



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Bioquímica e Imunologia

Caracterização Funcional e Imunológica da proteína
SmKI-1*, um inibidor de serino protease do *Schistosoma
mansoni

Suellen Batistoni de Moraes

Sergio Costa Oliveira

Orientador

Bárbara de Castro Pimentel Figueiredo

Co-orientadora

Belo Horizonte

Janeiro de 2018

SUELLEN BATISTONI DE MORAIS

Caracterização Funcional e Imunológica da proteína *SmKI-1*, um inibidor de serino protease do *Schistosoma mansoni*

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais pelo Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia como requisito parcial para obtenção do título de doutor.

Orientador: Sergio Costa Oliveira

Co-orientadora: Bárbara C.Pimentel Figueiredo

Belo Horizonte/2018



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE SUELLEN BATISTONI DE MORAIS.
 Aos vinte e dois dias do mês de janeiro de 2018 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Caracterização Funcional e Imunológica da proteína SmKI-1 um inibidor de serino protease de *Schistosoma mansoni*", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Sérgio Costa Oliveira, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Gustavo Batista de Menezes (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Vicente Martins (Universidade de Brasília), aprovada; Dr. Ricardo Toshio Fujiwara (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Carlos Delfin Chavez Olortegui (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Bárbara de Castro Pimentel Figueiredo - Coorientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Sérgio Costa Oliveira - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

APROVADA
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 22 de janeiro de 2018.


 Dr. Gustavo Batista de Menezes (UFMG)



 Dr. Vicente Martins (Universidade de Brasília)


 Dr. Ricardo Toshio Fujiwara (UFMG)


 Dr. Carlos Delfin Chavez Olortegui (UFMG)


 Dra. Bárbara de Castro Pimentel Figueiredo - Coorientador (UFMG)


 Dr. Sérgio Costa Oliveira - Orientador (UFMG)


 Prof^a Leda Quercia Vieira
 Coordenadora do Curso de Pós Graduação
 em Bioquímica e Imunologia
 ICB - UFMG

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela permissão de chegar até aqui! Ele é quem guia meu caminho! Agradeço imensamente ao meu Orientador, Professor Sergio Costa, que me concedeu a oportunidade de desenvolver esse trabalho em seu laboratório. Obrigada pelos ensinamentos científicos e profissionais ao longo de 9 anos de convivência.

A minha co-orientadora, Bárbara, quero deixar mais que registrado a minha admiração e gratidão! Começamos colegas de pós-graduação que faziam disciplinas juntas, com o tempo companheiras de bancada e de experimentos. Os anos de convivência nos aproximaram muito, e naturalmente se tornou uma orientadora para mim. Mesmo quando você estava nos EUA quase que semanalmente conversávamos por telefone sobre como nossas pesquisas andavam, me incentivava cada vez mais questionar e aprofundar dentro do meu alvo de trabalho. Você teve grande importância no desenvolvimento dessa tese. Porque se eu chegasse propondo um diferente modelo, sempre me incentivava a investigar. Essa parceria se estendeu e não ficou apenas presa ao lab. Bárbara e Guilherme são grandes amigos, meus padrinhos e também meus afilhados queridos!

Agradeço meus companheiros do grupo *Schisto* que a cada dia me ensinam mais! Vocês são os grandes responsáveis por essa vitória! Primeiramente os integrantes mais antigos que não estão atualmente dividindo a bancada comigo, mas me auxiliaram muito. Professores, Vicente e Carina o meu sincero agradecimento! Aos meus queridos amigos, Natan e Fábio, obrigada por trabalharem arduamente na execução de inúmeros experimentos, pelas discussões de trabalho que só me fizeram aprender mais, pela ajuda nos seminários e, claro, pelos momentos de descontração tornando o ambiente de trabalho sempre agradável! Um agradecimento especial também aos mais recentes integrantes do grupo, Cláudia, Rodrigo e Enrico que também contribuíram para o desenvolvimento desta tese. Por último, mas não menos importante, agradeço ao Rodrigo (uma vez *Schisto*, sempre um *Schisto*), que esteve e está ao meu lado nessa jornada desde o mestrado. Nós aprendemos muito trabalhando e quebrando a cabeça no dia a dia do lab. Hoje seu companheirismo vai além dos experimentos e discussões de artigos. Mesmo não sendo mais aluno do lab você esteve me incentivando, me acompanhando em experimentos, sejam aqueles tarde da noite ou mesmo me levando para UFMG quando precisava madrugar. Enfim, não tenho palavras para expressar minha gratidão, por toda a ajuda e principalmente pelo carinho e paciência de sempre! Te Amo!

Agradeço ao professor Gustavo que desde a primeira reunião se dispôs a ajudar com o que fosse necessário para a execução dos experimentos envolvendo uso de APAP. Deu-me total liberdade em seu laboratório e assim conheci sua aluna Débora. Uma super companheira que ouviu cada ideia que eu tinha e juntas delineamos diversos experimentos. Débora muito obrigada por seu comprometimento e profissionalismo. Outra professora que preciso agradecer é a Angélica e seus alunos Marcella e David, pela grande contribuição no modelo de Artrite. Também agradeço a professora Mariana que com toda sua experiência nos trouxe grandes contribuições com suas análises de bioinformática e estrutural da *SmKI*. Agradeço a professora Rafaela pela contribuição nas análises de acoplamento molecular.

Sem minha amada família não cumpriria mais essa etapa! Meus pais, Erivaldo e Marta, e irmãs, Ana e Marty, são os responsáveis por muitas das escolhas que fiz até hoje. Muito Obrigada pelo apoio e confiança que sempre dedicaram a mim. Eu quero poder sempre retribuir vocês! Também quero agradecer a mais nova integrante da família a Célia, uma pessoa incrível que me acolheu no princípio do Doutorado, e que esteve disposta a me ouvir quando chegava em casa ao final de um dia cheio, muitas vezes frustrantes por resultados nem sempre positivos. Muito obrigada pelo companheirismo!

Agradeço a todos meus familiares pela paciência que tiveram comigo nos encontros e festinhas ao longo desses anos. Sei que vocês sofreram comigo falando de proteína recombinante, camundongos, ELISAs, microscopias, westerns blots que não deram certo... Que iria chegar mais tarde porque tinha que repetir o experimento. Muito Obrigada a todos! Especial as minhas tias Miriam e Dorcas, que me receberam por um período na casa delas. E também meus Avós Queridos que me propiciaram em alguns momentos um refúgio para relaxar!

Agradeço a todos os colegas de laboratório pelos anos de convivência e que sempre estiveram à disposição para ajudar. Tornando o ambiente de trabalho sempre agradável! Vocês também contribuíram para este trabalho! Fábio Vitarelli, Júlia, Daiane, Pri, Marco T., Sandra, Ilma, Yuri, Fernanda e Érica. E a todos Ex-Lidianos que me ensinaram muito! Muito Obrigada!

Agradeço a todos os amigos e colegas que tenho no departamento e aos professores e funcionários desta instituição que também contribuíram para meu desenvolvimento. E a todas as agências financiadoras do governo.

Aos meus amigos que em alguns momentos não pude dedicar minha inteira atenção, agradeço pela paciência e apoio! Vocês são muito importantes na minha vida!

Resumo

O *Schistosoma mansoni* é um dos principais parasitos causadores da esquistossomose, uma das principais infecções helmínticas que acometem humanos em termos de morbidade e mortalidade no mundo. As estratégias atuais de controle da esquistossomose são principalmente baseadas em quimioterapia, mas o desenvolvimento de uma vacina contra esta doença parasitária contribuiria para uma diminuição do espectro e da transmissão da doença. No que diz respeito aos candidatos vacinais, foram avaliados numerosos genes que codificam proteínas de *S. mansoni* que são expressos na interface parasito/hospedeiro. Entre as moléculas mais promissoras estão às proteínas presentes no tegumento e no trato digestivo do parasito. Embora, a esquistossomose represente um grande problema de saúde pública nos países endêmicos, evidencia-se que o *S. mansoni* reduz as respostas inflamatórias em outras doenças. Felizmente, o controle das respostas inflamatórias se estende aos antígenos derivados de patógenos, levando-nos a estudar um inibidor de protease do tipo Kunitz de *S. mansoni* (*SmKI-1*), localizado na fase larval e adulta do parasito como uma molécula capaz de regular diferentes modelos de doenças inflamatórias e também como candidato a vacina antiesquistossomose. Primeiramente determinou-se que a *SmKI-1* recombinante (r) e o seu domínio Kunitz, mas não a região C-terminal, possuem atividade inibitória contra a tripsina e a elastase neutrofílica. Para compreender melhor a base molecular da inibição da elastase pela *SmKI-1*, análises moleculares por *Docking* também foram conduzidas. Os resultados de ancoragem sugeriram um bloqueio completo do sítio ativo da elastase neutrofílica pelo domínio Kunitz da *SmKI-1*. Além disso, r*SmKI-1* inibiu marcadamente a capacidade da elastase neutrofílica de matar esquistossômulos. Para investigar ainda mais o papel da *SmKI-1* no parasito, desenhou-se siRNA específico para o *knock-down* do gene da *SmKI-1* em *S. mansoni*. A supressão do gene *SmKI-1* no estágio larval de *S. mansoni* possuiu um forte impacto no desenvolvimento do parasito *in vitro* e *in vivo*. Para determinar a capacidade da *SmKI-1* em interferir na migração e função dos neutrófilos, avaliou-se o potencial anti-inflamatório da molécula *SmKI-1* em diferentes modelos murinos de doenças inflamatórias. Lesão no fígado mediada por acetaminofeno (APAP) em animais tratados com *SmKI-1* apresentaram redução significativa no recrutamento de neutrófilos e atividade de elastase. No modelo de gota induzida por urato monossódico (MSU), esta proteína reduziu a o acúmulo de neutrófilos, a secreção de IL-1 β , a hipernocicepção e a patologia da doença. Finalmente, demonstramos a capacidade da *SmKI-1* em inibir eventos iniciais que desencadeiam o recrutamento de neutrófilos na cavidade pleural de camundongos em resposta à carragenina e também apresentamos algumas evidências de que a *SmKI-1* não afeta a migração de outras células imunes além dos neutrófilos. Também avaliamos o potencial da *SmKI-1* como vacina

recombinante. A imunização de camundongos com rSmKI-1, formulada com adjuvante de Freund, induz uma resposta do tipo Th1, como IFN- γ e TNF- α , detectados no sobrenadante de esplenócitos cultivados *in vitro*. O efeito protetor conferido pela vacinação com rSmKI-1 foi demonstrado por redução de 51% na carga de parasitos adultos, redução de 36% no número de ovos por grama de tecido hepático, redução de 31% no número de granulomas e redução de 33% no área de granulomas do fígado. Em conclusão, SmKI-1 é uma proteína chave na sobrevivência de *S. mansoni* e tem a capacidade de inibir a função de neutrófilos como uma molécula terapêutica promissora contra doenças inflamatórias. Além disso, nossos dados demonstraram que SmKI-1 é um candidato potencial para sua utilização em uma vacina para o controle da esquistossomose

Abstract

Schistosoma mansoni is one of the main agents of schistosomiasis, which is the most important human helminthic infection in terms of global morbidity and mortality. Current schistosomiasis control strategies are mainly based on chemotherapy, but the development of a vaccine against this parasitic disease would contribute to a long-lasting decrease in disease spectrum and transmission. When it comes to vaccine candidates, numerous genes encoding *S. mansoni* proteins that are expressed at the mammalian host-parasite interface have been assessed. Among the most promising molecules are the proteins present in the tegument and digestive tract of the parasite. Although schistosomiasis represents a major public health problem in endemic countries, evidences show that *S. mansoni* downregulates inflammatory responses in many diseases. Fortunately, the control of inflammatory responses is extended to pathogen-derived antigens, leading us to study one *S. mansoni* Kunitz type protease inhibitor (*SmKI-1*), found in larval and adult phases of the parasite as a molecule capable of regulating different models of inflammatory diseases and as a vaccine candidate. First, we determine that recombinant (r) *SmKI-1* and its Kunitz domain but not the C-terminal region possess inhibitory activity against trypsin and neutrophil elastase. To better understand the molecular basis of neutrophil elastase inhibition by *SmKI-1*, molecular docking studies were also conducted. Docking results suggest a complete blockage of neutrophil elastase active site by *SmKI-1* Kunitz domain. Additionally, r*SmKI-1* markedly inhibited the capacity of neutrophil elastase to kill schistosomes. In order to further investigate the role of *SmKI-1* in the parasite, we designed specific siRNA to knock-down *SmKI-1* in *S. mansoni*. *SmKI-1* gene suppression in larval stage of *S. mansoni* robustly impact in parasite development *in vitro* and *in vivo*. To determine the ability of *SmKI-1* to interfere with neutrophil migration and function, we tested *SmKI-1* anti-inflammatory potential in different murine models of inflammatory diseases. Treatment with *SmKI-1* rescued acetaminophen (APAP)-mediated liver damage, with a significant reduction in both neutrophil recruitment and elastase activity. In the model of gout arthritis, this protein reduced neutrophil accumulation, IL-1 β secretion, hypernociception, and overall pathological score. Finally, we demonstrated the ability of *SmKI-1* to inhibit early events that trigger neutrophil recruitment in pleural cavities of mice in response to carrageenan and also present some evidence that *SmKI-1* does not affect the migration of other immune cells than neutrophils. We also evaluate the potential of *SmKI-1* as a recombinant vaccine. Mice immunization with r*SmKI-1*, formulated with Freund's adjuvant, induces a Th1-type response, as IFN- γ , and TNF- α were detected in the supernatant of cultured splenocytes. The protective effect conferred by vaccination with r*SmKI-1* was demonstrated by 51% reduction in the worm burden, 36% reduction in the number of eggs

per gram of hepatic tissue, a 31% reduction in the number of granulomas, and 33% reduction in the area of liver granulomas.. In conclusion, *SmKI-1* is a key protein in *S. mansoni* survival and it has the ability to inhibit neutrophil function as a promising therapeutic molecule against inflammatory diseases. As well as our data demonstrated that *SmKI-1* is a potential candidate for use in a vaccine to control schistosomiasis.

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

ADCC - Citotoxicidade celular mediada por células

ALT - Alanina amino transferase

APAP – Acetomifeno, Paracetamol

BLAST - Ferramenta básica de alinhamento local de sequências

BSA - Albumina de soro bovino

Ca²⁺ - Íon cálcio

cDNA- DNA complementar

CETEA - Comitê de Ética em Experimentação Animal

CFA - Adjuvante de Freund completo

ConA- Concanavalina A

Da, kDa- Dalton, kilodalton

DAPI - 4,6-diamino-2-fenilindol

DMEM - Meio *Dulbecco's Modified Eagle's*

DNA - Ácido desoxirribonucléico

dNTP- Desoxirribunucleotídeos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

DO_{600nm}- Densidade ótica a 600 nm

EDTA - Ácido etilenodiamina tetracético

ELISA - Ensaio imunoenzimático

Fh-KTM - inibidor de protease do tipo Kunitz derivado de *F. hepatica*,

FITC - Isotiocianato de fluoresceína

FPLC – *Fast protein liquid chromatography*

HRP - Peroxidase de rábano silvestre

IFA - Adjuvante de Freund incompleto

IFN- γ - Interferon gama

Ig - Imunoglobulina

IL - Interleucina

IPTG - Isopropiltiogalactosidase

kb, Mb -Kilobase, megabase

L, mL, μ L -Litro, mililitro, microlitro

LPS - Lipopolissacarídeo

m, cm, μ m - Metro, centímetro, micrômetro

M, mM, μ M - Molar, milimolar, micromolar

Mg²⁺ - Íon magnésio

mRNA- RNA mensageiro
MSU - Monosodium urate crystals (cristais de urato de monossódio)
NAD/NADH - Dinucleotídeo de nicotinamida adenina (forma oxidada/reduzida)
OMS - Organização Mundial da Saúde
OPD - Orto-fenilenodiamina
ORF - Região aberta de leitura
PAGE - Análise eletroforética em gel de poliacrilamida
PBS - Tampão fosfato-salino
PBST - Tampão fosfato-salino adicionado de 0,05% de Tween 20
PCE - Programa de Controle da Esquistossomose
PCR - Reação em cadeia da polimerase
pH - Potencial hidrogeniônico
PZQ - Praziquantel
qRT-PCR - PCR quantitativo em tempo real
RNA - Ácido ribonucléico
Rpm - Rotações por minuto
RPMI - Meio *Roswell Park Memorial Institute*
rSmKI-1 - Proteína recombinante SmKI-1 de *Schistosoma mansoni*
SDS - Dodecil sulfato de sódio
SHSPI - *Schistosoma haematobium* inibidor de serino protease
siRNA- Pequeno RNA inibidor
SmCB1 - Catepsina-B1 *Schistosoma mansoni*
SmKI-1 - *Schistosoma mansoni* Kunitz inhibitor 1
SmSynt – Sintenina
Smp80 - subunidade grande da calpaína
Smpi56 - Inibidor de protease de *S. mansoni* de 56 kDa
Smtcg - Tegumento purificado de *S. mansoni*
SWAP - Preparação de antígenos solúveis de verme adulto
TBST - Tampão TRIS-salino adicionado de 0,05% de Tween 20
TEMED - N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina
Th1, Th2, Th17 - Células T helper 1, 2 ou 17
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

Lista de Figuras

Figura 1 – Distribuição geográfica da esquistossomose no mundo segundo WHO 2015.	2
Figura 2 – Distribuição da esquistossomose segundo percentual de positividade em inquéritos coprocoscópicos – Brasil, 2012 Fonte: Sistema de Informação do Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose – SISPCE/SVS/MS(BRASIL, 2012).	3
Figura 3 – Ciclo de vida de <i>S. mansoni</i> , <i>S. japonicum</i> e <i>S. haematobium</i> – (McManus and Loukas, 2008) modificado.....	5
Figura 4 – Sequência nucleotídica de cDNA do antígeno Smp_147730 otimizada pela empresa DNA 2.0, utilizada neste trabalho. Em amarelo estão representadas as tríades correspondentes ao aminoácido cisteína ao longo da sequência nucleotídica da <i>SmKI-1</i>	31
Figura 5 – Vetor de expressão pJexpress414 utilizado para expressão da proteína <i>SmKI-1</i> - DNA 2.0, Califórnia, EUA.	31
Figura 6 – Sequências do domínio Kunitz e C-terminal otimizadas. Em verde região utilizada para desenhar os primers e em amarelo as tríades referente às cisteínas presentes na sequência do domínio Kunitz. Foi adicionado um códon de iniciação (uma metionina) em ambas a sequências das proções trabalhadas.	32
Figura 7 – Vetor de expressão pET-28a utilizado para expressão do Domínio Kunitz e C-terminal. Addgene, Cambridge, MA, EUA.....	33
Figura 8 – Representação esquemática do regime de imunização dos camundongos.	43
Figura 9 – Estrutura da <i>SmKI-1</i> e estrutura do domínio Kunitz.....	49
Figura 10 – Imunolocalização da <i>SmKI-1</i> em esquistossômulos de 7 dias.....	50
Figura 11 – A <i>SmKI-1</i> é importante no desenvolvimento do parasito.	52
Figura 12 – Expressão heteróloga e purificação de r <i>SmKI-1</i> , domínio KI e C-terminal.	54
Figura 13 – Toxicidade da <i>SmKI-1</i> recombinante em células BHK-21.....	55
Figura 14 – A <i>SmKI-1</i> recombinante inibe serino proteases e protege o estágio larval de <i>S. mansoni</i> contra a elastase neutrofílica.....	58
Figura 15 – Esquistossômulos de <i>S. mansoni</i> diminuem sobrevivência em cultura de neutrófilos.	60
Figura 16 - r <i>SmKI-1</i> reduz a lesão hepática induzida por APAP.....	63
Figura 17 – O tratamento com r <i>SmKI-1</i> diminui a inflamação da atrite induzida por MSU.	65
Figura 18 – Tratamento com r <i>SmKI-1</i> reduz neutrófilos em resposta à injeção de carragenina na cavidade pleural.....	67
Figura 19 – O efeito da r <i>SmKI-1</i> nas células peritoneais induzidas por tioglicolato.	69

Figura 20 – Cinética de anticorpos específicos anti- <i>SmKI-1</i> nos soros de camundongos vacinados com preparações <i>rSmKI-1</i> e Freund.	71
Figura 21 – Especificidade dos anticorpos contra <i>SmKI-1</i>	72
Figura 22 – Perfil de citocinas a partir de esplenócitos recuperados de animais vacinados com <i>rSmKI-1</i>	74
Figura 23 – Perfil de citocinas de esplenócitos de camundongos imunizados com <i>rSmKI-1</i> e infectados com <i>S. mansoni</i>	75
Figura 24 – A análise histopatológica do tecido hepático de camundongos vacinados com <i>rSmKI-1</i>	77

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Primers utilizados na PCR em tempo real.....	28
Tabela 2 – Sequências dos siRNAs utilizados neste trabalho.....	29
Tabela 3 – Sequência dos primers utilizados para amplificação das porções.....	32
Tabela 4 – Dados parasitológicos, e análise do número de ovos presentes no de camundongos C57BL/6 vacinados com rSmKI-1 e desafiados com 100 cercárias de <i>S. mansoni</i>	76

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	A esquistossomose	1
1.2	O parasito <i>Schistosoma mansoni</i> e seu ciclo de vida	3
1.3	Imunologia e patogênese da Esquistossomose Mânsonica	5
1.3.1	Mecanismos de escape imunológico	9
1.4	Tratamento e Controle.....	11
1.5	Desenvolvimento de vacinas antiesquistossomose	13
1.5.1	Vacina de Cercárias irradiadas	13
1.5.2	Antígenos testados pela OMS	14
1.5.3	O Tegumento e a Gastroderme são importantes regiões na seleção de moléculas alvos para estudos de vacinas e compreensão da relação parasito/hospedeiro	15
1.5.3.1	Estudos com novos antígenos vacinais de <i>Schistosoma</i>	16
1.6	Proteases e Inibidores de proteases são importantes na infecção e no desenvolvimento dos Helmintos.....	18
1.6.1	Inibidores de serino proteases do tipo Kunitz e suas importantes funções em helmintos	20
2	JUSTIFICATIVA.....	22
3	OBJETIVOS.....	23
3.1	Objetivo Geral	23
3.2	Objetivos Específicos	23
4	MÉTODOS.....	24
4.1	Camundongos e cercárias.....	24
4.2	Análise in silico e modelagem da proteína <i>SmKI-1</i> , um inibidor de serino protease do tipo Kunitz do <i>Schistosoma mansoni</i>	24

4.3	Docking molecular do domínio Kunitz da proteína <i>SmKI-1</i> com elastase neutrofílica	25
4.4	Análise da expressão gênica da <i>SmKI-1</i> em diferentes fases do ciclo do <i>S. mansoni</i>	26
4.4.1	Extração de RNA	26
4.4.2	Síntese de cDNA	26
4.4.3	PCR em Tempo Real	27
4.5	Silenciamento do gene <i>SmKI-1</i>	28
4.5.1	Produção de esquistossômulos (transformação)	28
4.5.2	Supressão gênica com siRNA	28
4.5.3	Análises fenotípicas	29
4.5.4	Infecção com esquistossômulos silenciados com siRNA- <i>SmKI-1</i>	30
4.6	Clonagem, expressão e purificação da <i>SmKI-1</i> e suas porções, domínio Kunitz e C-terminal	30
4.6.1	Construção das moléculas	30
4.6.2	Expressão, purificação e caracterização da <i>SmKI-1</i> e suas porções	33
4.7	Citotoxicidade da proteína <i>SmKI-1</i>	34
4.8	Análise de extratos protéicos	34
4.8.1	Extração de proteínas	34
4.8.2	SDS-PAGE e <i>Western Blot</i>	35
4.9	Imunolocalização da <i>SmKI-1</i> em esquistossômulos <i>S. mansoni</i>	35
4.10	Ensaio de inibição de serino proteases utilizando <i>SmKI-1</i> , Domínio KI e C-terminal recombinantes	36
4.11	Inibição da Elastase em cultura de Neutrófilos	36
4.11.1	Purificação de neutrófilos da medula óssea de camundongos TLR4 <i>knockout</i> (KO)	36
4.11.2	Ensaio de inibição da Elastase liberada por Neutrófilos em cultura	37
4.12	Sobrevivência de esquistossômulos na presença da Elastase Neutrofílica	37

4.13	Sobrevivência de esquistossômulos em cultura de neutrófilos isolados de medula	38
4.14	Modelo de lesão hepática induzida por Paracetamol (APAP)	38
4.14.1	Microscopia Intravital	39
4.15	Modelo de Gota experimental induzido por cristais de urato monossódico (MSU)	39
4.15.1	Avaliação da nocicepção dos camundongos	39
4.15.2	Contagem das células totais e diferenciais da cavidade sinovial	40
4.15.3	Histologia	40
4.15.4	Atividade de mieloperoxidase e secreção de IL-1 β	40
4.16	Modelo de pleurisia induzido por Carragenina	41
4.16.1	Citometria de fluxo para análise de populações de leucócitos	41
4.17	Modelo de peritonite induzida por tioglicolato	42
4.18	Imunização dos camundongos	42
4.19	Infecção, desafio e recuperação dos helmintos adultos	42
4.20	Dosagem dos anticorpos específicos contra rSmKI-1	43
4.21	Análise de citocinas	44
4.22	Contagem de ovos	44
4.23	Análise histopatológica dos animais imunizados	44
4.24	Análise estatística	45
5	RESULTADOS	46
5.1	– Caracterização Funcional da proteína SmKI do <i>S. mansoni</i>	46
5.1.1	SmKI-1 do <i>Schistosoma mansoni</i> é um inibidor do tipo Kunitz de serino proteases	46
5.1.2	SmKI-1 está localizada na superfície do trato intestinal de Esquistossômulos	49
5.1.3	Perfil de expressão da SmKI -1 em esquistossômulos e fase adulta do ciclo de vida do <i>S. mansoni</i>	50
5.1.4	A expressão do gene SmKI-1 é importante para a sobrevivência de <i>S. mansoni</i>	50

5.1.4.1	Viabilidade de esquistossômulos siRNA- <i>SmKI-1</i> <i>in vitro</i>	50
5.1.4.2	Viabilidade dos parasitos tratados com siRNA- <i>SmKI-1</i> <i>in vivo</i>	51
5.1.5	Expressão e purificação da r <i>SmKI-1</i> , domínio KI e C-terminal	53
5.1.6	<i>SmKI-1</i> não apresenta citotoxicidade celular nas concentrações utilizadas neste estudo	54
5.1.7	<i>SmKI-1</i> e a porção domínio Kunitz atuam como inibidores de tripsina e também da elastase neutrofílica.....	55
5.1.8	Inibição da Elastase em cultura de Neutrófilos.....	56
5.1.9	<i>SmKI-1</i> quando adicionada ao meio aumenta sobrevivência de esquistossômulos cultivados com Elastase neutrofílica.....	56
5.1.10	<i>SmKI-1</i> é capaz de bloquear o sítio ativo da elastase neutrofílica	56
5.1.11	Ausência da expressão da proteína <i>SmKI-1</i> diminui a sobrevivência de esquistossômulos em cultura de neutrófilos.....	59
5.1.12	r <i>SmKI-1</i> reduz a ativação e migração de neutrófilos, e danos no fígado causados por paracetamol (APAP).....	61
5.1.13	r <i>SmKI-1</i> diminui a resposta inflamatória na artrite induzida por MSU.....	64
5.1.14	r <i>SmKI-1</i> reduz a migração de neutrófilos na cavidade pleural induzida por carragenina	66
5.1.14	r <i>SmKI-1</i> não reduz a migração de linfócitos e macrófagos na cavidade peritoneal induzida por tioglicolato.....	68
5.2	– Caracterização Imunológica da proteína <i>SmKI-1</i>	69
5.2.1	A vacinação com r <i>SmKI-1</i> induz altos níveis de IgG	69
5.2.2	Perfil de citocinas após a vacinação com r <i>SmKI-1</i> e desafio com <i>S. mansoni</i>	72
5.2.3	A imunização com r <i>SmKI-1</i> induz imunidade protetora em camundongos.....	75
6	DISCUSSÃO.....	78
7	CONCLUSÕES.....	86

8	REFERÊNCIAS.....	87
9	ANEXOS.....	104
9.1	Artigos publicados durante o período do doutorado	104
9.2	Artigo submetido.....	106

1 INTRODUÇÃO

1.1 A esquistossomose

A esquistossomose é uma doença que afeta cerca de 210 milhões de pessoas e 779 milhões vivem em risco de infecção em 76 países em desenvolvimento (Berriman et al., 2009; Chitsulo et al., 2000; Montgomery, 2011; Steinmann et al., 2006). Dentre os indivíduos infectados, 120 milhões são sintomáticos e 20 milhões apresentam as formas mais graves da doença (Chitsulo et al., 2000; Engels et al., 2002).

Há cinco espécies causadoras da esquistossomose humana: *Schistosoma haematobium* (endêmica em 53 países na África e Oriente Médio), *S. mansoni* (endêmica em 54 países na América Latina, Caribe, África e Oriente Médio), *S. intercalatum* (endêmica em 10 países da África central), *S. japonicum* (endêmica na China, Indonésia, Camboja e Filipinas, sendo relatados casos em Laos e Tailândia) e *S. mekongi* (endêmica em Laos e Camboja) (Bruun and Aagaard-Hansen, 2008; Chitsulo et al., 2000). A Figura 1 evidencia a distribuição geográfica da esquistossomose no mundo.

A Esquistossomose está entre as doenças tropicais negligenciadas causadas por helmintos mais importantes da atualidade. Essas doenças caracterizam-se por sua alta endemicidade em zonas rurais e áreas urbanas mais empobrecidas, pois, prejudica o crescimento, o desenvolvimento intelectual em crianças e a produtividade dos trabalhadores, sendo estas condições favorecedoras da pobreza (Hotez et al., 2006a). Por afetar uma população mais pobre, há pouco investimento no desenvolvimento de medicamentos e vacinas (Hotez et al., 2006a; WHO, 2002). As doenças tropicais negligenciadas são causadoras da morbidade, sendo principalmente a esquistossomose responsável pela perda de 4,5 milhões em DALYs (Disability-Aadjusted Life Year) (Steinmann et al., 2006; van der Werf et al., 2003a; WHO, 2002; World Health, 2015).

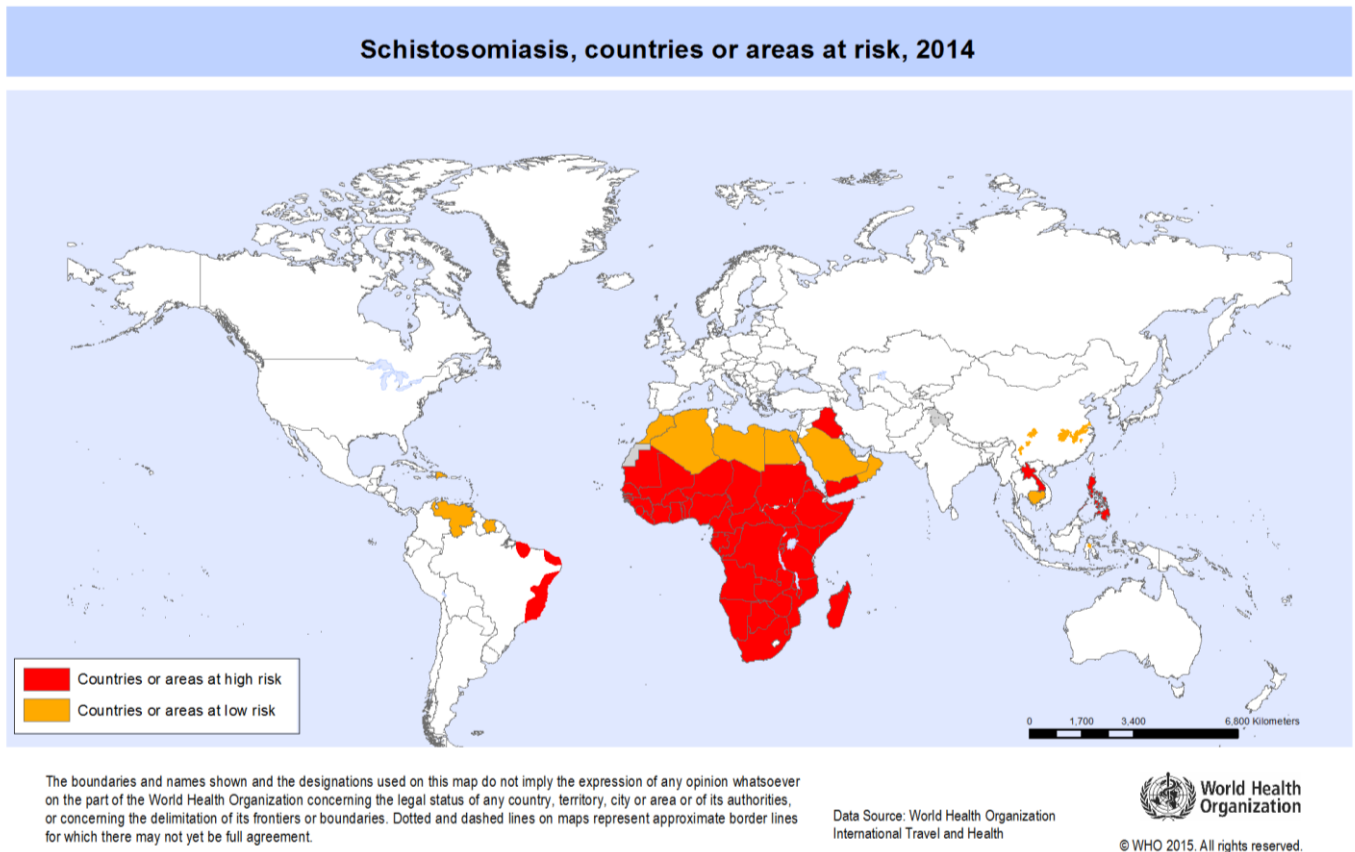


Figura 1 – Distribuição geográfica da esquistossomose no mundo segundo WHO 2015.

A espécie *Schistosoma mansoni*, endêmica em 54 países, é responsável pela infecção de mais de 70 milhões de pessoas. Nas Américas encontram-se áreas endêmicas no Brasil, Suriname, Venezuela e Ilhas do Caribe. Destes países, o Brasil é o que possui a maior área endêmica, onde a migração de pessoas originária dessa área em busca de melhores condições de vida contribuiu para a dispersão da doença (Coura and Amaral, 2004). Atualmente a esquistossomose distribuiu-se mais intensamente numa faixa de terras contínuas e contíguas ao longo de quase toda a costa litorânea da região Nordeste, a partir do Rio Grande do Norte em direção ao Sul, incluindo as zonas quentes e úmidas dos estados da Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia, onde se interioriza alcançando Minas Gerais, no Sudeste, seguindo o trajeto de importantes bacias hidrográficas (Carvalho, 2008; Coura and Amaral, 2004) (Figura 2).

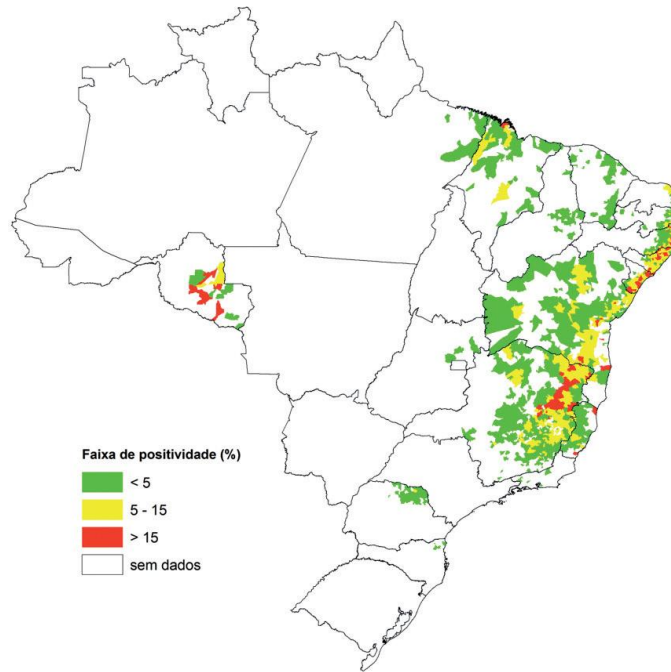


Figura 2 – Distribuição da esquistossomose segundo percentual de positividade em inquéritos coproscópicos – Brasil, 2012 Fonte: Sistema de Informação do Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose – SISPCE/SVS/MS(BRASIL, 2012).

1.2 O parasito *Schistosoma mansoni* e seu ciclo de vida

Os helmintos do gênero *Schistosoma* são vermes que atingem de 7 a 20 milímetros (mm) de comprimento na fase adulta, possuem corpo cilíndrico com duas ventosas terminais, um tegumento complexo e órgãos reprodutores. Diferentemente de outros trematódeos, estes helmintos são dióicos, ou seja, possuem sexos separados. O macho apresenta um canal ginecóforo onde a fêmea se aloja. A espécie *Schistosoma mansoni*, em sua forma adulta, vive nas veias mesentéricas, causando a esquistossomose intestinal, onde se alimentam de sangue incluindo as hemácias (Gryseels et al., 2006; McManus and Loukas, 2008). Estes helmintos apresentam um complexo ciclo de vida que envolve um caramujo como hospedeiro intermediário invertebrado e um mamífero como hospedeiro vertebrado (Han et al., 2009; Neves et al., 2010).

A infecção dos hospedeiros mamíferos ocorre pela penetração ativa de cercárias (forma infectante do parasito) na pele. Estas são liberadas pelos caramujos em meio aquático viáveis por até 72 horas e utilizam um conjunto de enzimas proteolíticas que auxiliam a penetração do parasito. Durante o processo de penetração as cercárias perdem a cauda, alcançam capilares

sanguíneos e migram em direção aos pulmões, onde se diferenciam em esquistossômulos (Collins et al., 2011). Os esquistossômulos iniciam a migração intravascular dos pulmões até o sistema porta hepático, onde completam o seu desenvolvimento e copulam, e seguem para o plexo mesentérico ou perivesicular, onde também se iniciam a ovoposição (Knopf and Linden, 1985) (Figura 3). A forma adulta de *S. mansoni* vive aos pares nas veias mesentéricas, onde cada fêmea pode depositar até 300 ovos por dia (Cheever and Duvall, 1974; Neves et al., 2010; Pellegrino and Coelho, 1978). Os ovos liberados secretam enzimas proteolíticas que auxiliam na sua migração para o lúmen do intestino, sendo posteriormente eliminados para o meio ambiente juntamente com as fezes e em contato com água, eclodem liberando os miracídios, segunda forma do helminto de vida livre. Os miracídios nadam ativamente ao encontro do hospedeiro invertebrado. Ao penetrar nas partes moles do caramujo, o miracídio sofre uma reorganização celular, dando origem aos esporocistos primários, posteriormente aos secundários, e por fim, às cercárias, que em condições de temperatura são liberadas na água pelos caramujos infectados dando continuidade ao ciclo de vida do parasito (Katz, 2003) (Figura 3).

Grande parte dos ovos de *Schistosoma* não consegue deixar os tecidos do hospedeiro e são arrastados das veias mesentéricas pelo fluxo sanguíneo atingindo os vasos sinusóides do fígado (sistema porta hepático). Os ovos com os miracídios íntegros geram uma resposta imune granulomatosa do tipo Th2 (Pearce and MacDonald, 2002). A fibrose desencadeada e a formação de granulomas hepáticos constituem a principal causa dos sintomas, morbidade e mortalidade associados à esquistossomose (Boros, 1989). O tempo desde a infecção humana até a ovoposição é de 4 a 6 semanas e os vermes adultos vivem em média 2 a 5 anos, podendo chegar a até 30 anos (Bruun and Aagaard-Hansen, 2008; Gryseels et al., 2006; Harris et al., 1984; McManus and Loukas, 2008).

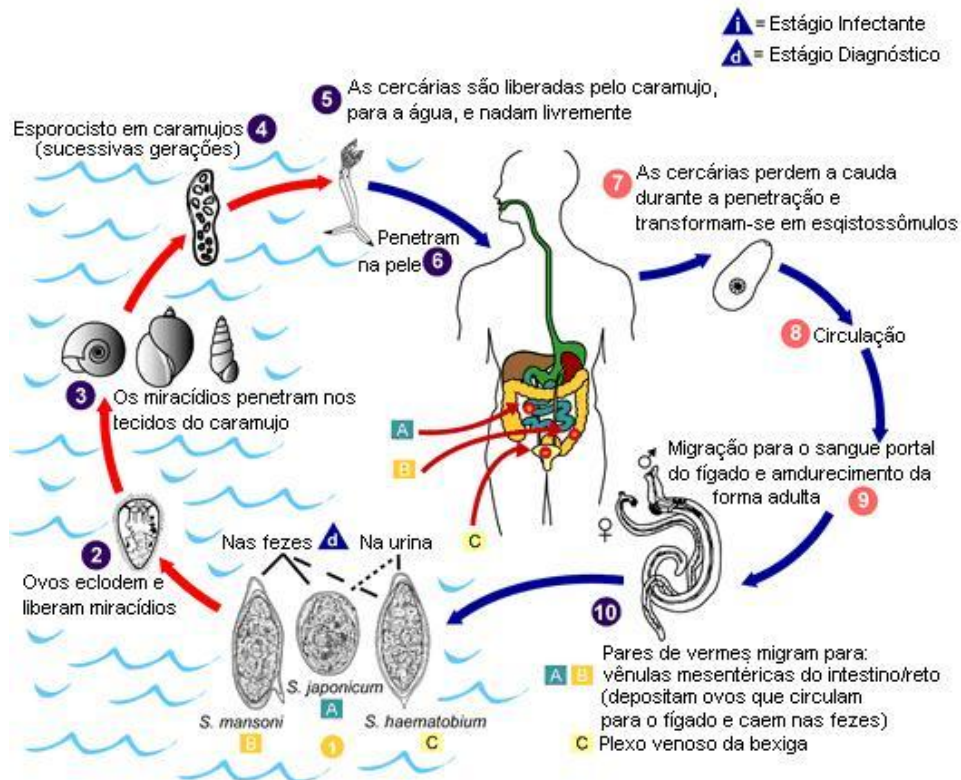


Figura 3 – Ciclo de vida de *S. mansoni*, *S. japonicum* e *S. haematobium* – (McManus and Loukas, 2008) modificado.

1.3 Imunologia e patogênese da Esquistossomose Mânsonica

A Esquistossomose mansônica, do ponto de vista clínico, se desenvolve em duas fases, uma aguda e uma crônica. Esta última pode apresentar três formas clínicas: intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica (Bottieau et al., 2006; Burke et al., 2009; Ross et al., 2007).

A patogênese da esquistossomose mansônica é dependente da interação helminto/hospedeiro humano (Allen and Maizels, 2011; Gryseels et al., 2006). Em relação ao *S. mansoni* são importantes a cepa, a fase evolutiva, a intensidade e o número de infecções. Por parte do hospedeiro, participam a diversidade genômica, o órgão predominantemente lesado, o padrão alimentar, a etnia, a reativação da doença, o tratamento específico, e, sobretudo, o perfil da resposta imune antes, durante e após a infecção, sendo esse fator o mais importante na determinação e evolução da doença (Gryseels et al., 2006; Pearce and MacDonald, 2002). Durante as etapas do ciclo evolutivo do *S. mansoni* nos diferentes tecidos (Figura 3), o helminto

passa por significantes alterações morfológicas e bioquímicas que facilitam o escape do helminto do sistema imunológico do hospedeiro (Pearce and MacDonald, 2002).

A partir das primeiras doze horas após a penetração das cercárias observa-se importante reação inflamatória dérmica e subdérmica, originando a dermatite cercariana, a qual é capaz de eliminar um grande número de cercárias e esquistossômulos ainda na pele, esta é a primeira linha de defesa contra a infecção (Kourilova et al., 2004; Lichtenbergova et al., 2008). Esta reação inflamatória é predominantemente constituída por células mononucleares e polimorfonucleares, e apresenta-se clinicamente como um exantema maculopapular pruriginoso (Lambertucci et al., 2000), cuja intensidade depende do número e duração das exposições e o estado imunológico do hospedeiro (Lichtenbergova et al., 2008). Durante a passagem pela epiderme e derme, ocorre a ativação de vários componentes da resposta imune inata. Em dois dias, organiza-se um infiltrado de células polimorfonucleares, mononucleares e células de Langerhans, além de produção local de quimiocinas – CCL3 e CCL11 (Allen and Maizels, 2011) e citocinas, interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-12p40, IL-10 (Hogg et al., 2003a). Depois de quatro a cinco dias, este cenário ainda é predominante, podendo se observar o influxo de linfócitos T CD4⁺ e produção de IL-12p40 e IFN- γ (interferon gama), os quais se reduzem na segunda semana (Hogg et al., 2003a; Kourilova et al., 2004).

Os esquistossômulos, na passagem pelos pulmões, podem causar focos de arteriolite, arterite e necrose, além da infiltração de neutrófilos, linfócitos e eosinófilos (Abath et al., 2006). Essa infiltração resulta na citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC). A ADCC consiste na morte de uma célula alvo revestida com anticorpos através de uma célula efetora citotóxica por um processo não fagocítico, caracterizado pela liberação do conteúdo de grânulos citotóxicos, ou pela expressão de moléculas de indução de morte celular. É uma resposta imune mediada por células *natural killer* (NK), monócitos, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos (Torben et al., 2012). Sendo que os eosinófilos são capazes de exercer papel protetor na infecção por meio da ADCC com IgE, e além disso, estudos *in vitro* demonstraram que a interação de anticorpos pertencentes às classes de IgG ou IgA com seus receptores Fc e as glicoproteínas presentes na superfície das células efetoras também são capazes de mediar a morte de esquistossômulos (Allen and Maizels, 2011; Khalife et al., 1986). Esse tipo de resposta imune possui ação efetora sobre esquistossômulos, mas aparentemente não possui efeito sobre helmintos adultos.

Além da ADCC, os anticorpos produzidos durante a infecção também podem desempenhar papel efetor ou regulador da resposta celular, dependendo do isotipo, essa resposta humoral contra a esquistossomose pode variar de acordo com a idade e forma clínica da doença. Pacientes que desenvolvem a fase aguda da doença apresentam altos níveis de IgG1, IgE contra esquistossômulos (Allen and Maizels, 2011; Khalife et al., 1986), enquanto que os pacientes avaliados na fase crônica de desenvolvimento da doença produzem altos níveis de IgG4 (Allen and Maizels, 2011; Satoguina et al., 2005), contra os esquistossômulos assim como helmintos adultos (Jassim et al., 1987).

A transformação dos esquistossômulos em vermes adultos ocorre entre 30 e 40 dias após a infecção, coincidindo com o início das manifestações clínicas da esquistossomose aguda (Burke et al., 2009). A fase aguda é dividida em dois períodos evolutivos: o pré-patente (antes da oviposição) e pós-patente (após a oviposição). Embora os mecanismos imunológicos envolvidos na resposta da infecção aguda ainda não estejam completamente elucidados, investigações em modelos murinos demonstram que inicialmente há predominância de uma resposta imune tipo Th1, substituída por Th2 na fase pós-patente (Pearce and MacDonald, 2002). Durante a fase pré-patente são detectados níveis consideráveis de fator de necrose tumoral (TNF) e de IL-2 e IL-6 produzidos pelas células mononucleares (Pearce and MacDonald, 2002). A produção de IFN- γ aumenta durante os estágios iniciais da formação dos granulomas (6 semanas após a infecção) e diminui subsequentemente durante o período de máxima atividade do granuloma (Boros and Lukacs, 1992; Chensue et al., 1992; Lukacs and Boros, 1992; Sher et al., 1991). Camundongos infectados tratados com doses gradativas de IFN- γ apresentam inibição da deposição de colágeno na inflamação crônica, bem como na formação de granulomas periovulares (Czaja et al., 1989; Giri et al., 1986). Outros estudos também evidenciaram que pacientes de fase aguda apresentam altos níveis de TNF- α , IL-1 e IL-6 (de Jesus et al., 2002). Acredita-se que a resposta imune do tipo Th1 seja responsável pelas lesões teciduais e manifestações clínicas da fase aguda.

No processo inflamatório provocado pela esquistossomose, a lesão típica observada é o granuloma que se forma em torno dos ovos depositados pelos parasitos (Carvalho, 2008). Cerca de 50% dos ovos alcançam a luz intestinal. O restante mantém-se circulante nos capilares da mucosa do intestino (Gryseels et al., 2006) e alguns ovos são carregados pela circulação mesentérica até o fígado, onde ficam retidos nos sinusóides hepáticos. Onde a liberação de antígenos solúveis a partir dos ovos induz a migração de macrófagos, eosinófilos e linfócitos CD4⁺ Th1 e Th2, mediados por TNF- α . Os macrófagos em contato com o ovo formam massas sinciciais multinucleadas; algumas destas células transformam-se em fibroblastos, orientando a

organização de camadas concêntricas em toda a espessura do granuloma, com ampla produção de colágeno (Fertin et al., 1991; Sempowski et al., 1996). Esses antígenos que atravessam os tecidos, são elementos fundamentais para a formação da reação granulomatosa. Observa-se uma modulação da resposta imune do tipo Th1 com diminuição da proliferação celular e da produção de citocinas pró-inflamatórias (Correa-Oliveira et al., 1989; Montenegro et al., 1999; Pearce and MacDonald, 2002). A IL-10 inibe a produção de IL-12, interferindo na manutenção da resposta imune Th1 (Pearce and MacDonald, 2002). A resposta celular muda de perfil para a resposta Th2, na qual há uma menor produção de IFN- γ e maior produção das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 (Correa-Oliveira et al., 1989; Koyasu et al., 2010; Montenegro et al., 1999; Pearce and MacDonald, 2002). Uma marca dessa resposta é a expressão de níveis maiores de citocinas indutoras do colágeno como IL-4 (Fertin et al., 1991; Sempowski et al., 1996) e IL-13 (Chiaromonte et al., 1999; Finkelman et al., 2004) e uma maior deposição de componentes da matriz extracelular (Cheever et al., 1992) que levam a origem dos granulomas. Estudos realizados em camundongos mostraram que as citocinas Th2 ativam os macrófagos aumentando a expressão de arginase com produção de prolina, aminoácido essencial na produção de colágeno, estando, assim, envolvidas na fibrogênese. Além disso, a IL-13 é capaz de estimular os fibroblastos hepáticos a sintetizarem proteínas da matriz extracelular, aumentando, assim, a produção de tecido fibroso (Jassim et al., 1987; Modolell et al., 1995). Com este efeito muitos autores acreditam que, em termos evolutivos, a resposta imune tipo Th2 pode ter surgido em resposta à lesão tecidual promovida pelas respostas inflamatórias, com uma resposta de reparo, no intuito resolver os danos patológicos gerados (Allen and Maizels, 2011).

Com efeito, a estrutura fibrosa do granuloma maduro é lamelar. Estudos recentes têm mostrado que a resposta granulomatosa observada na esquistossomose mansoniana é capaz de induzir a ocorrência de diferentes manifestações da doença, destacando-se: a hipertensão portal (granulomas hepáticos com a desorganização da arquitetura sinusoidal hepática, hepatomegalia); a formação de pseudotumores (granulomas na parede intestinal); as disfunções neurológicas (granulomas no sistema nervoso central, principalmente na medula); e as lesões vasculares pulmonares (granulomas nos vasos pulmonares) (Fuks et al., 1982; Hanna et al., 2005).

Estudos realizados em pacientes que exibiam hepatoesplenomegalia severa evidenciaram altos níveis de IFN- γ e TNF- α acompanhados de baixos níveis de IL-5, sugerindo que as citocinas proinflamatórias (IFN- γ e TNF- α) estariam relacionadas com a sintomatologia apresentada pelos pacientes (Mwatha et al., 1998). Esses achados corroboram com dados obtidos por Brunet e colaboradores (1997), em estudo realizado com camundongos deficientes em IL-4 infectados com *S. mansoni*, os quais não foram capazes de desenvolver uma resposta Th2 efetiva e

apresentaram morbidade e mortalidade elevadas (Brunet et al., 1997). A patologia nesses animais foi atribuída ao aumento da produção de mediadores pro-inflamatórios (Fallon et al., 2000; Hoffmann et al., 2000). No entanto uma resposta Th2 polarizada levaria ao desenvolvimento de uma doença crônica grave, com produção de granulomas e exacerbada resposta fibrogênica. Nesse contexto, a IL-10 aparece como uma citocina chave na patogênese da esquistossomose, tanto na fase aguda quanto na fase crônica da infecção, sendo crucial para a sobrevivência do hospedeiro. Segundo Hoffmann (2000), IL-10 possui o papel de controlar a polarização Th1 ou Th2 durante a infecção na esquistossomose murina (Hoffmann et al., 2000).

De forma geral compreende-se que a infecção por *S. mansoni* promove indução da resposta Th1, que é responsável por funções citotóxicas e pró-inflamatórias, induzem hipersensibilidade do tipo tardia e possuem atividade antifibrótica, e parece ser crucial na indução da imunidade protetora (Capron et al., 1999; Hoffmann et al., 1998) enquanto que a resposta Th2, induzida posteriormente relacionada ao controle da patogênese (Abath et al., 2006; Pearce and MacDonald, 2002). A indução de respostas polarizadas Th1 ou Th2, apesar de causarem distintas lesões teciduais, podem ser prejudiciais e até letais. Desta forma, a produção dos dois tipos de resposta de uma forma equilibrada deve promover a proteção ao hospedeiro contra os efeitos danosos da patologia (Wynn et al., 2004).

1.3.1 Mecanismos de escape imunológico

Muitos patógenos desenvolvem estratégias de evasão complexas, tais mecanismos de evasão do sistema imune dos parasitos dependem de uma forma de diálogo molecular entre o patógeno e o hospedeiro, assim como, muitos parasitos dependem de sinais moleculares do hospedeiro para o seu desenvolvimento (Allen and Maizels, 2011). O *S. mansoni* pode ser considerado um helminto extremamente adaptado ao *Homo sapiens sapiens*, tendo desenvolvido evolutivamente distintos mecanismos de evasão contra o sistema imune de seu hospedeiro.

A interação do *S. mansoni* com o sistema imunológico do seu hospedeiro é amplamente afetada por múltiplos mecanismos de evasão específicos e não específicos empregados pelo parasito para reduzir a reatividade imune do hospedeiro. E pouco se sabe sobre esses mecanismos a nível molecular (Fishelson, 1995). Uma das alternativas para o helminto é a anexação de antígenos do hospedeiro vertebrado à própria membrana plasmática, dificultando seu reconhecimento como *non self* (Boros and Whitfield, 1999). *S. mansoni*, assim com *S. japonicum* também é capaz de

realizar o desprendimento contínuo das porções mais exteriores do tegumento, com substituição por novas camadas de membrana celular a fim de escapar da resposta imune humoral (Braschi et al., 2006; Cai et al., 2008). Também ocorre o desencadeamento da resposta Th2, por antígenos dos ovos, levando à produção de IL-4, interleucina que tem atividade moduladora da atividade de macrófagos, acarretando inibição de atividade de mononucleares fagocíticos e reduzindo, simultaneamente, a estimulação de resposta mediada por células Th1 com atividade efetora citotóxica, e à maior participação de eosinófilos (Allen and Maizels, 2011). As citocinas, como IL-4, IL-5 e IL-13 são secretadas por linfócitos Th2, que ocorre a fim de modular a resposta inflamatória Th1 e em contrapartida é responsável pela formação de fibrose nos tecidos em que ovos estão retidos (Pearce and MacDonald, 2002).

Estudos demonstraram que a produção e liberação de proteases, moléculas capazes de clivar imunoglobulinas e proteínas do sistema complemento seriam alternativas para o helminto impedir a ação do sistema imune (Yang et al., 2015). Além das proteases, recentemente estudos observaram que inibidores de proteases de parasitos podem atuar como reguladores da resposta imune reduzindo a resposta inflamatória (McKerrow et al., 2006). Um exemplo de inibidor bastante estudado em helmintos é a serpina, um inibidor de serino proteases (Roberts et al., 2004). A família das serpinas compreendem, em humanos, enzimas que regulam a proteólise na coagulação sanguínea, inflamação, e ativação do complemento (Silverman et al., 2001). Foi observado que a produção das serpinas por helmintos é capaz de modular a resposta imune do hospedeiro atuando sobre as enzimas com funções efetoras do hospedeiro como as citadas acima. O inibidor da família serpina denominado SHSPI (*Schistosoma haematobium* inibidor de serino protease) de 54-58 kDa foi caracterizado e localizado na superfície de *S. haematobium* (Blanton et al., 1994; Huang et al., 1999). A localização desse inibidor na superfície do helminto demonstra-se estratégica, pois a molécula poderia atuar diretamente na interface parasito/hospedeiro. Os autores discutem que a SHSPI pode atuar evitando a formação de coágulos em torno do parasito por enzimas como trombina no plasma. *S. mansoni* também possui uma serpina associada à superfície denominada Smpi56 (Inibidor de protease de *S. mansoni* de 56 kDa) e foi demonstrada atividade inibitória contra elastase neutrofílica (Ghendler et al., 1994). Inibidores de elastase se mostram muito importantes para defesa de *Schistosoma*, uma vez que, foi observado em um estudo anterior que a elastase neutrofílica é tóxica para esquistossômulos em cultura (Freudenstein-Dan et al., 2003).

1.4 Tratamento e Controle

As medidas de controle da transmissão visam impedir a infecção de novos indivíduos com a adoção de ações abrangentes, tais como saneamento básico, educação sanitária e eliminação dos caramujos (Prichard et al., 2012; WHO, 2010). Porém, estudos anteriores demonstraram que medidas sanitárias e tratamento de água reduzem minimamente o impacto da infecção, quando estas não estão associadas a intervenções médicas e desenvolvimento econômico (Hotez et al., 2008) e também a dificuldade de se controlar a reprodução do hospedeiro invertebrado. Desde a década de 1950 a Organização Mundial de Saúde (OMS) tem se dedicado à implementação de estratégias de controle, estabelecendo diretrizes para desenvolvimento de medidas de controle da transmissão e consequentemente da morbidade (Bruun and Aagaard-Hansen, 2008)

Primeiramente, os hospedeiros invertebrados foram bastante estudados e a primeira forma de controle da esquistossomose foi o uso em baixas concentrações de moluscidas com toxicidade prolongada e restrita as espécies-alvos. Os moluscidas utilizados apresentaram mínimo impacto ambiental, baixo custo e fácil aplicação (WHO, 1953). Até a década de 1960, a OMS reconhecia o combate aos caramujos como a medida isolada mais efetiva no controle da doença. Naquele momento o controle da doença não acontecia por meio da quimioterapia, devido à falta de fármacos seguros, eficazes e baratas (Barbosa et al., 2006; WHO, 1967).

Após os primeiros estudos epidemiológicos, nas décadas de 1960, que auxiliaram na determinação de áreas endêmicas, iniciou-se as primeiras medidas com drogas (Amaral et al., 2006) que não obtiveram sucesso no controle da transmissão. Ao longo dos anos diversos fármacos foram testadas no tratamento em larga escala de pessoas infectadas pertencentes às áreas endêmicas (Coura and Amaral, 2004). Mas atualmente o controle da esquistossomose no Brasil e demais países tem sido realizado através do tratamento de indivíduos infectados com o quimioterápico Praziquantel (WHO, 2002).

O praziquantel é eficaz na redução da intensidade da infecção por todas as espécies do *Schistosoma*. Com o término da patente deste medicamento, diversas apresentações genéricas foram disponibilizadas para comercialização a baixo custo, aumentando a perspectiva de um acesso mais generalizado ao tratamento medicamentoso (Doenhoff et al., 2002).

A quimioterapia é uma importante estratégia no combate à esquistossomose, pois diminui a morbidade e a endemicidade, mas sozinha não consegue eliminar a doença das áreas endêmicas

devido às altas taxas de reinfecção (Bergquist, 1995; Harder, 2002; Ismail et al., 1999; Katz, 1999). Dessa forma o praziquantel foi combinado à derivados de artemisinina como forma de ampliar o tratamento. Uma vez que o praziquantel é ativo apenas contra a forma madura do helminto e estes derivados são efetivos contra as fases iniciais do helminto no hospedeiro humano (Gryseels et al., 2006), de forma que a combinação representa uma tentativa de eliminá-lo antes que o mesmo inicie a ovoposição.

Além das limitações do tratamento com o praziquantel, por não prevenir a reinfecção de indivíduos que vivem principalmente em áreas endêmicas, e também fatores com o relato do surgimento de cepas do *Schistosoma* resistentes ao tratamento (Cioli, 2000; Cioli et al., 1993; Doenhoff et al., 2002), se tornando alvos de extensa discussão o que leva a considerar essa abordagem de controle limitada. Também o diagnóstico da esquistossomose é um método a se questionar, pois a metodologia mais utilizada é o exame de fezes, e através deste só se pode determinar a infecção quando o indivíduo contaminado começa eliminar os ovos juntamente com as fezes e muitas vezes ocorre o falso negativo, e os ovos não detectados no exame (Katz, 1992) Diante disso, estratégias diferentes são defendidas, e uma delas seria uma abordagem terapêutica capaz de controlar efetivamente a esquistossomose em longo prazo. Consistiria na combinação da quimioterapia com uma vacina antiesquistossomose (Bergquist, 2002) capaz de promover mesmo que uma redução parcial da carga parasitária, pois, poderia diminuir consideravelmente a patologia e limitar a transmissibilidade da doença (Chitsulo et al., 2004). Embora ainda não existam relatos sobre uma vacina efetiva contra parasitos do gênero *Schistosoma* (Bergquist, 2002; Bergquist and Colley, 1998; Hagan and Sharaf, 2003; Katz, 1999), nos últimos anos, grandes esforços vêm sendo despendidos por organismos internacionais e institutos de pesquisa visando produzir uma vacina contra a esquistossomose (Katz, 1999; McWilliam et al., 2012).

Para que esta estratégia seja mais consistente, é necessário conhecer as características biológicas do *Schistosoma* e possíveis alvos para o desenvolvimento de vacinas e novos medicamentos. Os estudos do genoma, transcriptoma e proteoma do *S. mansoni* são úteis neste sentido, pois facilitam a identificação de alvos para o desenvolvimento de novos fármacos e vacinas com base nas diversas ferramentas e bases de dados disponíveis nestes estudos (Loukas et al., 2007).

1.5 Desenvolvimento de vacinas antiesquistossomose

Considerando que os helmintos do gênero *Schistosoma* possuem dois hospedeiros e que não realizam seu ciclo de vida completo em seres humanos, o desenvolvimento de uma vacina que possa produzir resposta imune protetora parcial, mesmo que não esterilizante, poderia ter um impacto na redução da patologia e limitaria transmissão da doença a longo prazo (Chitsulo et al., 2004; McManus and Loukas, 2008).

1.5.1 Vacina de Cercárias irradiadas

Na busca por uma vacina antiesquistossomose a imunização com cercárias atenuadas por radiação ionizante demonstrou um alto índice de proteção em modelos animais (Minard et al., 1978; Stek et al., 1981). A forma infectante do verme atenuada apresenta um padrão de migração lento no hospedeiro definitivo, sendo tal característica importante na indução da imunidade protetora contra a infecção por *S. mansoni* (Mountford et al., 1988). A maioria das larvas irradiadas morrem nos pulmões aproximadamente no vigésimo primeiro dia após a vacinação, mas pelo menos 25% ainda permanecem na pele por 14 dias (Mountford et al., 1988). A região da pele em que as larvas permanecem produz um foco inflamatório contendo macrófagos e células dendríticas, que capturam os antígenos liberados pela larva e ativam a resposta imune adaptativa nos linfonodos drenantes (Hogg et al., 2003a). Além disso, o microambiente inflamatório na pele também é rico em IL-12, importante citocina na ativação de células T auxiliares do tipo Th1 e na resposta protetora (Hogg et al., 2003a). Por outro lado, a produção de IL-12 na pele também é regulada por IL-10, limitando o aumento da inflamação (Hogg et al., 2003b).

Camundongos da linhagem C57BL/6 imunizados com dose única de cercárias atenuadas de *S. mansoni* induziram proteção em torno de 60 a 70% mediante o desafio com cercárias não-atenuadas, enquanto que em múltiplas vacinações, o índice de proteção aumenta para 73 a 77%. Foi observado que a imunidade protetora induzida por exposição única envolve uma resposta celular de células T CD4⁺ associadas a um perfil de citocinas do tipo Th1, uma vez que, analisando um grupo de animais em que foram aplicados anticorpos monoclonais anti-IFN- γ foi verificado a redução do nível de proteção alcançado. E quando analisado em animais em onde foi feita a neutralização das citocinas IL-4 e IL-5 não alteraram a imunidade protetora desses

animais mediante a infecção por *S. mansoni* (Sher et al., 1990; Smythies et al., 1992). Ao contrário da exposição única às cercárias atenuadas, múltiplas exposições apresentam um mecanismo diferente de imunidade protetora em camundongos. Ocorre o desenvolvimento de resposta do tipo Th2, com produção de altos títulos de IgG (Caulada-Benedetti et al., 1991; Mangold and Dean, 1986).

Embora induzam mecanismos protetores diferentes, tanto a imunização com uma única exposição às larvas atenuadas, quanto à imunização com múltiplas exposições requerem estímulos capazes de gerar respostas imunes humoral e celular. Camundongos deficientes em células B apresentaram proteção reduzida contra o desafio com cercárias após uma única exposição às larvas atenuadas (Jankovic et al., 1999a). O mesmo foi observado em camundongos deficientes em IFN- γ expostos a múltiplas imunizações (Jankovic et al., 1999a).

Entretanto, apesar dos elevados níveis de proteção obtidos em animais, a utilização do modelo de cercárias atenuadas em humanos não seria aplicável, devido à possibilidade do parasito recuperar sua capacidade infectante e ao alto custo envolvido na preparação da larva irradiada (Coulson, 1997; Pearce and MacDonald, 2002). Dessa forma este modelo se torna importante apenas para elucidação dos mecanismos imunológicos responsáveis pela indução da imunidade protetora em modelo experimental.

1.5.2 Antígenos testados pela OMS

Na década de 1990 a Organização Mundial de Saúde (OMS) financiou os testes de 6 antígenos potenciais candidatos a uma vacina antiesquistossomose, utilizando as diversas estratégias vacinais com estas proteínas do *Schistosoma* (Bergquist and Colley, 1998).

Os antígenos estudados foram: paramiosina, utilizado na sua forma nativa (Pearce et al., 1988); antígeno número 5 de vacina com cercárias irradiadas – IrV-5, como proteína recombinante (Soisson et al., 1992); Sm14 como proteína recombinante (Moser et al., 1991; Tandler et al., 1995); Sm28/Glutathione S-transferase – GST, também como proteína recombinante (Auriault et al., 1991; Trottein et al., 1992); triose-fosfatase isomerase – TPI, utilizada em forma de peptídeos sintéticos (Reynolds et al., 1992); e Sm23, também como peptídeos sintéticos. Foram realizados testes independentes com estes antígenos em camundongos e os resultados mostraram que não

foi alcançada proteção superior a 40%, com nenhuma das formulações de vacinas testadas (Bergquist, 1998).

Sm23, uma proteína integral de membrana, membro da família das Tetraspaninas, expressa em diferentes fases do helminto incluindo no tegumento de adultos, resultou em uma proteção de 36-44% após a infecção quando utilizada como vacina de DNA. Já quando testada como proteína recombinante formulada com suspensão de alumínio na forma de sal (alum) não conferiu nenhuma proteção (Da'Dara et al., 2003). Além disso, foram realizados estudos *in vitro* onde se avaliou a resposta humoral e celular humana da Sm23 na forma de peptídeo multiantigênico (MAP3), e verificaram a produção de altos níveis de IgG3 em pacientes resistentes à esquistossomose (Al-Sherbiny et al., 2003).

1.5.3 O Tegumento e a Gastroderme são importantes regiões na seleção de moléculas alvos para estudos de vacinas e compreensão da relação parasito/hospedeiro

As proteínas localizadas na interface parasito/hospedeiro do gênero *Schistosoma* são comumente associadas com mecanismos de escape do sistema imune do hospedeiro ou outra adaptação ao parasitismo, levando a sua sobrevivência por décadas dentro do hospedeiro definitivo (DeMarco and Verjovski-Almeida, 2009). Tais moléculas se tornaram os mais importantes alvos de estudos para desenvolvimento de vacinas e/ou drogas contra o gênero. As superfícies que compõem a interface parasito/hospedeiro são o tegumento e a gastroderme, estas regiões são cobertas por uma camada sincicial citoplasmática de alguns microns de espessura que constituem esta interface com o meio externo (Alan Wilson et al., 2006; Figueiredo et al., 2015b; Skelly et al., 2014).

O tegumento é uma superfície do parasito que promove interação dinâmica com o hospedeiro, envolvida na nutrição, evasão/modulação da resposta imune, excreção, osmoregulação, recepção sensorial e transdução de sinal (DeMarco and Verjovski-Almeida, 2009; Jones et al., 2004; Van Hellemond et al., 2006; Wilson and Coulson, 2006, 2009). É uma estrutura sincicial única, ou seja, o citoplasma do tegumento estende-se como uma unidade contínua em torno do parasito (Smith et al., 1969).

As proteínas que compõem o trato intestinal assim como as do tegumento são incluídas como potenciais alvos vacinais, uma vez que o sistema gastrointestinal do *Schistosoma* é considerado

uma extensão do seu tegumento (Morris and Threadgold, 1968; Zupunski et al., 2003), e dessa forma estão em contato direto com o hospedeiro durante o processo de infecção. Além disso, tais proteínas também fazem parte dos processos fundamentais para a sobrevivência e desenvolvimento do parasito durante o processo de estabelecimento da infecção nos hospedeiros humanos.

Gastroderme é um epitélio sincicial com muitos compartimentos vacuolares, vilosidades irregulares e inúmeras lamelas que se projetam para o lúmen que recuperam toda a superfície do aparelho digestivo (Figueiredo et al., 2015b; Morris and Threadgold, 1968; Skelly et al., 2014). A principal função do trato digestivo dos helmintos é digerir macromoléculas adquiridas a partir do sangue do hospedeiro mamífero, e para absorver produtos solúveis (Hall et al., 2011). Quanto à nutrição do *Schistosoma*, esta, baseia-se na ingestão de hemácias dos vasos onde esses parasitos estão alojados. Um aglomerado de hemácias é ingerido e acumulado no lúmen do esôfago anterior. Movimentos peristálticos conduzem, em seguida, este bolo sanguíneo para o compartimento posterior e finalmente para o intestino anterior. Trabalhos recentes revelaram que o esôfago tem um papel central no processamento do sangue, e não sendo considerado simplesmente como uma via de condução das hemácias ao longo da gastroderme até o intestino (Li et al., 2013; Skelly et al., 2014). O esôfago é uma região rodeada pela glândula esofágica na sua porção posterior (Skelly et al., 2014). A glândula esofágica é responsável pela secreção de enzimas digestivas no lúmen do esôfago tais como, moléculas que irão rapidamente lisar os eritrócitos a partir da entrada do sangue no compartimento esofágico posterior (Bogitsh and Carter, 1977; Li et al., 2013).

1.5.3.1 Estudos com novos antígenos vacinais de *Schistosoma*

Uma vez que os antígenos sugeridos pela OMS não obtiveram a resposta protetora desejada, outros estudos foram realizados na tentativa de se conseguir novos alvos potenciais para a produção de uma vacina contra a esquistossomose. A imunização de animais com antígenos do *Schistosoma* purificados na sua forma nativa; a imunização com proteínas recombinantes, que são produzidas em larga escala de forma heteróloga; a imunização com genes que codificam os antígenos protéicos do verme em forma de vacinas de DNA, que possuem a vantagem de produção em larga escala de maneira menos onerosa, além de serem mais estáveis que as proteínas recombinantes; e a imunização com peptídeos sintéticos contendo epitopos

imunodominantes de proteínas do parasito, que possuem a vantagem de não requerem purificação, tem se tornado abordagens atuais para determinação de potenciais alvos vacinais.

Proteínas expostas na superfície do helminto são as que apresentam os resultados mais promissores quando testadas como vacina. Em testes realizados com o tegumento purificado do *S. mansoni* (Smtg) verificou-se que induziu proteção parcial de 43-48% em modelo murino (Araujo et al., 2012). Proteínas do tegumento também foram testadas isoladamente para avaliação da proteção contra *S. mansoni* e resultados promissores foram alcançados. Em um estudo realizado em nosso laboratório demonstrou o potencial da proteína do tegumento Sm29 como candidato vacinal contra a esquistossomose. Obteve-se proteção com Sm29 recombinante (rSm29) em camundongos C57BL/6, onde, apresentaram 51% de proteção e 50% de redução do número de granulomas hepáticos (Cardoso et al., 2008). O antígeno rSmTSP-2 também apresentou um resultado promissor em nível de proteção, onde, alcançou redução de 57% do número total de vermes adultos recuperados por perfusão (Tran et al., 2006). Estes mesmos antígenos também foram avaliados, na formulação de vacina de DNA, pelo nosso grupo de pesquisa, e foi verificado a redução da carga parasitária em animais imunizados com o plasmídeo pUMVC3/Sm29 de 17-22%, pUMVC3/SmTSP-2 de 22%, quando testadas em conjunto pUMVC3/Quimera e pUMVC3/Sm29 + pUMVC3/SmTSP-2 obteve-se redução do número de helmintos maior, de 31-32 % e 24-32%, respectivamente (Goncalves de Assis et al., 2015).

Outro antígeno expresso no tegumento é a Sm22.6, uma molécula presente em esquistossômulos de pulmão, foi testada na forma de vacina de DNA e proteína recombinante, mas apenas a recombinante proporcionou redução na carga de helmintos adultos (34%) e induziu um tipo misto Th1/Th2 de resposta imune (Pacífico et al., 2006).

A proteína Sm200 kDa está no tegumento ancorada a proteínas GPI (glycosylphosphatidylinositol), esta não possui função conhecida (Sauma and Strand, 1990; Sauma et al., 1991), sua caracterização imunológica foi realizada através da imunização na forma de vacina de DNA complexado com sulfato de protamina como adjuvante. A proteção foi determinada com 38,1 % de redução da carga parasitária (Sauma and Strand, 1990; Sauma et al., 1991). Outro antígeno testado foi a subunidade grande da calpaína (Smp80). Como proteína recombinante obteve-se proteção de 29-39 % (Hota-Mitchell et al., 1997). Como vacina de DNA utilizando unicamente plasmídeos contendo a Smp80, a proteção foi de 39%. Outros testes foram realizados e a vacina de DNA foi combinada com a citocina IL-2 promovendo 57 % de proteção (Siddiqui et al., 2003).

As proteínas presentes no trato digestivo do *Schistosoma* também revelaram potencial vacinal quando avaliadas em modelo murino. A vacinação com antígeno Sm10.3, presente na glândula esofágica (DeMarco et al., 2010), promoveu redução em 32% da carga de helmintos recuperados e reduziu os efeitos da patologia gerada pela infecção por *S. mansoni*, uma vez que menos de 43,6% dos ovos foram encontradas no fígado e houve uma redução significativa do número, tamanho e fibrose de granulomas, 23,8%, 11,8%, e 39,8 % , respectivamente (Martins et al., 2014).

A Catepsina-B1 *Schistosoma mansoni* (SmCB1) é a papaína mais abundante das cisteíno peptidase expressa na gastroderme do parasito, e secretada no lúmen do intestino. A utilização da SmCB1 como vacina recombinante reduziu significativamente a carga parasitária em 66-73 % , o número de ovos no fígado (51%), e no intestino delgado (25%) (Sajid et al., 2003).

Superoxidase dismutase é encontrada em toda extensão do tegumento e gastroderme. A localização desta proteína sugere o desenvolvimento de mecanismos antioxidantes pelo parasito para proteger-se contra a resposta celular do hospedeiro e também contra os produtos de oxidação da hemoglobina (Mei and LoVerde, 1997). A vacinação utilizando este antígeno na formulação de uma vacina de DNA gerou proteção em camundongos contra infecção de *S. mansoni* reduzindo a carga parasitária em 54%.

Em mais um trabalho realizado por nosso grupo (Figueiredo et al., 2014), foi determinado a localização da proteína Sintenina (SmSynt) ao longo da gastroderme de *S. mansoni* e avaliado o seu pontencial como uma vacina recombinante. O efeito protetor conferido pela vacinação com rSmSynt foi demonstrado pela redução da carga de helmintos adultos em 30-37 % , redução no número e na área dos granulomas presentes no fígado de 38-43 % , e 35-37 % respectivamente.

1.6 Proteases e Inibidores de proteases são importantes na infecção e no desenvolvimento dos Helmintos

Helmintos do gênero *Schistosoma* podem sobreviver em seu hospedeiro humano em média 30 anos, e fica claro que esses parasitos desenvolveram estratégias para modular a resposta imune do hospedeiro através de mecanismos moleculares que somente recentemente vêm começando a serem compreendidos (Maizels et al., 2001; Pearce et al., 2004). Alguns avanços foram

realizados na identificação de fatores que são fundamentais para a virulência do parasito e a patogênese das doenças desencadeadas por eles. Entre os fatores mais estudados estão as proteases e os inibidores de proteases derivados dos parasitos.

As proteases são enzimas amplamente distribuídas na natureza e são encontradas de maneira ubíqua em eucariotos, procariotos e vírus. Elas realizam reações proteolíticas e hidrólise da ligação peptídica com base nos importantes grupos químicos em seus locais ativos. As proteases são tipicamente categorizadas em 4 classes principais: serino, metalo, cisteíno e aspártico proteases. Elas estão envolvidas em vários processos fisiológicos fundamentais em invertebrados que possuem paralelo com processos existentes em animais, como, por exemplo, bloqueio de canais iônicos, coagulação sanguínea e a resposta imune inata de alguns animais (Agarwala et al., 1996; Wan et al., 2013; Yuan et al., 2008). Além de seus papéis na fisiologia dos organismos, eles também desempenham papéis cruciais na patogênese de uma série de doenças, como doença cardiopulmonar e enfisema (Tetley, 1993). Durante o processo de infecção acredita-se que as proteases possam desempenhar papéis no estabelecimento e manutenção do parasito, sendo estes fatores significativos para o parasito estabelecer com sucesso a infecção.

Os inibidores de proteases também tem papel crucial no desenvolvimento do parasito. Estudos recentes revelaram que os inibidores de proteases dos trematódeos são críticos para a sobrevivência e a defesa desses helmintos frente ao sistema imunológico de seus hospedeiros vertebrados (Mebius et al., 2013). Alguns helmintos se desenvolvem e residem nos vasos sanguíneos, podendo atingir órgãos como intestino, pulmões, bexiga e fígado. E o *Schistosoma* é um exemplo de helminto que utiliza proteases e inibidores de proteases para invadir os tecidos do hospedeiro, bem como para sua nutrição e no seu desenvolvimento (Ranasinghe and McManus, 2017).

A fim de caracterizar tais moléculas vários estudos de proteoma, secretoma de adultos (Sotillo et al., 2016; Zhang et al., 2013), ovos (Cass et al., 2007), cercárias (Curwen et al., 2006; Knudsen et al., 2005), e miracídio (Wang et al., 2016; Wu et al., 2009) foram realizados. As evidências genômicas, transcriptômicas e proteômicas disponíveis até o momento indicaram que os mais abundantes grupos de inibidores de proteases são: a família de inibidores de serino proteases e de inibidores de cisteíno proteases (Robinson et al., 2008). No entanto, a família das serino proteases são as proteases mais abundantes representada no genoma humano (Puente et al., 2003), sugerindo que os parasitos do gênero *Schistosoma* evoluíram para sobreviver em seus

hospedeiros humanos, produzindo inibidores de protease derivados de parasitos que visam especificamente as proteases humanas mais abundantes.

A maioria dos inibidores de proteases de helmintos até então caracterizados estão presentes em vesículas extracelulares e possuem papéis importantes no estabelecimento e manutenção da infecção (de la Torre-Escudero et al., 2016). Em vesículas secretadas por *Fasciola hepatica* foram identificados vários inibidores de serino proteases, incluindo um peptídeo com seis domínios Kunitz (Cwiklinski et al., 2015), e várias serpinas presentes nas vesículas extracelular do *S. mansoni* (Cwiklinski et al., 2015).

Os inibidores de protease derivados de parasitos também podem ser importantes como alvos de diagnóstico, bem como vacinas contra infecções. Imunoensaios foram desenvolvidos utilizando serpinas para detecção sorológica de espécies específicas causadoras da esquistossomose (Tanigawa et al., 2015), e este potencial imunodiagnóstico provavelmente resultou dos papéis fisiológicos cruciais desempenhados pelas serpinas nas interações *Schistosoma*/hospedeiro. Outro bom exemplo são as serpinas de carrapatos, estas se mostraram promissoras como alvos vacinais contra infestações de carrapato (Andreotti et al., 2012; Muleng et al., 2001), e uma serpina, na formulação de proteína recombinante, de *S. japonicum* induziu resposta imune do tipo Th2 e proteção parcial contra a esquistossomose japonesa (Yan et al., 2005).

1.6.1 Inibidores de serino proteases do tipo Kunitz e suas importantes funções em helmintos

A família de inibidores do tipo Kunitz, também, possuem como alvo as serino proteases (Choo et al., 2012; Wan et al., 2013). Os inibidores de serino proteases do tipo Kunitz são ubíquos, existem em múltiplas formas e são encontrados em quase todos os eucariotos. Este domínio consiste em cerca de 60 resíduos de aminoácidos que apresentam características, tais como o padrão de ligação das pontes de dissulfeto (C1-C6, C2-C4 e C3-C5), que contribuem para a natureza estável do peptídeo maduro enovelado e um aminoácido na posição P1, que corresponde à especificidade de suas enzimas cogatas (Laskowski and Kato, 1980; Yuan et al., 2008). O resíduo P1 é o principal determinante da energia e especificidade do reconhecimento da protease pelos inibidores com domínio Kunitz.

O inibidor de protease do tipo Kunitz derivado de *F. hepatica*, Fh-KTM, foi a primeira proteína identificada com estrutura do tipo Kunitz da espécie (Falcon et al., 2014) e localizada no trato intestinal e no tegumento do parasito adulto. Mesmo com o domínio kunitz, o Fh-KTM não exibiu atividade inibitória contra serino proteases, mas inibiu potentemente as cisteíno proteases, como FhCL1 e FhCL2, de *F. hepatica* e catepsinas humanas K e L. Sendo Fh-KTM, possivelmente importante na regulação das principais proteases secretadas pelo próprio parasito e/ou proteases de tipo catepsina L do hospedeiro mamífero (Smith et al., 2016). Fh-KTM regula negativamente a maturação das células dendríticas, e é responsável pela supressão da produção de citocinas pró-inflamatórias em dendríticas ativadas por LPS, modulando dessa forma respostas inflamatórias. Pode-se sugerir que Fh-KTM tenha um papel modulador, que pode estar envolvido nos mecanismos de evasão imune de *F. hepatica* (Falcon et al., 2014).

Helminhos do gênero *Schistosoma* se mantêm vivos nos vasos sanguíneos de seus hospedeiros mamíferos promovendo, através da secreção de moléculas, uma modulação da resposta imune do hospedeiro (Mebius et al., 2013) e entre essas moléculas estão inibidores de proteases do tipo Kunitz. Em *Schistosoma* spp., foram identificados inibidores com domínio kunitz através de uma avaliação cuidadosa de seus genomas. Um inibidor de serino protease de *S. japonicum*, SjKI-1 foi expresso e funcionalmente caracterizado. SjKI-1 possui propriedades anti-inflamatórias anticoagulantes (Ranasinghe et al., 2015b). Além disso, o SjKI-1 é capaz de se ligar ao cálcio, que desempenha um papel fundamental na coagulação do sangue, uma vez que muitas das reações envolvidas são dependentes de Ca^{2+} e, portanto, SjKI-1 pode contribuir para a interrupção da cascata de coagulação ao reduzir o nível de Ca^{2+} livre disponível para estas reações (Ranasinghe et al., 2015b).

Recentemente foi identificado o inibidor de serino proteases do tipo Kunitz de *S. mansoni*, SmKI-1, o primeiro pertencente a família Kunitz da espécie (Ranasinghe et al., 2015a). Esta molécula é capaz de inibir tripsina e elastase neutrofílica. A elastase é uma serino protease que é produzida por neutrófilos ativados e secretada na resposta inflamatória, bem como o início da coagulação do sangue induzindo a secreção do fator tecidual (Alam et al., 2012; Nathan, 2006).

Devido o potencial que inibidores de proteases secretados vêm apresentando em diversos estudos, estes emergem como promissores fármacos para tratamento de doenças inflamatórias. Ainda levando em consideração que nenhum antígeno do *S. mansoni* tenha alcançado altos níveis de proteção como vacina, pretende-se caracterizar neste trabalho funcionalmente e imunologicamente a proteína SmKI-1.

2 JUSTIFICATIVA

A esquistossomose é uma importante doença parasitária em muitos países em desenvolvimento, incluindo o Brasil. Apesar de a quimioterapia ser uma importante estratégia no combate a essa enfermidade, ela não tem sido eficiente na redução da prevalência e dos índices de reinfecção devido às condições precárias de saneamento e também o acesso ao medicamento, muitas vezes difícil em áreas endêmicas, fazendo com que o tratamento fique oneroso. Além disso, casos de baixa eficiência do praziquantel, devido ao surgimento de cepas do parasito resistentes, já foram relatados.

A associação de vacinas com a quimioterapia seria uma boa estratégia de combate à esquistossomose, já que o tratamento quimioterápico propicia a redução da carga parasitária em curto prazo e a vacinação propicia uma resposta imune protetora de longa duração. Com isso, é essencial o conhecimento das moléculas e suas funções na fisiologia do parasito para que se possa associar essas funções na compreensão da relação parasito/hospedeiro humano. E dessa forma utilizar deste conhecimento no desenvolvimento de alvos terapêuticos como vacinas, diagnósticos e quimioterápicos.

Considerando, ainda, que diversos antígenos avaliados em busca de uma vacina eficiente não alcançaram níveis de proteção satisfatórios, como os níveis alcançados com cercárias atenuadas. Este trabalho estuda o potencial do antígeno *SmKI-1*, expresso em fases do *S. mansoni* em contato direto com hospedeiro humano, como alvo vacinal para o controle da esquistossomose. Acredita-se que a proteína *SmKI-1* faça parte de processos fundamentais para o desenvolvimento do parasito no interior do hospedeiro humano, incluindo uma função na coagulação permitindo a nutrição do helminto e também envolvido em processos inflamatórios relacionados ao controle e à evasão do sistema imune. Além disso, a acessibilidade da *SmKI-1* na superfície do tegumento e trato digestivo de *S. mansoni* torna o antígeno um novo candidato para o desenvolvimento drogas e ou vacinas contra esquistossomose podendo ainda extrapolar tal conhecimento e aplicá-lo ao desenvolvimento de drogas anti-inflamatórias.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar funcionalmente e imunologicamente a proteína de *SmKI-1* (Smp_147730) do *S. mansoni*.

3.2 Objetivos Específicos

1. Analisar por bioinformática o domínio Kunitz da *SmKI-1* e determinar por *docking* a interação dessa molécula com a enzima alvo, elastase;
2. Verificar a expressão de mRNA da *SmKI-1* em diferentes estágios do helminto *S. mansoni*;
3. Expressar em *E. coli* e purificar a proteína *SmKI-1* recombinante e suas porções N- e C-terminais;
4. Determinar a localização da proteína *SmKI-1* em esquistossômulos através de imunolocalização;
5. Avaliar sobrevivência e desenvolvimento de esquistossômulos silenciados com siRNA-*SmKI-1 in vitro e in vivo*;
6. Realizar o ensaio de inibição enzimática de serino proteases com a proteína *SmKI-1*, Domínio KI e C-terminal recombinantes;
7. Avaliar o potencial inibitório da *SmKI-1* e suas porções em cultura de neutrófilos;
8. Avaliar a inibição da resposta inflamatória do modelo APAP, artrite e pleurisia induzida por carragenina utilizando a *SmKI-1* recombinante;
9. Avaliar os níveis de proteção da vacinação de camundongos com *SmKI-1*;
10. Avaliar o perfil da resposta humoral e celular produzidos após a imunização de camundongos C57BL/6 com a proteína *SmKI-1* recombinante;
11. Verificar a redução do número e área dos granulomas presentes no fígado de camundongos vacinados;

4 MÉTODOS

4.1 Camundongos e cercárias

Fêmeas de camundongos C57BL/6 ou C57BL/6 TLR4 KO (*knockout* para o receptor Toll-like receptor 4), com idade entre 7 e 8 semanas, foram obtidas no biotério central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). As cercárias de *S. mansoni* (cepa LE) foram mantidas em caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* e preparadas por exposição à luz por duas horas, no Centro de Pesquisas Rene Rachou (CPqRR/Fiocruz). A contagem do número de cercárias suficientes para a infecção foi realizada com lupa acoplada à luz utilizando lugol. Todos os procedimentos envolvendo animais utilizados nesse trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal – CETEA, número de protocolo 179/2010 e 185/2017.

Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich, CO (St. Louis, MO, EUA), quando utilizado reagentes de outras empresas são indicados.

4.2 Análise *in silico* e modelagem da proteína SmKI-1, um inibidor de serino protease do tipo Kunitz do *Schistosoma mansoni*

As comparações da sequência da proteína SmKI-1 (Smp_147730, número de acesso CCD77156.1.) com outras sequências do banco de dados de proteínas foram realizadas usando o software BLASTp do banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Além disso, foi utilizada a pesquisa do banco de dados do *Conserved Domain* (CDD-Search) no site NCBI para comparar identidade e similaridade de motivos com domínios conservados conhecidos. Os alinhamentos das sequências foram obtidos pelo software CLUSTAL OMEGA, editado utilizando BIOEDIT e refinado utilizando o BoxShade. As propriedades físico-químicas da proteína deduzida foram determinadas pelo software *Protein Machine* disponível no site Expasy (<http://us.expasy.org/tools/>). A predição de probabilidade de desordem foi realizada usando os algoritmos COILD, que calcula a probabilidade de que a sequência adote uma conformação em *coiled-coil*.

Devido à inexistência de estruturas 3D da proteína SmKI-1 em bancos de dados, uma abordagem híbrida para as previsões de estrutura 3D foi escolhida para gerar uma estrutura precisa e atômica do domínio Kunitz da SmKI-1. Três etapas principais foram envolvidas na

modelagem. Em primeiro lugar, todas as sequências representativas de inibidores de Kunitz foram submetidas ao servidor web *ITASSER*, incluindo a especificação de homólogos *Tissue Factor Pathway Inhibitor* (TFPI) (código de acesso PDB: 4BQD) como modelos adicionais. O modelo do *C-score* mais alto foi então escolhido para prosseguir. Em segundo lugar, as pontes de dissulfeto foram minimizadas utilizando o MODELLER v9.17, que é um programa usado para modelagem baseado na homologia comparativa de estruturas protéicas. MODELLER v9.17 foi baixado do site do laboratório Andrej Sali (<https://salilab.org/modeller/>). As etapas básicas envolvidas na modelagem por homologia usando MODELLER foram: a seleção do modelo inicial usando PSI-BLAST, a seleção final do modelo e o alinhamento da sequência de consulta com a estrutura do modelo, construindo o modelo com base no modelo final selecionado, seguido da avaliação do modelo, simulação de procedimento MD e a validação utilizando o gráfico de Ramachandran.

4.3 Docking molecular do domínio Kunitz da proteína *SmKI-1* com elastase neutrofílica

Antes da realização do *Docking*, o domínio Kunitz da *SmKI-1* foi minimizado com o software MacroModel (Schrodinger versão 2015-3), empregando o campo de força OPLS_2005, um modelo de solvente de água implícito e o método de minimização de gradiente Conjugado Polak-Ribiere (PRCG), com um máximo de 2500 interações e convergências com base no gradiente de energia, com um limite de 0,05 kJ/Å-mol. Durante a minimização, as ligações de dissulfeto entre os três pares de cisteínas (Cys⁷-Cys⁵⁷, Cys¹⁶-Cys⁴⁰, Cys³²-Cys⁵³) foram mantidas como restrições. O acoplamento molecular foi realizado com o servidor web ClusPro 2.0, desenvolvido para armazenamento de proteína-proteína (Kozakov et al., 2017). O modelo do domínio Kunitz da proteína *SmKI-1* foi encaixado na estrutura da elastase neutrofílica humana extraída de um complexo cristalográfico com um inibidor de *Staphylococcus aureus* (código de adesão PDB 4NZL) (Stapels et al., 2014)

Foi analisado o melhor modelo de pontuação, com base na função de pontuação equilibrada. A análise da predição da interface proteína-proteína foi realizada com "Interfaces de proteínas, superfícies e montagens" no servidor PISA de, no Instituto Europeu de Bioinformática. O site (http://www.ebi.ac.uk/pdbe/prot_int/pistart.html) foi utilizado para calcular interações e propriedades de interface (Krissinel and Henrick, 2007). O complexo também foi analisado manualmente com o software Pymol.

4.4 Análise da expressão gênica da *SmKI-1* em diferentes fases do ciclo do *S. mansoni*

4.4.1 Extração de RNA

Foram utilizadas amostras dos estágios de ovo, miracídio, cercária, esquistossômulo e adulto (macho e fêmea). Todas as amostras foram armazenadas em trizol e maceradas utilizando-se um homogeneizador elétrico com um pistilo de plástico acoplado à sua extremidade. Cada amostra foi macerada 3 vezes durante 30 segundos com intervalos de 15 segundos incubados em gelo. O volume de cada amostra foi completado para 1 mililitro (mL) de Trizol (Invitrogen). Essas amostras foram mantidas à temperatura ambiente por no mínimo 5 minutos. Para cada 1 mL de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) utilizado foi adicionado 200µL de Clorofórmio (LabSynth, Diadema, SP, Brasil).

As amostras foram homogeneizadas por 1 minuto a temperatura ambiente e permaneceram 2 minutos em repouso. As fases orgânica e inorgânica foram separadas através de centrifugação a 16.000xg (força-g) por 15 minutos a 4° C. A fase inorgânica, que contém o RNA, foi cuidadosamente transferida para um tubo novo e o RNA foi extraído segundo manual do fabricante utilizando-se o kit Quiagen RNeasy (Quiagen, Hilden, Alemanha). A qualidade dos RNAs foi analisada através de gel de agarose 1%, amostras aplicadas com BlueGreen Loading Dye I (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil). A concentração do RNA foi dosada utilizando um NanoDrop® ND-1000 espectrofotômetro.

4.4.2 Síntese de cDNA

Após o tratamento com DNase, 1,5 µg de RNA total foi utilizado como molde para a síntese de cDNA. A síntese ocorreu em um volume final de 20 µL contendo 25 ng/µL de oligodT12-18, 10 mM de cada dNTP, 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM KCl, 3mM MgCl₂, 10 mM de DTT e 200 unidades da transcriptase reversa (SuperScript™ II RNase H- Reverse Transcriptase - Invitrogen), com incubação a 42°C por 50 minutos. Posteriormente, a enzima foi desnaturada a temperatura de 70°C por 15 minutos. As amostras de cDNA foram dosadas em NanoDrop® ND-1000 espectrofotômetro e diluídas para a concentração de 50 ng/µL.

4.4.3 PCR em Tempo Real

Para análise de expressão diferencial de genes, oligonucleotídeos iniciadores referentes à sequência de cDNA de *SmKI-1* foram desenhados (Tabela 1). Os iniciadores foram desenhados através do software Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As reações da PCR foram efetuadas no equipamento ABI 7900 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA) utilizando SYBR® Green para detecção das fitas duplas de DNA sintetizadas. O volume das reações foi de 20 µL, contendo 10 µL de SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems), 250 nM de cada oligonucleotídeo e 2,5 µL da solução contendo cDNA da amostra composta de cada fase do helminto. Amostras de cDNA das diferentes fases de desenvolvimento de *S. mansoni* foram utilizadas nas análises. As condições de amplificação utilizadas consistiram de aquecimento a 60°C durante dez minutos, 95°C por dez minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os dados foram analisados conforme o método comparativo do ciclo limiar (CT), de acordo com a equação $2\Delta\Delta Ct$ (Relative Quantification getting started guide for the 7300/7500 System e User Bulletin #2: ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystem). A presença de produto de amplificação não específica foi verificada pela curva de dissociação. A curva de dissociação representa a relação entre temperatura e quantidade de emissão de fluorescência da reação da PCR, sendo os dados coletados no intervalo entre 60°C a 95°C. Caso ocorresse a amplificação de mais de um produto, diferentes temperaturas de dissociação seriam detectadas.

Cada amostra de cDNA foi amplificada em triplicata e o experimento foi realizado em duplicata. Os valores obtidos através de amplificação com os iniciadores para *SmKI-1* foram normalizados de acordo com os valores de amplificação do gene NADH desidrogenase, controle endógeno, os primers correspondentes estão na tabela 1. Os valores de amplificação do cDNA referentes a cada amostra foram obtidos através de normalização considerando o valor obtido para os parasitos adultos com o valor de 100%, e com demais valores de amplificação foram calculados em relação ao adulto.

Tabela 1 – Primers utilizados na PCR em tempo real.

Primers	
<i>SmKI-F</i>	5'-GTGGATGTCTTGGAAATGG-3'
<i>SmKI-R</i>	5'-CAACGCTGAGTGGTTTCTGA-3'
<i>NADH F</i>	5'-GGTGGGGGTAGGTGTGAAGT-3'
<i>NADH R</i>	5'-AAATAAAAGCCCCAGAAACACA-3'

4.5 Silenciamento do gene *SmKI-1*

4.5.1 Produção de esquistossômulos (transformação)

Após a exposição dos caramujos à luz, as cercárias liberadas foram coletadas com o auxílio uma membrana com poros de 25 µm. As cercárias foram lavadas com água declorada e ressuspensas em Meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) acrescido de antibiótico Penstrep 1%. As cercárias foram transferidas para tubos de ensaio de fundo cônico e estes foram mantidos em gelo de forma que todo o volume da suspensão de cercárias ficasse imerso. Após 20 minutos, os tubos foram submetidos ao vórtex por 3 minutos e novamente imersos no gelo por pelo menos 2 minutos. Esse procedimento foi repetido por três ou quatro vezes até que as caudas das cercárias se desprendessem dos corpos. As caudas foram separadas dos corpos por meio de centrifugação em gradiente de percoll 30%. Os corpos das cercárias (esquistossômulos) foram coletados e cultivados em DMEM completo (10% soro fetal bovino, 1% penstrep, cDMEM) a 37°C e 5% CO₂ para serem utilizados em outros ensaios.

4.5.2 Supressão gênica com siRNA

Para o gene da *SmKI-1*, dois siRNAs foram sintetizados pela empresa Integrated DNA Technologies, Inc. (<http://www.idtdna.com/site>) e utilizados para suprimir a expressão gênica (Tabela 2). Estes foram si*SmKI-1I* e si*SmKI-1II*. A sequência de DNA nomeada *SmKI-1I* de DNA codificante que se estende entre as posições 135-160 e a sequência de DNA nomeada *SmKI-1II* de DNA codificante que se estende entre as posições 178-203. A sequência utilizada como controle para o siRNA irrelevante está indicada na tabela 2. Todos os siRNAs foram desenhados com a ajuda do programa online IDT RNAi *design Tool* (<https://www.idtdna.com/Scitools/Applications/RNAi/RNAi.aspx>). Os siRNAs foram

administrados aos parasitos por meio de eletroporação como descrito anteriormente (Krautz-Peterson et al., 2010). Adicionou-se 50 µL de tampão de eletroporação (BioRad, Hercules, EUA) nas amostras de esquistossômulos de 1 ou 7 dias após a transformação (1000 parasitos). A concentração final de siRNA foi de 2,5µg para o volume de 50µL (2,8µM) contendo os esquistossômulos. Os parasitos foram eletroporados em cubetas estéreis de 4 mm (BioRad, Hercules, Califórnia, EUA) pela aplicação de uma onda quadrada com um pulso único a 125V com a duração de 20ms à temperatura ambiente. Em seguida, os parasitos foram transferidos para meio de cultura cDMEM e incubados à 37°C com 5% CO₂, durante 6 semanas. Em intervalos de uma semana após a eletroporação, alguns dos parasitos foram coletados para análises de qRT-PCR e *western blot* para avaliar a supressão gênica e protéica, respectivamente.

Tabela 2 – Sequências dos siRNAs utilizados neste trabalho.

siRNAs	
<i>SmKI-1I</i>	5'- CTACGACAGTGTAATCAAACCTTGT-3'
<i>SmKI-1II</i>	5'-GGATGTCTTGGAAATGGAAACAAC-3'
siRNA irrelevante	5'-CTTCCTCTCTTTCTCTCCCTTCTCA-3'

4.5.3 Análises fenotípicas

Após a confirmação da supressão gênica da *SmKI-1*, os parasitos de todos os grupos experimentais foram mantidos em cultura e monitorados por algumas semanas para a avaliação de qualquer possível alteração no desenvolvimento ou comportamento. Além disso, foram feitas imagens dos parasitos de cada grupo em um microscópio invertido (Imagiologia EVOS® FL celular, LifeTechnologies, Carlsbad, CA, EUA), e a área ocupada por cada esquistossômulo foi medida para avaliação do crescimento dos parasitos em cultura utilizando o software ImageJ (US National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA). Para análise da viabilidade dos parasitos em cultura, adicionou-se 1mg/mL Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) às culturas à temperatura ambiente. Após 10 minutos, os parasitos mortos (Hoechst positivo) foram contados no microscópio, utilizando um filtro de leitura de 460 nm.

4.5.4 Infecção com esquistossômulos silenciados com siRNA-*SmKI-1*

Para análise *in vivo*, dois grupos de camundongos C57BL/6 fêmeas (10 animais por grupo) foram incluídos neste estudo. Cada grupo recebeu uma dose de 50 µL via intramuscular contendo 500 esquistossômulos. Um grupo recebeu 500 esquistossômulos eletroporados com siRNA controle, e outro grupo recebeu 500 esquistossômulos eletroporados siRNA-*SmKI-1*. Quarenta e cinco dias após a injeção com os esquistossômulos, os helmintos adultos foram perfundidos à partir da veia porta, conforme descrito anteriormente (Figueiredo et al., 2015a). Foram realizados dois experimentos independentes para determinar os níveis de sobrevivência de *S. mansoni*.

4.6 Clonagem, expressão e purificação da *SmKI-1* e suas porções, domínio Kunitz e C-terminal

4.6.1 Construção das moléculas

O plasmídeo pJexpress414 contendo a sequência para r*SmKI-1* (pJ414::*SmKI-1*) foi construído pela empresa DNA 2.0, Inc. EUA (<https://www.dna20.com>) utilizando algoritmos de otimização da sequência gênica para a expressão em *Escherichia coli*. A sequência de nucleotídeos enviada para empresa DNA 2.0 e o plasmídeo selecionado para expressão estão representados nas figuras 4 e 5.

SmKI-1

ATG CGC AAA GGT AAC TCG GAC **TGC** CTG CTG GAC TAC GAT GAA GGT ATC
TGT CGC GCA TTG CTG AAG CGT TTC TAT TAC GAT AGC GTG AAT CAA ACC
TGT GAG ATC TTT TAC TAT GGC GGT **TGC** CTG GGC AAC GGC AAC AAC TTT
 TTG AGC AAA GAT GAG **TGT** GAG CGT AAA **TGC** GGT GGC CAG ACG ACG AAT
 CGT ACC GAG ACT AGC TCC GAA ACC AGC AAA CAA ATG GAA ACC ATT AGC
 ACC TCC ATT GAT AAA AGC GAC AAT AGC GAA ACC ACG ATT ACG ACG CAG
 AAA CCG CTG AGC GTC GGT GCG AAG ATC GTT CTG GGT ATC CTG GAC ATT
 AAG AAC AAG GTT TCT AAT CTG TTC AAA AAG ATC AAG GGT GAG AAG CTG
 GAG

Figura 4 – Sequência nucleotídica de cDNA do antígeno Smp_147730 otimizada pela empresa DNA 2.0, utilizada neste trabalho. Em amarelo estão representadas as tríades correspondentes ao aminoácido cisteína ao longo da sequência nucleotídica da *SmKI-1*.

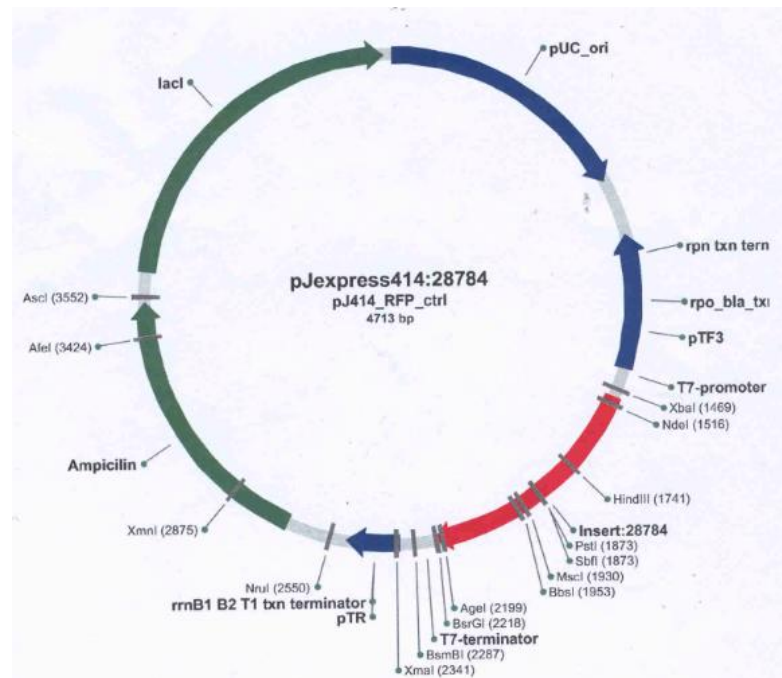


Figura 5 – Vetor de expressão pJexpress414 utilizado para expressão da proteína *SmKI-1*-DNA 2.0, Califórnia, EUA.

Além disso, o domínio Kunitz (domínio KI) e a cauda c-terminal (C-Terminal) da proteína *SmKI-1* foram clonados em um vetor pET28a (Addgene, Cambridge, MA, EUA), nos sítios de restrição *NdeI* e *XhoI*. Os primers utilizados para amplificação das duas porções estão demonstrados na tabela 3. Os fragmentos da reação em cadeia da polimerase (PCR) correspondentes foram: domínio KI (Arg²²-Thr⁸² N-terminal) e C-terminal (Gli⁷⁹-Glu¹⁴⁶ C-terminal). As sequências de nucleotídeos otimizadas de cada porção que foram clonadas estão representadas na figura 6 e o plasmídeo selecionado para expressão das mesmas representado na figura 7.

Tabela 3 – Sequência dos primers utilizados para amplificação das porções.

Primers	
Domínio KI F	5'- CGAGGCATATGATGCGCAAAGGTAAC-3'
Domínio KI R	5'- ATCTCGAGCGTCTGGCCACC-3'
C-terminal F	5'- CGAGGCATATGGGTGGCCAGACGAAT-3'
C-terminal	5'- ATCTCGAGCTCCAGCTTCTCACC-3'

Domínio Kunitz

ATG CGC AAA GGT AAC TCG GAC TGC CTG CTG GAC TAC GAT GAA GGT ATC
 TGT CGC GCA TTG CTG AAG CGT TTC TAT TAC GAT AGC GTG AAT CAA ACC
 TGT GAG ATC TTT TAC TAT GGC GGT TGC CTG GGC AAC GGC AAC AAC TTT
 TTG AGC AAA GAT GAG TGT GAG CGT AAA TGC GGT GGC CAG ACG

C-terminal

GGT GGC CAG ACG AAT CGT ACC GAG ACT AGC TCC GAA ACC AGC AAA CAA
 ATG GAA ACC ATT AGC ACC TCC ATT GAT AAA AGC GAC AAT AGC GAA ACC
 ACG ATT ACG ACG CAG AAA CCG CTG AGC GTC GGT GCG AAG ATC GTT CTG
 GGT ATC CTG GAC ATT AAG AAC AAG GTT TCT AAT CTG TTC AAA AAG ATC
 AAG GGT GAG AAG CTG GAG

Figura 6 – Sequências do domínio Kunitz e C-terminal otimizadas. Em verde região utilizada para desenhar os primers e em amarelo as tríades referente às cisteínas presentes na sequência do domínio Kunitz. Foi adicionado um códon de iniciação (uma metionina) em ambas a sequências das proções trabalhadas.

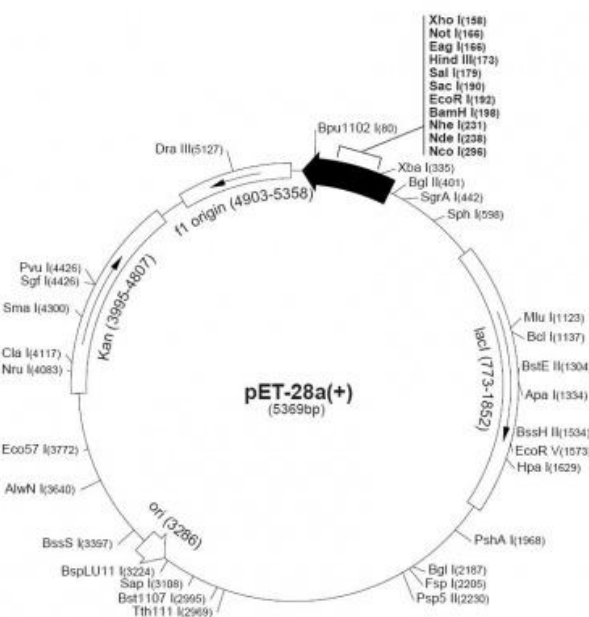


Figura 7 – Vetor de expressão pET-28a utilizado para expressão do Domínio Kunitz e C-terminal. Addgene, Cambridge, MA, EUA.

4.6.2 Expressão, purificação e caracterização da *SmKI-1* e suas porções

As construções foram transformadas em baterias competentes de *E. coli* da linhagem *Rosetta*TM (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). As células transformadas com plasmídeos de expressão contendo *SmKI-1* foram selecionadas em placas de ágar LB contendo ampicilina (50µg/mL) e cloranfenicol (34µg/mL). Já as bactérias positivas para as construções contendo domínio KI e o C-terminal foram selecionadas em placas de ágar de kanamicina (50µg/mL) e cloranfenicol (34µg/mL). O sequenciamento de amostras dos plasmídeos foi realizado para confirmar a presença e a orientação correta das quimeras.

Os clones positivos foram cultivados em meio contendo os antibióticos para seleção em um agitador rotativo a 180 rpm a 37°C até a densidade ótica (OD) de cerca de 0,5-0,8_{600nm} e a expressão da proteína *SmKI-1* e suas porções foram induzidas utilizando 1mM de Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida (IPTG). Cinco horas após a indução, as células bacterianas foram isoladas por centrifugação e ressuspensas em 50 mL de Solução de Lise (12,5 mM Na₂HPO₄, 12,5 mM de NaH₂PO₄, 0,5 M NaCl, 10mM imidazol). As células foram lisadas em sonicador três vezes, com pulsos de 30 segundos cada, a uma amplitude de 60% e centrifugadas novamente por 20 minutos, 4° C, a 5000g. As três proteínas recombinantes desse estudo foram recuperadas em corpos de inclusão e foram ressuspensas em 50mL de tampão de Corrida (12,5 mM Na₂HPO₄,

12,5 mM de NaH₂PO₄, 0,5 M NaCl, 40 mM imidazol, 8M uréia). Novamente realizou-se o procedimento de sonicação e centrifugadas novamente por 20 minutos, 4°C, à 5000g. Em seguida, a proteína rSmKI-1, o domínio Kunitz e o C-terminal foram recuperados solubilizados e então purificados por cromatografia de afinidade em coluna de Ni-Sepharose (Hitrap quelantes de 5 mL, GE Healthcare, São Paulo, Brasil), utilizando o sistema de cromatografia AKTA prime (GE Healthcare, São Paulo, Brasil). As frações contendo a proteína foram determinadas através de SDS/PAGE-20%, em seguida foram dialisadas em tampão PBS (solução salina de tampão fosfato, pH7,2) durante 16 horas a 4°C (Desalting). As proteínas recombinantes foram quantificadas utilizando o kit BCA (Pierce, Waltham, EUA) e posteriormente utilizadas em ensaios de inibição, modelos inflamatórios, vacinação e avaliação de perfis imunológicos.

4.7 Citotoxicidade da proteína SmKI-1

Para avaliar a citotoxicidade do rSmKI-1, 5x10⁴ células BHK-21 em meio RPMI suplementado com 5% de soro bovino fetal (FBS), 150U de penicilina de sódio G e 150µg de sulfato de estreptomicina foram plaqueados em uma placa de 96 poços e incubados durante 16 a 24h. Removeu-se o meio das células BHK-21 e adicionou-se 100µL de meio RPMI suplementado com 2% de FBS, 150 U de penicilina G de sódio, 150µg de sulfato de estreptomicina e rSmKI-1 na concentração final de 1000, 500, 250 , 125, 62,5, 31,25 ou 15,62 µg/mL. As células BHK-21 foram incubadas apenas com meio para calcular o percentual de células totais viáveis. Uma solução aquosa de CTAB (100mM) foi utilizada como controle positivo da citotoxicidade. As células foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂. Após 24h de incubação, avaliamos a viabilidade celular utilizando o Kit CellTiter 96® AQueous One Solution Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, Wisconsin, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

4.8 Análise de extratos protéicos

4.8.1 Extração de proteínas

Foram utilizadas amostras dos estágios de esquistossômulo e forma adulta (macho e fêmea). Todas as amostras foram armazenadas em 100µL de tampão PBS acrescidas de Triton X-100 na

concentração final de 1% e inibidores de proteases. As amostras foram maceradas utilizando-se um homogeneizador elétrico com um pistilo de plástico acoplado à sua extremidade. Cada amostra foi macerada três vezes durante 30 segundos com intervalos de 15 segundos incubados em gelo. Após 15 minutos no gelo, as amostras foram centrifugadas a 15.000g e o sobrenadante foi coletado.

4.8.2 SDS-PAGE e Western Blot

Foram analisados, a proteína rSmKI-1 purificada e os extratos de parasitos (helmintos adultos) preparados como descrito anteriormente (Laemmli, 1970) em géis de 20% de poliacrilamida SDS-PAGE. As proteínas foram transferidas para uma membrana Hybond-P PVDF (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, EUA). A membrana foi bloqueada com TBS-T (solução salina tamponada com Tris, pH 7,5, 0,05% de Tween 20) contendo leite em pó desnatado a 5% durante 16h a 4°C. A membrana posteriormente foi incubada com um anticorpo monoclonal de camundongos anti-6XHis (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) (1: 2000) ou anticorpo policlonal presente em soro de camundongos imunizados contra rSmKI-1 (1:100) durante 1h à temperatura ambiente. Após três lavagens com TBS-T, a membrana foi incubada com IgG anti-mouse produzido em cabra conjugado com HRP (Horse Radish Peroxidase) (1:2000) durante 1h à temperatura ambiente. Após três lavagens, as membranas foram reveladas utilizando Immobilion™ Ocidental HRP (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante e visualizados em Amersham Imager 600 (GE Healthcare).

4.9 Imunolocalização da SmKI-1 em esquistossômulos *S. mansoni*

Para realizar o experimento de imunolocalização da proteína SmKI-1, esquistossômulos foram cultivados *in vitro* durante 7 dias e preparados como descrito (Basch, 1981). Um protocolo de *whole-mount* foi utilizado nos esquistossômulos, onde os parasitos foram fixados em acetona 100% durante 15 minutos a -20°C e lavados em solução salina. Em seguida, os esquistossômulos foram bloqueados com 1% de BSA (albumina de soro de bovino) em PBS-T (solução salina tamponada com fosfato, pH 7,2 com 0,05% de Tween-20) (solução de bloqueio) durante 1h. As amostras foram incubadas com soro anti-rSmKI-1 diluído a 1:20 em tampão de bloqueio por uma hora. O soro de camundongos não imunizados (T0) foi utilizado na mesma diluição como controle negativo. As amostras foram lavadas com PBS-T e incubadas com um anticorpo IgG

anti-mouse conjugado com FITC (Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA), diluído 1:100 em tampão de bloqueio. Finalmente, as amostras foram lavadas três vezes, montadas em lâmina e observado usando um microscópio de fluorescência Nikon Eclipse (Minato, Tóquio, Japão) do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI-ICB/UFMG).

4.10 Ensaio de inibição de serino proteases utilizando *SmKI-1*, Domínio KI e C-terminal recombinantes

As cinéticas de inibição foram monitoradas por análise de variações na densidade ótica das amostras em microplacas. No primeiro ensaio, a tripsina bovina (100nM) (Sigma-Aldrich) foi incubada em 100mM de Tris-HCl (pH 8,0) contendo CaCl_2 20 mM e 0,05% de Triton X-100 na presença de r*SmKI-1*, ou domínio Kunitz, ou C-terminal na concentração de 100 nM a 37°C por duas horas. A atividade enzimática residual foi determinada a 405nm a cada 30 minutos, utilizando o substrato BApNA 0,5 mM (Sigma-Aldrich). Outro teste de inibição foi conduzido contendo 100nM de elastase neutrofílica humana (Innovative Research, Inc., Novi, MI, EUA), também avaliando a atividade inibitória da r*SmKI-1*, domínio Kunitz e C-terminal na concentração de 300nM r*SmKI-1*, com incubação a 37°C durante duas horas em tampão 50 mM de Tris-HCl (pH 7,4), e a atividade residual da enzima foi determinada a 405nm a cada 30 minutos, usando 0,5 mM de substrato S4760 (Sigma-Aldrich). Como controle negativo foi utilizado a albumina de soro bovino (BSA) na concentração de 300nM em todos os ensaios.

4.11 Inibição da Elastase em cultura de Neutrófilos

4.11.1 Purificação de neutrófilos da medula óssea de camundongos TLR4 *knockout* (KO)

Camundongos TLR4 *knockout* (KO) foram sacrificados em câmara de CO_2 , e os fêmures dos membros inferiores foram removidos da bacia, e retirados o excesso de tecido e a ponta distal de cada extremidade foi cortada. Dez mililitros de tampão PBS foi forçado através do osso utilizando uma seringa com uma agulha. Após dispersar aglomerados de células e a remoção de debris, as células de medula óssea foram centrifugadas a 200g durante 10 min a 4°C, e o sedimento foi ressuspensão em PBS. Os Neutrófilos da medula óssea foram isolados de acordo com o procedimento descrito em referência (Johansson et al., 2002) com algumas modificações. Resumidamente, as células de medula óssea foram suspensas em 3mL de PBS e aplicadas sobre

o gradiente de Percoll®. Dessa forma, as células de medula óssea foram adicionadas acima de três distintos gradientes de Percoll® com densidade de 1.095, 1.085 e 1.070g/mL. Em tubos de 15mL de poliestireno foram adicionados 3mL de cada uma das soluções de Percoll® preparada nas densidades descritas acima e posteriormente foi adicionado as células de medula óssea para centrifugação à 500g durante 80 min a 4°C minutos. A fração de neutrófilos foi obtida na interface dos gradientes 1.085 e 1.095 e coletada em um tubo separado e aplicado 1mL do tampão ACK (0,15 M NH₄Cl, 1,0 mM KHCO₃, 0,1 mM Na₂EDTA, pH 7,2) para lise das células vermelhas por 5 minutos em temperatura ambiente. Após, as células foram ressuspensas em 10mL de PBS para lavagem e centrifugadas a 200g por 10 minutos a 4°C. Encerrada a centrifugação as células presentes no pellet foram ressuspensas em 1mL de PBS contendo 0,9mM CaCl₂ e 0,49mM MgCl₂. O número de células foi determinado pela contagem em câmara de Neubauer e a viabilidade dos Neutrófilos foi determinada por coloração vital com azul de Tripán 0,002%.

4.11.2 Ensaio de inibição da Elastase liberada por Neutrófilos em cultura

A atividade da elastase neutrofílica foi avaliada a partir de neutrófilos ativados. Neutrófilos ($1,0 \times 10^7$ células) foram preparados em meio de incubação contendo tampão PBS, CaCl₂ 0,9mM e 0,49mM MgCl₂, durante 10 minutos a 37°C. Os neutrófilos foram estimulados com N-formilmetionil-leucil-fenilalanina (fMLP) com 100µM durante 10 minutos antes da adição da proteína SmKI-1, domínio Kunitz e C-terminal na concentração de 40µM, como controle a proteína BSA foi utilizada na mesma concentração. Após meia hora de incubação foi adicionado 0,25mM do substrato colorimétrico N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide S4760 (Sigma-Aldrich). A clivagem do substrato foi monitorada à partir de 2 horas com leitura do sobrenadante a 405nm. Cada reação, contendo volume final de 200µL, foi realizada em triplicata em placa de 96 poços .

4.12 Sobrevivência de esquistossômulos na presença da Elastase Neutrofílica

Esquistossômulos recém preparados foram lavados 3 vezes e suspensos em meio RPMI. As alíquotas contendo 150 esquistossômulos foram distribuídas em placas de microtitulação de fundo chato de 96 poços e foram incubadas a 37°C e 7,5% de CO₂. Após 1 hora, adicionou-se 0,15mg/mL de rSmKI-1 na cultura de esquistossômulos. Em seguida, foram adicionados

0,05mg/mL de elastase neutrófilica humana (Innovative Research, Inc., Novi, MI, EUA) na cultura e o volume final foi elevado para 200 μ L com RPMI para todos os poços. As placas de microtitulação foram cobertas e colocadas em uma incubadora a 37 °C e 7,5% CO₂. Após 18 horas, as placas de ensaio foram analisadas sob um microscópio invertido (Olympus Co., Hamburgo, Alemanha). Em cada poço, o percentual de sobrevivência dos esquistossômulos foi determinado. Os esquistossômulos mortos aparecem com aspecto opaco e granular, e com falta de atividade motora. Esta avaliação foi correlacionada com a medida de exclusão de esquistossômulos mortos com o uso do corante Hoechst 33258 (Gold, 1997). As contagens foram realizadas em amostras duplicadas.

4.13 Sobrevivência de esquistossômulos em cultura de neutrófilos isolados de medula

Esquistossômulos controle e eletroporados com siRNA-*SmKI-1* foram lavados 3 vezes e ressuspensos em meio RPMI. As alíquotas contendo 200 esquistossômulos foram distribuídas em placas de cultura de fundo chato de 24 poços. Adicionou-se 10⁶ neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos na cultura de esquistossômulos e o volume foi elevado para 300 μ L com meio RPMI. Em seguida os esquistossômulos foram incubados a 37 °C e 7,5% CO₂. Após 18 horas, as placas de cultura do ensaio foram analisadas em um microscópio invertido (Olympus Co.). A avaliação do percentual de sobrevivência dos esquistossômulos foi determinada seguindo a mesma análise do tópico anterior. Além disso, imagens foram capturadas utilizando um microscópio invertido (EVOS® FL Cell Imaging).

4.14 Modelo de lesão hepática induzida por Paracetamol (APAP)

O acetaminofeno, também conhecido como paracetamol ou APAP é um fármaco com propriedades analgésicas, e sua sobredosagem pode causar intoxicação hepática (Jaeschke et al., 2010; Larson, 2007). O APAP foi dissolvido em solução salina quente antes da gavagem. Os camundongos foram submetidos à jejum durante 15 horas antes da administração de APAP (600mg/kg) ou PBS estéril como veículo. Os camundongos receberam administração intravenosa de r*SmKI-1* em uma dose de 10mg/kg trinta minutos antes da injeção do APAP. E então, foram submetidos à eutanásia 24 horas após a injeção de APAP. A atividade da alanina amino transferase (ALT) sérica foi dosada por meio de um Kit cinético, seguindo orientações do fabricante (Bioclin, Minas Gerais, Brasil). Os fragmentos do fígado foram coletados para

histologia coloração com hematoxilina e eosina (HE), e também fragmentos foram processados para as dosagens das atividades das enzimas, elastase neutrofílica e da mieloperoxidase (MPO). A atividade da elastase foi medida utilizando 0,5mM do substrato S4760 (Sigma-Aldrich) e MPO conforme descrito em seção posterior.

4.14.1 Microscopia Intravital

Para imagens não invasivas, os camundongos foram anestesiados com ketamina (150mg/kg) e xilasina (16 mg/kg) e a microscopia confocal intravital do fígado foi realizada como descrito (McDonald et al., 2010). Todos os fluoróforos foram injetados intravenosamente 10 minutos antes da imagem, foram eles: Sytox Green (100µL/mouse, 50 µM, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), anti-GR1 conjugado com PE (4µg/mouse; 40µg/mL, clone RB6-8C5, eBioscience). As contagens de neutrófilos foram realizadas através das fotos capturadas no microscópio confocal.

4.15 Modelo de Gota experimental induzido por cristais de urato monossódico (MSU)

A inflamação articular foi induzida pela injeção intraarticular de MSU (Sigma-Aldrich) na concentração de 500µg por cavidade em 10µL de solução salina estéril inserindo uma agulha de 27,5 G através do ligamento suprapatellar na cavidade da junção do joelho esquerdo. No joelho direito foi injetado com o mesmo volume do veículo e utilizado como controle. No grupo experimental os camundongos receberam uma injeção intravenosa de rSmKI-1 (10mg/kg) uma hora antes da indução da gota. O grupo controle recebeu PBS por via intravenosa.

4.15.1 Avaliação da nocicepção dos camundongos

Em uma sala silenciosa, os camundongos foram colocados em gaiolas de acrílico (12x10x17cm) com um piso de grade de fio, 15-30 minutos antes do teste, para adaptação ambiental. Nesse experimento, utilizou-se um medidor de pressão eletrônico. Que consiste em um transdutor de força de mão equipado com uma ponta de polipropileno (INSIGHT Instruments, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) (Cunha et al., 2004), com uma ponta grande (4.15mm²) adaptada à sonda (Guerrero et al., 2006). Uma força perpendicular crescente foi aplicada na área central da superfície plantar da pata traseira para induzir a flexão da articulação do joelho, seguida da

retirada da pata. Um espelho inclinado abaixo da grade fornece uma visão clara da pata traseira do animal. O ponto final foi caracterizado pela remoção da pata da ponta de polipropileno. Após o limite de retirada de flexão, a intensidade da pressão foi gravada automaticamente. O valor para a resposta foi obtido pela média de duas medidas em uma pata traseira.

4.15.2 Contagem das células totais e diferenciais da cavidade sinovial

Após 16 horas de indução da inflamação das articulações, os camundongos foram eutanasiados. As cavidades sinoviais do joelho foram lavadas duas vezes com 5µL de PBS. Os leucócitos totais foram contados utilizando uma câmara de Neubauer. E as contagens diferenciais de leucócitos foram realizadas utilizando a preparação de lâminas em cytopspin e coradas com May-Grunwald-Giemsa (Cytospin 3, ShandonInc.). Os valores foram relatados como o número de células por cavidade pleural.

4.15.3 Histologia

A articulação do joelho foi removida e fixada durante 24 horas com 4% tampão de formalina neutro. Em seguida, as articulações foram incubadas em 14% de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) no pH 7,2 durante 4 semanas à temperatura ambiente para decalcificação. As amostras, então, foram incorporadas em parafina e secções de 7mm foram coradas com HE. Duas secções das articulações de cada joelho foram examinadas microscopicamente e marcadas de forma cega para os parâmetros analisados (Queiroz-Junior et al., 2011).

4.15.4 Atividade de mieloperoxidase e secreção de IL-1β

O sobrenadante dos tecidos periarticulares processados foram utilizados para determinar a acúmulo de neutrófilos por análise da atividade da MPO. A atividade MPO de leucócitos foi avaliada medindo a oxidação dependente de H₂O₂ de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Alíquotas de 30µL foram incubadas com 120µL de substratos TMB em placas de 96 poços. As placas foram incubadas durante 5 minutos à temperatura ambiente interrompidas com H₂SO₄ 4%. A densidade óptica foi lida à 450nm em uma leitora de microplaca (mQuant, Bio-Rad, CA, EUA). Já a citocina IL-1β foi quantificada utilizando kits de ensaio de imunoabsorção

enzimática (ELISA) (R & D Systems, Minnesota, EUA). Todas as amostras foram realizadas em duplicatas, e todas as amostras do experimento foram testadas na mesma placa.

4.16 Modelo de pleurisia induzido por Carragenina

Carragenina é um extrato obtido de algas vermelhas que forma uma goma. Neste estudo a carragenina foi utilizada na concentração de 2mg/mL para indução do recrutamento de neutrófilos para cavidade pleural. Primeiramente os camundongos receberam injeção intravenosa de rSmKI-1 (10mg/kg). Posteriormente a carragenina ou o veículo (PBS) foram injetados intrapleuralmente em um volume de 0,1mL. Os grupos experimentais foram divididos em carragenina+SmKI-1 e outro denominado grupo carragenina. Os camundongos foram sacrificados em uma câmara de CO₂ 4 horas após a injeção de carragenina. As células presentes na cavidade pleural foram colhidas pela injeção de 2mL de PBS, para lavar a cavidade e a contagem total de células foi realizada em uma câmara de Neubauer usando o corante Turk. As contagens de células diferenciais foram realizadas em preparações de cytopspin, coradas com May-Grunwald e Giemsa para identificação dos tipos celulares de acordo com os critérios morfológicos. Os resultados foram apresentados como o número de células por mililitro.

4.16.1 Citometria de fluxo para análise de populações de leucócitos

Quatro horas após a injeção de carragenina ou veículo (PBS), as células pleurais dos grupos carragenina+SmKI-1, carragenina e os grupos controles foram recuperadas através da lavagem da cavidade com PBS. As populações de neutrófilos (Ly6G⁺CD11b⁺), macrófagos (F4/80⁺CD11b⁺) e linfócitos (CD3⁺) foram analisadas pela marcação de 2x10⁵ células durante 30 minutos em gelo com anticorpos fluorescentes contra F4/80 (PE, clone BM8, BioLegend, San Diego, Califórnia, EUA), Ly6G (APC, H7clone 1A8, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), CD11b (BB115, clone M1/70, BD Biosciences) e CD3 (PE CY5, clone145-2C11, BD Biosciences). As células marcadas foram adquiridas em um citômetro BD FACSCanto II (BD Biosciences) e analisadas utilizando o software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR). As células foram primeiro selecionadas com base no tamanho e granularidade e CD11b⁺ para separar as populações de linfócitos e macrófagos/neutrófilos. Dentro do *gate* CD11b⁺ na população de macrófagos/neutrófilos, as células F4/80⁺ foram selecionadas *versus* Ly6G⁺.

4.17 Modelo de peritonite induzida por tioglicolato

Uma abordagem comum para quantificar a migração de leucócitos é através da análise de uma cavidade corporal após a indução local de um estímulo pró-inflamatório não específico, como o tioglicolato (Yadav et al., 2003). Foi injetado na cavidade peritoneal de camundongos 3mL de tioglicolato de Breper na concentração de 3% para estabelecer peritonite estéril aguda durante três dias. Para estudar o efeito de rSmKI-1 sobre o influxo de leucócitos induzidos por tioglicolato na cavidade peritoneal, quarenta e oito horas após a injeção intraperitoneal de tioglicolato, os grupos de camundongos C57BL/6 foram tratados com rSmKI-1 (10mg/kg), ou veículo (PBS). Após 72h seguindo a administração de tioglicolato, os animais foram sacrificados, as células de leucócitos peritoneais foram colhidas por lavagem da cavidade com 10mL de PBS e as contagens de células totais foram determinadas pela contagem em câmara de Neubauer. E a contagem diferencial de leucócitos foram realizadas preparações em cytopspin, e os valores foram relatados como o número de células por cavidade peritoneal.

4.18 Imunização dos camundongos

Fêmeas C57BL/6 selvagens ou TLR4 KO, de 6 a 8 semanas de idade, foram divididas em dois grupos experimentais de 10 animais cada e imunizadas com três doses subcutâneas, em intervalos de 15 dias conforme padronizado anteriormente no laboratório. As injeções subcutâneas foram feitas na região da nuca dos animais, com 25µg de proteína rSmKI-1 associada ao adjuvante de Freund completo (CFA) para a primeira administração e incompleto (IFA) para os reforços. Os grupos controle foram imunizados com PBS e adjuvante de Freund seguindo o mesmo protocolo de imunização. O regime de imunização dos animais está esquematizado na figura 8.

4.19 Infecção, desafio e recuperação dos helmintos adultos

Quinze dias após a última imunização, os camundongos foram desafiados por exposição da pele do abdômen destes animais a uma suspensão de 100 cercárias em água deionada durante uma hora. Quarenta e cinco dias após o desafio, os vermes adultos foram perfundidos a partir das veias porta, como descrito anteriormente (Fonseca et al., 2004) e coletados em placas de Petri descartáveis e contados com auxílio de lupa acoplada à lâmpada. Dois experimentos

independentes foram efetuados para determinar os níveis de proteção. O desenho experimental está representado na figura 7. O nível de proteção foi calculado comparando o número de helmintos recuperados de cada grupo vacinado com o respectivo grupo controle, utilizando a seguinte fórmula: $PL = [(WRCG-WREG)/WRCG] \times 100$, onde PL indica o nível de proteção (%), WRCG indica o número de vermes recuperados do grupo controle, e WREG indica o número de vermes recuperados a partir do grupo experimental.

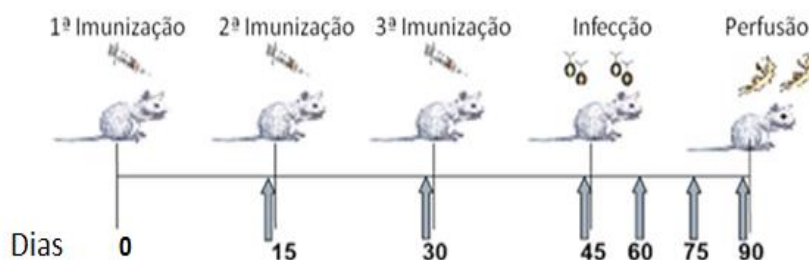


Figura 8 – Representação esquemática do regime de imunização dos camundongos.

4.20 Dosagem dos anticorpos específicos contra rSmKI-1

Soros dos animais imunizados nos experimentos foram coletados nos dias 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias do experimento realizado e foram utilizados para determinação dos níveis de anticorpos específicos anti-rSmKI-1 pela técnica de ELISA indireto. Placas de microtitulação (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha) de microtitulação de 96 poços foram revestidas com 5mg/mL rSmKI-1 em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6) durante 16 horas à 4°C, depois foi bloqueada durante 2h à temperatura ambiente com 200mL/poço de PBS-T mais 10% de FBS (soro fetal bovino). Cem microlitros de soro foram diluídos a 1:100 em PBS-T e foram adicionados a cada poço, após, as placas foram então incubadas durante 1h à temperatura ambiente. Anticorpos ligados à placa foram detectados utilizando anticorpos anti-mouse específicos para IgG, IgG1 e IgG2a conjugados com peroxidase (Southern Biotechnology, CA, EUA) diluídos 1:5.000, 1:10.000 e 1:2.000 em PBS-T, respectivamente. A reação de cor foi induzida pela adição de 100µL de 200pmol de OPD (dicloridrato de o-fenilenodiamina) em tampão citrato (pH 5,0), mais 0,04% de H₂O₂ a cada poço durante pelo menos 10 minutos. A reação de cor foi interrompida pela adição de 50mL de ácido sulfúrico a 5% por poço. As placas foram lidas a 492nm em um leitor de placas de ELISA (BioRad, Hercules, CA, EUA).

4.21 Análise de citocinas

Os ensaios de citocinas foram realizados utilizando esplenócitos cultivados a partir de camundongos imunizados com rSmKI-1 ou PBS (n=5 para cada grupo). Os esplenócitos foram isolados a partir dos baços de camundongos uma semana após a terceira imunização e então foram macerados, lavados duas vezes com PBS estéril. Após a lavagem, as contagens de células foram ajustadas para 1×10^6 células em meio RPMI 1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts, EUA) suplementado com 10% de FBS, 100U/mL de penicilina G e 100µg/mL de sulfato de estreptomicina. Os esplenócitos foram mantidos em cultura com meio apenas ou estimulados com a proteína rSmKI-1 (5µg/mL), concanavalina A (ConA) (5µg/mL), ou com Lipopolissacarídeo (LPS) (1µg/mL), como descrito anteriormente (Fonseca et al., 2004). As placas de 96 poços (Nunc, Roskilde, Dinamarca) foram mantidas em uma incubadora à 37°C com 5% de CO₂. Os sobrenadantes da cultura foram coletados após 24 horas para dosar os níveis de IL-4 e IL-5, após 48h, para dosar os níveis de TNF-α e após 72h para serem dosados os níveis de IFN-γ e IL-10. Os ensaios para quantificação de citocinas foram realizadas utilizando o kit de ELISA DuoSet((I & D) Systems, Minneapolis, MN, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

4.22 Contagem de ovos

Para avaliar o efeito da imunização com rSmKI-1 na patologia hepática, fígados de oito camundongos por grupo foram recolhidos após a perfusão para a recuperação dos parasitos adultos. O lobo direito do fígado de cada animal foram pesados e digeridos com KOH a 10% durante 16 horas à 37 °C. Ovos liberados após degradação do tecido hepático foram obtidos por centrifugação a 900g durante 10 min e ressuspensos em 1mL de solução salina. O número de ovos foi contado utilizando um microscópio de luz. A quantificação foi obtida calculando o número de ovos por grama de tecido do fígado.

4.23 Análise histopatológica dos animais imunizados

Foi retirado o lobo central do fígado dos animais pertencentes aos grupos trabalhados e estes foram fixados com formaldeído a 10% tamponado em PBS. Os cortes histológicos foram realizados usando micrótomo a 6mm e corados com HE. O número de granulomas foi contado em um microscópio com lente objetiva de 10X . Cada seção do fígado foi digitalizada para o

cálculo de toda a sua área (mm^2), utilizando o software ImageJ (US National Institutes of Health, Bethesda, MD , EUA). Para a medição da área total de granulomas, foi usada mais uma vez lente objetiva 10X; e as imagens foram capturadas através de uma microcâmara JVC TK 1270/RBG acoplada ao microscópio. Vinte granulomas contendo um único e bem definido ovo foram selecionados de forma aleatória, em cada seção do fígado e da área do granuloma foi medida utilizando o software ImageJ .

4.24 Análise estatística

Os resultados dos grupos experimentais foram comparados pelo teste t de Student utilizando o pacote de software GraphPad Prism (La Jolla , CA, EUA). Ajustes Bonferroni foram incluídos para comparações múltiplas. Os valores de p obtidos por este método foram considerados significativos caso sejam menores que 0,05.

5 RESULTADOS

5.1 – Caracterização Funcional da proteína SmKI do *S. mansoni*

5.1.1 SmKI-1 do *Schistosoma mansoni* é um inibidor do tipo Kunitz de serino proteases

Inicialmente, realizamos análises bioinformáticas para avaliar a sequência de aminoácidos da SmKI-1 (Smp_147730) do *S. mansoni* para investigar a conservação do domínio de Kunitz (KI) em comparação com outros organismos. O alinhamento da sequência utilizando o BLAST, para pesquisa de sequências homólogas para a proteína SmKI-1, com demais proteínas inibidoras que possuem domínio Kunitz conhecidas de diversas espécies mostrou a conservação do aminoácido P1 típico de inibidores de tripsina (Arg¹⁸) e os seis resíduos de cisteína (representados em amarelo na Figura 9A, C). O domínio de Kunitz (KI) da proteína SmKI-1 foi considerado um segmento bem conservado quando comparados com outros inibidores de proteases do tipo Kunitz como Actitoxina de *Anemonia viridis* (gi | 928589358), TFPI 2 de *Tinamus guttatus* (gi | 697415567) e a proteína AMBO de *Bos indicus* (gi | 1131295758) com 58%, 45% e 55% de identidade, respectivamente. Estes dados, juntamente com a análise PSI-BLAST, foram utilizados como insumo para a modelagem da proteína. A análise complementar *in silico* da sequência de aminoácidos SmKI-1 revelou, além da presença do domínio Kunitz inibidor conservado (N-terminal), também uma região C-terminal não estruturada (Figura 9B). Além disso, a análise de BLASTp da sequência dos aminoácidos da porção C-terminal não revelou semelhança com outras proteínas depositadas no banco de dados. Foi determinado o modelo estruturado do domínio Kunitz da SmKI-1 utilizando a ferramenta MODELLER v9.17 e o software *iTASSER*, uma modelagem realizada por homologia comparativa (Figura 9D). A estrutura adequada para o desenvolvimento do modelo foi obtida utilizando BLAST e configurando o PDB como o banco de dados de origem para encontrar exemplos de estrutura 3D. As sequências resultantes de pelo menos 48% de similaridade e identidade foram selecionadas para modelagem por homologia comparativa. PDB ID 4BQD (KD1 da TFPI humana complexado com um peptídeo sintético) foi encontrado com 65% de identidade com a sequência de consulta e foi escolhido como modelo para modelar o domínio Kunitz da SmKI-1. O modelo foi considerado bom e confiável e aproximadamente 91% dos resíduos estão na região favorecida no gráfico de Ramachandran. Além disso, os segmentos canônicos do loop de ligação primário de SmKI-1 (DEGICR¹⁸ALLK) e o loop de ligação secundário

(F³⁵YYGGCLCL⁴³NG⁴⁵NNFL) adotaram uma conformação bem conservada, que é similar em outros inibidores do tipo Kunitz em complexos com tripsina e elastase (Figura 9D).

a

SmKI-1	1	RKG-NSD	CLLDY--	DEGI	CRALLKRF	YYDSV	NTQTE	EIFY	YGGCL	LGNG	GNNFL	SKKEE	CERK	CG
gi 844873038	1	RKG-SSV	CLLDY--	DEGI	CRALIKRF	YYDRV	NKTC	EVFY	YGGCL	LGNR	RNNFL	SKQEE	CEQK	CN
gi 928589358	1	SYGINKD	CLLPM--	DVGR	CRARHPRY	YVNS	SKRC	EMFN	YGGCR	GNAN	NF	ITKKE	CEKV	C-
gi 55976206	1	---INKD	CLLPM--	DVGR	CRARHPRY	YVNS	SKRC	EKFI	YGGCR	GNAN	NF	ITKKE	CEKV	C-
gi 697415567	1	--EKQRA	CLLPM--	DDGP	CRAMVPRWY	YDRY	TQSC	QEFY	YGGCL	GNAN	NF	LTPDD	CEKR	CW
gi 928589350	1	SYGINKD	CLLPM--	DVGR	CRARHPRY	YVNS	SKRC	EKFI	YGGCR	GNAN	NF	ITKKE	CEKV	C-
gi 1011572969	1	LTAAQRS	CLLPV--	DDGP	CRALLPRWY	YDRY	TQTCE	EPFS	YGGCQ	GNAN	NF	FESSE	CEKS	CW
gi 338817561	1	---INSI	CLLPK--	KQGF	CRARFPFY	YVNS	STRRC	EMFY	YGGCQ	GNAN	NF	NTLEE	CEKV	C-
gi 1113784061	1	LTAAQRS	CLLPV--	DDGP	CRALLPRWY	YDRY	TQTCE	EPFS	YGGCQ	GNAN	NF	FESSE	CEKS	CW
gi 1131295758	1	FSKKADS	CLLDY--	SQGP	CLGLFKRY	FYNGT	SMACT	ETFL	YGGCM	GN	NFL	SEKE	CLQT	CR
gi 1169035207	1	PTGNRAA	CLLQV--	DDGP	CRAAIERV	YVNT	FTQKE	EIFY	YGGCK	GNAN	NF	NSYQE	CQKS	CF
gi 449280423	1	-----A	CLLPP--	DDGP	CRALVPRWY	YDRY	TQTCE	QEFY	YGGCH	GNAN	NF	LTLDD	CEKS	CW
gi 197260862	1	SLAQENV	CLLPV--	DEGV	CRALFKRF	YVPA	TDSCE	KEFY	YGGCE	GN	NR	FKSKKE	CILK	CQ
gi 239977294	1	SKDRPKF	CELPA--	DSGP	CRGILRAF	YVHP	VHRTQ	QMFY	YGGCY	GNAN	NF	FKTIDE	CKRT	C-
gi 743584662	1	TTAVNEI	CRLPVPND	YIE	CNAY	FPSY	RFNASSKQ	DRFV	YGGCG	GNAN	R	FRTKGE	CERT	CA
gi 305678521	1	---KGV	CLLQV--	DEGP	CRGEIERV	YVNT	ITQKE	EIFY	YGGCQ	GNAN	NF	FKSYQE	CQKT	CF
gi 743584664	1	TTAVNEI	CRLPVPND	YIE	CNAY	FPSY	RFNASSKQ	DRFV	YGGCG	GNAN	R	FRTKGE	CERT	CA
gi 928589357	1	SYGINKD	CLLPM--	DVGR	CRAKFPRY	YVNS	SKRC	EKFN	YGGCR	GNAN	NF	HNTLEE	CEKV	C-
gi 676772646	1	PTEKQRA	CLLPP--	DDGP	CRALVPRWY	YDRY	TQSC	QEFY	YGGCH	GNAN	NF	LTLDD	CEKS	CW
gi 1169035215	1	---AA	CLLQV--	DDGP	CRAAIERV	YVNT	FTQKE	EIFY	YGGCK	GNAN	NF	NSYQE	CQKS	CF
gi 55976207	1	---INKD	CLLPM--	DVGR	CRASHPRY	YVNS	SKRC	EKFI	YGGCR	GNAN	NF	HNTLEE	CEKV	C-
gi 678144934	1	---TEKQRS	CLLPP--	DDGP	CRALVPRWY	YDRY	TQSC	QEFY	YGGCH	GNAN	NF	LTLDD	CEKS	CW
gi 683461570	1	---QRA	CLLPP--	DDGP	CRALVPRWY	YDRY	TQSC	QEFY	YGGCH	GNAN	NF	LTLDD	CEKS	CW
gi 678110815	1	---EKQRA	CLLPP--	DEGP	CRALVPRWY	YDRY	TQSC	QEFY	YGGCH	GNAN	NF	TFDD	CEKS	CW
gi 1168890195	1	---KGV	CLLQV--	DEGP	CRGDIERY	YVNT	ITQKE	EIFY	YGGCQ	GNAN	NF	FKSFQE	CQKT	CF
gi 678195212	1	---EKQLA	CLLPP--	DDGP	CRAMVPRWY	YDRY	TQSC	QEFY	YGGCH	GNAN	NF	LTLDD	CEKR	CW
gi 679144633	1	---EKQRA	CLLPP--	DDGP	CRALVPRWY	YDRY	TQSC	QEFY	YGGCH	GNAN	NF	LTLDD	CEKS	CW
gi 678147668	1	---EKQRA	CLLPP--	DDGP	CRALVPRWY	YDRY	TQSC	QEFY	YGGCH	GNAN	NF	LTLDD	CEKS	CW
gi 123913154	1	GQDRPKF	CHLPV--	DSGI	CRAHIPRY	YVNP	ASNQC	QGFY	YGGCG	GNAN	NF	ETRDO	CRHT	C-
gi 241610027	1	---LNGE	CFEDM--	EEGP	CRARILSY	YVDF	DTGT	KEFF	YGGCE	GT	GNNF	KKKDE	CEKK	C-
gi 928589344	1	SYGINKD	CLLPM--	DVGR	CRASHPRY	YVNS	SKRC	EKFI	YGGCR	GNAN	NF	HNTLEE	CEKV	C-

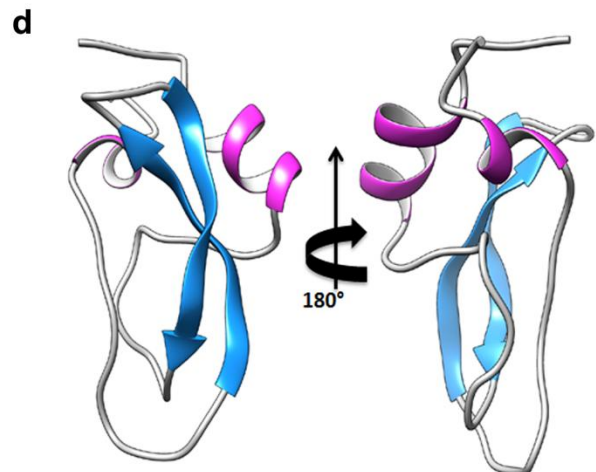
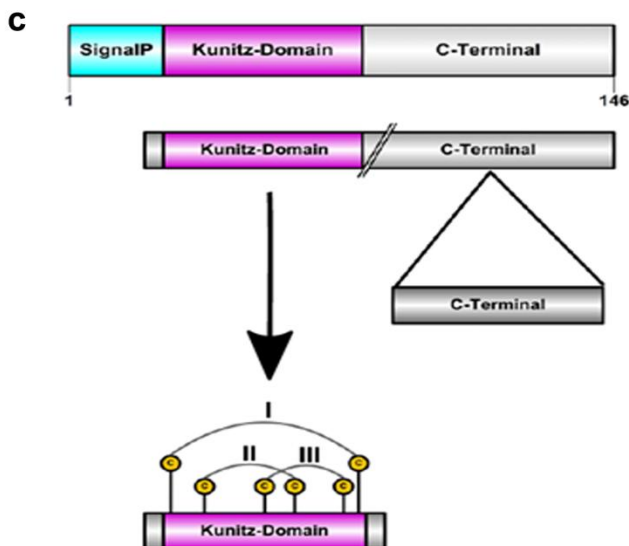
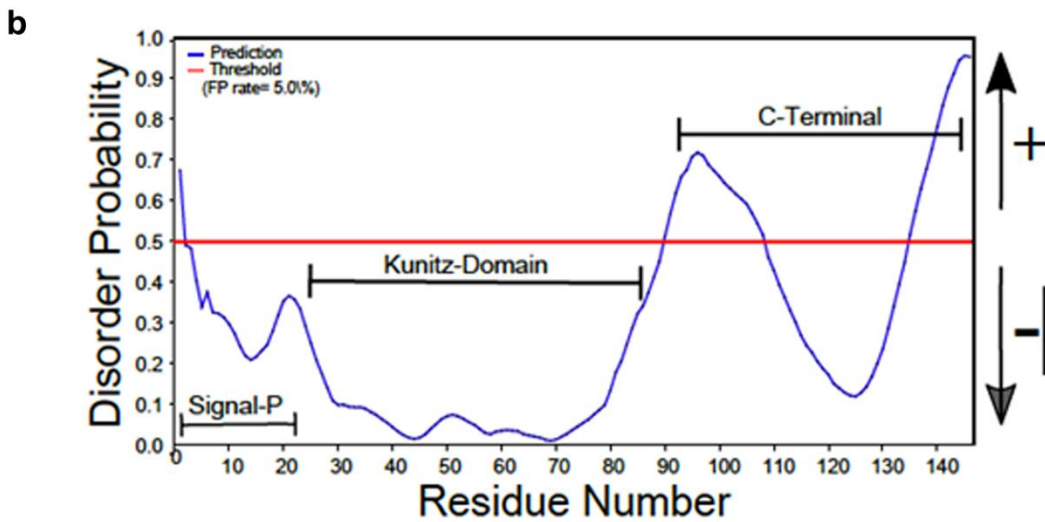


Figura 9 – Estrutura da *SmKI-1* e estrutura do domínio Kunitz.

(a) Alinhamento múltiplo das sequências entre a proteína *SmKI-1* de *S. mansoni* e suas proteínas homólogas foram realizadas utilizando Clustal Omega, refinado utilizando BoxShade. Os resíduos que são semelhantes estão sombreados em cinza, idênticos em preto e os resíduos de cisteína totalmente conservados em amarelos. (b) Probabilidade desordem mostrando o domínio Kunitz estruturado e a região C-terminal desestruturada. Análises realizadas com os algoritmos COILS disponíveis no site Expasy. (c) Representação esquemática e visão linear dos domínios da proteína *SmKI-1* completa que evidencia o domínio de Kunitz com os três pontes dissulfeto. (d) Estrutura 3D do domínio kunitz da proteína *SmKI-1* modelada utilizando MODELLER v9.17.

5.1.2 *SmKI-1* está localizada na superfície do trato intestinal de Esquistossômulos

Em publicação recente a proteína *SmKI-1* foi encontrada no tegumento de *S. mansoni* adultos, machos e fêmeas (Ranasinghe et al., 2015a). No entanto, não existe qualquer informação sobre a localização *SmKI-1* em esquistossômulos, a partir dessa informação realizamos a marcação em esquistossômulos cultivados por 7 dias com anticorpos policlonais de camundongos produzidos contra r*SmKI-1* para localizar essa proteína na fase larval do parasito. A proteína nativa *SmKI-1* (verde) foi localizada exclusivamente na porção posterior do lúmen intestinal de esquistossômulos (Figura 10A). Nenhum sinal fluorescente específico foi detectado no intestino ou em outra parte do esquistossômulo obtidos da mesma fonte de cultivo quando o soro de camundongos naives (pré-imune) foi utilizado (Figura 10B).

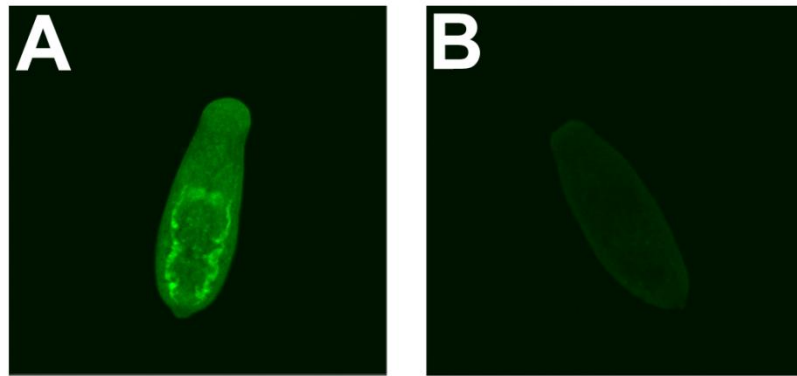


Figura 10 – Imunolocalização da *SmKI-1* em esquistossômulos de 7 dias.

(a) Marcação da *SmKI-1* nativa por imunofluorescência indireta em esquistossômulos inteiros fixados com acetona 100% usando o anticorpos de camundongos policlonais anti-r*SmKI-1* e anticorpos secundários anti-mouse conjugado com FITC (verde). (b) Como controle foi utilizado soro de camundongos pré-imune (20x).

5.1.3 Perfil de expressão da *SmKI-1* em esquistossômulos e fase adulta do ciclo de vida do *S. mansoni*

A expressão relativa de *SmKI-1* foi avaliada em diferentes estágios do ciclo de vida de *S. mansoni* através da técnica PCR em tempo real quantitativo (qRT-PCR) e os resultados são apresentados na Figura 11A. O gene *SmKI-1* apresentou elevada expressão relativa nas fases de vida intravascular, esquistossômulos e parasitos adultos. Ovos, miracídios e cercária não apresentaram expressão evidente da *SmKI-1*.

5.1.4 A expressão do gene *SmKI-1* é importante para a sobrevivência de *S. mansoni*

5.1.4.1 Viabilidade de esquistossômulos siRNA-*SmKI-1* *in vitro*

Uma vez que a *SmKI-1* é altamente expressa em estágios intravasculares, desenharam-se siRNAs específicos para realização do *knock down* do gene que expressa a *SmKI-1* e observou-se os efeitos da ausência de expressão gênica no parasito. No estágio larval, obtido através da transformação mecânica das cercárias, o tratamento com siRNA resultou em uma não detectável

expressão de *SmKI-1*. No entanto, em helmintos adultos recuperados de camundongos infectados com esquistossômulos eletroporados com siRNA-*SmKI-1*, foi observado uma supressão menos eficiente, 78% em fêmeas e 33% em machos, conforme avaliado por qPCR (Figura 11B).

Os esquistossômulos silenciados para o gene da *SmKI-1* foram mantidos em meio completo (DMEM, FBS 10%, Penstrep 1%, insulina e serotonina) durante seis semanas. E uma vez por semana, a expressão gênica foi monitorada, assim como o tamanho e a viabilidade dos parasitos suprimidos também foram avaliados. As taxas de supressão permaneceram acima de 90% até quatro semanas após o tratamento com siRNA-*SmKI-1*. Após 6 semanas, o efeito supressivo diminuiu, embora a expressão do gene *SmKI-1* ainda fosse menor que 70% nos parasitos suprimidos em comparação aos esquistossômulos controles (Figura 11C). Os parasitos *SmKI-1*-suprimidos apresentaram uma redução de 60% na viabilidade quando comparados aos controles (Figura 11D) indicando um desenvolvimento prejudicado do parasito em baixos níveis de mRNA *SmKI-1* (Figura 11E).

5.1.4.2 Viabilidade dos parasitos tratados com siRNA-*SmKI-1* *in vivo*

Para investigar se o silenciamento do gene *SmKI-1*, mediado pela técnica de RNAi, afetou a viabilidade dos parasitos *in vivo*, infectou-se grupos de 8 camundongos com esquistossômulos com o gene *SmKI-1* silenciado e como controle esquistossômulos apenas eletroporados sem nenhum siRNA. Após seis semanas, os parasitos adultos foram recuperados através da perfusão e contados. Houve uma redução significativa de aproximadamente 60%, nos parasitos suprimidos com siRNA-*SmKI-1*, recuperados em camundongos infectados, quando comparados ao grupo controle em dois ensaios independentes (Figura 11F) e nestes ensaios foi realizado o PCR em tempo real a fim de confirmar a manutenção do silenciamento gênico dos helmintos que desenvolveram em modelo animal (Figura 11G). Uma vez que a supressão do gene *SmKI-1* no estágio larval de *S. mansoni* influencia o desenvolvimento desses esquistossômulos tanto *in vitro* quanto *in vivo*, observa-se que a expressão desta proteína é essencial para o desenvolvimento e a sobrevivência do parasito.

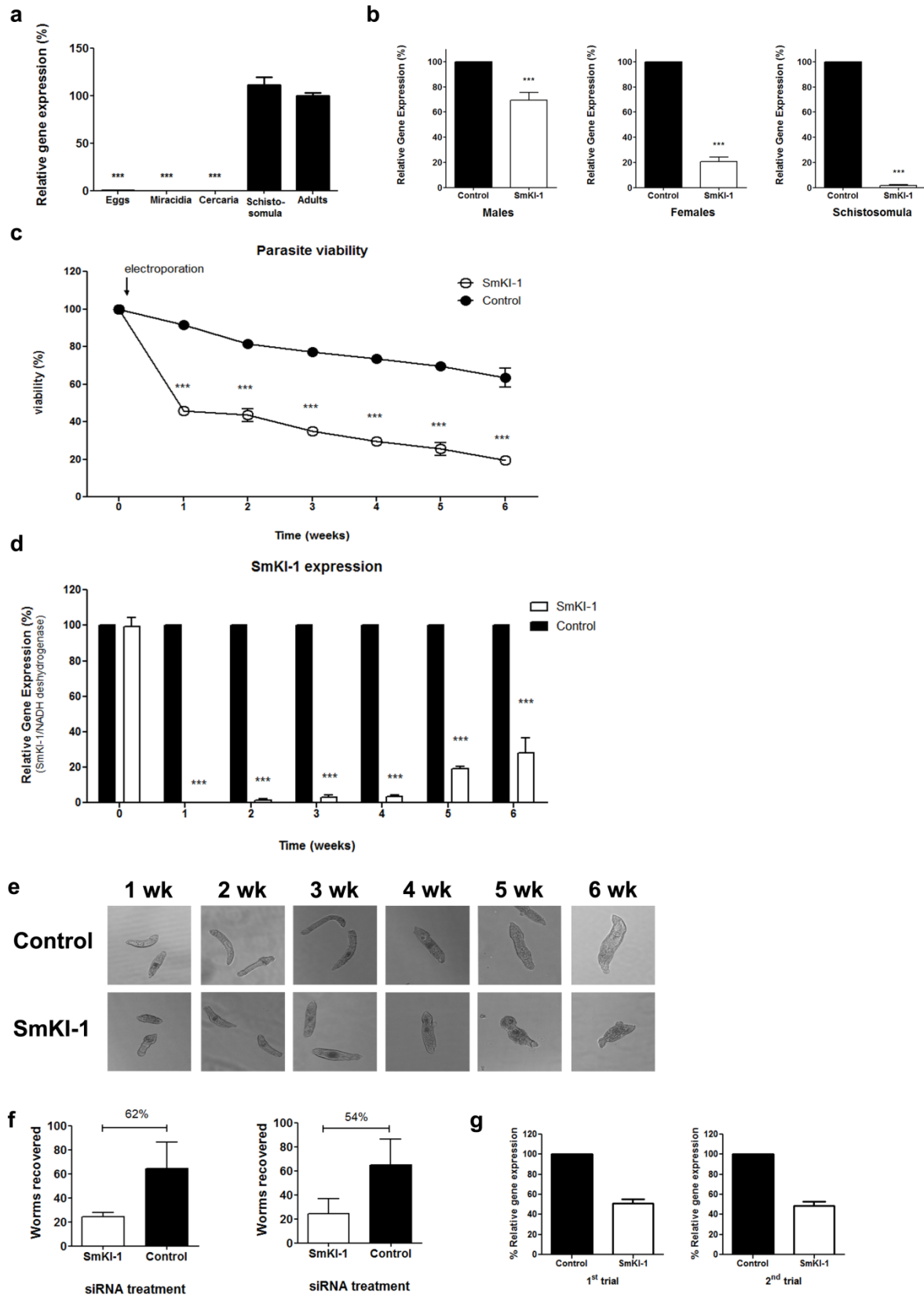


Figura 11 – A *SmKI-1* é importante no desenvolvimento do parasito.

(a) Expressão relativa do gene da *SmKI-1* avaliados pela técnica de qRT-PCR (média±DP) em diferentes estágios do ciclo de vida de *S. mansoni*: ovos, miracídio, cercária, esquistossômulo (cultivados por 7 dias) e parasitos adultos (macho e fêmea-ajustados como 100%). (b) Nível

médio de expressão do gene *SmKI-1* (\pm SD, n=3) em helmintos adultos machos (esquerda), fêmeas (centro) cultivados separados ou todos esquistossômulos (direito) 72 horas após o tratamento com siRNA controle (barras pretas, ajustadas para 100%) ou siRNA-*SmKI-1* (barras brancas), conforme determinado por qRT-PCR. (c) Viabilidade de esquistossômulos ao longo de 6 semanas. (d) Expressão do gene *SmKI-1* em esquistossômulos cultivados em diferentes tempos após o tratamento com siRNA-*SmKI-1*. Os círculos/barras brancas representam a sobrevivência dos esquistossômulos e a expressão relativa do grupo tratado com siRNA-*SmKI-1* em comparação com o grupo tratado com um siRNA controle (definido como 100%, círculos/barras pretas) nos mesmos intervalos de tempo. Resultados foram representativos de dois experimentos independentes. Diferenças significativas entre parasitos adultos e outros estágios de vida são indicadas por ***, $p < 0,001$. (e) Imagens representativas de esquistossômulos tratados com os siRNA controle (painel superior) ou siRNA-*SmKI-1* (painel inferior) em todos os intervalos de tempo avaliados. (f) Os esquistossômulos foram tratados com siRNA e utilizados para infectar camundongos e a carga de helminto recuperados após 45 dias. Os resultados foram expressos (média \pm DP) de dois experimentos independentes. Para todos os experimentos de PCR em tempo real foi utilizado o gene NADH desidrogenase como gene normalizador.

5.1.5 Expressão e purificação da r*SmKI-1*, domínio KI e C-terminal

A clonagem e a expressão heteróloga da proteína *SmKI-1* e seus fragmentos (domínio Kunitz e C-terminal) foram realizadas como descrito na seção de materiais e métodos. As proteínas recombinantes *SmKI-1* (r*SmKI-1*), domínio KI e C-terminal foram expressos fusionadas com uma cauda de Histidina e foram purificados a partir de lisados bacterianos usando cromatografia de afinidade em coluna de níquel e depois analisados por SDS-PAGE seguido de coloração com azul de Coomassie. Uma única banda com o tamanho esperado para r*SmKI-1* (~ 20kDa), domínio KI (~ 10 kDa) e C-terminal (~ 15kDa) indicam o sucesso do protocolo de purificação (Figura 12A). Para avaliar ainda mais a especificidade do procedimento de purificação, o r*SmKI-1*, domínio KI e a região C-terminal purificados foram avaliados por *Western blot* utilizando um anticorpo monoclonal anti-His (Figura 12B). Confirmando que as proteínas purificadas possuem o marcador de histidina e o peso molecular esperado para r*SmKI-1* e as porções: domínio KI e c-terminal. (Figura 12B).

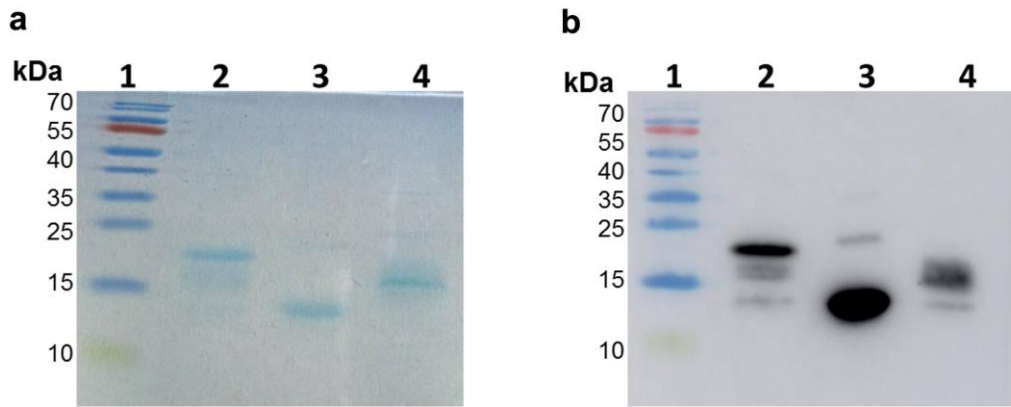


Figura 12 – Expressão heteróloga e purificação de rSmKI-1, domínio KI e C-terminal.

(a) SDS-PAGE corado com azul brilhante de Coomassie evidenciando rSmKI-1, domínio KI e c-terminal eluídos e dialisados após purificação em cromatografia de afinidade em coluna Ni²⁺. (b) Análise por *Western blot* da rSmKI-1 e suas porções incubadas com anticorpo monoclonal anti-His. O padrão de proteína de peso molecular (M.W.) é uma escala ampla pré-corada da Fermentas na canaleta 1; rSmKI-1 na canaleta 2; Domínio KI na canaleta 3; C-terminal na canaleta 4.

5.1.6 SmKI-1 não apresenta citotoxicidade celular nas concentrações utilizadas neste estudo

Para avaliar o potencial de citotoxicidade da rSmKI-1, incubou-se células BHK-21 com diferentes concentrações desta proteína e, em seguida, as culturas foram submetidas ao ensaio MTS. As células BHK-21 incubadas com rSmKI-1 não apresentaram morte celular, o que só foi observado em concentrações maiores (1000µg/mL) (Figura 13). Foi utilizada uma solução de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), um surfactante altamente tóxico, como controle positivo e as células BHK-21 incubadas apenas com meio foram utilizadas como controle negativo para calcular a percentual de células viáveis. Esses resultados dão suporte e segurança para utilização da rSmKI-1 nos próximos experimentos.

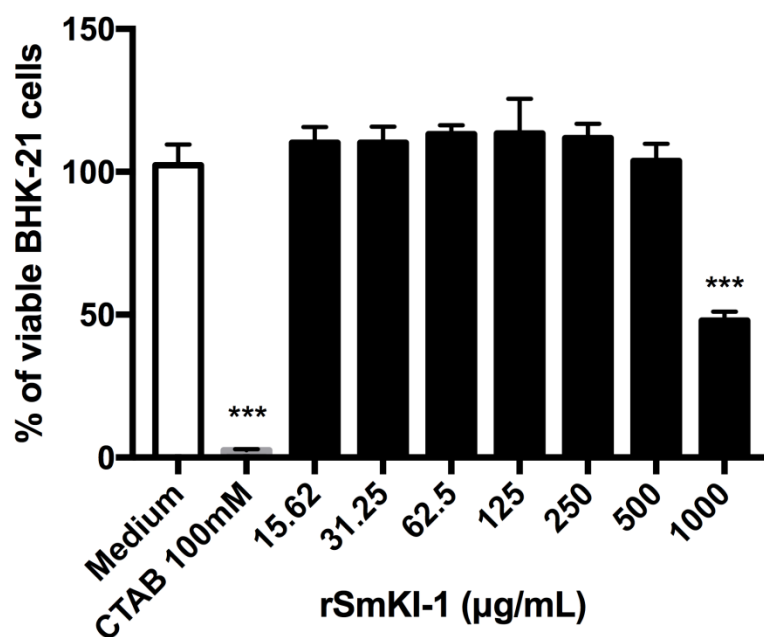


Figura 13 – Toxicidade da *SmKI-1* recombinante em células BHK-21.

As células BHK-21 foram incubadas com *rSmKI-1* na concentração final de 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25 ou 15,62 µg/mL e o potencial de citotoxicidade foi avaliado pelo ensaio MTS. O meio sozinho foi utilizado para calcular o percentual de células viáveis. As células BHK-21 também foram incubadas com uma solução de CTAB (100 mM) como controle positivo de citotoxicidade. (***) indica uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$).

5.1.7 *SmKI-1* e a porção domínio Kunitz atuam como inibidores de tripsina e também da elastase neutrofílica

Foi investigado o potencial do *rSmKI-1* para inibir a tripsina bovina e a elastase neutrofílica, sendo a última uma importante serino protease com papel na resposta inflamatória. Realizou-se ensaios enzimáticos *in vitro* utilizando o *rSmKI-1* inteira, o domínio de Kunitz e a região c-terminal da proteína e observamos que *rSmKI-1* e seu domínio Kunitz demonstraram atividade inibitória contra a tripsina na concentração de 100nM (relação Enzima:inibidor, 1:1) e a elastase neutrofílica na concentração de 300nM (1:3). No entanto, a região c-terminal não revelou atividade inibitória frente à nenhuma serino protease (Figura 14A, B).

5.1.8 Inibição da Elastase em cultura de Neutrófilos

A inibição da atividade da elastase em cultura de neutrófilos foi observada através da determinação da quantidade de substrato degradado no meio, indicado pela alteração de cor do sobrenadante. Neutrófilos obtidos a partir da medula de camundongos foram cultivados e pré-tratados com rSmKI-1 ou seu domínio Kunitz ou c-terminal na concentração de 40µM e então estimulados com fMLP. Foi observado uma redução na atividade da elastase nos poços contendo rSmKI-1 ou seu domínio Kunitz em até 70%, após o tratamento (Figura 14C). Como nos ensaios utilizando enzimas purificadas, novamente observou-se que o domínio c-terminal não afetou a atividade elastase. Juntos, esses resultados sugerem fortemente que a atividade anti-elastolítica da rSmKI-1 reside no seu domínio Kunitz e é independente do domínio c-terminal.

5.1.9 SmKI-1 quando adicionada ao meio aumenta sobrevivência de esquistossômulos cultivados com Elastase neutrofílica

Anteriormente foi demonstrado que a elastase é tóxica para a fase larval de *S. mansoni* (esquistossômulos) (Freudenstein-Dan et al., 2003). Devido a este fato, decidiu-se testar o efeito protetor da rSmKI-1 em esquistossômulos cultivados e tratados com elastase. O efeito tóxico da elastase nos esquistossômulo foi evidente em baixa concentração, como 0,05 mg/mL (Figura 14D). Após 24 horas, rSmKI-1 (0,15 mg/mL) inibiu visivelmente a capacidade da elastase neutrofílica de matar os esquistossômulos, uma redução de 70% da morte do parasito. Este efeito protetor observado com a adição da rSmKI-1 foi provavelmente devido à inibição da atividade de elastase e pode ser uma estratégia de evasão imune desenvolvida pelo parasito para sobreviver em hospedeiros vertebrados.

5.1.10 SmKI-1 é capaz de bloquear o sítio ativo da elastase neutrofílica

Para entender melhor a base molecular da inibição de elastase neutrofílica pelo domínio Kunitz da SmKI-1, estudos de *Docking* molecular foram conduzidos com o servidor Web Clus Pro 2.0. Os resultados do *Docking* sugerem um bloqueio completo do sítio ativo da elastase de pela SmKI-1, revelando um modo de ligação previsto muito semelhante ao observado para outros inibidores de elastase, nos quais dois *loops* da SmKI-1 (Asp¹⁴a Leu²¹ e Phe³⁶ a Leu⁴²) estão em contato com a enzima (Figura 14E) (Garcia-Fernandez et al., 2015; Stapels et al., 2014). A

análise da interface prevista com PISA revela que 14 resíduos *SmKI-1* estão envolvidos na interface, e aproximadamente 20% (761,8 Å²) da área acessível ao solvente do inibidor está escondida após a formação do complexo. A interface também é estabilizada por cinco ligações de hidrogênio intermoleculares, envolvendo todos os resíduos do *loop* Asp¹⁴-Leu²¹. Localizado na posição P1, o resíduo Arg¹⁸ da *SmKI-1* parece ser chave para estabilizar a interação. Tanto a sua estrutura principal como o NH e O estão envolvidos nas ligações de hidrogênio com a elastase neutrofílica Ser²¹⁷ e Gly²⁰⁰, respectivamente (Figura 14E). Foi previamente discutido que, na posição P1, os resíduos hidrofóbicos são preferidos para a inibição da elastase, em parte devido à dificuldade de acomodar maiores resíduos em S1. De acordo com isso, os dados do banco de dados MEROPS indicam Val, Ile e Ala como os resíduos de P1 mais frequentes em substratos da elastase neutrofílica (Rawlings et al., 2016). Além disso, a mutação Lys¹³Leu em P1 de um inibidor de Kunitz demonstrou melhorar a afinidade com a elastase pancreática (Garcia-Fernandez et al., 2015). Curiosamente, os resultados de *Docking* indicam que a elastase neutrofílica acomoda perfeitamente a Arg¹⁸ da *SmKI-1* no bolso S1, uma vez que a porção hidrofóbica da sua cadeia lateral ocupa o bolso S1, como esperado para um pequeno resíduo hidrofóbico, enquanto o grupo guanidino forma uma interação intramolecular com ponte salina com Glu¹⁴ *SmKI-1* e uma interação de empilhamento π com o resíduo Phe¹⁹⁹ da elastase neutrofílica. O aminoácido Glu¹⁴ da *SmKI-1* também está envolvido em uma interação de ligação de hidrogênio com a elastase neutrofílica no resíduo Cys²²³. As ligações de hidrogênio restantes previstas envolvem Ile¹⁶ e Leu²⁰ da *SmKI-1* ligadas respectivamente à elastase neutrofílica nos resíduos Val²¹⁹ e Phe⁵⁴. A cadeia lateral do resíduo Leu²⁰ da *SmKI-1*, um resíduo altamente conservado entre os inibidores do tipo Kunitz, também se encaixa no bolso de elastase S2' (Figura 14F). De modo geral, os resultados do *Docking* indicaram uma eficiente complementaridade química entre a proteína *SmKI-1* e a elastase neutrofílica, corroborando com a potente inibição *in vitro* observada.

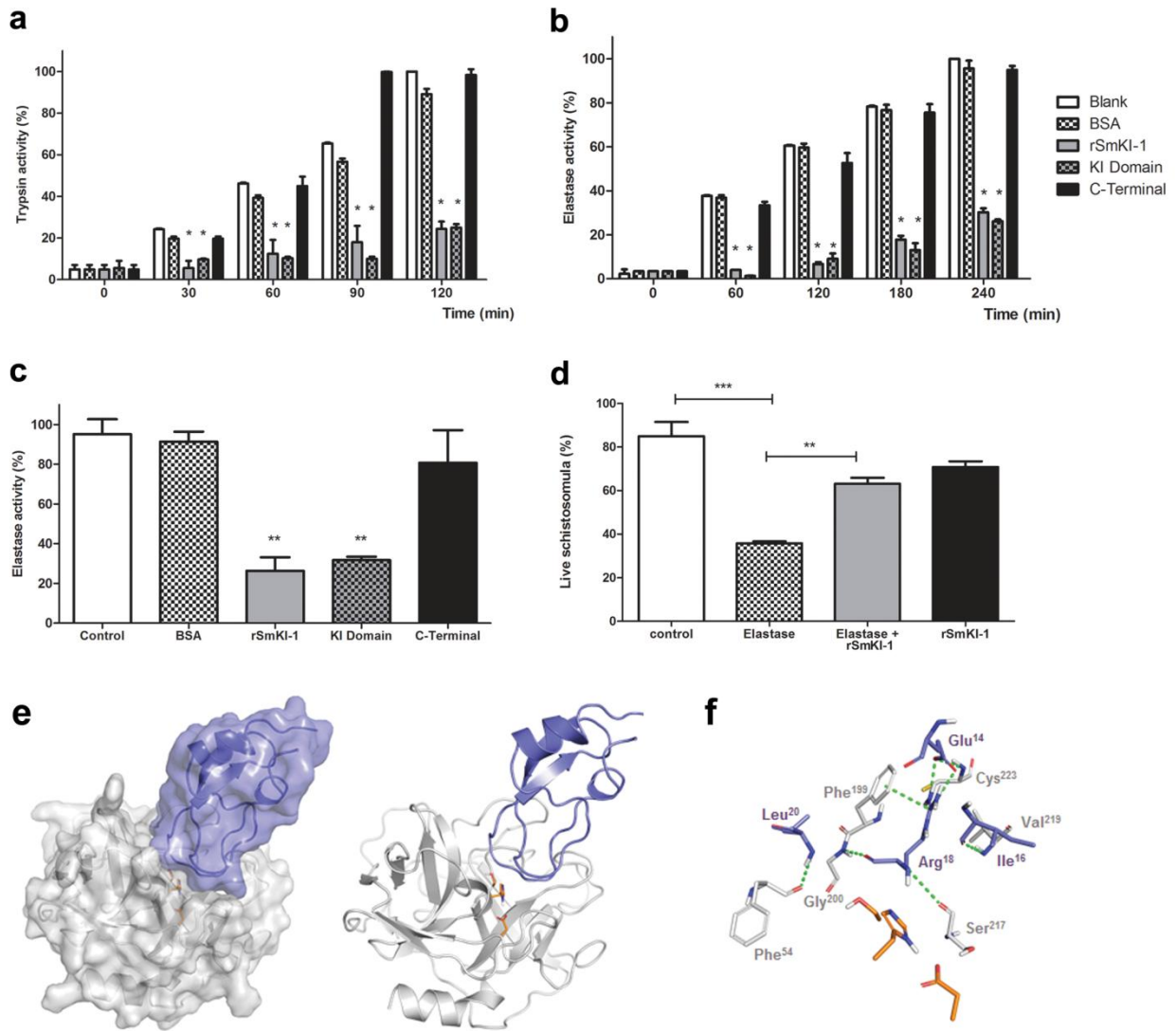


Figura 14 – A *SmKI-1* recombinante inibe serino proteases e protege o estágio larval de *S. mansoni* contra a elastase neutrofílica.

(a) Atividade da tripsina bovina (enzima (e): inibidor (i), 1:1), (b) atividade Elastase Neutrofílica Humana (e:i, 1:3) e (c) atividade da elastase secretada por neutrófilos em cultura. Em todas os experimentos, a albumina de soro bovino (BSA) foi utilizada como um controle negativo nas reações de inibição. A inibição de enzimas foi detectada ao longo de duas horas de incubação utilizando *rSmKI-1*, ou domínio Kunitz, ou c-terminal. As barras representam o percentual da atividade enzimática±desvio padrão. Diferenças significativas entre os grupos incubados com *rSmKI-1* ou domínio Kunitz em relação ao grupo controle são indicados por * $p < 0,05$ e ** $p < 0,005$. (d) Efeito da *rSmKI-1* em cultura esquistossômulos cultivados em cultura contendo elastase neutrofílica (e:i, 1:3). As barras representam o percentual de parasitos vivos±desvio padrão. As diferenças estatisticamente significativas entre os grupos são indicadas por ** $p < 0,005$ e *** $p < 0,001$. Os dados são representativos de três experimentos independentes. (e)

Interação molecular entre resíduos do domínio kunitz da *SmKI-1* (roxo) com a elastase neutrofílica (cinza) predita por *Docking* com CLUSPRO 2.0. Os resíduos da tríade catalítica da elastase (His⁷⁰, Asp¹¹⁷ e Ser²⁰²) são destacados em traços laranja. (f) A análise detalhada da interface prevista por *Docking* revela resíduos envolvidos em ligações de hidrogênio, uma ponte salina e uma interação empilhamento π (todas as interações mostradas com traços em verde). Os resíduos de *SmKI-1* foram representados e marcados em roxo, e resíduos da elastase neutrofílica em cinza.

5.1.11 Ausência da expressão da proteína *SmKI-1* diminui a sobrevivência de esquistossômulos em cultura de neutrófilos

Para investigar ainda mais a relação entre a molécula *SmKI-1* e neutrófilos, isolou-se neutrófilos de camundongos e incubou as células com esquistossômulos de 1 dia de idade após o tratamento com siRNA-*SmKI-1* ou siRNA controle. Após 24 horas de incubação, os neutrófilos promoveram a morte dos esquistossômulos, o que foi significativamente maior nos parasitos suprimidos para o gene da *SmKI-1* quando comparados ao grupo controle (Figura 15, barras brancas). Como controle da viabilidade, ambos os grupos de parasitos eletroporados também foram analisados na ausência de neutrófilos e não demonstram diferença na sobrevivência dos esquistossômulos após 2 dias em cultura (Figura 15, barras pretas). Imagens representativas das culturas apresentam a morfologia dos esquistossômulos na presença ou ausência de neutrófilos.

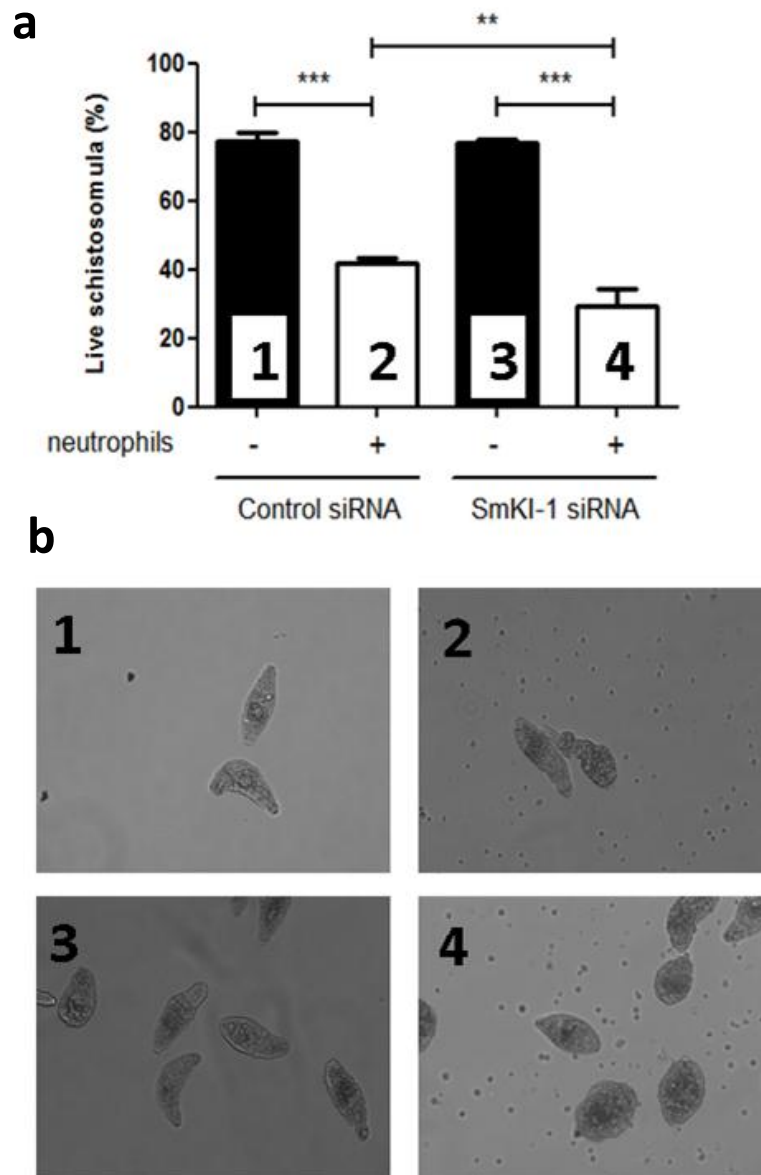


Figura 15 – Esquistossômulos de *S. mansoni* diminuem sobrevivência em cultura de neutrófilos. (a) Viabilidade de esquistossômulos em uma co-cultura com neutrófilos. As barras representam o percentual de parasitos vivos \pm SD. As diferenças estatisticamente significativas entre os grupos são indicadas por ** $p < 0,005$ e *** $p < 0,001$. Resultados são representativos de dois experimentos independentes. (b) Imagens representativas de esquistossômulos na ausência ou presença de neutrófilos. Grupo siRNA Controle (painéis 1 e 2) ou siRNA-*SmKI-1* (painéis 3 e 4).

5.1.12 rSmKI-1 reduz a ativação e migração de neutrófilos, e danos no fígado causados por paracetamol (APAP)

Camundongos TLR4 KO foram utilizados em todos os experimentos *in vivo* de modelos inflamatórios para minimizar a resposta celular relacionada ao LPS presente nas proteínas heterólogas. TLR4 é o principal receptor de ativação de macrófagos por LPS bacteriano (Medzhitov, 2007). Considerando que os antígenos utilizados nestes experimentos foram expressos e purificados a partir de culturas bacterianas, a contaminação com LPS bacteriano poderia afetar a migração celular. Portanto, ao utilizar TLR4 KO eliminamos qualquer efeito possível do LPS em nossos modelos. Para investigar ainda mais a capacidade da proteína rSmKI-1 em interferir na migração e função dos neutrófilos, utilizou-se o modelo de paracetamol (APAP), um composto hepatotóxico que causa morte celular e deposição maciça de DNA no fígado, induzindo inflamação aguda associada ao recrutamento de neutrófilos (Marques et al., 2015). Os camundongos foram divididos em dois grupos, sendo um tratado com rSmKI-1 por via intravenosa (10mg/Kg, grupo APAP+rSmKI-1) e outro grupo tratado com veículo (PBS, grupo APAP). Imediatamente após injeção com rSmKI-1 ou veículo, os camundongos foram desafiados com APAP via gavagem e as análises foram realizadas após 24 horas. A migração de neutrófilos para o fígado dos camundongos em resposta ao desafio APAP foi primeiramente avaliada através da quantificação indireta através do ensaio de atividade de Mieloperoxidase (MPO). Os camundongos desafiados com APAP apresentaram uma atividade MPO significativamente aumentada quando comparados ao grupo de controle PBS. O tratamento prévio com rSmKI-1 diminuiu significativamente a atividade de MPO induzida pelo tratamento com APAP (Figura 16A). Também analisou-se a atividade da elastase e foi possível observar uma diminuição de aproximadamente 49% na atividade enzimática no grupo APAP+rSmKI-1 em comparação ao grupo tratado apenas com APAP (Figura 16B). Para investigar diretamente o efeito da SmKI-1 na migração de neutrófilos para o fígado, analisou-se o microambiente hepático utilizando-se da técnica de microscopia confocal intravital. O grupo tratado com APAP apresentou extensas áreas de acúmulo de DNA nos sinusóides do fígado e no parênquima e um maior infiltrado de neutrófilos (Figura 16C, D). Em contraste, o grupo APAP+rSmKI-1 apresentou uma deposição de DNA fortemente reduzida e uma infiltração hepática de neutrófilos de aproximadamente 72% menor (Figura 16C, D). Sob análise histopatológica, os camundongos tratados com APAP+rSmKI-1 apresentaram sinais histológicos mais leves de hepatotoxicidade (Figura 16E). Por outro lado, os animais tratados com APAP apresentaram necrose hepática aberta e degeneração de hepatócitos (Figura 16E). Finalmente, investigamos os níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT), uma metodologia padrão-ouro para acesso à lesão hepática. Os níveis

de ALT no soro foram significativamente maiores em camundongos com APAP em comparação ao grupo controle de PBS (Figura 16F). No entanto, os camundongos tratados com APAP+r*SmKI-1* apresentaram níveis mais baixos de ALT, indicando diminuição do dano hepático (Figura 16F). Em conjunto, esses dados mostraram que a administração da r*SmKI-1* levou a uma diminuição da migração dos neutrófilos e com isso diminuição da inflamação, culminando em uma proteção marcante contra lesões hepáticas desencadeadas pelo desafio com APAP.

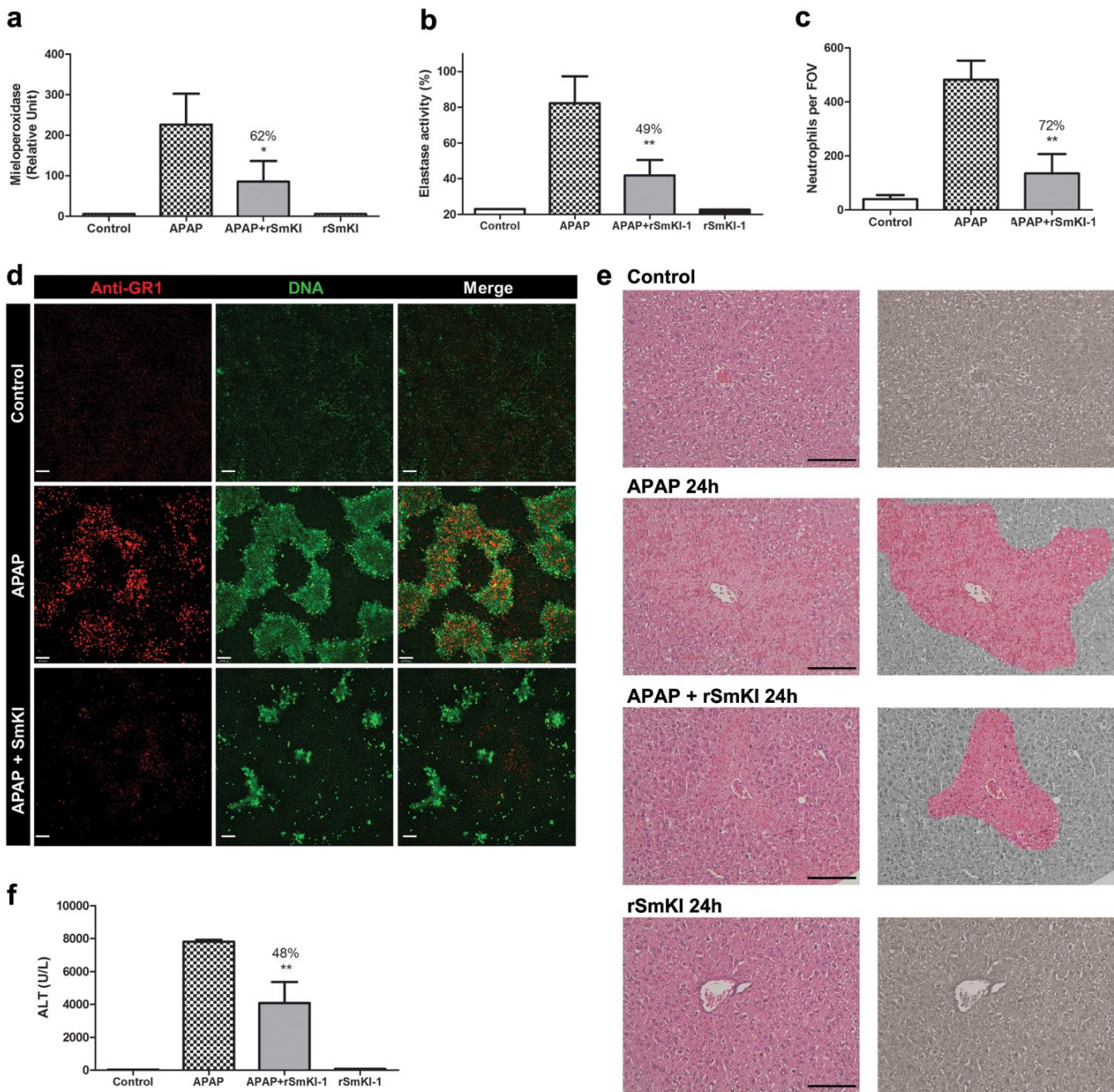


Figura 16 - rSmKI-1 reduz a lesão hepática induzida por APAP.

As atividades de (a) MPO e de (b) elastase neutrofílica foram mensuradas a partir do fígado de camundongos induzidos pela droga hepatotóxica, APAP, e tratados com rSmKI-1. (c) Número de neutrófilos por campo de visão (FOV) no fígado em animais tratados com APAP sozinho ou APAP+rSmKI-1. (d) Microscopia confocal intravital do fígado evidenciando a migração de neutrófilos (anti-GR1 PE em vermelho) em sítios necróticos (coloração Sytox-green) após 24 horas do desafio com APAP. Barra de escala=100µm. (e) Histologia coradas com HE representativa de secções do fígado. Barra de escala=300µm. E (f) níveis de ALT sérica de camundongos previamente tratados com rSmKI-1 e hepatotoxicidade induzida por APAP. Resultados são representados como a média±DP de n=6 por grupo. Os asteriscos indicam

diferenças estatisticamente significativas entre APAP+r*SmKI-1*, em comparação ao grupo APAP **p* <0,05 ou ** *p* <0,005.

5.1.13 r*SmKI-1* diminui a resposta inflamatória na artrite induzida por MSU

Uma vez que o r*SmKI-1* parece afetar a atividade dos neutrófilos, avaliou-se seu potencial para controlar doenças inflamatórias em um modelo experimental de artrite. Nesse modelo os neutrófilos são as células inflamatórias fundamentais que contribuem para a patogênese da doença. Os camundongos TLR4 KO foram divididos em dois grupos tratados, sendo um dos grupos tratado com r*SmKI-1* (10mg/Kg) por via intravenosa, enquanto o outro grupo recebeu PBS como veículo. Imediatamente depois, injetou-se os cristais de MSU puros diretamente nas articulações do joelho esquerdo e o PBS foi injetado no joelho direito e usado como controle. A injeção de MSU na articulação do joelho de camundongos induziu aumento significativo de neutrófilos no tecido periarticular, conforme avaliado pelo teste de MPO. No entanto, a administração de r*SmKI-1* diminuiu a MPO nas articulações do joelho (Figura 17A). Além disso, o número de células totais foi significativamente menor na cavidade articular de camundongos tratados com r*SmKI-1* em comparação aos animais desafiados com MSU (Figura 17B). Esta redução de células foi caracterizada pela diminuição da infiltração de neutrófilos na cavidade articular (Figura 17C). Em seguida, examinou-se também a secreção da citocina IL-1 β no tecido periarticular do joelho e observou-se níveis marcadamente aumentados desta citocina após a injeção de MSU. Por outro lado, o tratamento com r*SmKI-1* diminuiu significativamente os níveis de IL-1 β (Figura 17D). Além disso, 16 horas após a injeção de MSU, os cristais de MSU induziram hipernocicepção mecânica (como se observa pelo limiar de retirada da pata diminuída) devido à inflamação das articulações, especialmente pelo recrutamento de neutrófilos, uma vez que o acúmulo de neutrófilos na cavidade do joelho articular tem sido amplamente associado ao aumento da hipernocicepção em camundongos com artrite (Amaral et al., 2012; Coelho et al., 2008; Cunha et al., 2008). No entanto, os camundongos MSU+r*SmKI-1* apresentaram hipernocicepção reduzida (como observado no aumento do limite de retirada da pata) (Figura 17E) que também foi associada à redução de neutrófilos na cavidade do joelho (Figura 17D). O limiar de retirada induzido pela flexão da pata foi expresso em gramas (g) e utilizado para inferir respostas comportamentais associadas à dor experimental (hipernocicepção). O maior limite de retirada significa menor hipernocicepção (camundongos com redução da dor suportam maior pressão local) e vice-versa. Imagens representativas das

secções das articulações tibio-tarsais coradas com HE revelaram uma redução na infiltração de neutrófilos e diminuição da hiperplasia sinovial no grupo tratado MSU+r*SmKI*-1 quando comparados ao grupo MSU (Figura 17F).

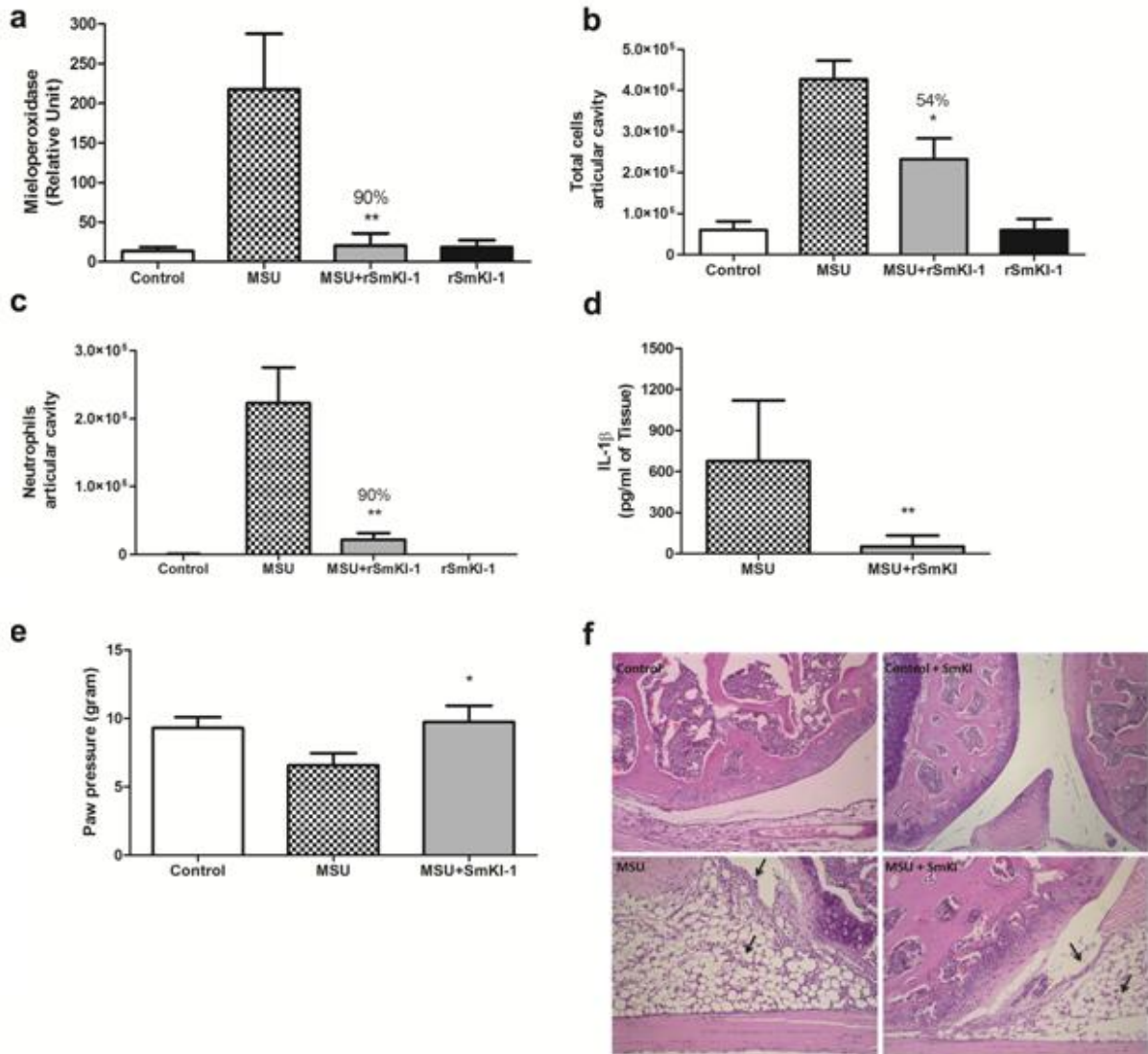


Figura 17 – O tratamento com r*SmKI*-1 diminui a inflamação da artrite induzida por MSU.

A inflamação tecidual foi acompanhada por (a) números relativos de neutrófilos no tecido periarticular determinado pelo teste de MPO, (b) células totais, (c) recrutamento de neutrófilos na cavidade sinovial e (d) secreção de IL-1β no tecido periarticular do joelho. Além da (e) disfunção articular observada pelo aumento da resposta nociceptiva de camundongos frente à estimulação mecânica utilizando um teste de medidor de pressão de pata eletrônico 15 horas após a injeção de MSU ou PBS (veículo controle). Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes do grupo MSU+r*SmKI*-1, em comparação com o grupo MSU, **p* <0,05 ou ***p* <0,005. (f) Imagens representativas da análise histopatológica coradas com HE de secções da articulação tibio-tarsiana de um camundongo tratado com MSU+r*SmKI*-1, MSU,

tratado com veículo e tratado rSmKI-1-controle. As setas e os asteriscos indicam que a membrana sinovial apresenta infiltrado inflamatório. Os resultados são a média±DP de n=6 por grupo.

5.1.14 rSmKI-1 reduz a migração de neutrófilos na cavidade pleural induzida por carragenina

Para continuar avaliando a interferência da proteína rSmKI-1 na migração de neutrófilos, utilizou-se o modelo de pleurisia induzida por carragenina que induz uma resposta inflamatória promovida pela adesão e migração de neutrófilos através do endotélio vascular (Byrum et al., 1999). O infiltrado celular para as cavidades pleurais dos camundongos foi analisado por lâminas de cytopspin e citometria de fluxo para dessa forma determinar a presença de células específicas após inflamação induzida por carragenina. Avaliou-se as células migratórias para a cavidade pleural entre dois grupos de camundongos, o grupo carragenina+rSmKI-1 e o grupo carragenina sozinho. Primeiramente os animais receberam de forma intravenosa a rSmKI-1 (10mg/Kg) ou PBS, e depois os grupos foram divididos como indicado acima e receberam carragenina (2mg/mL) ou injeção de veículo na cavidade pleural. Foi observada a redução do número total de células que se infiltraram na cavidade pleural após a injeção intrapleural de carragenina, mas essa redução não foi significativa (Figura 18A). Mas quando analisado especificamente as células, observou-se que o tratamento com rSmKI-1 reduziu cerca de 50% dos neutrófilos na cavidade pleural de camundongos administrados com carragenina, pela contagem em lâminas de cytopspin (Figura 18B) e pelo percentual da população de neutrófilos (Ly6G⁺CD11b⁺) por citometria de fluxo (Figura 18C). Além disso, evidenciou-se que, a administração prévia de SmKI-1 em camundongos, injetados intrapleuralmente com carragenina, não interferiu no percentual de macrófagos induzidos por carragenina (F4/80⁺CD11b⁺) (Figura 18D) e linfócitos (CD3⁺) (Figura 18E) recrutados para a cavidade pleural em comparação com o controle.

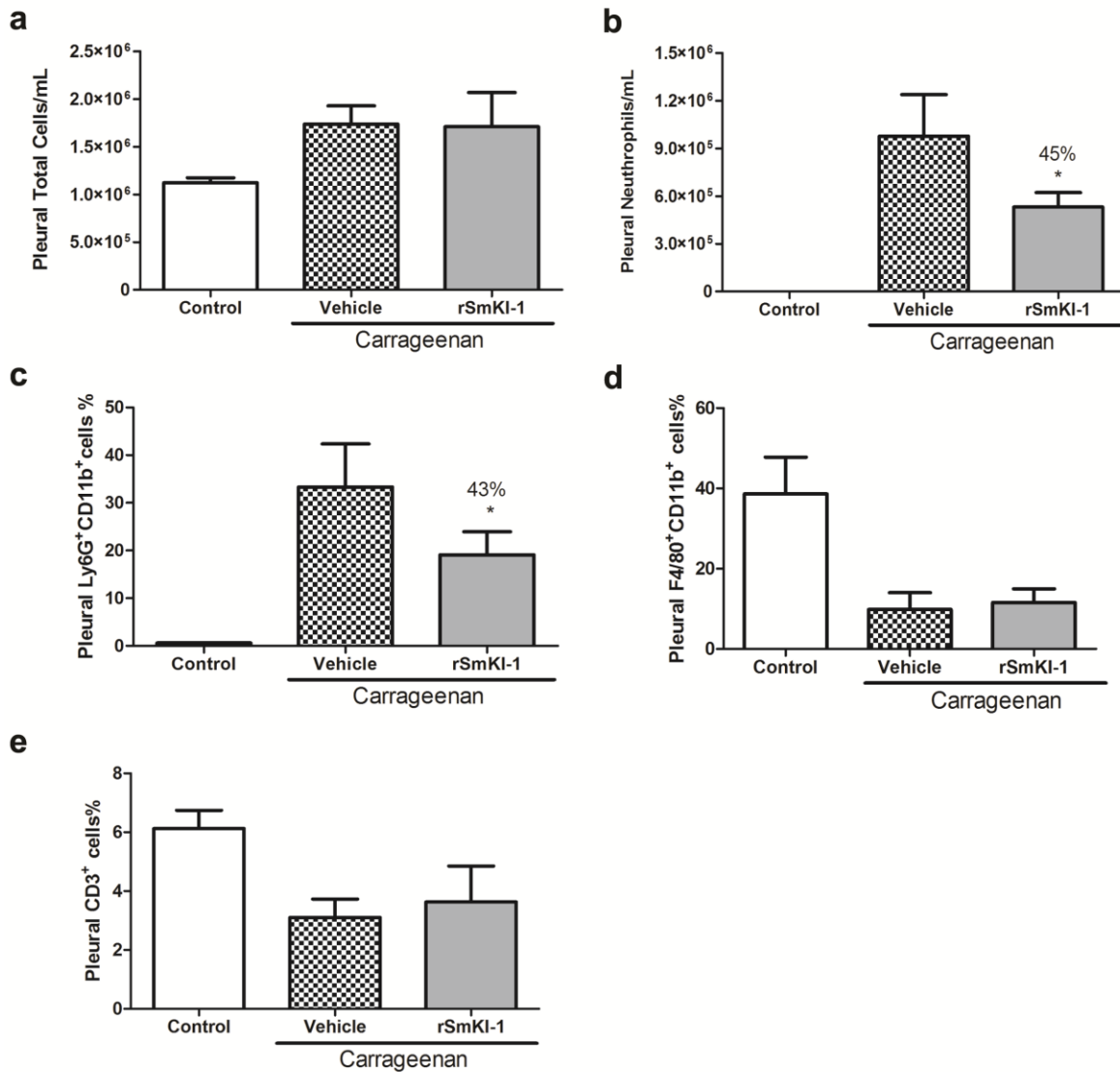


Figura 18 – Tratamento com rSmKI-1 reduz neutrófilos em resposta à injeção de carragenina na cavidade pleural.

Contagem de (a) células totais e (b) neutrófilos através da preparação de cytopspin. As populações de células específicas do lavado pleural também foram avaliadas por citometria de fluxo, seguindo o percentual de (c) neutrófilos (Ly6G⁺CD11b⁺), (d) macrófagos (F4/80⁺CD11b⁺) e (e) linfócitos (CD3⁺) em relação ao células totais do lavado. Os resultados foram expressos como o número de células por cavidade (média±DP) para o grupos n=5. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas entre o grupo carragenina+rSmKI-1, em comparação ao grupo carragenina *p <0,05.

5.1.14 rSmKI-1 não reduz a migração de linfócitos e macrófagos na cavidade peritoneal induzida por tioglicolato

Para avaliar se o rSmKI-1 interfere na migração de leucócitos, utilizou-se o tioglicolato, um estímulo pró-inflamatório não específico que é utilizado para aumentar o rendimento de macrófagos peritoneais e linfócitos, especialmente após 3 dias (Hoover and Nacy, 1984; Ray and Dittel, 2010). O infiltrado celular da cavidade peritoneal de camundongos foi analisado por cytopspin para determinar a presença de células após a inflamação induzida por tioglicolato. Avaliou-se as células migratórias na cavidade peritoneal entre dois grupos de camundongos, o grupo tioglicolato+rSmKI-1 e o grupo que recebeu apenas tioglicolato. Ambos os grupos receberam injeção de tioglicolato (3mL) na cavidade peritoneal e, após 48 horas, um grupo recebeu por via intravenosa rSmKI-1 na concentração de 10mg/Kg. Não houve diferença significativa no número total de células que se infiltraram na cavidade peritoneal após a injeção intraperitoneal de tioglicolato em ambos os grupos experimentais (Figura 19A). Além disso, foi demonstrado que o tratamento com rSmKI-1 não reduziu o número de linfócito e nem macrófagos na cavidade peritoneal de camundongos que foram administrados tioglicolato, avaliado pela contagem específica das células em lâminas de cytopspin em comparação ao grupo tioglicolato controle (Figura 19B e C).

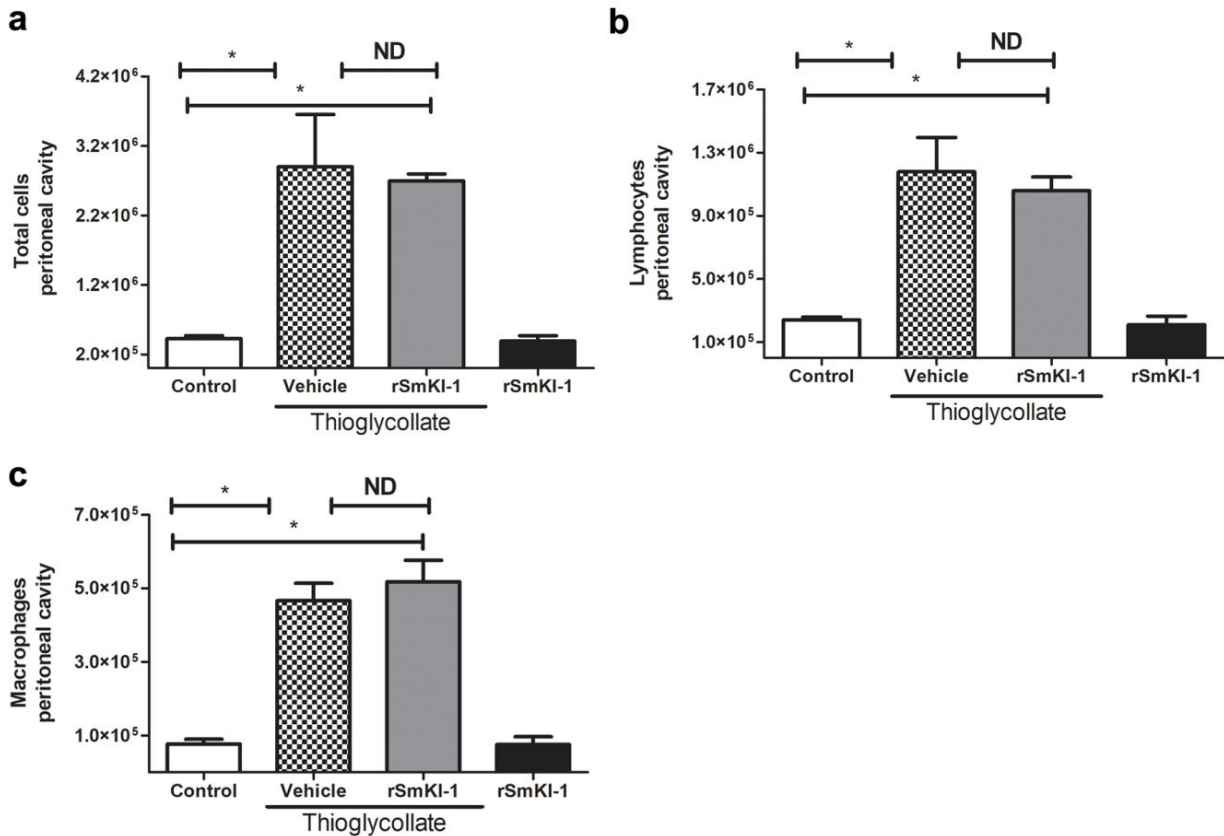


Figura 19 – O efeito da rSmKI-1 nas células peritoneais induzidas por tioglicolato.

Após 72 horas da injeção de tioglicolato, todos os grupos foram avaliados quanto às células peritoneais. (a) Número de células totais, (b) Linfócitos e (c) Macrófagos e (foram contados em lâminas de cytopspin). Os resultados foram expressos como média±DP. O número de animais por grupo foi n=4. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos tioglicolato+rSmKI-1, comparado ao grupo tioglicolato, *p <0,05.

5.2 – Caracterização Imunológica da proteína SmKI-1

5.2.1 A vacinação com rSmKI-1 induz altos níveis de IgG

Até o momento, os nossos dados demonstram que SmKI-1 é capaz de inibir *in vitro* e *in vivo* as funções elastolíticas do hospedeiro. Esta proteína é altamente expressa em estágios intravascular de ciclo de vida e está presente no lúmen intestinal, uma importante interface parasito-hospedeiro (Figueiredo et al., 2015b). Dessa forma, tem-se evidências suficientes para propor que a SmKI-1 seria um importante candidato vacinal no desenvolvimento de uma vacina anti-esquistossomose. Camundongos C57BL/6 foram imunizados com 3 doses da vacina formulada com 25µg de rSmKI-1 (ou PBS como controle) com adjuvante de Freund (CFA/IFA). Os soros

de 8-10 animais de cada grupo de vacinação foram testados por ELISA para avaliar os níveis de IgG totais específicos e suas subclasses IgG1 e IgG2a contra rSmKI-1. A produção significativa de anticorpos IgG anti-rSmKI-1 foi observada em camundongos imunizados com rSmKI-1 em comparação ao grupo de controle (PBS) em todos os pontos de coleta após a primeira imunização (Figura 20A). Após o dia 30, os camundongos imunizados com rSmKI-1 produziram níveis mais elevados de anti-SmKI-1 quando comparados com camundongos imunizados com PBS ($p < 0,05$). A medição de isotipos de IgG revelou que a imunização com rSmKI-1 induziu a produção de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-rSmKI-1 depois das imunizações. Os níveis de anticorpos IgG1 específicos aumentaram após a terceira imunização mantiveram-se altos após a infecção (Figura 20B), enquanto que os níveis de anticorpos IgG2a específicos aumentaram continuamente até o dia 90 (Figura 20C). Além disso, a relação IgG1/IgG2a reduziu a partir do dia 45 (Figura 21A), que se correlaciona com a elevação na produção de IgG2a anti-rSmKI-1 (Figura 20C). Assim, uma razão de IgG1/IgG2 reduzida, sugere o desenvolvimento de uma resposta imune Th1 induzida por vacinação com rSmKI-1 formulado com adjuvante de Freund. Além disso, a análise por *Western blot* foi realizada para determinar se os anticorpos policlonais criados contra rSmKI-1 após a vacinação eram capazes de reconhecer a proteína nativa em extratos do parasito. A proteína com o tamanho esperado da SmKI-1 (16kDa) foi detectada no extrato de helmintos adultos (Figura 21B, canaleta 2). Os soros de camundongos pré-ímmunes foram utilizados como controle e estes não detectaram proteínas no extrato (Figura 21B, canaleta 1). Este resultado indica que anticorpos produzidos contra a SmKI-1 recombinante foram capazes de reconhecer o inibidor de serino proteases do tipo Kunitz de *S. mansoni* na sua forma nativa.

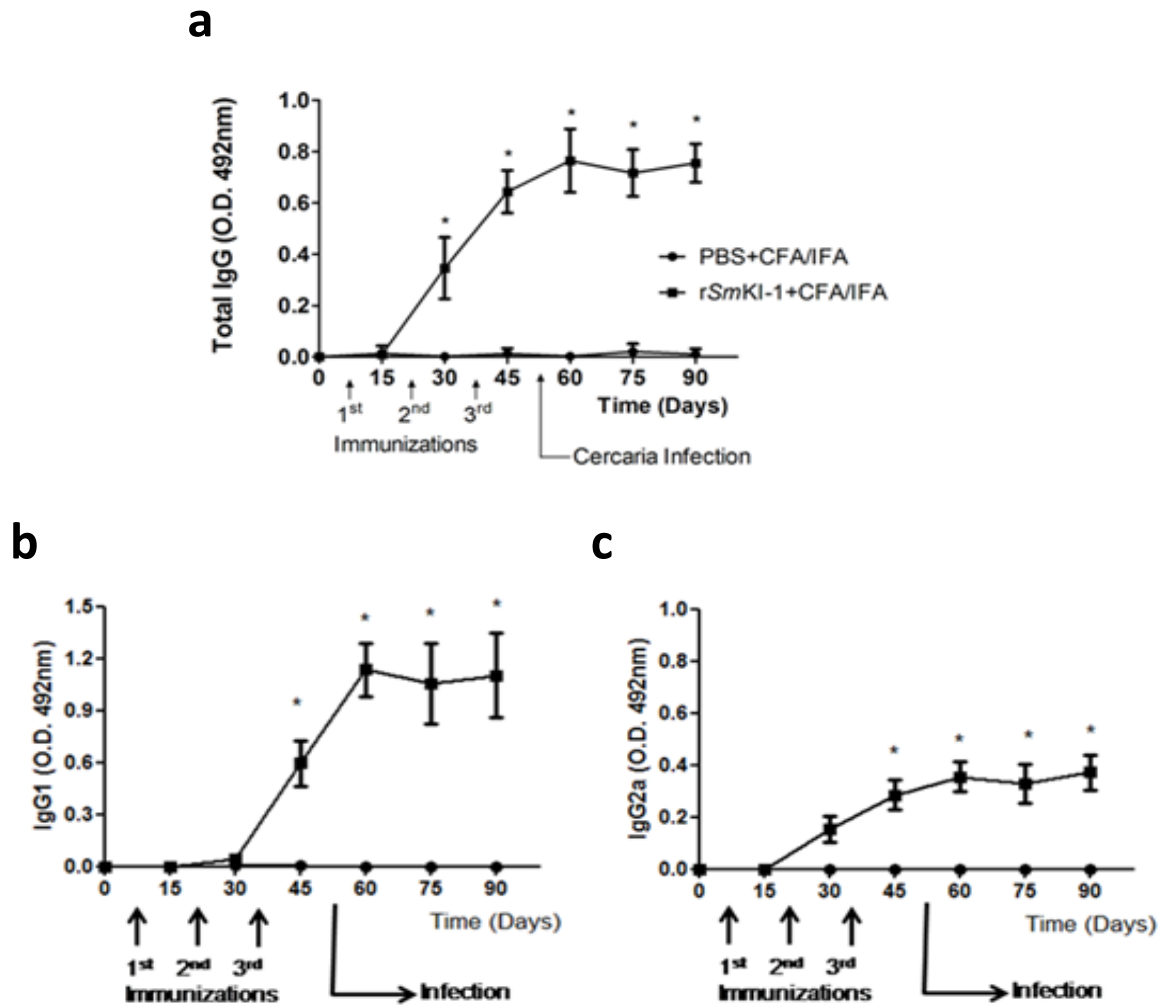


Figura 20 – Cinética de anticorpos específicos anti-*SmKI-1* nos soros de camundongos vacinados com preparações *rSmKI-1* e Freund.

(a) Cinética da produção de IgG anti-*rSmKI-1* em camundongos imunizados. Coletou-se os soros de 8-10 animais de cada grupo imunizados nos dias 15, 30, 45, 60, 75 e 90 e avaliados por ELISA. As setas indicam cada imunização. (b) Cinética de IgG1 e (c) IgG2a específicos. Grupo *rSmKI-1* estatisticamente significativo em relação ao grupo controle PBS. Valores de $*p < 0,05$. Os dados são representativos de dois experimentos independentes.

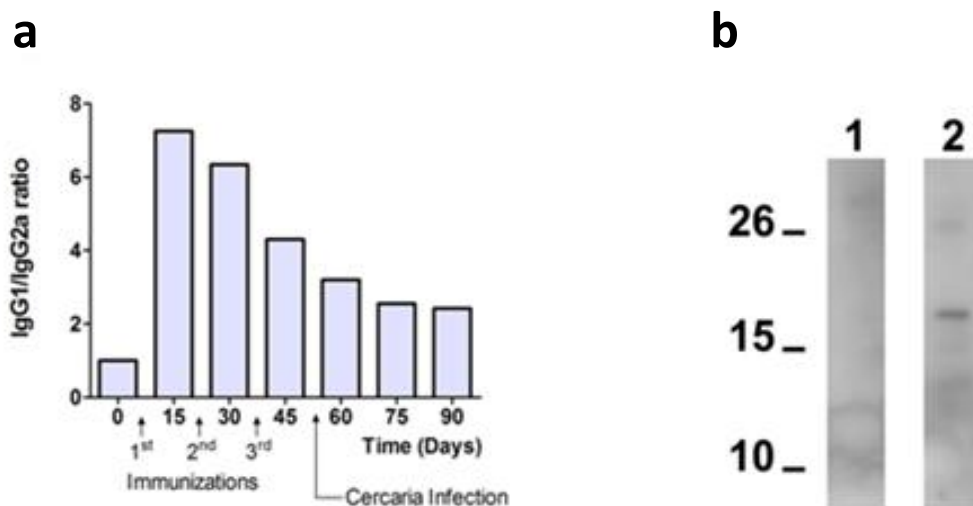


Figura 21 – Especificidade dos anticorpos contra *SmKI-1*.

(a) IgG1 e IgG2a foram dosados por ELISA e os valores foram usados para calcular a razão de IgG1/IgG2a. (b) Quinze microgramas de extrato proteico a partir de parasitos adultos foram separados por SDS-PAGE, transferidas para membrana de PVDF e incubadas com soro de camundongos imunizados com r*SmKI-1*. Utilizando o soro anti-*SmKI-1* detectou-se uma banda dominante com o tamanho previsto para *SmKI-1*, de 16 kDa (2). Como controle utilizou-se soros de camundongos pré-imunes e não foi verificada a presença de nenhuma banda na membrana (1).

5.2.2 Perfil de citocinas após a vacinação com r*SmKI-1* e desafio com *S. mansoni*

Após a vacinação, avaliou-se a produção de IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-5 e IL-10 em sobrenadantes de células de baço usando a linhagem de camundongo C57BL/6, selvagem e TLR4 KO, após uma semana da terceira imunização. As células de camundongos deficientes para o receptor TLR4, juntamente com as amostras tratadas com polimixina B elimina qualquer possível contaminação por LPS presente no antígeno. Foi detectado níveis significativamente mais elevados de IFN- γ em ambas as células de camundongos TLR4 KO ($764,5 \pm 228,0$ pg/mL) e C57BL/6 ($802,6 \pm 322,4$ pg/mL) imunizados com r*SmKI-1*, quando comparados com os grupos controles imunizados com PBS (Figura 22A). Além disso, foram detectados níveis elevados de TNF- α em células do baço de animais imunizados com r*SmKI-1* quando comparado ao grupo controle para camundongos C57BL/6 ($1288,8 \pm 172,9$ pg/mL) e para camundongos TLR4 KO ($550,6 \pm 61,2$ pg/mL) (Figura 22B, grupo estimulado com r*SmKI-1*). Em relação à produção de citocinas do perfil Th2, IL-4 e IL-5, foram produzidas em níveis muito baixos sem diferença estatisticamente significativas entre os grupos vacinados e o controle (dados não apresentados).

Níveis significativamente elevados de citocinas imunomodulatória IL-10 também foram observados em animais vacinados com r*Sm*KI-1 em comparação aos controles em camundongos C57BL/6 (2049 ± 243.9 pg/mL) e os camundongos TLR4 KO ($1187,4 \pm 141,4$ pg/mL) (Figura 22C). Estes resultados indicam que a imunização com r*Sm*KI-1 formulada com adjuvante de Freund induz uma resposta imune do tipo Th1 caracterizada pela produção de elevados níveis de citocinas Th1 IFN- γ e TNF- α e baixa produção das citocinas Th2, IL-4 e IL-5.

Além disso, avaliou-se o perfil de citocinas pós 45 dias do desafio com cercárias e semelhante à análise anterior, foram detectados citocinas Th1 IFN- γ ($1165,8 \pm 110,7$ pg/mL) e TNF- α ($1555,9 \pm 170,6$ pg/mL) (Figuras 23A e B, grupo estimulado com r*Sm*KI-1) no sobrenadante de células de baço de animais imunizados com r*Sm*KI-1. A citocina Th2 IL-5 ($266,5 \pm 93.1$ pg/mL) foi detectada em células de animais infectados, assim como níveis elevados de IL-10 ($1836,2 \pm 323,49$ pg/mL) foram mantidos após a infecção (Figuras 23C e D, grupo estimulado com r*Sm*KI-1). Concanavalina A (ConA) ou LPS foram utilizados como controles positivos para confirmar que os esplenócitos foram responsivos aos estímulos (Figuras 22 e 23, grupo ConA/LPS). As células do baço estimuladas apenas com meio não produziram concentrações de citocinas detectáveis pelo ensaio utilizado (Figuras 22 e 23, grupo meio).

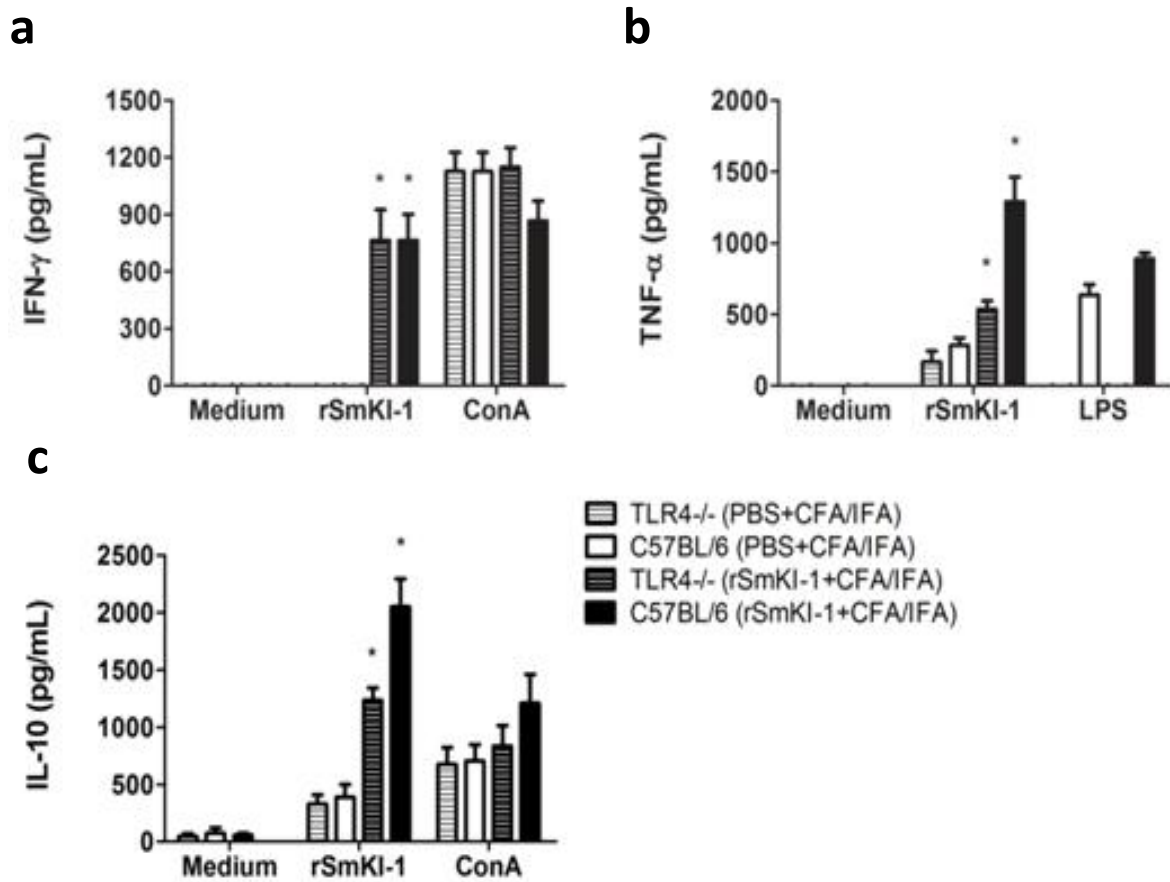


Figura 22 – Perfil de citocinas a partir de esplenócitos recuperados de animais vacinados com rSmKI-1.

Dez dias após a última imunização com rSmKI-1 ou PBS, os esplenócitos de cinco camundongos C57BL/6, selvagens ou TLR4 KO, foram isolados e cultivados para a determinação do perfil de citocinas e analisados quanto à sua produção de IFN- γ (a), o TNF- α (b) e IL-10 (c), em resposta aos estímulos com rSmKI-1, LPS, ConA e meio. Diferenças significativas entre as concentrações de citocinas de animais imunizados com rSmKI-1 e o grupo PBS controle são denotadas por * $p < 0,001$.

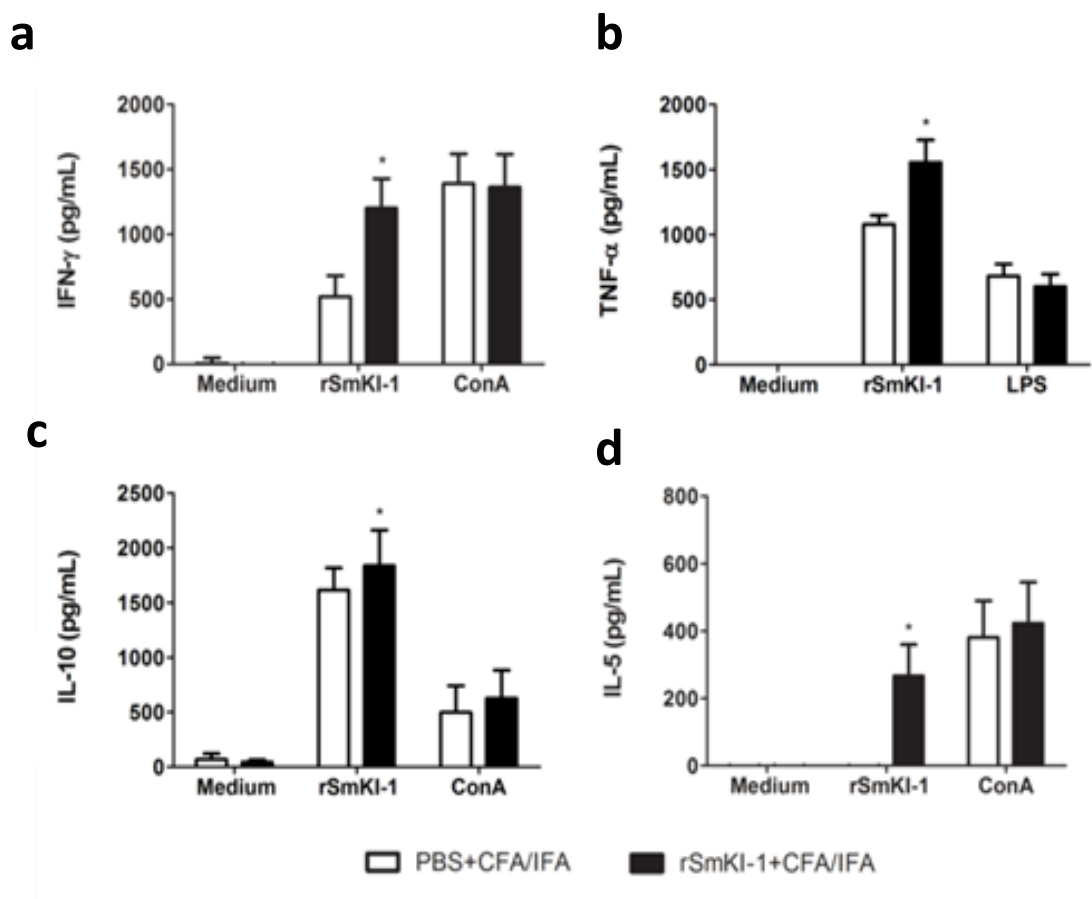


Figura 23 – Perfil de citocinas de esplenócitos de camundongos imunizados com rSmKI-1 e infectados com *S. mansoni*.

Após a imunização de camundongos, estes foram infectados com 100 cercárias de *S. mansoni* e 45 dias depois os camundongos foram sacrificados e a cultura de esplenócitos foi preparada. A produção de citocinas foi avaliada, onde foram detectados níveis elevados de IFN- γ (a), o TNF- α (b), IL-10 (c) e IL-5 (d). Diferenças significativas entre os dados de camundongos imunizados com rSmKI-1 e o grupo PBS são denotadas por * $p < 0,001$.

5.2.3 A imunização com rSmKI-1 induz imunidade protetora em camundongos

Foi formulada uma vacina com SmKI-1 recombinante e adjuvante de Freund e, em seguida, dois ensaios independentes de vacinação foram conduzidos utilizando camundongos C57BL/6 e a imunidade protetora foi avaliada 45 dias após o desafio com 100 cercárias de *S. mansoni*. O grupo controle recebeu apenas adjuvante em PBS. Camundongos vacinados com rSmKI-1

apresentaram uma redução de 51,5% na carga parasitária no primeiro experimento e redução de 45,3% no segundo experimento (Tabela 4).

Tabela 4 – Dados parasitológicos, e análise do número de ovos presentes no de camundongos C57BL/6 vacinados com rSmKI-1 e desafiados com 100 cercárias de *S. mansoni*.

Grupos	Helmintos	Helmintos	Helmintos Total	Ovos do Fígado
	Machos	Fêmeas	Média ±SD	Média ±SD
	Média ±SD	Média ±SD	(% redução)	(% redução)
PBS+CFA/IFA				
Experimento				
1º	16,94±2,8	27,7±5,23	44,72±4,96	22199,99±1939,00
2º	17,16±4,32	9,5±2,34	26,66±5,61	18135,96±1824,30
rSmKI-1+CFA/IFA				
Experimento				
1º	8,5±2,54	13,2±5,57	21,7±8,22* (51,5%)	14183,07±4127,95* (36,11%)
2º	8,0±3,03	6,58±2,70	14,58±5,43* (45,3%)	13472,54±2157,07* (25,71%)

*Estatisticamente significativo quando comparado ao grupo controle. (p<0,05)

Quanto aos ovos presentes nos fígados de camundongos, observou-se redução 25,7-36,1% no número de ovos por grama de tecido do fígado (Tabela 4). Além disso, a análise do tecido hepático demonstrou que a vacinação rSmKI-1 reduziu a patologia do fígado, conforme mostrado na Figura 24. A avaliação histopatológica revelou que a imunização com rSmKI-1 reduziu o número de granulomas hepáticos em 31% (Figura 24A), e a área de granuloma foi reduzida em 33% (Figura 24B), em comparação aos camundongos do grupo controle. A Figura 24 também mostra imagens representativas de uma secção de granuloma do fígado controle PBS (painel da esquerda) e de um camundongo vacinado com rSmKI-1 (painel da direita) representando os dados obtidos (Figura 24C).

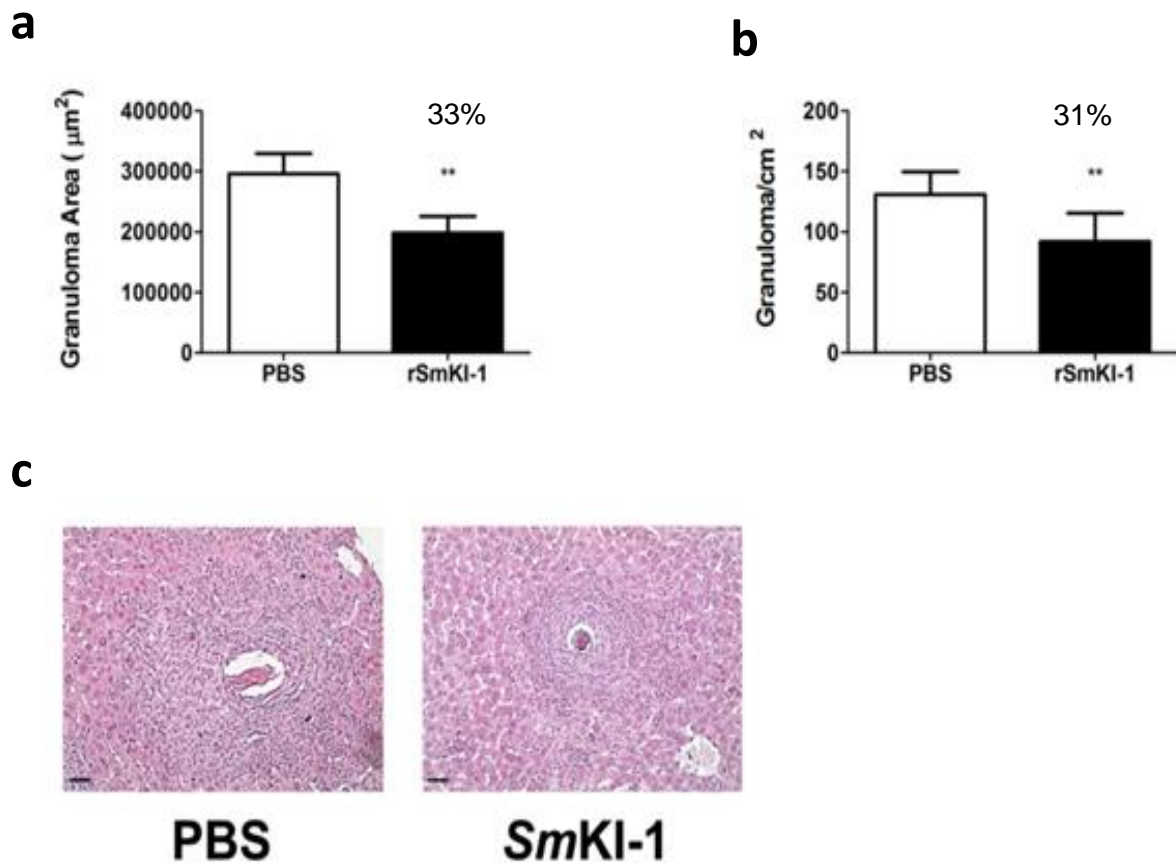


Figura 24 – A análise histopatológica do tecido hepático de camundongos vacinados com *rSmKI-1*. (a) Redução de 33 % foi observada na área do granuloma (média±SD) em secções do fígado de vacinados com *rSmKI-1* (barras pretas) em relação ao grupo controle (barras brancas). (b) Redução de 31 % no número de granulomas em camundongos vacinados é observada após a vacinação com *rSmKI-1* (barras pretas) quando comparada com o grupo controle. (c) Imagem de um granuloma detectado em uma secção do fígado corado com HE representativa do grupo controle (PBS), comparada com o granuloma de um camundongo vacinado com *rSmKI-1*. A barra representa 50 µm.

6 DISCUSSÃO

A esquistossomose é uma doença parasitária de importância mundial, responsável por manifestações clínicas agudas e crônicas, que podem levar a morte de indivíduos infectados. Apenas na África sub-Saariana, estima-se que há 280 mil mortes por ano devido às consequências graves desta patologia (van der Werf et al., 2003b). A morbidade induzida pela esquistossomose pode levar à invalidez precoce, uma vez que a esquistossomose afeta as funções cognitivas e o desenvolvimento infantil e a produtividade de adultos (Hotez et al., 2006b). Apesar de o tratamento quimioterápico ser capaz de reduzir a morbidade, o mesmo não reduz a prevalência da doença devido aos casos de reinfecção. Desta forma, a terapia combinada à vacinação, como uma forma de controlar a esquistossomose, se mostra promissora como a base para uma nova abordagem de controle.

Os maiores níveis de proteção contra a doença alcançados até o momento foram obtidos através da imunização com cercárias irradiadas, onde a resposta imune protetora ocorreu nos pulmões contra esquistossômulos migrantes (Jankovic et al., 1999b; Wilson et al., 1996). Visto que a utilização das cercárias como vacina não é viável por questões de biossegurança (Coulson, 1997; Pearce and MacDonald, 2002) e que ainda não se tenha definido nenhuma vacina contra esquistossomose com os antígenos testados até o momento, é de extrema importância a continuação da realização de estudos para compreensão da fisiologia do parasito, bem como sua relação parasito/hospedeiro, para dessa forma identificar e avaliar novos alvos moleculares para desenvolvimento de fármacos ou vacinas contra a esquistossomose. Tais proteínas, particularmente as moléculas secretadas ou expostas à superfície no tegumento e nos epitélios intestinais (Martins et al., 2012) são esses alvos, uma vez que, podem exercer papéis que definem a sobrevivência do parasito em seu hospedeiro. A proteína *SmKI-1* de *S. mansoni*, primeiro inibidor de serino protease identificado na espécie, apresentou eficiência ao inibir tripsina e elastase neutrofílica *in vitro*, como demonstrado anteriormente por (Ranasinghe et al., 2015a), confirmando a característica de um inibidor clássico de serino proteases.

Uma vez que, serino proteases estão envolvidas em diferentes aspectos fisiológicos, tais como coagulação do sangue, apoptose, transdução de sinal, cicatrização de feridas, ação de cascata de proteólise e respostas inflamatórias (Neurath, 1986), se torna interessante avaliar a função biológica da molécula *SmKI-1* do *S. mansoni* frente serino proteases do hospedeiro. Particularmente o estudo da elastase, uma serino protease produzida por neutrófilos ativados e secretada durante a inflamação (Alam et al., 2012; Nathan, 2006). A elastase neutrofílica é uma

importante molécula de defesa do hospedeiro necessária para a proteção contra bactérias e fungos patogênicos (Reeves et al., 2002). Quanto à relação da elastase com os esquistossômulos, um estudo prévio demonstrou que a elastase neutrofílica é tóxica para o estágio larval do parasito (Freudenstein-Dan et al., 2003), no entanto, os mecanismos pelos quais a elastase auxilia na destruição de um organismo multicelular, como os esquistossômulos, não são conhecidos.

S. mansoni infecta o hospedeiro humano e usa proteases para invadir os tecidos do hospedeiro, bem como para sua nutrição e desenvolvimento. Além disso, os parasitos adultos vivem nos vasos sanguíneos do hospedeiro e sobrevivem neste ambiente hostil sem desencadear uma resposta eficiente pelas células do sistema imune, como por exemplos neutrófilos, ou induzindo a ativação do complemento (Mebius et al., 2013). Sendo as serino proteases pertencentes a família de protease mais abundante representada no genoma humano, pode-se formular uma hipótese de que os parasitos que residem na corrente sanguínea, como *S. mansoni*, podem ter evoluído e se adaptado para sobreviver em seu hospedeiro humano, produzindo inibidores de proteases que vão além do controle da homeostase de seu próprio organismo, e são capazes de se dirigirem especificamente para proteases humanas.

Neste trabalho, desenhou-se um plasmídeo contendo o cDNA da *SmKI-1* com a utilização de codons otimizados que permitiu produzir eficientemente a proteína recombinante em *E. coli*. Também foram produzidas separadamente duas porções da molécula *SmKI-1*, sendo elas: o domínio Kunitz e o C-terminal. As moléculas recombinantes foram purificadas e testadas como inibidores de serino proteases e revelado qual porção é responsável pela atividade inibitória da *SmKI-1*. Além disso, *SmKI-1* foi apresentada como uma molécula moduladora da resposta inflamatória em modelos dependentes de neutrófilos.

Foi demonstrado que a proteína r*SmKI-1* atua como um inibidor de tripsina e elastase de neutrófilos *in vitro*. E que sua atividade inibitória está em seu domínio Kunitz e não à região C-terminal (Figura 14A e B). A elastase secretada por neutrófilos mantidos em cultura também foi inibida por r*SmKI-1* e seu domínio Kunitz, demonstrando que esta molécula também interfere na atividade enzimática da elastase recém secretada por neutrófilos murinos (Figura 14C). A elastase é uma enzima chave no sistema imunológico do hospedeiro de mamíferos, sendo importante na defesa contra agentes patogênicos. Belaouaj e colegas (Belaouaj et al., 2000) revelaram que a clivagem da proteína de membrana A pela elastase neutrofílica resulta na morte celular de *E.coli*. Em nosso estudo, também foi demonstrado que r*SmKI-1* reduz a morte de esquistossômulos por elastase, portanto, a capacidade de r*SmKI-1* de interagir com o sítio catalítico da elastase, como demonstrado pelas análises de *Docking* molecular, a inibição da

atividade enzimática é potencialmente um mecanismo de evasão imune desenvolvido pelo parasito.

Foi hipotetizado neste trabalho que a *SmKI-1* é uma molécula importante envolvida no desenvolvimento do parasito e do mecanismo de evasão imunológica utilizado por *S. mansoni*. Para testar esta hipótese, a expressão do gene *SmKI-1* foi suprimida utilizando RNAi em esquistossômulos e em parasitos adultos machos, fêmeas do *S. mansoni*, sendo a supressão mais eficiente observada no estágio larval. Os esquistossômulos suprimidos para o gene *SmKI-1* apresentaram menor viabilidade comparado ao controle quando mantidos em cultura (Figura 11C). Além disso, quando os parasitos *SmKI-1*-suprimidos foram inoculados em camundongos apenas 30% dos helmintos foram recuperados dos animais infectados (Figura 11F). Portanto, a supressão de do gene *SmKI-1* por siRNA demonstra um forte impacto na sobrevivência do parasito no hospedeiro mamífero. Uma explicação para este resultado pode ser a observação de que a proteína *SmKI-1* é liberada nos produtos de secreção/excreção da espécie *S. mansoni* e esta molécula provavelmente está envolvida na proteção do parasito *in vivo*. Produtos de secreção/excreção de helmintos são predominantemente constituídos por proteases, inibidores de protease, homólogos de veneno, enzimas glicolíticas e lectinas (Hewitson et al., 2009), esses produtos, que atuam na interface parasito/hospedeiro podem ser importantes na resposta imune e imunomodulação. A molécula Fh-KTM presente no extrato total do parasito *Fasciola* foi responsável pela supressão da produção de citocinas pró-inflamatórias em células dendríticas diminuindo a capacidade de induzir respostas inflamatória (Falcon et al., 2014).

A inibição de enzimas inflamatórias, como a elastase, nos hospedeiros de mamíferos é um importante mecanismo de modulação imunológica utilizado por agentes patogênicos. A atividade inibitória da proteína *rSmKI-1* frente a protease elastase demonstrada, culminou em mais uma hipótese neste trabalho: avaliar se *SmKI-1* é capaz de modular a inflamação, interferindo na atividade dos neutrófilos, especialmente a migração e ativação dessas células. O papel dos neutrófilos na fisiopatologia das doenças inflamatórias está bem estabelecido, com muitas linhas de evidência que sustentam uma correlação direta entre a presença de neutrófilos no tecido inflamado e a progressão das doenças inflamatórias (Fauschou and Borregaard, 2003; Kobayashi and DeLeo, 2009). Em nosso estudo, testamos os potenciais efeitos terapêuticos da *SmKI-1* como molécula anti-inflamatória em três modelos experimentais diferentes: lesão hepática induzida por APAP, gota induzida por MSU e pleurisia induzida por carragenina.

A lesão hepática induzida por drogas é uma das principais causas de insuficiência hepática aguda com ainda poucas opções terapêuticas. No tratamento clínico, o paracetamol (APAP) é frequentemente utilizado como antipirético e analgésico, sendo um medicamento seguro quando aplicado na faixa terapêutica (<4g/dia). No entanto, o abuso não supervisionado e à longo prazo do APAP contribui para o aumento das taxas de lesão hepática e insuficiência hepática aguda em todo o mundo (Jaeschke et al., 2010; Larson, 2007). Em camundongos, a lesão hepática é induzida por uma única dose elevada de APAP (Randle et al., 2008). Neste trabalho, foi induzido danos ao fígado para avaliar os possíveis efeitos da molécula rSmKI-1 no recrutamento de neutrófilos. Como esperado, a administração de APAP causou um impressionante acúmulo das células no fígado dos camundongos, associados à necrose e ao acúmulo de eritrócitos. Utilizou-se da microscopia confocal intravital para acompanhar a migração direcional de neutrófilos para o fígado devido à sobredosagem de APAP. O tratamento com rSmKI-1 nos animais inflamação-APAP apresentou uma redução significativa tanto na atividade da elastase quanto no recrutamento de neutrófilos (Figura 16B e C). Corroborando com esses achados, a administração de rSmKI-1 reduziu significativamente a atividade de MPO no fígado e ALT sérica (Figura 16A e F), confirmando uso da rSmKI-1 como uma possível alternativa terapêutica em doenças inflamatórias do fígado.

A artrite é uma doença inflamatória causada pela deposição de cristal MSU no espaço articular e periarticular da articulação, relacionada com hiperuricemia prolongada do metabolismo anormal do ácido nucleico (Choi et al., 2005). O cristal de MSU promove a produção de quimiocinas e citocinas e a expressão de moléculas de adesão celular, que induzem a migração de células inflamatórias, especialmente neutrófilos, para os locais de lesão tecidual (Jaramillo et al., 2004). rSmKI-1 foi utilizada para prevenir as reações inflamatórias em camundongos após a indução da gota por MSU. Esta proteína reduziu a acúmulo de neutrófilos, a hipernocicepção, bem como, fatores patológicos em geral (Figura 17). A diminuição do dano articular foi associada à diminuição da secreção local da citocina pró-inflamatória, IL-1 β , uma das citocinas responsáveis pela iniciação e perpetuação da resposta inflamatória que promove o influxo de neutrófilos nos locais de lesão tecidual (Tincani et al., 2007). Os resultados demonstram, pela primeira vez, a potente atividade anti-inflamatória da rSmKI-1 em modelo artrite de gotosa experimental. Outros estudos demonstraram que algumas infecções helmintílicas influenciam fortemente o sistema imunológico e possibilitam vias protetoras em distúrbios imunológicos, como doenças artríticas (Eissa et al., 2016; Matisz et al., 2011). A infecção pelo parasito mostrou diminuir a gravidade da artrite induzida por colágeno em camundongos através da supressão local e sistêmica de mediadores pró-inflamatórios, sugerindo seu benefício substancial do possível contato/infecção

por helmintos como um agente terapêutico contra a artrite reumatóide (Eissa et al., 2016). Felizmente, o estudo de proteínas recombinantes de parasitos demonstra que a regulação da resposta imune não é estritamente dependente da infecção parasitária, mas está associada a antígenos derivados desses patógenos (Oliveira et al., 2016b). O rSmKI-1 é um exemplo de molécula de *S. mansoni* que apresenta uma atividade anti-inflamatória potente contra as doenças artríticas.

Para finalizar a nossa avaliação da SmKI-1 como molécula anti-inflamatória, utilizou-se o modelo de pleurisia induzido por carragenina, um forte indutor inflamatório que responde através da produção de leucotrieno (LT) B₄ no local da inflamação (Mathieu et al., 1990). Utilizando a inflamação pleural induzida por carragenina, demonstramos a capacidade de rSmKI-1 inibir eventos iniciais que desencadeiam o recrutamento de neutrófilos nas cavidades pleurais de camundongos em resposta a este estímulo inflamatório (Figura 18). Embora nossos resultados indiquem os efeitos do rSmKI-1 no recrutamento e função dos neutrófilos, ainda precisamos entender completamente os mecanismos envolvidos em sua atividade anti-inflamatória. As evidências apontam para o comprometimento do recrutamento de neutrófilos devido à inibição da elastase, mas são necessários mais estudos para confirmar esta hipótese. Tais descobertas possuem um forte impacto no desenvolvimento de drogas que inibem a migração de neutrófilos e pode representar uma nova e importante estratégia terapêutica para o tratamento de doenças inflamatórias (Ferreira et al., 2013), além de nos conduzir ao estudo dessa molécula com um atraente candidato vacinal.

Uma vez determinado o papel da proteína SmKI-1 e sua importância para manutenção da sobrevivência do helminto, juntamente com os dados da expressão desse gene nas fases em desenvolvimento no hospedeiro definitivo, nos validam, portanto, avaliar este antígeno como candidato vacinal e assim compreender as respostas imunes humoral e celular induzidas mediante a imunização com rSmKI-1 em modelo murino.

A imunização com rSmKI-1 foi capaz de induzir a produção de anticorpos policlonais e estes de reconhecer a proteína nativa SmKI-1 presente no SWAP quando utilizados em *western blot* (Figura 21B). Experimentos de imunolocalização usando anti-rSmKI-1 policlonal indicaram que a proteína SmKI-1 está principalmente presente no trato intestinal em esquistossômulos, além dessa região foi anteriormente relatado está localizada em ovos e tegumento de parasitos adultos (Ranasinghe et al., 2015a). O trato intestinal é uma região composta pela gastroderme, e consiste em uma camada epitelial sincicial com muitos compartimentos vacuolares que se projetam para

o lúmen (Figueiredo et al., 2015b; Martins et al., 2014). A gastroderme de *Schistosoma* se mostra essencial para a nutrição por este helminto, além de ser uma região acessível a macromoléculas do hospedeiro, como imunoglobulinas (Holtfreter et al., 2010; Li et al., 2013), o que pode implicar no contato direto entre o epitélio digestivo e o sistema imune do hospedeiro.

Avaliou-se a interação da *SmKI-1* com o sistema imune do hospedeiro utilizando a formulação *rSmKI-1*/adjuvante de Freund e os resultados mostraram que a imunização induziu altos níveis de produção de IgG anti-*rSmKI-1* após a segunda vacinação (Figura 20). A relação entre os subtipos de IgG (IgG1/IgG2a) diminuiu após a terceira imunização (Figura 21A), o que sugere uma mudança para a resposta imune Th1. Estes resultados corroboram com alguns estudos que demonstram que a produção de anticorpos são importantes na eliminação do parasito (Melo et al., 2014). Em estudo anterior desenvolvido em nosso laboratório, a imunização com *Sm29* recombinante foi capaz de induzir uma resposta Th1 protetora polarizada em camundongos, com níveis elevados de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a anti-*Sm29* (Cardoso et al., 2008). Outro exemplo de antígeno é *Smp80*, capaz de mediar proteção humoral contra esquistossomose causada por *S. mansoni*, atuando especialmente na eliminação da fase pulmonar de esquistossômulos, fase mais suscetível a resposta imune (Ahmad et al., 2009). Além disso, é descrito na literatura que a imunização por antígenos na forma recombinante é capaz de desenvolver o mecanismo de citotoxicidade celular mediada por anticorpo (ADCC), resposta essa dependente dos anticorpos ligados à superfície do parasito (Torben et al., 2012).

Também foi analisado, em camundongos imunizados com *rSmKI-1*, o perfil de citocinas produzido pelas células do baço quando estimulados com *rSmKI-1* em cultura. E observou-se um aumento significativo da produção de níveis como IFN- γ e TNF- α no sobrenadante (Figura 22A e B), demonstrando que esta formulação induziu citocinas características da resposta imune Th1. As citocinas Th2, IL-4 e IL-5 foram detectadas em níveis muito baixos, sem diferença para o grupo controle. Apesar dos altos níveis de citocinas inflamatórias, também foram produzidas quantidades significativas de IL-10 (Figura 22C). Os animais que receberam imunização com *rSmKI-1* produziram perfil de citocina Th1, mas após o desafio com cercárias além da produção de citocinas inflamatórias também revelaram produção significativa de IL-5 e níveis ainda maiores de IL-10.

Em estudos anteriores realizados por nosso grupo, a maioria dos antígenos de *S. mansoni* testados como proteínas recombinantes e vacinas de DNA que conferiram proteção parcial contra os desafios de cercárias induziram uma resposta imune do tipo Th1 (Cardoso et al., 2008;

Fonseca et al., 2004; Goncalves de Assis et al., 2015) ou uma resposta mista Th1/Th2 (Martins et al., 2014; Martins et al., 2012; Pacifico et al., 2006). O IFN- γ é uma citocina pró-inflamatória que aumenta a resposta imune à infecção promovendo a ativação de leucócitos e seu papel na imunidade protetora contra a esquistossomose (Araujo et al., 2012; Fonseca et al., 2004; Hoffmann et al., 2000). Já foi demonstrado que o IFN- γ está envolvido na imunidade protetora contra a esquistossomose, uma vez que a proteção induzida pela vacinação com o antígeno rSm14 foi dependente da produção de IFN- γ (Fonseca et al., 2004), assim como a proteção conferida pela vacinação com cercárias irradiadas foi completamente abolida quando foram utilizados anticorpos anti-IFN- γ específicos (Smythies et al., 1992). Tanto o IFN- γ quanto o TNF- α aumentam os níveis de óxido nítrico produzidos por macrófagos recrutados, o que também está relacionado a uma resposta imune protetora contra *S. mansoni* (Pearce and MacDonald, 2002).

Alguns vacinologistas preconizam que para uma vacina contra a esquistossomose, um antígeno deve ser capaz de induzir pelo menos 50% de proteção contra a infecção (McManus and Loukas, 2008). Mesmo uma vacina parcialmente eficaz contra a esquistossomose poderia acelerar significativamente a eliminação da doença. Através da imunização de camundongos com rSmKI-1, foi investigado se esta molécula poderia induzir proteção em um modelo murino pela infecção por *S. mansoni*. A proteção parcial conferida pela vacinação com rSmKI-1 resultou em redução de 45,3% -51,5% na carga parasitária (Tabela 4), e a patologia geral foi reduzida, como mostrado pela redução de 25,71-36,11% no número de ovos por grama de tecido hepático (Tabela 4), 31% redução no número de granulomas, redução de 33% na área dos granulomas (Figura 24). Estes resultados da patologia do fígado podem estar relacionados aos níveis elevados de IL-10 detectados no sobrenadante de esplenócitos de camundongos imunizados estimulados e cultivados com rSmKI-1. A IL-10 é uma importante citocina reguladora que foi descrita como citocina que regulou a resposta imune desencadeada pela infecção por *S. mansoni* (Araujo et al., 2012; Sadler et al., 2003; Teixeira-Carvalho et al., 2008). Esta citocina pode regular as respostas Th2 e/ou prevenir o desenvolvimento de uma resposta Th1 polarizada e, conseqüentemente, reduzir a inflamação e a patologia hepática (Sadler et al., 2003).

Os resultados obtidos neste trabalho apoiam a utilização da proteína rSmKI-1 como um candidato vacinal promissor no controle da esquistossomose. Além disso, nosso grupo de pesquisa procura investigar qual porção da molécula seria responsável por induzir a proteção encontrada neste trabalho, uma vez que foi caracterizado que a porção N-terminal (domínio Kunitz) é a região inibitória da proteína, e esta apresenta homologia com o domínio Kunitz de

diversos eucariotos incluindo o homem. É observado que a conservação dentro da família de inibidores de serino proteases do tipo kunitz se encontra apenas dentro da sequência aminoácídica pertencente ao domínio kunitz, e mesmo assim neste trabalho observamos a proteção gerada pela r*SmKI-1*. Já a região C-terminal não possui homologia com a sequência de outros inibidores, apenas dentro da espécie. Dessa forma, seria importante caracterizar individualmente as duas regiões da molécula *SmKI-1* e verificar se individualmente essas regiões podem induzir resposta imune protetora, para assim otimizar a produção da vacina anti-esquistossomose.

7 CONCLUSÕES

Em resumo, os dados apresentados aqui demonstraram que *SmKI-1* é uma proteína importante na sobrevivência e manutenção do *S. mansoni* no seu hospedeiro mamífero. Esta proteína possui a capacidade de inibir a atividade de elastase neutrofílica e também a migração e ativação de neutrófilos em diferentes modelos inflamatórios, levando ao interesse em seu potencial como uma molécula terapêutica promissora contra doenças inflamatórias. Além disso, demonstramos que a função *SmKI-1* está relacionada ao seu domínio Kunitz presente na estrutura protéica. Nossas descobertas apoiam fortemente e encorajam outros estudos utilizando a *rSmKI-1*. Em relação às imunizações com a formulação contendo à *rSmKI-1* associado ao adjuvante de Freund, essas promoveram níveis eficazes de proteção contra a infecção. Esses resultados suportam a utilização da proteína *rSmKI-1* como um candidato vacinal promissor no controle da esquistossomose e uma molécula alvo com potencial terapêutico contra doenças inflamatórias.

8 REFERÊNCIAS

- Abath, F.G., Morais, C.N., Montenegro, C.E., Wynn, T.A., and Montenegro, S.M. (2006). Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? *Trends in parasitology* 22, 85-91.
- Agarwala, K.L., Kawabata, S., Miura, Y., Kuroki, Y., and Iwanaga, S. (1996). Limulus intracellular coagulation inhibitor type 3. Purification, characterization, cDNA cloning, and tissue localization. *The Journal of biological chemistry* 271, 23768-23774.
- Ahmad, G., Torben, W., Zhang, W., Wyatt, M., and Siddiqui, A.A. (2009). Sm-p80-based DNA vaccine formulation induces potent protective immunity against *Schistosoma mansoni*. *Parasite immunology* 31, 156-161.
- Al-Sherbiny, M., Osman, A., Barakat, R., El Morshedy, H., Bergquist, R., and Olds, R. (2003). In vitro cellular and humoral responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens. *Acta tropica* 88, 117-130.
- Alam, S.R., Newby, D.E., and Henriksen, P.A. (2012). Role of the endogenous elastase inhibitor, elafin, in cardiovascular injury: from epithelium to endothelium. *Biochemical pharmacology* 83, 695-704.
- Alan Wilson, R., van Dam, G.J., Kariuki, T.M., Farah, I.O., Deelder, A.M., and Coulson, P.S. (2006). The detection limits for estimates of infection intensity in schistosomiasis mansoni established by a study in non-human primates. *International journal for parasitology* 36, 1241-1244.
- Allen, J.E., and Maizels, R.M. (2011). Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nature reviews Immunology* 11, 375-388.
- Amaral, F.A., Costa, V.V., Tavares, L.D., Sachs, D., Coelho, F.M., Fagundes, C.T., Soriani, F.M., Silveira, T.N., Cunha, L.D., Zamboni, D.S., *et al.* (2012). NLRP3 inflammasome-mediated neutrophil recruitment and hypernociception depend on leukotriene B(4) in a murine model of gout. *Arthritis and rheumatism* 64, 474-484.
- Amaral, R.S., Taul, P.L., Lima, D.D., and Engels, D. (2006). An analysis of the impact of the Schistosomiasis Control Programme in Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 101 Suppl 1, 79-85.
- Andreotti, R., Cunha, R.C., Soares, M.A., Guerrero, F.D., Leite, F.P., and de Leon, A.A. (2012). Protective immunity against tick infestation in cattle vaccinated with recombinant trypsin inhibitor of *Rhipicephalus microplus*. *Vaccine* 30, 6678-6685.
- Araujo, J.M., de Melo, T.T., de Sena, I.C., Alves, C.C., Araujo, N., Duraes Fdo, V., Oliveira, S.C., and Fonseca, C.T. (2012). *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument (Smtteg) immunization in absence of adjuvant induce IL-10 production by CD4+ cells and failed to protect mice against challenge infection. *Acta tropica* 124, 140-146.
- Auriault, C., Wolowczuk, I., Gras-Masse, H., Marguerite, M., Boulanger, D., Capron, A., and Tartar, A. (1991). Epitopic characterization and vaccinal potential of peptides derived from a major antigen of *Schistosoma mansoni* (Sm28 GST). *Peptide research* 4, 6-11.

- Barbosa, C.S., Favre, T.C., Wanderley, T.N., Callou, A.C., and Pieri, O.S. (2006). Assessment of schistosomiasis, through school surveys, in the Forest Zone of Pernambuco, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 101 Suppl 1*, 55-62.
- Basch, P.F. (1981). Cultivation of *Schistosoma mansoni* in vitro. I. Establishment of cultures from cercariae and development until pairing. *The Journal of parasitology 67*, 179-185.
- Belaouaj, A., Kim, K.S., and Shapiro, S.D. (2000). Degradation of outer membrane protein A in *Escherichia coli* killing by neutrophil elastase. *Science 289*, 1185-1188.
- Bergquist, N.R. (1995). Schistosomiasis vaccine development: approaches and prospects. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 90*, 221-227.
- Bergquist, N.R. (1998). Schistosomiasis vaccine development: progress and prospects. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 93 Suppl 1*, 95-101.
- Bergquist, N.R. (2002). Schistosomiasis: from risk assessment to control. *Trends in parasitology 18*, 309-314.
- Bergquist, N.R., and Colley, D.G. (1998). Schistosomiasis vaccine: research to development. *Parasitology today 14*, 99-104.
- Berriman, M., Haas, B.J., LoVerde, P.T., Wilson, R.A., Dillon, G.P., Cerqueira, G.C., Mashiyama, S.T., Al-Lazikani, B., Andrade, L.F., Ashton, P.D., *et al.* (2009). The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature 460*, 352-358.
- Blanton, R.E., Licate, L.S., and Aman, R.A. (1994). Characterization of a native and recombinant *Schistosoma haematobium* serine protease inhibitor gene product. *Molecular and biochemical parasitology 63*, 1-11.
- Bogitsh, B.J., and Carter, O.S. (1977). *Schistosoma mansoni*: ultrastructural studies on the esophageal secretory granules. *The Journal of parasitology 63*, 681-686.
- Boros, D.L. (1989). Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection. *Clinical microbiology reviews 2*, 250-269.
- Boros, D.L., and Lukacs, N.W. (1992). The role of egg antigens, cytokines in granuloma formation in murine schistosomiasis mansoni. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 87 Suppl 4*, 75-79.
- Boros, D.L., and Whitfield, J.R. (1999). Enhanced Th1 and dampened Th2 responses synergize to inhibit acute granulomatous and fibrotic responses in murine schistosomiasis mansoni. *Infection and immunity 67*, 1187-1193.
- Bottieau, E., Clerinx, J., de Vega, M.R., Van den Enden, E., Colebunders, R., Van Esbroeck, M., Vervoort, T., Van Gompel, A., and Van den Ende, J. (2006). Imported Katayama fever: clinical and biological features at presentation and during treatment. *The Journal of infection 52*, 339-345.
- Braschi, S., Curwen, R.S., Ashton, P.D., Verjovski-Almeida, S., and Wilson, A. (2006). The tegument surface membranes of the human blood parasite *Schistosoma mansoni*: a proteomic analysis after differential extraction. *Proteomics 6*, 1471-1482.
- BRASIL (2012). PLANO INTEGRADO DE AÇÕES ESTRATÉGICAS DE ELIMINAÇÃO DA HANSENÍASE, FILARIOSE, ESQUISTOSSOMOSE E ONCOCERCOSE COMO PROBLEMA
- DE SAÚDE PÚBLICA, TRACOMA COMO CAUSA DE CEGUEIRA E CONTROLE DAS GEOHELMINTÍASES, M.d.S.S.d.V.e. Saúde, ed. (Minitério da Saúde), pp. 104.

- Brunet, L.R., Finkelman, F.D., Cheever, A.W., Kopf, M.A., and Pearce, E.J. (1997). IL-4 protects against TNF-alpha-mediated cachexia and death during acute schistosomiasis. *Journal of immunology* 159, 777-785.
- Bruun, B., and Aagaard-Hansen, J. (2008). The social context of schistosomiasis and its control: an introduction and annotated bibliography. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data 227.
- Burke, M.L., Jones, M.K., Gobert, G.N., Li, Y.S., Ellis, M.K., and McManus, D.P. (2009). Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite immunology* 31, 163-176.
- Byrum, R.S., Goulet, J.L., Snouwaert, J.N., Griffiths, R.J., and Koller, B.H. (1999). Determination of the contribution of cysteinyl leukotrienes and leukotriene B4 in acute inflammatory responses using 5-lipoxygenase- and leukotriene A4 hydrolase-deficient mice. *Journal of immunology* 163, 6810-6819.
- Cai, P., Bu, L., Wang, J., Wang, Z., Zhong, X., and Wang, H. (2008). Molecular characterization of *Schistosoma japonicum* tegument protein tetraspanin-2: sequence variation and possible implications for immune evasion. *Biochemical and biophysical research communications* 372, 197-202.
- Capron, A., Dombrowicz, D., and Capron, M. (1999). Regulation of the immune response in experimental and human schistosomiasis: the limits of an attractive paradigm. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 1, 485-490.
- Cardoso, F.C., Macedo, G.C., Gava, E., Kitten, G.T., Mati, V.L., de Melo, A.L., Caliari, M.V., Almeida, G.T., Venancio, T.M., Verjovski-Almeida, S., *et al.* (2008). *Schistosoma mansoni* tegument protein Sm29 is able to induce a Th1-type of immune response and protection against parasite infection. *PLoS neglected tropical diseases* 2, e308.
- Carvalho, O.S. (2008). *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar (Rio de Janeiro).
- Cass, C.L., Johnson, J.R., Califf, L.L., Xu, T., Hernandez, H.J., Stadecker, M.J., Yates, J.R., 3rd, and Williams, D.L. (2007). Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* egg secretions. *Molecular and biochemical parasitology* 155, 84-93.
- Caulada-Benedetti, Z., al-Zamel, F., Sher, A., and James, S. (1991). Comparison of Th1- and Th2-associated immune reactivities stimulated by single versus multiple vaccination of mice with irradiated *Schistosoma mansoni* cercariae. *Journal of immunology* 146, 1655-1660.
- Cheever, A.W., and Duvall, R.H. (1974). Single and repeated infections of grivet monkeys with *Schistosoma mansoni*: parasitological and pathological observations over a 31-month period. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 23, 884-894.
- Cheever, A.W., Finkelman, F.D., Caspar, P., Heiny, S., Macedonia, J.G., and Sher, A. (1992). Treatment with anti-IL-2 antibodies reduces hepatic pathology and eosinophilia in *Schistosoma mansoni*-infected mice while selectively inhibiting T cell IL-5 production. *Journal of immunology* 148, 3244-3248.
- Chensue, S.W., Terebuh, P.D., Warmington, K.S., Hershey, S.D., Evanoff, H.L., Kunkel, S.L., and Higashi, G.I. (1992). Role of IL-4 and IFN-gamma in *Schistosoma mansoni* egg-induced hypersensitivity granuloma formation. Orchestration, relative contribution, and relationship to macrophage function. *Journal of immunology* 148, 900-906.

- Chiaramonte, M.G., Donaldson, D.D., Cheever, A.W., and Wynn, T.A. (1999). An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response. *The Journal of clinical investigation* 104, 777-785.
- Chitsulo, L., Engels, D., Montresor, A., and Savioli, L. (2000). The global status of schistosomiasis and its control. *Acta tropica* 77, 41-51.
- Chitsulo, L., Loverde, P., and Engels, D. (2004). Schistosomiasis. *Nature reviews Microbiology* 2, 12-13.
- Choi, H.K., Mount, D.B., and Reginato, A.M. (2005). Pathogenesis of gout. *Annals of internal medicine* 143, 499-516.
- Choo, Y.M., Lee, K.S., Yoon, H.J., Qiu, Y., Wan, H., Sohn, M.R., Sohn, H.D., and Jin, B.R. (2012). Antifibrinolytic role of a bee venom serine protease inhibitor that acts as a plasmin inhibitor. *PloS one* 7, e32269.
- Cioli, D. (2000). Praziquantel: is there real resistance and are there alternatives? *Current opinion in infectious diseases* 13, 659-663.
- Cioli, D., Pica-Mattocchia, L., and Archer, S. (1993). Drug resistance in schistosomes. *Parasitology today* 9, 162-166.
- Coelho, F.M., Pinho, V., Amaral, F.A., Sachs, D., Costa, V.V., Rodrigues, D.H., Vieira, A.T., Silva, T.A., Souza, D.G., Bertini, R., *et al.* (2008). The chemokine receptors CXCR1/CXCR2 modulate antigen-induced arthritis by regulating adhesion of neutrophils to the synovial microvasculature. *Arthritis and rheumatism* 58, 2329-2337.
- Collins, J.J., 3rd, King, R.S., Cogswell, A., Williams, D.L., and Newmark, P.A. (2011). An atlas for *Schistosoma mansoni* organs and life-cycle stages using cell type-specific markers and confocal microscopy. *PLoS neglected tropical diseases* 5, e1009.
- Correa-Oliveira, R., Pearce, E.J., Oliveira, G.C., Golgher, D.B., Katz, N., Bahia, L.G., Carvalho, O.S., Gazzinelli, G., and Sher, A. (1989). The human immune response to defined immunogens of *Schistosoma mansoni*: elevated antibody levels to paramyosin in stool-negative individuals from two endemic areas in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 83, 798-804.
- Coulson, P.S. (1997). The radiation-attenuated vaccine against schistosomes in animal models: paradigm for a human vaccine? *Advances in parasitology* 39, 271-336.
- Coura, J.R., and Amaral, R.S. (2004). Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 99, 13-19.
- Cunha, T.M., Barsante, M.M., Guerrero, A.T., Verri, W.A., Jr., Ferreira, S.H., Coelho, F.M., Bertini, R., Di Giacinto, C., Allegretti, M., Cunha, F.Q., *et al.* (2008). Treatment with DF 2162, a non-competitive allosteric inhibitor of CXCR1/2, diminishes neutrophil influx and inflammatory hypernociception in mice. *British journal of pharmacology* 154, 460-470.
- Cunha, T.M., Verri, W.A., Jr., Vivancos, G.G., Moreira, I.F., Reis, S., Parada, C.A., Cunha, F.Q., and Ferreira, S.H. (2004). An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]* 37, 401-407.

- Curwen, R.S., Ashton, P.D., Sundaralingam, S., and Wilson, R.A. (2006). Identification of novel proteases and immunomodulators in the secretions of schistosome cercariae that facilitate host entry. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 5, 835-844.
- Cwiklinski, K., de la Torre-Escudero, E., Trelis, M., Bernal, D., Dufresne, P.J., Brennan, G.P., O'Neill, S., Tort, J., Paterson, S., Marcilla, A., *et al.* (2015). The Extracellular Vesicles of the Helminth Pathogen, *Fasciola hepatica*: Biogenesis Pathways and Cargo Molecules Involved in Parasite Pathogenesis. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 14, 3258-3273.
- Czaja, M.J., Weiner, F.R., Takahashi, S., Giambone, M.A., van der Meide, P.H., Schellekens, H., Biempica, L., and Zern, M.A. (1989). Gamma-interferon treatment inhibits collagen deposition in murine schistosomiasis. *Hepatology* 10, 795-800.
- Da'Dara, A.A., Skelly, P.J., Walker, C.M., and Harn, D.A. (2003). A DNA-prime/protein-boost vaccination regimen enhances Th2 immune responses but not protection following *Schistosoma mansoni* infection. *Parasite immunology* 25, 429-437.
- de Jesus, A.R., Silva, A., Santana, L.B., Magalhaes, A., de Jesus, A.A., de Almeida, R.P., Rego, M.A., Burattini, M.N., Pearce, E.J., and Carvalho, E.M. (2002). Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. *The Journal of infectious diseases* 185, 98-105.
- de la Torre-Escudero, E., Bennett, A.P., Clarke, A., Brennan, G.P., and Robinson, M.W. (2016). Extracellular Vesicle Biogenesis in Helminths: More than One Route to the Surface? *Trends in parasitology* 32, 921-929.
- DeMarco, R., Mathieson, W., Manuel, S.J., Dillon, G.P., Curwen, R.S., Ashton, P.D., Ivens, A.C., Berriman, M., Verjovski-Almeida, S., and Wilson, R.A. (2010). Protein variation in blood-dwelling schistosome worms generated by differential splicing of micro-exon gene transcripts. *Genome research* 20, 1112-1121.
- DeMarco, R., and Verjovski-Almeida, S. (2009). Schistosomes--proteomics studies for potential novel vaccines and drug targets. *Drug discovery today* 14, 472-478.
- Doenhoff, M.J., Kusel, J.R., Coles, G.C., and Cioli, D. (2002). Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 96, 465-469.
- Eissa, M.M., Mostafa, D.K., Ghazy, A.A., El Azzouni, M.Z., Boulos, L.M., and Younis, L.K. (2016). Anti-Arthritic Activity of *Schistosoma mansoni* and *Trichinella spiralis* Derived-Antigens in Adjuvant Arthritis in Rats: Role of FOXP3+ Treg Cells. *PloS one* 11, e0165916.
- Engels, D., Chitsulo, L., Montresor, A., and Savioli, L. (2002). The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. *Acta tropica* 82, 139-146.
- Falcon, C.R., Masih, D., Gatti, G., Sanchez, M.C., Motran, C.C., and Cervi, L. (2014). *Fasciola hepatica* Kunitz type molecule decreases dendritic cell activation and their ability to induce inflammatory responses. *PloS one* 9, e114505.
- Fallon, P.G., Richardson, E.J., Smith, P., and Dunne, D.W. (2000). Elevated type 1, diminished type 2 cytokines and impaired antibody response are associated with hepatotoxicity and mortalities during *Schistosoma mansoni* infection of CD4-depleted mice. *European journal of immunology* 30, 470-480.

- Faurschou, M., and Borregaard, N. (2003). Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 5, 1317-1327.
- Ferreira, R.G., Matsui, T.C., Gomides, L.F., Godin, A.M., Menezes, G.B., de Matos Coelho, M., and Klein, A. (2013). Niacin inhibits carrageenan-induced neutrophil migration in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 386, 533-540.
- Fertin, C., Nicolas, J.F., Gillery, P., Kalis, B., Banchereau, J., and Maquart, F.X. (1991). Interleukin-4 stimulates collagen synthesis by normal and scleroderma fibroblasts in dermal equivalents. *Cellular and molecular biology* 37, 823-829.
- Figueiredo, B.C., Assis, N.R., Morais, S.B., Ricci, N.D., Pinheiro, C.S., Martins, V.P., Bicalho, R.M., Da'dara, A.A., Skelly, P.J., and Oliveira, S.C. (2014). Schistosome syntenin partially protects vaccinated mice against *Schistosoma mansoni* infection. *PLoS neglected tropical diseases* 8, e3107.
- Figueiredo, B.C., Da'dara, A.A., Oliveira, S.C., and Skelly, P.J. (2015a). Schistosomes Enhance Plasminogen Activation: The Role of Tegumental Enolase. *PLoS pathogens* 11, e1005335.
- Figueiredo, B.C., Ricci, N.D., de Assis, N.R., de Morais, S.B., Fonseca, C.T., and Oliveira, S.C. (2015b). Kicking in the Guts: *Schistosoma mansoni* Digestive Tract Proteins are Potential Candidates for Vaccine Development. *Frontiers in immunology* 6, 22.
- Finkelman, F.D., Shea-Donohue, T., Morris, S.C., Gildea, L., Strait, R., Madden, K.B., Schopf, L., and Urban, J.F., Jr. (2004). Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. *Immunological reviews* 201, 139-155.
- Fishelson, Z. (1995). Novel mechanisms of immune evasion by *Schistosoma mansoni*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 90, 289-292.
- Fonseca, C.T., Brito, C.F., Alves, J.B., and Oliveira, S.C. (2004). IL-12 enhances protective immunity in mice engendered by immunization with recombinant 14 kDa *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein through an IFN-gamma and TNF-alpha dependent pathway. *Vaccine* 22, 503-510.
- Freudenstein-Dan, A., Gold, D., and Fishelson, Z. (2003). Killing of schistosomes by elastase and hydrogen peroxide: implications for leukocyte-mediated schistosome killing. *The Journal of parasitology* 89, 1129-1135.
- Fuks, M.A., Santa Rosa, G.L., Savino, W., and Goulart, E.G. (1982). The responses to *Schistosoma mansoni* of infected mice and non-infected mice following parabiosis. I-- Histological aspects. *Anais de microbiologia* 27, 129-138.
- Garcia-Fernandez, R., Perbandt, M., Rehders, D., Ziegelmueller, P., Piganeau, N., Hahn, U., Betzel, C., Chavez Mde, L., and Redecke, L. (2015). Three-dimensional Structure of a Kunitz-type Inhibitor in Complex with an Elastase-like Enzyme. *The Journal of biological chemistry* 290, 14154-14165.
- Ghendler, Y., Arnon, R., and Fishelson, Z. (1994). *Schistosoma mansoni*: isolation and characterization of Smp156, a novel serine protease inhibitor. *Experimental parasitology* 78, 121-131.
- Giri, S.N., Hyde, D.M., and Marafino, B.J., Jr. (1986). Ameliorating effect of murine interferon gamma on bleomycin-induced lung collagen fibrosis in mice. *Biochemical medicine and metabolic biology* 36, 194-197.

- Gold, D. (1997). Assessment of the viability of *Schistosoma mansoni* schistosomula by comparative uptake of various vital dyes. *Parasitology research* 83, 163-169.
- Goncalves de Assis, N.R., Batistoni de Morais, S., Figueiredo, B.C., Ricci, N.D., de Almeida, L.A., da Silva Pinheiro, C., Martins Vde, P., and Oliveira, S.C. (2015). DNA Vaccine Encoding the Chimeric Form of *Schistosoma mansoni* Sm-TSP2 and Sm29 Confers Partial Protection against Challenge Infection. *PloS one* 10, e0125075.
- Gryseels, B., Polman, K., Clerinx, J., and Kestens, L. (2006). Human schistosomiasis. *Lancet* 368, 1106-1118.
- Guerrero, A.T., Verri, W.A., Jr., Cunha, T.M., Silva, T.A., Rocha, F.A., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., and Parada, C.A. (2006). Hypernociception elicited by tibio-tarsal joint flexion in mice: a novel experimental arthritis model for pharmacological screening. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 84, 244-251.
- Hagan, P., and Sharaf, O. (2003). Schistosomiasis vaccines. *Expert opinion on biological therapy* 3, 1271-1278.
- Hall, S.L., Braschi, S., Truscott, M., Mathieson, W., Cesari, I.M., and Wilson, R.A. (2011). Insights into blood feeding by schistosomes from a proteomic analysis of worm vomitus. *Molecular and biochemical parasitology* 179, 18-29.
- Han, Z.G., Brindley, P.J., Wang, S.Y., and Chen, Z. (2009). *Schistosoma* genomics: new perspectives on schistosome biology and host-parasite interaction. *Annual review of genomics and human genetics* 10, 211-240.
- Hanna, S., Gharib, B., Lepidi, H., Montet, J.C., Dumon, H., and de Reggi, M. (2005). Experimental schistosomiasis, protective aspects of granulomatous reaction in the mouse liver. *Parasitology research* 96, 6-11.
- Harder, A. (2002). Chemotherapeutic approaches to trematodes (except schistosomes) and cestodes: current level of knowledge and outlook. *Parasitology research* 88, 587-590.
- Harris, A.R., Russell, R.J., and Charters, A.D. (1984). A review of schistosomiasis in immigrants in Western Australia, demonstrating the unusual longevity of *Schistosoma mansoni*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 78, 385-388.
- Hewitson, J.P., Grainger, J.R., and Maizels, R.M. (2009). Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Molecular and biochemical parasitology* 167, 1-11.
- Hoffmann, K.F., Caspar, P., Cheever, A.W., and Wynn, T.A. (1998). IFN-gamma, IL-12, and TNF-alpha are required to maintain reduced liver pathology in mice vaccinated with *Schistosoma mansoni* eggs and IL-12. *Journal of immunology* 161, 4201-4210.
- Hoffmann, K.F., Cheever, A.W., and Wynn, T.A. (2000). IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. *Journal of immunology* 164, 6406-6416.
- Hogg, K.G., Kumkate, S., Anderson, S., and Mountford, A.P. (2003a). Interleukin-12 p40 secretion by cutaneous CD11c+ and F4/80+ cells is a major feature of the innate immune response in mice that develop Th1-mediated protective immunity to *Schistosoma mansoni*. *Infection and immunity* 71, 3563-3571.

- Hogg, K.G., Kumkate, S., and Mountford, A.P. (2003b). IL-10 regulates early IL-12-mediated immune responses induced by the radiation-attenuated schistosome vaccine. *International immunology* *15*, 1451-1459.
- Holtfreter, M.C., Loebermann, M., Frei, E., Riebold, D., Wolff, D., Hartung, G., Kinzelbach, R., and Reisinger, E.C. (2010). Schistosomula, pre-adults and adults of *Schistosoma mansoni* ingest fluorescence-labelled albumin in vitro and in vivo: implication for a drug-targeting model. *Parasitology* *137*, 1645-1652.
- Hoover, D.L., and Nacy, C.A. (1984). Macrophage activation to kill *Leishmania tropica*: defective intracellular killing of amastigotes by macrophages elicited with sterile inflammatory agents. *Journal of immunology* *132*, 1487-1493.
- Hota-Mitchell, S., Siddiqui, A.A., Dekaban, G.A., Smith, J., Tognon, C., and Podesta, R.B. (1997). Protection against *Schistosoma mansoni* infection with a recombinant baculovirus-expressed subunit of calpain. *Vaccine* *15*, 1631-1640.
- Hotez, P.J., Bethony, J.M., Oliveira, S.C., Brindley, P.J., and Loukas, A. (2008). Multivalent anthelmintic vaccine to prevent hookworm and schistosomiasis. *Expert review of vaccines* *7*, 745-752.
- Hotez, P.J., Bundy, D.A.P., Beegle, K., Brooker, S., Drake, L., de Silva, N., Montresor, A., Engels, D., Jukes, M., Chitsulo, L., *et al.* (2006a). Helminth Infections: Soil-transmitted Helminth Infections and Schistosomiasis. In *Disease Control Priorities in Developing Countries*, D.T. Jamison, J.G. Breman, A.R. Measham, G. Alleyne, M. Claeson, D.B. Evans, P. Jha, A. Mills, and P. Musgrove, eds. (Washington (DC)).
- Hotez, P.J., Molyneux, D.H., Fenwick, A., Ottesen, E., Ehrlich Sachs, S., and Sachs, J.D. (2006b). Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria. *PLoS medicine* *3*, e102.
- Huang, W., Haas, T.A., Biesterfeldt, J., Mankawsky, L., Blanton, R.E., and Lee, X. (1999). Purification and crystallization of a novel membrane-anchored protein: the *Schistosoma haematobium* serpin. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* *55*, 350-352.
- Ismail, M., Botros, S., Metwally, A., William, S., Farghally, A., Tao, L.F., Day, T.A., and Bennett, J.L. (1999). Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from Egyptian villagers. *The American journal of tropical medicine and hygiene* *60*, 932-935.
- Jaeschke, H., Williams, C.D., McGill, M.R., and Farhood, A. (2010). Herbal extracts as hepatoprotectants against acetaminophen hepatotoxicity. *World journal of gastroenterology : WJG* *16*, 2448-2450.
- Jankovic, D., Kullberg, M.C., Noben-Trauth, N., Caspar, P., Ward, J.M., Cheever, A.W., Paul, W.E., and Sher, A. (1999a). Schistosome-infected IL-4 receptor knockout (KO) mice, in contrast to IL-4 KO mice, fail to develop granulomatous pathology while maintaining the same lymphokine expression profile. *Journal of immunology* *163*, 337-342.
- Jankovic, D., Wynn, T.A., Kullberg, M.C., Hieny, S., Caspar, P., James, S., Cheever, A.W., and Sher, A. (1999b). Optimal vaccination against *Schistosoma mansoni* requires the induction of both B cell- and IFN-gamma-dependent effector mechanisms. *Journal of immunology* *162*, 345-351.

- Jaramillo, M., Godbout, M., Naccache, P.H., and Olivier, M. (2004). Signaling events involved in macrophage chemokine expression in response to monosodium urate crystals. *The Journal of biological chemistry* 279, 52797-52805.
- Jassim, A., Hassan, K., and Catty, D. (1987). Antibody isotypes in human schistosomiasis mansoni. *Parasite immunology* 9, 627-650.
- Johansson, S., Goransson, U., Luijendijk, T., Backlund, A., Claeson, P., and Bohlin, L. (2002). A neutrophil multitarget functional bioassay to detect anti-inflammatory natural products. *Journal of natural products* 65, 32-41.
- Jones, M.K., Gobert, G.N., Zhang, L., Sunderland, P., and McManus, D.P. (2004). The cytoskeleton and motor proteins of human schistosomes and their roles in surface maintenance and host-parasite interactions. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 26, 752-765.
- Katz, A.A., K. (2003). *Esquistossomose, xistosa, barriga d'água.*, C.e. Cultura, ed. (São Paulo), pp. 55.
- Katz, N. (1999). [Problems in the development of a vaccine against schistosomiasis mansoni]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 32, 705-711.
- Khalife, J., Capron, M., Capron, A., Grzych, J.M., Butterworth, A.E., Dunne, D.W., and Ouma, J.H. (1986). Immunity in human schistosomiasis mansoni. Regulation of protective immune mechanisms by IgM blocking antibodies. *The Journal of experimental medicine* 164, 1626-1640.
- Knopf, P.M., and Linden, T. (1985). Completion of *Schistosoma mansoni* life cycle in thyroidectomized rats and effects of thyroid hormone replacement therapy. *The Journal of parasitology* 71, 422-426.
- Knudsen, G.M., Medzihradzky, K.F., Lim, K.C., Hansell, E., and McKerrow, J.H. (2005). Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* cercarial secretions. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 4, 1862-1875.
- Kobayashi, S.D., and DeLeo, F.R. (2009). Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. *Wiley interdisciplinary reviews Systems biology and medicine* 1, 309-333.
- Kourilova, P., Hogg, K.G., Kolarova, L., and Mountford, A.P. (2004). Cercarial dermatitis caused by bird schistosomes comprises both immediate and late phase cutaneous hypersensitivity reactions. *Journal of immunology* 172, 3766-3774.
- Koyasu, S., Moro, K., Tanabe, M., and Takeuchi, T. (2010). Natural helper cells: a new player in the innate immune response against helminth infection. *Advances in immunology* 108, 21-44.
- Kozakov, D., Hall, D.R., Xia, B., Porter, K.A., Padhorny, D., Yueh, C., Beglov, D., and Vajda, S. (2017). The ClusPro web server for protein-protein docking. *Nature protocols* 12, 255-278.
- Krautz-Peterson, G., Simoes, M., Faghiri, Z., Ndegwa, D., Oliveira, G., Shoemaker, C.B., and Skelly, P.J. (2010). Suppressing glucose transporter gene expression in schistosomes impairs parasite feeding and decreases survival in the mammalian host. *PLoS pathogens* 6, e1000932.
- Krissinel, E., and Henrick, K. (2007). Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *Journal of molecular biology* 372, 774-797.

- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lambertucci, J.R., Serufo, J.C., Gerspacher-Lara, R., Rayes, A.A., Teixeira, R., Nobre, V., and Antunes, C.M. (2000). *Schistosoma mansoni*: assessment of morbidity before and after control. *Acta tropica* 77, 101-109.
- Larson, A.M. (2007). Acetaminophen hepatotoxicity. *Clinics in liver disease* 11, 525-548, vi.
- Laskowski, M., Jr., and Kato, I. (1980). Protein inhibitors of proteinases. *Annual review of biochemistry* 49, 593-626.
- Li, X.H., de Castro-Borges, W., Parker-Manuel, S., Vance, G.M., Demarco, R., Neves, L.X., Evans, G.J., and Wilson, R.A. (2013). The schistosome oesophageal gland: initiator of blood processing. *PLoS neglected tropical diseases* 7, e2337.
- Lichtenbergova, L., Kolbekova, P., Kourilova, P., Kasny, M., Mikes, L., Haas, H., Schramm, G., Horak, P., Kolarova, L., and Mountford, A.P. (2008). Antibody responses induced by *Trichobilharzia regenti* antigens in murine and human hosts exhibiting cercarial dermatitis. *Parasite immunology* 30, 585-595.
- Loukas, A., Tran, M., and Pearson, M.S. (2007). Schistosome membrane proteins as vaccines. *International journal for parasitology* 37, 257-263.
- Lukacs, N.W., and Boros, D.L. (1992). Utilization of fractionated soluble egg antigens reveals selectively modulated granulomatous and lymphokine responses during murine schistosomiasis mansoni. *Infection and immunity* 60, 3209-3216.
- Maizels, R.M., Gomez-Escobar, N., Gregory, W.F., Murray, J., and Zang, X. (2001). Immune evasion genes from filarial nematodes. *International journal for parasitology* 31, 889-898.
- Mangold, B.L., and Dean, D.A. (1986). Passive transfer with serum and IgG antibodies of irradiated cercaria-induced resistance against *Schistosoma mansoni* in mice. *Journal of immunology* 136, 2644-2648.
- Marques, P.E., Oliveira, A.G., Pereira, R.V., David, B.A., Gomides, L.F., Saraiva, A.M., Pires, D.A., Novaes, J.T., Patricio, D.O., Cisalpino, D., *et al.* (2015). Hepatic DNA deposition drives drug-induced liver injury and inflammation in mice. *Hepatology* 61, 348-360.
- Martins, V.P., Morais, S.B., Pinheiro, C.S., Assis, N.R., Figueiredo, B.C., Ricci, N.D., Alves-Silva, J., Caliar, M.V., and Oliveira, S.C. (2014). Sm10.3, a member of the micro-exon gene 4 (MEG-4) family, induces erythrocyte agglutination in vitro and partially protects vaccinated mice against *Schistosoma mansoni* infection. *PLoS neglected tropical diseases* 8, e2750.
- Martins, V.P., Pinheiro, C.S., Figueiredo, B.C., Assis, N.R., Morais, S.B., Caliar, M.V., Azevedo, V., Castro-Borges, W., Wilson, R.A., and Oliveira, S.C. (2012). Vaccination with enzymatically cleaved GPI-anchored proteins from *Schistosoma mansoni* induces protection against challenge infection. *Clinical & developmental immunology* 2012, 962538.
- Mathieu, J., Tissot, M., Nolibe, D., Florentin, I., Kergonou, J.F., and Giroud, J.P. (1990). Local and systemic effects of an acute inflammation on eicosanoid generation capacity of

polymorphonuclear cells and macrophages. *International journal of experimental pathology* 71, 603-616.

- Matisz, C.E., McDougall, J.J., Sharkey, K.A., and McKay, D.M. (2011). Helminth parasites and the modulation of joint inflammation. *Journal of parasitology research* 2011, 942616.
- McDonald, B., Pittman, K., Menezes, G.B., Hirota, S.A., Slaba, I., Waterhouse, C.C., Beck, P.L., Muruve, D.A., and Kubes, P. (2010). Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science* 330, 362-366.
- McKerrow, J.H., Caffrey, C., Kelly, B., Loke, P., and Sajid, M. (2006). Proteases in parasitic diseases. *Annual review of pathology* 1, 497-536.
- McManus, D.P., and Loukas, A. (2008). Current status of vaccines for schistosomiasis. *Clinical microbiology reviews* 21, 225-242.
- McWilliam, H.E., Driguez, P., Piedrafita, D., McManus, D.P., and Meeusen, E.N. (2012). Novel immunomic technologies for schistosome vaccine development. *Parasite immunology* 34, 276-284.
- Mebius, M.M., van Genderen, P.J., Urbanus, R.T., Tielens, A.G., de Groot, P.G., and van Hellemond, J.J. (2013). Interference with the host haemostatic system by schistosomes. *PLoS pathogens* 9, e1003781.
- Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449, 819-826.
- Mei, H., and LoVerde, P.T. (1997). *Schistosoma mansoni*: the developmental regulation and immunolocalization of antioxidant enzymes. *Experimental parasitology* 86, 69-78.
- Melo, T.T., Sena, I.C., Araujo, N., and Fonseca, C.T. (2014). Antibodies are involved in the protective immunity induced in mice by *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument (Smtcg) immunization. *Parasite immunology* 36, 107-111.
- Minard, P., Dean, D.A., Jacobson, R.H., Vannier, W.E., and Murrell, K.D. (1978). Immunization of mice with cobalt-60 irradiated *Schistosoma mansoni* cercariae. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 27, 76-86.
- Modolell, M., Corraliza, I.M., Link, F., Soler, G., and Eichmann, K. (1995). Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *European journal of immunology* 25, 1101-1104.
- Montenegro, S.M., Miranda, P., Mahanty, S., Abath, F.G., Teixeira, K.M., Coutinho, E.M., Brinkman, J., Goncalves, I., Domingues, L.A., Domingues, A.L., *et al.* (1999). Cytokine production in acute versus chronic human *Schistosomiasis mansoni*: the cross-regulatory role of interferon-gamma and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. *The Journal of infectious diseases* 179, 1502-1514.
- Montgomery, S. (2011). *Online Yellow Book: Health Information for Overseas Travel* 2012.
- Morris, G.P., and Threadgold, L.T. (1968). Ultrastructure of the tegument of adult *Schistosoma mansoni*. *The Journal of parasitology* 54, 15-27.

- Moser, D., Tendler, M., Griffiths, G., and Klinkert, M.Q. (1991). A 14-kDa *Schistosoma mansoni* polypeptide is homologous to a gene family of fatty acid binding proteins. *The Journal of biological chemistry* 266, 8447-8454.
- Mountford, A.P., Coulson, P.S., and Wilson, R.A. (1988). Antigen localization and the induction of resistance in mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 97 (Pt 1), 11-25.
- Muleng, A., Sugino, M., Nakajim, M., Sugimoto, C., and Onuma, M. (2001). Tick-Encoded serine proteinase inhibitors (serpins); potential target antigens for tick vaccine development. *The Journal of veterinary medical science* 63, 1063-1069.
- Mwatha, J.K., Kimani, G., Kamau, T., Mbugua, G.G., Ouma, J.H., Mumo, J., Fulford, A.J., Jones, F.M., Butterworth, A.E., Roberts, M.B., *et al.* (1998). High levels of TNF, soluble TNF receptors, soluble ICAM-1, and IFN-gamma, but low levels of IL-5, are associated with hepatosplenic disease in human schistosomiasis mansoni. *Journal of immunology* 160, 1992-1999.
- Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature reviews Immunology* 6, 173-182.
- Neurath, H. (1986). The versatility of proteolytic enzymes. *Journal of cellular biochemistry* 32, 35-49.
- Neves, J.K., Botelho, S.P., de Melo, C.M., Pereira, V.R., de Lima Mdo, C., Pitta Ida, R., Albuquerque, M.C., and Galdino, S.L. (2010). Biological and immunological activity of new imidazolidines against adult worms of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology research* 107, 531-538.
- Oliveira, S.C., Figueiredo, B.C., Cardoso, L.S., and Carvalho, E.M. (2016). A double edged sword: *Schistosoma mansoni* Sm29 regulates both Th1 and Th2 responses in inflammatory mucosal diseases. *Mucosal immunology* 9, 1366-1371.
- Pacifico, L.G., Fonseca, C.T., Chiari, L., and Oliveira, S.C. (2006). Immunization with *Schistosoma mansoni* 22.6 kDa antigen induces partial protection against experimental infection in a recombinant protein form but not as DNA vaccine. *Immunobiology* 211, 97-104.
- Pearce, E.J., C, M.K., Sun, J., J, J.T., McKee, A.S., and Cervi, L. (2004). Th2 response polarization during infection with the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *Immunological reviews* 201, 117-126.
- Pearce, E.J., James, S.L., Hieny, S., Lanar, D.E., and Sher, A. (1988). Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by vaccination with schistosome paramyosin (Sm97), a nonsurface parasite antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5678-5682.
- Pearce, E.J., and MacDonald, A.S. (2002). The immunobiology of schistosomiasis. *Nature reviews Immunology* 2, 499-511.
- Pellegrino, J., and Coelho, P.M. (1978). *Schistosoma mansoni*: wandering capacity of a worm couple. *The Journal of parasitology* 64, 181-182.
- Prichard, R.K., Basanez, M.G., Boatman, B.A., McCarthy, J.S., Garcia, H.H., Yang, G.J., Sripa, B., and Lustigman, S. (2012). A research agenda for helminth diseases of humans: intervention for control and elimination. *PLoS neglected tropical diseases* 6, e1549.

- Puente, X.S., Sanchez, L.M., Overall, C.M., and Lopez-Otin, C. (2003). Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nature reviews Genetics* 4, 544-558.
- Queiroz-Junior, C.M., Madeira, M.F., Coelho, F.M., Costa, V.V., Bessoni, R.L., Sousa, L.F., Garlet, G.P., Souza Dda, G., Teixeira, M.M., and Silva, T.A. (2011). Experimental arthritis triggers periodontal disease in mice: involvement of TNF-alpha and the oral Microbiota. *Journal of immunology* 187, 3821-3830.
- Ranasinghe, S.L., Fischer, K., Gobert, G.N., and McManus, D.P. (2015a). Functional expression of a novel Kunitz type protease inhibitor from the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Parasites & vectors* 8, 408.
- Ranasinghe, S.L., Fischer, K., Gobert, G.N., and McManus, D.P. (2015b). A novel coagulation inhibitor from *Schistosoma japonicum*. *Parasitology* 142, 1663-1672.
- Ranasinghe, S.L., and McManus, D.P. (2017). Protease Inhibitors of Parasitic Flukes: Emerging Roles in Parasite Survival and Immune Defence. *Trends in parasitology* 33, 400-413.
- Randle, L.E., Goldring, C.E., Benson, C.A., Metcalfe, P.N., Kitteringham, N.R., Park, B.K., and Williams, D.P. (2008). Investigation of the effect of a panel of model hepatotoxins on the Nrf2-Keap1 defence response pathway in CD-1 mice. *Toxicology* 243, 249-260.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., and Finn, R. (2016). Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic acids research* 44, D343-350.
- Ray, A., and Dittel, B.N. (2010). Isolation of mouse peritoneal cavity cells. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
- Reeves, E.P., Lu, H., Jacobs, H.L., Messina, C.G., Bolsover, S., Gabella, G., Potma, E.O., Warley, A., Roes, J., and Segal, A.W. (2002). Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nature* 416, 291-297.
- Rey, L. (2001). *Schistosoma mansoni* e esquistossomíase: a doença.
- Reynolds, S.R., Shoemaker, C.B., and Harn, D.A. (1992). T and B cell epitope mapping of SM23, an integral membrane protein of *Schistosoma mansoni*. *Journal of immunology* 149, 3995-4001.
- Roberts, T.H., Hejgaard, J., Saunders, N.F., Cavicchioli, R., and Curmi, P.M. (2004). Serpins in unicellular Eukarya, Archaea, and Bacteria: sequence analysis and evolution. *Journal of molecular evolution* 59, 437-447.
- Robinson, M.W., Dalton, J.P., and Donnelly, S. (2008). Helminth pathogen cathepsin proteases: it's a family affair. *Trends in biochemical sciences* 33, 601-608.
- Ross, A.G., Vickers, D., Olds, G.R., Shah, S.M., and McManus, D.P. (2007). Katayama syndrome. *The Lancet infectious diseases* 7, 218-224.
- Sadler, C.H., Rutitzky, L.I., Stadecker, M.J., and Wilson, R.A. (2003). IL-10 is crucial for the transition from acute to chronic disease state during infection of mice with *Schistosoma mansoni*. *European journal of immunology* 33, 880-888.
- Sajid, M., McKerrow, J.H., Hansell, E., Mathieu, M.A., Lucas, K.D., Hsieh, I., Greenbaum, D., Bogyo, M., Salter, J.P., Lim, K.C., *et al.* (2003). Functional expression and characterization of *Schistosoma mansoni* cathepsin B and its trans-activation by an

- endogenous asparaginyl endopeptidase. *Molecular and biochemical parasitology* *131*, 65-75.
- Satoguina, J.S., Weyand, E., Larbi, J., and Hoerauf, A. (2005). T regulatory-1 cells induce IgG4 production by B cells: role of IL-10. *Journal of immunology* *174*, 4718-4726.
 - Sauma, S.Y., and Strand, M. (1990). Identification and characterization of glycosylphosphatidylinositol-linked *Schistosoma mansoni* adult worm immunogens. *Molecular and biochemical parasitology* *38*, 199-209.
 - Sauma, S.Y., Tanaka, T.M., and Strand, M. (1991). Selective release of a glycosylphosphatidylinositol-anchored antigen from the surface of *Schistosoma mansoni*. *Molecular and biochemical parasitology* *46*, 73-80.
 - Sempowski, G.D., Derdak, S., and Phipps, R.P. (1996). Interleukin-4 and interferon-gamma discordantly regulate collagen biosynthesis by functionally distinct lung fibroblast subsets. *Journal of cellular physiology* *167*, 290-296.
 - Sher, A., Coffman, R.L., Hieny, S., and Cheever, A.W. (1990). Ablation of eosinophil and IgE responses with anti-IL-5 or anti-IL-4 antibodies fails to affect immunity against *Schistosoma mansoni* in the mouse. *Journal of immunology* *145*, 3911-3916.
 - Sher, A., Fiorentino, D., Caspar, P., Pearce, E., and Mosmann, T. (1991). Production of IL-10 by CD4⁺ T lymphocytes correlates with down-regulation of Th1 cytokine synthesis in helminth infection. *Journal of immunology* *147*, 2713-2716.
 - Siddiqui, A.A., Phillips, T., Charest, H., Podesta, R.B., Quinlin, M.L., Pinkston, J.R., Lloyd, J.D., Pompa, J., Villalovos, R.M., and Paz, M. (2003). Enhancement of Sm-p80 (large subunit of calpain) induced protective immunity against *Schistosoma mansoni* through co-delivery of interleukin-2 and interleukin-12 in a DNA vaccine formulation. *Vaccine* *21*, 2882-2889.
 - Silverman, G.A., Bird, P.I., Carrell, R.W., Church, F.C., Coughlin, P.B., Gettins, P.G., Irving, J.A., Lomas, D.A., Luke, C.J., Moyer, R.W., *et al.* (2001). The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *The Journal of biological chemistry* *276*, 33293-33296.
 - Skelly, P.J., Da'dara, A.A., Li, X.H., Castro-Borges, W., and Wilson, R.A. (2014). Schistosome feeding and regurgitation. *PLoS pathogens* *10*, e1004246.
 - Smith, D., Tikhonova, I.G., Jewhurst, H.L., Drysdale, O.C., Dvorak, J., Robinson, M.W., Cwiklinski, K., and Dalton, J.P. (2016). Unexpected Activity of a Novel Kunitz-type Inhibitor: INHIBITION OF CYSTEINE PROTEASES BUT NOT SERINE PROTEASES. *The Journal of biological chemistry* *291*, 19220-19234.
 - Smith, J.H., Reynolds, E.S., and Von Lichtenberg, F. (1969). The integument of *Schistosoma mansoni*. *The American journal of tropical medicine and hygiene* *18*, 28-49.
 - Smythies, L.E., Coulson, P.S., and Wilson, R.A. (1992). Monoclonal antibody to IFN-gamma modifies pulmonary inflammatory responses and abrogates immunity to *Schistosoma mansoni* in mice vaccinated with attenuated cercariae. *Journal of immunology* *149*, 3654-3658.

- Soisson, L.M., Masterson, C.P., Tom, T.D., McNally, M.T., Lowell, G.H., and Strand, M. (1992). Induction of protective immunity in mice using a 62-kDa recombinant fragment of a *Schistosoma mansoni* surface antigen. *Journal of immunology* *149*, 3612-3620.
- Sotillo, J., Pearson, M., Potriquet, J., Becker, L., Pickering, D., Mulvenna, J., and Loukas, A. (2016). Extracellular vesicles secreted by *Schistosoma mansoni* contain protein vaccine candidates. *International journal for parasitology* *46*, 1-5.
- Stapels, D.A., Ramyar, K.X., Bischoff, M., von Kockritz-Blickwede, M., Milder, F.J., Ruyken, M., Eisenbeis, J., McWhorter, W.J., Herrmann, M., van Kessel, K.P., *et al.* (2014). *Staphylococcus aureus* secretes a unique class of neutrophil serine protease inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *111*, 13187-13192.
- Steinmann, P., Keiser, J., Bos, R., Tanner, M., and Utzinger, J. (2006). Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *The Lancet infectious diseases* *6*, 411-425.
- Stek, M., Jr., Dean, D.A., and Clark, S.S. (1981). Attrition of schistosomes in an irradiation-attenuated cercarial immunization model of *Schistosoma mansoni*. *The American journal of tropical medicine and hygiene* *30*, 1033-1038.
- Tanigawa, C., Fujii, Y., Miura, M., Nzou, S.M., Mwangi, A.W., Nagi, S., Hamano, S., Njenga, S.M., Mbanefo, E.C., Hirayama, K., *et al.* (2015). Species-Specific Serological Detection for Schistosomiasis by Serine Protease Inhibitor (SERPIN) in Multiplex Assay. *PLoS neglected tropical diseases* *9*, e0004021.
- Teixeira-Carvalho, A., Martins-Filho, O.A., Peruhype-Magalhaes, V., Silveira-Lemos, D., Malaquias, L.C., Oliveira, L.F., Silveira, A.M., Gazzinelli, A., Gazzinelli, G., and Correa-Oliveira, R. (2008). Cytokines, chemokine receptors, CD4+CD25HIGH+ T-cells and clinical forms of human schistosomiasis. *Acta tropica* *108*, 139-149.
- Tendler, M., Vilar, M.M., Brito, C.A., Freire, N.M., Katz, N., and Simpson, A. (1995). Vaccination against schistosomiasis and fascioliasis with the new recombinant antigen Sm14: potential basis of a multi-valent anti-helminth vaccine? *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* *90*, 255-256.
- Tetley, T.D. (1993). New perspectives on basic mechanisms in lung disease. 6. Proteinase imbalance: its role in lung disease. *Thorax* *48*, 560-565.
- Tincani, A., Andreoli, L., Bazzani, C., Bosiso, D., and Sozzani, S. (2007). Inflammatory molecules: a target for treatment of systemic autoimmune diseases. *Autoimmunity reviews* *7*, 1-7.
- Torben, W., Ahmad, G., Zhang, W., Nash, S., Le, L., Karmakar, S., and Siddiqui, A.A. (2012). Role of antibody dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC) in Sm-p80-mediated protection against *Schistosoma mansoni*. *Vaccine* *30*, 6753-6758.
- Tran, M.H., Pearson, M.S., Bethony, J.M., Smyth, D.J., Jones, M.K., Duke, M., Don, T.A., McManus, D.P., Correa-Oliveira, R., and Loukas, A. (2006). Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis. *Nature medicine* *12*, 835-840.
- Trottein, F., Godin, C., Pierce, R.J., Sellin, B., Taylor, M.G., Gorillot, I., Silva, M.S., Lecocq, J.P., and Capron, A. (1992). Inter-species variation of schistosome 28-kDa glutathione S-transferases. *Molecular and biochemical parasitology* *54*, 63-72.

- van der Werf, M.J., Borsboom, G.J., and de Vlas, S.J. (2003a). No effect of recall period length on prevalence of self-reported haematuria in *Schistosoma haematobium*-endemic areas. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 97, 373-374.
- van der Werf, M.J., de Vlas, S.J., Brooker, S., Looman, C.W., Nagelkerke, N.J., Habbema, J.D., and Engels, D. (2003b). Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. *Acta Trop* 86, 125-139.
- Van Hellemond, J.J., Retra, K., Brouwers, J.F., van Balkom, B.W., Yazdanbakhsh, M., Shoemaker, C.B., and Tielens, A.G. (2006). Functions of the tegument of schistosomes: clues from the proteome and lipidome. *International journal for parasitology* 36, 691-699.
- Wan, H., Lee, K.S., Kim, B.Y., Zou, F.M., Yoon, H.J., Je, Y.H., Li, J., and Jin, B.R. (2013). A spider-derived Kunitz-type serine protease inhibitor that acts as a plasmin inhibitor and an elastase inhibitor. *PloS one* 8, e53343.
- Wang, T., Zhao, M., Rotgans, B.A., Strong, A., Liang, D., Ni, G., Limpanont, Y., Ramasoota, P., McManus, D.P., and Cummins, S.F. (2016). Proteomic Analysis of the *Schistosoma mansoni* Miracidium. *PloS one* 11, e0147247.
- WHO (1953). WHO Expert Committee on Bilharziasis: first report. In *Technical Report Series* (Geneva: World Health Organization).
- WHO (1967). Epidemiology and control of Schistosomiasis: report of a WHO Expert Committee. In *Technical Report Series* (Geneva: World Health Organization).
- WHO (2002). *Prevention and Control of Schistosomiasis and Soiltransmitted Helminthiasis*.
- WHO (2010). *World Health Statistics*.
- Wilson, R.A., and Coulson, P.S. (2006). Schistosome vaccines: a critical appraisal. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 101 Suppl 1, 13-20.
- Wilson, R.A., and Coulson, P.S. (2009). Immune effector mechanisms against schistosomiasis: looking for a chink in the parasite's armour. *Trends in parasitology* 25, 423-431.
- Wilson, R.A., Coulson, P.S., Betts, C., Dowling, M.A., and Smythies, L.E. (1996). Impaired immunity and altered pulmonary responses in mice with a disrupted interferon-gamma receptor gene exposed to the irradiated *Schistosoma mansoni* vaccine. *Immunology* 87, 275-282.
- World Health, O.W. (2015). Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. *First WHO report on neglected tropical diseases*, pp. 129.
- Wu, X.J., Sabat, G., Brown, J.F., Zhang, M., Taft, A., Peterson, N., Harms, A., and Yoshino, T.P. (2009). Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* proteins released during in vitro miracidium-to-sporocyst transformation. *Molecular and biochemical parasitology* 164, 32-44.
- Wynn, T.A., Thompson, R.W., Cheever, A.W., and Mentink-Kane, M.M. (2004). Immunopathogenesis of schistosomiasis. *Immunological reviews* 201, 156-167.
- Yadav, R., Larbi, K.Y., Young, R.E., and Nourshargh, S. (2003). Migration of leukocytes through the vessel wall and beyond. *Thrombosis and haemostasis* 90, 598-606.
- Yan, Y., Liu, S., Song, G., Xu, Y., and Dissous, C. (2005). Characterization of a novel vaccine candidate and serine proteinase inhibitor from *Schistosoma japonicum* (Sj serpin). *Veterinary parasitology* 131, 53-60.

- Yang, Y., Wen, Y., Cai, Y.N., Vallee, I., Boireau, P., Liu, M.Y., and Cheng, S.P. (2015). Serine proteases of parasitic helminths. *The Korean journal of parasitology* 53, 1-11.
- Yuan, C.H., He, Q.Y., Peng, K., Diao, J.B., Jiang, L.P., Tang, X., and Liang, S.P. (2008). Discovery of a distinct superfamily of Kunitz-type toxin (KTT) from tarantulas. *PloS one* 3, e3414.
- Zhang, M., Hong, Y., Han, Y., Han, H., Peng, J., Qiu, C., Yang, J., Lu, K., Fu, Z., and Lin, J. (2013). Proteomic analysis of tegument-exposed proteins of female and male *Schistosoma japonicum* worms. *Journal of proteome research* 12, 5260-5270.
- Zupunski, V., Kordis, D., and Gubensek, F. (2003). Adaptive evolution in the snake venom Kunitz/BPTI protein family. *FEBS letters* 547, 131-136.

9 ANEXOS

9.1 Artigos publicados durante o período do doutorado

2013-2017:

• GONÇALVES DE ASSIS, NATAN RAIMUNDO; **BATISTONI DE MORAIS, SUELLEN**; FIGUEIREDO, BÁRBARA CASTRO PIMENTEL; RICCI, NATASHA DELAQUA; DE ALMEIDA, LEONARDO AUGUSTO ; DA SILVA PINHEIRO, CARINA ; MARTINS, VICENTE DE PAULO; OLIVEIRA, SERGIO COSTA. DNA Vaccine Encoding the Chimeric Form of *Schistosoma mansoni* Sm-TSP2 and Sm29 Confers Partial Protection against Challenge Infection. PlosOne, v. 10, p. e0125075, 2015.

• FIGUEIREDO, BARBARA CASTRO PIMENTEL; RICCI, NATASHA DELAQUA ; DE ASSIS, NATAN RAIMUNDO GONÇALVES; **DE MORAIS, SUELLEN BATISTONI**; FONSECA, CRISTINA TOSCANO ; OLIVEIRA, SERGIO COSTA. Kicking in the Guts: *Schistosoma mansoni* Digestive Tract Proteins are Potential Candidates for Vaccine Development. Frontiers in Immunology (Online), v. 6, p. 17, 2015.

• ALVES CC, ARAUJO N, DOS SANTOS VCF, COUTO FB, ASSIS NRG, **MORAIS SB**, OLIVEIRA, SC; FONSECA, CT. Sm29, but Not Sm22.6 Retains its Ability to Induce a Protective Immune Response in Mice Previously Exposed to a *Schistosoma mansoni* Infection. PLoSNegl Trop Dis 9(2): e0003537, 2015.

• FIGUEIREDO, BARBARA C.; ASSIS, NATAN R. G.; **MORAIS, SUELLEN B.**; RICCI, NATASHA D.; PINHEIRO, CARINA S.; MARTINS, VICENTE P.; BICALHO, RODRIGO M.; DA'DARA, AKRAM A. ;SKELLY, PATRICK J.;OLIVEIRA, SERGIO C. Schistosome

Syntenin Partially Protects Vaccinated Mice against *Schistosom amansoni* Infection. PLoS Neglected Tropical Diseases (Online) , v. 8, p. e3107, 2014.

• PINHEIRO, CARINA S. ; RIBEIRO, ANA PAULA DIAS ; CARDOSO, FERNANDA C. ; MARTINS, VICENTE P. ; FIGUEIREDO, BARBARA C. P.; ASSIS, NATAN R.G.; **MORAIS, SUELLEN B.** ;CALIARI, MARCELO V. ; LOUKAS, ALEX ; OLIVEIRA, SERGIO C. A multivalent chimeric vaccine composed of *Schistosoma mansoni* SmTSP2 and Sm29 was able to induce protection against infection in mice. Parasite Immunology (Print) , v. 36, p. 303312, 2014.

• FIGUEIREDO, BARBARA CASTRO PIMENTEL; DE ASSIS, NATAN RAIMUNDO GONÇALVES; **DE MORAIS, SUELLEN BATISTONI**; MARTINS, VICENTE PAULO ; RICCI, NATASHA DELAQUA ;BICALHO, RODRIGO MARQUES ; PINHEIRO, CARINA DA SILVA ;OLIVEIRA, SERGIO COSTA. Immunological characterization of a chimeric form of *Schistosoma mansoni* aquaporin in the murine model. Parasitology (London. Print) , v. CJO, p. 112,2014.

• MARTINS, VICENTE P.; **MORAIS, SUELLEN B.**; PINHEIRO, CARINA S.; ASSIS, NATAN R. G.; FIGUEIREDO, BARBARA C.P. ; RICCI, NATASHA D. ; ALVES SILVA, JULIANA ;CALIARI, MARCELO V.; OLIVEIRA, SERGIO C. Sm10.3, a Member of the MicroExon Gene 4 (MEG4) Family, Induces Erythrocyte Agglutination In Vitro and Partially Protects Vaccinated Miceagainst *Schistosoma mansoni*.Infection. PLoSNeglected Tropical Diseases (Online) , v. 8, p. e2750, 2014.

9.2 Artigo submetido

Plos Pathogens

Suellen B. Morais; Barbara C. Figueiredo; Natan R. G. Assis; Debora M. Alvarenga; Mariana T. Q. de Magalhães; Rafaela S. Ferreira; Angélica T. Vieira; Gustavo B. Menezes and Sergio C. Oliveira. *Schistosoma mansoni* SmKI-1 serine protease inhibitor binds to elastase and impairs neutrophil function and inflammation. Submissão revisada enviada no dia 08.11.2018 para a revista PLOS Pathogens.

Versão Submetida aguardando confirmação de aceite:

***Schistosoma mansoni* SmKI-1 serine protease inhibitor binds to elastase and impairs neutrophil function and inflammation**

Suellen B. Morais^{1,2¶}; Barbara C. Figueiredo^{1,2¶}; Natan R. G. Assis^{1,2}; Debora M. Alvarenga³; Mariana T. Q. de Magalhães¹; Rafaela S. Ferreira¹; Angélica T. Vieira¹; Gustavo B. Menezes³ and Sergio C. Oliveira^{1,2,*}

¹Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

²Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais (INCT-DT), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Ministério de Ciência Tecnologia e Inovação Salvador, Bahia, Brazil.

³Centro de Biologia Gastrointestinal, Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Short title: *S. mansoni* SmKI-1 protects against inflammation

*Corresponding author

E-mail: scozeus1@gmail.com (SCO)

¶These authors contributed equally to this work.

Abstract

Protease inhibitors have important function during homeostasis, inflammation and tissue injury. In this study, we described the role of *Schistosoma mansoni* SmKI-1 serine protease inhibitor in parasite development and as a molecule capable of regulating different models of inflammatory diseases. First, we determine that recombinant (r) SmKI-1 and its Kunitz domain but not the C-terminal region possess inhibitory activity against trypsin and neutrophil elastase (NE). To better understand the molecular basis of NE inhibition by SmKI-1, molecular docking studies were also conducted. Docking results suggest a complete blockage of NE active site by SmKI-1 Kunitz domain. Additionally, rSmKI-1 markedly inhibited the capacity of NE to kill schistosomes. In order to further investigate the role of SmKI-1 in the parasite, we designed specific siRNA to knockdown SmKI-1 in *S. mansoni*. SmKI-1 gene suppression in larval stage of *S. mansoni* robustly impact in parasite development *in vitro* and *in vivo*. To determine the ability of SmKI-1 to interfere with neutrophil migration and function, we tested SmKI-1 anti-inflammatory potential in different murine models of inflammatory diseases. Treatment with SmKI-1 rescued acetaminophen (APAP)-mediated liver damage, with a significant reduction in both neutrophil recruitment and elastase activity. In the model of gout arthritis, this protein reduced neutrophil accumulation, IL-1 β secretion, hypernociception, and overall pathological score. Finally, we

demonstrated the ability of *SmKI-1* to inhibit early events that trigger neutrophil recruitment in pleural cavities of mice in response to carrageenan. In conclusion, *SmKI-1* is a key protein in *S. mansoni* survival and it has the ability to inhibit neutrophil function as a promising therapeutic molecule against inflammatory diseases.

Author summary

Schistosoma mansoni is one of the main agents of schistosomiasis, which is the most important human helminthic infection in terms of global morbidity and mortality. Although schistosomiasis represents a major public health problem in endemic countries, evidences show that *S. mansoni* downregulates inflammatory responses in many diseases. Fortunately, the control of inflammatory responses is extended to pathogen-derived antigens, leading us to study one *S. mansoni* Kunitz type protease inhibitor (*SmKI-1*), found in larval and adult phases of the parasite. We demonstrate that *SmKI-1* inhibits trypsin and neutrophil elastase (NE). Additionally, live parasites that *SmKI-1* gene has been suppressed using siRNA displayed an impaired schistosome development both *in vitro* and *in vivo*. Further, we demonstrate that *SmKI-1* possesses an anti-inflammatory potential in three different murine models of inflammatory diseases: acetaminophen (APAP)-mediated liver damage, gout arthritis, and pleural inflammation in response to carrageenan. In these inflammatory disease models, we evaluated *SmKI-1* effect on neutrophil and our results demonstrate this molecule is able to inhibit neutrophil migration and function, regulating inflammation. Thus, our data suggest that *SmKI-1* is a promising therapeutic molecule against inflammatory diseases.

Introduction

Immunologic disorders are becoming increasingly prevalent in developed population, with asthma exceeding 10% of children in many countries(Asher et al., 2006), while the incidence of autoimmune diseases such as type I diabetes(Gale, 2002) as well as of inflammatory bowel disease (IBD)(Economou and Pappas, 2008) continues to rise. Helminth parasites are associated with protection from inflammatory conditions in both humans and animal models(Maizels, 2016). One possible explanation resides that helminths drive the regulatory arm of the immune system, abrogating the ability of the host to expel the parasites, while also dampening reactivity to many inflammatory processes. Furthermore, these parasites or their products hold therapeutic potential for human inflammatory disorders.

Parasitic helminths of genus *Schistosoma*, the agents of schistosomiasis, develop the capability to live for decades in the blood vessels of human host. Schistosomiasis is the most important human helminthic infection in terms of global morbidity and mortality(van der Werf et al., 2003b). During infection, larval schistosomes (schistosomula) migrate to the blood vessels where they mature to adult worms and live as pairs in the mesenteric or perivesicular veins for years (Gryseels et al., 2006). These parasite stages (larval and adult), besides surviving inside the host, acquire the ability to modulate human immune responses, what has always called the attention of many scientists worldwide(Abath et al., 2006; Pearce and Sher, 1987). Many studies reveal that schistosomes down-regulate inflammatory responses in immune-mediated diseases(Bafica et al., 2012; Bafica et al., 2011; Cardoso et al., 2010; Lima et al., 2013). Fortunately, the control of inflammation seems not to be strictly dependent on parasite infection, since it is extended to some pathogen-derived antigens(Bafica et al., 2012; Cardoso et al., 2010; Lima et al., 2013), suggesting some schistosome molecules are useful weapons to control inflammation(Janssen et al., 2016; Oliveira et al., 2016a).

Immunity to schistosome infection has been assigned to several immune mechanisms including parasite opsonization by specific antibodies and complement and various types of

effector cells (e.g., neutrophils, macrophages, eosinophils, and others) (Capron and Capron, 1986; Dean et al., 1975). Among immune cells, neutrophils are stated as the first cell type to arrive at inflammatory sites (Nathan, 2006). These cells have a crucial role on innate immune response development (Nathan, 2006) although they are also involved in host tissue damage through secretion of proteases and cytotoxic mediators (Cascao et al., 2010). In this study, we characterized biochemically *S. mansoni* SmKI-1 and we showed that expression of SmKI-1 is essential for parasite survival *in vitro* and *in vivo*. Additionally, we tested SmKI-1 anti-inflammatory potential in different murine models of inflammatory diseases, such as acetaminophen (APAP)-induced liver inflammation, gout arthritis and carrageenan-induced pleural inflammation. Finally, we observed that SmKI-1 has the ability to bind to elastase and interferes with neutrophil migration and function, reducing inflammation.

Results

***Schistosoma mansoni* SmKI-1 is a Kunitz type serine-protease inhibitor**

Initially, we performed bioinformatic analysis to evaluate the *S. mansoni* SmKI-1 (Smp_147730) amino acid sequence in order to determine the conservation of its Kunitz domain (KI) compared to other organisms. The sequence alignment using BLAST homology search for the coded protein SmKI-1 compared to other functionally known Kunitz inhibitor proteins from various species showed the conservation of the P1 site typical of trypsin inhibitor (Arg¹⁸) and the six cysteine residues (represented in yellow on Fig. 1A and C). The Kunitz domain of SmKI-1 protein was found to be a well-conserved segment with other Kunitz protease inhibitors such as Actitoxin from *Anemonia viridis* (gi|928589358), Tissue Factor pathway inhibitor 2 from *Tinamus guttatus* (gi|697415567) and the AMBO protein from *Bos indicus* (gi|1131295758) with 58%, 45%, and 55% of identity, respectively. These data together with PSI-BLAST analysis was used as an input for protein modeling. Complementary *in silico* analysis of SmKI-1 amino acid

sequence revealed besides the presence of the conserved Kunitz inhibitor domain (N-terminal), also an unstructured C-terminal region (Fig. 1B). Also, BLASTp analysis of the predicted C-terminal amino acid sequence revealed no similarity with other proteins deposited in the databank. Furthermore, we predicted the occupancy of *N*-glycosylation and *O*-glycosylation sites by using bioinformatics programs. Our sequence based predictions revealed only one putative *N*-glycosylation site for *SmKI*-1 protein at Asn³⁰, which agrees with other functionally characterized Kunitz inhibitors with high similarity to *SmKI*-1 that have this single point modification and previous results described by Ranasinghe and colleagues (S1A Fig.) (Ranasinghe et al., 2015a). Glycosylation prediction results show no potential *O*-glycosylation sites in the sequence (all prediction confidence scores were lower than 0.5), and the single *N*-glycosylation site annotated for this protein (Asn³⁰) is neither in the primary nor secondary binding loop (S1A Fig.).

We modeled *SmKI*-1 Kunitz domain by comparative homology modeling using the MODELLER v9.17 tool and *iTASSER* software (Fig 1D). The suitable template structure for developing the model was obtained using BLAST by setting PDB as the source database for finding the 3D structure templates. The resulting sequences of at least 48% similarity and identity were selected for comparative homology modeling. PDB ID 4BQD was found to have 65% identity with the query sequence and was chosen as the template for modeling the *SmKI*'s Kunitz domain. The model was found to be reliable and approximately 91% of the residues fell in the favored region in the Ramachandran plot. Moreover, the canonical segments of the primary binding loop of *SmKI*-1 (DE¹⁴GICR¹⁸ALLK) and the secondary binding loop (F³⁵YYGGCLG⁴³NG⁴⁵NNFL) adopt a well-conserved conformation, which is similar within other Kunitz inhibitors in complex with trypsin and elastase (Fig 1D). Our modeling also suggests that the untypical Glu¹⁴ could be important to form the complex and allow the hydrophobic P1 Arg¹⁸ to enter the active site.

Cloning and heterologous expression of the *SmKI-1* and its fragments (Kunitz and C-terminal domains), were performed as described in the material and methods section. Recombinant (r) His-tagged *SmKI-1* (r*SmKI-1*), KI and C-terminal domains were purified from bacterial lysates using nickel affinity chromatography, and then analyzed by SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining. A single band of the expected size of r*SmKI-1* (~20 kDa), KI (~10 kDa) and C-terminal domains (~15 kDa) indicate the success of the purification protocol (S1B Fig.). To further evaluate the specificity of the purification procedure, purified r*SmKI-1*, KI domain and C-terminal region were analyzed by western blot using an anti-His tag monoclonal antibody (S1C Fig.). The western blot analysis confirmed that the purified proteins have the histidine tag and the molecular weight was the expected for r*SmKI-1*, KI and C-terminal domains. Also, the purity and average molecular mass of the refolded recombinant protein (KI domain) was analyzed by mass spectrometry. Our data showed a single homogeneity protein with a $[M+H]^+ = 11,200.0$ m/z with theoretical average molecular mass of 11,074.0 Da. The precursor charge state $M+2H^+$ was also detected (S1D Fig.).

The final product was submitted to circular dichroism (CD) analysis in order to rapid determine the secondary structure and folding properties of this inhibitor. Because the spectra of proteins are so dependent on their conformation, CD can be used to estimate the structure of unknown proteins and monitor their structures. Here, we were able to verify that KI domain was soluble and well-folded and suitable for our assays (S1E Fig.). The protein showed a typical negative band at 215 nm and small positive band 195 nm, which is typical for antiparallel β -sheets and other Kunitz-inhibitors (Nagy et al., 2003; Zhao et al., 2011). In order to evaluate the cytotoxicity potential of r*SmKI-1*, we incubated BHK-21 cells with different concentrations of this protein and submitted them to the MTS assay. BHK-21 cells incubated with the amounts of r*SmKI-1* used in this study did not show cell death, which was only observed at higher r*SmKI-1* concentrations (1000 μ g/mL) (S1F Fig.). A solution of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), a highly toxic surfactant, was used as a positive control and the BHK-21 cells

incubated with medium alone were used as a negative control to calculate the percentage of viable cells. These results supported the safety of r*SmKI-1* for the next experiments.

***SmKI-1* and its Kunitz domain but not the C-terminal region inhibit both trypsin and elastase activities**

Herein, we investigated the *SmKI-1* potential to inhibit bovine trypsin and also neutrophil elastase, a well-known human serine protease with important role in inflammation. We performed enzymatic assays *in vitro* using the recombinant (r) full *SmKI-1*, the Kunitz domain and the C-terminal region of the protein and observed that r*SmKI-1* and its Kunitz domain possess inhibitory activity against trypsin (100nM) and neutrophil elastase (300nM) (Fig. 2A and B). However, the C-terminal domain showed no inhibitory activity. In addition, we observed a reduction in the elastase activity when cultured murine neutrophils were pre-treated with r*SmKI-1* or its Kunitz domain and stimulated with N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) (Fig 2C). As observed in *in vitro* assays, the C-terminal domain did not affect the elastase activity. Together, these results strongly suggest that r*SmKI-1* anti-elastolytic activity resides on its Kunitz domain and it is independent of the C-terminal region of the molecule.

Previously, neutrophil elastase was found to be toxic to *S. mansoni* larvae (schistosomula), since inhibitors prevented elastase-mediated schistosome killing (Freudenstein-Dan et al., 2003). Then, we decided to test the protective effect of *SmKI-1* in cultured schistosomula treated with elastase. The toxic effect of elastase in schistosomula was evident at low concentration such as 0.05 mg/mL. After 24 hours of treatment, r*SmKI-1* (0.15 mg/mL) markedly inhibited the capacity of neutrophil elastase to kill schistosomula (Fig 2D). This protective effect observed by r*SmKI-1* was probably due to elastase activity inhibition.

To better understand the molecular basis of neutrophil elastase (NE) inhibition by *SmKI-1* Kunitz domain, molecular docking studies were conducted using the webserver ClusPro 2.0. Docking results suggest a complete blockage of NE active site by *SmKI-1*, revealing a predicted

binding mode very similar to the observed for other elastase inhibitors, in which two *SmKI-1* loops (Asp¹³ to Leu²¹ and Phe³⁶ to Leu⁴²) are in close contact with the enzyme (Fig 2E) (Garcia-Fernandez et al., 2015; Stapels et al., 2014). Analysis of the predicted interface with PISA reveals that 14 *SmKI-1* residues are involved in the interface, and approximately 20% (761.8 Å²) of the inhibitor solvent-accessible area is buried upon complex formation. The interface is also stabilized by five intramolecular hydrogen bonds, all involving residues from the Asp¹³-Leu²¹ loop. Located at the P1 position, *SmKI-1* Arg¹⁸ seems to be a key residue for stabilizing the interaction due to its hydrophobic tail, which can form crucial H-bonds in the S1 pocket. Both its backbone NH and O are involved in hydrogen bonds, respectively to NE Ser²¹⁷ and Gly²⁰⁰ (Fig 2F). It has been previously discussed that the P1 position hydrophobic residues are preferred for elastase inhibition, partially due to the difficulty to accommodate bigger residues at S1. In agreement to that, data from the MEROPS database indicates Val, Ile and Ala as the most frequent P1 residues in NE substrates (Rawlings et al., 2016). Also, the Lys13Leu mutation at P1 of a Kunitz inhibitor has been shown to improve affinity to pancreatic elastase (Garcia-Fernandez et al., 2015). Interestingly, docking results indicate that NE elastase nicely accommodates *SmKI-1* Arg¹⁸ at S1 pocket, since the hydrophobic portion of its side chain occupies the S1 pocket as it would be expected for a small hydrophobic residue, while the guanidine group forms an intramolecular salt bridge interaction with *SmKI-1* Glu¹⁴ and a π -stacking interaction to NE Phe¹⁹⁹. *SmKI-1* Glu¹⁴ is also involved in a hydrogen bond interaction to NE Cys²²³. The remaining predicted hydrogen bonds involve *SmKI-1* Ile¹⁶ and Leu²⁰ (bound respectively to NE Val²¹⁹ and Phe⁵⁴). The side chain of *SmKI-1* Leu²⁰, a highly conserved residue among Kunitz type inhibitors, also fits well in the S2' elastase pocket (Fig 2F). Altogether, the docking results indicate very good shape and chemical complementarities between *SmKI-1* and neutrophil elastase, in agreement with the potent *in vitro* inhibition observed in this study.

***SmKI-1* gene expression is important for *S. mansoni* survival**

In order to investigate the role of *SmKI-1* in the parasite, we measured the relative expression of *SmKI-1* mRNA in different life cycle stages (e.g.: eggs, miracidia, cercariae, schistosomula and adult parasites) of *S. mansoni* by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and the results are shown in Fig 3A. The *SmKI-1* gene exhibited high relative expression in the intravascular life stages, with highest mRNA levels observed in larval and adult parasites. *SmKI-1* transcripts were not detected in eggs, miracidia and cercariae stages. Since *SmKI-1* is highly expressed in intravascular stages, we designed specific siRNA in order to knockdown the gene and observed the effects of the lack of *SmKI-1* expression in the parasite. In the larval stage, obtained through cercariae mechanical transformation, the siRNA treatment resulted in no detectable expression of *SmKI-1*. However, in adults recovered from infected mice electroporation with *SmKI-1* siRNA resulted in a less efficient suppression: 78% in females and 33% in males, as measured by qPCR (Fig 3B).

SmKI-1-suppressed schistosomula were kept in Braschi medium for six weeks and once a week, gene expression was monitored and the size and viability of suppressed parasites were also evaluated. Suppression rates remained at over 90% up to at least four weeks post *SmKI-1* siRNA treatment. After 6 weeks, the suppressive effect waned although *SmKI-1* gene expression was still 70% lower in suppressed parasites compared to controls (Fig 3C). *SmKI-1* suppressed parasites exhibited a 60% reduction in viability when compared to control ones (Fig. 3D) and they were also smaller in size (S2A Fig.) indicating impaired development under low levels of *SmKI-1* mRNA (S2B Fig.).

To investigate whether *SmKI-1* RNAi-mediated gene silencing affected parasite viability *in vivo*, we infected groups of 8 mice with *SmKI-1*-suppressed schistosomula or control parasites. After six weeks, the adult worms were recovered through perfusion and counted. There was a significant reduction in worm burden in the *SmKI-1*-suppressed parasites compared to the control group, 62% reduction in the first trial and 54% reduction in the second one (Fig. 3E). The

worm burden reduction also resulted in reduction in eggs found in infected mouse livers (S2C Fig.). Since *SmKI-1* gene suppression in larval stage of *S. mansoni* robustly impact schistosomes development *in vitro* and *in vivo*, we conclude that expression of this protein is essential for parasite survival.

In order to further investigate the relationship between *SmKI-1* and neutrophils, we isolated neutrophils from mice and incubated them *in vitro* with 1-day old schistosomula after treatment with either *SmKI-1* siRNA or control siRNA. Following 24 hours of incubation, neutrophils induced schistosomula killing that was significantly higher in *SmKI-1*-suppressed parasites when compared to control group (Fig 3F). This result suggests a potential role for *SmKI-1* to interact with neutrophils to inhibit parasite killing *in vitro*. As a control for viability, both groups of electroporated parasites were also analyzed in the absence of neutrophils and demonstrate no difference in schistosomula survival after the same time in culture (S2D Fig.).

Since it is known that neutrophils adhere to the larval schistosomes' surface and participate in the removal of glycocalyx by phagocytosis *in vivo*(de Melo et al., 1993) and our studies indicates that *SmKI-1* seems to impair elastase secretion by neutrophils, we depleted neutrophils *in vivo* and infected mice with *SmKI-1*-suppressed schistosomula or control parasites. When worms recovered from animals infected with *SmKI-1*-suppressed schistosomula were compared to parasites treated with control siRNA in neutrophils depleted mice, we still observed a worm burden reduction of 16% suggesting that *SmKI-1* plays an important role in parasite development independent of its ability to inhibit host neutrophils *in vivo* (S3 Fig.).

***SmKI-1* reduces neutrophil migration and liver damage caused by acetaminophen (APAP)**

To further investigate the ability of *SmKI-1* to interfere with neutrophil migration and function, we used the acetaminophen (APAP) model, a hepatotoxic compound that caused cell death and massive DNA deposition in liver, inducing acute inflammation associated with

neutrophil recruitment (Marques et al., 2015). TLR4 KO mice were used in all *in vivo* experiments related to the murine models of inflammatory diseases to minimize the cellular response related to the LPS contamination present in *SmKI-1*. Mice were divided in two groups, one treated with r*SmKI-1* intravenously (APAP+ *SmKI-1* group, 10mg/Kg), and another group treated with vehicle (PBS, APAP group). Immediately following *SmKI-1* or vehicle injection, mice were challenged with APAP by gavage and samples collected after 24 hrs. Neutrophil migration to mouse livers in response to APAP challenge was first indirectly evaluated through myeloperoxidase (MPO) activity. Mice challenged with APAP had a significantly increased MPO activity when compared to PBS-control group. Previous treatment with r*SmKI-1* significantly reduced (62%) MPO activity induced by APAP treatment (Fig. 4A). We also analyzed elastase activity and observed an approximately 49% decrease in enzymatic activity in APAP+r*SmKI-1* group in comparison to APAP group alone (Fig. 4B). To directly investigate the effect of *SmKI-1* in neutrophil migration to the liver, we imaged hepatic microenvironment under confocal intravital microscopy. APAP-treated group had extensive areas of DNA accumulation within liver sinusoids and parenchyma and a higher number of infiltrating neutrophils (Fig. 4C and D). In contrast, APAP+*SmKI-1* group had robustly reduced DNA deposition and an approximately 72% lower hepatic neutrophil infiltration (Fig. 4C and D). Under histopathology analysis, APAP+*SmKI-1* treated mice presented milder histological signals of hepatotoxicity (Fig. 4E). Conversely, APAP treated animals presented overt liver necrosis and hepatocyte degeneration (Fig. 4E). Finally, we investigated serum alanine aminotransferase levels (ALT), a gold standard methodology to access hepatic injury. Serum ALT levels were significantly higher in APAP-challenged mice in comparison to the PBS-control group (Fig. 4F). However, APAP+*SmKI-1* treated mice had lower ALT levels (48%), indicating decreased hepatic damage (Fig. 4F). Taking together, these data shown that r*SmKI-1* administration led to reduced liver neutrophil migration and inflammation, culminating in a markedly protection against liver injury triggered by APAP challenge.

***SmKI-1* diminishes inflammatory response in MSU-induced gout**

Since *SmKI-1* seems to affect neutrophil activity, we then tested its potential to control inflammation, in an experimental model of gout arthritis, in which neutrophils are one of the pivotal inflammatory cells that contribute to disease pathogenesis. Mice were divided in two treated groups, one group was treated with r*SmKI-1* (10mg/Kg) intravenously, while the other group received PBS as vehicle. Then, we injected highly pure monosodium urate (MSU) crystals directly into C57BL/6 mice right knee joints and PBS was administered to the left knee as control. Injection of MSU in the knee joint of mice induced significant accumulation of neutrophils in periarticular tissue, as assessed by MPO assay. In contrast, *SmKI-1* administration decreased MPO (90%) in the knee joints (Fig. 5A). Furthermore, the number of total cell were significantly lower in the articular cavity of *SmKI-1*-treated mice (54%) as compared to non-treated MSU-challenged mice (Fig. 5B). This total cell reduction in articular cavity was accompanied by decrease (90%) in neutrophil infiltration (Fig. 5C). Next, we also examined the production of the cytokine IL- β in the knee periarticular tissue and observed markedly increased levels of this cytokine after MSU injection. Conversely, treatment with r*SmKI-1* significantly decreased levels of IL-1 β (Fig 5D). Additionally, 16 hrs after MSU injection, MSU crystals induced mechanical hypernociception (as observed by the decreased paw withdrawal threshold) due to joint inflammation specially by the neutrophil recruitment, given that neutrophil's accumulation in the articular knee cavity have been extensively associated with increase hypernocipetion in mice with arthritis (Amaral et al., 2012; Coelho et al., 2008; Cunha et al., 2008). However, MSU+*SmKI-1*-treated mice showed reduced hypernociception (Fig 5E) that was also associated with reduction of neutrophils in the articular knee cavity (Fig 5C). The dorsiflexion-elicited withdrawal threshold was expressed in grams (g) and used to infer behavioral responses associated with experimental pain (hypernociception). The higher withdrawal threshold means lower hypernociception, since mice with reduce pain support more

local pressure. Additionally, knee tissue from r*SmKI-1* treated mice showed reduction in joint destruction characterized by diminished leukocyte infiltration and hyperplasia from the synovial membrane after MSU injection (Fig 5F).

Finally, we decided to address whether schistosomes could modulate MSU-induced arthritis. After 56 days of *S. mansoni* infection, mice were challenged with MSU to induce gout. Interestingly, a significant reduction of neutrophils in the articular knee cavity was observed (Fig. 5G) suggesting that the parasite infection is able to modulate the gout inflammatory response, similarly to what was observed when we used r*SmKI-1*.

***SmKI-1* reduces neutrophil migration in pleural cavity induced by carrageenan**

To confirm that r*SmKI-1* inhibits neutrophil migration, we used the carrageenan-induced pleurisy model that induces an inflammatory response promoted by neutrophil adhesion and migration through the vascular endothelial cells (Byrum et al., 1999). The fluid leakage from the mouse pleural cavities was analyzed by cytopsin and flow cytometry to determine the presence of cells after carrageenan-induced inflammation. First, animals were injected with carrageenan (2mg/mL) and then treated with r*SmKI-1* (10 mg/kg) or vehicle. Then, we evaluated the migrating cells to the pleural cavity between two mouse groups, the carrageenan+r*SmKI-1* treated group and the carrageenan alone group. There was no significant difference in total number of cells infiltrating into the pleural cavity after intrapleural injection of carrageenan in both experimental groups (Fig. 6A). However, we observed that r*SmKI-1* treatment reduced around 45% of neutrophil recruitment to the pleural cavity of mice after carrageenan administration as measured by cytopsin (Fig. 6B). Similar findings were obtained (43% reduction) when we evaluated the percentage of neutrophil population (Ly6G⁺CD11b⁺) by flow cytometry (Fig. 6C). Additionally, we demonstrated that *SmKI-1* treatment after carrageenan intrapleural injection did not interfere with the percentage of carrageenan-induced macrophages (F4/80⁺CD11b⁺) (Fig.

6D) and T lymphocytes (CD3⁺ cells) (Fig. 6E) recruited into the pleural cavity compared to the control vehicle.

***SmKI-1* does not affect lymphocyte and macrophage migration in peritoneal cavity induced by thioglycollate**

To confirm that r*SmKI-1* does not alter a model of neutrophil-independent inflammation, we used the thioglycollate-induced nonspecific cell migration. As demonstrated by Ray and Dittel (Ray and Dittel, 2010), the peritoneal cavity harbors a number of immune cells, especially macrophages and lymphocytes. First, animals were injected with thioglycollate (3mL of 3% solution) and then treated with r*SmKI-1* (10 mg/kg) or vehicle. Then, we evaluated the cells present in the peritoneal cavity by cytopsin between two mouse groups, the thioglycollate+r*SmKI-1* treated animals or the thioglycollate alone administered group. There was no significant difference in total number of cells infiltrating in both experimental groups (S4A Fig.). Similar findings were obtained when we evaluated the lymphocyte (S4B Fig.) and macrophage (S4C Fig.) populations, suggesting that the administration of r*SmKI-1* does not promote a broadly immunosuppressive effect, since it does not affect the migration of lymphocytes and macrophages in both thioglycollate and carrageenan-induced inflammation models.

Discussion

Serine proteases are involved in different physiological aspects such as blood coagulation, apoptosis, signal transduction, wound healing, proteolysis cascade action and inflammatory responses (Neurath, 1986). Particularly, elastase is a serine protease produced by activated neutrophils, and secreted during inflammation as well as in the initiation of blood coagulation (Alam et al., 2012; Nathan, 2006). Furthermore, neutrophil elastase is an important

host defense molecule required for protection against pathogenic bacteria and fungi (Reeves et al., 2002). Regarding schistosomes, a previous study demonstrated that neutrophil elastase is toxic to the larval stage of this parasite (Freudenstein-Dan et al., 2003); however, the mechanisms by which elastase kills a multicellular organism such as the schistosomes are not known. *S. mansoni* infect humans and use proteases to invade host tissues and for nutrition and development. Additionally, adult schistosomes live in the blood vessels of the mammalian hosts and survive in this hostile environment without triggering immune attack by immune cells, such as neutrophils or inducing complement activation (Mebius et al., 2013). Since serine proteases are the most abundant protease family represented in the human genome, we can hypothesize that helminth parasites, such as *S. mansoni*, have evolved to survive in their human hosts by producing parasite-derived protease inhibitors that specifically target human proteases.

Herein, we demonstrated that *SmKI-1* acts as a trypsin and neutrophil elastase inhibitor *in vitro*. Previously, Ranasinghe et al. was the first to describe *SmKI-1* and they reported the potential anti-coagulant and anti-inflammatory properties of this molecule (Ranasinghe et al., 2015a). We then took further and also evaluated the inhibitory activity of its Kunitz domain and C-terminal region of the protein as individual molecules. In this study, we demonstrated that the protease inhibitor function of *SmKI-1* is due to its Kunitz domain, but not the C-terminal region of the molecule. Elastase secreted by cultured neutrophils was also inhibited by *SmKI-1* and its Kunitz domain, demonstrating that this molecule also robustly interferes with the enzyme activity of elastase released by murine neutrophils. Elastase is a key enzyme in the mammalian host immune system, being important in defense against different pathogens. Belaouaj and colleagues (Belaouaj et al., 2000) showed that cleavage of outer membrane protein A by neutrophil elastase resulted in *Escherichia coli* cell death. In this study, we also demonstrated that *SmKI-1* reduces schistosomula killing by elastase. Therefore, the ability of *SmKI-1* to interact with elastase's catalytic site as demonstrated by our docking experiments and to inhibit

enzyme activity could be a potential immune evasion mechanism developed by the parasite through evolution.

Furthermore, we demonstrated that *SmKI-1*, the first Kunitz-type serine protease inhibitor described in *S. mansoni*, has the highest relative expression in the intravascular life stages, larval and adult parasites. Higher *SmKI-1* mRNA expression in adult parasites but not in larval stage was previously reported (Ranasinghe et al., 2015a). We hypothesized here that *SmKI-1* is an important molecule involved in parasite development. To test this hypothesis, *SmKI-1* expression was suppressed using siRNA in *S. mansoni* adult males, females and schistosomula, being the most efficient suppression observed in the larval stage. The *SmKI-1*-suppressed schistosomula presented lower viability compared to control parasites when kept in cultured. Additionally, when *SmKI-1*-suppressed parasites were inoculated to mice 54-62% less helminths were recovered from infected animals. Therefore, *SmKI-1* siRNA suppression demonstrated a robust impact in parasite survival inside the mammalian host. One explanation for this outcome may be the observation that *SmKI-1* is released in the excretory-secretory products of the *S. mansoni* and this molecule is probably involved in providing protection to the parasite *in vivo*. Helminth excretory-secretory products are predominantly comprised of proteases, protease inhibitors, venom allergen homologues, glycolytic enzymes and lectins (Hewitson et al., 2009). These products which act in the host/parasite interface may be important in immune response and immune modulation. *Fasciola hepatica* Kunitz type molecule (Fh-KTM) present in parasite total extract was responsible for suppressing pro-inflammatory cytokine production in LPS-activated dendritic cells (DC) that impaired their ability to induce inflammatory responses (Falcon et al., 2014).

The inhibition of key inflammatory enzymes, such as elastase, in the mammalian host is an important immune modulatory mechanism used by pathogens. In this study, we demonstrated the protease inhibitory activity of *SmKI-1*. Therefore, we hypothesized this protein is able to modulate inflammation, interfering with neutrophil activity, especially migration. The role of

neutrophils in the pathophysiology of inflammatory diseases is well established, with many lines of evidence supporting a direct correlation between the presence of neutrophils in inflamed tissue and the progression of inflammatory diseases (Faurischou and Borregaard, 2003; Kobayashi and DeLeo, 2009). Therefore, we tested the *SmKI-1* anti-inflammatory potential in three different disease models: APAP-induced liver injury, MSU-induced gout and carrageenan-induced pleural inflammation.

Drug-induced liver injury is one of the major causes of acute liver failure with yet few therapeutic options. In clinical treatment, acetaminophen (APAP) is frequently used as antipyretic and analgesic, being a safe drug when applied in the therapeutic range (<4g/day). However, unsupervised and long-term abuse of APAP has contributed to increased rates of liver injury and acute liver failure worldwide (Jaeschke et al., 2010; Larson, 2007). In mice, liver injury is induced by a single high dose of APAP (Randle et al., 2008). Here, we induced liver damage in order to evaluate the possible effects of *SmKI-1* in neutrophil recruitment and activation since these cells play a major role in acute injury development. As expected, the administration of APAP caused a striking congestion of mouse liver cells, associated with necrosis and accumulation of erythrocytes. We used confocal intravital microscopy to follow directional migration of neutrophils to liver due to APAP overdose. Treatment with *SmKI-1* rescued APAP-mediated liver damage, with a significant reduction in both neutrophil recruitment and elastase activity.

Gout arthritis is an inflammatory disease caused by the deposition of MSU crystal in the articular junctions(Choi et al., 2005). MSU crystal promotes the production of chemokines and cytokines and expression of cell adhesion molecules, which induce the migration of inflammatory cells into sites of tissue injury (Jaramillo et al., 2004). *SmKI-1* was used to treat mice after MSU-induced gout. This protein reduced neutrophil accumulation, hypernociception, and overall pathological score. The diminished joint damage was associated with decreased local production of the pro-inflammatory cytokine, IL-1 β , one of the cytokines responsible for the

initiation and perpetuation of the inflammatory response which promotes neutrophil influx to the sites of tissue injury (Tincani et al., 2007). These findings demonstrate, for the first time, the potent anti-inflammatory activity of *SmKI-1* in experimental gout arthritis. Other studies have proved that some helminthic infections strongly influence the immune system and enable protective pathways in immune disorders, like arthritic disease (Eissa et al., 2016; Matisz et al., 2011). Parasite infection has shown to decrease the severity of collagen induced arthritis in mice through local and systemic suppression of pro-inflammatory mediators, suggesting their substantial benefit as therapeutic agents against rheumatoid arthritis (Eissa et al., 2016). Fortunately, the study of parasite recombinant proteins demonstrate that regulation of immune response is not strictly dependent on parasite infection, but is associated with pathogen-derived antigens (Oliveira et al., 2016b). The *rSmKI-1* is one example of a *S. mansoni* molecule that possesses a robust anti-inflammatory activity against gout arthritis.

Lastly, we used carrageenan, a strong inflammatory agent that induces the production of leukotriene (LT) B₄ at the site of inflammation (Mathieu et al., 1990). Using the carrageenan-induced pleural inflammation model, we demonstrated the ability of *SmKI-1* to inhibit early events that trigger neutrophil recruitment in the pleural cavities of mice in response to inflammatory stimuli. Although our results indicate the effect of *SmKI-1* on neutrophil recruitment and function, we still need to fully understand the mechanisms involved in its anti-inflammatory activities. Evidences point out to impairment of neutrophil recruitment due to elastase inhibition, but more studies are required to confirm this hypothesis. Our findings have a strong impact on drug development that inhibit neutrophil migration and it may represent an important new therapeutic strategy for treatment of inflammatory diseases (Ferreira et al., 2013).

In summary, the data presented here demonstrated that *SmKI-1* is a key protein in *S. mansoni* survival and maintenance inside their mammalian hosts. This protein possesses the ability to inhibit neutrophil elastase activity and also the migration of these cells in different models of inflammatory diseases, leading to an interest in its potential as a drug for disease

treatment. Additionally, we demonstrated that *SmKI-1* function is related to the Kunitz domain present on its protein structure. Based on our understanding of the pathogenesis of inflammation, multiple pharmacological interventions have been developed in the past several decades. Although effective, none of the anti-inflammatory agents have had a lasting effect on disease control. Therefore, the results obtained here encourage us to support further studies using *rSmKI-1* as a promising therapeutic molecule against inflammatory diseases.

Material and Methods

Ethics statement

All experiments involving animals were conducted in accordance with the Brazilian Federal Law number 11.794, which regulates the scientific use of animals in Brazil, the Institutional Animal Care and Use Committees (IACUC) guidelines and the Animal Welfare Act and Regulations guidelines established by the American Veterinary Medical Association Panel on Euthanasia. Animals were fed, housed and handled in strict agreement with these recommendations. All protocols were approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation (CETEA) at Universidade Federal de Minas Gerais UFMG under permit 179/2010.

Mice and parasites

Female C57BL/6 and TLR4 KO mice aged 6–8 weeks were purchased from the Federal University of Minas Gerais (UFMG) animal facility. *S. mansoni* (LE strain) cercariae were routinely maintained in *Biomphalaria glabrata* snails at Centro de Pesquisa René Rachou Fiocruz (CPqRR) and prepared by exposing infected snails to light for 2 h to induce shedding of parasites. Cercariae numbers and viability were determined prior to infection using a light microscope prior to infection. Schistosomula were obtained after separation from the tails by

centrifugation using a 57% Percoll (Pharmacia, Uppsala, Sweden) solution. Parasite was cultured for at least one day *in vitro* as previously described (Da'dara and Skelly, 2015). Adult worms were obtained by perfusion of the portal hepatic vein from Swiss mice, 6–7 weeks after infection with approximately 125 cercariae (Da'dara and Skelly, 2015). Perfusion was performed using RPMI-1640 media or PBS containing 1.5% sodium citrate. Parasite eggs were recovered from the livers of these mice as previously described (Da'dara and Skelly, 2015).

Chemicals

All reagents were purchased from Sigma-Aldrich, CO (St. Louis, MO, USA) unless otherwise specified.

Accession number

Smp_147730 (*SmKI-1*) CCD77156.1.

In silico analysis and modeling of *SmKI-1* Kunitz Inhibitor from *Schistosoma mansoni*

Comparison of the *SmKI-1* deduced protein sequence with other Protein database sequences were performed using the BLASTp software (Altschul and Lipman, 1990) from the NCBI databank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The Conserved Domain Database search (CDD-Search) from the NCBI site was used to compare motif identity and similarity with known conserved domains (Marchler-Bauer et al., 2005). Sequence alignments were obtained by using CLUSTAL OMEGA software (Thompson et al., 2002), edited using BIOEDIT and refined using BoxShade. The physical-chemical properties of the deduced protein were determined by the Protein Machine software available at the ExPasy website (<http://us.expasy.org/tools/>). The disorder probability prediction was performed using the COILD algorithms, which calculates the

probability that the sequence will adopt a coiled-coil conformation. Due to the nonexistence of experimental 3D-structures of *SmKI-1* protein, a hybrid approach to protein 3D-structure predictions was chosen to generate an accurate, atomistic structure of the *SmKI-1* Kunitz domain. Three major steps were involved in the modeling. First, all the representative Kunitz inhibitors sequences were submitted to ITASSER web-server (Zhang, 2008), including specification on a homologous *Tissue Factor Pathway Inhibitor* (TFPI) (PDB accession code: 4BQD) as an additional template. The model of the highest C-score was then chosen to proceed. Second, the disulfide bridges were minimized using MODELLER v9.17, which is a computer program used for comparative homology modeling of protein structures. MODELLER v9.17 was downloaded from the Andrej Sali laboratory website (<https://salilab.org/modeller/>). The basic steps involved in homology modeling using MODELLER are the initial template selection using PSI-BLAST, final template selection and alignment of the query sequence with the template structure, building the model based on the final template selected, followed by model evaluation, MD simulation procedures and validation by using Ramachandran Plot.

Molecular docking of *SmKI-1* Kunitz domain to elastase

Prior to docking, the *SmKI-1* Kunitz domain was minimized with the software MacroModel (Schrodinger version 2015-3), employing the OPLS_2005 force field, an implicit water solvent model and the Polak-Ribiere Conjugate Gradient (PRCG) minimization method with a maximum of 2500 iterations and convergence based on the energy gradient and a 0.05 kJ/Å-mol threshold. During minimization, disulfide bonds between the three Cys pairs (Cys⁷-Cys⁵⁷, Cys¹⁶-Cys⁴⁰, Cys³²-Cys⁵³) were kept as constraints. Molecular docking was performed with the webserver ClusPro 2.0, developed for protein-protein docking (Kozakov et al., 2017). The *SmKI-1* Kunitz domain model was docked to the human neutrophil elastase structure extracted from a crystallographic complex with an inhibitor from *Staphylococcus aureus* (PDB accession code 4NZL) (Stapels et al., 2014). The best scoring model, based on the balanced scoring function,

was analyzed. Analysis of the predicted protein-protein interface was performed with the “Protein interfaces, surfaces and assemblies” service PISA at the European Bioinformatics Institute (http://www.ebi.ac.uk/pdbe/prot_int/pistart.html) to calculate interactions and interface properties (Krissinel and Henrick, 2007). The complex was also manually analyzed with the software Pymol.

Construction, expression and purification of *SmKI-1*, Kunitz and C-terminal domains

The plasmid pJ414 containing the sequence for r*SmKI-1* (pJ414::*SmKI*) was manufactured by DNA 2.0, Inc. USA (<https://www.dna20.com>) using DNA2.0 optimization algorithms for expression in *Escherichia coli*. Furthermore, the *SmKI-1* Kunitz domain (KI domain) and *SmKI-1* C-terminal tail (C-terminal) were cloned into a pET28a vector, into the *NdeI* and *XhoI* restriction sites. The polymerase chain reaction (PCR) generated fragments corresponding to KI domain (N-terminal Arg²²-Thr⁸²) or C-terminal (C-terminal Gli⁷⁹-Glu¹⁴⁶). These plasmids were transformed into *E. coli* RosettaTM (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) competent cells. Cells transformed with expression plasmids of *SmKI-1*, KI domain and C-terminal were screened on LB agar plates containing ampicillin (50 µg/ml) and chloramphenicol (34 µg/ml). DNA sequencing was performed to confirm the presence and the correct orientation of the open reading frames. The clones were cultured in selective medium on a rotary shaker at 200 rpm at 37 °C to an optical density at 600 nm of approximately 0.5–0.8 and gene expression was induced by using 1mM isopropylthiogalactoside (IPTG). Five hour after induction, the bacterial cells were harvested by centrifugation at 4000 g for 20 min. The pellet was resuspended in 50 mL of 10mM Na₂HPO₄, 10mM NaH₂PO₄, 500mM NaCl and 10mM imidazole. Subsequently, the cells were submitted to three cycles of sonication lasting 30 seconds each and centrifuged at 5400 g for 20 minutes. The r*SmKI-1*, KI and C-terminal domains were recovered as inclusion bodies and solubilized in 50 mL of 8 M urea, 10 mMNa₂HPO₄, 10 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl and 40

mM imidazole. The KI domain was recovered from the inclusion bodies solubilized in 6 M GuHCl and centrifuged at 10,000 g for 1 hour. Recovered proteins were loaded into Ni charged Sepharose-resin (Hitrap chelating 5 mL) at room temperature. The column was washed sequentially several times with Tris-Buffer without GuHCl, and finally the refolded protein was eluted with Tris-buffer containing 400 mM imidazole. The protein was further dialysed against buffer without imidazole and purified to homogeneity by reverse phase chromatography using C₈ column PRP-3 (Hamilton 7.0 mm x 305 mm) with a linear gradient of acetonitrile (5%-95%) containing 0.1% TFA. The resulting samples were freeze-dried under vacuum. The proteins were purified by affinity chromatography on a Ni-Sepharose column (Hitrap chelating 5 mL) under denaturing conditions using an AKTAPrimePlus chromatography system (GE Healthcare, São Paulo, Brazil) according to the manufacturer's protocol. Fractions containing these three proteins were determined through SDS/PAGE-20% and they were dialyzed against PBS pH 7.0 for 16 hours at 4°C. The recombinant proteins were quantified using the BCA kit (Pierce, Waltham, USA) and used for all experiments.

SDS-PAGE and immunoblotting

Purified rSmKI-1, KI and C-terminal domains were analyzed on 20% polyacrilamide SDS-PAGE gel prepared and run as previously described (Laemmli, 1970). Proteins were then transferred to a Hybond-P PVDF membrane (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA) (Towbin et al., 1979). The membrane was blocked with TBS-T (tris-buffered saline pH 7.5, 0.05% Tween 20) containing 5% dry milk for 16 h at 4 °C. The membrane was then incubated with a mouse monoclonal antibody to the 6XHis-tag (GE Healthcare) (1:2,000) for 1 h at room temperature. After three washes with TBS-T, the membrane was incubated with goat anti-mouse IgG conjugated to horseradish peroxidase (HRP) (1:2,000) for 1 h at room temperature. After three washes, the membranes were developed using Immobilon™ Western HRP subtract (Millipore

Corporation, Billerica, MA, USA) according to the manufacturer's instructions and visualized in Amersham Imager 600 (GE Healthcare).

Mass spectrometry analysis and Secondary Structure Determination

The refolded protein (KI domain) purity was analyzed by MALDI-TOF/MS (AutoFlex III, Bruker Daltonics, Germany) using close external calibration under linear mode. Approximately 50 nM of soluble protein was dissolved in Milli-Q H₂O, mixed to a saturated solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, spotted on a MALDI sample plate, and dried at room temperature. All resulting data was analyzed manually using both mMass and Flex Analysis 3.0 (Bruker Daltonics) softwares. Also, the secondary structure of the refolded protein was investigated by circular dichroism using a Jasco-J815 spectropolarimeter (Jasco International Co., Japan). Spectrum was acquired at room temperature from 194 nm to 260 nm as an average of 5 readings using a 0.1 cm path length cell, data pitch 0.2 nm and a response time of 0.5 s. Data scans of buffer solutions were acquired and subtracted from protein data. The spectra was converted to mean residue ellipticity and readings at $[\Theta]_{222}$ nm, $[\Theta]_{215}$ nm and $[\Theta]_{208}$ were used to estimate protein conformation.

Cytotoxicity analysis of recombinant *SmKI-1*

To evaluate the cytotoxicity of the recombinant *SmKI-1*, 5×10^4 BHK-21 cells were seeded in a 96 well plate in RPMI medium supplemented with 5% fetal bovine serum, 150 U penicillin G sodium and 150 μ g streptomycin sulfate and incubated for 16 to 24 h. We removed the medium from the BHK-21 cells and added 100 μ L of RPMI medium supplemented with 2% fetal bovine serum, 150 U penicillin G sodium, 150 μ g streptomycin sulfate and r*SmKI-1* at the final concentration of 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 or 15.62 μ g/mL. BHK-21 cells were incubated only with medium to calculate the percentage of total viable cells. An aqueous solution of CTAB

(100 mM) was used as a positive control of cytotoxicity. The cells were incubated at 37°C with 5% CO₂. After 24 h of incubation, we evaluated the cell viability using the CellTiter 96® AQueous One Solution Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega), according to the manufacturer's instructions.

***In vitro* Serine Protease Inhibition Assays**

The kinetics of the inhibition assay were monitored by analyzing variations in optical density of the samples in microplate. For the inhibition reactions of trypsin the enzyme:inhibitor ratio of 1:1 and neutrophil elastase 1:3 were determined. Then, we used the optimal concentration of bovine trypsin (100 nM) (Sigma, St. Louis, MO, USA) that was incubated in 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 20 mM CaCl₂ and 0.05% Triton X-100 with 100nM of rSmKI-1, KI and C-terminal domains at 37°C for two hours. The residual enzyme activity was determined at 405 nm every 30 minutes using the substrate 0.5 mM BApNA (Sigma). Another inhibition test was performed using 100 nM human neutrophil elastase (Innovative Research, Inc., Novi, MI, USA) and 300nM rSmKI-1, at 37°C for two hours in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), and the residual enzyme activity was determined at 405 nm every 30 minutes using 0.5 mM of the substrate S4760 (Sigma). As a negative inhibition control was used 300 nM of Bovine serum albumin (BSA) in all assays.

Neutrophil isolation

Mice were killed by cervical dislocation, the femurs and tibiae from both hind limbs were removed and freed of soft tissue attachments, and the extreme distal tip of each bone extremity was cut off. PBS was forced through the bone by using a 1-ml syringe with a 27-gauge needle. After dispersing cell clumps and removing the debris, the bone marrow cells were centrifuged at 200g for 10 min at 4°C, and the pellet was resuspended in PBS. Bone marrow suspended in 2 ml

of PBS were laid on top of a three-layer Percoll gradient prepared in 15-ml polystyrene tubing by layering 2 ml each of 1.095, 1.085, and 1.070 g/mL Percoll solutions. After centrifugation at 500g for 30 min at 4°C in a swinging bucket rotor, the lowest band (1.085/1.095 g/ml interface) was collected as the neutrophil fraction. Remaining erythrocytes were lysed by hypotonic shock. The resultant pellet was suspended in PBS containing $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ and 2.5% BSA. In all experiments neutrophil samples were 97% viable as determined by Trypan blue staining.

Neutrophil elastase inhibition by *SmKI-1* and Kunitz domain

Elastase release and inhibition assay of freshly isolated neutrophils (1×10^6 cells) were stimulated with fMLP (100 nM) for a further 10 minutes before addition of the 40 μM of *SmKI-1*, KI and C-terminal domains at 37°C for one hour. After that, it was added colorimetric substrate S4760 (100 ng/ml, Sigma). Cleavage of substrate was immediately monitored colorimetrically at 405 nm every hour for 16 hours. Each reaction (200 μl) was performed in triplicate in a 96-well plate. Initial reaction rates are reported as the change in absorbance per minute.

Treatment of schistosomes with elastase

Freshly prepared schistosomulas were washed 3 times and resuspended in RPMI medium. Aliquots containing 150 schistosomula were dispensed into flat-bottom, 96-well microtiter plates and 0.15mg/mL of r*SmKI-1* was added for one hour at 37°C and 7.5% CO_2 . Then, 0.05mg/mL of human neutrophil elastase (Innovative Research, Inc., Novi, MI, USA) was added and the volume was brought to 200 μl with RPMI. The microtiter plates were covered and placed in a humidified incubator at 37 °C and 7.5% CO_2 . After 18 hrs, the plates were inspected under an inverted microscope (Olympus Co., Hamburg, Germany). In each well, the percentage of dead schistosomes was scored. Dead schistosomes appear as an opaque and granular appearance, and lacked flame cell activity. This measurement correlated well with a dye-exclusion counting(Gold, 1997).

Preparation and delivery of *SmKI-1*-suppressed parasites

Two gene-specific small inhibitory RNAs (siRNAs) were commercially synthesized (Integrated DNA Technologies, Inc.) and used to knockdown *SmKI-1* gene expression. These are si*SmKI-1I* and si*SmKI-1II*. The DNA sequence of *SmKI-1I* is 5'-CTACGACAGTGTAATCAAACCTTGT-3', spanning coding DNA positions 135–160 and the DNA sequence for *SmKI-1II* is 5'-GGATGTCTTGGAAATGGAAACAAC-3', spanning coding DNA positions 178–203, both designed with the help of the online IDT RNAi Design Tool (<https://www.idtdna.com/Scitools/Applications/RNAi/RNAi.aspx>). The siRNAs were delivered to 1-day or 7-day old schistosomula or adult parasites by electroporation as previously described (Krautz-Peterson et al., 2010). The control, irrelevant siRNA is: 59-CTTCCTCTCTTCTCTCCCTTGTGA-39. To monitor gene expression at various times after siRNA administration, qRT-PCR was performed using custom TaqMan Assays. Schistosomula cultures were monitored along six weeks to compare control and *SmKI-1* siRNA-electroporated parasite size, images were taken using an inverted microscope (EVOS® FL Cell Imaging, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and parasite viability in culture was measured by adding 1 mg/ml Hoechst 33258 to the cultures at room temperature. After 10 min dead parasites (Hoechst positive) were counted microscopically, using a 460 nm reading filter.

For *in vivo* analysis, two groups of female C57BL/6 mice (10 animals per group) were included in this study. Each group received one dose of 50 μ L containing 500 schistosomula in a quadriceps muscle. One group received 500 schistosomula siRNA control, and another group received 500 schistosomula *SmKI-1* siRNA-electroporated. Forty five days after schistosomula injection, adult worms were perfused from the portal veins, as described previously (Figueiredo et al., 2015a). Two independent experiments were performed to determine survival rates of *S. mansoni*.

Neutrophil depletion

Neutrophils were depleted by intraperitoneal injection of 50µg of anti-mouse Ly6G (clone 1A8, BioXcell, West Lebanon, NH, USA) 24 hours before infection with 250 schistosomula siRNA control or with 250 schistosomula *SmKI-1* siRNA-electroporated. Forty five days after schistosomula injection, adult worms were perfused from the portal veins, as described above. The neutrophils depletion was maintained with applications of anti-mouse Ly6G antibodies at intervals of 3 days each dose for 12 days. In these experiments, 50 µg of an isotype control antibody (clone LTF-2, BioXcell) was administered as control. Neutrophil depletion was confirmed by flow cytometry analysis of neutrophils or dendritic cells as control present in the spleen of uninfected animals. The populations of neutrophils or dendritic cells were analyzed by staining 1×10^6 cells for 30 min on 4°C with fluorescent antibodies against Ly6G (PE, clone 1A8, BD Biosciences), CD11b (APC-Cy7, clone M1/70, BD Biosciences), CD11c (FITC, clone HL3, BD Biosciences). Stained cells were acquired in Attune Flow Cytometer (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) and analyzed using FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, USA).

Schistosomes incubation with neutrophils

SmKI-1 siRNA or control siRNA were delivered to 1-day old schistosomula and resuspended in RPMI medium. Aliquots containing 200 schistosomula were dispensed into flat-bottom, 96-well microtiter plates. In the following day, 10^5 neutrophils isolated from C57BL/6 mice were added to each well and incubated with schistosomula for 24 hours at 37°C and 7.5% CO₂. As a viability control, some wells did not receive neutrophils. After incubation time, plates were inspected under an inverted microscope (Olympus Co., Hamburg, Germany). In each well, the percentage of dead schistosomes was scored. Dead schistosomes appear as an opaque and granular appearance, and lacked flame cell activity. This measurement correlated well with a dye-exclusion counting (Gold, 1997).

Experimental Gout arthritis Model

Joint inflammation was induced by the intraarticular injection of monosodium urate (MSU) (100 µg per cavity in 10 µL of sterile saline) by inserting a 27.5 G needle through the suprapatellar ligament into the left knee joint cavity. The contralateral knee was injected with the same volume of the vehicle (saline) and used as control. Then one group received intravenously injection of rSmKI-1 (10mg/kg) immediately after MSU administration.

Nociception assessment

In a quiet room, the mice were placed in acrylic cages (12x10x17 cm high) with a wire grid floor, 15–30 min before the test, for environmental adaptation. In these experiments, an electronic pressure meter was used. It consists of a hand-held force transducer fitted with a polypropylene tip (INSIGHT Instruments, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil) (Cunha et al., 2004). A non-standard large tip (4.15 mm²) was adapted to the probe (Guerrero et al., 2006). An increasing perpendicular force was applied to the central area of the plantar surface of the hind paw to induce the flexion of the knee joint, followed by paw withdrawal. A tilted mirror below the grid provided a clear view of the animal's hind paw. The end point was characterized by the removal of the paw from the polypropylene tip. After the flexion-elicited withdrawal threshold, the intensity of the pressure was automatically recorded. The value for the response was obtained by averaging two measurements in one hind paw.

Total and differential synovial cavity cell counts

After induction of joint inflammation, mice were euthanized. Knee synovial cavities were washed twice with 5µL of PBS. Total leukocyte counts were counted using a Neubauer chamber. Differential counts of leucocytes were performed using May-Grunwald-Giemsa-stained cytopspin smears (Cytospin 3, ShandonInc.) and the values are reported as the number of cells per cavity.

Elastase, Myeloperoxidase activity and measurement of IL-1 β

Supernatant of processed periarticular tissues were used to determinate neutrophil accumulation in periarticular tissues by testing elastase and myeloperoxidase (MPO) activities. Elastase activity was measured using 0.5 mM of the substrate S4760 (Sigma). Leukocyte MPO activity was assessed by measuring the H₂O₂-dependent oxidation of TMB. Aliquots of 30 μ l were incubated with 120 μ l of TMB substrates in 96 well plates. Plates were incubated for 5 min at room temperature and the reaction stopped with H₂SO₄ 4%. The optical densities were read at 450 nm in a microwell reader system (mQuant, Bio-Rad, USA). IL-1 β was quantified using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D Systems). All samples were performed in triplicates.

Infection with *S. mansoni* and experimental gout arthritis induction

Briefly, C57BL/6 mice were infected with 50 cercariae from *S. mansoni* strain LE by percutaneous exposure of abdominal skin for 1 hour (Pacifico et al., 2009). Experimental gout arthritis was induced 56 days after schistosome infection as described in section “Experimental Gout arthritis Model” and cells were counted as described in section “Total and differential synovial cavity cell counts”.

Drug-induced liver injury Model

Acetaminophen (APAP) (Sigma) was dissolved in warm saline before gavage. Mice were fasted for 15 hours before APAP administration (600 mg/kg) or sterile PBS as vehicle. The animals received intravenously administration rSmKI-1 at a dose of 10 mg/kg 0.5 h before APAP. Mice were then submitted to euthanasia 24 h after APAP injection. Serum alanine aminotransferase (ALT) activity was performed using a kinetic test (Bioclin). Liver fragments were collected for

histology (hematoxylin and eosin [H&E]), also for neutrophil elastase and myeloperoxidase activity as described in the preceding section.

***In Vivo* Mice Imaging**

For noninvasive imaging, mice were anesthetized with ketamin and xilasin and injected intravenously with 100 μ L of NucRed Dead 647 (Molecular Probes) 5 minutes before imaging at MS FXPRO (Bruker). Liver confocal intravital microscopy was performed as previously described (McDonald et al., 2010). All fluorophores were injected intravenously 10 minutes before imaging: Sytox Green (100 μ L/mouse, 50 μ M, Invitrogen) and PE-conjugated anti-GR1 (4 μ g/mouse; 40 μ g/mL, eBioscience). Neutrophil counts were performed in the images captured in the confocal microscope.

Inhibition of neutrophil migration into the pleural cavity by *SmKI-1*

Carrageenan (2mg/mL), or vehicle (PBS) was injected intrapleurally in a volume of 0.1 ml. After that, mice that received carrageenan were divided into two groups, one group received intravenously injection of r*SmKI-1* (10 mg/kg) was termed carrageenan+*SmKI-1* group and another that received vehicle only was termed carrageenan group. Mice were sacrificed in a CO₂ chamber 4 h after the injection. The cells present in the cavity were harvested by injecting 2 mL of PBS and total cell counts were performed in a Neubauer chamber using Turk's stain. Differential cell counts were performed on cytopsin preparations, which were stained with May-Grunwald and Giemsa to identify cell types according to standard morphologic criteria. The results are presented as the number of cells per milliliter.

Flow cytometry analysis of leukocyte populations

Four hours after carrageenan, or vehicle (PBS) injection, the pleural cells of carrageenan+rSmKI-1, carrageenan and control groups were obtained by washing the cavity with PBS. The populations of neutrophils (Ly6G⁺CD11b⁺) macrophages (F4/80⁺CD11b⁺), and T lymphocytes (CD3⁺ cells) were analyzed by staining 2×10^5 cells for 30 min on ice with fluorescent mAbs against F4/80 (PE, clone A3-1, BioLegend), Ly6G (APC, clone 1A8, BD Biosciences), CD11b (BB515, clone M1/70, BD Biosciences), and CD3 (PE CY5, clone 145-2C11, BD Biosciences). Stained cells were acquired in a BD FACSCanto II (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR). The cells were first selected based on size and granularity and CD11b⁺ to separate lymphocyte and macrophage/neutrophil populations. From the CD11b⁺ gate containing the macrophage/neutrophil population, F4/80⁺ cells were selected for macrophages and Ly6G⁺ for neutrophils.

Thioglycollate Induced Peritonitis

In order to test a neutrophil-independent inflammation model, C57BL/6 mice received an injection of 3 mL of 3% thioglycollate broth, a non-specific pro-inflammatory stimulus, into their peritoneal cavities. To evaluate the effect of rSmKI-1 on thioglycollate-induced leukocytes influx into the peritoneal cavity, 48 hours after thioglycollate injection, mice were divided in two groups (n = 8) and treated with either rSmKI-1 (10 mg/kg), or vehicle (5 mL/kg of saline). At 72 hours following thioglycollate administration, the animals were sacrificed, the peritoneal leukocyte cells were harvested by lavage of peritoneal cavities with PBS (10 mL) and total cell counts were determined using a Neubauer chamber. Differential counts of leukocytes were performed as described in section “Total and differential synovial cavity cell counts”.

Statistical analysis

The results from the experimental groups were compared by Student's *t*-test using the software package GraphPad Prism (La Jolla, CA). Bonferroni adjustments were included for multiple comparisons. The *p*-values obtained by this method were considered significant if they were *p* < 0.05, or otherwise stated.

Acknowledgements

We thank Dr. Cristina T. Fonseca from FIOCRUZ- René Rachou for providing cercariae for the schistosome experiments and Dr. Geovanni Cassali for performing the pathology experiment in the gout arthritis model.

References

- Abath, F.G., Morais, C.N., Montenegro, C.E., Wynn, T.A., and Montenegro, S.M. (2006). Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? *Trends in parasitology* 22, 85-91.
- Agarwala, K.L., Kawabata, S., Miura, Y., Kuroki, Y., and Iwanaga, S. (1996). Limulus intracellular coagulation inhibitor type 3. Purification, characterization, cDNA cloning, and tissue localization. *The Journal of biological chemistry* 271, 23768-23774.
- Ahmad, G., Torben, W., Zhang, W., Wyatt, M., and Siddiqui, A.A. (2009). Sm-p80-based DNA vaccine formulation induces potent protective immunity against *Schistosoma mansoni*. *Parasite immunology* 31, 156-161.
- Al-Sherbiny, M., Osman, A., Barakat, R., El Morshedy, H., Bergquist, R., and Olds, R. (2003). In vitro cellular and humoral responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens. *Acta tropica* 88, 117-130.
- Alam, S.R., Newby, D.E., and Henriksen, P.A. (2012). Role of the endogenous elastase inhibitor, elafin, in cardiovascular injury: from epithelium to endothelium. *Biochemical pharmacology* 83, 695-704.
- Alan Wilson, R., van Dam, G.J., Kariuki, T.M., Farah, I.O., Deelder, A.M., and Coulson, P.S. (2006). The detection limits for estimates of infection intensity in schistosomiasis mansoni established by a study in non-human primates. *International journal for parasitology* 36, 1241-1244.
- Allen, J.E., and Maizels, R.M. (2011). Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nature reviews Immunology* 11, 375-388.
- Altschul, S.F., and Lipman, D.J. (1990). Protein database searches for multiple alignments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 5509-5513.
- Amaral, F.A., Costa, V.V., Tavares, L.D., Sachs, D., Coelho, F.M., Fagundes, C.T., Soriani, F.M., Silveira, T.N., Cunha, L.D., Zamboni, D.S., *et al.* (2012). NLRP3 inflammasome-mediated neutrophil recruitment and hypernociception depend on leukotriene B(4) in a murine model of gout. *Arthritis Rheum* 64, 474-484.
- Amaral, R.S., Tauil, P.L., Lima, D.D., and Engels, D. (2006). An analysis of the impact of the Schistosomiasis Control Programme in Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 101 Suppl 1, 79-85.

- Andreotti, R., Cunha, R.C., Soares, M.A., Guerrero, F.D., Leite, F.P., and de Leon, A.A. (2012). Protective immunity against tick infestation in cattle vaccinated with recombinant trypsin inhibitor of *Rhipicephalus microplus*. *Vaccine* 30, 6678-6685.
- Araujo, J.M., de Melo, T.T., de Sena, I.C., Alves, C.C., Araujo, N., Duraes Fdo, V., Oliveira, S.C., and Fonseca, C.T. (2012). *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument (Smteg) immunization in absence of adjuvant induce IL-10 production by CD4+ cells and failed to protect mice against challenge infection. *Acta tropica* 124, 140-146.
- Asher, M.I., Montefort, S., Bjorksten, B., Lai, C.K., Strachan, D.P., Weiland, S.K., Williams, H., and Group, I.P.T.S. (2006). Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet* 368, 733-743.
- Auriault, C., Wolowczuk, I., Gras-Masse, H., Marguerite, M., Boulanger, D., Capron, A., and Tartar, A. (1991). Epitopic characterization and vaccinal potential of peptides derived from a major antigen of *Schistosoma mansoni* (Sm28 GST). *Peptide research* 4, 6-11.
- Bafica, A.M., Cardoso, L.S., Oliveira, S.C., Loukas, A., Goes, A., Oliveira, R.R., Carvalho, E.M., and Araujo, M.I. (2012). Changes in T-Cell and Monocyte Phenotypes In Vitro by *Schistosoma mansoni* Antigens in Cutaneous Leishmaniasis Patients. *J Parasitol Res* 2012, 520308.
- Bafica, A.M., Cardoso, L.S., Oliveira, S.C., Loukas, A., Varela, G.T., Oliveira, R.R., Bacellar, O., Carvalho, E.M., and Araujo, M.I. (2011). *Schistosoma mansoni* antigens alter the cytokine response in vitro during cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106, 856-863.
- Barbosa, C.S., Favre, T.C., Wanderley, T.N., Callou, A.C., and Pieri, O.S. (2006). Assessment of schistosomiasis, through school surveys, in the Forest Zone of Pernambuco, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 101 Suppl 1, 55-62.
- Basch, P.F. (1981). Cultivation of *Schistosoma mansoni* in vitro. I. Establishment of cultures from cercariae and development until pairing. *The Journal of parasitology* 67, 179-185.
- Belaouaj, A., Kim, K.S., and Shapiro, S.D. (2000). Degradation of outer membrane protein A in *Escherichia coli* killing by neutrophil elastase. *Science* 289, 1185-1188.
- Bergquist, N.R. (1995). Schistosomiasis vaccine development: approaches and prospects. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 90, 221-227.
- Bergquist, N.R. (1998). Schistosomiasis vaccine development: progress and prospects. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 93 Suppl 1, 95-101.
- Bergquist, N.R. (2002). Schistosomiasis: from risk assessment to control. *Trends in parasitology* 18, 309-314.
- Bergquist, N.R., and Colley, D.G. (1998). Schistosomiasis vaccine: research to development. *Parasitology today* 14, 99-104.
- Berriman, M., Haas, B.J., LoVerde, P.T., Wilson, R.A., Dillon, G.P., Cerqueira, G.C., Mashiyama, S.T., Al-Lazikani, B., Andrade, L.F., Ashton, P.D., *et al.* (2009). The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature* 460, 352-358.
- Blanton, R.E., Licate, L.S., and Aman, R.A. (1994). Characterization of a native and recombinant *Schistosoma haematobium* serine protease inhibitor gene product. *Molecular and biochemical parasitology* 63, 1-11.
- Bogitsh, B.J., and Carter, O.S. (1977). *Schistosoma mansoni*: ultrastructural studies on the esophageal secretory granules. *The Journal of parasitology* 63, 681-686.
- Boros, D.L. (1989). Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection. *Clinical microbiology reviews* 2, 250-269.
- Boros, D.L., and Lukacs, N.W. (1992). The role of egg antigens, cytokines in granuloma formation in murine schistosomiasis mansoni. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 87 Suppl 4, 75-79.
- Boros, D.L., and Whitfield, J.R. (1999). Enhanced Th1 and dampened Th2 responses synergize to inhibit acute granulomatous and fibrotic responses in murine schistosomiasis mansoni. *Infection and immunity* 67, 1187-1193.

- Bottieau, E., Clerinx, J., de Vega, M.R., Van den Enden, E., Colebunders, R., Van Esbroeck, M., Vervoort, T., Van Gompel, A., and Van den Ende, J. (2006). Imported Katayama fever: clinical and biological features at presentation and during treatment. *The Journal of infection* 52, 339-345.
- Braschi, S., Curwen, R.S., Ashton, P.D., Verjovski-Almeida, S., and Wilson, A. (2006). The tegument surface membranes of the human blood parasite *Schistosoma mansoni*: a proteomic analysis after differential extraction. *Proteomics* 6, 1471-1482.
- BRASIL (2012). PLANO INTEGRADO DE AÇÕES ESTRATÉGICAS DE ELIMINAÇÃO DA HANSENÍASE, FILARIOSE, ESQUISTOSSOMOSE E ONCOCERCOSE COMO PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA, TRACOMA COMO CAUSA DE CEGUEIRA E CONTROLE DAS GEOHELMINTÍASES, M.d.S.S.d.V.e. Saúde, ed. (Minitério da Saúde), pp. 104.
- Brunet, L.R., Finkelman, F.D., Cheever, A.W., Kopf, M.A., and Pearce, E.J. (1997). IL-4 protects against TNF-alpha-mediated cachexia and death during acute schistosomiasis. *Journal of immunology* 159, 777-785.
- Bruun, B., and Aagaard-Hansen, J. (2008). The social context of schistosomiasis and its control: an introduction and annotated bibliography. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data 227.
- Burke, M.L., Jones, M.K., Gobert, G.N., Li, Y.S., Ellis, M.K., and McManus, D.P. (2009). Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite immunology* 31, 163-176.
- Byrum, R.S., Goulet, J.L., Snouwaert, J.N., Griffiths, R.J., and Koller, B.H. (1999). Determination of the contribution of cysteinyl leukotrienes and leukotriene B4 in acute inflammatory responses using 5-lipoxygenase- and leukotriene A4 hydrolase-deficient mice. *Journal of immunology* 163, 6810-6819.
- Cai, P., Bu, L., Wang, J., Wang, Z., Zhong, X., and Wang, H. (2008). Molecular characterization of *Schistosoma japonicum* tegument protein tetraspanin-2: sequence variation and possible implications for immune evasion. *Biochemical and biophysical research communications* 372, 197-202.
- Capron, A., Dombrowicz, D., and Capron, M. (1999). Regulation of the immune response in experimental and human schistosomiasis: the limits of an attractive paradigm. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 1, 485-490.
- Capron, M., and Capron, A. (1986). Rats, mice and men - models for immune effector mechanisms against schistosomiasis. *Parasitol Today* 2, 69-75.
- Cardoso, F.C., Macedo, G.C., Gava, E., Kitten, G.T., Mati, V.L., de Melo, A.L., Caliari, M.V., Almeida, G.T., Venancio, T.M., Verjovski-Almeida, S., *et al.* (2008). *Schistosoma mansoni* tegument protein Sm29 is able to induce a Th1-type of immune response and protection against parasite infection. *PLoS neglected tropical diseases* 2, e308.
- Cardoso, L.S., Oliveira, S.C., Goes, A.M., Oliveira, R.R., Pacifico, L.G., Marinho, F.V., Fonseca, C.T., Cardoso, F.C., Carvalho, E.M., and Araujo, M.I. (2010). *Schistosoma mansoni* antigens modulate the allergic response in a murine model of ovalbumin-induced airway inflammation. *Clin Exp Immunol* 160, 266-274.
- Carvalho, O.S. (2008). *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar (Rio de Janeiro).
- Cascao, R., Moura, R.A., Perpetuo, I., Canhao, H., Vieira-Sousa, E., Mourao, A.F., Rodrigues, A.M., Polido-Pereira, J., Queiroz, M.V., Rosario, H.S., *et al.* (2010). Identification of a cytokine network sustaining neutrophil and Th17 activation in untreated early rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 12, R196.
- Cass, C.L., Johnson, J.R., Califf, L.L., Xu, T., Hernandez, H.J., Stadecker, M.J., Yates, J.R., 3rd, and Williams, D.L. (2007). Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* egg secretions. *Molecular and biochemical parasitology* 155, 84-93.
- Caulada-Benedetti, Z., al-Zamel, F., Sher, A., and James, S. (1991). Comparison of Th1- and Th2-associated immune reactivities stimulated by single versus multiple vaccination of mice with irradiated *Schistosoma mansoni* cercariae. *Journal of immunology* 146, 1655-1660.

- Cheever, A.W., and Duvall, R.H. (1974). Single and repeated infections of grivet monkeys with *Schistosoma mansoni*: parasitological and pathological observations over a 31-month period. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 23, 884-894.
- Cheever, A.W., Finkelman, F.D., Caspar, P., Heiny, S., Macedonia, J.G., and Sher, A. (1992). Treatment with anti-IL-2 antibodies reduces hepatic pathology and eosinophilia in *Schistosoma mansoni*-infected mice while selectively inhibiting T cell IL-5 production. *Journal of immunology* 148, 3244-3248.
- Chensue, S.W., Terebuh, P.D., Warmington, K.S., Hershey, S.D., Evanoff, H.L., Kunkel, S.L., and Higashi, G.I. (1992). Role of IL-4 and IFN-gamma in *Schistosoma mansoni* egg-induced hypersensitivity granuloma formation. Orchestration, relative contribution, and relationship to macrophage function. *Journal of immunology* 148, 900-906.
- Chiaromonte, M.G., Donaldson, D.D., Cheever, A.W., and Wynn, T.A. (1999). An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response. *The Journal of clinical investigation* 104, 777-785.
- Chitsulo, L., Engels, D., Montresor, A., and Savioli, L. (2000). The global status of schistosomiasis and its control. *Acta tropica* 77, 41-51.
- Chitsulo, L., Loverde, P., and Engels, D. (2004). Schistosomiasis. *Nature reviews Microbiology* 2, 12-13.
- Choi, H.K., Mount, D.B., and Reginato, A.M. (2005). Pathogenesis of gout. *Ann Intern Med* 143, 499-516.
- Choo, Y.M., Lee, K.S., Yoon, H.J., Qiu, Y., Wan, H., Sohn, M.R., Sohn, H.D., and Jin, B.R. (2012). Antifibrinolytic role of a bee venom serine protease inhibitor that acts as a plasmin inhibitor. *PloS one* 7, e32269.
- Cioli, D. (2000). Praziquantel: is there real resistance and are there alternatives? *Current opinion in infectious diseases* 13, 659-663.
- Cioli, D., Pica-Mattoccia, L., and Archer, S. (1993). Drug resistance in schistosomes. *Parasitology today* 9, 162-166.
- Coelho, F.M., Pinho, V., Amaral, F.A., Sachs, D., Costa, V.V., Rodrigues, D.H., Vieira, A.T., Silva, T.A., Souza, D.G., Bertini, R., *et al.* (2008). The chemokine receptors CXCR1/CXCR2 modulate antigen-induced arthritis by regulating adhesion of neutrophils to the synovial microvasculature. *Arthritis and rheumatism* 58, 2329-2337.
- Collins, J.J., 3rd, King, R.S., Cogswell, A., Williams, D.L., and Newmark, P.A. (2011). An atlas for *Schistosoma mansoni* organs and life-cycle stages using cell type-specific markers and confocal microscopy. *PLoS neglected tropical diseases* 5, e1009.
- Correa-Oliveira, R., Pearce, E.J., Oliveira, G.C., Golgher, D.B., Katz, N., Bahia, L.G., Carvalho, O.S., Gazzinelli, G., and Sher, A. (1989). The human immune response to defined immunogens of *Schistosoma mansoni*: elevated antibody levels to paramyosin in stool-negative individuals from two endemic areas in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 83, 798-804.
- Coulson, P.S. (1997). The radiation-attenuated vaccine against schistosomes in animal models: paradigm for a human vaccine? *Advances in parasitology* 39, 271-336.
- Coura, J.R., and Amaral, R.S. (2004). Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 99, 13-19.
- Cunha, T.M., Barsante, M.M., Guerrero, A.T., Verri, W.A., Jr., Ferreira, S.H., Coelho, F.M., Bertini, R., Di Giacinto, C., Allegretti, M., Cunha, F.Q., *et al.* (2008). Treatment with DF 2162, a non-competitive allosteric inhibitor of CXCR1/2, diminishes neutrophil influx and inflammatory hypernociception in mice. *Br J Pharmacol* 154, 460-470.
- Cunha, T.M., Verri, W.A., Jr., Vivancos, G.G., Moreira, I.F., Reis, S., Parada, C.A., Cunha, F.Q., and Ferreira, S.H. (2004). An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. *Braz J Med Biol Res* 37, 401-407.

- Curwen, R.S., Ashton, P.D., Sundaralingam, S., and Wilson, R.A. (2006). Identification of novel proteases and immunomodulators in the secretions of schistosome cercariae that facilitate host entry. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 5, 835-844.
- Cwiklinski, K., de la Torre-Escudero, E., Trelis, M., Bernal, D., Dufresne, P.J., Brennan, G.P., O'Neill, S., Tort, J., Paterson, S., Marcilla, A., *et al.* (2015). The Extracellular Vesicles of the Helminth Pathogen, *Fasciola hepatica*: Biogenesis Pathways and Cargo Molecules Involved in Parasite Pathogenesis. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 14, 3258-3273.
- Czaja, M.J., Weiner, F.R., Takahashi, S., Giambrone, M.A., van der Meide, P.H., Schellekens, H., Biempica, L., and Zern, M.A. (1989). Gamma-interferon treatment inhibits collagen deposition in murine schistosomiasis. *Hepatology* 10, 795-800.
- Da'dara, A.A., and Skelly, P.J. (2015). Gene suppression in schistosomes using RNAi. *Methods in molecular biology* 1201, 143-164.
- Da'Dara, A.A., Skelly, P.J., Walker, C.M., and Harn, D.A. (2003). A DNA-prime/protein-boost vaccination regimen enhances Th2 immune responses but not protection following *Schistosoma mansoni* infection. *Parasite immunology* 25, 429-437.
- de Jesus, A.R., Silva, A., Santana, L.B., Magalhaes, A., de Jesus, A.A., de Almeida, R.P., Rego, M.A., Burattini, M.N., Pearce, E.J., and Carvalho, E.M. (2002). Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. *The Journal of infectious diseases* 185, 98-105.
- de la Torre-Escudero, E., Bennett, A.P., Clarke, A., Brennan, G.P., and Robinson, M.W. (2016). Extracellular Vesicle Biogenesis in Helminths: More than One Route to the Surface? *Trends in parasitology* 32, 921-929.
- de Melo, A.L., Machado, C.R., and Pereira, L.H. (1993). Interaction between neutrophils and *Schistosoma mansoni* larvae in vivo. A transmission electron-microscopic study. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 35, 29-33.
- Dean, D.A., Wistar, R., and Chen, P. (1975). Immune response of guinea pigs to *Schistosoma mansoni*. I. In vitro effects of antibody and neutrophils, eosinophils and macrophages on schistosomula. *Am J Trop Med Hyg* 24, 74-82.
- DeMarco, R., Mathieson, W., Manuel, S.J., Dillon, G.P., Curwen, R.S., Ashton, P.D., Ivens, A.C., Berriman, M., Verjovski-Almeida, S., and Wilson, R.A. (2010). Protein variation in blood-dwelling schistosome worms generated by differential splicing of micro-exon gene transcripts. *Genome research* 20, 1112-1121.
- DeMarco, R., and Verjovski-Almeida, S. (2009). Schistosomes--proteomics studies for potential novel vaccines and drug targets. *Drug discovery today* 14, 472-478.
- Doenhoff, M.J., Kusel, J.R., Coles, G.C., and Cioli, D. (2002). Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 96, 465-469.
- Economou, M., and Pappas, G. (2008). New global map of Crohn's disease: Genetic, environmental, and socioeconomic correlations. *Inflamm Bowel Dis* 14, 709-720.
- Eissa, M.M., Mostafa, D.K., Ghazy, A.A., El Azzouni, M.Z., Boulos, L.M., and Younis, L.K. (2016). Anti-Arthritic Activity of *Schistosoma mansoni* and *Trichinella spiralis* Derived-Antigens in Adjuvant Arthritis in Rats: Role of FOXP3+ Treg Cells. *PloS one* 11, e0165916.
- Engels, D., Chitsulo, L., Montresor, A., and Savioli, L. (2002). The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. *Acta tropica* 82, 139-146.
- Falcon, C.R., Masih, D., Gatti, G., Sanchez, M.C., Motran, C.C., and Cervi, L. (2014). *Fasciola hepatica* Kunitz type molecule decreases dendritic cell activation and their ability to induce inflammatory responses. *PloS one* 9, e114505.
- Fallon, P.G., Richardson, E.J., Smith, P., and Dunne, D.W. (2000). Elevated type 1, diminished type 2 cytokines and impaired antibody response are associated with hepatotoxicity and mortalities during *Schistosoma mansoni* infection of CD4-depleted mice. *European journal of immunology* 30, 470-480.

- Faurschou, M., and Borregaard, N. (2003). Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 5, 1317-1327.
- Ferreira, R.G., Matsui, T.C., Gomides, L.F., Godin, A.M., Menezes, G.B., de Matos Coelho, M., and Klein, A. (2013). Niacin inhibits carrageenan-induced neutrophil migration in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 386, 533-540.
- Fertin, C., Nicolas, J.F., Gillery, P., Kalis, B., Banchereau, J., and Maquart, F.X. (1991). Interleukin-4 stimulates collagen synthesis by normal and scleroderma fibroblasts in dermal equivalents. *Cellular and molecular biology* 37, 823-829.
- Figueiredo, B.C., Assis, N.R., Morais, S.B., Ricci, N.D., Pinheiro, C.S., Martins, V.P., Bicalho, R.M., Da'dara, A.A., Skelly, P.J., and Oliveira, S.C. (2014). Schistosome syntenin partially protects vaccinated mice against *Schistosoma mansoni* infection. *PLoS neglected tropical diseases* 8, e3107.
- Figueiredo, B.C., Da'dara, A.A., Oliveira, S.C., and Skelly, P.J. (2015a). Schistosomes Enhance Plasminogen Activation: The Role of Tegumental Enolase. *PLoS pathogens* 11, e1005335.
- Figueiredo, B.C., Ricci, N.D., de Assis, N.R., de Morais, S.B., Fonseca, C.T., and Oliveira, S.C. (2015b). Kicking in the Guts: *Schistosoma mansoni* Digestive Tract Proteins are Potential Candidates for Vaccine Development. *Frontiers in immunology* 6, 22.
- Finkelman, F.D., Shea-Donohue, T., Morris, S.C., Gildea, L., Strait, R., Madden, K.B., Schopf, L., and Urban, J.F., Jr. (2004). Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. *Immunological reviews* 201, 139-155.
- Fishelson, Z. (1995). Novel mechanisms of immune evasion by *Schistosoma mansoni*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 90, 289-292.
- Fonseca, C.T., Brito, C.F., Alves, J.B., and Oliveira, S.C. (2004). IL-12 enhances protective immunity in mice engendered by immunization with recombinant 14 kDa *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein through an IFN-gamma and TNF-alpha dependent pathway. *Vaccine* 22, 503-510.
- Freudenstein-Dan, A., Gold, D., and Fishelson, Z. (2003). Killing of schistosomes by elastase and hydrogen peroxide: implications for leukocyte-mediated schistosome killing. *The Journal of parasitology* 89, 1129-1135.
- Fuks, M.A., Santa Rosa, G.L., Savino, W., and Goulart, E.G. (1982). The responses to *Schistosoma mansoni* of infected mice and non-infected mice following parabiosis. I--Histological aspects. *Anais de microbiologia* 27, 129-138.
- Gale, E.A. (2002). The rise of childhood type 1 diabetes in the 20th century. *Diabetes* 51, 3353-3361.
- Garcia-Fernandez, R., Perbandt, M., Rehders, D., Ziegelmuller, P., Piganeau, N., Hahn, U., Betzel, C., Chavez Mde, L., and Redecke, L. (2015). Three-dimensional Structure of a Kunitz-type Inhibitor in Complex with an Elastase-like Enzyme. *The Journal of biological chemistry* 290, 14154-14165.
- Ghendler, Y., Arnon, R., and Fishelson, Z. (1994). *Schistosoma mansoni*: isolation and characterization of Smpi56, a novel serine protease inhibitor. *Experimental parasitology* 78, 121-131.
- Giri, S.N., Hyde, D.M., and Marafino, B.J., Jr. (1986). Ameliorating effect of murine interferon gamma on bleomycin-induced lung collagen fibrosis in mice. *Biochemical medicine and metabolic biology* 36, 194-197.
- Gold, D. (1997). Assessment of the viability of *Schistosoma mansoni* schistosomula by comparative uptake of various vital dyes. *Parasitol Res* 83, 163-169.
- Goncalves de Assis, N.R., Batistoni de Morais, S., Figueiredo, B.C., Ricci, N.D., de Almeida, L.A., da Silva Pinheiro, C., Martins Vde, P., and Oliveira, S.C. (2015). DNA Vaccine Encoding the Chimeric Form of *Schistosoma mansoni* Sm-TSP2 and Sm29 Confers Partial Protection against Challenge Infection. *PloS one* 10, e0125075.
- Gryseels, B., Polman, K., Clerinx, J., and Kestens, L. (2006). Human schistosomiasis. *Lancet* 368, 1106-1118.

- Guerrero, A.T., Verri, W.A., Jr., Cunha, T.M., Silva, T.A., Rocha, F.A., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., and Parada, C.A. (2006). Hypernociception elicited by tibio-tarsal joint flexion in mice: a novel experimental arthritis model for pharmacological screening. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* *84*, 244-251.
- Hagan, P., and Sharaf, O. (2003). Schistosomiasis vaccines. *Expert opinion on biological therapy* *3*, 1271-1278.
- Hall, S.L., Braschi, S., Truscott, M., Mathieson, W., Cesari, I.M., and Wilson, R.A. (2011). Insights into blood feeding by schistosomes from a proteomic analysis of worm vomitus. *Molecular and biochemical parasitology* *179*, 18-29.
- Han, Z.G., Brindley, P.J., Wang, S.Y., and Chen, Z. (2009). Schistosoma genomics: new perspectives on schistosome biology and host-parasite interaction. *Annual review of genomics and human genetics* *10*, 211-240.
- Hanna, S., Gharib, B., Lepidi, H., Montet, J.C., Dumon, H., and de Reggi, M. (2005). Experimental schistosomiasis, protective aspects of granulomatous reaction in the mouse liver. *Parasitology research* *96*, 6-11.
- Harder, A. (2002). Chemotherapeutic approaches to trematodes (except schistosomes) and cestodes: current level of knowledge and outlook. *Parasitology research* *88*, 587-590.
- Harris, A.R., Russell, R.J., and Charters, A.D. (1984). A review of schistosomiasis in immigrants in Western Australia, demonstrating the unusual longevity of *Schistosoma mansoni*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* *78*, 385-388.
- Hewitson, J.P., Grainger, J.R., and Maizels, R.M. (2009). Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Molecular and biochemical parasitology* *167*, 1-11.
- Hoffmann, K.F., Caspar, P., Cheever, A.W., and Wynn, T.A. (1998). IFN-gamma, IL-12, and TNF-alpha are required to maintain reduced liver pathology in mice vaccinated with *Schistosoma mansoni* eggs and IL-12. *Journal of immunology* *161*, 4201-4210.
- Hoffmann, K.F., Cheever, A.W., and Wynn, T.A. (2000). IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. *Journal of immunology* *164*, 6406-6416.
- Hogg, K.G., Kumkate, S., Anderson, S., and Mountford, A.P. (2003a). Interleukin-12 p40 secretion by cutaneous CD11c+ and F4/80+ cells is a major feature of the innate immune response in mice that develop Th1-mediated protective immunity to *Schistosoma mansoni*. *Infection and immunity* *71*, 3563-3571.
- Hogg, K.G., Kumkate, S., and Mountford, A.P. (2003b). IL-10 regulates early IL-12-mediated immune responses induced by the radiation-attenuated schistosome vaccine. *International immunology* *15*, 1451-1459.
- Holtfreter, M.C., Lobermann, M., Frei, E., Riebold, D., Wolff, D., Hartung, G., Kinzelbach, R., and Reisinger, E.C. (2010). Schistosomula, pre-adults and adults of *Schistosoma mansoni* ingest fluorescence-labelled albumin in vitro and in vivo: implication for a drug-targeting model. *Parasitology* *137*, 1645-1652.
- Hoover, D.L., and Nacy, C.A. (1984). Macrophage activation to kill *Leishmania tropica*: defective intracellular killing of amastigotes by macrophages elicited with sterile inflammatory agents. *Journal of immunology* *132*, 1487-1493.
- Hota-Mitchell, S., Siddiqui, A.A., Dekaban, G.A., Smith, J., Tognon, C., and Podesta, R.B. (1997). Protection against *Schistosoma mansoni* infection with a recombinant baculovirus-expressed subunit of calpain. *Vaccine* *15*, 1631-1640.
- Hotez, P.J., Bethony, J.M., Oliveira, S.C., Brindley, P.J., and Loukas, A. (2008). Multivalent anthelmintic vaccine to prevent hookworm and schistosomiasis. *Expert review of vaccines* *7*, 745-752.
- Hotez, P.J., Bundy, D.A.P., Beegle, K., Brooker, S., Drake, L., de Silva, N., Montresor, A., Engels, D., Jukes, M., Chitsulo, L., *et al.* (2006a). Helminth Infections: Soil-transmitted Helminth Infections and Schistosomiasis. In *Disease Control Priorities in Developing Countries*,

- D.T. Jamison, J.G. Breman, A.R. Measham, G. Alleyne, M. Claeson, D.B. Evans, P. Jha, A. Mills, and P. Musgrove, eds. (Washington (DC)).
- Hotez, P.J., Molyneux, D.H., Fenwick, A., Ottesen, E., Ehrlich Sachs, S., and Sachs, J.D. (2006b). Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria. *PLoS medicine* 3, e102.
- Huang, W., Haas, T.A., Biesterfeldt, J., Mankawsky, L., Blanton, R.E., and Lee, X. (1999). Purification and crystallization of a novel membrane-anchored protein: the *Schistosoma haematobium* serpin. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* 55, 350-352.
- Ismail, M., Botros, S., Metwally, A., William, S., Farghally, A., Tao, L.F., Day, T.A., and Bennett, J.L. (1999). Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from Egyptian villagers. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 60, 932-935.
- Jaeschke, H., Williams, C.D., McGill, M.R., and Farhood, A. (2010). Herbal extracts as hepatoprotectants against acetaminophen hepatotoxicity. *World J Gastroenterol* 16, 2448-2450.
- Jankovic, D., Kullberg, M.C., Noben-Trauth, N., Caspar, P., Ward, J.M., Cheever, A.W., Paul, W.E., and Sher, A. (1999a). Schistosome-infected IL-4 receptor knockout (KO) mice, in contrast to IL-4 KO mice, fail to develop granulomatous pathology while maintaining the same lymphokine expression profile. *Journal of immunology* 163, 337-342.
- Jankovic, D., Wynn, T.A., Kullberg, M.C., Hieny, S., Caspar, P., James, S., Cheever, A.W., and Sher, A. (1999b). Optimal vaccination against *Schistosoma mansoni* requires the induction of both B cell- and IFN-gamma-dependent effector mechanisms. *Journal of immunology* 162, 345-351.
- Janssen, L., Silva Santos, G.L., Muller, H.S., Vieira, A.R., de Campos, T.A., and de Paulo Martins, V. (2016). Schistosome-Derived Molecules as Modulating Actors of the Immune System and Promising Candidates to Treat Autoimmune and Inflammatory Diseases. *J Immunol Res* 2016, 5267485.
- Jaramillo, M., Godbout, M., Naccache, P.H., and Olivier, M. (2004). Signaling events involved in macrophage chemokine expression in response to monosodium urate crystals. *The Journal of biological chemistry* 279, 52797-52805.
- Jassim, A., Hassan, K., and Catty, D. (1987). Antibody isotypes in human schistosomiasis mansoni. *Parasite immunology* 9, 627-650.
- Johansson, S., Goransson, U., Luijendijk, T., Backlund, A., Claeson, P., and Bohlin, L. (2002). A neutrophil multitarget functional bioassay to detect anti-inflammatory natural products. *Journal of natural products* 65, 32-41.
- Jones, M.K., Gobert, G.N., Zhang, L., Sunderland, P., and McManus, D.P. (2004). The cytoskeleton and motor proteins of human schistosomes and their roles in surface maintenance and host-parasite interactions. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 26, 752-765.
- Katz, A.A., K. (2003). *Esquistossomose, xistosa, barriga d'água.*, C.e. Cultura, ed. (São Paulo), pp. 55.
- Katz, N. (1992). Brazilian contributions to epidemiological aspects of schistosomiasis mansoni. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 87 *Suppl* 4, 1-9.
- Katz, N. (1999). [Problems in the development of a vaccine against schistosomiasis mansoni]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 32, 705-711.
- Khalife, J., Capron, M., Capron, A., Grzych, J.M., Butterworth, A.E., Dunne, D.W., and Ouma, J.H. (1986). Immunity in human schistosomiasis mansoni. Regulation of protective immune mechanisms by IgM blocking antibodies. *The Journal of experimental medicine* 164, 1626-1640.
- Knopf, P.M., and Linden, T. (1985). Completion of *Schistosoma mansoni* life cycle in thyroidectomized rats and effects of thyroid hormone replacement therapy. *The Journal of parasitology* 71, 422-426.

- Knudsen, G.M., Medzihradsky, K.F., Lim, K.C., Hansell, E., and McKerrow, J.H. (2005). Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* cercarial secretions. *Molecular & cellular proteomics* : MCP 4, 1862-1875.
- Kobayashi, S.D., and DeLeo, F.R. (2009). Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. *Wiley interdisciplinary reviews Systems biology and medicine* 1, 309-333.
- Kourilova, P., Hogg, K.G., Kolarova, L., and Mountford, A.P. (2004). Cercarial dermatitis caused by bird schistosomes comprises both immediate and late phase cutaneous hypersensitivity reactions. *Journal of immunology* 172, 3766-3774.
- Koyasu, S., Moro, K., Tanabe, M., and Takeuchi, T. (2010). Natural helper cells: a new player in the innate immune response against helminth infection. *Advances in immunology* 108, 21-44.
- Kozakov, D., Hall, D.R., Xia, B., Porter, K.A., Padhorny, D., Yueh, C., Beglov, D., and Vajda, S. (2017). The ClusPro web server for protein-protein docking. *Nat Protoc* 12, 255-278.
- Krautz-Peterson, G., Simoes, M., Faghiri, Z., Ndegwa, D., Oliveira, G., Shoemaker, C.B., and Skelly, P.J. (2010). Suppressing glucose transporter gene expression in schistosomes impairs parasite feeding and decreases survival in the mammalian host. *PLoS pathogens* 6, e1000932.
- Krissinel, E., and Henrick, K. (2007). Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol* 372, 774-797.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lambertucci, J.R., Serufo, J.C., Gerspacher-Lara, R., Rayes, A.A., Teixeira, R., Nobre, V., and Antunes, C.M. (2000). *Schistosoma mansoni*: assessment of morbidity before and after control. *Acta tropica* 77, 101-109.
- Larson, A.M. (2007). Acetaminophen hepatotoxicity. *Clin Liver Dis* 11, 525-548, vi.
- Laskowski, M., Jr., and Kato, I. (1980). Protein inhibitors of proteinases. *Annual review of biochemistry* 49, 593-626.
- Li, X.H., de Castro-Borges, W., Parker-Manuel, S., Vance, G.M., Demarco, R., Neves, L.X., Evans, G.J., and Wilson, R.A. (2013). The schistosome oesophageal gland: initiator of blood processing. *PLoS neglected tropical diseases* 7, e2337.
- Lichtenbergova, L., Kolbekova, P., Kourilova, P., Kasny, M., Mikes, L., Haas, H., Schramm, G., Horak, P., Kolarova, L., and Mountford, A.P. (2008). Antibody responses induced by *Trichobilharzia regenti* antigens in murine and human hosts exhibiting cercarial dermatitis. *Parasite immunology* 30, 585-595.
- Lima, L.M., Santos, S.B., Oliveira, R.R., Cardoso, L.S., Oliveira, S.C., Goes, A.M., Loukas, A., Carvalho, E.M., and Araujo, M.I. (2013). *Schistosoma* antigens downmodulate the in vitro inflammatory response in individuals infected with human T cell lymphotropic virus type 1. *Neuroimmunomodulation* 20, 233-238.
- Loukas, A., Tran, M., and Pearson, M.S. (2007). Schistosome membrane proteins as vaccines. *International journal for parasitology* 37, 257-263.
- Lukacs, N.W., and Boros, D.L. (1992). Utilization of fractionated soluble egg antigens reveals selectively modulated granulomatous and lymphokine responses during murine schistosomiasis *mansoni*. *Infection and immunity* 60, 3209-3216.
- Maizels, R.M. (2016). Parasitic helminth infections and the control of human allergic and autoimmune disorders. *Clin Microbiol Infect* 22, 481-486.
- Maizels, R.M., Gomez-Escobar, N., Gregory, W.F., Murray, J., and Zang, X. (2001). Immune evasion genes from filarial nematodes. *International journal for parasitology* 31, 889-898.
- Mangold, B.L., and Dean, D.A. (1986). Passive transfer with serum and IgG antibodies of irradiated cercaria-induced resistance against *Schistosoma mansoni* in mice. *Journal of immunology* 136, 2644-2648.
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J.B., Cherukuri, P.F., DeWeese-Scott, C., Geer, L.Y., Gwadz, M., He, S., Hurwitz, D.I., Jackson, J.D., Ke, Z., *et al.* (2005). CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. *Nucleic Acids Res* 33, D192-196.

- Marques, P.E., Oliveira, A.G., Pereira, R.V., David, B.A., Gomides, L.F., Saraiva, A.M., Pires, D.A., Novaes, J.T., Patricio, D.O., Cisalpino, D., *et al.* (2015). Hepatic DNA deposition drives drug-induced liver injury and inflammation in mice. *Hepatology* *61*, 348-360.
- Martins, V.P., Morais, S.B., Pinheiro, C.S., Assis, N.R., Figueiredo, B.C., Ricci, N.D., Alves-Silva, J., Caliari, M.V., and Oliveira, S.C. (2014). Sm10.3, a member of the micro-exon gene 4 (MEG-4) family, induces erythrocyte agglutination in vitro and partially protects vaccinated mice against *Schistosoma mansoni* infection. *PLoS neglected tropical diseases* *8*, e2750.
- Martins, V.P., Pinheiro, C.S., Figueiredo, B.C., Assis, N.R., Morais, S.B., Caliari, M.V., Azevedo, V., Castro-Borges, W., Wilson, R.A., and Oliveira, S.C. (2012). Vaccination with enzymatically cleaved GPI-anchored proteins from *Schistosoma mansoni* induces protection against challenge infection. *Clinical & developmental immunology* *2012*, 962538.
- Mathieu, J., Tissot, M., Nolibe, D., Florentin, I., Kergonou, J.F., and Giroud, J.P. (1990). Local and systemic effects of an acute inflammation on eicosanoid generation capacity of polymorphonuclear cells and macrophages. *Int J Exp Pathol* *71*, 603-616.
- Matisz, C.E., McDougall, J.J., Sharkey, K.A., and McKay, D.M. (2011). Helminth parasites and the modulation of joint inflammation. *Journal of parasitology research* *2011*, 942616.
- McDonald, B., Pittman, K., Menezes, G.B., Hirota, S.A., Slaba, I., Waterhouse, C.C., Beck, P.L., Muruve, D.A., and Kubes, P. (2010). Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science* *330*, 362-366.
- McKerrow, J.H., Caffrey, C., Kelly, B., Loke, P., and Sajid, M. (2006). Proteases in parasitic diseases. *Annual review of pathology* *1*, 497-536.
- McManus, D.P., and Loukas, A. (2008). Current status of vaccines for schistosomiasis. *Clinical microbiology reviews* *21*, 225-242.
- McWilliam, H.E., Driguez, P., Piedrafita, D., McManus, D.P., and Meeusen, E.N. (2012). Novel immunomic technologies for schistosome vaccine development. *Parasite immunology* *34*, 276-284.
- Mebius, M.M., van Genderen, P.J., Urbanus, R.T., Tielens, A.G., de Groot, P.G., and van Hellemond, J.J. (2013). Interference with the host haemostatic system by schistosomes. *PLoS pathogens* *9*, e1003781.
- Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* *449*, 819-826.
- Mei, H., and LoVerde, P.T. (1997). *Schistosoma mansoni*: the developmental regulation and immunolocalization of antioxidant enzymes. *Experimental parasitology* *86*, 69-78.
- Melo, T.T., Sena, I.C., Araujo, N., and Fonseca, C.T. (2014). Antibodies are involved in the protective immunity induced in mice by *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument (Smteg) immunization. *Parasite immunology* *36*, 107-111.
- Minard, P., Dean, D.A., Jacobson, R.H., Vannier, W.E., and Murrell, K.D. (1978). Immunization of mice with cobalt-60 irradiated *Schistosoma mansoni* cercariae. *The American journal of tropical medicine and hygiene* *27*, 76-86.
- Modolell, M., Corraliza, I.M., Link, F., Soler, G., and Eichmann, K. (1995). Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *European journal of immunology* *25*, 1101-1104.
- Montenegro, S.M., Miranda, P., Mahanty, S., Abath, F.G., Teixeira, K.M., Coutinho, E.M., Brinkman, J., Goncalves, I., Domingues, L.A., Domingues, A.L., *et al.* (1999). Cytokine production in acute versus chronic human *Schistosomiasis mansoni*: the cross-regulatory role of interferon-gamma and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. *The Journal of infectious diseases* *179*, 1502-1514.
- Montgomery, S. (2011). Online Yellow Book: Health Information for Overseas Travel 2012.
- Morris, G.P., and Threadgold, L.T. (1968). Ultrastructure of the tegument of adult *Schistosoma mansoni*. *The Journal of parasitology* *54*, 15-27.

- Moser, D., Tendler, M., Griffiths, G., and Klinkert, M.Q. (1991). A 14-kDa *Schistosoma mansoni* polypeptide is homologous to a gene family of fatty acid binding proteins. *The Journal of biological chemistry* 266, 8447-8454.
- Mountford, A.P., Coulson, P.S., and Wilson, R.A. (1988). Antigen localization and the induction of resistance in mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 97 (Pt 1), 11-25.
- Muleng, A., Sugino, M., Nakajim, M., Sugimoto, C., and Onuma, M. (2001). Tick-Encoded serine proteinase inhibitors (serpins); potential target antigens for tick vaccine development. *The Journal of veterinary medical science* 63, 1063-1069.
- Mwatha, J.K., Kimani, G., Kamau, T., Mbugua, G.G., Ouma, J.H., Mumo, J., Fulford, A.J., Jones, F.M., Butterworth, A.E., Roberts, M.B., *et al.* (1998). High levels of TNF, soluble TNF receptors, soluble ICAM-1, and IFN-gamma, but low levels of IL-5, are associated with hepatosplenic disease in human schistosomiasis mansoni. *Journal of immunology* 160, 1992-1999.
- Nagy, A., Trexler, M., and Patthy, L. (2003). Expression, purification and characterization of the second Kunitz-type protease inhibitor domain of the human WFIKKN protein. *Eur J Biochem* 270, 2101-2107.
- Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature reviews Immunology* 6, 173-182.
- Neurath, H. (1986). The versatility of proteolytic enzymes. *Journal of cellular biochemistry* 32, 35-49.
- Neves, J.K., Botelho, S.P., de Melo, C.M., Pereira, V.R., de Lima Mdo, C., Pitta Ida, R., Albuquerque, M.C., and Galdino, S.L. (2010). Biological and immunological activity of new imidazolidines against adult worms of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology research* 107, 531-538.
- Oliveira, S.C., Figueiredo, B.C., Cardoso, L.S., and Carvalho, E.M. (2016a). A double edged sword: *Schistosoma mansoni* Sm29 regulates both Th1 and Th2 responses in inflammatory mucosal diseases. *Mucosal Immunol*.
- Oliveira, S.C., Figueiredo, B.C., Cardoso, L.S., and Carvalho, E.M. (2016b). A double edged sword: *Schistosoma mansoni* Sm29 regulates both Th1 and Th2 responses in inflammatory mucosal diseases. *Mucosal Immunol* 9, 1366-1371.
- Pacifico, L.G., Fonseca, C.T., Chiari, L., and Oliveira, S.C. (2006). Immunization with *Schistosoma mansoni* 22.6 kDa antigen induces partial protection against experimental infection in a recombinant protein form but not as DNA vaccine. *Immunobiology* 211, 97-104.
- Pacifico, L.G., Marinho, F.A., Fonseca, C.T., Barsante, M.M., Pinho, V., Sales-Junior, P.A., Cardoso, L.S., Araujo, M.I., Carvalho, E.M., Cassali, G.D., *et al.* (2009). *Schistosoma mansoni* antigens modulate experimental allergic asthma in a murine model: a major role for CD4+ CD25+ Foxp3+ T cells independent of interleukin-10. *Infect Immun* 77, 98-107.
- Pearce, E.J., C, M.K., Sun, J., J, J.T., McKee, A.S., and Cervi, L. (2004). Th2 response polarization during infection with the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *Immunological reviews* 201, 117-126.
- Pearce, E.J., James, S.L., Hieny, S., Lanar, D.E., and Sher, A. (1988). Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by vaccination with schistosome paramyosin (Sm97), a nonsurface parasite antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5678-5682.
- Pearce, E.J., and MacDonald, A.S. (2002). The immunobiology of schistosomiasis. *Nature reviews Immunology* 2, 499-511.
- Pearce, E.J., and Sher, A. (1987). Mechanisms of immune evasion in schistosomiasis. *Contrib Microbiol Immunol* 8, 219-232.
- Pellegrino, J., and Coelho, P.M. (1978). *Schistosoma mansoni*: wandering capacity of a worm couple. *The Journal of parasitology* 64, 181-182.

- Prichard, R.K., Basanez, M.G., Boatman, B.A., McCarthy, J.S., Garcia, H.H., Yang, G.J., Sripa, B., and Lustigman, S. (2012). A research agenda for helminth diseases of humans: intervention for control and elimination. *PLoS neglected tropical diseases* 6, e1549.
- Puente, X.S., Sanchez, L.M., Overall, C.M., and Lopez-Otin, C. (2003). Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nature reviews Genetics* 4, 544-558.
- Queiroz-Junior, C.M., Madeira, M.F., Coelho, F.M., Costa, V.V., Bessoni, R.L., Sousa, L.F., Garlet, G.P., Souza Dda, G., Teixeira, M.M., and Silva, T.A. (2011). Experimental arthritis triggers periodontal disease in mice: involvement of TNF-alpha and the oral Microbiota. *Journal of immunology* 187, 3821-3830.
- Ranasinghe, S.L., Fischer, K., Gobert, G.N., and McManus, D.P. (2015a). Functional expression of a novel Kunitz type protease inhibitor from the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Parasites & vectors* 8, 408.
- Ranasinghe, S.L., Fischer, K., Gobert, G.N., and McManus, D.P. (2015b). A novel coagulation inhibitor from *Schistosoma japonicum*. *Parasitology* 142, 1663-1672.
- Ranasinghe, S.L., and McManus, D.P. (2017). Protease Inhibitors of Parasitic Flukes: Emerging Roles in Parasite Survival and Immune Defence. *Trends in parasitology* 33, 400-413.
- Randle, L.E., Goldring, C.E., Benson, C.A., Metcalfe, P.N., Kitteringham, N.R., Park, B.K., and Williams, D.P. (2008). Investigation of the effect of a panel of model hepatotoxins on the Nrf2-Keap1 defence response pathway in CD-1 mice. *Toxicology* 243, 249-260.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., and Finn, R. (2016). Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic acids research* 44, D343-350.
- Ray, A., and Dittel, B.N. (2010). Isolation of mouse peritoneal cavity cells. *J Vis Exp*.
- Reeves, E.P., Lu, H., Jacobs, H.L., Messina, C.G., Bolsover, S., Gabella, G., Potma, E.O., Warley, A., Roes, J., and Segal, A.W. (2002). Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nature* 416, 291-297.
- Rey, L. (2001). *Schistosoma mansoni* e esquistossomíase: a doença.
- Reynolds, S.R., Shoemaker, C.B., and Harn, D.A. (1992). T and B cell epitope mapping of SM23, an integral membrane protein of *Schistosoma mansoni*. *Journal of immunology* 149, 3995-4001.
- Roberts, T.H., Hejgaard, J., Saunders, N.F., Cavicchioli, R., and Curmi, P.M. (2004). Serpins in unicellular Eukarya, Archaea, and Bacteria: sequence analysis and evolution. *Journal of molecular evolution* 59, 437-447.
- Robinson, M.W., Dalton, J.P., and Donnelly, S. (2008). Helminth pathogen cathepsin proteases: it's a family affair. *Trends in biochemical sciences* 33, 601-608.
- Ross, A.G., Vickers, D., Olds, G.R., Shah, S.M., and McManus, D.P. (2007). Katayama syndrome. *The Lancet infectious diseases* 7, 218-224.
- Sadler, C.H., Rutitzky, L.I., Stadecker, M.J., and Wilson, R.A. (2003). IL-10 is crucial for the transition from acute to chronic disease state during infection of mice with *Schistosoma mansoni*. *European journal of immunology* 33, 880-888.
- Sajid, M., McKerrow, J.H., Hansell, E., Mathieu, M.A., Lucas, K.D., Hsieh, I., Greenbaum, D., Bogyo, M., Salter, J.P., Lim, K.C., *et al.* (2003). Functional expression and characterization of *Schistosoma mansoni* cathepsin B and its trans-activation by an endogenous asparaginyl endopeptidase. *Molecular and biochemical parasitology* 131, 65-75.
- Satoguina, J.S., Weyand, E., Larbi, J., and Hoerauf, A. (2005). T regulatory-1 cells induce IgG4 production by B cells: role of IL-10. *Journal of immunology* 174, 4718-4726.
- Sauma, S.Y., and Strand, M. (1990). Identification and characterization of glycosylphosphatidylinositol-linked *Schistosoma mansoni* adult worm immunogens. *Molecular and biochemical parasitology* 38, 199-209.
- Sauma, S.Y., Tanaka, T.M., and Strand, M. (1991). Selective release of a glycosylphosphatidylinositol-anchored antigen from the surface of *Schistosoma mansoni*. *Molecular and biochemical parasitology* 46, 73-80.

- Sempowski, G.D., Derdak, S., and Phipps, R.P. (1996). Interleukin-4 and interferon-gamma discordantly regulate collagen biosynthesis by functionally distinct lung fibroblast subsets. *Journal of cellular physiology* *167*, 290-296.
- Sher, A., Coffman, R.L., Hieny, S., and Cheever, A.W. (1990). Ablation of eosinophil and IgE responses with anti-IL-5 or anti-IL-4 antibodies fails to affect immunity against *Schistosoma mansoni* in the mouse. *Journal of immunology* *145*, 3911-3916.
- Sher, A., Fiorentino, D., Caspar, P., Pearce, E., and Mosmann, T. (1991). Production of IL-10 by CD4⁺ T lymphocytes correlates with down-regulation of Th1 cytokine synthesis in helminth infection. *Journal of immunology* *147*, 2713-2716.
- Siddiqui, A.A., Phillips, T., Charest, H., Podesta, R.B., Quinlin, M.L., Pinkston, J.R., Lloyd, J.D., Pompa, J., Villalovos, R.M., and Paz, M. (2003). Enhancement of Sm-p80 (large subunit of calpain) induced protective immunity against *Schistosoma mansoni* through co-delivery of interleukin-2 and interleukin-12 in a DNA vaccine formulation. *Vaccine* *21*, 2882-2889.
- Silverman, G.A., Bird, P.I., Carrell, R.W., Church, F.C., Coughlin, P.B., Gettins, P.G., Irving, J.A., Lomas, D.A., Luke, C.J., Moyer, R.W., *et al.* (2001). The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *The Journal of biological chemistry* *276*, 33293-33296.
- Skelly, P.J., Da'dara, A.A., Li, X.H., Castro-Borges, W., and Wilson, R.A. (2014). Schistosome feeding and regurgitation. *PLoS pathogens* *10*, e1004246.
- Smith, D., Tikhonova, I.G., Jewhurst, H.L., Drysdale, O.C., Dvorak, J., Robinson, M.W., Cwiklinski, K., and Dalton, J.P. (2016). Unexpected Activity of a Novel Kunitz-type Inhibitor: INHIBITION OF CYSTEINE PROTEASES BUT NOT SERINE PROTEASES. *The Journal of biological chemistry* *291*, 19220-19234.
- Smith, J.H., Reynolds, E.S., and Von Lichtenberg, F. (1969). The integument of *Schistosoma mansoni*. *The American journal of tropical medicine and hygiene* *18*, 28-49.
- Smythies, L.E., Coulson, P.S., and Wilson, R.A. (1992). Monoclonal antibody to IFN-gamma modifies pulmonary inflammatory responses and abrogates immunity to *Schistosoma mansoni* in mice vaccinated with attenuated cercariae. *Journal of immunology* *149*, 3654-3658.
- Soisson, L.M., Masterson, C.P., Tom, T.D., McNally, M.T., Lowell, G.H., and Strand, M. (1992). Induction of protective immunity in mice using a 62-kDa recombinant fragment of a *Schistosoma mansoni* surface antigen. *Journal of immunology* *149*, 3612-3620.
- Sotillo, J., Pearson, M., Potriquet, J., Becker, L., Pickering, D., Mulvenna, J., and Loukas, A. (2016). Extracellular vesicles secreted by *Schistosoma mansoni* contain protein vaccine candidates. *International journal for parasitology* *46*, 1-5.
- Stapels, D.A., Ramyar, K.X., Bischoff, M., von Kockritz-Blickwede, M., Milder, F.J., Ruyken, M., Eisenbeis, J., McWhorter, W.J., Herrmann, M., van Kessel, K.P., *et al.* (2014). *Staphylococcus aureus* secretes a unique class of neutrophil serine protease inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *111*, 13187-13192.
- Steinmann, P., Keiser, J., Bos, R., Tanner, M., and Utzinger, J. (2006). Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *The Lancet infectious diseases* *6*, 411-425.
- Stek, M., Jr., Dean, D.A., and Clark, S.S. (1981). Attrition of schistosomes in an irradiation-attenuated cercarial immunization model of *Schistosoma mansoni*. *The American journal of tropical medicine and hygiene* *30*, 1033-1038.
- Tanigawa, C., Fujii, Y., Miura, M., Nzou, S.M., Mwangi, A.W., Nagi, S., Hamano, S., Njenga, S.M., Mbanefo, E.C., Hirayama, K., *et al.* (2015). Species-Specific Serological Detection for Schistosomiasis by Serine Protease Inhibitor (SERPIN) in Multiplex Assay. *PLoS neglected tropical diseases* *9*, e0004021.
- Teixeira-Carvalho, A., Martins-Filho, O.A., Peruhype-Magalhaes, V., Silveira-Lemos, D., Malaquias, L.C., Oliveira, L.F., Silveira, A.M., Gazzinelli, A., Gazzinelli, G., and Correa-

- Oliveira, R. (2008). Cytokines, chemokine receptors, CD4+CD25HIGH+ T-cells and clinical forms of human schistosomiasis. *Acta tropica* 108, 139-149.
- Tendler, M., Vilar, M.M., Brito, C.A., Freire, N.M., Katz, N., and Simpson, A. (1995). Vaccination against schistosomiasis and fascioliasis with the new recombinant antigen Sm14: potential basis of a multi-valent anti-helminth vaccine? *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 90, 255-256.
- Tetley, T.D. (1993). New perspectives on basic mechanisms in lung disease. 6. Proteinase imbalance: its role in lung disease. *Thorax* 48, 560-565.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., and Higgins, D.G. (2002). Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Curr Protoc Bioinformatics Chapter 2*, Unit 2 3.
- Tincani, A., Andreoli, L., Bazzani, C., Bosiso, D., and Sozzani, S. (2007). Inflammatory molecules: a target for treatment of systemic autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 7, 1-7.
- Torben, W., Ahmad, G., Zhang, W., Nash, S., Le, L., Karmakar, S., and Siddiqui, A.A. (2012). Role of antibody dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC) in Sm-p80-mediated protection against *Schistosoma mansoni*. *Vaccine* 30, 6753-6758.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 4350-4354.
- Tran, M.H., Pearson, M.S., Bethony, J.M., Smyth, D.J., Jones, M.K., Duke, M., Don, T.A., McManus, D.P., Correa-Oliveira, R., and Loukas, A. (2006). Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis. *Nature medicine* 12, 835-840.
- Trottein, F., Godin, C., Pierce, R.J., Sellin, B., Taylor, M.G., Gorillot, I., Silva, M.S., Lecocq, J.P., and Capron, A. (1992). Inter-species variation of schistosome 28-kDa glutathione S-transferases. *Molecular and biochemical parasitology* 54, 63-72.
- van der Werf, M.J., Borsboom, G.J., and de Vlas, S.J. (2003a). No effect of recall period length on prevalence of self-reported haematuria in *Schistosoma haematobium*-endemic areas. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 97, 373-374.
- van der Werf, M.J., de Vlas, S.J., Brooker, S., Looman, C.W., Nagelkerke, N.J., Habbema, J.D., and Engels, D. (2003b). Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. *Acta Trop* 86, 125-139.
- Van Hellemond, J.J., Retra, K., Brouwers, J.F., van Balkom, B.W., Yazdanbakhsh, M., Shoemaker, C.B., and Tielens, A.G. (2006). Functions of the tegument of schistosomes: clues from the proteome and lipidome. *International journal for parasitology* 36, 691-699.
- Wan, H., Lee, K.S., Kim, B.Y., Zou, F.M., Yoon, H.J., Je, Y.H., Li, J., and Jin, B.R. (2013). A spider-derived Kunitz-type serine protease inhibitor that acts as a plasmin inhibitor and an elastase inhibitor. *PloS one* 8, e53343.
- Wang, T., Zhao, M., Rotgans, B.A., Strong, A., Liang, D., Ni, G., Limpanont, Y., Ramasoota, P., McManus, D.P., and Cummins, S.F. (2016). Proteomic Analysis of the *Schistosoma mansoni* Miracidium. *PloS one* 11, e0147247.
- WHO (1953). WHO Expert Committee on Bilharziasis: first report. In *Technical Report Series* (Geneva: World Health Organization).
- WHO (1967). Epidemiology and control of Schistosomiasis: report of a WHO Expert Committee. In *Technical Report Series* (Geneva: World Health Organization).
- WHO (2002). Prevention and Control of Schistosomiasis and Soiltransmitted Helminthiasis.
- WHO (2010). World Health Statistics.
- Wilson, R.A., and Coulson, P.S. (2006). Schistosome vaccines: a critical appraisal. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 101 Suppl 1, 13-20.
- Wilson, R.A., and Coulson, P.S. (2009). Immune effector mechanisms against schistosomiasis: looking for a chink in the parasite's armour. *Trends in parasitology* 25, 423-431.

- Wilson, R.A., Coulson, P.S., Betts, C., Dowling, M.A., and Smythies, L.E. (1996). Impaired immunity and altered pulmonary responses in mice with a disrupted interferon-gamma receptor gene exposed to the irradiated *Schistosoma mansoni* vaccine. *Immunology* 87, 275-282.
- World Health, O.W. (2015). Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. First WHO report on neglected tropical diseases, pp. 129.
- Wu, X.J., Sabat, G., Brown, J.F., Zhang, M., Taft, A., Peterson, N., Harms, A., and Yoshino, T.P. (2009). Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* proteins released during in vitro miracidium-to-sporocyst transformation. *Molecular and biochemical parasitology* 164, 32-44.
- Wynn, T.A., Thompson, R.W., Cheever, A.W., and Mentink-Kane, M.M. (2004). Immunopathogenesis of schistosomiasis. *Immunological reviews* 201, 156-167.
- Yadav, R., Larbi, K.Y., Young, R.E., and Nourshargh, S. (2003). Migration of leukocytes through the vessel wall and beyond. *Thrombosis and haemostasis* 90, 598-606.
- Yan, Y., Liu, S., Song, G., Xu, Y., and Dissous, C. (2005). Characterization of a novel vaccine candidate and serine proteinase inhibitor from *Schistosoma japonicum* (Sj serpin). *Veterinary parasitology* 131, 53-60.
- Yang, Y., Wen, Y., Cai, Y.N., Vallee, I., Boireau, P., Liu, M.Y., and Cheng, S.P. (2015). Serine proteases of parasitic helminths. *The Korean journal of parasitology* 53, 1-11.
- Yuan, C.H., He, Q.Y., Peng, K., Diao, J.B., Jiang, L.P., Tang, X., and Liang, S.P. (2008). Discovery of a distinct superfamily of Kunitz-type toxin (KTT) from tarantulas. *PloS one* 3, e3414.
- Zhang, M., Hong, Y., Han, Y., Han, H., Peng, J., Qiu, C., Yang, J., Lu, K., Fu, Z., and Lin, J. (2013). Proteomic analysis of tegument-exposed proteins of female and male *Schistosoma japonicum* worms. *Journal of proteome research* 12, 5260-5270.
- Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* 9, 40.
- Zhao, R., Dai, H., Qiu, S., Li, T., He, Y., Ma, Y., Chen, Z., Wu, Y., Li, W., and Cao, Z. (2011). SdPI, the first functionally characterized Kunitz-type trypsin inhibitor from scorpion venom. *PloS one* 6, e27548.
- Zupunski, V., Kordis, D., and Gubensek, F. (2003). Adaptive evolution in the snake venom Kunitz/BPTI protein family. *FEBS letters* 547, 131-136.

Figure Captions

Fig 1. *SmKI-1* Kunitz type domain sequence and structure. (a) Multiple Sequence Alignment between the *SmKI-1* protein from *Schistosoma mansoni*, and its homologous proteins performed using Clustal Omega, refined using BoxShade and then manually. The residues that are similar are shaded in gray, identical in dark-black and in yellow absolutely conserved cysteine residues.

(b) Disordered Probability Prediction showing the structured Kunitz domain and unstructured C-terminal region. Analysis performed using COILS algorithms available at the Expasy website.

(c) Schematic representation and linear view of the domains of the full-length *SmKI-1* protein showing the Kunitz domain with the three disulfide bounds arrangements. (d) 3D protein

structure of the *SmKI-1* Kunitz domain modeled using MODELLER v9.17.

Fig 2. Recombinant *SmKI-1* and its Kunitz domain inhibit serine proteases and protect *S. mansoni* against neutrophil elastase. Recombinant *SmKI-1*, its Kunitz or C-terminal domains (100 nM) were tested as inhibitor of serino proteases: **(a)** Bovine Trypsin activity (100nM), **(b)** Human Neutrophil Elastase activity (300nM) and **(c)** Neutrophil-secreted elastase activity. In all experiments, bovine serum albumin (BSA, 300nM) was used as a negative control. Enzyme inhibition was detected over two-hour incubation with r*SmKI-1* or its Kunitz domain. Bars indicate each enzyme activity mean \pm standard deviation. **(d)** Protective effect of r*SmKI-1* (0.15 mg/mL) in cultured schistosomula treated with purified elastase (0.05 mg/mL). Bars represent live parasites \pm standard deviation. Data are representative of at least three independent experiments. For **(a)** and **(b)**, an asterisk indicate statistically significant differences of r*SmKI-1* or Kunitz domain compared to control group $p < 0.05$. For **(c)** and **(d)**, ** asterisks indicate statistically significant differences of r*SmKI-1*, compared to control group or elastase group $p < 0.005$. **(e)** Binding mode of *SmKI-1* Kunitz domain (purple) to neutrophil elastase (gray) predicted by docking with CLUSPRO 2.0. Residues from elastase catalytic triad (His⁷⁰, Asp¹¹⁷ and Ser²⁰²) are highlighted in orange sticks. **(f)** Detailed analysis of the docking predicted interface reveals residues involved in hydrogen bonds, a salt bridge and a π -stacking interaction (all interactions shown as green dashes). *SmKI-1* residues are represented and labeled in purple, NE residues in gray.

Fig 3. *SmKI-1* is important for parasite development. **(a)** Quantitative RT-PCR data showing relative expression level (mean \pm SD) of *SmKI-1* at different stages in the *S. mansoni* life cycle: eggs, miracidia, cercariae, schistosomula (7-day cultured larvae) and adult worms (male and female - set at 100%). **(b)** Mean level of *SmKI-1* gene expression (\pm SD, n=3) in cultured adult schistosome males (left) , females (center) or schistosomula (right) at 72 hours after treatment with control siRNA (black bars, set at 100%) or siRNA targeting *SmKI-1* (white bars), as

determined by qPCR. (c) *SmKI-1* gene expression and (d) schistosome viability in cultured schistosomula at different time points after treatment with *SmKI-1* siRNAs. White circles/bars represent the relative expression of the group treated with *SmKI-1* siRNAs compared to the group treated with a control siRNA (set as 100%, black circles/bars) at the same time points. Results are representative of two independent experiments. Significant differences between male adult worms and other life stages is denoted by ***, $p < 0.001$. (e) Schistosomula were treated with *SmKI-1* siRNA and used to infect mice. Worm burden recovery (mean \pm SD) from two independent experiments are shown. (f) Viability of schistosomula treated with *SmKI-1* siRNA or control siRNA cultured with mouse neutrophils (mean \pm SD). Significant differences between groups is denoted by an asterisk, $p < 0.05$. Results are representative of two independent experiments.

Fig 4. *SmKI-1* reduces hepatic APAP-induced injury. (a) MPO and (b) Elastase activities were measured in r*SmKI-1* treated mice during liver APAP-induced hepatotoxicity. Treated-mice received *SmKI-1* (10 mg/kg) or PBS vehicle i.v. 15 min prior APAP administration (600 mg/kg). (c) Number of neutrophils per field of view (FOV) in the liver of r*SmKI-1* treated animals. (d) Liver confocal intravital microscopy showing neutrophil (anti-GR1 PE in red) migration into necrotic sites (Sytox green staining) following 24 hours of APAP challenge. Scale bar = 100 μ m. (e) Left panels represent histology of hematoxylin and eosin-stained liver sections, scale bar = 300 μ m. In right panels, liver damage is highlighted. (f) serum ALT levels confirmed severe liver damage in APAP group and reduction of liver necrosis in mice treated with APAP+*SmKI-1*. Results are the mean \pm SEM of n=6 per group. An asterisk indicate statistically significant differences of r*SmKI-1* compared to APAP group ($p < 0.05$) or ** $p < 0.005$.

Fig 5. *SmKI-1* treatment decreased inflammation after MSU-induced gout. Mice were treated with r*SmKI-1* (10 mg/kg) or PBS vehicle i.v. 15 min prior MSU injection. Then, animals were challenged with intra-articular knee injection of MSU (100 μ g/cavity). Mice were grouped

as MSU control, PBS control, MSU+*SmKI-1*-treatment and PBS+*SmKI-1*-treatment. Tissue inflammation was evaluated by (a) relative numbers of neutrophil in periarticular tissue determined by MPO assay, (b) total cells and (c) neutrophil recruitment in the synovial cavity, (d) IL-1 β production measured by ELISA in the periarticular knee tissue and (e) joint dysfunction as noted by the increase nociceptive response of mice to mechanical stimulation using an electronic paw pressure meter test 15 hrs after MSU or PBS (control vehicle) injection. (f) Representative photographs of hematoxylin and eosin-stained sections of knee joints of mice after 15 hrs of injection with vehicle or MSU crystals (100 μ g/joint). Leukocyte infiltration and hyperplasia of the synovial membrane are indicated by black arrows. (g) Neutrophil recruitment in the synovial cavity of mice infected with *S. mansoni*. Mice were grouped as PBS control, PBS infected, MSU control and MSU infected. ND = not detected. Results are the mean \pm SEM of n=6 per group. Asterisks indicate statistically significant differences of r*SmKI-1* compared to MSU-vehicle group *p< 0.05 or ** p< 0.005. An asterisk also indicates statistically significant differences of *S. mansoni* infection versus control mice that received MSU, p<0.05.

Fig 6. *SmKI-1* treatment reduces neutrophil migration into pleural cavity in response to carrageenan injection. After carrageenan injection (2mg/mL) into pleural cavity, animals received an intravenous dose of *SmKI-1* (10 mg/kg) or PBS (vehicle). Four hours later, we recovered cells by washing pleural cavity with PBS. Counting of (a) total cells and (b) neutrophils were performed by cytospin preparations. Specific cell populations in pleural fluid were also evaluated by flow cytometry, being the percentage of (c) neutrophils (Ly6G⁺CD11b⁺), (d) macrophages (F4/80⁺CD11b⁺), and (e) T lymphocytes (CD3⁺ cells) calculated from the total cell numbers. Results are expressed as the number of cells per cavity or percentage of cell subpopulations (mean \pm SD) for each treated group (5-6 mice each). An Asterisk indicates statistically significant differences of carrageenan+*SmKI-1* compared to carrageenan vehicle group (p< 0.05).

Supporting information

S1 Fig. Biochemical analysis of rSmKI-1, KI Domain and C-terminal. (A) *SmKI-1* full-length protein sequence. The Kunitz Domain is underlined in black and the canonical segments of the primary and secondary binding loops of *SmKI-1* are underlined in red. Glycosylation prediction results show no potential O-glycosylation sites in the sequence (all prediction confidence scores were lower than 0.5), and the single N-glycosylation site that has been annotated for this protein (Asn30, black arrow) is neither in the primary nor in the secondary binding loop. (B) SDS-PAGE stained with Coomassie brilliant blue showing eluted and dialyzed r*SmKI-1*, KI Domain and c-terminal after purification by Ni₂₊-charged column chromatography. (C) Western blot analysis of r*SmKI-1* and its collect proteins probed with monoclonal mouse anti-His tag antibodies. The molecular weight protein standard (M.W.) is a broad range pre-stained ladder from Fermentas in lane 1; r*SmKI-1* in lane 2; KI Domain in lane 3; .C-terminal in lane 4. (D) Average molecular mass and purity of folded KI domain was determined by MALDI-TOF/MS using linear mode on a Bruker instrument AutoFlex III. Precursor charge state M+2H⁺ was detected and the observed average molecular mass was 11,200.0 Da with theoretical average molecular mass of 11,074.0 Da. (E) Circular dichroism analysis (far-UV spectrum) of KI domain showing predominant β -sheet conformation. (F) BHK-21 cells were incubated with r*SmKI-1* at the final concentration of 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 or 15.62 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and the cytotoxicity potential was evaluated by MTS assay. The medium alone was used to calculate the percentage of viable cells. The BHK-21 cells were also incubated with a CTAB solution (100 mM) as a positive control of cytotoxicity. *** denotes statistically significant differences ($p < 0.0001$) in relation to cells incubated with medium alone.

S2 Fig. *SmKI-1* is important in parasite development. (A) Sizes of schistosomula cultured throughout six weeks post siRNA treatment. Sizes of individual schistosomula treated with *SmKI-1* (white circles) or Control siRNAs (gray squares) are shown. The lines indicate the means for each group. Results shown are representative of two replicate experiments. Significant differences between control group and *SmKI-1* group are denoted by *, $p < 0.05$ or ***, $p < 0.001$. (B) Representative images of schistosomula treated with either control (upper panel) or *SmKI-1* (lower panel) siRNAs in all time points evaluated. (C) Number of eggs per gram of liver tissue (mean \pm SD) from mice infected with schistosomula treated with control siRNA (black bar) or *SmKI-1* siRNA (white bar). (D) Control of viability of schistosomula treated with *SmKI-1* siRNA or control siRNA cultured without mouse neutrophils (mean \pm SD).

S3 Fig. Depletion of neutrophils *in vivo* during *SmKI-1*-suppressed parasites infection. Neutrophils were depleted by treatment with anti-mouse Ly6G and cells were evaluated by flow cytometry, being the percentage of (a) neutrophils (Ly6G⁺ CD11b⁺) and (b) dendritic cells (CD11c⁺ CD11b⁺), calculated from the total cell numbers. (c) Worm burden recovery (mean \pm SD) of 250 schistosomula siRNA control or 250 schistosomula *SmKI-1* siRNA-electroporated parasites used to infect neutrophil-depleted mice. Results are expressed as the number of worms recovery (mean \pm SD) for each treated group (5 mice each). On top of the bars the difference in percentage of worm burden decrease among studied groups.

S4 Fig. *SmKI-1* does not affect the migration of lymphocytes and macrophages. Forty eight hours after thioglycollate injection (3mL of a 3% solution) into peritoneal cavities, animals received an intravenous dose of *SmKI-1* (10 mg/kg) or PBS (vehicle). Twenty-four hours later, we recovered peritoneal cells by washing peritoneal cavities with PBS. Counting of (A) total cells, (B) lymphocytes and (C) macrophages were performed by cytopspin preparations. ND = not detected.

Figure 1

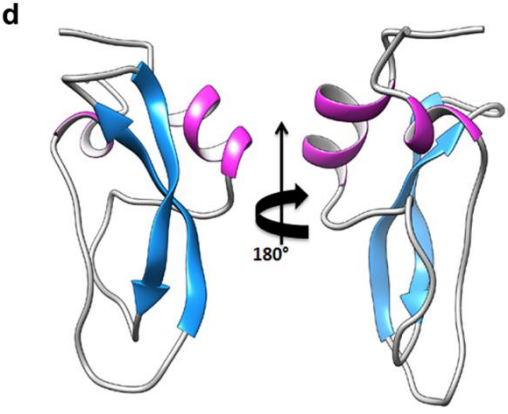
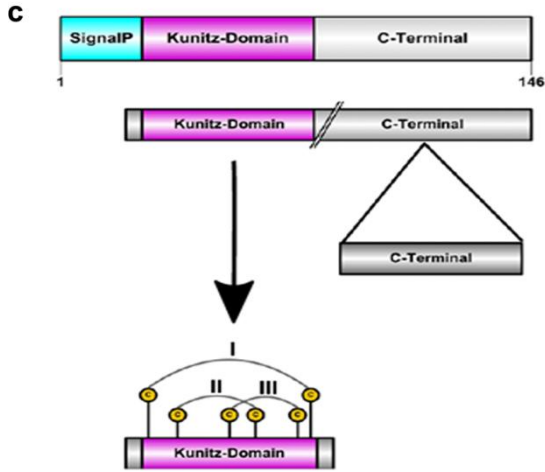
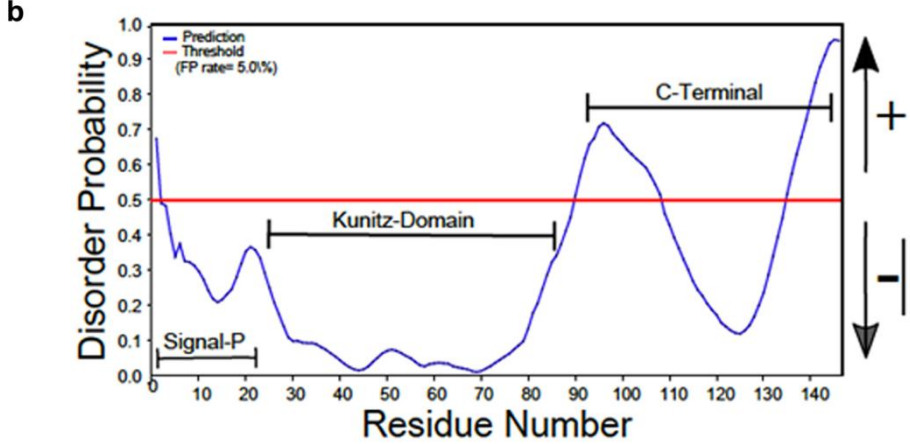
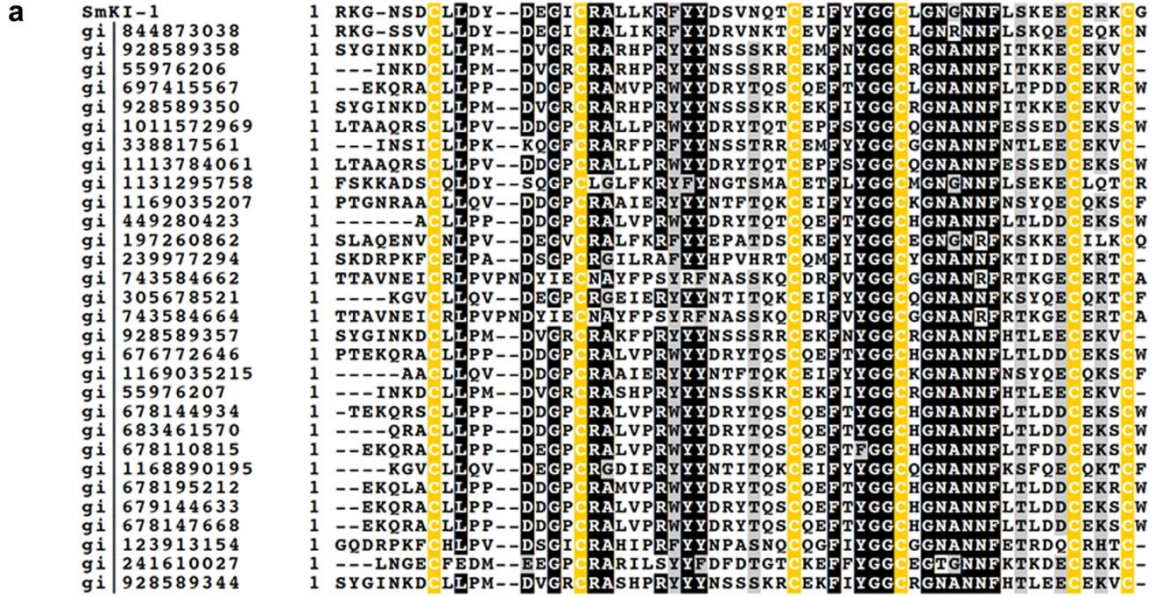


Figure 2

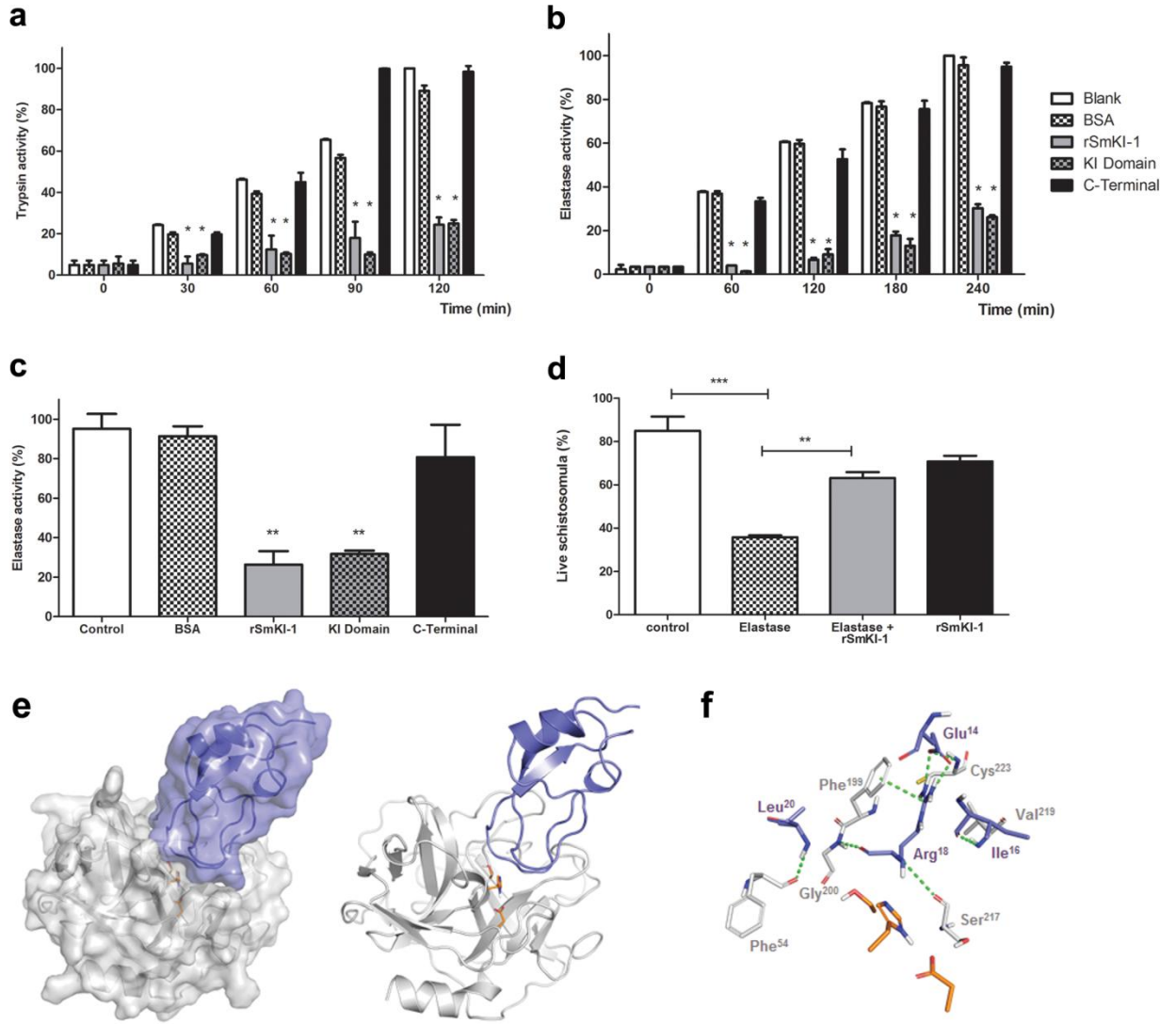


Figure 3

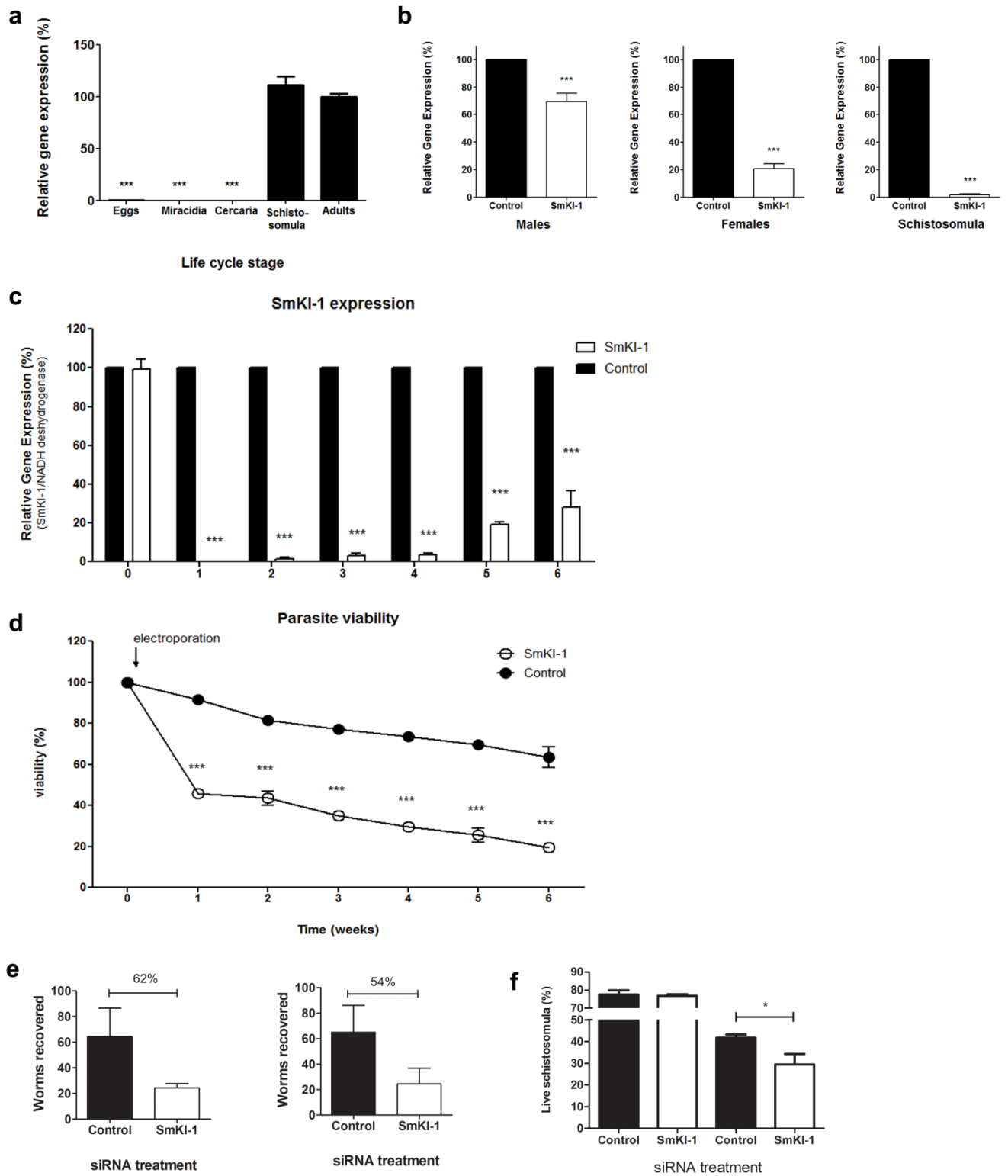


Figure 4

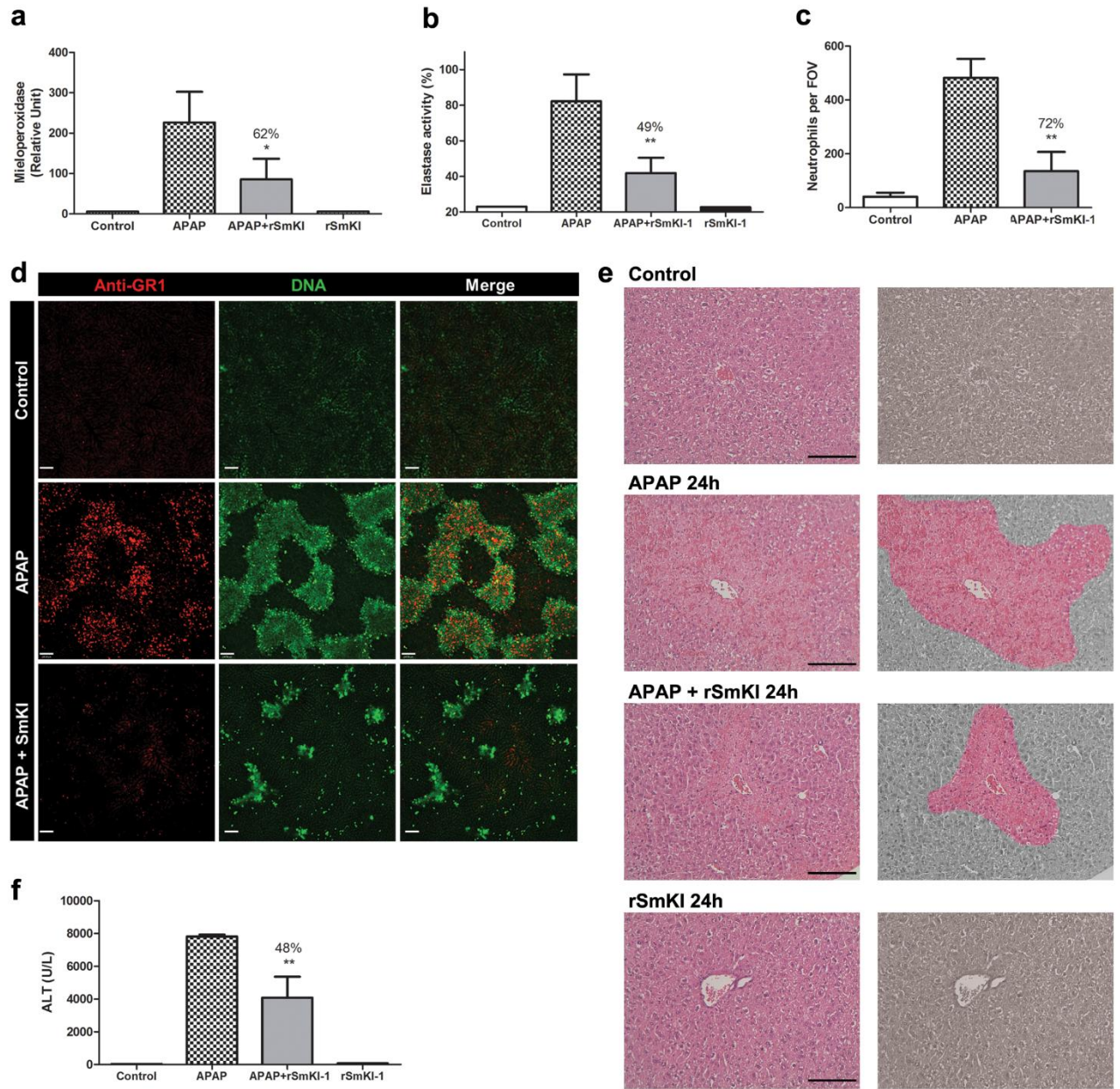


Figure 5

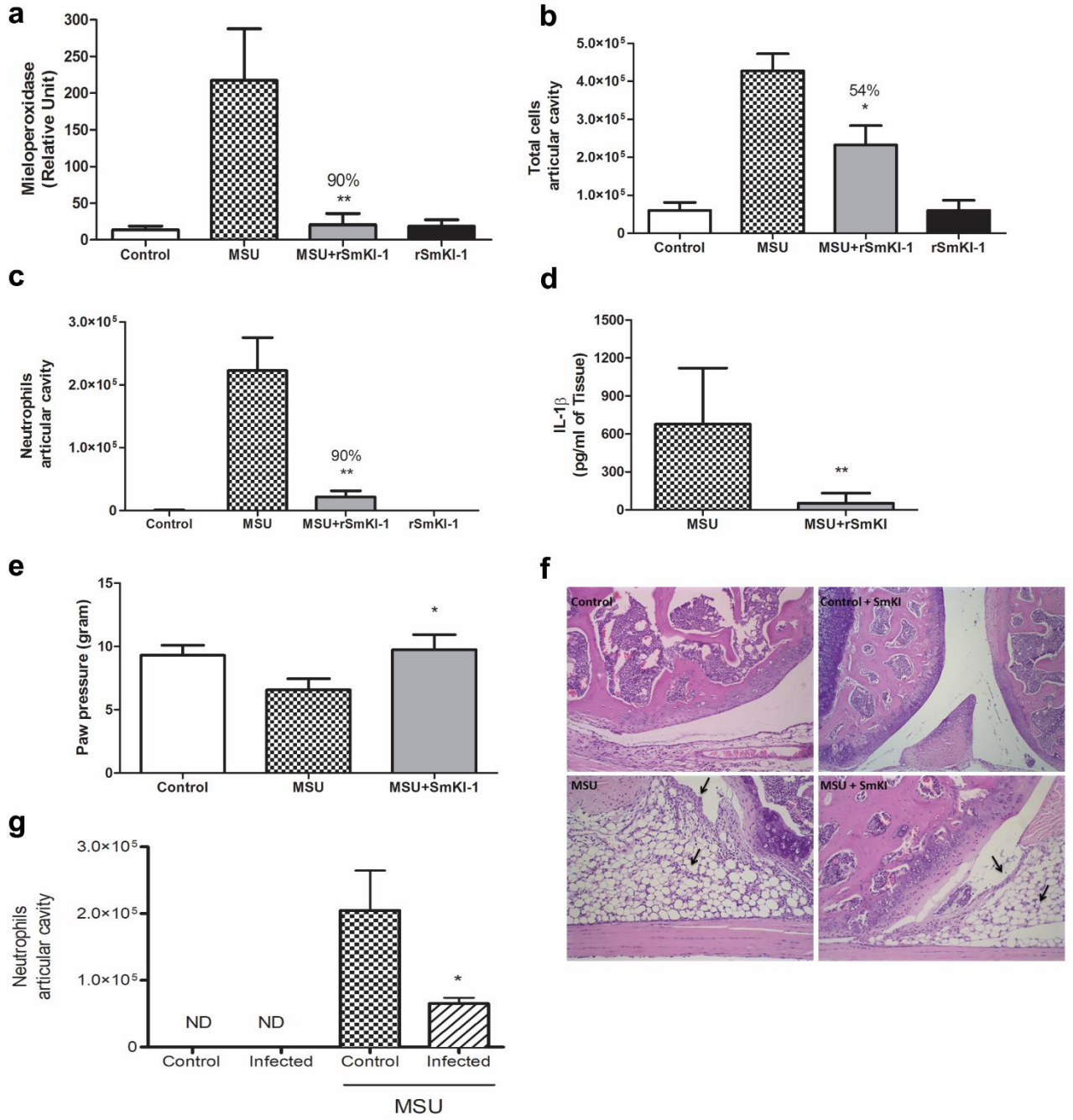
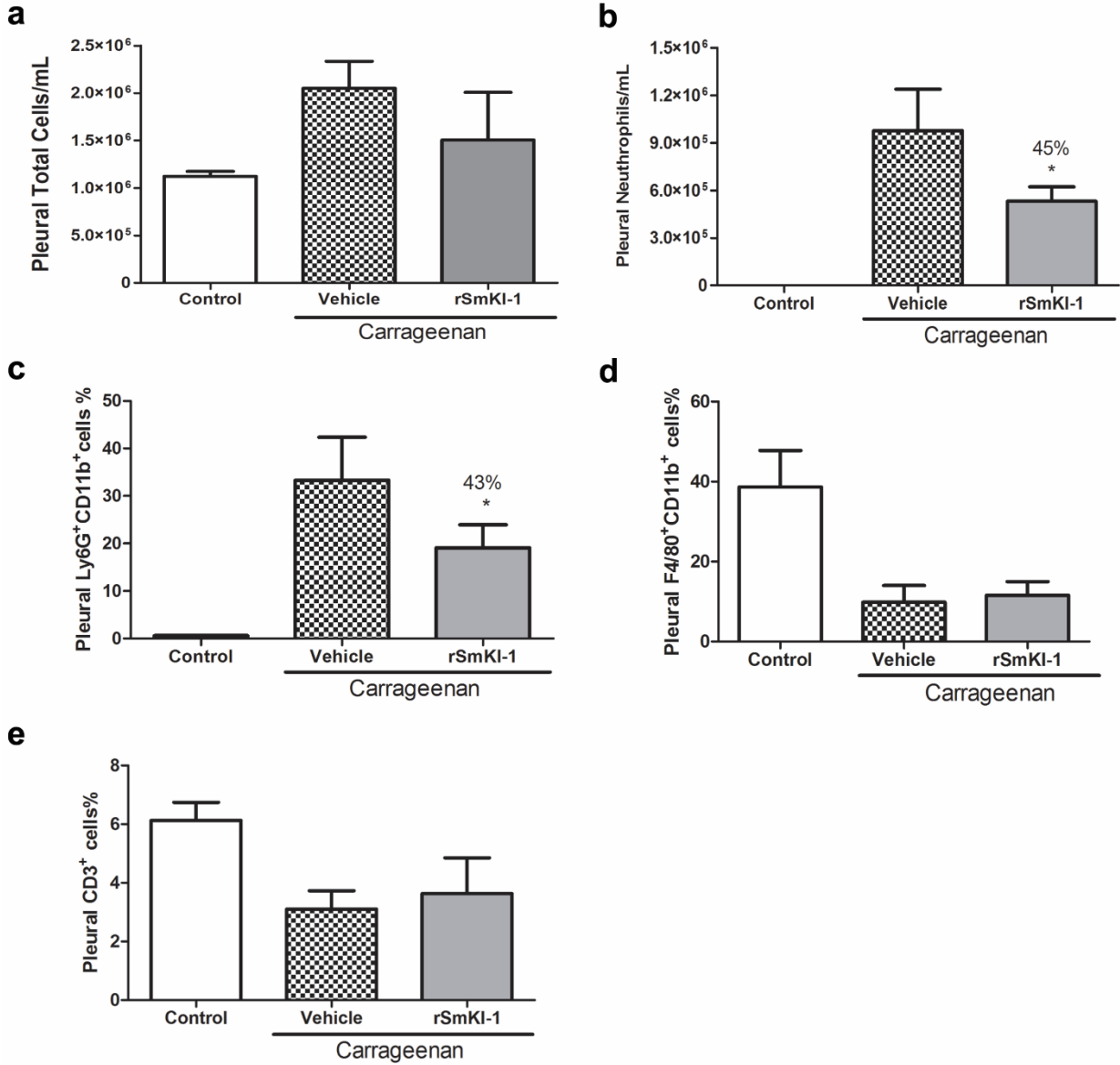


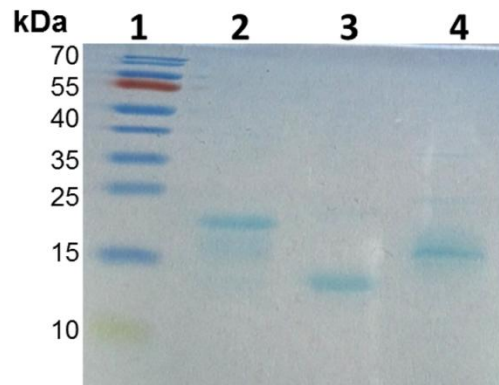
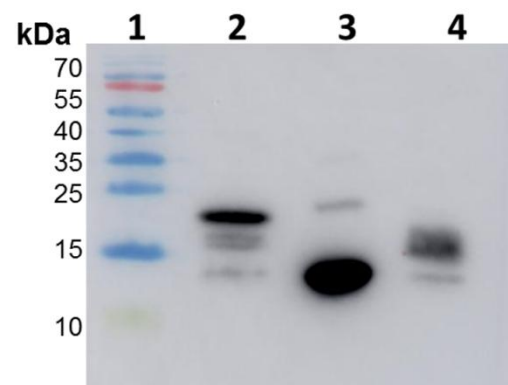
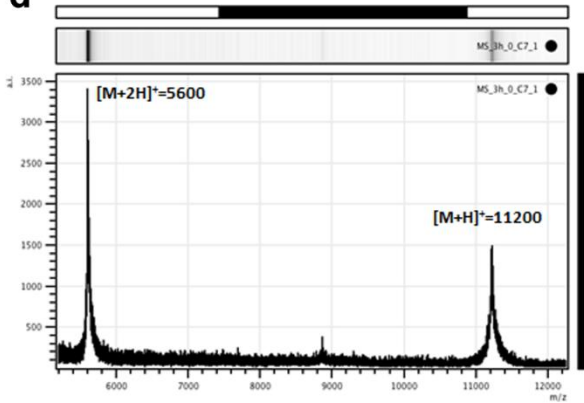
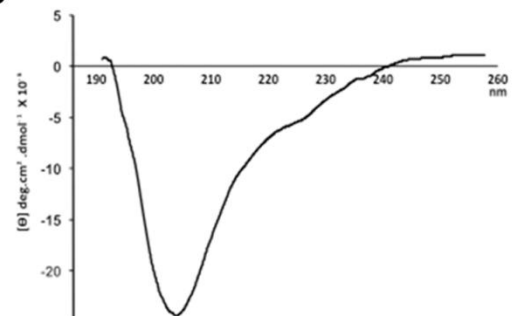
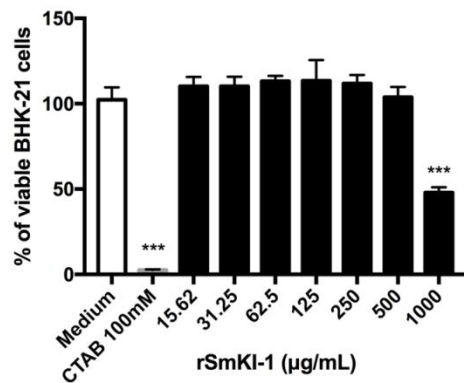
Figure 6



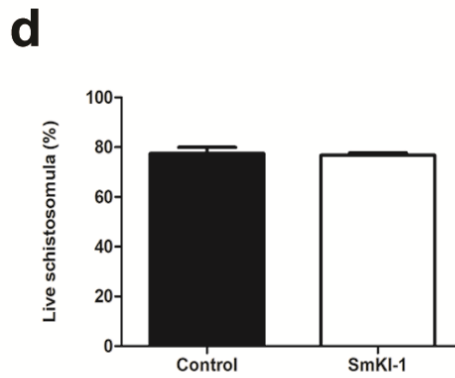
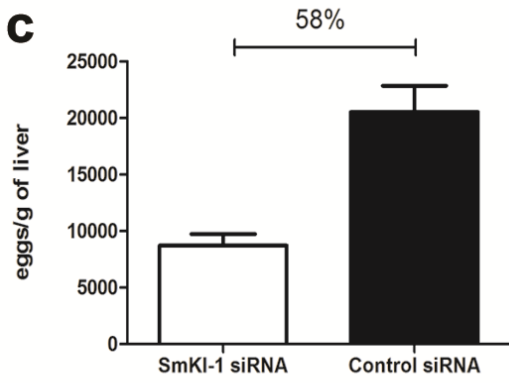
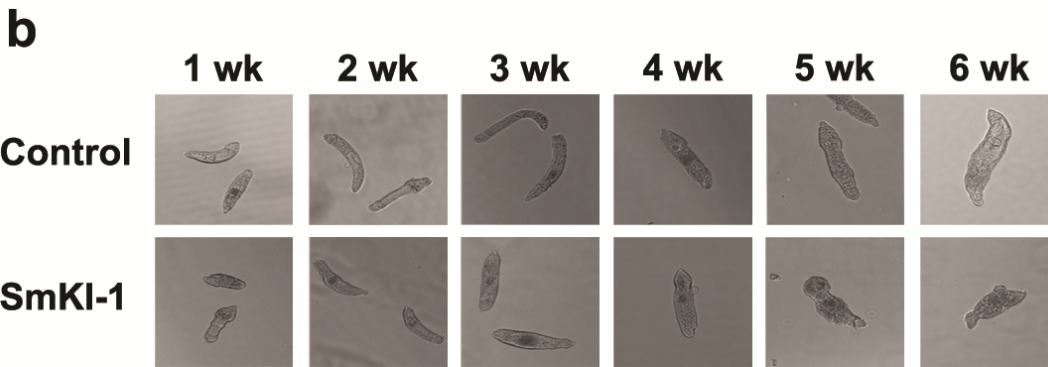
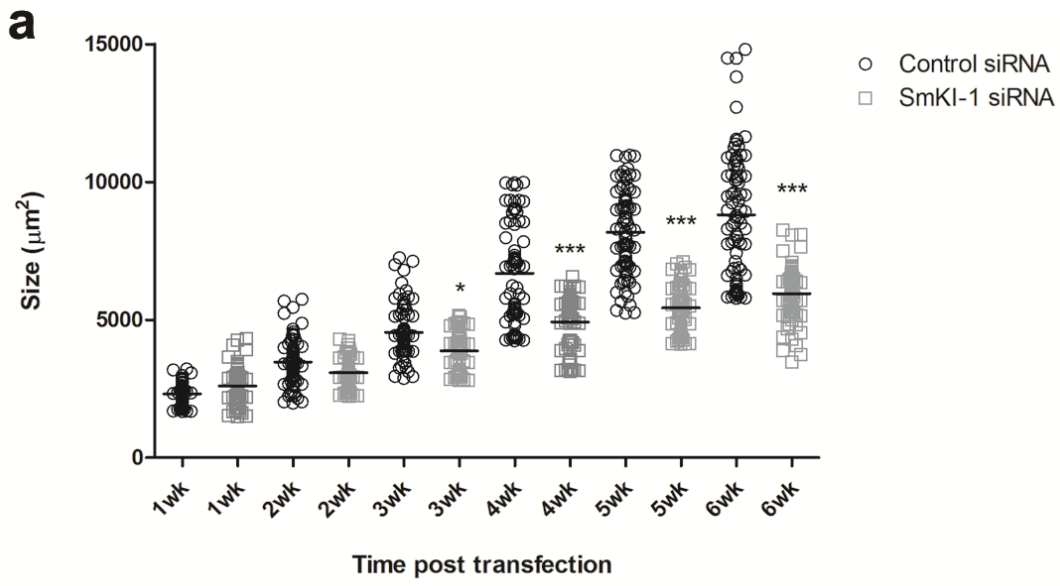
Sup 1

a

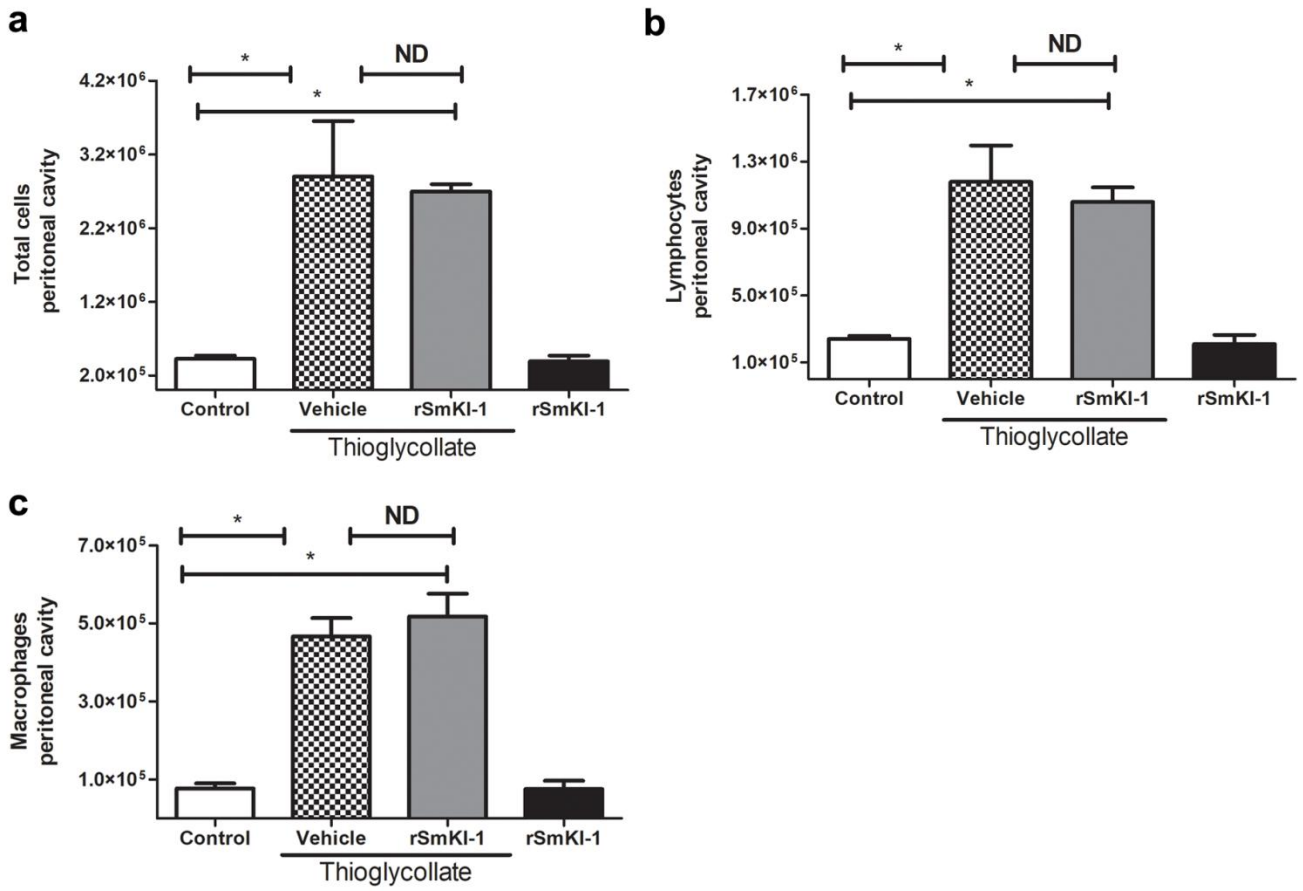
MRKGNSDCLLDYDEGICRALLKRFYYDSVNQTCEIFY[↓]
GGCLGNGNNFLSKDECERKCGGQTNRTETSSETSKQ
 METISTSIDKSDNSETTITTQKPLSVGAKIVLGILDIKNK
 VSNLFKKIKGEKLE

b**c****d****e****f**

Sup 2



Sup 3



Sup 4

