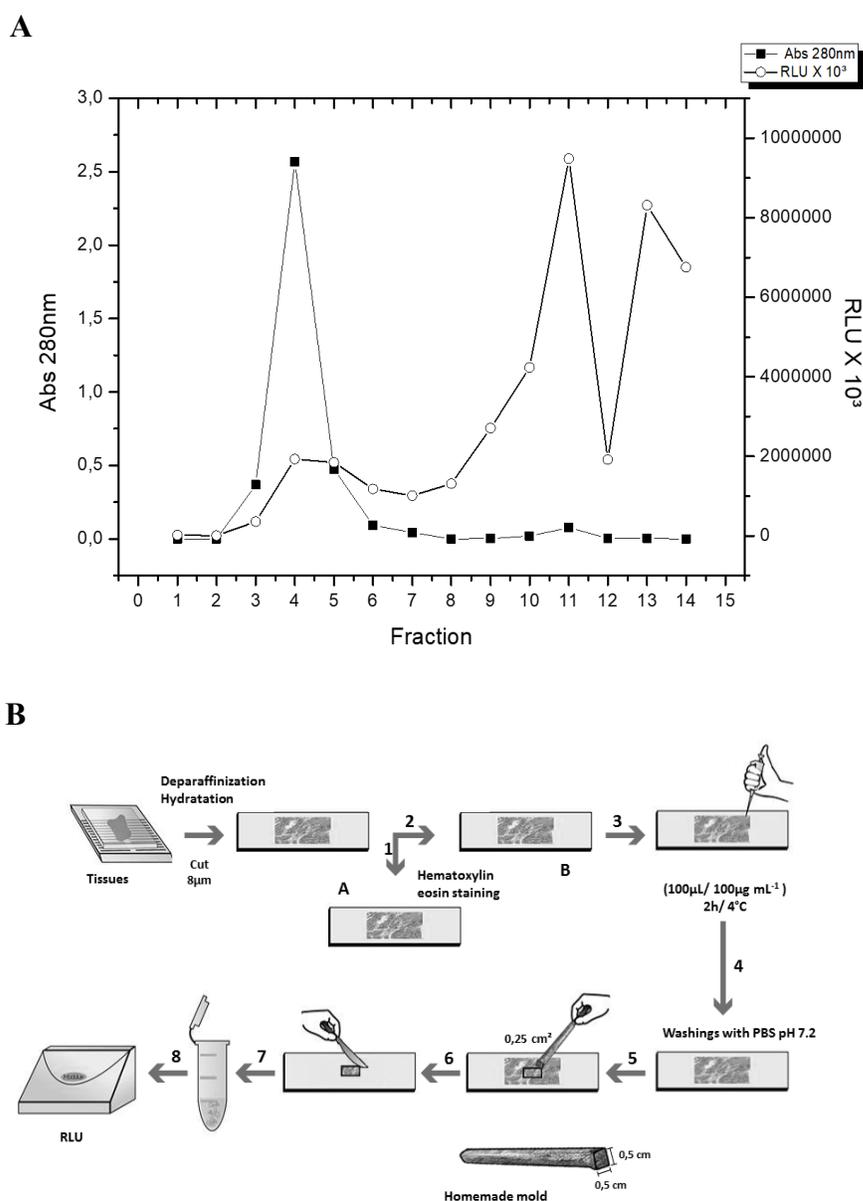
A técnica de quimiluminescência (QL) é um método analítico refinado e potente que permite verificar a presença de antígenos com baixos limites de detecção (atomole-zeptomole) [4]. Derivados de acridina são usados atualmente em reações QL para a detecção e análise de diferentes tipos de compostos ou moléculas [5]. Em nosso laboratório, o éster de acridina (EA) foi usado rotulado a um anticorpo específico para realizar uma análise quantitativa de antígenos encontrados em tecidos malignos [6,7]. Nosso grupo de pesquisa também demonstrou a versatilidade de EA marcando este composto de quimiluminescência para lectinas e avaliou o glicofenótipo de tecidos neoplásicos [8,9,10].

Este estudo é um grande passo no uso de procedimentos envolvendo acurácia diagnóstica com a possibilidade de quantificar antígenos, uma vez que é importante para a exatidão da detecção de infecção de baixo grau. A quimiluminescência permitiu identificar a presença de CCA e quantificar este antígeno nos tecidos renais, hepáticos e esplênicos de camundongos infectados por *S. mansoni* em diferentes tempos de infecção (30, 60 e 120 dias de infecção). Uma melhor compreensão sobre o comportamento da CCA em diferentes estágios da esquistossomose permitirá uma melhora no desenvolvimento de métodos diagnósticos.

Camundongos fêmeas (Swiss Webster; n = 45) foram utilizados neste estudo. Trinta camundongos foram infectados individualmente pelo *Schistosoma mansoni* (cepa Belo Horizonte - BH): 50 cercárias na região abdominal sob luz artificial por pelo menos 2 horas. Os camundongos foram sacrificados por uma dose excessiva de anestésico de acordo com o tempo de infecção: 30, 60 e 120 dias e seus fígados, baço e rim foram removidos com uma tesoura cirúrgica. O grupo controle (n = 15) foi submetido aos mesmos processos de estresse e eutanasiado no mesmo dia que o grupo experimental. Os protocolos experimentais estavam de acordo com os requisitos do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil (nº 23076.017619/2015-60).

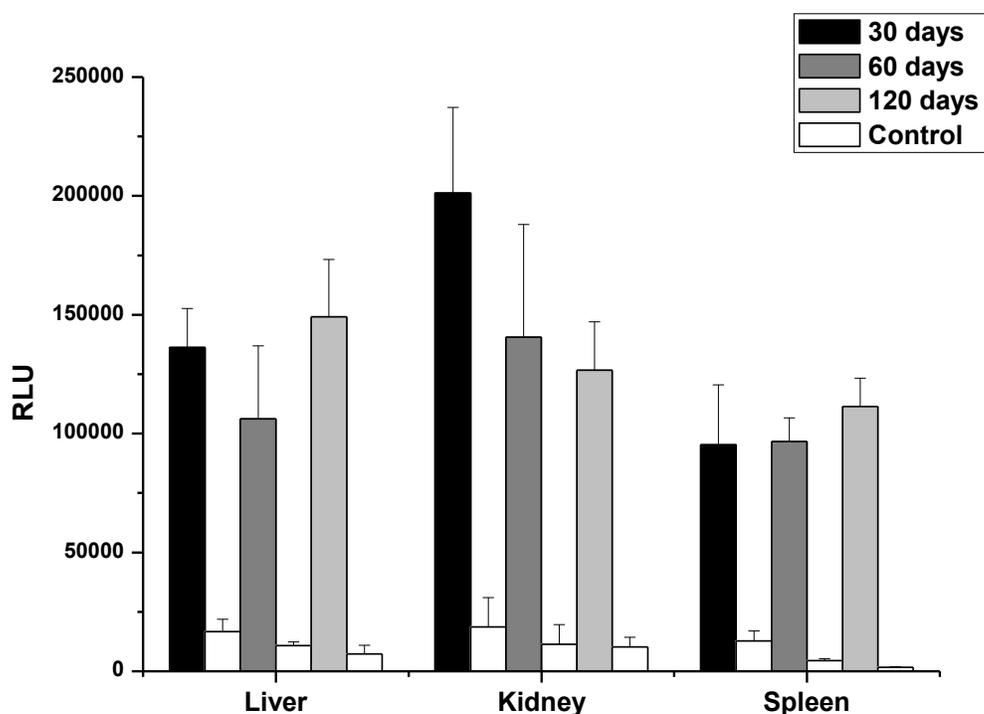
Pela técnica quimiluminescente, foi possível detectar a presença de CCA em tecidos utilizando um anticorpo policlonal marcado com AE (anti-CCA-EA); a emissão de fótons permitiu quantificar este antígeno. O anticorpo policlonal anti-Antígeno Catódico Circulante (anti-CCA) foi gentilmente fornecido pela Dra. R. F.Q. Grenfell e o grupo de pesquisa Dr. P. M. Z. Coelho. O anticorpo anti-CCA foi conjugado ao éster de acridina (DMAE-NHS) de acordo com os procedimentos descritos pelo kit Enzo® Chemiluminescent Labeling (Catálogo No. ADI-907-001) (Figura 1).

Figura 13: Conjugação de Antígeno Catódico Circulante ao éster de acridina



A intensidade de emissão de luz foi determinada como unidades de luz relativa (ULR) com um tempo de contagem de 5 segundos por amostra. As frações correspondentes aos picos de proteína e quimiluminescência foram coletadas e usadas ao longo deste trabalho. **(A)**. Os tecidos foram lavados várias vezes com solução tampão fosfato 0,15 M (PBS) e todos os espécimes foram preservados em formol a 10% (solução tampão, pH 7,4) para estudo histopatológico. Os fragmentos selecionados foram submetidos a etapas de desidratação (mergulho em etanol) e diafanização (mergulho em xileno), seguido de um mergulho em parafina fundida a 60 ° C. Este procedimento está de acordo com Silva [8]: as seções de parafina das amostras foram cortadas sequencialmente com 8 µm de profundidade cada, transferidas para lâminas de vidro, desparafinizadas em xileno (uma vez 5 min e três vezes 1 min) e reidratadas em álcoois graduados (três mergulhos 100% e uma vez 70% - 1 min cada. As lâminas foram processadas diferentemente: a lâmina A foi tradicionalmente corada com hematoxilina-eosina enquanto a lâmina B foi processada adicionalmente da seguinte forma: lavada (duas vezes, 5 minutos de cada vez) com tampão fosfato 10 mM. Em seguida, foi incubado com anti-CCA-EA (100 µL contendo 10 µg de proteína) por 2 horas a 4°C, seguido de lavagem (três vezes 5 min) com 15 mL de PBS. A área correspondente à seção de tecido (em forma de quadrado; 0,25cm²) foi cortado usando um molde caseiro. Em seguida, este pedaço de tecido de 0,25 cm² foi removido com um bisturi da lâmina de vidro e transferido para um tubo de teste de polipropileno contendo 50 µL de PBS. Finalmente, as ULR das fatias de tecido foram ensaiadas como descrito acima. Medições em triplicado foram realizadas ao longo deste estudo **(B)**.

Os resultados dos animais infectados foram comparados com camundongos não infectados e a intensidade de emissão foi determinada como Unidades de Luz Relativa (ULRs) (**Figura 2**). Todos os valores de ULR foram estatisticamente significantes quando comparados os tecidos infectados e controle ($p < 0,01$). Para os tecidos hepáticos através da emissão de fótons observou-se que aos 30 dias os valores de ULR do grupo foram de 136.290 ± 16.295 para o fígado infectado e 16.705 ± 5.221 para o controle dos camundongos, enquanto para os 60 dias de infecção o ULR foi 106.271 ± 30.627 e 10.769 ± 1.597 não infectados. Quando comparados aos 60 dias, os valores de ULR do grupo de 120 dias foram menores: 149.138 ± 24.136 para o fígado murino infectado e 7.261 ± 3.675 para o grupo controle. Quando foram comparados três grupos de infecção (teste de Tukey), observou-se diferença estatística dos valores de ULR entre 30 e 60 dias e 60 e 120 dias. Não foi observada diferença estatística entre 30 e 120 dias.

Figura 14: Ensaio de quimiluminescência

Comparações entre grupos infectados e não infectados. O diagrama confronta a emissão de Unidades de Luz Relativa (ULR) entre três tempos de infecção de tecido e seus respectivos grupos de controle. Representa camundongos de fígado, rim e baço infectados a 30, 60 e 120 dias de infecção cada. A análise estatística foi realizada pelo Software OriginPro8 (OriginLab Corporation, One Roundhouse Plaza, Northampton, MA 01060 USA) e os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (s.d.). As análises comparativas entre os grupos foram realizadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Análises de comparações entre tecidos infectados e controle foram realizadas usando estatística paramétrica do teste de Mann-Whitney-Wilcoxon e teste t de Student ($p < 0,01$) através da SigmaPlot (Califórnia, EUA).

Por outro lado, a análise do tecido renal mostrou valores mais elevados de ULRs para os tecidos do primeiro grupo de infecção: 30 dias. Para este grupo de emissão de fótons de infecção apresentou 201.209 ± 35.970 para a esquistossomose murina, enquanto que os valores de RLU foram mostrados em 18.709 ± 12.292 . Aos 60 dias, os valores de ULR do rim infectado foram de 140.552 ± 47.490 enquanto os tecidos de controle foram de 11.339 ± 8.242 . Os tecidos com 120

dias de infecção apresentaram diferença significativa entre eles e tecidos renais saudáveis, respectivamente, 126.623 ± 20.343 e 10.300 ± 4.001 . O teste de Tukey ($p < 0,05$) para comparar três grupos mostrou diferença estatística entre 30 e 120 dias de infecção, apenas.

Tecidos esplênicos também mostraram grandes diferenças significativas entre os tecidos avaliados no grupo de 30 dias. Os valores dos animais infectados foram 95.191 ± 25.339 enquanto o grupo controle foi de 12.789 ± 4.182 . Por outro lado, no grupo de 60 dias, os valores de ULR foram 96.719 ± 9.935 para animais infectados e 4.466 ± 880 para animais sadios. Os maiores valores de ULR, entre todos os grupos infectados, foram 120 dias de infecção nos tecidos esplênicos. Emissão de fótons de tecidos infectados (111.357 ± 11.925) enquanto camundongos não infectados foram 1.642 ± 257 . No entanto, quando comparados três grupos de infecção pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), não foi observada diferença estatística.

Os produtos excretados / secretados de vermes adultos de *S. mansoni* são antígenos cuja deposição nos tecidos combinados com imunoglobulinas (IgG e IgM) resultam em reações inflamatórias. Há um dano no tecido circundante denominado complexo imune (CI). O CCA é particularmente importante para ser depositado na membrana basal glomerular e, em alguns pacientes, resulta em disfunção grave [11]. Sabe-se hoje em dia que o CCA também desempenha um papel importante no mecanismo de escape do sistema imunológico pelo verme adulto. A porção glicídica da CCA promove reação cruzada de altos títulos de IgM com unidades de Lewis-X na superfície dos granulócitos. Isso pode levar à morte dessas células, por mecanismos autoimunes e pela assistência do sistema complemento. [12].

Estudos sobre o CCA em tecidos experimentais têm cerca de três décadas [13, 14]. É necessário atualizar o comportamento desse antígeno no hospedeiro, combinado com técnicas mais sensíveis. Em nosso estudo, os tempos de infecção foram decididos para observar o comportamento da CCA em três momentos diferentes da esquistossomose: na infecção precoce, no pico da fase aguda e no início da cronicidade. No tecido hepático, observamos uma expressiva rotulagem da ULR nos 60 dias de infecção. Isso possivelmente indica uma maior presença desse antígeno na fase aguda. No tecido renal, a marcação com ULR foi maior no grupo de 30 dias, o que pode significar uma maior presença de imunocomplexos na infecção inicial. O tecido esplênico não apresentou diferença significativa entre nenhum dos grupos de infecção, o que pode indicar pouca ou nenhuma variação desse antígeno durante a infecção.

A fisiologia e comportamento da CCA no organismo hospedeiro não é satisfatoriamente relatados na literatura. Sabe-se que este antígeno é suficientemente solúvel para ser liberado na urina antes mesmo que os ovos apareçam nas fezes do [15, 16]. Este teste rápido, no entanto, não é viável para amostras sorológicas. Como se sabe que esse antígeno participa do mecanismo de escape do sistema imune, o estudo experimental do CCA é um passo para o desenvolvimento de vacinas baseadas nesse antígeno, como proposto por Abden [12]. Este estudo tem um papel importante na elucidação da intensidade da infecção experimental pela esquistossomose através das lesões imunocomplexas formadas pelo CCA no organismo hospedeiro. Além de auxiliar no desenho de vacinas, a quimiluminescência neste trabalho permitiu quantificar esse antígeno no hospedeiro e avaliar o dano causado pelo imunocomplexo CCA.

REFERÊNCIAS

- [1] Grenfell, R.F.; Coelho, P.M.; Taboada, D.; De Mattos, A.C.; Davis, R.; Harn, D.A. Newly established monoclonal antibody diagnostic assays for *Schistosoma mansoni* direct detection in areas of low endemicity. *PLoS One*. Jan 31;9(1):e87777. doi: 10.1371/journal.pone.0087777. eCollection 2014.
- [2] Sanneh B, Joof E, Sanyang AM, Renneker K, Camara Y, et al. (2017) Field evaluation of a schistosome circulating cathodic antigen rapid test kit at point-of-care for mapping of schistosomiasis endemic districts in The Gambia. *PLOS ONE* 12(8): e0182003.
- [3] Ochodo EA, Gopalakrishna G, Spek B, Reitsma JB, van Lieshout L, Polman K, Lamberton P, Bossuyt PMM, Leeflang MMG. Circulating antigen tests and urine reagent strips for diagnosis of active schistosomiasis in endemic areas. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2015, Issue 3. Art. No.: CD009579. DOI: 10.1002/14651858.CD009579.pub2.
- [4] Kricka LJ. Clinical applications of chemiluminescence. *Anal Chim Acta* 2003; 500: 279-286.
- [5] Khan P, Idrees D, Moxley MA, Corbett JA, Ahmad F, von Figura G, Sly WS, Waheed A, Hassan MI. Luminol-based chemiluminescent signals: clinical and non-clinical application and future uses. *Appl Biochem Biotechnol*. 2014 May;173(2):333-55. doi: 10.1007/s12010-014-0850-1.
- [6] Araújo-Filho JL, Melo-Junior MR, Beltrão EIC, de Lima LRA, Antunes CBL, de Carvalho LB. Immunochemiluminescent detection of galectin-3 in tumoral tissue from prostate. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2013;6(9):1861-1867.

- [7] de Melo Rêgo MJ, Cordeiro MF, Cavalcanti Cde L, de Carvalho Junior LB, Beltrão EI. Immunohistochemiluminescence Detection: A Quantitative Tool in Breast Cancer HER-2 Status Evaluation, *Disease Markers*, vol. 34, no. 5, pp. 373-377, 2013. doi:10.3233/DMA-130981
- [8] Silva LPBG, Almeida SMV, Lima LRA, Cavalcanti CLB, de Melo Lira MM, Silva MPC, Beltrão EIC, Carvalho Júnior LB. Evaluation of glyco-phenotype in prostatic neoplasm by chemiluminescent assay. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014; 7(7):3800-3808.
- [9] Lima LR, Bezerra MF, Almeida SM, Silva LP, Beltrão EI, Carvalho Júnior LB. Glyco-phenotype Evaluation in Cutaneous Tumors Using Lectins Labeled with Acridinium Ester. *Disease Markers*, vol. 35, no. 3, Article ID 787130, 6 pages, 2013. doi:10.1155/2013/787130
- [10] Brustein, V.P., Cavalcanti, C.L.B., de Melo-Junior, M.R. et al. *Appl Biochem Biotechnol* (2012) 166: 268. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9422-9>
- [11] Neves, D. P. *Parasitologia Humana*. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2004.
- [12] Abdeen, S.H. Manipulation of the Immune Evasive Properties of Circulating Cathodic Antigen Induces Protective Immunity against Schistosomiasis *Mansoni* in C57BL/6 Mice. *Egypt J Immunol*. 17(2):91-103, 2010.
- [13] Deelder AM, el-Dosoky I, Van Marck EA, Qian ZL. Immunofluorescent localization of *Schistosoma mansoni* circulating cathodic antigen in tissues of infected mice using monoclonal antibody. *Z Parasitenkd*. 1985;71(3):317-23.
- [14] de Water R.; Van Marck, E.A.; Fransen, J.A.; Deelder, A.M. Ultrastructural localization of the circulating anodic antigen and the circulating cathodic antigen in the liver of mice infected with *Schistosoma mansoni*: a sequential study. *Exp Parasitol*. V.64 (3), p.499-509, 1987.
- [15] Silveira, A. M. S., Evaluation of the CCA Immuno-Chromatographic Test to Diagnose *Schistosoma mansoni* in Minas Gerais State, Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(1), 2016.
- [16] Kittur N, Castleman JD, Campbell CH, King CH, Colley DG. Comparison of *Schistosoma mansoni* Prevalence and Intensity of Infection, as Determined by the Circulating Cathodic Antigen Urine Assay or by the Kato-Katz Fecal Assay: A Systematic Review. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2016;94(3):605-610. doi:10.4269/ajtmh.15-0725

Conclusão

7 CONCLUSÃO

As lectinas ConA, WGA e SNA e os anticorpos anti-CCA, MMP-9, MMP-2 e ADAM-10 foram propriamente conjugadas ao éster de acridina.

Quando utilizado quimiluminescência de lectinas, as expressões de glicose/manose e N-Acetilglicosamina estavam elevadas, quando comparadas ao grupo controle, enquanto que a expressão de ácido neuramínico permaneceu virtualmente inalterada.

Em imunoquimiluminescência de collagenases, MMP-2 mostrou-se reduzida e estatisticamente insignificante. MMP-9 apresentou maior RLU para 30 e 60 dias de infecção, enquanto ADAM-10 foi melhor expresso em 60 dias de infecção, quando contraposto os outros tempos da doença.

Na avaliação de CCA, os valores de RLU em tecido hepático foram mais bem expressos em 60 dias de infecção, enquanto que no tecido renal, a expressão da proteína esteve maior em 30 dias da doença. CCA em tecido esplênico, porém, teve maiores valores de RLU em 120 dias de esquistossomose quando comparados a RLU desta proteína em 30 e 60 dias.

Foi observado que a expressão do colágeno tecidual esteve maior em 8 semanas de infecção quando comparada a 16 semanas de esquistossomose. Nestes mesmos tecidos foram observados granulomas do tipo Reativo Inicial, Exudativo, Exudativo-Fibrótico e Produtivo-Fibrótico. Houve predominância de granulomas Exudativos em 8 semanas de infecção, enquanto em 16 semanas prevaleceu granulomas Produtivo-Fibróticos.

REFERÊNCIAS

- ABDEL AZIZ, M.T. *et al.* Amelioration of Murine *Schistosoma mansoni* Induced Liver Fibrosis by Mesenchymal Stem Cells. *J Stem Cells Regen Med.* 8(1): 28–34, 2012.
- AFRIN, R.; IKAI, A. Subunit unbinding mechanics of dimeric wheat germ agglutinin (WGA) studied by atomic force microscopy, *FEBS Letters* 588, 4472–4477, 2014.
- ANDRADE, Z.A.; SILVA, L.M.; de SOUZA, M.M. An Experimental Approach to the Pathogenesis of "Pipestem" Fibrosis (Symmers' Fibrosis of the Liver). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, v. 92 (5), p. 699-706, 1997.
- ANTHONY, B.J. *et al.* *Schistosoma japonicum* Eggs Induce a Proinflammatory, Anti-Fibrogenic Phenotype in Hepatic Stellate Cells, *PLoS One.* 8(6), 2013.
- ARAÚJO, R.V.S. *et al.* "Metaloproteinases: aspectos fisiopatológicos sistêmicos e sua importância na cicatrização." *Revista de Ciências Médicas e Biológicas* v.10(1), p.82-88, 2011a.
- ARAÚJO, R.V.S *et al.* Evaluation of the antischistosomal activity of sulfated α -D-glucan from the lichen *Ramalina celastri* free and encapsulated into liposomes. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 44(4), p.311-318, 2011b.
- ARAÚJO-FILHO, J.L. S. *et al.* Immunochemiluminescent detection of galectin-3 in tumoral tissue from prostate. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, v. 9, p. 1861-1867, 2013.
- BALLERSTADT, R. *et al.* Concanavalin A for in vivo glucose sensing: A biotoxicity review. *Biosensors and Bioelectronics*, v.22, p.275–284, 2006.
- BAPTISTA, A; ANDRADE, Z.A. Angiogenesis and schistosomal granuloma formation. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, v. 100 (2), p. 183-185, 2005.
- BARBOSA, V. S. *et al.* Spatial distribution of schistosomiasis and geohelminthiasis cases in the rural areas of Pernambuco, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 45(5), p. 633-638, 2012.
- BARBOSA, V.S. *et al.* First report of schistosomiasis on Serrambi beach, Ipojuca, State of Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop.*, v.48(6), p.780-782, 2015.
- BARRAL-NETTO, M. *et al.* In vivo protective effect of the lectin from *Canavalia brasiliensis* on BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. *Acta Tropica* v.60, p.237–250, 1996.
- BIES, C.; LEHR, C.M.; WOODLEY, J.F. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. *Advanced Drug Delivery*, v.56, p.425– 435, 2004.

BLACK C.L. *et al.* Increases in levels of schistosome-specific immunoglobulin E and CD23(+) B cells in a cohort of Kenyan children undergoing repeated treatment and reinfection with *Schistosoma mansoni*. *J Infect Dis*; v. 202(3), p.399-405, 2010.

BOGLIOLO, L.; BRASILEIRO FILHO, G. *Patologia*. 9ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Esquistossomose Mansônica In_____ Guia de Vigilância Epidemiológica, Ministério da Saúde, v.10, p.24, 2011.

BROWN, R.C.*et al.* Development and application of a novel acridinium ester for use as a chemiluminescent emitter in nucleic acid hybridisation assays using chemiluminescence quenching. *Organic & Biomolecular Chemistry*, v. 7, p. 386–394, 2009.

BRUSTEIN, V.P *et al.* Chemiluminescent Detection of Carbohydrates in the Tumoral Breast Diseases. *Appl Biochemical and Biotechnology*, v.166, p.268–275, 2012.

CAMODECA, C. *et al.* Discovery of a new selective inhibitor of A Disintegrin And Metalloprotease 10 (ADAM-10) able to reduce the shedding of NKG2D ligands in Hodgkin's lymphoma cell models *Eur J Med Chem*. 111:193-201, 2016.

CAMPOS, L.M. *et al.* Acridinium ester conjugated to lectin as chemiluminescent histochemistry marker. *Biomarkers*, v.11(5), p.480-484, 2006.

CHAICHI, M. J. *et al.* The Study of Chemiluminescence of Acridinium Ester in Presence of Rhodamin B as a Fluorescer. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering* v. 30, p.89-96, 2011.

CHENG, Z. *et al.* MMP-2 and 9 in Chronic Kidney Disease *Int J Mol Sci*. 18(4), 2017.

CHEUNG, A.H.; WONG, J.H.; NG, T.B. *Musa acuminata* (Del Monte banana) lectin is a fructose-binding lectin with cytokine-inducing activity. *Phytomedicine*, v.16 p.594–600, 2009.

COELHO, P.M.Z. *et al.* Transmission control of schistosomiasis mansoni by introduction of a resistant lineage of *Biomphalaria tenagophila* in areas where transmission is maintained by this species. *Acta Tropica*, v. 108, p. 245-248, 2008.

COLLEY, D.G. *et al.* Human schistosomiasis. *Lancet*. V. 28; p.2253-2264, 2014.

CONSOLO, M. *et al.* Matrix metalloproteinases and their inhibitors as markers of inflammation and fibrosis in chronic liver disease (Review) *International Journal of Molecular Medicine* 24: 143-152, 2009.

COOLEY, L.F.; MARTIN, R.K.; CONRAD, D.H. A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM) 10 and 17 in Th2 Mediated Responses, Allergic Diseases - New Insights, Prof. Celso Pereira (Ed.), InTech, 2015.

CUMMINGS, R.; TURCO, S. Parasitic Infections. In: Varki A. *et al.* Essentials of Glycobiology Chapter 40 Published on line, 2009.

CUMMINGS, R.D.; NYAME, A.K. Schistosome glycoconjugates. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1455, p.363-374, 1999.

DEELDER, A.M. Diagnostic markers in schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; v.87 (5), p.125-127, 1992.

DEELDER, A.M. *et al.* Immunofluorescent localization of *Schistosoma mansoni* circulating cathodic antigen in tissues of infected mice using monoclonal antibody. *Zeitschrift fur Parasitenkunde*, v. 71, p. 317-323, 1985.

DEELDER, A.M. *et al.* Schistosoma: analysis of monoclonal antibodies reactive with the circulating antigens CAA and CCA. *Parasitology*. v.112 (1), p.21-35, 1996.

DESSEIN, A. *et al.* Genetic analysis of human predisposition to hepatosplenic disease caused by schistosomes reveals the crucial role of connective tissue growth factor in rapid progression to severe hepatic fibrosis. *Pathol Biol (Paris)*. V. 61(1), p.3-10, 2013.

DODEIGNE, C.; THUNUS, L.; LEJEUNE, R. Chemiluminescence as diagnostic tool. A review *Talanta*, v.51, p.415-439, 2000.

ELBAZ, T., ESMAT G. Hepatic and intestinal schistosomiasis *Journal of Advanced Research*, v 4(5), p. 445-452, 2013.

EL-SHARKAWI, K. *et al.* The biochemical value of urinary metalloproteinases 3 and 9 in diagnosis and prognosis of bladder cancer in Egypt *J Biomed Sci*.21:72, 2014.

FERNANDES, M. *et al.* Detection of circulating polysaccharide antigen of *Schistosoma mansoni* in hamster sera by crossed immunoelectrophoresis. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, v. 30, n. 2, p. 72-78, 1988.

FERNANDES, M.P. *et al.* Mechanism of *Trypanosoma cruzi* death induced by *Cratylia mollis* seed lectin *Journal of Bioenergy and Biomembrane*, v.42, p. 69-78, 2010.

FERREIRA, S.A. *et al.* Sialic acid differential expression in non-melanoma skin cancer biopsies *Medical Molecular Morphology*, 2013.

GARCIA-MALDONADO, E. *et al.* Molecular and functional characterization of a glycosylated Galactose- Binding lectin from *Mytilus californianus* *Fish & Shellfish Immunology* 66, 564e574, 2017.

GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S. B. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta Histochemica*, v. 113, p. 236-254, 2011.

GONÇALVES, F. *et al.* Esquistossomose Aguda, de caráter episódico, na Ilha de Itamaracá, Estado de Pernambuco. *Cad Saude Publica*; v.7, p.424-425, 1991.

GORELIK, E.; GALILI, U.; RAZ, A. On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* v.20, p.245–277, 2001.

GRENFELL, R. *et al.* New approaches with different types of circulating cathodic antigen for the diagnosis of patients with low *Schistosoma mansoni* load. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2054, 2013.

GRENFELL, R.F. *et al.* Newly established monoclonal antibody diagnostic assays for *Schistosoma mansoni* direct detection in areas of low endemicity. *PLoS One.* Jan 31;9(1): e87777. doi: 10.1371/journal.pone.0087777. eCollection 2014.

GUIMARÃES, M.T., *et al.* Estudo comparativo da expressão de carboidratos no sistema ovogranuloma hepático na esquistossomose humana e experimental. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 67(1): 59-63, 2008.

GUIMARÃES CAVALCANTI, M. *et al.* Schistosomiasis in areas of low endemicity: a new era in diagnosis. *Trends Parasitol;* v.29: p.75-82, 2013.

GUIMARÃES CAVALCANTI, M. *et al.* Schistosomiasis: Clinical management of liver disease. *Clinical Liver Disease,* 6: 59–62. doi:10.1002/cld.495, 2015.

HART, R.S.; TAAFFE, LR. The use of acridinium ester-labelled streptavidin in immunoassays. *Journal of Immunological Methods,* v.101, p.91-96, 1987.

HOLLAND, J.H. *Hidden Order: how adaptation builds complexity.* Cambridge: Perseus Books, 1995.

JACOBS, W. *et al.* Schistosomal granuloma modulation. I. *Schistosoma mansoni* worm antigens CAA and CCA prime egg- antigen-induced hepatic granuloma formation. *Parasitol Res.* 85(1):7-13, 1999.

JÖNSSON, T., *et al.* Agrarian diet and diseases of affluence do evolutionary novel dietary lectins cause leptin resistance? *BMC Endocr. Disord.* 5 (10) 2005.

KATZ, N. A descoberta da esquistossomose no Brasil. *Gazeta Médica da Bahia,* v 78 (2), p. 123-125, 2008.

KATZ, N.; ALMEIDA, K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. *Ciências e Cultura.* v 55(1) p. 38-41, 2003.

KHAN, P. *et al.* Luminol-based chemiluminescent signals: clinical and non-clinical application and future uses. *Appl Biochem Biotechnol.* V.173(2), p.333-355, 2014.

KING, D.W. *et al.* Flow Injection Analysis of H₂O₂ in Natural Waters Using Acridinium Ester Chemiluminescence: Method Development, *Analytical Chemistry,* v.79, p. 4169-4176, 2007.

- KRICKA, L.J. Clinical applications of chemiluminescence *Analytica Chimica Acta*, v.500, p.279–286, 2003.
- LAFLEUR, M.; HANDSLEY, M; EDWARDS, D. Metalloproteinases and their inhibitors in angiogenesis. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 5(23), 1-39, 2003.
- LAM, SK.; NG, T.B. Lectins: production and practical applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 89, p.45–55, 2011.
- LENZI, H.L. *et al.* Migração e Desenvolvimento de *Schistosoma mansoni* no Hospedeiro Definitivo. In: CARVALHO, O.S.; COELHO, P.M.Z.; LENZI, H.L. *Schistosoma mansoni* & Esquistossomose: uma visao multidisciplinar. Rio de Janeiro: Fiocruz. p. 87-146, 2008.
- LIANG, Y.J. *et al.* New insight into the antifibrotic effects of praziquantel on mice in infection with *Schistosoma japonicum*. *PLoS One*. 6(5), 2011.
- LIMA, L.R.A; *et al.* Glycophenotype evaluation in cutaneous tumors using lectins labeled with acridinium ester. *Disease markers*, v. 35 (3), p.149–154, 2013.
- LIN, P.; YE, X.; NG, T. Purification of melibiose-binding lectins from two cultivars of Chinese black soybeans. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* v.40, p. 1029–1038, 2008.
- LIS, H, SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Chemical Reviews*, v. 98, p. 637-674, 1998.
- LIU, M.; LIN, Z.; LIN, JM. A review on applications of chemiluminescence detection in food analysis *Analytica Chimica Acta*, v. 670, p. 1–10, 2010.
- MA, X. *et al.* Construction of a Concanavalin A electrochemical sensor base on anovel sandwich capture mode. *Sensors and Actuators B* 248, 201–206, 2017.
- MARTINELLI, R.; ROCHA, H. Revisão/Atualização em Nefrologia Clínica: Envolvimento glomerular na esquistossomose mansônica. *J Bras Nefrol.* ;18: 279–282, 1996.
- MAVEYRAUD, L. *et al.* Structural basis for sugar recognition, including the Tn carcinoma antigen, by the lectin SNA-II from *Sambucus nigra*. *Proteins*, v.75, p.89–103, 2009.
- MAZIGO, H.D. *et al.* Epidemiology and interactions of Human Immunodeficiency Virus - 1 and *Schistosoma mansoni* in sub-Saharan Africa. *Infect Dis Poverty*. Jan 24;2(1):2. doi: 10.1186/2049-9957-2-2, 2013.
- MELO, C.M.L *et al.* Potential effects of Cramoll 1,4 lectin on murine Schistosomiasis mansoni *Acta Tropica*, v. 118, p. 152–158, 2011.
- MELO-JÚNIOR, M.R. *et al.* Carbohydrates Detection in the Hepatic Egg – Granuloma System Using Lectin Histochemistry *International Journal of Morphology*, v. 26(4), p. 967-972, 2008.

MIDZI, N. *et al.* Use of circulating cathodic antigen strips for the diagnosis of urinary schistosomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* v.103 (1), p.45-51, 2009.

NYAME, A.K. *et al.* Immunity to schistosomiasis: glycans are potential antigenic targets for immune intervention *Experimental Parasitology*, v.104, p.1–13, 2003.

OCHODO, E.A. *et al.* Circulating antigen tests and urine reagent strips for diagnosis of active schistosomiasis in endemic areas (Review). *The Cochrane Library*, 3: 1- 265, 2015.

PEREIRA e SILVA, Y. *et al.* Circulating antigens levels in diferente clinical forms of the *Schistosoma mansoni* infection *Mem Inst Oswaldo Cruz.* V. 94(1):83-86, 1999.

PERNAMBUCO. Secretaria de Saúde de Pernambuco. Disponível em <<http://portal.saude.pe.gov.br/programas-e-acoos/control-de-doencas/projeto-sanar-doencas-negligenciadas/>> Acesso em 06 setembro 2016.

RAPIDMEDICAL DIAGNOSIS. Disponível em: <http://www.rapid-diagnostics.com/products.html>. Acessado em 08 setembro 2016.

REGO, M. J. B. M. *et al.* Immunohistochemiluminescence detection: A quantitative tool in breast cancer HER-2 status evaluation. *Disease Markers (Print)*, v. 34, p. 373-377, 2013.

REIS, E.A.G. *et al.* Potential immunomodulatory effects of plant lectins in *Schistosoma mansoni* Infection. *Acta Tropica*, v. 108, p. 160–165, 2008.

RILEY, G.P. Chronic tendon pathology: Molecular basis and therapeutic implications. *Expert Reviews in Molecular Medicine* · Vol. 7; Issue 5; 2005.

RODA, A. *et al.* Dioxetane-Doped Silica Nanoparticles as Ultrasensitive Reagentless Thermochemiluminescent Labels for Bioanalytics. *Anal. Chem.* 84, 9913–9919, 2012.

RODA, A. *et al.* Progress in chemical luminescence-based biosensors: A critical review. *Biosens Bioelectron.* v.76,p.164-179, 2016.

ROSE, S. *Trayectorias de Vida-biologia, Libertad y Determinismo.* Barcelona: Granica, 2001.

SELL, A.M.; COSTA, C.P. Atividades biológicas das lectinas PHA, WGA, jacalina e artocarpina. *Acta Scientiarum*, v.22(2), p. 297-303, 2000.

SHAHIDI-NOGHABI, S. *et al.* Exposure of insect midgut cells to *Sambucus nigra* L. agglutinins I and II causes cell death via caspase-dependent apoptosis. *Journal of Insect Physiology*, v.56, p.1101-1107, 2010.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules *Glycobiology* v, 14 (11), p. 53R–62R, 2004.

SILVA L.P., *et al.* Evaluation of glyco-phenotype in prostatic neoplasm by chemiluminescent assay. *Int J Clin Exp Pathol*, 7: 3800-3808, 2014.

SILVA-MORAES, V. *et al.* Biomarkers for schistosomiasis: Towards an integrative view of the search for an effective diagnosis. *Acta Trop.*132:75-9. 2014.

SINGH, K. P. *et al.* Differential expression of collagen, MMP, TIMP and fibrogenic-cytokine genes in the granulomatous colon of *Schistosoma mansoni*-infected mice, *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 100:7, 611-620, 2006.

SMITH, H. *et al.* Comparison of *Schistosoma mansoni* Soluble Cercarial Antigens and Soluble Egg Antigens for Serodiagnosing Schistosome Infections. *PLoS Neglected Tropical Diseases.*:6(9):e1815. doi:10.1371/journal.pntd.0001815, 2012.

TEIXEIRA, C.R. *et al.* Potential of KM+ lectin in immunization against *Leishmania amazonensis* infection. *Vaccine*, p.24, v. 3001–3008, 2006.

VAN BUUL, V.; BROUNS, F.J.P.H. Health effects of wheat lectins: A review. *Journal of Cereal Science* 59, 112e117, 2014.

VAN DIE, I. *et al.* Interaction of schistosome glycans with the host immune system. *Glycobiology and Medicine*, v. 564, p. 9-19, 2005.

VARGOVÁ, V. *et al.* Electrochemical sensing of concanavalin A and ovalbumin interaction in solution *Analytica Chimica Acta*, 935 97e103, 2016.

VARKI, A. *et al.* Essentials of Glycobiology Published on line, 2009.

WATER, R. *et al.* Ultrastructural localization of the circulating anodic antigen and the circulating cathodic antigen in the liver of mice infected with *Schistosoma mansoni*: a sequential study. *Exp Parasitol.* V.64 (3), p.499-509, 1987.

WEBER, A. Development of a lectin binding assay to differentiate between recombinant and endogenous proteins in pharmacokinetic studies of protein-biopharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 108, 21–28, 2015.

WYNN, T.A.; BARRON, L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis *Semin Liver Dis.* V.30(3), p.245-57, 2010.

YANG, C.Y.; CHANALARIS, A.; TROEBERG, L. ADAMTS and ADAM metalloproteinases in osteoarthritis - looking beyond the 'usual suspects'. *Osteoarthritis Cartilage.* V.25(7), p.1000-1009, 2017.

ZHANG, G.Q. *et al.* A novel lectin with antiproliferative activity from the medicinal mushroom *Pholiota adiposa*. *Acta Biochim Pol*, v.56, p. 415–421, 2009.

ZIDA, A. *et al.* Epidemiological and clinical aspects of urogenital schistosomiasis in women, in Burkina Faso, West Africa. *Infect Dis Poverty*. doi: 10.1186/s40249-016-0174-1. Sep 1;5(1):81.2016.

ANEXO – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
Fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 31 de julho de 2015

Ofício nº 76/15

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: Prof.º Luiz Bezerra de Carvalho Junior
Departamento de Bioquímica
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.017619/2015-60

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado **“Otimização de Técnicas Imunoquimiluminescentes para Investigação de Antígenos Teciduais, Séricos e Urinários em Esquistossomose Mansônica”**.

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA- UFPE); Animal; Camundongo isogênico; Nº total de animais; 60.

Atenciosamente,

 Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
UFPE SIAPE 1801584