

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Parasitologia

Karine Ferreira Lopes

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UM ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO,
USANDO ANTÍGENO MULTIEPÍTOPOS, PARA O DIAGNÓSTICO
LABORATORIAL DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI**

Belo Horizonte
2020

Karine Ferreira Lopes

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UM ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO,
USANDO ANTÍGENO MULTIEPÍTOPOS, PARA O DIAGNÓSTICO
LABORATORIAL DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Parasitologia.

Orientador: Dr. Stefan Michael Geiger

Coorientador: Dr. Edward Oliveira

Área de concentração: Helminologia

**Belo Horizonte
2020**

043

Lopes, Karine Ferreira.

Desenvolvimento e avaliação de um ensaio imunoenzimático, usando antígeno multiepítomos, para o diagnóstico laboratorial da esquistossomose mansoni [manuscrito] / Karine Ferreira Lopes. – 2020.

131 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Stefan Michael Geiger. Coorientador: Dr. Edward Oliveira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. Schistosoma mansoni. 3. Diagnóstico. 4. Sorologia. 5. Carga Parasitária. 6. Epítomos. I. Geiger, Stefan Michael. II. Oliveira, Edward José de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COLEGIADO DO PROGRAMA DE GRADUAÇÃO PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

DISSERTAÇÃO 405/03/2020

TÍTULO: "DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UM ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO, USANDO ANTÍGENO MULTIEPÍTOPOS, PARA O DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI"

ALUNA: KARINE FERREIRA LOPES

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: HELMINTOLOGIA

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **dezenove de fevereiro de 2020**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes doutores:

Rafaella Fortini Grenfell

IRR/FIOCRUZ

Deborah Aparecida Negrão-Corrêa

UFMG

Edward José de Oliveira- Coorientador

IRR/FIOCRUZ

Stefan Michael Geiger- Orientador

UFMG

Belo Horizonte, 19 de fevereiro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Helida Monteiro de Andrade, Coordenador(a)**, em 07/11/2023, às 10:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2777273** e o código CRC **84919F88**.

*Dedico ao meu tão amado pai, **Paulo Estevão**
Lopes, meu porto seguro e a maior razão de
todas as minhas conquistas.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço ao Mestre Jesus e ao meu Anjo da Guarda, que me guiaram pelo bom caminho, sempre com muito zelo e proteção;

Ao meu orientador, Dr. Stefan Michael Geiger, por ter me recebido em seu laboratório sem nenhum receio, o que foi de extrema importância para a ampliação dos meus horizontes. Obrigada pela oportunidade de realizar os trabalhos de campo e por me mostrar o outro lado da pesquisa. Lembrarei-me sempre de todo conhecimento adquirido;

Ao meu coorientador, Dr. Edward Oliveira, pelos maravilhosos quatro anos de trabalho, pela oportunidade e confiança para a realização deste e de outros projetos. Obrigada por todos os ensinamentos transmitidos com muito carinho e paciência, os quais ultrapassaram as barreiras científicas;

Ao meu pai, Paulo, por ser uma fonte inesgotável de amor e incentivo. Obrigada por estar ao meu lado a cada segundo da minha caminhada, que se iniciou há muitos anos. Obrigada pelos ensinamentos, por vibrar por cada conquista, por ser meu refúgio e minha calma nos momentos difíceis;

À minha mãe, Josi, pelo orgulho e confiança no meu trabalho. Obrigada por nossas conversas diárias, sejam elas de desabafo ou apenas para nos divertir com assuntos aleatórios.

Aos meus irmãos, Jéssica, Pablo, Lorena e Sara, pela união e companheirismo em todos os momentos;

À minha mãeadrasta Fabiana, uma amiga e segunda mãe que a vida me deu. Obrigada por sua imensa alegria, que contagia a todos ao seu redor. É evidente o quanto o nosso lar se tornou mais feliz desde a sua chegada. Serei eternamente grata pelo seu apoio e pelos sábios conselhos;

Ao meu amor, Fabiano, uma pessoa maravilhosa que eu tive a chance de conhecer. Ao escolher viver comigo, você aceitou dividir todos os bons e difíceis momentos. Obrigada pelo apoio, pela confiança e, principalmente, pela paciência;

Aos meus tios Rosa e Jacob, pelo apoio incondicional e por todo o suporte prestado desde o início da minha vida acadêmica, que me permitiu chegar até aqui. Agradeço pelos maravilhosos encontros, que tanto me divertem e me aliviam a tensão;

À minha avó Laurita e meus tios Josimar e Onofre, pelas orações que tanto me ajudaram e protegeram;

À minha amiga e irmã Jéssica, por mais de dez anos de amizade. Obrigada por ser tão compreensiva e por sempre me apoiar em todas as minhas escolhas. Apesar de não termos um contato diário, nossa amizade segue firme e regada de muito amor;

À minha sogra, Silvana, por me lembrar a importância da fé, por estar sempre à disposição para me ouvir e pelos sábios conselhos. Obrigada pelo cuidado e por me proporcionar as melhores condições para o cumprimento de todas as minhas tarefas;

Aos meus amigos Estefânia, Glayson e Dayane, que trago comigo desde a graduação, pelo apoio e refúgio e, apesar da distância, pela presença diária na minha vida;

Aos meus amigos e segunda família, Patrícia, Giovanni, Ilza, Francisco, Renata, Sophia e Isabella, por terem me acolhido em suas vidas e por todo o apoio a mim prestados;

Aos alunos do Laboratório de Helminoses Intestinais, especialmente à Dayane, Paulo e Vanessa, com quem dividi diariamente parte da minha rotina de desenvolvimento deste trabalho;

Aos colegas do Grupo de Pesquisa Clínica e Política Pública em Doenças Infecciosas e Parasitárias, especialmente à Mariana, Carolina, Líndicy, Verônica e Bruna, com quem partilho minhas atividades desde a graduação. Obrigada por toda ajuda prestada ao longo desses quatro anos e pela presença em cada passo dado;

À Mariana Freire, por toda ajuda e apoio nesses anos de vida científica. Obrigada pela disposição com a realização dos experimentos, por sanar minhas dúvidas e me acompanhar nos momentos de insegurança. A minha entrada no curso de mestrado e os próximos passos que darei após esta etapa é, em grande parte, devido a você.

À Dayane Souza, que me acompanhou em todos os ensaios sempre me oferecendo grande apoio na escrita e interpretação dos resultados;

Ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia, especialmente à Sibeles e Sumara; à Universidade Federal de Minas Gerais e ao Instituto René Rachou pela oportunidade e suporte prestado para a realização deste trabalho;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de fomento, que permitiu uma dedicação exclusiva à realização deste trabalho. Ao Programa de Apoio à Pesquisa Estratégica em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (PAPES/FIOCRUZ) e ao Programa de pesquisa para o SUS: Gestão compartilhada em saúde – PPSUS MS/CNPQ/FAPEMIG/SES, pelo financiamento do projeto;

E a todos os envolvidos direta e indiretamente para a concretização deste trabalho.

(...) “Os pais são um porto seguro para os filhos até que eles se tornem independentes. Embora possam pensar que o lugar mais seguro para as crianças é junto deles, os filhos devem ser preparados para navegar mar adentro, enfrentando bom e mau tempo para atingir seus objetivos” (...)

Içami Tiba

RESUMO

A esquistossomose mansoni é uma doença de evolução crônica, causada pelo parasito *Schistosoma mansoni*, que ainda representa um sério problema de saúde pública no Brasil. O diagnóstico laboratorial da esquistossomose mansoni, realizado por meio da detecção de ovos do parasito nas fezes, apresenta baixa sensibilidade quando aplicado em indivíduos com baixa carga parasitária, o que dificulta o controle e erradicação da doença. Os testes sorológicos podem ser mais sensíveis para o diagnóstico da infecção, principalmente quando se faz uso de antígenos recombinantes. Esses antígenos podem conter epítomos específicos de uma ou mais proteínas, aumentando a sensibilidade e especificidade do teste. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi desenvolver e avaliar um ensaio imunoenzimático de ELISA, usando um antígeno multiepítomos, produzido através da tecnologia do DNA recombinante. Para isso, as sequências de aminoácidos da catepsina B e da asparaginil endopeptidase de *S. mansoni* foram submetidas à predição de epítomos de células B usando os preditores BepiPred 2.0 e o método de antigenicidade descrito por Kolaskar & Tongaonkar, para selecionar as regiões peptídicas com maior potencial antigênico. Juntamente com sequências peptídicas obtidas de trabalhos anteriores, estas foram retrotraduzidas em sequências nucleotídicas e utilizadas na construção de um minigene. O minigene foi inserido no plasmídeo pET28a e a construção foi transformada em *E. coli* BL21(DE3) pLysS, para produção do antígeno multiepítomos em larga escala. Após análise de solubilidade, o antígeno recombinante foi purificado por cromatografia de afinidade com resina sensibilizada com níquel, em condições desnaturantes. Em seguida, esse antígeno foi renaturado por meio de diálise contra soluções de ureia em concentrações decrescentes. Esse antígeno foi utilizado para sensibilizar microplacas de poliestireno em uma concentração ótima, previamente determinada por titulação em bloco contra diferentes diluições de soros controles positivos, negativos e conjugado anti-IgG-peroxidase, para padronizar um ensaio de ELISA, denominado ELISA IgG anti-SmME. O desempenho do ELISA IgG anti-SmME foi avaliado em usando 118 amostras de soro de participantes positivos e negativos para esquistossomose, além de amostras de participantes com outras helmintoses. Posteriormente, o ensaio foi aplicado em amostras de indivíduos antes e após três, seis e doze meses de tratamento com praziquantel, para avaliar o nível de anticorpos IgG em indivíduos ovo-negativos e reinfetados. Usando um ponto de corte definido pela análise da curva ROC (Receiver Operating Curve), o ELISA IgG anti-SmME apresentou sensibilidade de 68%, especificidade de 66% e acurácia diagnóstica de 67%. A maioria dos participantes com esquistossomose mansoni apresentou baixa carga parasitária. Nesses participantes o ELISA IgG anti-SmME apresentou 68% de sensibilidade na detecção dos indivíduos com ≤ 12 opg (ovos por grama de fezes) e 67% na detecção dos indivíduos com 13-99 opg. Nos pacientes ovo-positivos para *S. mansoni* e tratados com praziquantel, não foi possível observar queda nos níveis de anticorpos, mesmo até 12 meses após tratamento. Vale destacar que esse foi o primeiro estudo usando um antígeno recombinante multiepítomos no ensaio de ELISA, para diagnóstico da esquistossomose mansoni. O mesmo demonstrou aplicabilidade no diagnóstico de indivíduos com baixa carga parasitária. Nesse sentido, novos trabalhos deverão ser realizados para melhorar o desempenho do ELISA IgG anti-SmME e torná-lo uma alternativa para o diagnóstico laboratorial da esquistossomose mansoni.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*. Diagnóstico. Antígeno multiepítomos. Sorologia. Baixa carga parasitária.

ABSTRACT

Intestinal schistosomiasis is a chronic disease, caused by the parasite *Schistosoma mansoni*, which still represents a serious public health problem in Brazil. The laboratory diagnosis of intestinal schistosomiasis, carried out by detecting parasite eggs in feces, has low sensitivity when applied to individuals with low parasitic load, which represents an obstacle for control and eradication of the disease. Serological tests can be more sensitive for the diagnosis of infection, especially when using recombinant antigens. These antigens can contain specific epitopes of one or more proteins, increasing the sensitivity and specificity of the test. Therefore, the objective of this work was to develop and evaluate an ELISA-based immunoenzymatic assay, using a multi-epitope antigen, produced with recombinant DNA technology. For this, the amino acid sequences of *S. mansoni* cathepsin B and asparaginyl endopeptidase were submitted for the prediction of B cell epitopes using the BepiPred 2.0 and the antigenicity prediction method described by Kolaskar & Tongaonkar, to select the peptide regions with higher antigenic potential. Together with peptide sequences obtained from previous works, these sequences were backtranslated into nucleotide sequences and used in the construction of a minigene. The minigene was inserted into plasmid pET28a and the construct was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, for large-scale production. After solubility analysis, the recombinant antigen was purified under denaturing conditions by nickel-sensitized resin affinity chromatography. Then, the antigen was renatured by means of dialysis against urea solutions in decreasing concentrations. This antigen was used to coat polystyrene microplates in an optimal concentration, previously determined by block titration against different dilutions of positive, negative control sera and anti-IgG-peroxidase conjugate, to standardize an ELISA assay, called ELISA IgG anti-SmME. The performance of the ELISA IgG anti-SmME was evaluated using sera from 118 positive and negative individuals for schistosomiasis. In addition, samples from individuals with other helminths were used. Subsequently, the assay was tested against serum samples from individuals before and three, six and twelve months after treatment with praziquantel, to assess the level of IgG antibodies in egg-negative and reinfected individuals. The cut-off point was defined by ROC (Receiver Operating Curve) analysis and the ELISA IgG anti-SmME resulted in a sensitivity of 68%, specificity of 66% and diagnostic accuracy of 67%. Most of the *S. mansoni*-infected individuals had a low parasitic burden. In their serum samples, the ELISA IgG anti-SmME showed 68% sensitivity for individuals with egg counts of ≤ 12 epg (eggs per gram feces) and 67% for individuals with 13-99 epg. In egg-positive individuals treated with praziquantel, no drop in antibody reactivity was observed, even up to 12 months after treatment. It is worth mentioning that, for the diagnosis of intestinal schistosomiasis, this was the first study using a multi-epitope recombinant antigen in an ELISA assay. It demonstrated applicability in the diagnosis of individuals with low parasitic load. In this sense, further work should be carried out to improve the performance of the ELISA IgG anti-SmME and make it an alternative for the laboratory diagnosis of schistosomiasis.

Key words: *Schistosoma mansoni*. Diagnosis. Multi-epitope antigen. Serology. Low parasite load.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição geográfica das espécies de <i>Schistosoma</i> no mundo	18
Figura 2 - Distribuição geográfica da esquistossomose mansoni no Brasil no período de 2009 a 2017	22
Figura 3 - Ciclo Biológico de <i>Schistosoma mansoni</i>	23
Figura 4 - Análise preditiva da antigenicidade da catepsina B, segundo o método de Kolaskar & Tongaonkar (1990).....	43
Figura 5 - Predição de epítomos lineares de células B da catepsina B, através do método BepiPred 2.0	43
Figura 6 - Análise preditiva de antigenicidade da asparaginil endopeptidase de acordo com o método de Kolaskar e Tongaonkar (1990)	44
Figura 7 - Predição de epítomos lineares de células B da asparaginil endopeptidase usando o método BepiPred 2.0	44
Figura 8 - Mapa do vetor de expressão pET-28a(+)......	49
Figura 9 - Expressão proteica em sistema pET	51
Figura 10 - Propriedades físico-químicas do antígeno P1-P5	67
Figura 11 - Gel de poliacrilamida a 6% dos produtos da digestão da construção pET28a-P1-P5, com as enzimas <i>Bam</i> HI e <i>Hind</i> III.....	68
Figura 12 - Perfil eletroforético em SDS-PAGE a 12% e <i>Western blotting</i> do extrato bacteriano	69
Figura 13 - Análise de solubilidade do antígeno P1-P5 em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12%.....	70

Figura 14 - Análise do gel de poliacrilamida a 12%, referente às frações eluídas na purificação por cromatografia de afinidade em coluna sensibilizada com níquel, após coloração com Coomassie Blue 71

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curva padrão construída para determinação da concentração proteica do antígeno multiepítomos	72
Gráfico 2 - Padronização do ELISA IgG anti-SmME.....	74
Gráfico 3 - Proporção de participantes infectados por <i>S. mansoni</i> em relação ao gênero.....	75
Gráfico 4 - Proporção de participantes infectados e não infectados por <i>S. mansoni</i> em relação à faixa etária.	76
Gráfico 5 - Curva ROC do ELISA IgG anti-SmME.	77
Gráfico 6 - Detecção de anticorpos IgG, por meio do ensaio de ELISA IgG anti-SmME, nos grupos de participantes positivos e negativos para esquistossomose mansoni	78
Gráfico 7 - Imunorreatividade de anticorpos IgG contra o antígeno multiepítomos, definida pelo ELISA IgG anti-SmME, em subgrupos de indivíduos positivos para esquistossomose mansoni, estratificados pela carga parasitária	81
Gráfico 8 - Detecção de anticorpos IgG pelo ELISA IgG anti-SmME nos grupos de participantes positivos (Pos), negativos de área endêmica (Neg E), negativos de área não endêmica (Neg NE) e de indivíduos com infecção por outros helmintos (Outros H).....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Peptídeos potencialmente antigênicos, utilizados na construção do antígeno multiepítomos	46
Tabela 2 - Relação entre o índice <i>kappa</i> e a força de concordância do teste diagnóstico.....	66
Tabela 3 - Concentração proteica das alíquotas de antígeno eluídas após a purificação	72
Tabela 4 - Proporção de infecção dos indivíduos avaliados por meio de testes parasitológicos	76
Tabela 5 - Desempenho do ELISA IgG anti-SmME usando o teste de referência (duas lâminas de Kato-Katz a partir de uma amostra fecal ou pelas técnicas Helmintex® e gradiente salínico), para classificar infectados e não infectados por <i>S. mansoni</i>	78

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

β-ME	β-mercaptoetanol
ASC	Área sob a curva
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albumina de soro bovino. Do inglês: <i>bovine serum albumin</i>
CAA	Antígeno anódico circulante. Do inglês: <i>circulating anodic antigen</i>
CCA	Antígeno catódico circulante. Do inglês: <i>circulating cathodic antigen</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar. Do inglês: <i>complementary desoxiribonucleic acid</i>
DALYs	Anos de vida ajustados por incapacidade. Do inglês: <i>Disability-Adjusted Life Years</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico. Do inglês: <i>desoxiribonucleic acid</i>
DO	Densidade óptica
DTNs	Doenças Tropicais Negligenciadas
ELISA	Ensaio imunoenzimático de enzima ligada. Do inglês: <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ELISA IgG anti-SmME	Ensaio imunoenzimático adsorvido com antígeno multiepitópos
ELISA-Pp	Ensaio imunoenzimático adsorvido com peptídeo sintético
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IEDB	<i>Immune Epitope Database and Analysis Resource</i>
IFN-γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IPTG	Isopropil tio-β-tiogalactopiranosídeo
KDa	kilodalton
LB-ágar	Meio Luria-Bertani-ágar
Meio TB	Meio <i>Terrific Broth</i>
ml	Mililitro
mM	Milimolar
Neg E	Amostras de área endêmica negativas para esquistossomose mansoni
Neg NNE	Amostras de área não endêmica negativas para esquistossomose mansoni
Ng	Nanograma
Nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPG	Ovos por grama de fezes

ORF	Leitura de Fase Aberta. Do inglês: <i>open reading frame</i>
PCE	Programa de Controle da Esquistossomose
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase. Do inglês: <i>polymerase chain reaction</i>
PECE	Programa Especial de Controle da Esquistossomose
PC	Ponto de corte
POC-CCA	<i>Point-of-Care Circulating Cathodic Antigen</i>
POS	Amostras positivas para esquistossomose mansoni
PZQ	Praziquantel
ROC	Características de Operação do Receptor. Do inglês: <i>receiver operating characteristic</i>
RPM	Rotações por minuto
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio, do inglês: <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEA	Antígeno solúvel do ovo. Do inglês: <i>soluble egg antigen</i>
SISPCE	Sistema de Informação do Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose
Sm31	Catepsina de <i>Schistosoma mansoni</i>
Sm32	Asparaginil endopeptidase de <i>Schistosoma mansoni</i>
STF	Salina tamponada com fosfato
STF-T	Salina tamponada com fosfato contendo Tween 20 a 0,05%
SWAP	Preparado de antígeno solúvel de verme adulto. Do inglês: <i>soluble adult worm antigen preparation</i>
TBS	Tampão tris salina. Do inglês: <i>Tris buffered saline</i>
TBS-T	Tampão tris salina contendo Tween 20 a 0,05%
TEMED	N,N,N,N-tetrametiletlenodiamina
Th1	Resposta imune do tipo 1. Do ingles: <i>T helper cells type 1</i>
Th2	Resposta imune do tipo 2. Do ingles: <i>T helper cells type 2</i>
µg	Micrograma
µL	Microlitro
VPN	Valor preditivo negative
VPP	Valor preditivo positivo
WHO	Organização Mundial de Saúde. Do inglês: <i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Esquistossomose no mundo	17
1.2 Esquistossomose no Brasil.....	19
1.3 Ciclo evolutivo.....	22
1.4 Imunopatologia da esquistossomose mansoni	24
1.5 Diagnóstico e controle da esquistossomose mansoni	27
1.6 Clonagem e expressão de proteínas recombinantes	35
2 JUSTIFICATIVA	38
3 OBJETIVOS.....	40
3.1 Objetivo geral.....	40
3.2 Objetivos específicos	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 Fluxograma de estudo	41
4.2 Seleção dos peptídeos potencialmente antigênicos.....	42
4.3 Construção e síntese do minigene.....	48
4.4 Cultivo de bactérias.....	52
4.4.1 Linhagens de <i>E. coli</i>	52
4.4.2 Meios de cultivo para bactérias.....	52
4.4.3 Procedimento de competência das linhagens bacterianas.....	52
4.4.4 Transformação das bactérias	53
4.5 Confirmação da transformação bacteriana.....	53
4.5.1 Extração do DNA plasmidial	53
4.5.2 Reação de restrição enzimática	54
4.5.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%	54
4.6 Expressão e purificação do antígeno recombinante.....	55
4.6.1 Cinética de expressão do antígeno multiepítotos	55
4.6.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%	55
4.6.3 <i>Western blotting</i>	56
4.6.4 Expressão em maior escala do antígeno multiepítotos	57
4.6.5 Análise de solubilidade do antígeno multiepítotos	57
4.6.6 Purificação do antígeno multiepítotos sob condições desnaturantes	57
4.6.7 Dosagem proteica pelo método do BCA.....	58
4.6.8 Renaturação do antígeno recombinante purificado.....	59

4.7	Padronização do ensaio de ELISA.....	59
4.8	População e área de estudo	60
4.8.1	Mesorregião Norte de Minas Gerais	60
4.8.2	Mesorregião Metropolitana de Belo Horizonte	61
4.8.3	Mesorregião Nordeste do Pará	61
4.9	Aspectos éticos.....	61
4.10	Coleta das amostras.....	62
4.11	Processamento das amostras	62
4.12	Aplicação do antígeno multiepítomos no diagnóstico da esquistossomose mansoni	62
4.12.1	Avaliação de desempenho diagnóstico do ELISA IgG anti-SmME.....	62
4.12.2	Avaliação do nível de anticorpos IgG após o tratamento	64
4.13	Análise estatística	65
5	RESULTADOS	67
5.1	Produção do antígeno recombinante.....	67
5.1.1	Construção do minigene multiepítomos.....	67
5.1.2	Confirmação da transformação bacteriana.....	68
5.1.3	Cinética de expressão do antígeno multiepítomos	68
5.1.4	Expressão em maior escala e purificação do antígeno multiepítomos.....	69
5.1.5	Renaturação do antígeno multiepítomos	71
5.2	Padronização do ELISA IgG anti-SmME.....	72
5.3	Avaliação do desempenho diagnóstico do ELISA IgG anti-SmME.....	74
5.3.1	Caracterização dos indivíduos do estudo, testados pelo ELISA IgG anti-SmME	74
5.3.2	Desempenho do ELISA IgG anti-SmME para o diagnóstico da esquistossomose mansoni	
	76	
5.3.3	Avaliação do nível de anticorpos IgG após tratamento com praziquantel.....	82
6	DISCUSSÃO.....	84
7	CONCLUSÃO.....	93
8	PERSPECTIVAS.....	94
9	REFERÊNCIAS.....	95
	APÊNDICE A – Formulação das soluções utilizadas	119
	ANEXO A – Certificado de análise do minigene P1-P5.....	123
	ANEXO B – Sequenciamento do plasmídeo pET-28a(+) com o minigene P1-P5.....	125
	ANEXO C – Alinhamento do antígeno multiepítomos com a catepsina B humana.....	127

1 INTRODUÇÃO

1.1 Esquistossomose no mundo

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) são aquelas provocadas por agentes infecciosos e parasitários e são consideradas endêmicas em populações de baixo nível socioeconômico. Essas doenças ocorrem principalmente em áreas rurais e em algumas áreas urbanas pobres de países de baixa renda na África, Ásia e América Latina (HOTEZ et al., 2007). São ditas negligenciadas devido à falta de investimentos por parte do governo e das indústrias no desenvolvimento de produtos e tecnologias para aplicação no diagnóstico, tratamento, prevenção e controle dessas doenças (HOTEZ et al., 2006). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), nesta categoria estão inclusas as seguintes enfermidades: as leishmanioses, doença de Chagas, tripanossomíase humana africana, hanseníase, oncocercose, filariose, cisticercose, tracoma, dengue, raiva, infecções orais causadas por trematódeos, geohelmintoses e esquistossomose (WHO, 2017).

O Brasil é responsável por grande parte dos casos de DTNs na América Latina, incluindo doença de Chagas (25%), leishmaniose cutânea (39%), dengue (40%), hanseníase (86%), leishmaniose visceral (93%) e esquistossomose (96%) (HOTEZ & FUJIWARA, 2014), sendo que a maior parte dos casos ocorre, principalmente, nas regiões norte e nordeste do país (LINDOSO & LINDOSO, 2009). Dentre as doenças parasitárias, a esquistossomose é a segunda doença mais devastadora, perdendo apenas para a malária, em termos de impacto em saúde pública (WALL et al., 2018). Em 2015, a esquistossomose ocupou a terceira posição na lista das doenças negligenciadas, com 3,51 milhões de anos de vida perdidos por incapacidade (DALYs) (WHO, 2017).

A esquistossomose ainda é um crescente problema de saúde pública, sendo endêmica em 78 países, com mais de 200 milhões de pessoas infectadas (WHO, 2016). Desses, sete países necessitam de atualização de sua situação epidemiológica para fins de planejamento e implementação de medidas de controle, 19 necessitam de avaliação para verificar a interrupção da transmissão e 52 necessitam de implementação da quimioterapia preventiva, feita por meio da administração em massa de medicamento (WHO, 2013). No continente americano, a Venezuela e o Brasil estão entre os países que ainda requerem a quimioterapia preventiva. Entretanto, apenas o Brasil reportou os dados à OMS, no qual 615 crianças e 3.282 adultos foram tratados em 2017 (WHO, 2018).

Em 2012 foi firmada a declaração de Londres, na qual várias organizações públicas e privadas se comprometeram a eliminar dez das dezoito doenças negligenciadas até o ano de

2020. Através da resolução WHA65.21 foi estabelecido um plano de ação para a eliminação da esquistossomose, apoiado em várias estratégias, como o fornecimento de saneamento básico e distribuição de água potável para a população, educação em saúde, controle dos hospedeiros intermediários, diagnóstico dos infectados, dentre outras (WHO, 2012). No Brasil, o Ministério da Saúde tem o compromisso de cumprir as metas do Plano Estratégico da OMS 2012-2020. O objetivo é alcançar o controle da morbidade até 2020, com a redução da prevalência das infecções de alta intensidade para menos de 5% e a eliminação da esquistossomose como problema de saúde pública, com a redução dessa prevalência para menos de 1% até 2025 (WHO, 2013).

A esquistossomose é uma doença de evolução crônica, causada por parasitos trematódeos digenéticos do gênero *Schistosoma*. O ser humano é o principal hospedeiro definitivo e diferentes espécies de caramujos de água doce atuam como hospedeiro intermediário do parasito (STEINMANN et al., 2006). Cinco espécies do parasito são capazes de causar a esquistossomose em humanos: *S. haematobium*, *S. japonicum* e *S. mansoni*, que são mais amplamente distribuídas e *S. intercalatum* e *S. mekongi*, que ocorrem em áreas restritas (Figura 1).

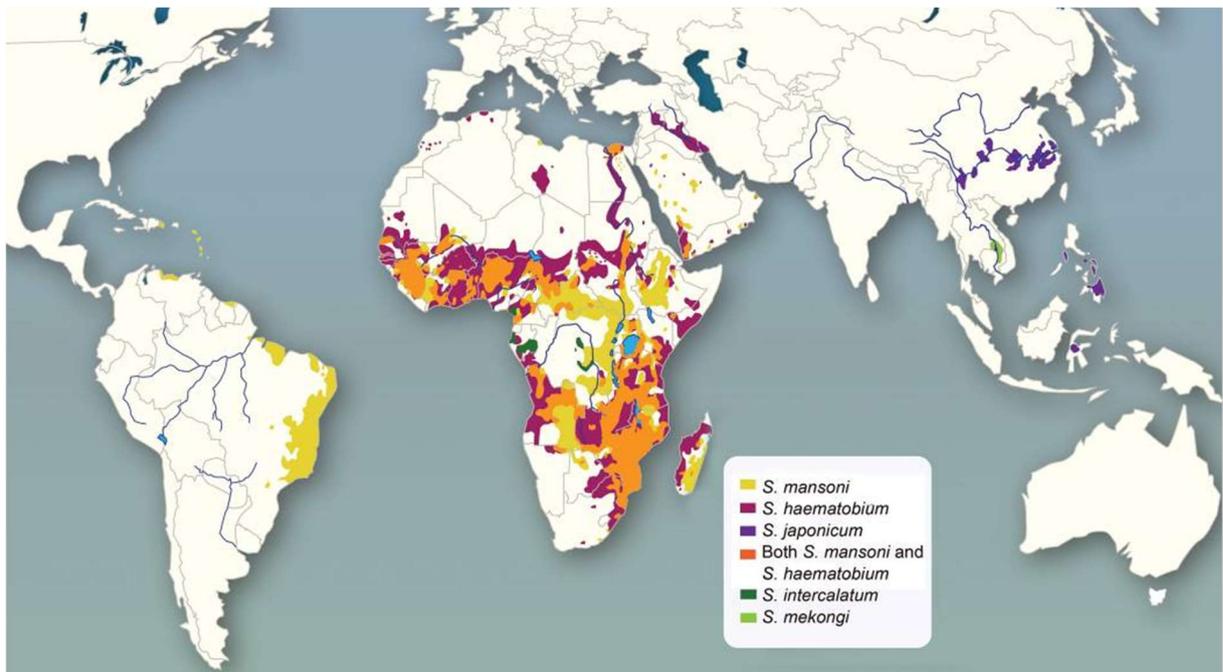


Figura 1: Distribuição geográfica das espécies de *Schistosoma* no mundo. Fonte: Weerakoon et al., 2015.

A espécie *S. haematobium* é responsável pela forma vesical da doença e é endêmica em toda a região da África Subsaariana (EZEH et al., 2019). Os hospedeiros intermediários desta espécie são moluscos do gênero *Bulinus* e, no hospedeiro definitivo, os parasitos vivem no

plexo venoso vesical, que envolve a porção inferior da bexiga e a base da próstata, onde ocorre a oviposição (SHEBEL et al., 2012).

O *S. japonicum* é endêmico no sudeste asiático e na região do Pacífico, principalmente na China, Indonésia e Filipinas (LETTE & TEMESGEN, 2007; SIDDIQUI & SIDDIQUI, 2017). No hospedeiro definitivo, o parasito habita o plexo venoso mesentérico e os ovos são eliminados nas fezes (GRYSEELS et al. 2006). Seu hospedeiro intermediário são caramujos do gênero *Oncomelania* (GUO-JING et al. 2005).

Já a espécie *S. mansoni*, que também causa a forma intestinal da doença, está presente na África, América do Sul, incluindo o Brasil e na América Central, nas Ilhas do Caribe (GRIMES et al., 2015) e seu hospedeiro intermediário são caramujos do gênero *Biomphalaria* (BRUMPT, 1941). As outras espécies de *Schistosoma* apresentam transmissão focal e, por isso, têm menor importância epidemiológica (COLLEY et al., 2012).

1.2 Esquistossomose no Brasil

O parasito *S. mansoni*, agente da esquistossomose mansoni, é a única espécie endêmica no Brasil. Historicamente, acredita-se que a doença foi introduzida no país durante o intenso fluxo migratório e pelo tráfico de escravos africanos durante o período colonial (COURA & AMARAL, 2004). Grande parte destes escravos certamente estava infectada por diferentes espécies do parasito e, apesar das condições ambientais favoráveis, apenas o *S. mansoni* conseguiu se estabelecer no país, devido à presença de pelo menos três espécies de moluscos do gênero *Biomphalaria*, que atuam como hospedeiros intermediários do parasito: *B. glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila* (LUTZ, 1918).

O trematódeo *S. mansoni* foi descrito e nomeado em 1907, por Sambon, em homenagem a Patrick Manson. Entretanto, foi Manoel Pirajá da Silva, médico baiano, quem realmente descreveu, pela primeira vez, os parasitos desta espécie, visto que o espécime examinado por Sambon estava em péssimas condições. Em 1908, Pirajá da Silva diagnosticou 20 casos por meio do exame de fezes e realizou necropsias em três destes indivíduos que vieram a óbito, tornando possível a descrição detalhada de vermes adultos e do ovo com espículo lateral, permitindo a diferenciação de *S. mansoni* e *S. haematobium* (SILVA, 1908).

Diversos fatores ainda contribuem para a transmissão e expansão da esquistossomose no país: o clima tropical é uma condição ideal para a manutenção do ciclo evolutivo do parasito; a falta de saneamento básico faz com que os dejetos do hospedeiro definitivo sejam eliminados diretamente no meio ambiente, contaminando fontes de água doce que servem de criadouros para o hospedeiro intermediário; os caramujos são resistentes às condições adversas do

ambiente, entrando em processo de diapausa, por exemplo; a falta de educação sanitária da população que vive em áreas de risco, com relação à forma de infecção e profilaxia e, por fim, migrações de pessoas residentes em áreas endêmicas para áreas não endêmicas (BRASIL, 2014).

Um dos principais avanços no controle da esquistossomose no país foi a criação do Programa Especial de Controle da Esquistossomose (PECE), em 1975, com o objetivo inicial de controlar a doença em seis estados do nordeste. Embora a metodologia fosse variável de estado para estado, o programa se baseou, principalmente, na quimioterapia e na aplicação de moluscicida em criadouros de caramujos (KATZ, 1998). Em 1980, o PECE perdeu as características de um programa especial e se tornou um programa de rotina do Ministério da Saúde, denominado Programa de Controle da Esquistossomose (PCE). As estratégias de controle se restringiram à quimioterapia em massa, além do estímulo da participação de outros órgãos de saúde pública no diagnóstico e tratamento dos indivíduos infectados (FAVRE et al., 2001).

Segundo a OMS, as estratégias de controle da esquistossomose são dependentes da prevalência da doença em cada área, sendo categorizadas da seguinte forma: em áreas de baixo risco, nas quais a prevalência é $< 10\%$, é realizado o tratamento apenas dos indivíduos infectados; em áreas de risco moderado, onde a prevalência varia de $\geq 20\%$ e $\leq 50\%$, é feito o tratamento de crianças em idade escolar a cada dois anos, além do tratamento de adultos em risco de adquirir a infecção; e, por fim, em áreas de alto risco, nas quais a prevalência alcança níveis $\geq 50\%$, a estratégia é o tratamento de toda a população em risco (WHO, 2013).

No Brasil, as estratégias de controle visam o tratamento apenas dos casos confirmados por meio de exames parasitológicos de fezes, com o uso do Praziquantel (PZQ), em regiões endêmicas com percentual de positividade inferior a 15%. Quando o percentual de positividade está entre 15% e 25%, são tratados os indivíduos com exame parasitológico de fezes positivo e os conviventes e, acima de 25%, são tratados todos os indivíduos da localidade (BRASIL, 2014).

O PZQ foi desenvolvido na década de 70 e é o único fármaco usado no tratamento da esquistossomose (RIDI & TALLIMA, 2013; VALLE et al., 2017). Ele é ativo contra todas as espécies do parasito e é eficaz contra as formas adultas. Apesar de apresentar uma falha terapêutica contra as formas imaturas, o grande valor deste fármaco tem sido atribuído à sua baixa toxicidade e baixo custo (SILVA-MORAES et al., 2013). Desta forma, espera-se minimizar a morbidade e mortalidade da população acometida pela doença, para que estes não sofram com as formas graves. A determinação das áreas de risco e de intervenções, por meio

de levantamentos epidemiológicos, juntamente ao tratamento, proporciona um controle integrado da doença (BRASIL, 2014).

De fato, as medidas regulares de controle da esquistossomose impactaram diretamente na prevalência e na intensidade das infecções, reduzindo o número de óbitos e de ocorrência de formas graves da doença (BRASIL, 2014). Após a realização de três inquéritos de abrangência nacional conduzidos no Brasil, o primeiro por Pellon & Teixeira (1947-1952), seguido pelo PECE (1975-1979) e o último pelo Ministério da Saúde e Fiocruz, com o Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geo-helminthoses (2010-2015), percebe-se uma queda na taxa de positividade de 10,09% para 9,24% e 1,79%, respectivamente, com risco moderado de transmissão na maior parte do país. Dentre as razões para esse fato, podemos citar a melhoria no saneamento básico, acesso à água potável e tratamento dos casos identificados por meio do diagnóstico individual (KATZ, 2018). Com a queda da positividade, as áreas de transmissão adquiriram um perfil epidemiológico de baixa endemicidade. A esquistossomose atinge, de forma intensa e moderada, o litoral da região Nordeste, se estendendo do Rio Grande do Norte até o litoral do Espírito Santo, sendo oito estados as principais áreas endêmicas da doença. Em Minas Gerais, a doença ocorre em intensidade variada ao longo do seu território, com destaque para as regiões Nordeste, Norte e Central do estado, onde a positividade alcança níveis superiores a 15% (BRASIL, 2019) (Figura 2).

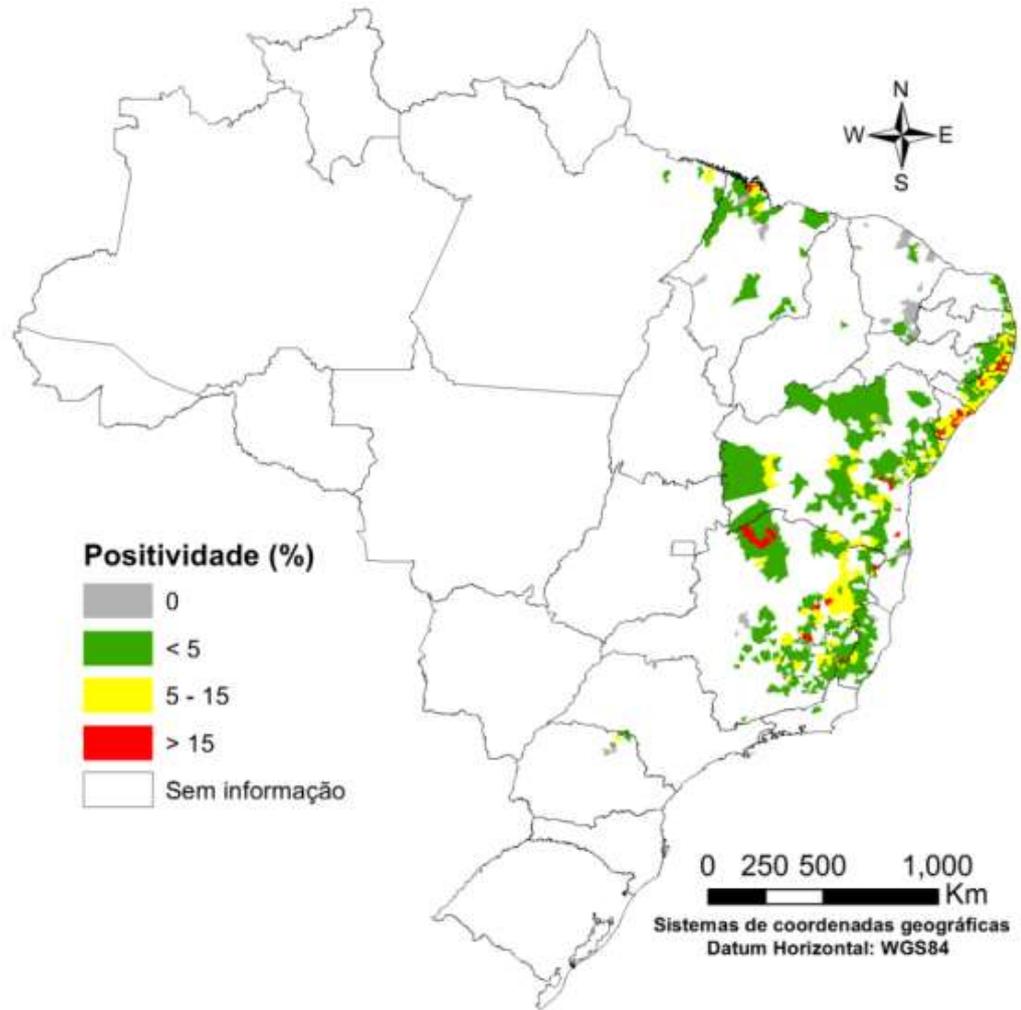


Figura 2: Distribuição geográfica da esquistossomose mansoni no Brasil no período de 2009 a 2017. Fonte: Brasil, 2019.

1.3 Ciclo evolutivo

S. mansoni é um platelminto dioico, com nítido dimorfismo sexual. A fêmea é maior que o macho, que possui uma abertura ventral, denominada canal ginecóforo, onde a fêmea se aloja (SILVA; NEVES & GOMES, 2008). O parasito possui um complexo ciclo evolutivo, apresentando uma fase de reprodução assexuada no hospedeiro intermediário e uma de reprodução sexuada no hospedeiro definitivo (Figura 3).

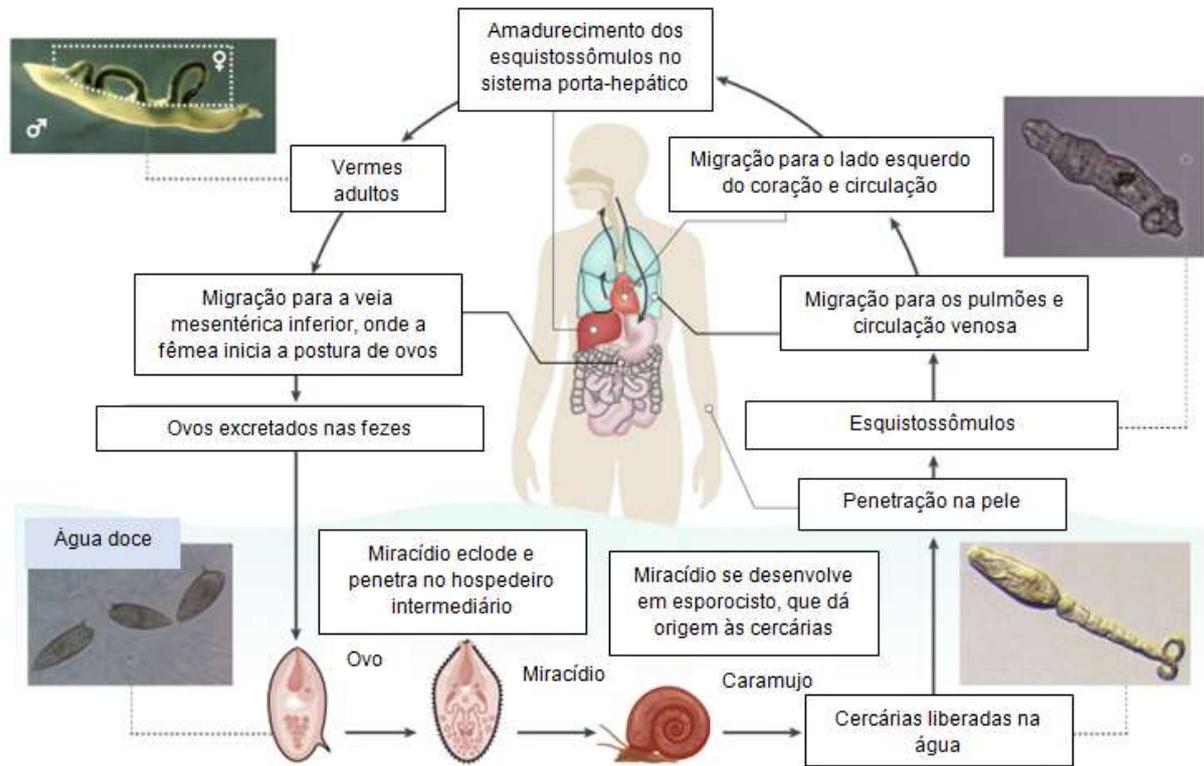


Figura 3: Ciclo Biológico de *Schistosoma mansoni*. Fonte: Adaptado de McManus et al., 2018.

No hospedeiro definitivo, os vermes adultos são encontrados na veia mesentérica inferior, onde a fêmea realiza a oviposição (ROSS et al., 2002). Os ovos de *Schistosoma* spp. têm uma estrutura rígida de células reticuladas e, portanto, não possuem mecanismos próprios de motilidade. Sendo assim, esses ovos dependem de mecanismos externos para atravessar os tecidos do hospedeiro e serem eliminados nas fezes (DEWALICK et al., 2012). Esses mecanismos não são completamente elucidados, apesar de ser um passo essencial no ciclo de vida do parasito. Sabe-se que o processo de excreção é parcialmente dependente da reação imune do hospedeiro dirigida aos ovos (DOENHOFF et al., 1978), mas é provável que mecanismos adicionais estejam envolvidos neste processo (DEWALICK et al., 2014).

Nem todos os ovos postos chegam à luz intestinal. Muitos deles podem ficar retidos na mucosa do intestino ou são transportados pelo fluxo sanguíneo e levados ao fígado. Quando os ovos eliminados junto às fezes atingem o ambiente aquático, sofrem influência da baixa osmolaridade do meio, que, juntamente com os estímulos de temperatura e luminosidade, levam a intensos movimentos larvais. Isso provoca a liberação do miracídio, a forma infectante para o hospedeiro intermediário (COELHO et al., 2008). Esta forma tem grande capacidade de locomoção e quimiotaxia aos moluscos (CHERNIN, 1970; DISSOUS; DISSOUS & CAPRON, 1986). Após a penetração no caramujo, os miracídeos perdem seus cílios e passam por uma

transformação, resultando na produção de esporocistos primários e, por poliembrionia, em esporocistos secundários. Os esporocistos secundários migram para as glândulas digestivas do hospedeiro intermediário, onde cada um dá origem a numerosas cercárias por reprodução assexuada (COLLINS et al., 2011).

O estágio nesse hospedeiro pode durar de três a cinco semanas e após esse período, as cercárias deixam o hospedeiro por meio dos espaços intercelulares e atingem a água durante as horas mais quentes do dia. Uma vez livres na água, as cercárias nadam ativamente até alcançarem um hospedeiro definitivo (HAAS et al. 2002; PAZ, SEQUEIRA & PYRRHO, 2017) e, quando o encontram, penetram ativamente através da pele intacta que se encontra em contato com fontes de água doce contaminada (DUNNE & COOKE, 2005). A cercária possui uma cauda bifurcada, usada para mobilidade na água, e uma cabeça, na qual contém ventosas para fixação na pele do hospedeiro e glândulas contendo enzimas proteolíticas, que facilitam a penetração (WAINE & MCMANUS, 1997).

Durante a penetração, os parasitos perdem a cauda, se transformam em esquistossômulos e migram na circulação sanguínea, passando pelos pulmões, coração e, por fim, chegam ao sistema porta hepático. No sistema porta, os machos e fêmeas se tornam sexualmente maduros, se acasalam e migram juntos para a veia mesentérica inferior (WEERAKOON et al. 2015).

1.4 Imunopatologia da esquistossomose mansoni

Os sintomas da doença dependem do estágio de desenvolvimento do parasito e varia conforme a carga parasitária e a resposta imune do hospedeiro. Dependendo de fatores inerentes ao indivíduo infectado, alguns podem apresentar a forma inaparente (assintomática), especialmente em indivíduos residentes em áreas endêmicas, na qual não há ou apresentam de forma leve os sinais e sintomas da infecção. Em alguns indivíduos, a esquistossomose pode se apresentar sob a forma aguda e evoluir para a forma crônica, se a doença não for diagnosticada e tratada oportunamente. A diferença entre a forma aguda e crônica está relacionada às manifestações clínicas e respostas imunológicas que o indivíduo infectado apresenta (BARSOUM et al., 2013).

Os sintomas clínicos durante a fase aguda geralmente ocorrem em indivíduos residentes em áreas endêmicas que são expostos ao parasito pela primeira vez, sem nenhum contato prévio. Esta se inicia com a penetração das cercárias através da pele e com a resposta imune do hospedeiro definitivo. Durante a penetração, as cercárias liberam diversas moléculas por meio da secreção das glândulas acetabulares, que irão auxiliar neste processo e na transformação em

esquistossômulos (HAAS et al., 1997). Em caso de exposição prévia às cercárias do parasito, a resposta imune inata dá origem a reações de hipersensibilidade e podem levar a uma reação prurídica maculopapular, chamada dermatite cercariana (MCMANUS et al., 2018).

Durante o período pré-patente, ainda na fase aguda da infecção, que corresponde as primeiras 4 a 5 semanas após a exposição às cercárias, a resposta imune é inicialmente inata, seguida de uma resposta primariamente *T-helper* do tipo 1 (Th1), direcionada contra antígenos de vermes. Esta resposta é caracterizada por citocinas pró-inflamatórias circulantes, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 (IL-1), IL-6 e interferon gama (IFN- γ) (PEARCE & MACDONALD, 2002). Os sintomas dessa fase incluem febre, calafrios, anorexia, tosse seca e lesões de pele (LAMBERTUCCI, 2010). Algumas dessas manifestações podem surgir dias após a exposição às cercárias ou cerca de um mês depois, coincidindo com o início da eliminação de ovos nas fezes (RABELLO et al., 1995).

Em áreas endêmicas e na ausência de intervenção, a doença é primariamente crônica e pode durar décadas, devido à constante exposição dos indivíduos às cercárias e à longevidade dos vermes adultos (COLLEY & SECOR, 2014). Os parasitos que residem nos vasos sanguíneos não desencadeiam qualquer resposta inflamatória ou sintomas diretamente e, por isso, não são diagnosticados na fase aguda. Fêmeas de *S. mansoni* e, em menor grau, os pares de vermes, modulam a resposta imune suprimindo o recrutamento de células imunes da resposta inata (SOMBETZKI et al., 2018). Esse fato pode ser explicado pela capacidade dos parasitos de regenerar seu tegumento externo através de células-tronco somáticas (COLLINS et al., 2013), por mimetismo molecular (KEMP et al., 1976) ou por ligação de antígenos do hospedeiro ao tegumento superficial, ocultando os próprios antígenos (GOLDRING et al., 1976).

Entre a sexta e a décima sétima semana de infecção, ocorre uma mudança em relação aos antígenos que o hospedeiro é exposto, período que corresponde ao início da oviposição. Esta etapa é responsável pela mudança para uma resposta dominante do tipo 2 (Th2), com aumento das citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, o que caracteriza a fase crônica da doença. Essas citocinas induzem a produção de imunoglobulina E (IgE) e estas agem como um fator de crescimento e sobrevivência para os eosinófilos (MOSMANN, 1992). Essa resposta atinge um pico em, aproximadamente, oito semanas, quando tende a diminuir com a progressão para a fase crônica da doença (BURKE et al., 2009).

Os antígenos secretados pela camada interna do ovo maduro, o envelope de von Lichtenberg, atravessam os poros dos ovos e se disseminam nas áreas circunvizinhas (ASHTON et al., 2001). Esses antígenos, denominados antígenos solúveis dos ovos (SEA),

provocam uma forte inflamação granulomatosa, caracterizada pela infiltração de macrófagos alternativamente ativados (M ϕ aa), eosinófilos e células Th2, com proliferação de fibroblastos e geração de matriz extracelular (COSTAIN, MACDONALD & SMITS, 2018), levando à formação de granulomas ao redor dos ovos que ficam retidos no tecido circundante. Os granulomas são formados por uma coleção de células inflamatórias, como os eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e macrófagos (MCMANUS et al., 2018) e podem levar à fibrose hepática grave (Fibrose de Symmers) e hipertensão portal (WILSON et al., 2007; SCHWARTZ & FALLON, 2018).

Ao contrário do conhecimento acerca do papel das citocinas na resposta contra o parasito, a participação dos anticorpos na infecção e progressão da doença tem sido pouco investigada. A importância da resposta humoral na patologia da esquistossomose tem sido estudada a partir de infecções experimentais por *S. mansoni* em camundongos deficientes de células B. Apesar de não serem verificadas alterações relacionadas à resposta proliferativa de células T ou no equilíbrio Th1/Th2, a formação do granuloma e fibrose hepática estão aumentadas, além da diminuição da excreção de ovos nas fezes e deficiência na modulação da patologia na fase crônica da doença (JANKOVIC et al., 1998; FAIRFAX et al., 2012).

Os níveis de imunocomplexos circulantes são frequentemente aumentados diante de um quadro infeccioso de curso crônico. Em indivíduos com esquistossomose foi demonstrado que as quatro subclasses de anticorpos IgG estavam presentes na formação de imunocomplexos, com predomínio de IgG₁ na forma crônica leve e de IgG₂, IgG₃ e IgG₄ nos casos crônicos mais graves (JASSIM; CATTY & HASSAN, 1987). Além destes, anticorpos IgM e IgE foram observados nas fases aguda e crônica da doença, respectivamente (BOUT et al., 1977; JASSIM; CATTY & HASSAN, 1987).

Estudos imuno-epidemiológicos indicam que a resistência à reinfeção está associada à imunidade Th2 e conseqüente aumento no nível de anticorpos IgE, bem como o recrutamento e ativação de eosinófilos e mastócitos (JIZ et al., 2009; BLACK et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2012). Alguns autores relataram correlação entre os níveis de anticorpos IgE contra antígenos solúveis de vermes adultos (SWAP) com a proteção e anticorpos IgG₄ contra SEA e SWAP com a susceptibilidade à reinfeção (DUNNE et al., 1992; NAUS et al., 1998; JIZ et al., 2009).

O equilíbrio entre os níveis de anticorpos IgE e IgG₄ favorece a produção de IgE em um microambiente com predomínio de resposta Th2, com presença de baixos níveis de IFN- γ e IL-10 (CAPRON; DOMBROWICZ & CAPRON; 1999). Por outro lado, um microambiente rico em IL-10, o que é visto na infecção por *S. mansoni*, está associado a altos níveis de anticorpos IgG₄ (JESUS et al., 2000). Em outro trabalho, a presença de anticorpos IgE e IgG₄ mostrou uma

tendência de comprometer a resistência associada à IgE isolada, sugerindo que a resposta imune humoral, por meio de anticorpos IgE, é atenuada pelos níveis de anticorpos IgG₄. Anticorpos IgG₄ são fracos indutores de citotoxicidade celular dependente de anticorpo e, hipoteticamente, compete com IgE específica ligada aos eosinófilos e inibe esse mecanismo imunológico protetor (JIZ et al., 2009).

1.5 Diagnóstico e controle da esquistossomose mansoni

Atualmente existem diferentes metodologias disponíveis para o diagnóstico da doença, dentre elas os métodos coproparasitológicos, imunológicos e moleculares. A demonstração direta de ovos eliminados nas fezes, visualizados no microscópio óptico, constitui um diagnóstico de certeza, o que oferece um importante valor a essas metodologias. Apesar de resultados negativos não necessariamente indicarem a ausência de infecção, visto que diversas técnicas apresentam baixa sensibilidade diante de certas circunstâncias, os exames coproparasitológicos são muito utilizados por serem de simples realização, apresentarem alta especificidade, baixo custo e serem facilmente aplicadas em campo (MCMANUS et al., 2018).

Diante da variedade de técnicas diagnósticas desenvolvidas, a técnica de Kato-Katz permanece como a técnica recomendada pela OMS (WHO/PAHO, 2014). Esta técnica se baseia na detecção de ovos do parasito nas fezes do hospedeiro, através de um esfregaço fecal, com um volume equivalente a 41,7 mg de fezes em lâmina de vidro, recoberta por um pedaço de papel celofane embebido em glicerina, contendo verde de malaquita ou azul de metileno. O exame de toda preparação e a contagem dos ovos são feitos em microscópio óptico e o número de ovos encontrados é multiplicado por 24, para se calcular o número de ovos por grama de fezes (opg) (KATZ; CHAVES & PELLEGRINO, 1972).

A técnica de Kato-Katz apresenta um excelente desempenho em áreas com altas (>50%) e moderadas (20-50%) taxas de prevalência (LIM et al., 2018). Entretanto, em áreas onde os programas de controle da morbidade da doença reduziram essas taxas para valores inferiores a 1%, o desempenho da técnica diminui consideravelmente. Isso é devido à baixa sensibilidade em identificar indivíduos com baixa carga parasitária (VLAS & GRYSEELS, 1992), condição que, hoje em dia, retrata a maior parte da população de áreas endêmicas do Brasil (OLIVEIRA et al., 2018).

Várias outras limitações da técnica de Kato-Katz foram descritas por diversos autores. Uma delas é que a sensibilidade também é comprometida após a realização de tratamento e com a variação diária da quantidade de ovos eliminados (YU et al., 2007; DEGAREGE et al., 2014). Com isso, são necessárias diferentes amostras do mesmo indivíduo para que um resultado mais

acurado seja obtido, através da leitura de múltiplas lâminas. Ainda, em áreas de baixa prevalência ou no diagnóstico de indivíduos com baixa carga parasitária, se faz necessário o uso de metodologias complementares para que a positividade se aproxime da real prevalência ou do resultado verdadeiro, nos casos individuais (SIQUEIRA et al., 2011). Outra característica, que compromete a reprodutibilidade da técnica, é a ocorrência de resultados divergentes quando a leitura da lâmina é feita por diferentes examinadores (KONGS et al., 2001; BEHRE et al., 2004). Além disso, a técnica de Kato-Katz não pode ser aplicada em fezes diarreicas, apesar de este ser um sintoma frequente em indivíduos infectados (LAMBERTUCCI, 2010).

Inúmeras outras técnicas parasitológicas encontram-se descritas na literatura, como a técnica de sedimentação espontânea (HPJ), a centrifugação com formol-acetato de etila (TF-Test®) modificado, o Helmintex® e os métodos de eclosão de miracídeos e gradiente salínico. A técnica de sedimentação espontânea foi descrita por Lutz (1919) e padronizada por Hoffmann, Pons e Janer (1934). Neste procedimento, as fezes são homogeneizadas em água e filtradas em uma tela ou gaze cirúrgica, para retenção dos resíduos fecais. Em seguida são deixadas em repouso, para sedimentação espontânea dos ovos de parasitos. Essa técnica qualitativa é amplamente difundida entre os laboratórios de análises clínicas, por ser de fácil execução, baixo custo e permitir o diagnóstico de outras parasitoses (RABELLO et al., 2008).

O TF-Test® (Bio Brasil Ciência e Tecnologia S.A, São Paulo, SP, Brasil) foi desenvolvido inicialmente como uma técnica qualitativa (GOMES et al. 2004), mas um método de quantificação da carga parasitária foi desenvolvido por Siqueira et al. (2011). Três amostras fecais (1500 mg) são filtradas e transferidas para uma solução de formol e acetato de etila. O material é centrifugado e o sedimento é examinado em microscópio óptico (GOMES et al. 2004). Na comparação do TF-Test® com a técnica de Kato-Katz, ambos realizados com 500 mg de fezes, sensibilidades de 40% e 80% foram encontrados, respectivamente. O desempenho do TF-Test® foi de 44,4%, mesmo utilizando 1500 mg de fezes (SIQUEIRA et al. 2011).

O Helmintex® é uma técnica que se baseia na análise de 30 gramas de fezes, que são submetidas a repetidos processos de filtração e sedimentação. Posteriormente, as amostras são combinadas com esferas paramagnéticas que interagem com os ovos de *S. mansoni* e estes são separados do material fecal por meio de um campo magnético. Assim, a amostra torna-se mais límpida, facilitando a visualização dos ovos em microscópio óptico (TEIXEIRA et al., 2007). Quando aplicada em uma área de baixa endemicidade no estado do Ceará, Brasil, foi observada uma prevalência de 42,5% por essa técnica, em comparação a 18,2% pelo gradiente salínico (500 mg de fezes) e 9,1% pelo Kato-Katz (3 lâminas a partir de uma amostra fecal) (PINHEIRO et al., 2012).

O método de eclosão de miracídios é baseado no fototropismo apresentado pelos miracídios. As amostras fecais são colocadas em um frasco, que é completado com água desclorada até o orifício, localizado no ápice do funil. O frasco é protegido da luz com uma caixa de madeira, exceto pelo ápice do funil, que fica exposto à luz. Assim, os miracídios são atraídos pela iluminação artificial, podendo ser coletados e contados. Essa técnica, realizada com 1,5 g de fezes, demonstrou sensibilidade equivalente ao exame de 36 lâminas de Kato-Katz (JURBERG et al., 2008).

O método de gradiente salínico se baseia na alta densidade dos ovos de *S. mansoni*, que promove sua sedimentação em gradiente de solução salina. Esse procedimento utiliza 500 mg de fezes, o equivalente a massa de amostra contida em 12 lâminas de Kato-Katz. Essa quantidade de fezes é diluída em solução salina a 0,85% e colocada sob um fluxo contínuo de solução salina a 3%, que passa por uma placa porosa e promove a suspensão e retirada de detritos de baixa densidade da amostra fecal. Os ovos de *S. mansoni* possuem alta densidade e permanecem na superfície da placa porosa. O sedimento é transferido para uma lâmina e analisado ao microscópio óptico. O aprimoramento da técnica nos últimos anos permitiu o preparo de até 12 amostras simultaneamente por hora (COELHO et al., 2009). Resultados laboratoriais demonstraram que esta técnica apresenta sensibilidade superior à da técnica de Kato-Katz realizada com a confecção de 12 lâminas a partir de uma única amostra fecal (~500 mg).

Os métodos imunológicos, em comparação ao exame parasitológico, podem ser mais sensíveis para o diagnóstico da esquistossomose, especialmente em áreas de baixa transmissão, onde os indivíduos infectados apresentam baixa intensidade de infecção (< 100 opg). Nas últimas décadas, vários testes sorológicos foram desenvolvidos para detectar anticorpos contra antígenos de *Schistosoma* spp., como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), reação de hemaglutinação indireta (HAI) e ensaio imunoenzimático de ELISA (DEELDER & EVELEIGH, 1978; TARP; BLACK & PETERSEN, 2000; CHAND; CHIODINI & DOENHOFF, 2010).

Uma das dificuldades iniciais no desenvolvimento dos testes sorológicos é com relação à escolha dos antígenos apropriados, principalmente no que se refere à produtividade, facilidade de obtenção, estabilidade em condições simples de estocagem, capacidade antigênica e especificidade (RABELLO et al., 2008). Esses antígenos podem ser obtidos de diversos estágios evolutivos do parasito. Os mais utilizados são os extratos brutos, obtidos mediante ruptura de vermes, cercárias ou ovos do parasito. O verme adulto é a fonte mais fácil e abundante de obtenção de antígenos (DOENHOFF; CHIODINI & HAMILTON, 2004),

enquanto antígenos cercarianos são menos utilizados devido à sua baixa especificidade (LUNDE & OTTESEN, 1980). Além destes, extratos preparados a partir de ovos de *Schistosoma* spp., contêm um grande número de moléculas, embora apenas uma minoria destas possa ser liberada por ovos viáveis *in vivo* (ASHTON et al., 2001).

O parasito secreta e excreta inúmeros antígenos (HOKKE; FITZPATRICK & HOFFMANN, 2007), muitos dos quais estimulam fortemente a resposta imune celular e humoral, que pode ser facilmente mensurada por meio de técnicas imunológicas (COLLEY & SECOR, 2014). Como o tubo digestivo do *S. mansoni* termina em um fundo cego (DIAB et al., 2019), o conteúdo digestivo é regurgitado na circulação sanguínea do hospedeiro a cada 3-4 horas (LAWRENCE, 1973). Nele são encontrados conteúdos não digeridos, hematina, enzimas parasitárias e outros componentes, além dos antígenos circulantes que, em sua maioria, pertencem ao grupo de antígenos circulantes associados ao tubo digestivo do parasito, consistindo em polipeptídeos, glicoproteínas, proteoglicanos e polissacarídeos (BOGITSH, 1989; VAN DAM et al., 1996). A detecção desses antígenos representa uma boa estratégia diagnóstica, permitindo detectar infecções ativas, além de atuar como bons marcadores para determinar a intensidade de infecção e eficácia do tratamento (FELDMEIER et al., 1986; JONGE et al., 1988).

O potencial diagnóstico de alguns desses antígenos foi verificado por meio de diversos estudos. Ruppel et al. (1985a) demonstraram, por meio da técnica de *immunoblotting*, que proteínas de 31 (Sm31) e 32 kDa (Sm32) eram detectadas por anticorpos de camundongos, após quatro semanas de infecção e essas mesmas proteínas foram reconhecidas por amostras de soro de indivíduos infectados com *S. mansoni* (RUPPEL et al., 1985b). Por meio de uma reação de imunofluorescência, foi possível verificar que essas proteínas são encontradas no tubo digestivo de parasitos adultos (RUPPEL et al. 1985a).

Baseado na sequência de nucleotídeos e aminoácidos, a Sm31 foi caracterizada como uma catepsina B, com atividade proteolítica (KLINKERT et al. 1989). Inicialmente, esta protease é sintetizada como uma proenzima composta de 340 resíduos de aminoácidos. Após clivagem, torna-se uma enzima ativa constituída de 250 resíduos de aminoácidos glicosilados, originando uma proteína de 31 kDa (BRINDLEY et al., 1997).

A identidade da Sm32 foi esclarecida quando as sequências de DNA codificantes para essa proteína, se mostraram similares à da asparaginil endopeptidases de sementes de leguminosas, posteriormente classificada como uma cisteína protease da família das leguminas (ISHII, 1994). Esta protease é liberada no conteúdo digestivo dos parasitos com a função de hidrolisar proenzimas que estão envolvidas na digestão da hemoglobina. A inibição da atividade

dessa enzima impede a clivagem das catepsinas B e L, que são diretamente envolvidas na digestão da hemoglobina (DALTON et al., 1996).

Uma fêmea de *S. mansoni* ingere cerca de 330.000 hemácias por hora, enquanto os machos ingerem cerca de 39.000. Após a ingestão de sangue, os eritrócitos são lisados pela ação de hemolisinas no tubo digestivo do parasito (LAWRENCE, 1973). A hemoglobina liberada flui para o ceco, onde é degradada extracelularmente a dipeptídeos e aminoácidos livres e são absorvidos no tubo digestivo do parasito (BRINDLEY et al., 1997; WANG et al., 2015). Além destas, outras enzimas, como as catepsinas C, D e L, também participam desse processo (TORT et al., 1999).

Trabalhando com uma biblioteca de cDNA, Valli e colaboradores (2007) selecionaram, usando anticorpos anti-Sm31/32, eluídos de fitas de nitrocelulose, usadas na técnica de *immunoblotting*, cinco clones de bactérias, denominadas de ET01, ET03, ET04, ET06 e ET10, que foram previamente transfectadas com fagos λ gt11 transformados com cDNA de *S. mansoni*. O sequenciamento do clone ET03, que apresentou maior imunorreatividade contra Sm31/32 na técnica de *immunoblotting*, forneceu uma sequência de 682 nucleotídeos e a tradução da sequência de cDNA resultou em apenas uma leitura de fase aberta (ORF), na posição 173-343, correspondente a 57 aminoácidos. Esta sequência mostrou semelhança apenas com uma etiqueta de sequência expressa (EST), denominada MA002456.C8F, obtida por Bailey et al. (dados não publicados) e depositada no GenBank em fevereiro de 1999 (número de acesso: 2191547). A partir desta sequência, dois peptídeos foram sintetizados por meio da estratégia f-moc e estes foram aplicados em um ensaio de ELISA contra um *pool* de amostras de soro positivas e negativas para a esquistossomose mansoni. Ambos os peptídeos mostraram alta imunorreatividade apenas contra o *pool* de soros positivo, sugerindo que esses podem ser úteis como base antigênica em métodos imunológicos para o diagnóstico da doença (VALLI et al. 2007).

Desde as primeiras publicações sobre a presença de antígenos circulantes no sangue de hospedeiros infectados por *Schistosoma* spp., as pesquisas nesse campo têm sido estimuladas pelo objetivo de desenvolver testes sorológicos apropriados para o diagnóstico da doença. Embora outros antígenos tenham sido descritos, os mais estudados são o antígeno anódico circulante (CAA: *Circulating Anodic Antigen*), também conhecido como GASP (*Gut Associated Proteoglycan*), e o antígeno catódico circulante (CCA: *Circulating Cathodic Antigen*), também conhecido como antígeno M (CARLIER et al., 1975; DEELDER et al. 1976, 1980; CARLIER, BOUT & CAPRON, 1980).

Ambos os antígenos foram identificados em amostras de soro de hamsters infectados, em um processo de purificação dos antígenos circulantes (DEELDER et al. 1976). Esses antígenos apresentam migração oposta quanto ao sentido de migração eletroforética: o CAA, um antígeno de alto peso molecular, solúvel no ácido tricloro acético (TCA) e estável ao calor, exibe migração anódica, enquanto o CCA, um antígeno de baixo peso molecular e também solúvel em TCA, exibe migração catódica (DEELDER et al. 1980).

Tanto o CAA quanto o CCA podem ser encontrados no sangue após a 3^a e 5^a semana de infecção, dependendo da intensidade da infecção (VAN DAM et al., 1996). Com isso, há uma indução precoce da resposta imune humoral, permitindo a detecção de IgM contra esses antígenos, antes mesmo do encontro de ovos nas fezes do hospedeiro, seja pela técnica de imunofluorescência (NASH; OTTESEN & CHEEVER, 1978; DEELDER et al., 1989), quanto pela técnica de ELISA (DEELDER & KORNELIS, 1980; VAN DAM et al., 1993; OLIVEIRA et al. 2003; OLIVEIRA; KANAMURA & LIMA 2005).

A função desses antígenos ainda não é bem esclarecida, mas sabe-se que são produzidos pelas células epiteliais do tubo digestivo do parasito, sendo regurgitados na corrente sanguínea do hospedeiro definitivo (NASH, 1974). Como seu padrão de excreção não é alterado após a alimentação, sua função provavelmente não está relacionada à digestão da hemoglobina, como as outras proteínas citadas (VAN DAM et al., 1996). A função mais plausível para esses antígenos é a proteção da gastroderme, como as mucinas, por exemplo, com as quais algumas características estruturais são compartilhadas pelo CCA (VAN DAM et al., 1994).

Em 2006, Oliveira e colaboradores sintetizaram sete peptídeos, dos quais três se basearam na sequência de aminoácidos da catepsina B e dois da leitura de fase aberta do clone ET03, um da proteína de choque térmico de 70 kDa de *S. mansoni* (HSP-Sm70) e um do antígeno catódico circulante (CCA). Quando submetidos ao ensaio de ELISA, esses peptídeos apresentaram alta imunorreatividade frente ao *pool* de amostras de soro de indivíduos positivos para esquistossomose mansoni, em comparação ao *pool* de soro de indivíduos negativos. Os outros dois peptídeos, que foram desenhados a partir das sequências da HSP-Sm 70 e do CCA, não apresentaram nenhuma imunorreatividade.

Com base nesses resultados, este mesmo grupo padronizou um ensaio de ELISA utilizando um *pool* destes cinco peptídeos sintéticos e avaliou seu desempenho diagnóstico usando amostras de soro de indivíduos ovo-positivos para *S. mansoni*, em fase aguda ou crônica da doença, e um grupo de indivíduos ovo-negativos, que compreendeu indivíduos com e sem outros parasitos intestinais residentes em área não endêmica para esquistossomose mansoni. Esse ensaio apresentou uma sensibilidade de 86,8% e especificidade de 94,2%, o que evidencia

o potencial do uso de um antígeno contendo sequências de múltiplos epítomos (OLIVEIRA et al., 2008).

Um método diagnóstico alternativo que tem sido empregado é a detecção desses antígenos polissacarídicos no sangue ou na urina de indivíduos infectados (VAN LIESHOUT; POLDERMAN & DEELDER, 2000). A detecção do CCA na urina através de um teste rápido baseado no ensaio de ELISA tem sido considerada uma boa ferramenta diagnóstica para a esquistossomose (POLMAN et al., 2001). O princípio desse teste rápido foi desenvolvido por van Etten e colaboradores (1994) e reproduzido por van Dam e colaboradores (1994), posteriormente. O POC-CCA[®] (*point-of-care circulating cathodic antigen*) é um teste rápido comercialmente disponível (Rapid Medical Diagnostics, Pretoria, África do Sul), que permite a detecção do CCA na urina de pacientes com infecções ativas por *S. mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum*. É um teste imunocromatográfico de fluxo lateral, composto por uma membrana de nitrocelulose com anticorpo monoclonal conjugado a ouro coloidal.

O POC-CCA[®] está disponível desde 2008 e seu desempenho tem sido avaliado com o objetivo de ser incluído nos programas de controle da esquistossomose de diferentes países (VAN DAM et al., 2004; COLLEY et al., 2013). Esse teste é de grande praticidade, já que utiliza amostras não invasivas, fornece um resultado dentro de 20 minutos e dispensa o uso de qualquer equipamento. Por isso, tem sido utilizado em áreas endêmicas da África, com diferentes taxas de prevalência, como ferramenta de triagem, indicador de carga parasitária e avaliação de cura após tratamento (SHANE et al., 2011; ADRIKO et al., 2014; LAMBERTON et al., 2014; COLLEY; ANDROS & CAMPBELL, 2017). Apesar de esse teste apresentar maior sensibilidade que o Kato-Katz nessas áreas e seu uso ser incentivado, sua aplicação para o diagnóstico laboratorial merece maiores investigações, principalmente em áreas de baixa endemicidade (OCHODO et al., 2015). No Brasil, trabalhos publicados apresentam divergências de resultados, que podem estar relacionados à falta de um método de referência na avaliação de desempenho do POC-CCA[®], superestimando sua sensibilidade (SIQUEIRA et al., 2016; FERREIRA et al., 2017). Além disso, a interpretação do traço como um resultado positivo, conforme instruções do fabricante, leva a uma alta taxa de resultados falso positivos (COELHO et al., 2016; GRENFELL et al., 2018) e o teste apresenta baixa sensibilidade na detecção dos casos de indivíduos com baixa carga parasitária (SILVEIRA et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2018).

Como alternativa aos problemas relacionados à sensibilidade dos testes diagnósticos utilizados na rotina, a reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma das técnicas mais utilizadas na ciência, desde que se tornou uma nova ferramenta aplicada ao diagnóstico de doenças, logo

após o seu surgimento, em 1985 (SAIKI et al., 1985). A técnica permite a amplificação de sequências de DNA ou RNA do agente etiológico, copiando-as em larga escala e de maneira bem específica (JOSHI & DESHPANDE, 2010).

Algumas técnicas de PCR foram descritas para aplicação no diagnóstico da esquistossomose mansoni. Essas técnicas se baseiam na amplificação de sequências de DNA contidas no genoma de *S. mansoni* e todas elas se mostraram eficientes na detecção dos casos positivos, com sensibilidade e especificidade próximos de 90% e 100%, respectivamente (PONTES; DIAS-NETO & RABELO, 2002; PONTES et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2010).

Alguns anos após seu desenvolvimento, a técnica de PCR foi aprimorada de forma a permitir o monitoramento simultâneo da quantidade de DNA amplificado, sendo denominada PCR em tempo real. A técnica foi descrita pela primeira vez por Higuchi e colaboradores (1993), quando montaram um sistema acoplado a uma câmera de vídeo, que permitia monitorar todos os ciclos da reação através da detecção do aumento da fluorescência durante a reação, devido à ligação de brometo de etídio às moléculas de DNA dupla-fita recém-sintetizadas. O procedimento é semelhante ao da PCR convencional e, atualmente, as etapas de amplificação, detecção e quantificação são totalmente automatizadas (HEID et al., 1996). O sucesso da técnica levou ao seu aperfeiçoamento, graças ao desenvolvimento de sondas de oligonucleotídeos de fita simples e da descoberta da atividade exonuclease 5'-3' (cinco linha e três linha) da enzima *Taq* polimerase (HOLLAND et al., 1991).

Outra variação da técnica de PCR, denominada de PCR-ELISA, foi desenvolvida e pode ser proposta para a detecção de DNA do parasito em amostras fecais, como uma alternativa ao diagnóstico de pacientes com baixa carga parasitária. Na primeira etapa, este sistema permite a amplificação de uma região específica do DNA, na qual o produto obtido é marcado com biotina na extremidade 5' e capturado em microplaca de poliestireno recoberta com estreptavidina. O material capturado é desnaturado, permitindo a liberação da fita não marcada. Uma sonda marcada com fluoresceína na extremidade 5' é hibridizada à fita simples de DNA que se encontra aderida à microplaca, já que são sequências complementares. Após, ocorre ligação de um conjugado anti-fluoresceína-peroxidase ao produto, capturado na microplaca, e adição de uma mistura substrato-cromógeno. Por fim, é feita a leitura da absorbância em leitor de microplacas (MUSIANI et al., 2007). Nesse tipo de ensaio, a sonda também pode ser marcada com digoxigenina e detectada com um fragmento Fab anti-digoxigenina marcado com peroxidase (GIBELLINI et al., 1993). Ao aplicá-la em uma população de área endêmica para esquistossomose no Brasil, Gomes et al. (2010) mostraram que 30% da população foi positiva

para a infecção por *S. mansoni*, em comparação com os 18% detectados pelo exame de 12 lâminas de Kato-Katz.

Apesar de altamente sensível e específica, com potencial para análises de grande demanda, a técnica de PCR dificilmente é aplicada no diagnóstico da doença em países endêmicos, devido à exigência de equipamentos laboratoriais caros e sofisticados e profissionais altamente qualificados (UTZINGER et al., 2015).

1.6 Clonagem e expressão de proteínas recombinantes

Muitos testes desenvolvidos para o diagnóstico da esquistossomose utilizam extratos totais de ovos ou vermes adultos, ou ainda, frações excretadas e secretadas pelo parasito, o que leva à necessidade de manutenção do ciclo do parasito em laboratório, dificuldade de padronização, além da baixa especificidade devida à reatividade cruzada com anticorpos produzidos contra outros helmintos (STACK et al., 2005). Além disso, a produção de antígenos de parasitos pelas técnicas clássicas de bioquímica é uma tarefa demorada e difícil de ser realizada, com pouco rendimento antigênico. Como alternativa esses antígenos podem ser produzidos por meio da tecnologia do DNA recombinante. Neste sentido, presume-se que a substituição dessas preparações por antígenos recombinantes desenhados a partir de resultados de predição de epítomos e técnicas de biologia molecular, pode fornecer um meio inovador e alternativo para o desenvolvimento de testes sorológicos mais baratos, reprodutíveis e acurados (DAI et al., 2012). Algumas evidências experimentais sugerem que a aplicação de antígenos produzidos com sequências de epítomos, possa atender a demanda da padronização de testes sorológicos sensíveis e específicos (LIN et al., 2008; CAMUSSONE et al., 2009; WANG et al., 2014) e a aplicação de antígenos multiepítomos em testes diagnósticos foi avaliada em diversos estudos, para o diagnóstico laboratorial de diferentes doenças (DIPTI; JAIN & NAVIN, 2006; LIN et al., 2008; CAMUSSONE et al., 2009; DUTHIE et al., 2010; CHENG et al., 2011; MENEZES-SOUZA et al., 2014).

A clonagem e expressão de genes apresentam a vantagem de permitir a modificação de um único *locus* gênico, sem interferência no restante do genoma. Isto é a base para a produção de animais transgênicos, produção de proteínas, peptídeos e vacinas (WU & BAZER, 2019) e, para isso, diversos hospedeiros podem ser utilizados, como as leveduras, células de insetos e de mamíferos (MAKRIDES, 1996). Entretanto, o mais utilizado é o vetor bacteriano, principalmente a *Escherichia coli*, pois esta é bem caracterizada fisiologicamente e metabolicamente, possui um ciclo de vida curto e é facilmente manipulada geneticamente, já

que foi um dos primeiros organismos a ter seu genoma completamente sequenciado (GOPAL & KUMAR, 2013).

E. coli é uma bactéria pertencente à família Enterobacteriaceae, sendo, portanto, um microrganismo bacilar e gram-negativo, que coloniza o trato intestinal de humanos e outros seres endotérmicos (TENAILLON et al., 2010). Esses organismos possuem duas membranas, uma externa e uma citoplasmática. O espaço entre elas é chamado de periplasma e contém proteínas envolvidas no sensoriamento químico, transporte e outras funções celulares (MADIGAN et al., 2016). Entretanto, as proteínas eucarióticas produzidas nesse sistema podem diferir de sua forma original, pois essa bactéria não realiza algumas das modificações pós-traducionais, como a glicosilação, acetilação e amidação (MARSTON, 1986).

Para produção de uma proteína recombinante, o gene que a codifica é clonado no sítio múltiplo de clonagem (SMC) de um vetor de expressão, como o plasmídeo, por exemplo, sob controle de um promotor que regula a expressão do gene. Caso o gene contenha íntrons, ele é clonado a partir de uma biblioteca de cDNA, visto que as bactérias não são capazes de excisá-los (BALASUNDARAM; HARRISON & BRACEWELL, 2009). O plasmídeo, contendo o gene de interesse, é usado para transformar uma cepa de *E. coli* capaz de produzir a proteína recombinante, quando crescidas em meio de cultivo líquido. Ao atingir um estágio específico do crescimento, a produção da proteína recombinante é induzida pela adição de um indutor químico que ativará o promotor no vetor de expressão. Assim, o gene recombinante é expresso e a cadeia polipeptídica da proteína recombinante se dobra, podendo, então, ser liberada da célula e purificada (OVERTON, 2014).

Um dos principais objetivos da expressão de uma proteína recombinante é a obtenção de um alto rendimento de produto solúvel na célula bacteriana. A proteína recombinante, quando produzida em bactérias, pode alcançar três regiões diferentes. Primeiro, ela pode ser enviada para o meio extracelular e alcançar o meio de cultivo. Quando isso ocorre, resulta em altas quantidades de proteína recombinante e esta pode manter sua forma nativa (SØRENSEN & MORTENSEN, 2005).

Outra possibilidade é que as proteínas recombinantes podem ser direcionadas ao periplasma. Este compartimento concentra cerca de 4% de toda proteína celular, o que permite uma boa concentração da proteína, favorecendo o processo de purificação. Além disso, este é um ambiente oxidativo, o que propicia a adequada conformação das proteínas e favorece a clivagem do peptídeo sinal durante a translocação para o periplasma, produzindo a região N-terminal autêntica da proteína (MAKRIDES, 1996).

Quando a proteína recombinante se localiza no citoplasma, ela é expressa em grandes quantidades, porém, frequentemente na forma agregada, os chamados corpos de inclusão. Estes agregados contêm grande quantidade da proteína de interesse, porém, para sua obtenção, é necessário o uso de reagentes desnaturantes, como a guanidina e ureia (CLARCK, 2001). Essas proteínas são utilizadas para as mais diversas aplicações, como no campo terapêutico, na produção de anticorpos monoclonais, produção de vacinas e testes diagnósticos (CHEN, 2012; YE et al., 2014; CLARCK & PAZDERNIK, 2016).

Alguns pesquisadores têm tentado obter os antígenos de *Schistosoma* spp. por meio da expressão de seus genes em sistema heterólogo, utilizando a tecnologia do DNA recombinante. Em um trabalho anterior, a catepsina B de *S. mansoni* foi expressa como uma proteína de fusão com a região amino-terminal da replicase do RNA do fago MS2 em *E. coli*. No entanto, a proteína de fusão se agregou no citoplasma e só pôde ser solubilizada em intensas condições desnaturantes (KLINKERT et al., 1988). Esta mesma proteína foi expressa em células de inseto, mas o rendimento obtido foi extremamente baixo (GÖTZ et al., 1992).

Diante da falta de sucesso em expressar a catepsina B em *E. coli*, Lipps et al. (1996) expressaram o precursor desta proteína em *Saccharomyces cerevisiae*. Para isso, a sequência codificadora foi fundida a um fator de secreção e subclonado em um vetor de expressão. Ao ser expressa, a proteína foi secretada para o sobrenadante da cultura e posteriormente purificada em sua forma ativa, após o tratamento com pepsina.

Embora a catepsina B e a asparaginil endopeptidase venham sendo propostas como antígenos para o diagnóstico laboratorial da esquistossomose mansoni, até o momento não foi produzido um antígeno contendo epítomos dessas proteínas. Nesse trabalho, foram investidos esforços para a produção de um antígeno multiepítomos, desenhado a partir dessas proteínas, para aplicação no diagnóstico sorológico da esquistossomose mansoni.

2 JUSTIFICATIVA

A esquistossomose mansoni ainda é um sério problema de saúde pública no Brasil, no qual há estimativa de 1.500.000 indivíduos infectados por *S. mansoni* (KATZ, 2018). Programas de controle adotados na China, Egito e Japão têm alcançado sucesso no controle da morbidade e redução da prevalência nos últimos anos, principalmente devido à implementação do tratamento em massa com PZQ (ROLLINSON et al., 2013). Com esse avanço, novas metas foram definidas na resolução WHA65.21 de 2012, na qual foi priorizada a eliminação da doença como um problema de saúde pública. No Brasil, a determinação foi intensificar o controle da morbidade até 2019 e interromper a transmissão da doença até 2021 (WHO/PAHO, 2014).

Para isso, as estratégias de controle são baseadas no saneamento básico, educação em saúde, diagnóstico e tratamento dos indivíduos infectados. Dentre essas medidas, o diagnóstico está entre os desafios a serem superados para alcançar as metas estabelecidas pela OMS (FENWICK; ROLLINSON; & SOUTHGATE, 2006; UTZINGER et al., 2011). De acordo com a OMS, o diagnóstico deve ser feito por meio da técnica de Kato-Katz, através da identificação e quantificação de ovos do parasito em duas lâminas de uma única amostra fecal (WHO/PAHO, 2014). No início, logo após a implementação das medidas de controle da esquistossomose mansoni no Brasil, quando a prevalência e intensidade de infecção eram altas, com mais de 50% dos indivíduos eliminando mais de 400 ovos por grama de fezes, a técnica apresentava elevada acurácia diagnóstica. Entretanto, o controle intensificado ao longo dos anos reduziu significativamente a transmissão e a morbidade da esquistossomose mansoni em áreas endêmicas. Apesar disso, a transmissão da infecção persistiu em algumas regiões e surgiram outras áreas de baixa endemicidade e intensidade de infecção, situação atual do Brasil. Nessas áreas a maioria dos indivíduos elimina menos de 100 ovos por grama de fezes, fato que compromete o desempenho da técnica de Kato-Katz (BARBOSA et al., 2017; BÄRENBOLD et al., 2017). Os indivíduos com esquistossomose mansoni, que não são diagnosticados por essa técnica, são responsáveis pela manutenção da transmissão da doença no local de residência e pelo estabelecimento de novos focos quando se deslocam para outras regiões (MELO et al., 2019).

Durante a 65ª Assembleia Mundial de Saúde da OMS foi dada uma atenção especial para o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico que possam ser aplicadas em qualquer contexto epidemiológico, além de ser empregada em diferentes estágios dos programas de controle (WHO, 2012). Para isso, o teste precisa apresentar alta sensibilidade e especificidade, ser de fácil execução, baixo custo, fornecer resultados precisos, identificar infecção ativa e ser

eficaz na avaliação de cura após tratamento (DOENHOFF; CHIODINI & HAMILTON, 2004; GRENFELL et al., 2012; CAVALCANTI et al., 2013). Entretanto, como um teste que atenda a esses critérios ainda não está disponível, a combinação de diferentes técnicas tem sido adotada para aumentar a sensibilidade diagnóstica (SIQUEIRA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2018).

Durante a infecção pelo parasito, o sistema imune do hospedeiro desencadeia uma resposta com grande produção de anticorpos, que podem ser detectados por meio dos testes sorológicos. Esses testes possuem alta sensibilidade e seu uso tem sido ampliado para a detecção da infecção em indivíduos de área endêmicas e de baixa endemicidade (VAN GOOL et al., 2002; SMITH et al., 2012). Além disso, essas técnicas, em associação com a técnica de Kato-Katz, mostram-se sensíveis e promissoras para a detecção da infecção por *S. mansoni* (KANAMURA et al., 1998; OLIVEIRA; KANAMURA; LIMA, 2005; GOLÇALVES et al., 2006).

Diferentes testes sorológicos, apropriados ou não para estudos populacionais, empregando diferentes tipos de preparações antigênicas, têm sido descritos nos últimos anos. Em um trabalho prévio, foi desenvolvido um ensaio imunoenzimático usando um *pool* de cinco peptídeos, denominado de ELISA-Peptídeo (ELISA-Pp), que demonstrou sensibilidade de 86,8% e especificidade de 94,2%, quando foi empregado em amostras de soro coletadas de indivíduos que foram positivos e negativos para ovos de *S. mansoni* nas fezes (OLIVEIRA et al. 2008).

Visando melhorar a sensibilidade do teste sorológico, anteriormente padronizado, este trabalho se propôs a desenvolver um ensaio imunoenzimático, usando um antígeno multiepítomos, para o diagnóstico laboratorial da esquistossomose mansoni. A ideia central foi manter as sequências nucleotídicas que codificam para os peptídeos usados no ELISA-Pp e acrescentar outras sequências, tanto da catepsina B (Sm31) como também da asparaginil endopeptidase (Sm32), cujos peptídeos apresentaram altos índices de predição na análise *in silico*. Desse modo, espera-se que um antígeno multiepítomos, produzido a partir das sequências de aminoácidos das proteínas citadas, possa proporcionar a padronização de um ensaio imunoenzimático, para detecção de anticorpos específicos contra *S. mansoni*, com elevada acurácia diagnóstica.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

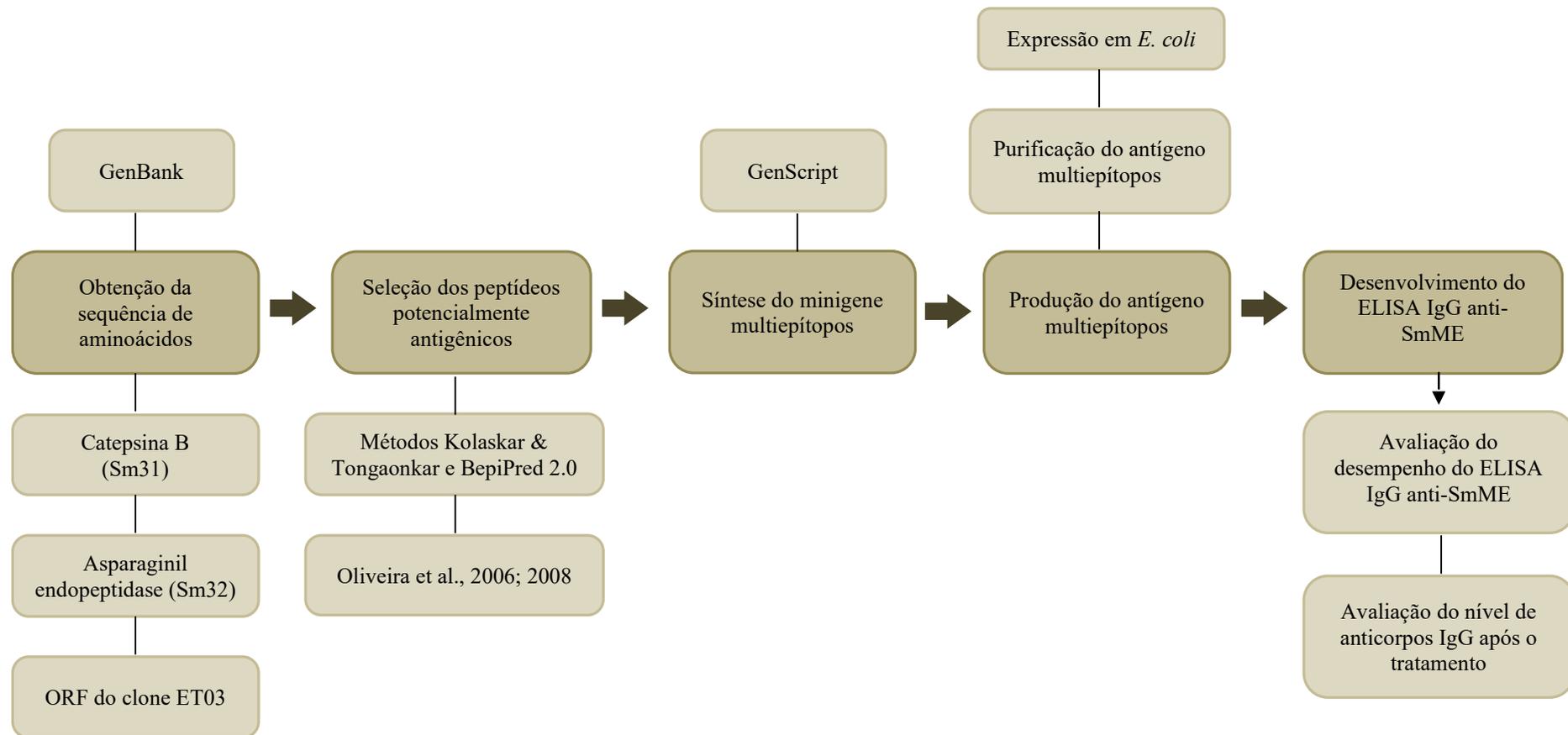
Desenvolver e avaliar um ensaio imunoenzimático, usando antígeno multiepítomos, para o diagnóstico laboratorial da esquistossomose mansoni.

3.2 Objetivos específicos

- Selecionar epítomos da catepsina B (Sm31) e da asparaginil endopeptidase (Sm32);
- Desenhar um minigene contendo combinações das sequências nucleotídicas que codificam para os epítomos selecionados;
- Clonar, expressar e purificar o antígeno multiepítomos;
- Padronizar e otimizar um ensaio imunoenzimático de ELISA, a partir de amostras de soros humanos, para detecção de anticorpos IgG contra o antígeno multiepítomos;
- Determinar a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo e acurácia do ELISA para diagnóstico da esquistossomose mansoni, a partir de soros humanos provenientes das regiões Norte e Central de Minas Gerais e do Pará;
- Avaliar o nível de anticorpos IgG em indivíduos ovo-negativos e reinfectados após três, seis e doze meses de tratamento.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Fluxograma de estudo



4.2 Seleção dos peptídeos potencialmente antigênicos

A sequência de aminoácidos da catepsina B (número de acesso: M21309) e da asparaginil endopeptidase (número de acesso: AJ250582.1) foram obtidas através do GenBank, utilizando o endereço do *National Center For Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>). Estas sequências foram submetidas à predição de epítomos de células B, através do servidor *web Immune Epitope Database and Analysis Resource* (IEDB) (disponível em <http://tools.iedb.org/bcell/>), para selecionar regiões peptídicas que possuem maior potencial antigênico.

O IEDB está disponível desde 2004 e foi fundado pelo *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (NIAID), dos Estados Unidos da América. Apesar da grande variedade de bancos de dados disponíveis, o IEDB se destaca pela precisão dos dados armazenados e por apresentá-los juntamente aos contextos experimentais em que foram determinados (VITA et al., 2009). Esse programa reúne cinco métodos escalares de predição de epítomos lineares que incluem os parâmetros escalares da alça da cadeia peptídica, acessibilidade, flexibilidade, antigenicidade e hidrofobicidade, além de incorporar o método BepiPred (PETERS et al., 2005).

Para a análise de predição, foram utilizados os métodos Kolaskar e Tongaonkar e BepiPred 2.0. O método semi-empírico de Kolaskar & Tongaonkar (1990) considera as propriedades físico-químicas dos resíduos de aminoácidos e faz uma relação estatística, na qual verifica a frequência destes antígenos conhecidos experimentalmente, com precisão de até 75%. Já o BepiPred 2.0 (JESPERSEN et al., 2017) prevê epítomos usando um algoritmo de regressão de floresta aleatória, que se baseia apenas em dados derivados de estruturas cristalinas.

A pontuação média de propensão antigênica para a catepsina B foi de 1,014, com mínima de 0,841 e máxima de 1,212, baseada no método de Kolaskar e Tongaonkar (Figura 4). Já pelo método BepiPred 2.0, a pontuação média foi de 0,520, com mínima e máxima de 0,248 e 0,635, respectivamente (Figura 5). Na análise da asparaginil endopeptidase, o método de Kolaskar e Tongaonkar identificou 17 epítomos, alcançando pontuação mínima de 0,861 e máxima de 1,230 (Figura 6). Já na análise pelo método BepiPred 2.0, foram preditos 13 epítomos, com valores mínimos e máximos de 0,251 e 0,596, respectivamente (Figura 7).

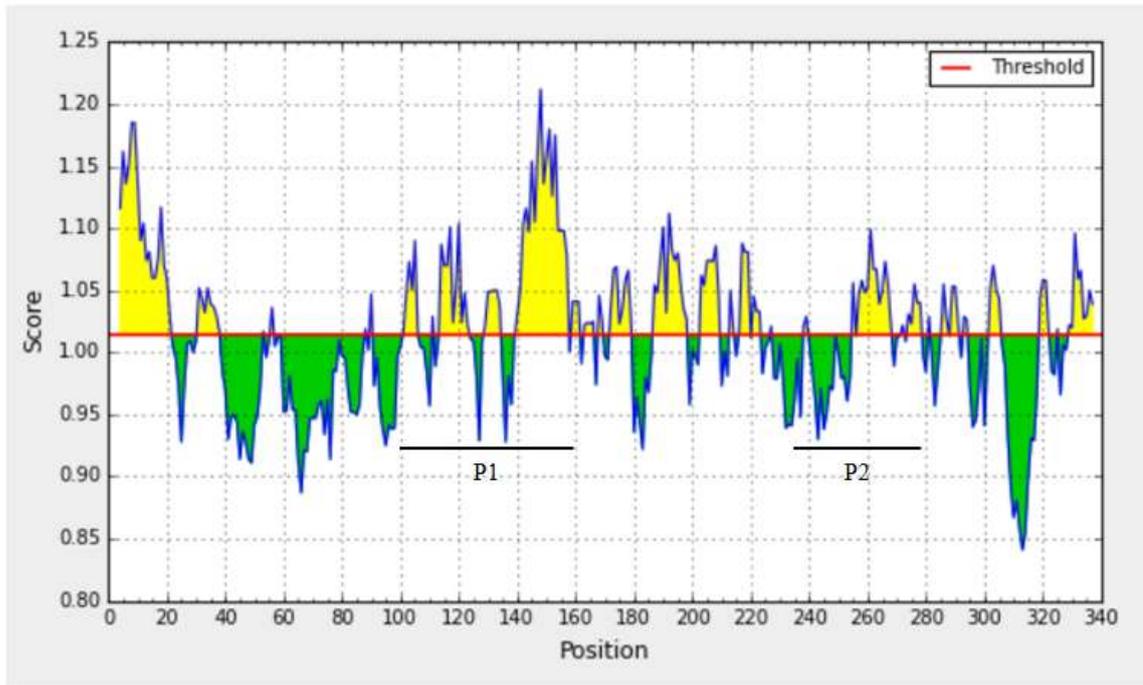


Figura 4: Análise preditiva da antigenicidade da catepsina B, segundo o método de Kolaskar & Tongaonkar (1990). O eixo X indica a posição dos aminoácidos e o eixo Y indica a pontuação da probabilidade de antigenicidade dos aminoácidos. As linhas destacadas representam as regiões peptídicas selecionadas e a linha vermelha indica o ponto de corte, estabelecido em 1,014.

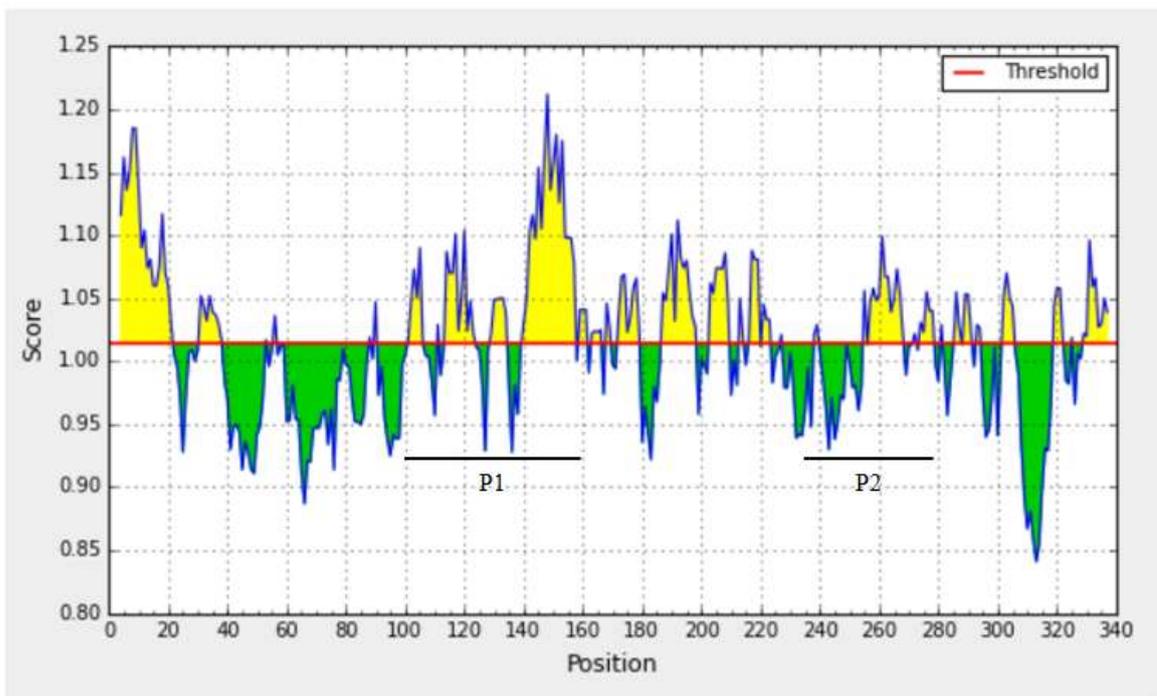


Figura 5: Predição de epítomos lineares de células B da catepsina B, através do método BepiPred 2.0. O ponto de corte, representado pela linha vermelha, foi estabelecido em 0,520.

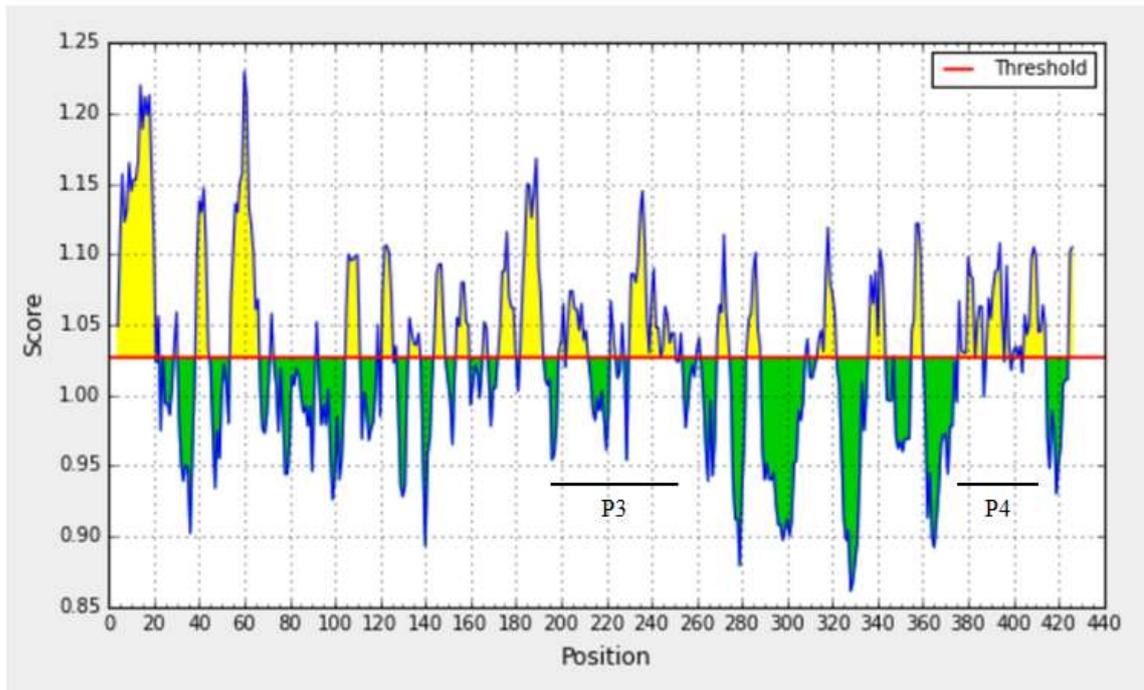


Figura 6: Análise preditiva de antigenicidade da asparaginil endopeptidase de acordo com o método de Kolaskar e Tongaonkar (1990). O ponto de corte foi estabelecido em 1,026.

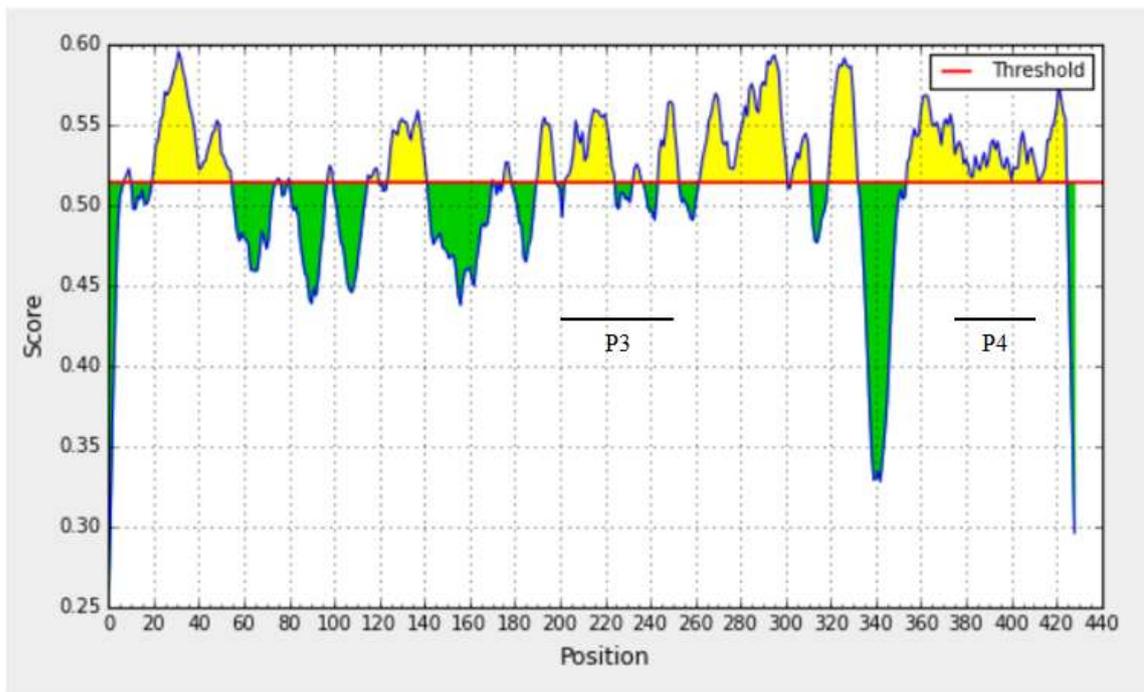


Figura 7: Predição de epítomos lineares de células B da asparaginil endopeptidase usando o método BepiPred 2.0. Nesta análise, o ponto de corte foi estabelecido em 0,514.

Para selecionar os peptídeos potencialmente antigênicos, foram utilizadas como critério as regiões que apresentaram os maiores algoritmos de antigenicidade. Dessa forma, foram selecionadas quatro regiões peptídicas, denominadas de P1, P2, P3 e P4. Além disso, foi incluído um peptídeo (P5) composto pelas sequências de aminoácidos da catepsina B,

previamente selecionadas por Noya et al. (2001) e da ORF do clone ET03, de Valli et al. (2007), previamente usados no ELISA-Pp (OLIVEIRA et al. 2008). As sequências dos peptídeos P1 a P5 estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Peptídeos potencialmente antigênicos, utilizados na construção do antígeno multiepítomos

Peptídeo	Proteína originária	Sequências de aminoácidos
P1	Catepsina B	99-WPGCKSIATIRDQSRCGSCWSFGAVEAMSDRSCIQSGGKQNVELSAVDLLTCCESCGLGCEG-160
P2	Catepsina B	215-RCKQTCQRKYKTPYTQDKHRGKSSYNVKNDEKAIQKEIMKYGPVEASFTVYEDFLNYKSGIYK-277
P3	Asparaginil endopeptidase	198-FQQILPSNLSIYATTAANPTECSYSTFCGDPTITTCLADLYSYNWIVDSQTHHLTQ-253
P4	Asparaginil endopeptidase	375-QTLDCTESVYEQFKSKCFTLQQAPEVGGHFSTLYNYCAD-413
	Catepsina B	81- DHNDWNVEIPSNFDSRKKWP -100
	Catepsina B	221- QRKYKTPYTQDKHRGKSSYN -240
P5*	Catepsina B	241- VKNDEKAIQKEIMKYGPVEA-260
	ORF do clone ET03	5- HRQFCETKLIVLCRIFSNTH-24
	ORF do clone ET03	34-TVESLAIHLLKCAQVCIKI-53

* Sequências obtidas segundo Noya et al. (2001) e Valli et al. (2007)

Após a construção do antígeno multiepítomos, sua sequência foi submetida aos métodos de predição anteriormente descritos. Segundo o método de Kolaskar e Tongaonkar, o antígeno possui uma pontuação média de 1,037, com pontuação variando de 0,878 a 1,212 (Figura 8). Já pelo método BepiPred 2.0, a pontuação mínima e máxima foi de 0,242 e 0,676, respectivamente, com pontuação média de 0,510 (Figura 9).

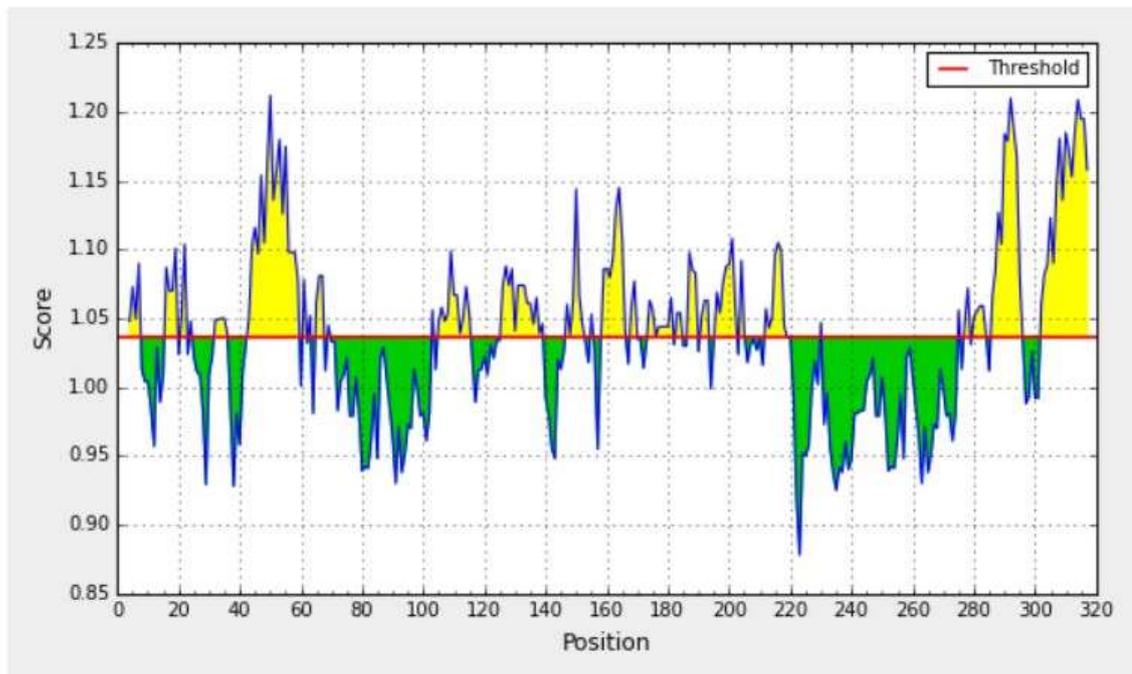


Figura 8: Análise preditiva de antigenicidade do antígeno multiepítomos de acordo com o método de Kolaskar e Tongaonkar (1990). O ponto de corte foi estabelecido em 1,037.

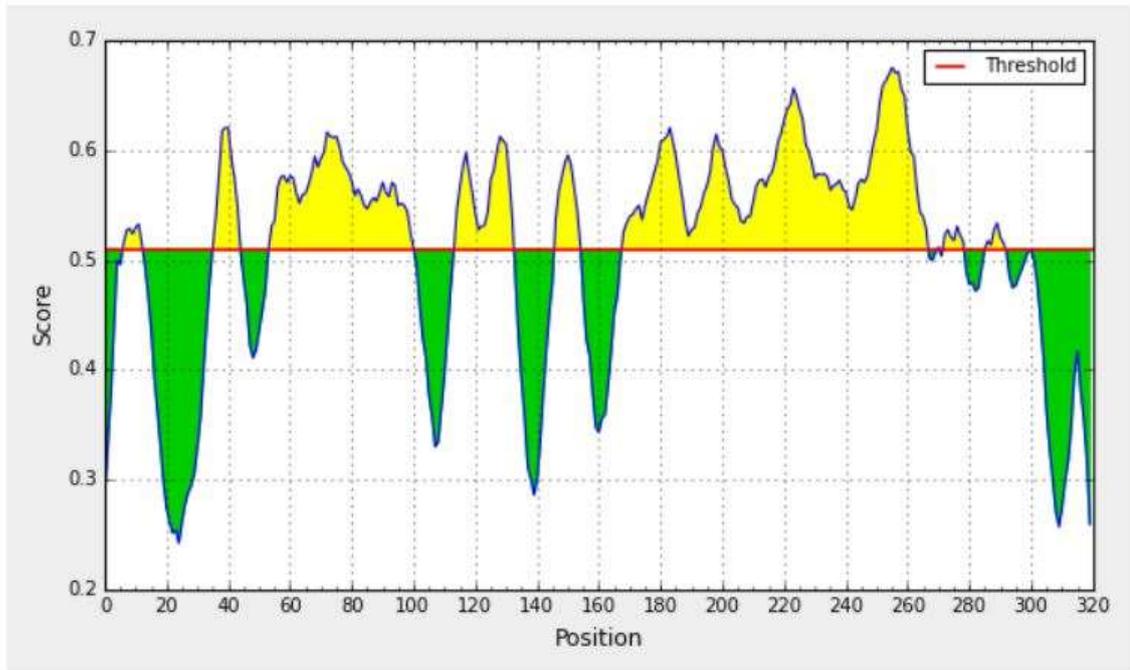


Figura 9: Predição de epítopos lineares de células B do antígeno multiepítopos usando o método BepiPred 2.0. O ponto de corte foi estabelecido em 0,510.

A sequência de aminoácidos que compõe o antígeno multiepítopos foi submetida a uma análise *in silico*, para avaliação das propriedades físico-químicas, a composição da sequência, o peso molecular e o ponto isoelétrico teórico. A análise foi realizada através do *software* ProtoParam (disponível em <https://web.expasy.org/protparam/>).

4.3 Construção e síntese do minigene

A sequência nucleotídica foi obtida por retrotradução das sequências de aminoácidos dos peptídeos selecionados e foi construído um minigene, utilizando o programa BioEdit (*Biological sequence alignment editor*), denominado P1-P5. A sequência do minigene foi enviada para a empresa GenScript (Piscataway, NJ, EUA), onde foi otimizada e sintetizada. A otimização dos códons foi realizada para viabilizar a expressão do antígeno em sistema procaríoto, sem que houvesse alteração na sequência de aminoácidos. Nessa construção, foram inseridos sítios de restrição para as enzimas *Bam*HI, na extremidade 5' e para *Hind*III, na extremidade 3', além de um código de parada (*stop códon*) (Anexo A).

O minigene foi inserido no plasmídeo pET-28a(+), previamente linearizado com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III. Esse plasmídeo é um vetor da série pET e possui duas sequências que codificam caudas de histidina (6X His) nas regiões N-terminal e C-terminal, uma origem de replicação, as regiões dos promotores, a sequência do *operon* da lactose, *lac*I e o gene que confere resistência ao antibiótico canamicina, o que permite a seleção dos clones transformados.

Além disso, esse vetor apresenta uma região com múltiplos sítios de clonagem, que podem ser clivados com enzimas de restrição (Anexo B, Figura 7).

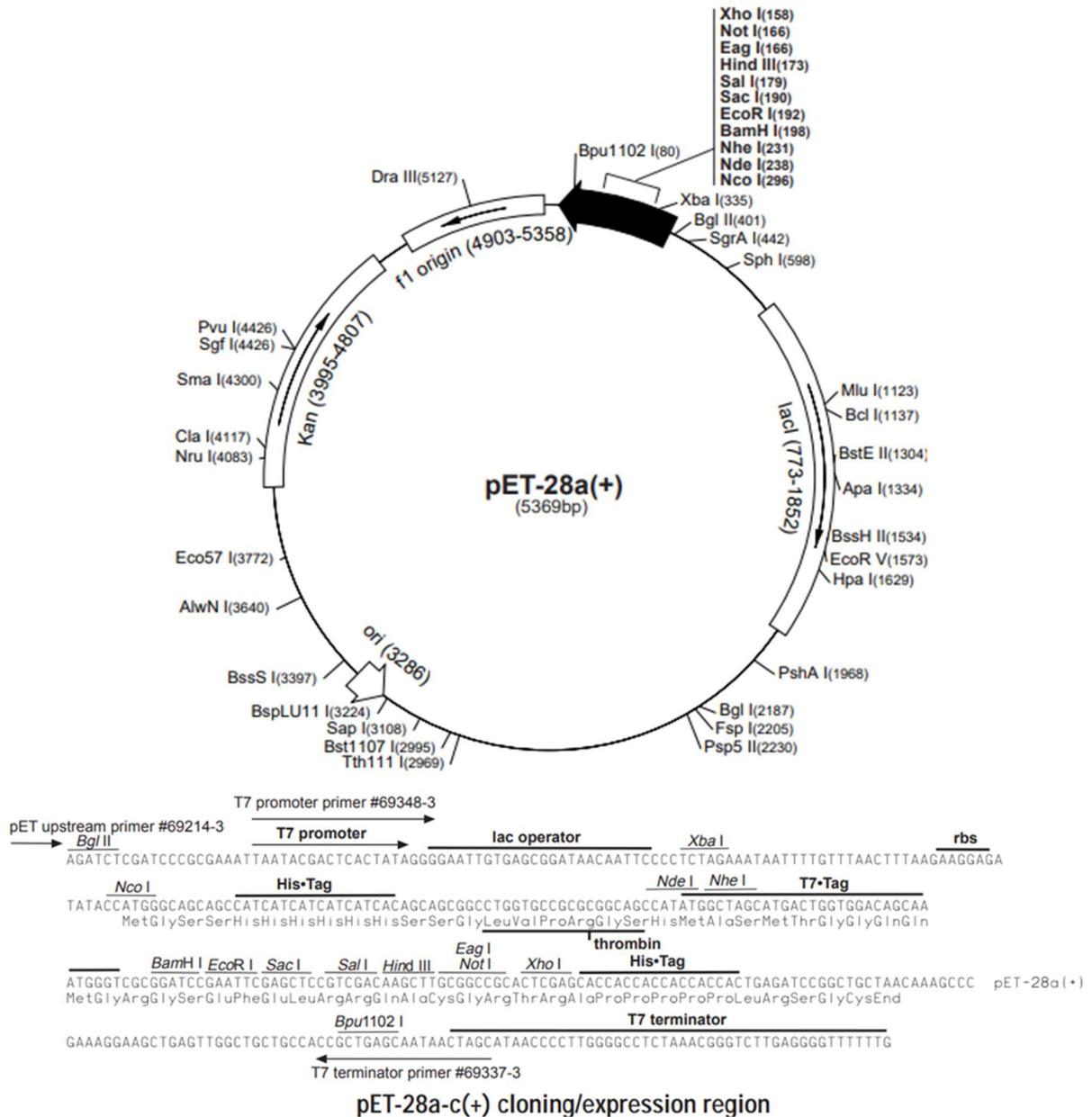


Figura 10: Mapa do vetor de expressão pET-28a(+). Fonte: Adaptado de <https://biochem.web.utah.edu/hill/links/pET28.pdf>.

Os plasmídeos do sistema pET se baseiam num hospedeiro de *E. coli* modificado que transporta uma cópia cromossômica do gene que codifica a RNA polimerase do bacteriófago T7 e este está sob controle de um promotor induzível por isopropil tio- β -tiogalactopiranosídeo (IPTG), o *lacUV5*. Esta construção é incorporada de forma estável no cromossomo bacteriano no locus DE3 (OVERTON, 2014). Na ausência de IPTG, o promotor *lac* é reprimido pelo repressor LacI, o que impede a transcrição da T7 RNA polimerase. Após a adição de IPTG, a

LacI é liberada da região promotora e o gene da T7 RNA polimerase é transcrito e traduzido. Esta enzima é, então, capaz de ativar a transcrição a partir do promotor da T7 localizado no plasmídeo, a jusante de onde é clonado o gene de interesse. Como o promotor T7 é altamente específico para a T7 RNA polimerase, este não é ativado pela RNA polimerase de *E. coli*, então, a expressão do gene é dependente de IPTG (CLARCK & PAZDERNIK, 2016) (Figura 9).

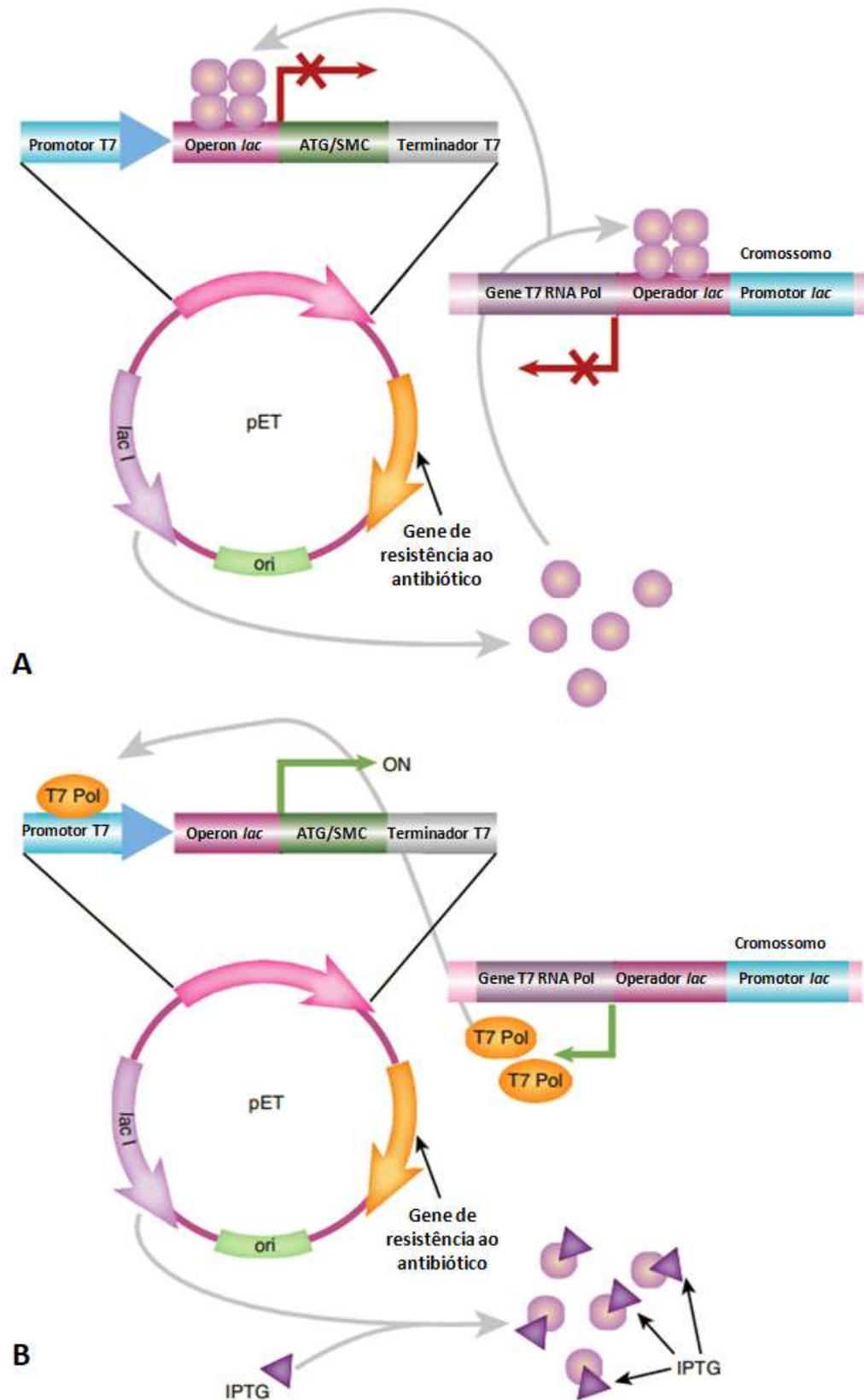


Figura 11: Expressão proteica em sistema pET. (A) O gene da proteína recombinante é inserido no sítio múltiplo de clonagem (SMC), mas não é expresso pelo plasmídeo até ser induzido. O plasmídeo pET transporta o gene da proteína LacI, que reprime o gene da T7 RNAPolimerase no cromossomo bacteriano e o gene da proteína recombinante no plasmídeo pET. (B) Quando o indutor IPTG é adicionado, ele causa a liberação da LacI de ambos os promotores. O gene da T7 RNA polimerase é expresso, o que leva à transcrição do gene da proteína recombinante. Fonte: Adaptado de Clarck & Pazdernik (2016).

Na construção utilizada, o minigene, que codifica para o antígeno multiepítomos, é precedido por uma sequência codificadora que permite a expressão do antígeno fusionado a uma cauda de histidina, que possui afinidade por íons metálicos, como o níquel, por exemplo. Após sua síntese, a construção, denominada pET-28a-P1-P5, foi liofilizada e enviada para o Laboratório de Pesquisa Clínica e Políticas Públicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias do Instituto René Rachou (PCPP/IRR).

4.4 Cultivo de bactérias

4.4.1 Linhagens de *E. coli*

Nas transformações realizadas, foram utilizadas as seguintes linhagens de *E. coli* competentes: DH5 α e BL21(DE3) pLysS, para armazenamento da construção e expressão do antígeno recombinante, respectivamente. Outros vetores de expressão foram utilizados, mas os resultados da confirmação de expressão do antígeno recombinante foram negativos.

A designação DE3 indica que a bactéria é um lisógeno do fago λ DE3 e, portanto, transporta o gene da T7 RNA polimerase sob controle do promotor *lacUV5*, induzível por IPTG. O termo pLysS indica que essa linhagem de bactéria contém um plasmídeo que codifica para a lisozima T7, um inibidor natural da T7 RNA polimerase. Dessa forma, essa linhagem possui um melhor controle da expressão, reduzindo a expressão ao nível basal antes da indução com IPTG. A estabilidade do plasmídeo nesta linhagem bacteriana é conferida pelo uso de cloranfenicol no meio de cultivo.

4.4.2 Meios de cultivo para bactérias

Para o cultivo das bactérias foram utilizados os meios Luria-Bertani-ágar (LB-ágar) pH 7,0 e Terrific Broth (TB). Todos os reagentes foram diluídos em água tipo I e os meios autoclavados. Quando necessários, para seleção de colônias transformadas e/ou indução da expressão do antígeno multiepítomos, foram adicionados o antibiótico canamicina (concentração final de 30 μ g/mL) e IPTG, (concentração final de 1mM), respectivamente. As formulações de todas as soluções utilizadas estão no apêndice A.

4.4.3 Procedimento de competência das linhagens bacterianas

Para o preparo, 100 microlitros (μ L) de células de cada linhagem de *E. coli*, provenientes de uma cultura saturada, foram crescidas em 5 mL de meio TB, incubadas por aproximadamente 18 horas, em incubadora *shaker* a 37 °C, sob agitação a 200 rotações por minuto (rpm). No dia

seguinte, 1 mL deste cultivo foi transferido para um erlenmeyer contendo 24 mL de meio TB e este foi incubado em agitação, nas mesmas condições descritas, até que a densidade óptica do cultivo atingisse uma leitura entre 0,6 e 0,8, em um comprimento de onda de 590 nm (DO_{590}), indicando que as bactérias atingiram a fase de crescimento logarítmico. Em seguida, o cultivo foi transferido para um tubo Falcon[®] e centrifugado por 15 minutos, a 1.260 g e 4 °C. O sobrenadante foi desprezado, o sedimento foi ressuspensionado com 5 mL de uma solução estéril de $CaCl_2$ a 0,1M e o tubo incubado no gelo por 20 minutos.

Após, o tubo foi novamente centrifugado e o sedimento ressuspensionado com 2 mL de $CaCl_2$ a 50 mM. As bactérias foram aliquotadas na proporção de 200 μ L de cultivo e 40 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) e estas foram armazenadas em congelador a -70 °C.

4.4.4 Transformação das bactérias

Primeiramente, a construção pET-28a-P1-P5 liofilizada foi reidratada com 80 μ L água de injeção, para se obter uma concentração final de 50 ng/ μ L. Após, 5 μ L da solução de plasmídeo foram transferidos para um microtubo e, em seguida, foram adicionados 100 μ L da suspensão de bactérias *E. coli* DH5 α e *E. coli* BL21(DE3) pLysS competentes.

Após homogeneização, os microtubos foram incubados em banho de gelo por 15 minutos, seguido de um choque térmico a 42 °C por 1 minuto e um novo banho de gelo durante 10 minutos. Para que houvesse um crescimento inicial das bactérias, foram adicionados 500 μ L de meio super ótimo com repressão de catabólitos (SOC) nos tubos, que foram incubados em agitação a 37 °C por 1 hora. Após incubação, um volume de 100 e 200 μ L de cultivo bacteriano foram semeados em placas de Petri com meio LB-ágar sólido, contendo canamicina (30 μ g/mL). As placas foram mantidas em estufa a 37 °C por aproximadamente 18 horas.

4.5 Confirmação da transformação bacteriana

4.5.1 Extração do DNA plasmidial

Colônias das duas linhagens bacterianas [*E. coli* DH5 α e BL21(DE3) pLysS] transformadas foram pinçadas e inoculadas em 5 mL de meio TB, contendo canamicina (30 μ g/mL), e cultivadas por aproximadamente 18 horas, em incubadora *shaker* a 37 °C, sob agitação a 200 rpm. Após o crescimento, os plasmídeos foram extraídos por lise alcalina, utilizando o kit *Pure Yield Plasmid Miniprep System* (Promega, Madison, WI, EUA), conforme instruções do fabricante. Para isso, 3 mL de cultivo foram centrifugados a 13.000 rpm por 2 minutos e, após, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensionadas em 600 μ L de água

de injeção. Em seguida, foram adicionados 100 μL de tampão de lise e a solução foi homogeneizada por inversão do tubo. Logo após, foram adicionados 350 μL da solução de neutralização e os reagentes foram novamente homogeneizados por inversão. Os tubos foram centrifugados por 3 minutos, a 13.000 rpm e o sobrenadante foi transferido para uma coluna acoplada a um tubo coletor, que foi centrifugada por 30 segundos a 13.000 rpm. O líquido filtrado pela coluna foi desprezado e nela foram adicionados 200 μL da solução de lavagem e remoção de endotoxinas e a coluna foi novamente centrifugada. O líquido do tubo coletor foi desprezado e foram adicionados 400 μL da solução de lavagem na coluna, que foi novamente centrifugada. Após, o líquido filtrado foi desprezado e a coluna foi novamente centrifugada para remoção do excesso de solução de lavagem. Por fim, a coluna foi acoplada a um microtubo de 1,5 mL estéril e foram adicionados 30 μL de água de injeção no centro da coluna. A coluna foi incubada por 1 minuto em temperatura ambiente e centrifugada a 13.000 rpm, por 90 segundos. A coluna foi descartada e os tubos contendo o plasmídeo foram armazenados em congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.5.2 Reação de restrição enzimática

Para confirmação da transformação dos clones, foi feita a extração do inserto do plasmídeo pET-28a(+), realizada através de uma digestão dupla com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III (Promega, Madison, WI, EUA), cujos sítios se encontram flanqueando o inserto. Assim, foi preparada uma reação com volume final de 20 μL , que continha: 10 μL do plasmídeo extraído, 2 μL de tampão da enzima, 0,2 μL de albumina de soro bovino (BSA) a 10 mg/mL (Promega, Madison, WI, EUA), 1 μL de *Bam*HI, 1 μL de *Hind*III e 5,8 μL de água de injeção. A reação foi incubada em um termociclador (modelo AG 5331, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) por uma hora a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, seguida de outra incubação de 10 minutos a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.5.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%

O gel foi preparado no aparato de eletroforese vertical para mini-gel (Mini Protean[®] Tetra Vertical Electrophoresis Cell, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA), produzido com 6 mL de solução de Tris/Borato/EDTA (TBE) contendo acrilamida 5% e bis-acrilamida 0,2%, 67 μL de persulfato de amônio a 10% e 3,5 μL de N,N,N,N-tetrametiletlenodiamina (TEMED). As amostras foram preparadas na proporção de 4 μL do produto de restrição e 2 μL do tampão de aplicação (Blue/Orange 6X Loading Dye, Promega, Madison, WI, EUA). As amostras foram rapidamente centrifugadas e 5 μL de cada uma delas e do marcador de pares de

bases (100 bp DNA Ladder, Promega) foram aplicados no gel. A eletroforese foi realizada sob uma voltagem de 150 V durante 30 minutos, com tampão TBE.

Após, o gel foi transferido para a solução fixadora, durante 10 minutos em agitação e, em seguida, foi transferido para uma solução de nitrato de prata, nas mesmas condições citadas. O gel foi lavado com água, submetido à solução reveladora e, por fim, novamente na solução fixadora. O gel foi envolto em plástico e fotografado e, após análise dos resultados, as colônias positivas para a presença da construção pET28a-P1-P5 foram armazenadas em congelador a -80 °C, na proporção de 900 µL de cultivo e 100 µL de glicerol.

4.6 Expressão e purificação do antígeno recombinante

4.6.1 Cinética de expressão do antígeno multiepítotos

Uma colônia de *E. coli* BL21(DE3) pLysS transformada com a construção pET28a-P1-P5 foi expandida em 5 mL meio TB-canamicina e cultivada por aproximadamente 18 horas, em *shaker* a 37 °C sob agitação a 200 rpm. No dia seguinte, 400 µL desse cultivo foram adicionados em 9,6 mL de meio TB-canamicina e incubado em *shaker* a 37 °C, sob agitação de 200 rpm. O crescimento bacteriano foi monitorado por meio de leituras em leitor de microplacas a 590 nm, até que a densidade óptica do cultivo atingisse uma DO₅₉₀ de 0,6 a 0,8. Uma alíquota de 1 mL do cultivo foi coletada, denominada A₀, e no restante foi adicionado IPTG (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, EUA) para uma concentração final de 1 mM. Novas alíquotas, de 500 µL cada, foram coletadas após duas, três e quatro horas de incubação, para avaliação da cinética de expressão. As alíquotas coletadas foram centrifugadas a 13.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspensionado com 100 µL de tampão de amostra 2X.

4.6.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE) 12% foi realizada para avaliar a cinética de expressão do antígeno multiepítotos. As alíquotas e o padrão de peso molecular (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, EUA) foram submetidos à SDS-PAGE sob condições desnaturantes e redutoras, conforme descrito por Laemmli (1970).

O gel de separação foi preparado utilizando 2,475 mL de água tipo I, 3 mL de solução acrilamida-bisacrilamida 30%, 1,875 mL de tampão Tris 1,5 M pH 8,8, 75 µL de solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10%, 75 µL de solução de persulfato de amônio a 10% e 3 µL de TEMED. A solução foi adicionada no aparato de eletroforese vertical para mini-gel (Bio-

Rad Laboratories) para polimerizar em temperatura ambiente. Posteriormente, foi preparado o gel de empilhamento com 2,1 mL de água tipo I, 500 µL de solução acrilamida-bisacrilamida 30%, 380 µL de tampão Tris 1 M, pH 6,8, 30 µL de solução de SDS a 10% , 30 µL de solução de persulfato de amônio a 10% e 3 µL de TEMED. Essa solução foi adicionada sobre o gel de separação contido no aparato de eletroforese e, sobre ela, foi inserido um pente descontínuo para formar os moldes dos poços para aplicação das amostras.

As amostras foram aquecidas a 95 °C por 5 minutos, centrifugadas e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%. Após a polimerização completa do gel, foram aplicadas 25 µL de cada amostra por poço e 12 µL do padrão de peso molecular (High Range Rainbow, GE Healthcare, Chicago, IL, EUA).

As amostras foram submetidas a uma tensão de 60 V até que estas migrassem pelo gel de empilhamento e, após, a tensão foi aumentada para 150 V, até a completa migração pelo gel de separação. O gel foi corado com solução de Coomassie Brilliant_R-250 por 1 hora em agitação e descorado em solução descorante até retirada completa do excesso de coloração.

4.6.3 Western blotting

As proteínas separadas pela eletroforese a 12% foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham™ Hybond-ECL, 0,45 µm). A membrana e os filtros foram previamente imersos em tampão de transferência e, após a montagem do sistema (Mini Trans-Blot® Cell, Bio-Rad Laboratories), a transferência foi realizada por duas horas, sob uma corrente elétrica de 300 miliamperes, a 4°C.

Após, a membrana foi seca por aproximadamente 10 minutos, em estufa a 37°C, e imersa em 20 mL de tampão tris salina (TBS), contendo 0,05% de Tween-20 e 5% de leite desnatado (TBS-T-Leite 5%) por duas horas em temperatura ambiente, sob agitação constante. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes, com TBS + 0,05% de Tween 20 (TBS-T), em agitação por 5 minutos.

Após o bloqueio, a membrana foi incubada em 10 mL de TBS-T-Leite 1% com anticorpo monoclonal anti-histidina (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), diluído na proporção de 1: 3.000, em agitação por uma hora, em temperatura ambiente. A membrana foi novamente lavada e incubada em 10 mL de TBS-T-Leite 1% com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma), diluído na proporção de 1: 30.000, também por uma hora em agitação, em temperatura ambiente. Passado esse período, as membranas foram lavadas duas vezes com TBS-T e uma vez com TBS. A membrana foi incubada por um minuto em câmara escura com solução quimioluminescente (Amersham ECL Prime Western

Blotting Detection, GE Lifesciences, Chicago, IL, EUA) e a reação antígeno-anticorpo foi fotografada no ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare).

4.6.4 Expressão em maior escala do antígeno multiepítomos

Uma alíquota do cultivo de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS transformada com a construção pET28a-P1-P5 foi adicionada em 50 mL de meio TB-canamicina e incubada por aproximadamente 18 horas, a 37 °C e sob agitação de 200 rpm. No dia seguinte, 40 mL desse cultivo foram expandidos para um litro de meio TB-canamicina, até a fase de crescimento logarítmico. Neste momento, a indução da expressão do antígeno recombinante foi feita pela adição de IPTG para uma concentração final de 1 mM. Foram retiradas alíquotas do cultivo antes e quatro horas após a indução para serem submetidas à eletroforese.

4.6.5 Análise de solubilidade do antígeno multiepítomos

Cerca de um litro do cultivo, obtido no experimento anterior, foi centrifugado por 30 minutos, a 4.800 g e 4°C. O sedimento foi ressuscitado com 43 mL de tampão de lise (12 mL/1 g de sedimento) e, em seguida, foram adicionados 174 µL de lisozima (200 µg/1 mL de tampão de lise) (Sigma-Aldrich) e 3,6 mL de inibidor de protease (1 mL/1g de sedimento) (Sigma-Aldrich). A mistura foi incubada em agitação no gelo por 15 minutos e submetida a cinco ciclos de sonicação (VC-750, Sonics vibra-cell – Sonics e Materials, Newton, MA, EUA), na intensidade de 30%, por 30 segundos, com intervalos de 1 minuto. A suspensão foi centrifugada por 40 minutos, a 13.000 g e 4°C.

O sedimento foi ressuscitado com 29 mL de tampão de lise (8 mL/g), 116 µL de lisozima (200 µg/mL) e 3,6 mL de inibidor de protease (1 mL/g). A mistura foi novamente incubada no gelo por 15 minutos sob agitação e submetida a 5 ciclos de sonicação nas mesmas condições descritas. A suspensão foi centrifugada a 13.000 g por 40 minutos a 4°C.

O sedimento foi ressuscitado com 14,5 mL de tampão de lavagem dos corpos de inclusão (4 mL/g). A suspensão foi mantida em agitação por 15 minutos, em temperatura ambiente, e submetida a um novo ciclo de sonicação. Após, a suspensão foi centrifugada e esta etapa foi novamente realizada. As preparações, sedimentos e sobrenadantes obtidos, foram separados em gel de poliacrilamida a 12% e analisadas quanto à solubilidade do antígeno recombinante.

4.6.6 Purificação do antígeno multiepítomos sob condições desnaturantes

O sedimento, obtido após lavagem dos corpos de inclusão, foi ressuspenso com 35 mL de tampão de solubilização dos corpos de inclusão (5 mL/1 g de sedimento), juntamente com 35 μ L de β -mercaptoetanol (β -ME). O lisado foi incubado por 18 horas em agitação a 4°C. No dia seguinte, o lisado foi centrifugado por 30 minutos, a 10.900 g e 4°C. O sedimento foi ressuspenso com 5 mL de tampão de solubilização dos corpos de inclusão e misturado com 3 mL de resina de níquel (Ni Sepharose[®] High Performance, GE Lifesciences), previamente lavada e equilibrada com tampão de solubilização dos corpos de inclusão. A suspensão foi incubada por 1 hora, em refrigerador (4-8°C). Após, a suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 1.360 g. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspenso com 15 mL de tampão de lavagem 1, sendo homogeneizado por 5 minutos no agitador horizontal (Kline NT 151, Nova Técnica, Piracicaba, SP, Brasil). Este procedimento de centrifugação/ressuspensão foi realizado mais duas vezes.

Após a última centrifugação, foram adicionados 15 mL de tampão de lavagem 2 sob a resina e a suspensão foi homogeneizada por 5 minutos em agitador horizontal. Após, a suspensão foi centrifugada e lavada mais uma vez. A suspensão foi transferida para uma coluna do tipo Econo-pac (BioRad) e lavada com 3 mL de tampão de lavagem 2.

Para a eluição do antígeno recombinante, foi adicionado 1 mL de tampão de eluição sobre a resina, que foi incubada nesta solução por 1 minuto. Após, a coluna foi aberta e foram coletadas alíquotas de 1 mL. A adição de tampão e coleta de alíquotas foi repetida até que toda proteína fosse eluída da coluna, confirmada por meio da dosagem proteica nos eluatos, utilizando o método de Bradford (1976). As amostras eluídas foram analisadas em gel de poliacrilamida 12%, para avaliação da pureza do antígeno recombinante e a concentração proteica foi quantificada pelo método do ácido bicinonínico (Pierce[™] BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific).

4.6.7 Dosagem proteica pelo método do BCA

As proteínas totais presentes nas amostras foram quantificadas pelo método do BCA, utilizando o conjunto de reagentes *Pierce[™] BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific). Para isso, em uma microplaca de fundo plano, foram adicionados 10 μ L de cada amostra e, em seguida, 200 μ L de solução preparada com reagentes fornecidos pelo kit (49 partes de reagente A e 1 parte de reagente B). A microplaca foi agitada por 30 segundos, incubada por 30 minutos a 37°C e a leitura foi realizada no leitor de microplacas (Modelo 550, Bio-Rad), ajustado no comprimento de onda de 590 nm. A concentração das amostras foi determinada com uma

equação da reta, construída a partir da curva padrão das leituras de absorvância de uma solução de BSA, nas concentrações de 50, 100, 200 e 500 µg/mL.

4.6.8 Renaturação do antígeno recombinante purificado

Duas alíquotas do antígeno recombinante, purificado sob condições desnaturantes e com o mesmo grau de pureza, foram homogeneizadas e submetidas à diálise sucessiva contra tampão de eluição contendo ureia a 6 M, 4 M, e 2 M, durante 3 horas, em cada tampão. Após, o antígeno foi dialisado contra salina tamponada com fosfato (STF), também por três horas. Em seguida, o antígeno foi recuperado e a concentração proteica foi determinada pelo método do BCA.

4.7 Padronização do ensaio de ELISA

O antígeno P1-P5 foi aplicado no ensaio de ELISA para detecção de anticorpos IgG em amostras de soro humanas. Primeiramente o teste foi padronizado a fim de se determinar as melhores condições do ensaio para a diferenciação entre as amostras de soro positivas e negativas. Todas as variáveis foram testadas sob as mesmas circunstâncias.

O antígeno foi diluído em tampão carbonato/bicarbonato a 0,05 M pH 9,6 para uma concentração final de 0,5 µg/mL, 1 µg/mL e 2 µg/mL e 50 µL de cada diluição foram transferidos, em duplicata, para os poços de microplacas de poliestireno de fundo plano (Costar 3590, Corning Incorporated, Corning, NY, EUA), que foram incubadas por 30 minutos, em câmara úmida a 37°C, seguida de incubação por 18 horas, em geladeira (4-8°C).

No dia seguinte, as microplacas foram lavadas cinco vezes com 250 µL de STF contendo 0,05% de Tween 20 (STF-T). Para análise sobre a eficiência do bloqueio dos sítios livres, foram testadas duas soluções de bloqueio: STF-T, contendo leite desnatado a 5% (STF-T-Leite 5%) e STF-T contendo BSA a 1% (STF-T-BSA 1%). O bloqueio foi realizado com 200 µL de cada solução em cada poço e as microplacas foram incubadas em câmara úmida a 37°C por duas horas ou por 18 horas, em geladeira (4-8°C). Após, as microplacas foram lavadas e os soros controles, um *pool* de cinco amostras positivas e cinco amostras negativas, foram diluídos na proporção de 1:50 e 1:100, em STF-T-Leite 1% e STF-T-BSA 0,5%, conforme a solução de bloqueio utilizada. Foram adicionados 50 µL de cada diluição por poço, em duplicata, e as microplacas foram incubadas por 1 hora, em câmara úmida a 37°C. Após novas lavagens, foram adicionados 50 µL do conjugado anti-IgG humano-peroxidase (Sigma-Aldrich) diluído nas proporções de 1:10.000 e 1:30.000 em STF-T-Leite 1% e STF-T-BSA 0,5%. As microplacas foram incubadas por 1 hora, em câmara úmida a 37°C.

As microplacas foram novamente lavadas e a reação antígeno-anticorpo foi revelada pela adição de 50 µL de mistura cromógena (Peróxido de hidrogênio + Tetrametilbenzidina; Sigma-Aldrich) em cada poço, seguida de incubação por 20 minutos, ao abrigo da luz. Após, foram adicionados 50 µL de solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1N em cada poço para interromper a reação. A leitura da absorbância foi realizada no leitor de microplacas (VersaMax Microplate Reader, software SoftMax® Pro6.4, Molecular Devices, San Jose, CA, EUA), ajustado no comprimento de onda de 450 nm.

Com os resultados das leituras de absorbância, foram construídos gráficos expressando a razão entre a absorbância dos soros controles positivo e negativo, para a definição da melhor condição do ensaio de ELISA, denominado ELISA IgG anti-SmME.

4.8 População e área de estudo

4.8.1 Mesorregião Norte de Minas Gerais

O município de Januária está situado no Norte de Minas Gerais, na região do Médio São Francisco, e conta com uma população de 67.742 pessoas (IBGE, 2019). O município está localizado a 635 quilômetros de Belo Horizonte, é endêmico para a esquistossomose e possui deficiências no tratamento de água, saneamento básico e educação em saúde, o que compromete o controle da esquistossomose mansoni.

A cidade possui vários distritos e, dentre eles, está Brejo do Amparo, que fica a três quilômetros da sede do município. As localidades trabalhadas no distrito (Pé da Serra, Tocantins e Santana) têm cerca de 270 habitantes que residem em uma área rural banhada pelo córrego Tocantins, em que a água é usada pelos residentes para consumo próprio e dos animais. Além dessas localidades, o município possui diversas comunidades rurais ao longo de seu território e, dentre elas, estão inclusas as comunidades de Gameleira e Bom Jantar, a 25 km da sede, no distrito de Tejuco, e a comunidade de Pindaibal, a 80 km da sede, aproximadamente, pertencente ao distrito de São Joaquim. As comunidades nos distritos de Brejo do Amparo (Pé da Serra, Tocantins e Santana) e em São Joaquim (Pindaibal) têm histórico de transmissão ativa da esquistossomose, tanto pelo PCE como pelo nosso grupo de pesquisa, e são áreas com suposta média endemicidade. Já as comunidades de Bom Jantar e Gameleira, no distrito de Tejuco, não possuem dados recentes disponíveis pelo PCE, mas têm relatos recentes de casos esporádicos (SILVA, 2019).

4.8.2 Mesorregião Metropolitana de Belo Horizonte

O Parque Nacional da Serra do Cipó (ParnaCipó), localizado na região metropolitana de Belo Horizonte, abrange os municípios de Jaboticatubas, Morro do Pilar, Santana do Riacho e Itambé do Mato Dentro.

O município de Jaboticatubas possui a maior extensão territorial da região metropolitana de Belo Horizonte e tem cerca de 20.143 habitantes. O município foi incluído no PECE em 1976, pela Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) e, dados do Sistema de Informação do Programa de Controle da Esquistossomose (SISPCE), referentes ao período de 1996 a 2016, reportam que houve 4.506 casos de esquistossomose mansoni no município. No último levantamento parasitológico em escolares, nos anos 2016-2018, a situação epidemiológica do município foi classificada como baixa endemicidade, já que a prevalência resultou em menos de 5% (SANTOS, 2018).

Morro do Pilar se estende por uma área de 477,548 km² e possui cerca de 3.182 habitantes (IBGE, 2019). O município está a 150 km da capital mineira e a 54 km a Norte-Oeste de Itabira, a maior cidade nos arredores. Atualmente não há nenhum dado de Morro do Pilar no SISPCE e no levantamento parasitológico mais recente não foi constatada a presença de escolares infectados por *S. mansoni* (SANTOS, 2018).

4.8.3 Mesorregião Nordeste do Pará

O município de Primavera possui cerca de 10.825 habitantes (IBGE, 2019), distribuídos em uma área de 258,600 km². Segundo dados do SISPCE, de 1997 a 2016 foram registrados 473 casos de esquistossomose no município, além de infecções por outros helmintos, como *Ascaris lumbricoides* e ancilostomídeos. Segundo o pesquisador envolvido na pesquisa, Dr. Martin Johannes Enk, a transmissão da esquistossomose no município é focal e a situação epidemiológica é considerada de baixa endemicidade, porém, infecções com diversos geohelmintos são frequentes. Amostras de 19 indivíduos desse município foram incluídas nesse estudo (Grupos Pos, Neg NE e Outros H).

4.9 Aspectos éticos

As amostras utilizadas neste estudo pertencem a uma soroteca do Laboratório de Helmintoses Intestinais, localizado no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (LHI/ICB/UFMG). Essas amostras foram coletadas em projetos realizados anteriormente: Projeto de esquistossomose no Parque Nacional da Serra do Cipó (CAAE 55620116.2.0000.5149), Projeto de otimização de estratégias para o diagnóstico e controle da

esquistossomose em áreas de baixa e moderada endemicidade no Brasil (CAAE 63621316.4.0000.5149) e Projeto de Aprimoramento de técnicas diagnósticas para levantamento de prevalência e controle de cura, monitoramento da transmissão e identificação de marcadores de morbidade em áreas com cenários eco-epidemiológicos distintos: Amazônia, baixada Maranhense e Norte de Minas Gerais (CAAE 21824513.9.0000.5149). Dentro deste mesmo projeto, as amostras de Primavera, Pará, foram gentilmente cedidas pelo Dr. Martin Johannes Enk e seu uso foi aprovado pelo CAAE 21824513.9.0000.5091.

As crianças com idade entre seis e nove anos e adolescentes de dez a quatorze anos assinaram o Termo de Assentimento Livre e Esclarecido, enquanto os pais ou responsáveis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.10 Coleta das amostras

Cada participante forneceu uma amostra fecal e amostras de sangue venoso foram coletadas em tubos não heparinizados, que foram centrifugados para a obtenção de soro. As amostras de soro de cada participante foram extraídas, aliquotadas em microtubos e armazenadas em congelador a -20°C.

4.11 Processamento das amostras

A caracterização das amostras de fezes de cada indivíduo foi realizada pela equipe do Laboratório de Helmintoses Intestinais, por meio de técnicas parasitológicas através das fezes coletadas. O kit Helm Test – Biomanguinhos, Rio de Janeiro, RJ – foi utilizado para a realização da técnica de Kato-Katz (KATZ et al., 1972), com a confecção de, pelo menos, duas lâminas a partir de uma amostra fecal. Adicionalmente, as técnicas Helmintex® (TEIXEIRA et al., 2007) e do gradiente salínico (COELHO et al., 2009) foram realizadas com as amostras dos indivíduos residentes de Brejo do Amparo, município de Januária.

4.12 Aplicação do antígeno multiepítopos no diagnóstico da esquistossomose mansoni

4.12.1 Avaliação de desempenho diagnóstico do ELISA IgG anti-SmME

Os ensaios do ELISA IgG anti-SmME foram realizados nas melhores condições selecionadas. Sendo assim, microplacas de 96 poços foram sensibilizadas com 0,5 µg/mL do antígeno P1-P5 diluído em tampão carbonato/bicarbonato. As microplacas foram incubadas em câmara úmida a 37°C por 30 minutos, seguida de incubação em geladeira por 18 horas. Após, as microplacas foram lavadas cinco vezes, bloqueadas 200 µL de STF-T-Leite 5% e incubadas

por 18 horas em geladeira. Após novas lavagens, as amostras foram diluídas a 1:100 em solução de STF-T-Leite 1% e foram aplicados 50 µL de cada uma, em duplicata. As microplacas foram incubadas a 37°C por 1 hora. Passado esse período, as microplacas foram lavadas e 100 µL de conjugado anti-IgG humano-peroxidase diluído a 1:30.000 em STF-T-Leite 1% foram adicionados em cada poço. As microplacas foram incubadas a 37°C por 1 hora e novamente lavadas após esse período. A reação foi revelada com a adição de 50 µL de mistura cromógena em cada poço e incubação de 20 minutos em temperatura ambiente. A reação foi interrompida com a adição de 50 µL de H₂SO₄ 2N em cada poço e a leitura da absorbância foi feita no comprimento de onda de 450 nm.

Para avaliar o desempenho do ELISA IgG anti-SmME, amostras de soro de 118 indivíduos residentes em diferentes áreas, com diferentes perfis epidemiológicos foram utilizadas. Essas amostras foram divididas em quatro grupos:

Grupo Pos: composto por 53 amostras de soro coletadas de participantes que foram positivos para ovos de *S. mansoni* nas fezes examinadas pelas técnicas parasitológicas. Essas amostras pertenciam a indivíduos residentes em Brejo do Amparo (n=19), Pindaibal (n=20), Jaboticatubas (n=8) e Primavera (n=6).

Grupo Neg E: grupo de 20 amostras de soro coletadas de participantes residentes em áreas endêmicas para esquistossomose mansoni, mas que foram negativos para ovos de *S. mansoni* nas fezes examinadas pelas técnicas parasitológicas. Essas amostras são provenientes de Gameleira (n=10) e Bom Jantar (n=10).

Grupo Neg NE: grupo de 34 amostras de soro coletadas de participantes residentes em áreas não endêmicas para esquistossomose mansoni, que foram negativos para ovos de *S. mansoni* nas fezes examinadas pelas técnicas parasitológicas. Essas amostras são provenientes dos municípios de Morro do Pilar (n=20), Jaboticatubas (n=12) e Primavera (n=2).

Grupo Outros H: grupo de 11 amostras de soro coletadas de participantes que foram negativos para ovos de *S. mansoni*, mas positivos para outros helmintos nas fezes examinadas pelas técnicas parasitológicas. Essas amostras são provenientes do município de Primavera.

Para avaliação do desempenho do ELISA IgG anti-SmME, duas estratégias de análise foram utilizadas. Na primeira, foram utilizadas as 118 amostras de soro, sendo 53 amostras

positivas e 65 amostras negativas para esquistossomose mansoni; na segunda forma de análise, foram utilizadas 98 amostras, das quais 53 são positivas e 45 negativas, sendo estas compostas por amostras dos grupos Neg E e Outros H.

4.12.2 Avaliação do nível de anticorpos IgG após o tratamento

Das 26 amostras totais de participantes residentes em Brejo do Amparo, município de Januária, incluídas neste estudo, um subgrupo composto por 20 amostras foram submetidas ao ELISA IgG anti-SmME para avaliação do nível de anticorpos IgG após o tratamento com PZQ. Esses indivíduos, que foram positivos para ovos de *S. mansoni* nas fezes, foram devidamente tratados, conforme a recomendação do Ministério da Saúde, e novas amostras de fezes e soro foram coletadas após três, seis e doze meses. Após cada coleta, as amostras fecais dos indivíduos foram novamente submetidas a diferentes técnicas parasitológicas (Kato-Katz, gradiente salínico e Helmintex[®]). A representação dos grupos e o número de amostras que os compõem estão representados na figura 12.

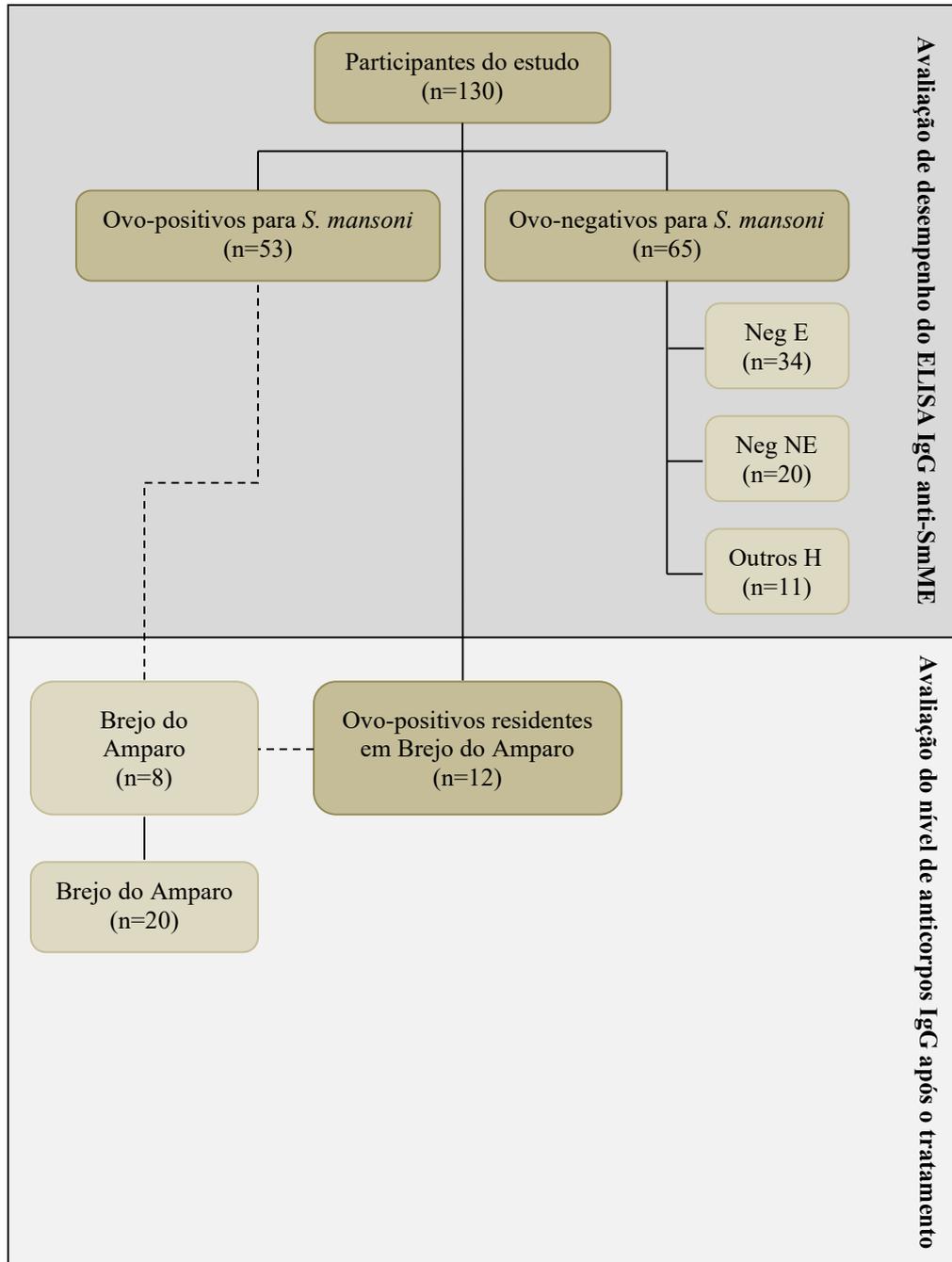


Figura 12: Grupos de amostras utilizadas no ELISA IgG anti-SmME. Na primeira fase foi feita a avaliação de desempenho do ensaio, realizada com um grupo de 118 amostras de soro, sendo 53 pertencentes ao grupo de indivíduos ovo-positivos (Pos) e 65 do grupo de ovo-negativos, de acordo com as técnicas parasitológicas. Além disso, o grupo negativo foi subdividido em negativo de área endêmica (Neg E), negativo de área não endêmica (Neg NE) e com infecção por outros helmintos (Outros H). A segunda fase consistiu na avaliação do nível de anticorpos IgG após o tratamento com PZQ. Para isso, amostras de 12 indivíduos residentes em Brejo do Amparo, mais um subgrupo de amostras de 8 indivíduos incluídos na primeira fase, totalizando amostras de 20 indivíduos, foram submetidas aos ensaios. Essas amostras foram coletadas antes e após três, seis e doze meses de tratamento.

4.13 Análise estatística

Um banco de dados foi montado no programa Microsoft Excel 2010 contendo as informações dos participantes, bem como os resultados das técnicas de Kato-Katz, Helmintex

e gradiente salínico. Esse mesmo banco de dados foi utilizado para entrada dos resultados do ensaio ELISA IgG anti-SmME.

O programa GraphPad Prism versão 8.0 (San Diego, CA, EUA) foi utilizado para fazer as análises estatísticas e construção dos gráficos. Os pontos de corte do ELISA IgG anti-SmME foram determinados através da curva ROC (*Receiver Operator Curve*) e foram consideradas positivas aquelas amostras com leitura de absorbância acima do valor estabelecido.

A análise de normalidade dos grupos foi feita pelo teste de Shapiro-Wilk. A comparação das médias das leituras de absorbância das amostras do grupo positivo e negativo, para ovos de *S. mansoni* nas fezes, foi feita pelo teste de Mann-Whitney, enquanto a comparação entre o grupo positivo (Pos) e subgrupos de negativos (Neg E, Neg NE e Outros H) foi feita pelo teste de Kruskal-Wallis. Nos grupos de amostras obtidas de participantes antes e após o tratamento, a comparação foi realizada pelo teste pareado de Friedman. Os valores da densidade óptica das amostras positivas foram comparados com a carga parasitária pelo teste não paramétrico de correlação de Spearman. O nível de significância de $p \leq 0,05$ foi adotado para todos os testes estatísticos aplicados.

Para o cálculo e análise dos parâmetros sorológicos de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo, acurácia e índice *kappa* do ELISA, foi utilizado o programa online Open-Epi versão 3.01 (disponível em http://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm). A relação entre os valores do índice *kappa* e a força de concordância está esquematizada na tabela 2, adaptada de Landis & Koch, 1977.

Tabela 2: Relação entre o índice *kappa* e a força de concordância do teste diagnóstico

Índice <i>kappa</i>	Força de concordância
<0,00	Ausente
0,00 – 0,20	Insignificante
0,21 – 0,40	Fraca
0,41 – 0,60	Moderada
0,61 – 0,80	Substancial
0,81 – 1,00	Excelente

Fonte: adaptado de Landis & Koch, 1977

5 RESULTADOS

5.1 Produção do antígeno recombinante

5.1.1 Construção do minigene multiepítotos

Após as análises de predição, duas sequências peptídicas da catepsina B, denominadas de P1 e P2, e duas da asparaginil endopeptidase, P3 e P4, que apresentaram altos índices de antigenicidade, foram selecionadas, conforme indicado na seção Materiais e métodos (páginas 43 a 45). Esses peptídeos, juntamente com sequências do P5, previamente utilizado no ELISA-Pp (OLIVEIRA et al. 2006; 2008), foram retrotraduzidos e utilizados na construção do minigene que codifica para o antígeno multiepítotos (antígeno P1-P5). O minigene foi constituído por 960 bases nucleotídicas, que codificam para um antígeno de 320 aminoácidos. As propriedades físico-químicas do antígeno P1-P5 foram preditas por meio do *software* ProtoParam. Por meio dessa análise *in silico* foi predito que esse antígeno possui um peso molecular de 36,4 kDa e o ponto isoelétrico de 8,29 (Figura 13).

```

      10      20      30      40      50      60
WPGCKSIATI RDQSRCGSCW SFGAVEAMSD RSCIQSGGKQ NVELSAVDLL TCCESCGLGC

      70      80      90     100     110     120
EGRCKQTCQR KYKTPYTQDK HRGKSSYNVK NDEKAIQKEI MKYGPVEASF TVYEDFLNYK

     130     140     150     160     170     180
SGIYKFQQIL PSNLSIYATT AANPTECSYS TFCGDP TITT CLADLYSYNW IVDSQTHHLT

     190     200     210     220     230     240
QQTLDCTESV YEQFKSKCFT LQQAPEVGGH FSTLYNYCAD DHNDWNVEIP SNFDSRKKWP

     250     260     270     280     290     300
QRKYKTPYTQ DKHRGKSSYN VKNDEKAIQK EIMKYGPVEA HRQFCETKLI VLCRIFSNTH

     310     320
TVESLAI IIL LKCAQVCIKI

Number of amino acids: 320

Molecular weight: 36461.31

Theoretical pI: 8.29

```

Figura 13: Propriedades físico-químicas do antígeno P1-P5. A análise foi realizada através do *software* ProtParam, disponível em <https://web.expasy.org/protparam/>. O antígeno é constituído por 320 aminoácidos, com peso molecular e ponto isoelétrico estimados em 36,4kDa e 8,29, respectivamente.

5.1.2 Confirmação da transformação bacteriana

A construção pET-28a-P1-P5 foi utilizada para transformar bactérias *E. coli* DH5 α e BL21(DE3) pLysS competentes e a seleção dos clones transformados foi feita em placas com meio LB sólido contendo canamicina. Uma colônia de *E. coli* DH5 α e quatro de BL21(DE3) pLysS foram selecionadas para expansão e extração dos plasmídeos. A confirmação da transformação bacteriana e da presença do inserto foram realizadas por meio de uma digestão dupla dos plasmídeos extraídos e visualizados em gel de poliacrilamida a 6%. A presença de um fragmento de 969 pares de bases confirmou a transformação de ambas as linhagens bacterianas (Figura 14). Isso porque o minigene é constituído por 960 pares de bases, além de cinco pares do sítio da enzima *Bam*HI, três do códon de parada e um par do sítio da enzima *Hind*III. As colônias de cada linhagem bacteriana foram armazenadas em congelador a -80°C.

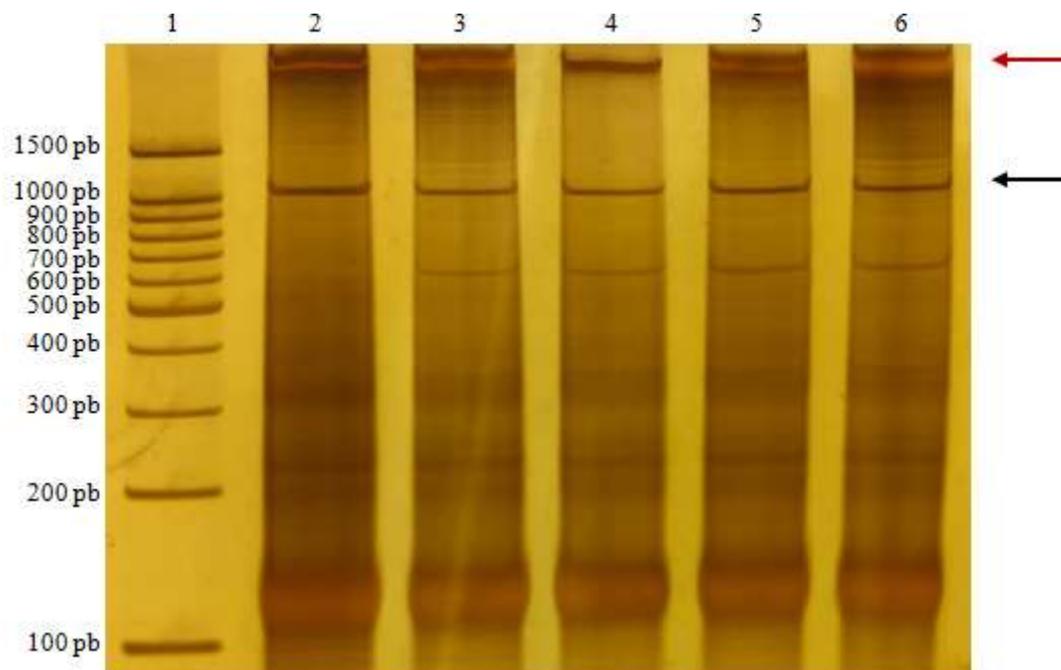


Figura 14: Gel de poliacrilamida a 6% dos produtos da digestão da construção pET28a-P1-P5, com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III. Canaleta 1: Padrão de pares de bases; canaleta 2: digestão enzimática da construção extraída de *E. coli* DH5 α ; canaletas 3 a 6: digestão enzimática da construção extraída de quatro colônias de *E. coli* BL21(DE3) pLysS. Em todas elas, foi possível evidenciar uma banda de 969 pb, referente ao inserto P1-P5 (indicada pela seta preta), e outra acima de 1500 pb (indicada pela seta vermelha), referente ao vetor pET28a.

5.1.3 Cinética de expressão do antígeno multiepítopos

Uma colônia de *E. coli* BL21(DE3) pLysS transformada foi cultivada e induzida à expressão do antígeno recombinante. A análise do gel de poliacrilamida a 12% (Figura 15A) revelou que, na ausência de IPTG, não houve expressão do antígeno recombinante (canaleta 2). Após duas e três horas (canaletas 3 e 4, respectivamente) foi possível identificar uma fração proteica de, aproximadamente, 37 kDa, valor próximo ao esperado para o antígeno

multiepítotos. Essa mesma banda ficou mais intensa após quatro horas de indução (canaleta 5). Para verificar se a fração proteica citada correspondia ao antígeno recombinante P1-P5, foi feito um *Western blotting* com anticorpo monoclonal anti-6X His, utilizando os extratos bacterianos de duas colônias obtidos antes e após quatro horas de indução (Figura 15B). A ausência de uma reação imunoenzimática na alíquota obtida antes da indução (canaleta 2) e o reconhecimento evidente da fração proteica pelo anticorpo monoclonal confirmam a expressão do antígeno recombinante (canaletas 3 e 4).

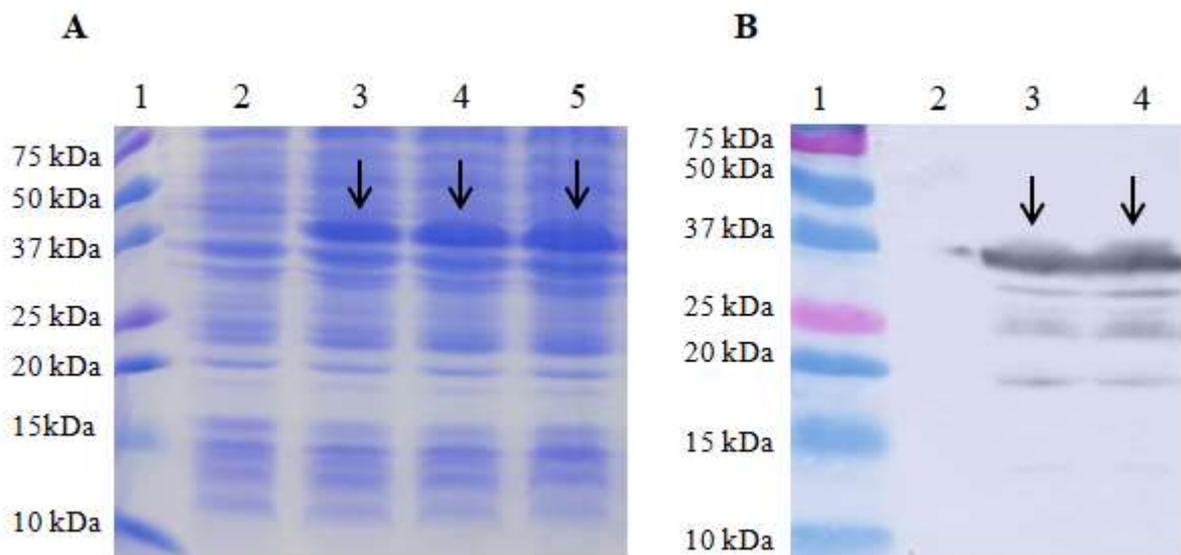


Figura 15: Perfil eletroforético em SDS-PAGE a 12% e *Western blotting* do extrato bacteriano. (A) Uma banda de aproximadamente 37 kDa sugere a expressão do antígeno P1-P5 após duas, três e quatro horas de indução (canaletas 3, 4 e 5, respectivamente). (B) *Western blotting* do extrato bacteriano, obtido após quatro horas de indução da expressão do antígeno com IPTG, evidenciando o reconhecimento da fração proteica pelo anticorpo monoclonal anti-6X His. Em ambas as figuras, a canaleta 1 representa o marcador de peso molecular (Bio-Rad Laboratories) e as setas indicam a fração proteica correspondente ao antígeno P1-P5.

5.1.4 Expressão em maior escala e purificação do antígeno multiepítotos

Após confirmação da expressão do antígeno recombinante, uma colônia de *E. coli* BL21(DE3) pLysS foi expandida, para obtenção do antígeno em grande quantidade. Quatro horas após a indução da expressão do antígeno deu-se início à análise de solubilidade do antígeno recombinante, para verificar se o mesmo estava presente na fração solúvel ou insolúvel do extrato bacteriano. Conforme demonstrado na figura 16, o antígeno P1-P5 é encontrado, principalmente, na fração insolúvel (canaleta 5), o que requer uma purificação em condições desnaturantes.

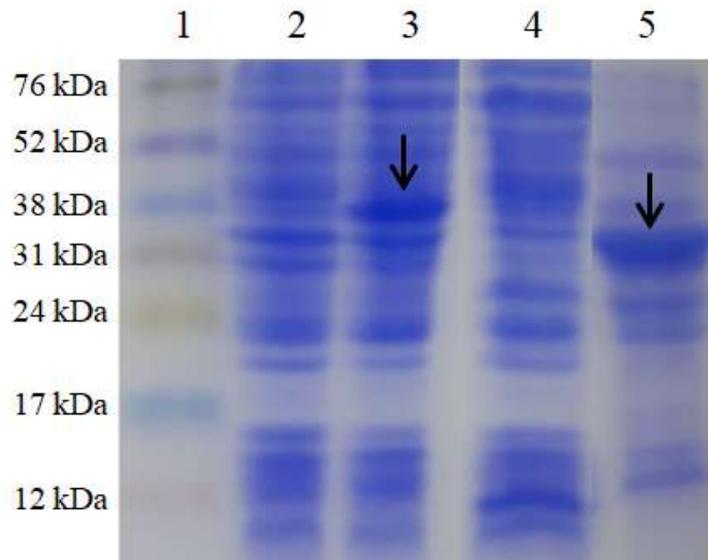


Figura 16: Análise de solubilidade do antígeno P1-P5 em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12%. Bactérias *E. coli* BL21(DE3) pLysS foram induzidas à expressão do antígeno recombinante e, após quatro horas, deu-se início à análise de solubilidade. Canaleta 1: Padrão de peso molecular (Amersham ECL Rainbow Markers; GE Healthcare); canaleta 2: extrato bacteriano antes da indução da expressão do antígeno; canaleta 3: extrato bacteriano após quatro horas de indução; canaleta 4: fração solúvel do extrato bacteriano; canaleta 5: fração insolúvel do extrato bacteriano. As setas indicam a fração proteica correspondente ao antígeno P1-P5.

A purificação se deu pela técnica de cromatografia de afinidade com resina sensibilizada com níquel, graças à presença de uma cauda de histidina inserida na porção N-terminal do antígeno recombinante, através do vetor de expressão. Ao passar pela coluna, a cauda de histidina interage com o níquel presente na resina, ficando retido na coluna. A variação decrescente do pH do tampão de eluição permite a liberação do antígeno, devido à protonação da histidina e reversão da interação iônica. Desta forma, o antígeno recombinante pode ser obtido na fração eluída. Das alíquotas eluídas, cinco delas apresentavam grau de pureza satisfatório, com a presença de uma fração proteica de 37 kDa (Figura 17).

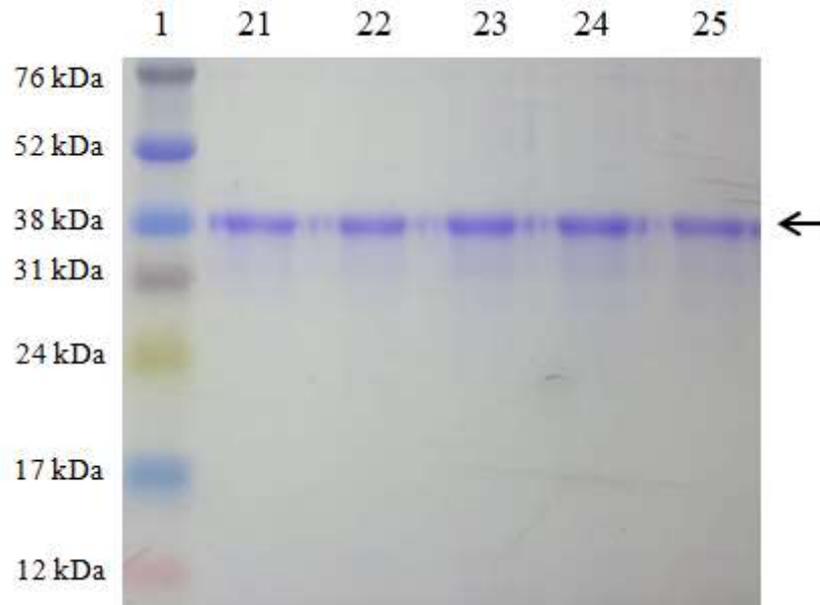


Figura 17: Análise do gel de poliacrilamida a 12%, referente às frações eluídas na purificação por cromatografia de afinidade em coluna sensibilizada com níquel, após coloração com Coomassie Blue. A canaleta 1 indica o padrão de peso molecular e as outras identificações representam as alíquotas obtidas no processo de purificação. A seta indica a fração proteica correspondente ao antígeno P1-P5, representada em 37 kDa, com grau de pureza satisfatório.

5.1.5 Renaturação do antígeno multiepítomos

Após a purificação, uma curva padrão de quatro pontos foi construída para determinar a equação da reta a ser utilizada no cálculo da concentração proteica das amostras eluídas (Gráfico 1). A concentração dessas alíquotas foi determinada pelo método do BCA, através da equação: $y = 2015,9x + 18,726$ (Tabela 3). As alíquotas 21 e 22, que apresentavam grau de pureza similar, foram homogeneizadas e submetidas a um processo de diálise contra tampão de eluição em concentrações decrescentes de uréia e, por fim, contra STF. Com a remoção gradual da ureia, agente desnaturante presente na solução de eluição, ocorre a renaturação do antígeno, favorecendo sua capacidade antigênica. O processo resultou em uma concentração de 48 $\mu\text{g/mL}$ do antígeno recombinante.

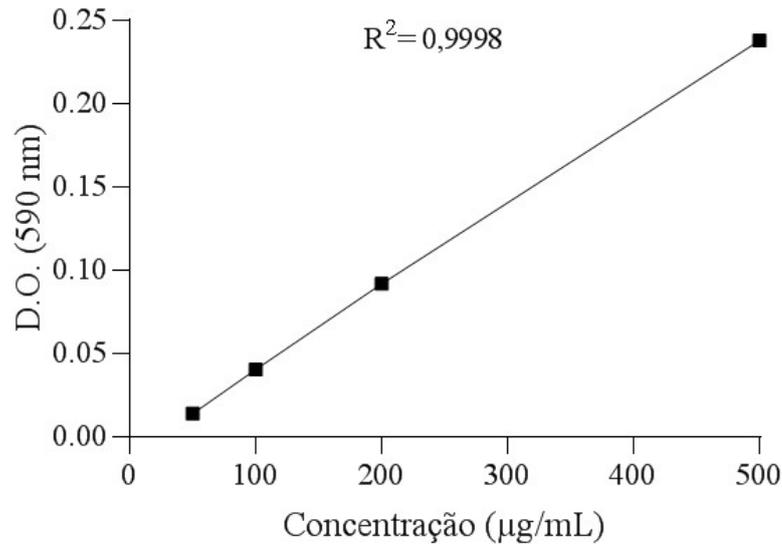


Gráfico 1: Curva padrão construída para determinação da concentração proteica do antígeno multiepítomos. A curva foi construída utilizando diluições de BSA, nas concentrações de 50, 100, 200 e 500 µg/mL.

Tabela 3: Concentração proteica das alíquotas de antígeno eluídas após a purificação

Alíquota	D.O. (590 nm)	Concentração (µg/mL)
21	0,281	586
22	0,195	411
23	0,189	399
24	0,206	434
25	0,222	466

5.2 Padronização do ELISA IgG anti-SmME

A padronização do ensaio foi realizada testando diferentes soluções e condições de bloqueio, diluições da amostra de soro e do conjugado anti-IgG humano. As combinações de diluição de soro e conjugado testadas foram: soro a 1/100 e conjugado a 1/30.000 (C1); soro a 1/100 e conjugado a 1/10.000 (C2); soro a 1/50 e conjugado a 1/30.000 (C3); e soro a 1/50 e conjugado a 1/10.000 (C4). As melhores condições foram determinadas pela análise da relação entre a média da densidade óptica do *pool* de amostras positivas e do *pool* de amostras negativas. Os maiores valores indicam maior diferença entre as leituras de ambos os grupos. Os ensaios realizados utilizando STF-T-BSA 1% como solução de bloqueio não apresentaram altos valores de variação, tanto para o bloqueio realizado em câmara úmida a 37°C por duas horas (Gráfico 2A), quanto para o bloqueio realizado em temperatura de geladeira (4°C a 8°C) por 18 horas (Gráfico 2B). Isso indica que essas condições não foram ideais para caracterizar amostras positivas e negativas, por meio das leituras de absorbância. Quando os ensaios de ELISA foram realizados utilizando STF-T-Leite a 5% como solução de bloqueio, maiores valores de variação

foram obtidos, especialmente quando a incubação da microplaca foi realizada por 18 horas (Gráfico 2C e 2D). Diante disso, pode-se observar que os melhores resultados foram obtidos com 0,5 µg/mL do antígeno recombinante, amostra de soro diluída a 1: 100 e conjugado anti-IgG humano na diluição de 1: 30.000.

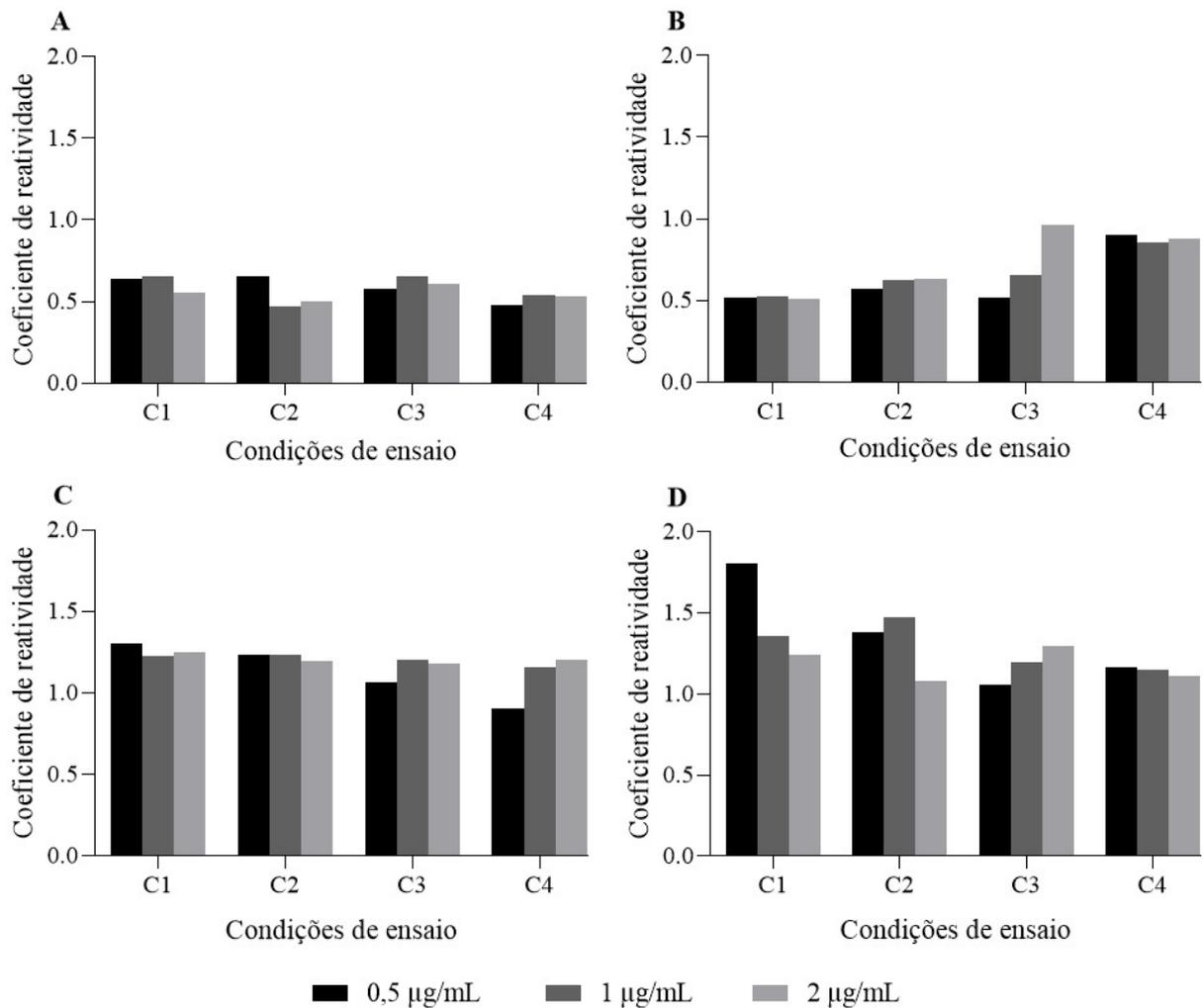


Gráfico 2: Padronização do ELISA IgG anti-SmME. A placa foi sensibilizada com 0,5, 1 e 2 µg/mL do antígeno P1-P5. O bloqueio foi testado com STF-T-BSA a 1% em câmara úmida por duas horas a 37°C (A) e em temperatura de geladeira (4°C a 8°C) por 18 horas (B); e com STF-T-Leite a 5% em câmara úmida por duas horas a 37°C (C) e em temperatura de geladeira (4°C a 8°C) por 18 horas (D). As combinações das diluições de soro e conjugado testadas foram: diluição do soro a 1/100 e diluição do conjugado a 1/30.000 (C1); diluição do soro a 1/100 e diluição do conjugado a 1/10.000 (C2); diluição do soro a 1/50 e diluição do conjugado a 1/30.000 (C3); e diluição do soro a 1/50 e diluição do conjugado a 1/10.000 (C4).

5.3 Avaliação do desempenho diagnóstico do ELISA IgG anti-SmME

5.3.1 Caracterização dos indivíduos do estudo, testados pelo ELISA IgG anti-SmME

Foram incluídas nesse estudo amostras de soro de 130 participantes residentes em sete localidades distintas. Cinquenta e cinco participantes (42,30%) eram do gênero feminino, das quais 21 estavam infectadas por *S. mansoni*. Setenta e cinco participantes (57,70%) eram do gênero masculino, sendo que 38 deles estavam infectados com *S. mansoni*. Não houve diferença significativa quanto à taxa de infecção entre os grupos (Gráfico 3).

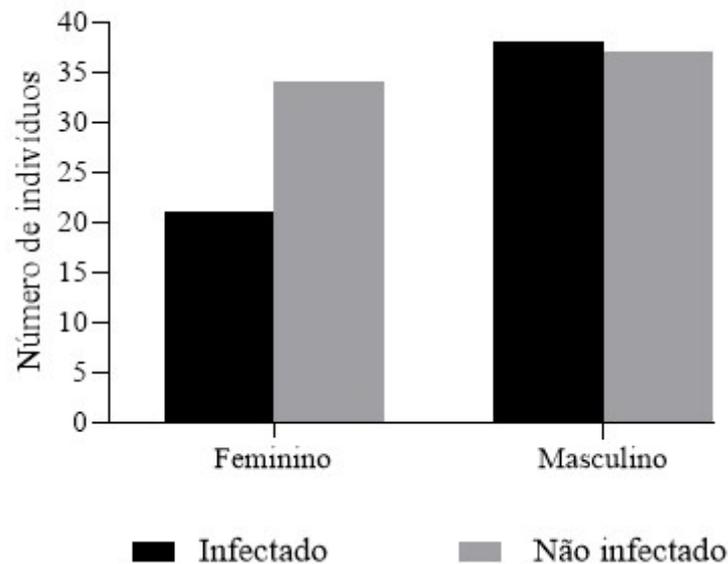


Gráfico 3: Proporção de participantes infectados por *S. mansoni* em relação ao gênero. Dos 130 indivíduos, 55 (42,3%) eram do gênero feminino e 75 (57,7%) do gênero masculino. Vinte e um participantes do gênero feminino e 38 do gênero masculino estavam infectados por *S. mansoni*, enquanto 34 e 37 não estavam infectados pelo parasito, respectivamente. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p = 0,54$).

Os participantes desse estudo apresentavam idade entre 6 e 68 anos, com média de 23,5 anos, dos quais: 40 participantes tinham idade entre 6 e 10 anos, 34 entre 11 e 20 anos, 31 entre 21 e 40 anos, 21 entre 41 e 60 anos e 4 com idade superior a 60 anos. O maior número de infectados foi no grupo daqueles com idade entre 11 e 20 anos, com 21 infectados por *S. mansoni*, seguido pelas faixas etárias de 21 a 40 e 41 a 60 anos, com 16 e 11 infectados, respectivamente. Nove indivíduos com idade entre seis e dez anos estavam infectados, seguido pelo grupo com mais de 60 anos, no qual três estavam infectados. Não houve diferença significativa na taxa de positividade em relação à faixa etária (Gráfico 4). A infecção por *S. mansoni* foi diagnosticada usando uma amostra de fezes examinada pela técnica de Kato-Katz, com duas lâminas, e pelas técnicas Helmintex® e gradiente salínico. Foram identificados 65/130 (50%) participantes infectados por *S. mansoni*, dos quais cinco estavam coinfectados por ancilostomídeo. Sessenta e cinco indivíduos (50%) eram negativos para infecção por *S. mansoni*, sendo: 54 negativos para qualquer parasito; oito com infecção por ancilostomídeo; um por *A. lumbricoides*; um coinfectado por *A. lumbricoides* e ancilostomídeo; e um infectado por *Trichuris trichiura* (Tabela 4).

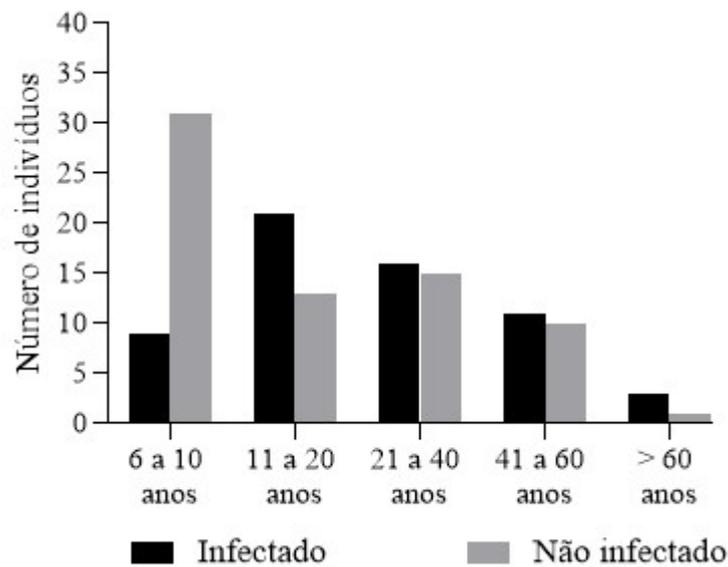


Gráfico 4: Proporção de participantes infectados e não infectados por *S. mansoni* em relação à faixa etária. Dos 40 indivíduos com idade entre 6 e 10 anos, 9 estavam infectados por *S. mansoni*; dos 34 com idade entre 11 e 20 anos, 21 estavam infectados; dos 31 com idade entre 21 e 40 anos, 16 estavam infectados; dos 21 indivíduos com idade entre 41 a 60 anos, 11 estavam infectados e, por fim, dos 4 indivíduos com idade superior a 60 anos, 3 estavam infectados. Não houve diferença significativa na taxa de positividade em relação à faixa etária ($p = 0,71$).

Tabela 4: Proporção de infecção dos indivíduos avaliados por meio de técnicas parasitológicas

Infectados	65 (50%)
<i>Schistosoma mansoni</i>	60
<i>S. mansoni</i> e ancilostomídeo	5
Não infectados	65 (50%)
Negativos para qualquer helminto	54
Ancilostomídeo	8
<i>Ascaris lumbricoides</i>	1
<i>Ascaris lumbricoides</i> e ancilostomídeo	1
<i>Trichuris trichiura</i>	1

5.3.2 Desempenho do ELISA IgG anti-SmME para o diagnóstico da esquistossomose mansoni

Após a seleção das condições ótimas de realização do ELISA IgG anti-SmME, o desempenho do ensaio foi avaliado através de duas formas. Na primeira, foi utilizado um grupo de 118 amostras, das quais 53 foram positivas e 65 negativas no teste referência (duas lâminas de Kato-Katz a partir de uma amostra fecal e pelas técnicas Helmintex® e gradiente salínico). A curva ROC foi utilizada para determinação do ponto de corte do ELISA IgG anti-SmME e está representada no gráfico 5. Esta curva apresenta a sensibilidade em função da proporção de

falsos positivos. Quanto mais próxima a curva ficar da porção superior esquerda do gráfico, maior será a área sob a curva (ASC) e, conseqüentemente, maior o potencial do teste para discriminar indivíduos infectados e não infectados, de modo que uma ASC de 1,0 indica uma acurácia diagnóstica perfeita (sensibilidade e especificidade iguais a 100%). A ASC do ELISA IgG anti-SmME foi de 0,67 (IC 95% 0,57 a 0,77), indicando que o ensaio foi capaz de discriminar os participantes como positivos e negativos ($p=0,0016$).

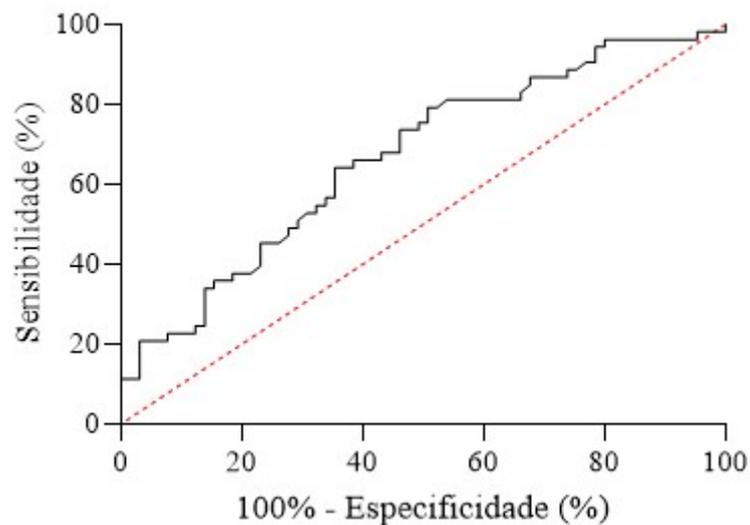


Gráfico 5: Curva ROC do ELISA IgG anti-SmME, determinada a partir da análise 1. A curva ROC foi construída a partir da média das leituras de absorbância das amostras de 53 participantes ovo-positivos e 65 indivíduos ovo-negativos para *S. mansoni*. A linha pontilhada representa um modelo de curva sem nenhum poder discriminador.

Após a construção da curva ROC, alguns pontos de corte foram analisados para selecionar aquele que apresentasse os maiores índices de sensibilidade, especificidade e acurácia diagnóstica. Os resultados foram adicionados em uma tabela de contingência 2 X 2, em comparação ao teste de referência, para determinação das taxas de desempenho.

A sensibilidade do teste variou de 55,56% a 58,33% e a especificidade de 64,18% a 71,74%. O ponto de corte com o maior e menor valor de especificidade apresentou as maiores e menores taxas de valor preditivo positivo, com 75,47% e 54,72%, respectivamente. Entretanto, esta mesma relação não foi observada entre a sensibilidade e o valor preditivo negativo. De modo geral, a concordância entre o ELISA IgG anti-SmME e o método de referência foi fraca, com índice *kappa* variando de 0,20 a 0,27 (Tabela 5). Diante disso, com o intuito de selecionar o ponto em que o teste apresentasse o melhor desempenho, foi levado em consideração a maior taxa de acurácia diagnóstica, que se baseia nos resultados verdadeiramente positivos e negativos ($Acu = VP + VN/n \text{ total}$). Desta forma, o ponto de corte

mais acurado foi em 0,311 e o mesmo encontra-se destacado na tabela. O grupo positivo apresentou leitura de absorvância mínima e máxima de 0,027 e 2,908, respectivamente, e mediana de 0,364, acima do ponto de corte. O grupo negativo apresentou uma leitura mínima de 0,030, máxima de 1,691 e mediana de 0,268, abaixo do ponto de corte. Estes resultados estão apresentados no gráfico 6.

Tabela 5: Desempenho do ELISA IgG anti-SmME usando o teste de referência (duas lâminas de Kato-Katz a partir de uma amostra fecal ou pelas técnicas Helmintex® e gradiente salínico), para classificar infectados e não infectados por *S. mansoni*

PC	Sens.	IC 95%	Esp.	IC 95%	VPP	VPN	ACU	<i>kappa</i>
0,305	55,56%	43,42-67,15	67,27%	54,10-78,19	66,04%	56,92%	61,02	0,22
0,311	58,33%	45,73-79,38	68,97%	56,20-79,38	66,04%	61,54%	63,56	0,27
0,321	57,89%	44,98-69,81	67,21%	54,72-77,67	62,26%	63,08%	62,71	0,25
0,330	56,36%	43,27-68,63	65,08%	52,75-75,67	58,49%	63,08%	61,02	0,21
0,350	56,86%	43,27-69,50	64,18%	52,27-74,60	54,72%	66,15%	61,02	0,20

PC: Ponto de corte. Sens.: Sensibilidade. IC: Intervalo de confiança. Esp.: Especificidade. VPP: Valor preditivo positivo. VPN: Valor preditivo negativo. ACU: Acurácia.

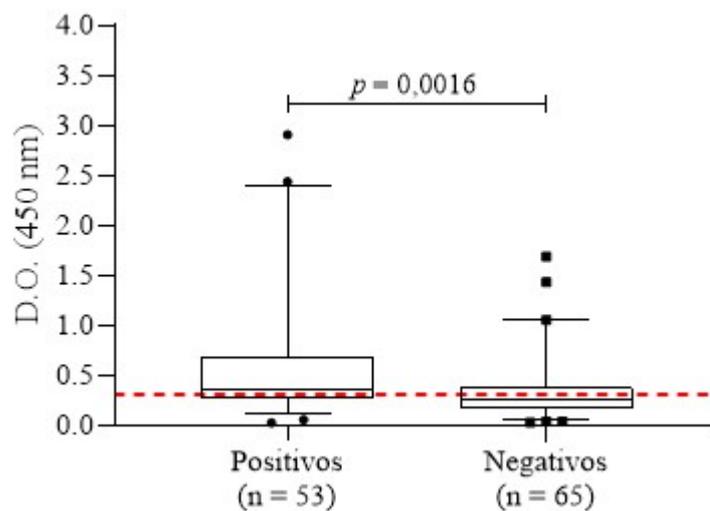


Gráfico 6: Detecção de anticorpos IgG, por meio do ensaio de ELISA IgG anti-SmME, nos grupos de participantes ovo-positivos e ovo-negativos para esquistossomose mansoni. O gráfico foi construído pelas médias das leituras de absorvâncias de 53 amostras ovo-positivas e 65 amostras ovo-negativas de áreas endêmicas (n=20), não endêmicas (n=34) e com infecção por outros helmintos (n=11). As barras indicam a mediana e os percentis de 5 e 95% e a linha pontilhada indica o ponto de corte.

Na segunda análise foram utilizadas 98 amostras, das quais 53 pertenciam ao grupo Pos e as outras 45 pertenciam aos grupos Neg E e Outros H. Desta forma, a curva ROC (gráfico 7) apresentou uma ASC de 0,75 (IC 95% 0,65 a 0,84), com discriminação entre os grupos

($p < 0,0001$). Sob esta análise, o ELISA IgG anti-SmME apresentou um melhor desempenho. Com o ponto de corte estipulado em 0,301, o teste alcançou sensibilidade de 67,92% (IC 95% 54,52 a 78,91) e especificidade de 66,67% (IC 95% 52,07 a 78,64). As taxas de VPP e VPN foram de 70,59% (IC 95% 57,00 a 81,29) e 63,83% (IC 95% 49,54 a 76,03), respectivamente. Por fim, a acurácia diagnóstica apresentou uma taxa de 67,35% (IC 95% 57,56 a 75,82) e índice *kappa* de 0,34 (IC 0,14 a 0,54). O grupo positivo apresentou uma média de leitura de absorbância mínima de 0,043, máxima de 2,908 e mediana de 0,364. Já as leituras mínimas e máximas do grupo negativo foram 0,027 e 0,894, respectivamente, com mediana de 0,196 (gráfico 8).

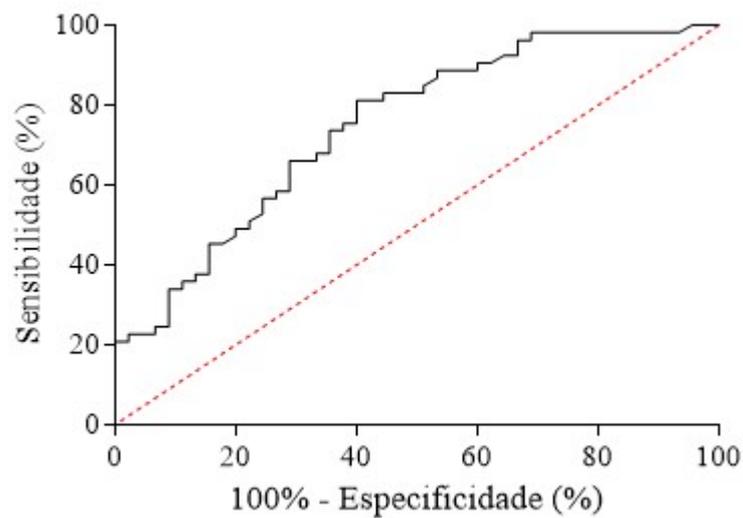


Gráfico 7: Curva ROC do ELISA IgG anti-SmME, determinada a partir da análise 2. A curva ROC foi construída a partir da média das leituras de absorbância de 53 participantes ovo-positivos e 45 ovo-negativos, dos quais 34 são de áreas não endêmicas para esquistossomose mansoni e 11 são de indivíduos infectados por outros helmintos.

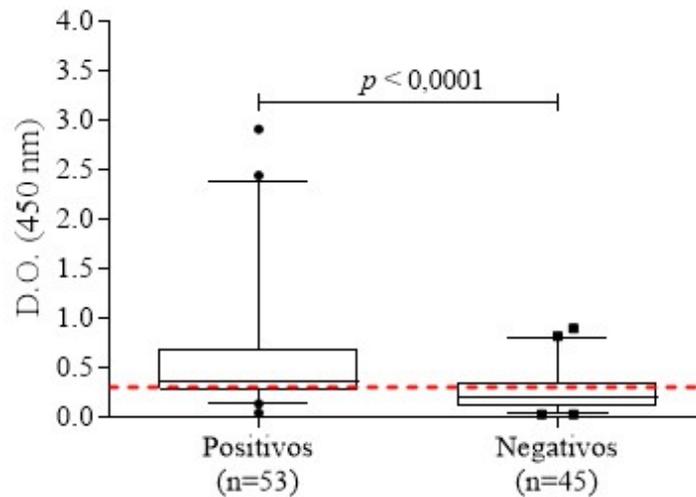


Gráfico 8: Detecção de anticorpos IgG, por meio do ensaio de ELISA IgG anti-SmME, nos grupos de participantes ovo-positivos e ovo-negativos para *S. mansoni*. O gráfico foi construído pelas médias das leituras de absorvâncias de 53 amostras ovo-positivas e 45 amostras ovo-negativas, incluindo amostras de áreas não endêmicas (n=34) e de indivíduos com infecção por outros helmintos (n=11). As barras indicam a mediana e os percentis de 5 e 95% e a linha pontilhada indica o ponto de corte.

A reatividade dos anticorpos IgG dos participantes positivos para esquistossomose mansoni foi avaliada quanto ao número de ovos de *S. mansoni* por grama de fezes. A maior parte dos participantes apresentou ≤ 12 e de 13 a 99 opg, sendo 22 e 24 indivíduos, respectivamente. O ELISA IgG anti-SmME não conseguiu detectar todos os participantes nos subgrupos divididos de acordo com a carga parasitária. O ELISA IgG anti-SmME foi positivo para 16/22 (72,72%) no grupo de participantes com ≤ 12 opg, 16/24 (66,67%) no grupo de 13 a 99 opg, 4/5 (80%) no grupo de 100 a 399 opg, mas não detectou nenhum dos participantes com ≥ 400 opg (Gráfico 7). Não houve diferença significativa entre a imunorreatividade dos anticorpos IgG nos diferentes grupos. O teste não paramétrico de correlação de Spearman foi utilizado para verificar se havia alguma relação entre a leitura de absorvância e a carga parasitária. A interpretação é dada da seguinte forma: $r = 1$ indica uma correlação perfeita; $r = -1$ indica uma relação inversa entre as duas variáveis; e $r = 0$ indica que não há uma relação entre as variáveis. De fato, não foi observada uma correlação positiva entre a reatividade dos anticorpos e o número de ovos por grama de fezes ($r = 0,09$).

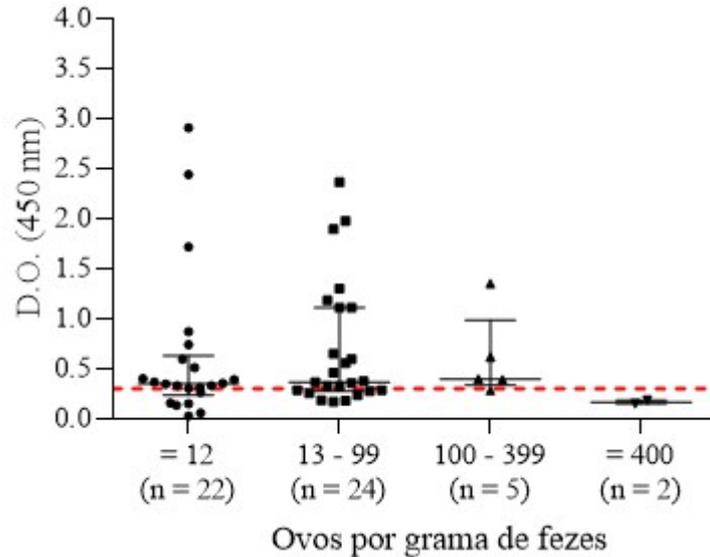


Gráfico 9: Imunorreatividade de anticorpos IgG contra o antígeno multiepitópos, definida pelo ELISA IgG anti-SmME, em subgrupos de indivíduos ovo-positivos para *S. mansoni*, estratificados pela carga parasitária. O gráfico foi construído pela média das leituras de absorvância de 53 amostras positivas e o número de ovos por grama de fezes foi calculado a partir de duas lâminas de Kato-Katz, usando uma amostra fecal. As barras indicam a mediana e os intervalos interquartis de 25 e 75% e a linha pontilhada indica o ponto de corte.

O grupo de participantes infectados por *S. mansoni* foi analisado em relação ao grupo de negativos para esquistossomose mansoni, que foi dividido em subgrupos de residentes de área endêmica (Neg E), residentes de área não endêmica (Neg NE) e com infecção por outros helmintos (Outros H). Das 53 amostras positivas, 36 (67,92%) foram corretamente detectadas, já que apresentaram leitura de absorvância acima do ponto de corte. As leituras de absorvância desse grupo e a idade dos participantes foram analisadas pelo teste de correlação de Spearman, mas nenhuma correlação foi encontrada ($r = -0,004$).

No primeiro subgrupo de negativos, 13/20 (65%) amostras apresentaram leituras de absorvâncias acima do ponto de corte; no grupo Neg NE foram 13/34 (38,23%) amostras e, no terceiro subgrupo, foram 2/11 (18,18%) amostras, sendo uma de indivíduo com infecção por ancilostomídeo e outra de indivíduo com infecção por *A. lumbricoides*. O ELISA IgG anti-SmME demonstrou diferença significativa quando os resultados do grupo Pos foi comparado com os do subgrupo Neg NE ($p=0,0132$), mas o mesmo não ocorreu entre o grupo Pos e o subgrupo Neg E. Além disso, houve diferença estatística entre o grupo Pos e o grupo Outros H ($p=0,0003$) e entre os grupos Neg E e Outros H ($p=0,0021$) (Gráfico 8).

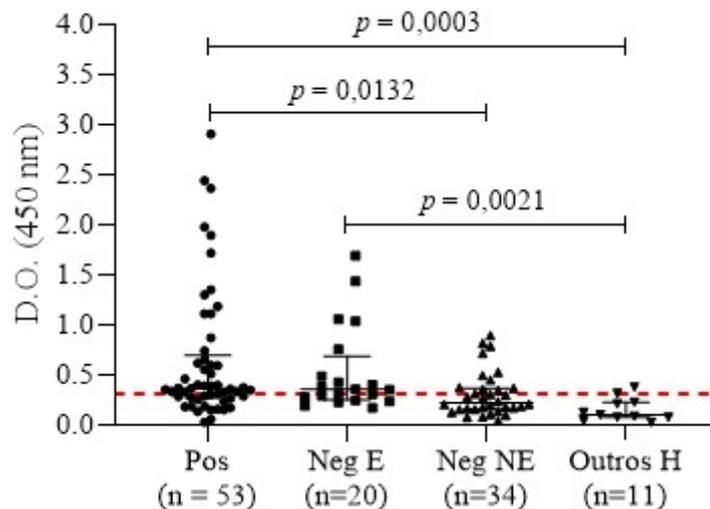


Gráfico 10: Detecção de anticorpos IgG pelo ELISA IgG anti-SmME nos grupos de participantes positivos (Pos), negativos de área endêmica (Neg E), negativos de área não endêmica (Neg NE) e de indivíduos com infecção por outros helmintos (Outros H). O gráfico foi construído pela média das leituras de absorbância de 53 amostras ovo-positivas e 65 amostras ovo-negativas para *S. mansoni*. As barras indicam a mediana e os intervalos interquartis de 25 e 75%.

5.3.3 Avaliação do nível de anticorpos IgG após tratamento com praziquantel

Um subgrupo de amostras de 20 participantes com esquistossomose mansoni, residentes em Brejo do Amparo, foram tratados com PZQ e acompanhados após três, seis e doze meses. Todos esses indivíduos foram positivos nos exames parasitológicos antes do tratamento e permaneceram ovo-negativos durante todo o acompanhamento. Antes do tratamento, a mediana das leituras de absorbância foi de 0,200. Após três meses, esta foi de 0,253, aumentando para 0,453 após seis meses e diminuindo para 0,349 após doze meses. Entretanto, as diferenças entre as medianas dos grupos não foram significativas ($p=0,3735$) (Gráfico 9A). Na análise de reatividade individual (Gráfico 9B), dos 20 indivíduos positivos antes do início do tratamento (tempo 0), apenas 8 apresentaram leitura de absorbância acima do ponto de corte (0,301). Três meses após o tratamento, 8 amostras também foram positivas no ELISA, sendo que dessas, quatro foram positivas no tempo 0. Após seis meses, 14 amostras foram positivas, permanecendo em 12 após 12 meses de tratamento.

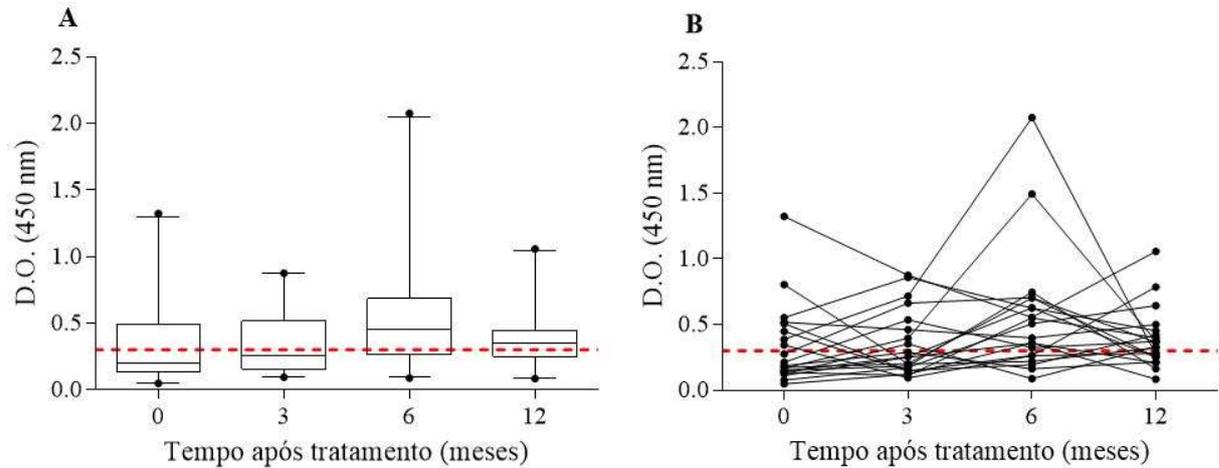


Gráfico 9: Avaliação e acompanhamento da imunorreatividade de anticorpos IgG, determinada pelo ELISA IgG anti-SmME antes (0) e após três (3), seis (6) e doze meses (12) de tratamento com praziquantel, de 20 indivíduos inicialmente infectados por *S. mansoni*. (A) Antes do tratamento, a mediana das leituras de absorvância foi de 0,200, aumentando para 0,253 após três meses e para 0,453 após seis meses, e diminuída para 0,349 após doze meses de tratamento. Entretanto, não houve diferença significativa entre os tempos avaliados. As barras indicam a mediana e os intervalos interquartílicos de 5 e 95% e a linha pontilhada indica o ponto de corte. (B) Análise de reatividade individual mostrando que no tempo 0 e após três meses de tratamento, 8 amostras foram positivas no ELISA IgG anti-SmME, enquanto esse número subiu para 14 e 12 após seis e doze meses de tratamento, respectivamente.

6 DISCUSSÃO

As técnicas parasitológicas permanecem como a principal forma de diagnóstico laboratorial da esquistossomose mansoni. Estas são amplamente utilizadas para o diagnóstico dessa doença, seja pelo fato de fornecerem diagnóstico de certeza, seja pela eficácia e pelo custo-benefício. Entretanto, as técnicas parasitológicas comuns têm apresentado baixo desempenho, especialmente nos casos de indivíduos com baixa carga parasitária (>100 opg). Esses indivíduos não são tratados e permanecem infectados, contribuindo para a manutenção da transmissão residual da doença (SECOR, 2014).

Diante da atual situação da esquistossomose no Brasil e em vários outros países, é essencial o desenvolvimento de técnicas diagnósticas mais acuradas, que possam contribuir para o controle e eliminação da doença. Uma técnica que apresente elevadas taxas de sensibilidade e especificidade é de extrema importância para o diagnóstico da doença, oportunizar o tratamento e, conseqüentemente, promover a interrupção da transmissão do parasito numa determinada área (LUSTIGMAN et al., 2012). As técnicas baseadas na detecção de anticorpos têm melhorado a eficiência do diagnóstico da esquistossomose, principalmente em áreas de baixa endemicidade (ALARCÓN DE NOYA et al., 1992; KINKEL et al., 2012).

Vários antígenos recombinantes têm sido utilizados em ensaios de ELISA e avaliados quanto ao seu potencial diagnóstico. A sensibilidade desses ensaios alcançaram taxas de 87% para SmE16, uma proteína expressa no ovo do parasito (MOSER; DOENHOFF & KLINKERT, 1992); 77% para infecções por *S. mansoni* e 89,4% por *S. haematobium*, quando empregado o antígeno Sm22.3 (HANKOCK et al., 1997); 55% e 60% com o uso dos antígenos Sm31 e Sm32, respectivamente. A sensibilidade aumentou para 75% quando ambos os antígenos foram combinados (KLINKERT et al., 1991).

Na China, um grupo de pesquisadores produziu, em sistema procaríoto, vários antígenos multiepítotos a partir de proteínas de *S. japonicum*, para o diagnóstico da esquistossomose em cabras. Os resultados obtidos chegaram às taxas de 97,8% de sensibilidade e 100% de especificidade (CHAO et al., 2016). Esses valores foram superiores aos obtidos quando o ensaio foi realizado com os antígenos isoladamente (JIN et al., 2010).

Estes dados reforçam o potencial da utilização de um antígeno contendo seqüências de diferentes epítotos para aplicação diagnóstica. Neste sentido, um antígeno multiepítotos foi construído, expresso em bactérias *E. coli* e utilizado em um ensaio imunoenzimático de ELISA, para o diagnóstico laboratorial da esquistossomose mansoni. Esse antígeno é formado por cinco peptídeos. Os peptídeos P1 e P2 foram obtidos da seqüência de aminoácidos da catepsina B,

enquanto P3 e P4 foram obtidos da sequência da asparaginil endopeptidase, ambas submetidas à predição de epítomos de célula B. O peptídeo P5 é formado pela união de três peptídeos que compõem a sequência da catepsina B e por dois peptídeos da ORF do clone ET03. Os três primeiros peptídeos que compõem P5, correspondem a IMT-164, IMT-178 e IMT-180 descritos por Noya et al. (2001), que sintetizaram 17 peptídeos por meio da estratégia t-boc, tendo como base a sequência de aminoácidos da Sm31 (catepsina B). A antigenicidade desses peptídeos foi primeiramente avaliada por meio da técnica de *Western blotting*, usando soros de coelhos previamente imunizados com esses peptídeos. Desses, 10 foram imunogênicos, sendo que ITM-172 e ITM-180 reconheceram o antígeno Sm31 na técnica de *Western blotting*. Os outros dois peptídeos que formam o P5 foram descritos como sendo parte de sequência obtida por meio de sequenciamento do clone ET03, que foi consistentemente reativo durante um processo de seleção usando anticorpos anti-Sm31/32 (catepsina B/asparaginil endopeptidase) dissociados de complexos imunes. A antigenicidade desses peptídeos foi primeiramente avaliada contra um *pool* de amostras de soros positivas e um *pool* de soros negativos para esquistossomose mansoni (VALLI et al., 2007).

Posteriormente, a antigenicidade dos cinco peptídeos, que compõem o P5, foi avaliada contra um *pool* de amostras de soros positivas e um *pool* de soros negativos para esquistossomose mansoni, usando dois diferentes procedimentos de sensibilização de microplacas de poliestireno (OLIVEIRA et al., 2006). Em seguida, os peptídeos que compõem o P5 foram misturados e usados para o desenvolvimento de um ensaio imunoenzimático de ELISA, que foi chamado de ELISA-Pp. O ELISA-Pp apresentou sensibilidade de 86,8% e especificidade de 94,2%, quando foi avaliado em 53 e 139 amostras de soro de participantes com esquistossomose mansoni e participantes saudáveis e com outras helmintoses, respectivamente (OLIVEIRA et al., 2008).

Diante desses resultados, nesse trabalho foi desenvolvido um ensaio imunoenzimático de ELISA, usando um antígeno multiepitópicos (antígeno P1-P5), para o diagnóstico laboratorial da esquistossomose mansoni (ELISA IgG anti-SmME). Na construção da sequência polinucleotídica, foram mantidas as sequências nucleotídicas que codificam para os peptídeos usados no ELISA-Pp e acrescentou-se outras sequências, tanto da catepsina B (Sm31) como também da asparaginil endopeptidase (Sm32), cujos peptídeos apresentaram altos índices de predição antigênica na análise *in silico*.

A catepsina B também está presente nos mamíferos. Ela é parte de uma família de 11 cisteínoproteases e, em humanos, está envolvida na invasão de tumores e metástases (AGGARWAL & SLOANE, 2014). A catepsina B de *S. mansoni* apresenta quase 70% de

homologia com a catepsina B do fígado humano (KLINKERT et al., 1989). Apesar de os epítomos de sua sequência terem sido utilizados para fins de diagnóstico, durante a construção *in silico* do antígeno multiepítomos foi realizado um alinhamento entre sua sequência e a sequência da catepsina B humana, usando o algoritmo HAlign (SÖDING, 2005) do *software* Clustal-Omega. O alinhamento resultou em apenas 71 aminoácidos idênticos, com 17,23% de identidade (Anexo C).

Além do antígeno P1-P5, um segundo minigene, denominado P5-P6, foi construído, mas não foi dado seguimento até a etapa final do processo de produção do antígeno recombinante. Este minigene foi composto por 140 aminoácidos que, além dos peptídeos que compõem a sequência P5, também foram incluídos dois peptídeos pertencentes ao antígeno CCA, descritos no trabalho de Grenfell et al. (2013).

O antígeno P1-P5 foi produzido em bactérias *E. coli* BL21(DE3) pLysS. Apesar dessa linhagem possuir o plasmídeo pLysS, resistente ao cloranfenicol, seu cultivo foi realizado apenas na presença de canamicina, porque na primeira tentativa de expansão desta linhagem, a mesma não se multiplicou em meio contendo cloranfenicol. Com a suspeita de que houve a perda do plasmídeo pLysS, um experimento de cultivo em meio de cultura contendo canamicina e, em paralelo, em meio contendo canamicina e cloranfenicol, confirmou a suspeita. Houve crescimento bacteriano apenas na primeira condição citada. Em condições laboratoriais, esses plasmídeos são distribuídos de forma aleatória durante a divisão celular e, na ausência de pressão seletiva podem ser perdidos (SAVVAS & MIKRIDES, 1996). A perda do plasmídeo pode ser aumentada em casos de várias cópias do mesmo plasmídeo; quando os genes inseridos reduzem a taxa de crescimento ou são tóxicos para o hospedeiro; quando as bactérias são cultivadas em processos contínuos (BANEYX, 1999); ou ainda, em caso de congelamento (KOENING, 2003).

Após expressão, a análise de solubilidade mostrou que o antígeno estava presente na fração solúvel e, em maior quantidade, na fração insolúvel do extrato bacteriano. A primeira tentativa de purificação foi feita a partir da fração solúvel, mas o rendimento foi extremamente baixo e as alíquotas eluídas possuíam algumas proteíneas contaminantes, que inviabilizaram novos procedimentos de purificação. Como alternativa, novas tentativas de expressão podem ser realizadas em outras linhagens bacterianas para otimização da produção, ou ainda, pode-se realizar uma segunda etapa de purificação, que possa separar as frações pela massa molecular.

A expressão de proteínas na fração insolúvel é resultado da formação de corpos de inclusão, que são agregados de proteínas com conformação tridimensional incompleta (PALOMARES et al., 2004). As causas desse fenômeno podem ser várias, como altas

concentrações da proteína recombinante, o que facilita a agregação e a deficiência na formação das ligações dissulfeto, devido ao ambiente redutor do citoplasma bacteriano (CARRIÓ & VILLAVERDE, 2002). Como alternativa, o cultivo em baixas temperaturas pode favorecer a expressão de proteínas solúveis visto que, com a redução do metabolismo e do nível de expressão, a proteína alcançaria suas estruturas terciárias e quaternárias (GOPAL & KUMAR, 2013). Um cultivo de bactérias foi mantido por diferentes períodos após indução, em *shaker* a 15°C e 200 rpm, mas não foi constatada a expressão do antígeno nessas condições. Sendo assim, para obtenção de maior quantidade do antígeno, a purificação se deu a partir da fração insolúvel, que envolveu os processos de isolamento e solubilização dos corpos de inclusão.

Os métodos utilizados para o isolamento desses agregados incluíram a ruptura celular mecânica e química, feitas por sonicação e uso de lisozima, respectivamente. A sonicação é a aplicação de energia sonora para agitação de partículas em uma amostra (KAMINENI & HUANG, 2019) e, no caso das bactérias, causa ruptura das ligações iônicas, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas no organismo (YOKOI; KINOSHITA & ZHANG, 2005), enquanto a lisozima causa a hidrólise da ligação glicosídica que une os resíduos de açúcares aminados presentes na parede celular (RATHORE; BILBREY & STEINMEYER, 2003). A solubilização foi realizada com o uso de uma solução contendo alta concentração de ureia. A ureia é um agente desnaturante típico que, em altas concentrações, tem efeito caotrópico, isto é, ela rompe as ligações não covalentes entre as moléculas da proteína. Além disso, é adicionado β -ME para reduzir as ligações dissulfeto inter e intramoleculares (YAMAGUCHI & MIYAZAKI, 2014).

A importância da conformação proteica na determinação da especificidade antigênica é bem conhecida, pois evidências indicam que essa propriedade é drasticamente reduzida com a desnaturação proteica (CRUMPTON, 1974). Portanto, foi realizada a renaturação do antígeno por meio de diálise, pois a maioria das proteínas retorna ao seu estado nativo com a remoção do agente desnaturante (KONERMANN, 2012). Esse fenômeno ocorre, provavelmente, porque todas as propriedades físico-químicas para a formação da estrutura tridimensional da proteína estão contidas na sequência de aminoácidos (ANFINSEN, 1973).

O ELISA IgG anti-SmME, desenvolvido após obtenção do antígeno P1-P5, foi aplicado em um grupo de amostras de indivíduos residentes de localidades com diferentes perfis de endemicidade. Em regiões endêmicas, os indivíduos são constantemente expostos ao parasito (COLLEY & SECOR, 2014). Neste caso, a primo-infecção ocorre em torno dos dois anos de idade e as maiores taxas de prevalência e intensidade de infecção ocorrem em adolescentes jovens, com uma diminuição na fase adulta e terceira idade (COLLEY et al., 2014). Esse

aumento da prevalência até a segunda década de vida, observado nesse estudo, também já havia sido documentada em outras áreas endêmicas para a doença (CONCEIÇÃO & COURA, 1978; FLEMING et al., 2006). A redução da prevalência na idade adulta pode ser devido ao histórico e à fonte de exposição dos indivíduos. Em um estudo realizado com lavadores de carros foi observado que a resistência à reinfeção pelo parasito aumenta após cada ciclo de infecção e cura terapêutica (BLACK et al., 2010).

O desempenho do ELISA IgG anti-SmME foi avaliado com e sem a presença do grupo Neg E. Na primeira estratégia de análise foram utilizadas amostras de soro de 53 participantes positivos e 65 negativos para a esquistossomose mansoni. As médias das leituras de absorbância desses grupos foram utilizadas para a construção da curva ROC, que teve uma área sob a curva de 0,67. Apesar de este valor indicar um desempenho abaixo do esperado, o teste apresentou poder significativo de discriminar os indivíduos positivos e negativos ($p=0,016$). A partir da curva ROC, foram selecionados cinco pontos de corte com diferentes combinações de sensibilidade e especificidade. A seleção partiu do ponto situado na porção mais superior e à esquerda da curva (0,321), pois é o ponto relacionado ao menor número de resultados falsos positivos e negativos. Dessa forma, ocorre um balanço nas taxas de sensibilidade e especificidade, respectivamente. A partir deste valor, foram selecionados dois pontos de corte acima e abaixo.

Apesar dos vários pontos de corte estabelecidos, não houve grande variação no desempenho do teste, já que a sensibilidade e especificidade do ELISA-SmME variaram de 55,56% a 58,33% e de 64,18% a 71,74%, respectivamente. Isso pode ser explicado pelo grupo de amostras situado na zona cinza, cuja leitura de absorbância compreendeu os limites de 10% acima ou abaixo do ponto de corte. A maior sensibilidade, acurácia e concordância foram alcançadas com o ponto de corte de 0,311, que diagnosticou corretamente 35/60 participantes positivos e 40/58 negativos. Na segunda estratégia, o grupo Neg E foi retirado da análise e, com isso, a curva ROC apresentou uma ASC de 0,75, e o melhor ponto de corte foi definido em 0,301, no qual a sensibilidade e especificidade do teste aumentaram para 67,92% e 66,67%, respectivamente. Isso foi devido ao aumento dos casos verdadeiramente positivos (36/53) e verdadeiramente negativos (30/45).

O ELISA IgG anti-SmME apresentou uma fraca concordância com o teste parasitológico ($kappa = 0,34$) e este resultado precisa ser analisado sobre duas vertentes, relacionadas à sensibilidade e à especificidade do teste. A baixa sensibilidade pode estar relacionada ao fato de os anticorpos presentes nas amostras de soro dos participantes não responderem aos epítomos utilizados no antígeno. O sistema imune humano pode responder

contra um antígeno com a produção de anticorpos contra epítomos conformacionais e glicosilados, que não são reproduzidos quando se produz proteínas recombinantes em bactérias e peptídeos sintéticos, ou quando estes são danificados por tratamentos químicos quando se prepara um antígeno purificado, comprometendo a sensibilidade do teste sorológico. Pelo fato de que o antígeno P1-P5 ter sido produzido em sistema procarioto, o mesmo não contém as modificações pós-traducionais realizadas pelas células eucarióticas (MARSTON, 1986). A expressão do antígeno recombinante em outros vetores de expressão, especialmente os eucarióticos, pode melhorar a antigenicidade do antígeno P1-P5 e, conseqüentemente, o desempenho do ELISA IgG anti-SmME.

Por outro lado, o desempenho do teste em detectar corretamente os indivíduos ovo-negativos pode ter sido comprometido pela subestimação dos casos nesses subgrupos de indivíduos (Neg E, Neg NE e Outros H). Como já foi demonstrado, no cenário epidemiológico atual da esquistossomose mansoni a maior parte dos indivíduos infectados apresenta baixa carga parasitária, o que compromete o desempenho das técnicas parasitológicas (BRASIL, 2014). Além disso, o alto nível de anticorpos circulantes, especialmente em indivíduos residentes de áreas endêmicas, pode aumentar o número de resultados falsos positivos pelos testes sorológicos. Das 60 amostras que foram positivas no ELISA IgG anti-SmME na primeira análise, 25 delas foram erroneamente classificadas. Do subgrupo Neg E, sete são de residentes de Bom Jantar e cinco são de Gameleira, áreas endêmicas para a esquistossomose mansoni. Esses participantes tinham idade média de 42 anos e a alta reatividade dos anticorpos IgG pode estar relacionada ao contato e infecção anterior dos indivíduos com o parasito, talvez durante a infância ou adolescência e/ou infecções antigas que se encontram na fase da pós-patência, com vermes já senescentes. Do subgrupo Neg NE, sete participantes são do município de Jaboticatubas e quatro de Morro do Pilar, áreas de baixa endemicidade ou não endêmicas para a esquistossomose, respectivamente, sendo todos eles crianças em idade escolar. Por fim, do grupo Outros H, apenas duas amostras, uma com infecção por ancilostomídeo e outra por *A. lumbricoides*, apresentaram médias de leituras de absorbância acima do ponto de corte, indicando, assim, uma baixa reatividade cruzada com outros helmintos. Esse valor foi reduzido para 17/53 quando o subgrupo Neg E não foi incluído na análise de desempenho do teste.

Nos países tropicais, é bastante comum que um indivíduo esteja coinfectado ou exposto a duas ou mais espécies de helmintos (BROOKER et al., 2000; FLEMING et al., 2006), o que pode levar à redução da especificidade de um teste sorológico. A semelhança entre os antígenos dos diferentes parasitos, ou uma infecção passada ou não diagnosticada, pode levar a uma reatividade cruzada da resposta imune celular (GEIGER et al., 2004) e humoral (CORRÊA-

OLIVEIRA et al., 2002). Neste trabalho, cinco indivíduos estavam coinfectados por *S. mansoni* e ancilostomídeo, mas apenas um deles apresentou resultado positivo no ELISA IgG anti-SmME. Este resultado inesperado é discordante daqueles obtidos por Corrêa-Oliveira et al. (2002), que mostraram que as imunoglobulinas de pacientes infectados por ancilostomídeo reagem de maneira cruzada ao SEA e SWAP de *S. mansoni*. Em relação aos onze indivíduos monoinfectados por outros helmintos, apenas dois, um infectado por Ancilostomídeo e outro por *Ascaris* spp. apresentaram leituras acima do ponto de corte. Isso pode ser devido a uma reação cruzada ou a uma infecção ou exposição à *S. mansoni* não detectada. Novos estudos deverão ser realizados com antígeno P1-P5 e com um número maior de indivíduos infectados com geohelmintos de áreas não endêmicas para esquistossomose, visando avaliar melhor e de forma mais abrangente o seu desempenho, já que, até o momento, esse é primeiro estudo usando um antígeno recombinante multiepítopos no ensaio de ELISA, para o diagnóstico da esquistossomose mansoni. Esse antígeno pode ser usado para detecção de isotipos de IgG, ou ainda, aplicado em outras plataformas sorológicas, como na citometria de fluxo, por exemplo.

A maior parte dos participantes positivos para a esquistossomose mansoni, incluída neste estudo, apresentaram baixa carga parasitária, sendo 22 com ≤ 12 opg e 24 com 13-99 opg; cinco indivíduos com carga moderada, com 100-399 opg e apenas dois com carga alta, ≥ 400 opg. Esse tipo de informação é de extrema importância no desenvolvimento de novos testes, pois uma das maiores limitações da técnica de Kato-Katz, recomendada pela OMS (WHO/PAHO, 2014), é a detecção de indivíduos com baixa carga parasitária (ENK et al., 2008). O ELISA IgG anti-SmME apresentou um bom desempenho no diagnóstico desses indivíduos, detectando corretamente 15/22 dos participantes com ≤ 12 opg e 16/24 dos participantes com 13 a 99 opg, apresentando uma sensibilidade de 68,18% e 66,67%, respectivamente. Em contrapartida, a técnica de Kato-Katz realizada com duas lâminas a partir de uma amostra fecal não é capaz de identificar a infecção nos indivíduos com ≤ 12 opg. O melhor desempenho é obtido com a coleta de três amostras fecais e confecção de duas lâminas de cada uma delas, que alcança uma sensibilidade máxima de 40% (OLIVEIRA et al., 2018).

Para verificar se havia alguma relação entre a leitura de absorbância e a carga parasitária dos participantes, foi feita uma análise de correlação de Spearman, mas não foi encontrada uma relação positiva entre esses dois resultados ($r = 0,09$). Isso pode estar relacionado ao tipo de antígeno e anticorpo analisado em relação à intensidade de infecção, ou simplesmente refletir a capacidade da resposta imune de cada indivíduo de reconhecer e reagir contra os antígenos do parasito. Estudos anteriores mostraram que os níveis de IgA, IgE, IgG₁ e IgG₄ estão inversamente relacionados à intensidade de infecção (WOOLHOUSE & HAGAN, 1999;

MUTAPI et al., 2011), especialmente a razão entre IgE e IgG₄, que reconheceram, basicamente, as mesmas frações antigênicas do SWAP de *S. haematobium* (MUTAPI et al., 2011). Diferenças também podem ser encontradas em relação à idade do hospedeiro. Webster et al. (1997) demonstraram que os níveis de IgE aumentam com a idade do indivíduo frente ao SWAP de *S. mansoni* e *S. japonicum*, mas nenhum padrão foi encontrado para os isotipos IgG₁, IgG₃ e IgG₄. Por outro lado, os níveis desses isotipos frente ao SEA tendem a diminuir com o aumento da idade do hospedeiro.

Neste trabalho, a imunorreatividade dos anticorpos IgG contra o antígeno multiepítomos não diminuiu, mesmo após um ano de tratamento. A presença de anticorpos específicos circulantes pode ser explicada pela persistência de alguns vermes vivos no sistema porta-hepático, sem realizar a oviposição (VENDRAME et al., 2001), pela liberação de vários antígenos após a morte do parasito (ROBERTS et al., 1987) e pela persistência de antígenos nos tecidos do hospedeiro (HASSAN; BADAWI & STRAND, 1992). Esses níveis elevados podem se manter por dois ou até mais anos (JONES; MITCHELL & LEEN, 1992). Por ser uma área endêmica, o contato com o parasito e casos de reinfeção são muito frequentes.

Assim como em várias doenças, a melhor abordagem para o diagnóstico da esquistossomose depende do contexto epidemiológico. Devido a esses anticorpos circulantes, em áreas de alta endemicidade os ensaios sorológicos têm uso limitado, enquanto as técnicas parasitológicas são as mais realizadas. Por outro lado, a detecção de anticorpos é uma boa estratégia para o diagnóstico de indivíduos de área não endêmica. Neste caso, a exposição às cercárias geralmente é limitada, o que resulta em infecções de baixa carga parasitária, fato que compromete o diagnóstico laboratorial pelas técnicas parasitológicas (DOENHOFF; CHIODINI & HAMILTON, 2004; CLERINX & GOMPEL, 2011). Um exemplo disso foi o uso de um ensaio de ELISA, usando extrato total de vermes adutos, o IgG-ELISA-SWAP, como critério no tratamento de um grupo de 50 indivíduos infectados após exposição a um foco de transmissão de esquistossomose em São João Del Rei, localizado na região sudeste do estado de Minas Gerais. Nesse estudo, 19 participantes foram positivos para ovos de *S. mansoni* nas fezes, enquanto 47 foram positivos para a presença de anticorpos anti-SWAP no teste sorológico. Todos os indivíduos do grupo controle, composto por 30 indivíduos que não tiveram contato com o foco de transmissão, foram negativos em ambas as técnicas (LAMBERTUCCI et al., 2013).

Os soros de indivíduos que foram incluídos nos ensaios do ELISA IgG anti-SmME eram provenientes de diferentes regiões com situações epidemiológicas bem distintas. Foram incluídos soros de indivíduos de áreas de alta e baixa endemicidade do Norte de Minas Gerais,

mas com histórico de transmissão ativa; soros de escolares de dois municípios do ParnaCipó, com baixa endemicidade ou endemicidade ausente ou não comprovada, da Região Central de Minas Gerais; e soros de indivíduos com geohelmintos, provenientes de uma localidade sem histórico de transmissão de *S. mansoni* localizada no Estado do Pará. Todos esses indivíduos, da melhor forma possível, foram bem caracterizados pelas técnicas parasitológicas. Porém, não se tem informações sobre o histórico de exposição parasitária de cada indivíduo, uma variável de extrema importância, especialmente em adolescentes e adultos de maior idade. O ELISA IgG anti-SmME apresentou um bom desempenho, mas este pode ser melhorado.

7 CONCLUSÃO

Nesse trabalho foram produzidos dois minigenes que codificam para antígenos multiepítotos, para aplicação no diagnóstico da esquistossomose mansoni. Apesar de apenas um deles ter alcançado a etapa final do processo de expressão do antígeno recombinante, o minigene que codifica para o antígeno P5-P6 encontra-se clonado em um vetor de expressão e armazenado em bactérias *E. coli* DH5 α . Desta forma, os experimentos de expressão do antígeno poderão ser facilmente retomados.

Quando o antígeno P1-P5 foi aplicado no ensaio de ELISA, este apresentou reatividade frente às amostras de soro de participantes com esquistossomose mansoni, distinguindo-as das amostras de participantes ovo-negativos ($p=0,0016$). Com uma sensibilidade e especificidade de 58,33% e 68,97%, respectivamente. Além disso, o ELISA IgG anti-SmME apresentou um bom desempenho no diagnóstico de indivíduos com baixa carga parasitária, detectando 15/22 (68,18%) dos indivíduos com ≤ 12 opg e 16/24 (66,67%) dos indivíduos com 13 a 99 opg.

Considerando que este é o primeiro estudo de aplicação de um antígeno multiepítotos para o diagnóstico da esquistossomose mansoni, novos estudos devem ser realizados para melhorar o desempenho do ELISA IgG anti-SmME, podendo, assim, gerar um teste com elevada acurácia para o diagnóstico de indivíduos com esquistossomose mansoni, especialmente daqueles com baixa carga parasitária.

8 PERSPECTIVAS

Os resultados apresentados neste trabalho são os primeiros obtidos neste projeto de pesquisa e, por isso, há uma perspectiva de relizar novos experimentos a fim de melhorar o desempenho do ELISA IgG anti-SmME. Para isso, espera-se:

- Otimizar as condições de cultivo para obtenção do antígeno P1-P5 em sua forma solúvel;
- Expressar o antígeno P1-P5 em leveduras;
- Avaliar o desempenho diagnóstico do ELISA IgG anti-SmME em estudos de campo;
- Avaliar a imunorreatividade de anticorpos IgG de amostras de soro de crianças;
- Avaliar a imunorreatividade de outras classes e subclasses de anticorpos.

9 REFERÊNCIAS

ADRIKO, M. et al. Evaluation of circulating cathodic antigen (CCA) urine-cassette assay as a survey tool for *Schistosoma mansoni* in different transmission settings within Bugiri District, Uganda. **Acta Tropica**, v. 136, p. 50-57, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.04.001>.

AGGARWAL, N.; SLOANE, B. F. Cathepsin B: multiple roles in cancer. **Proteomics - Clinical Applications**, v. 8, n. 5-6, p. 427-437, 2014. <http://dx.doi.org/10.1002/prca.201300105>.

ALARCÓN DE NOYA, B. et al. New approaches for the control and eradication of schistosomiasis in Venezuela. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, n. 4, p. 227-231, 1992. <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02761992000800035>.

ANFINSEN, C. B. Principles that govern the folding of protein chains. **Science**, v. 181, n. 4096, p. 223-230, 1973. <http://dx.doi.org/10.1126/science.181.4096.223>.

ASHTON, P. D. et al. The schistosome egg: development and secretions. **Parasitology**, v. 122, n. 3, p. 329-338, 2001. <http://dx.doi.org/10.1017/s0031182001007351>.

BALASUNDARAM, B.; HARRISON, S.; BRACEWELL, D. G. Advances in product release strategies and impact on bioprocess design. **Trends In Biotechnology**, v. 27, n. 8, p. 477-485, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.04.004>.

BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Current Opinion In Biotechnology**, v. 10, n. 5, p. 411-421, 1999. [http://dx.doi.org/10.1016/s0958-1669\(99\)00003-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0958-1669(99)00003-8).

BARBOSA, C. S. et al. Quality control of the slides by Kato-Katz method for the parasitological diagnosis of schistosomiasis infection by *Schistosoma mansoni*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 53, n.2, p.110-114, 2017. <http://dx.doi.org/10.5935/1676-2444.20170018>.

BÄRENBOLD, O. et al. Estimating sensitivity of the Kato-Katz technique for the diagnosis of *Schistosoma mansoni* and hookworm in relation to infection intensity. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 10, p. 1-14, 2017. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0005953>.

BARSOUM, R. S.; ESMAT, G.; EL-BAZ, T. Human schistosomiasis: clinical perspective. **Journal Of Advanced Research**, v. 4, n. 5, p. 433-444, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2013.01.005>.

BERHE, N. et al. Variations in helminth faecal egg counts in Kato–Katz thick smears and their implications in assessing infection status with *Schistosoma mansoni*. **Acta Tropica**, v. 92, n. 3, p. 205-212, 2004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2004.06.011>.

BERRIMAN, M. et al. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. **Nature**, v. 460, n. 7253, p. 352-358, 2009. <http://dx.doi.org/10.1038/nature08160>.

BLACK, C. L. et al. Influence of exposure history on the immunology and development of resistance to human schistosomiasis mansoni. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 3, p. 1-11, 2010. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000637>.

BOGITSH, B. J. Observations on digestion in Schistosomes or "blood and butts". **Transactions Of The American Microscopical Society**, v. 108, n. 1, p. 1-5, 1989. <http://dx.doi.org/10.2307/3226200>.

BOUT, D. et al. Circulating immune complexes in schistosomiasis. **Immunology**, v. 33, n. 1, p. 17-22, 1977.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

BRASIL, M. S. Distribuição da esquistossomose na área endêmica, por faixa de positividade, por município. Brasil, 2009 – 2017. 2019. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/25/Mapa-distribuicao-esquistossomose-2009-2017.pdf>>. Acesso em 22/01/2020.

_____. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Vigilância da Esquistossomose Mansonii: diretrizes técnicas / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – 4. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014. 144 p.

BRINDLEY, P. J. et al. Proteolytic degradation of host hemoglobin by schistosomes. **Molecular And Biochemical Parasitology**, v. 89, n. 1, p. 1-9, 1997. [http://dx.doi.org/10.1016/s0166-6851\(97\)00098-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0166-6851(97)00098-4).

BROOKER, S. et al. Epidemiology of single and multiple species of helminth infections among school children in Busia District, Kenya. **East African Medical Journal**, v. 77, n. 3, p. 157-161, 2009. <http://dx.doi.org/10.4314/eamj.v77i3.46613>.

BRUMPT, E. Observations biologiques diverses concernant *Planorbis (Australorbis) glabratus* hôte intermédiaire de *Schistosoma mansoni*. **Annales de Parasitologie Humaine Et Comparée**, v. 18, n. 1-38, p. 9-45, 1941. <http://dx.doi.org/10.1051/parasite/1941181009>.

BURKE, M. L. et al. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 4, p. 163-176, 2009. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3024.2009.01098.x>.

CAMUSSONE, C. et al. Comparison of recombinant *Trypanosoma cruzi* peptide mixtures versus multiepitope chimeric proteins as sensitizing antigens for immunodiagnosis. **Clinical And Vaccine Immunology**, v. 16, n. 6, p. 899-905, 2009. <http://dx.doi.org/10.1128/cvi.00005-09>.

CAPRON, A.; DOMBROWICZ, D.; CAPRON, M. Regulation of the immune response in experimental and human schistosomiasis: the limits of an attractive paradigm. **Microbes And Infection**, v. 1, n. 7, p. 485-490, 1999. [http://dx.doi.org/10.1016/s1286-4579\(99\)80086-0](http://dx.doi.org/10.1016/s1286-4579(99)80086-0).

CARLIER, Y. et al. Immunological studies in human schistosomiasis. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 24, n. 6, p. 949-954, 1975. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.1975.24.949>.

CARLIER, Y.; BOUT, D.; CAPRON, A. Detection of *Schistosoma mansoni* M antigen in circulating immunocomplexes and in kidneys of infected hamsters. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 74, n. 4, p. 534-538, 1980. [http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(80\)90072-3](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(80)90072-3).

CARRIÓ, M. M.; VILLAVERDE, A. Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. **Journal Of Biotechnology**, v. 96, n. 1, p. 3-12, 2002. [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1656\(02\)00032-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1656(02)00032-9).

CARVALHO, G. B. F. et al. Identification of *Schistosoma mansoni* candidate antigens for diagnosis of schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 7, p. 837-843, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762011000700009>.

CAVALCANTI, M. G. et al. Schistosomiasis in areas of low endemicity: a new era in diagnosis. **Trends In Parasitology**, v. 29, n. 2, p. 75-82, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2012.11.003>.

CHAND, M. A.; CHIODINI, P. L.; DOENHOFF, M. J. Development of a new assay for the diagnosis of schistosomiasis, using cercarial antigens. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 104, n. 4, p. 255-258, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2009.12.004>.

CHAO, L. V. et al. Evaluation of recombinant multi-epitope proteins for diagnosis of goat schistosomiasis by enzyme-linked immunosorbent assay. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2016. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1418-4>.

CHEN, R. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 5, p. 1102-1107, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.013>.

CHENG, Z. et al. Evaluation of a novel fusion protein antigen for rapid serodiagnosis of tuberculosis. **Journal Of Clinical Laboratory Analysis**, v. 25, n. 5, p. 344-349, 2011. <http://dx.doi.org/10.1002/jcla.20483>.

CHERNIN, E. Behavioral responses of miracidia of *Schistosoma mansoni* and other trematodes to substances emitted by snails. **Journal of Parasitology**, v. 56, n. 2, p. 287-296, 1970.

CLARK, D. P.; PAZDERNIK, N. J. Recombinant proteins. **Biotechnology**, p. 335-363, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-385015-7.00010-7>.

CLERINX, J.; VAN GOMPEL, A. Schistosomiasis in travellers and migrants. **Travel Medicine And Infectious Disease**, v. 9, n. 1, p. 6-24, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tmaid.2010.11.002>.

COELHO, P. M. Z. et al. Evolução de *Schistosoma mansoni* no hospedeiro intermediário. In: CARVALHO, O.S. et al. **Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2008, pp. 43-84.

_____. Improvement of POC-CCA interpretation by using lyophilization of urine from patients with *Schistosoma mansoni* low worm burden: towards an elimination of doubts about the concept of trace. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 6, p. 1-13, 2016. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0004778>.

_____. Use of a saline gradient for the diagnosis of schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 5, p. 720-723, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762009000500010>.

COLLEY, D. G.; ANDROS, T. S.; CAMPBELL, C. H. Schistosomiasis is more prevalent than previously thought: what does it mean for public health goals, policies, strategies, guidelines and intervention programs?. **Infectious Diseases Of Poverty**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2017. <http://dx.doi.org/10.1186/s40249-017-0275-5>.

_____. A five-country evaluation of a point-of-care circulating cathodic antigen urine assay for the prevalence of *Schistosoma mansoni*. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 88, n. 3, p. 426-432, 2013. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.12-0639>.

_____. Human schistosomiasis. **The Lancet**, v. 383, n. 9936, p. 2253-2264, 2014. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(13\)61949-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(13)61949-2).

COLLEY, D. G.; SECOR, W. E. Immunology of human schistosomiasis. **Parasite Immunology**, v. 36, n. 8, p. 347-357, 2014. <http://dx.doi.org/10.1111/pim.12087>.

COLLINS, J. J. et al. Adult somatic stem cells in the human parasite *Schistosoma mansoni*. **Nature**, v. 494, n. 7438, p. 476-479, 2013. <http://dx.doi.org/10.1038/nature11924>.

_____. An atlas for *Schistosoma mansoni* organs and life-cycle stages using cell type-specific markers and confocal microscopy. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 3, p. 1-17, 2011. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001009>.

CONCEIÇÃO, M. J.; COURA, J.R. Morbidade da esquistossomose mansoni em uma comunidade rural de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 12, n. 1, p. 87-103, 1978. <http://dx.doi.org/10.1590/s0037-86821978000100014>.

CORRÊA-OLIVEIRA, R. et al. Infection with *Schistosoma mansoni* correlates with altered immune responses to *Ascaris lumbricoides* and hookworm. **Acta Tropica**, v. 83, n. 2, p.123-132, 2002. [http://dx.doi.org/10.1016/s0001-706x\(02\)00108-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0001-706x(02)00108-0).

COSTAIN, A. H.; MACDONALD, A. S.; SMITS, H. H. Schistosome egg migration: mechanisms, pathogenesis and host immune responses. **Frontiers In Immunology**, v. 9, p. 1-16, 2018. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2018.03042>.

COURA, J.; AMARAL, R. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 1, p. 13-19, 2004. <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762004000900003>.

CRUMPTON, M. J. Protein antigens: the molecular bases of antigenicity and immunogenicity. **The Antigens**, p. 1-78, 1974. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-635502-4.50008-4>.

DAI, J. et al. Evaluation of a Recombinant Multiepitope peptide for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection. **Clinical And Vaccine Immunology**, v. 19, n. 3, p. 338-342,. 2012. <http://dx.doi.org/10.1128/cvi.05553-11>.

DALTON, J. P. et al. Characterization of the cathepsin-like cysteine proteinases of *Schistosoma mansoni*. **Infection and immunity**, v. 64, n. 4, p. 1328-1324, 1996.

DEELDER, A. M. et al. Recognition of gut-associated antigens by immunoglobulin M in the indirect fluorescent antibody test for schistosomiasis mansoni. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 83, n. 3, p. 364-367, 1989. [http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(89\)90506-3](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(89)90506-3).

_____. *Schistosoma mansoni*: characterization of two circulating polysaccharide antigens and the immunological response to these antigens in mouse, hamster, and human infections. **Experimental Parasitology**, v. 50, n. 1, p. 16-32, 1980. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-4894\(80\)90004-1](http://dx.doi.org/10.1016/0014-4894(80)90004-1).

_____. *Schistosoma mansoni*: demonstration of two circulating antigens in infected hamsters. **Experimental Parasitology**, v. 40, n. 2, p. 189-197, 1976. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-4894\(76\)90081-3](http://dx.doi.org/10.1016/0014-4894(76)90081-3).

DEELDER, A. M.; EVELEIGH, P.C. An indirect haemagglutination reaction for the demonstration of *Schistosoma mansoni* circulating anodic antigen. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 72, n. 2, p. 178-180, jan. 1978. [http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(78\)90055-x](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(78)90055-x).

DEELDER, A. M.; KORNELIS, D. A comparison of the IFA and the ELISA for the demonstration of antibodies against schistosome gut-associated polysaccharide antigens in schistosomiasis. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 64, n. 1, p. 65-75, 1980. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00927057>.

DEGAREGE, A. et al. Day-to-day fluctuation of point-of-care circulating cathodic antigen test scores and faecal egg counts in children infected with *Schistosoma mansoni* in Ethiopia. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 210, p. 1-7, 2014.

DEWALICK, S. et al. Binding of von Willebrand factor and plasma proteins to the eggshell of *Schistosoma mansoni*. **International Journal For Parasitology**, v. 44, n. 5, p. 263-268, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.12.006>.

_____. *Schistosoma mansoni*: The egg, biosynthesis of the shell and interaction with the host. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 1, p. 7-13, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2011.07.018>.

DIAB, R. G. et al. Retracted: urinary circulating DNA and circulating antigen for diagnosis of schistosomiasis mansoni. **Tropical Medicine & International Health**, v. 24, n. 3, p. 371-378, 2019. <http://dx.doi.org/10.1111/tmi.13193>.

DIPTI, C. A.; JAIN, S. K.; NAVIN, K. A novel recombinant multi-epitope protein as a hepatitis C diagnostic intermediate of high sensitivity and specificity. **Protein Expression And Purification**, v. 47, n. 1, p. 319-328, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2005.12.012>.

DISSOUS, C.; DISSOUS, C.; CAPRON, A. Stimulation of *Schistosoma mansoni* miracidia by a 80 kDa glycoprotein from *Biomphalaria glabrata*. **Molecular And Biochemical Parasitology**, v. 21, n. 3, p. 203-209, 1986. [http://dx.doi.org/10.1016/0166-6851\(86\)90125-8](http://dx.doi.org/10.1016/0166-6851(86)90125-8).

DOENHOFF, M. J.; CHIODINI, P. L.; HAMILTON, J. V. Specific and sensitive diagnosis of schistosome infection: can it be done with antibodies? **Trends In Parasitology**, v. 20, n. 1, p. 35-39, 2004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2003.10.019>.

DOENHOFF, M.; MUSALLAM, R.; MCGREGOR, A. Studies on the host-parasite relationship in *Schistosoma mansoni*-infected mice: the immunological dependence of parasite egg excretion. **Immunology**, v. 35, n. 5, p. 771-778, 1978.

DUNNE, D. W. et al. Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection. **European**

Journal Of Immunology, v. 22, n. 6, p. 1483-1494, 1992.
<http://dx.doi.org/10.1002/eji.1830220622>.

DUNNE, D. W.; COOKE, A. A worm's eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 5, p. 420-426, 2005. <http://dx.doi.org/10.1038/nri1601>.

DUTHIE, M. S. et al. Rational design and evaluation of a multiepitope chimeric fusion protein with the potential for leprosy diagnosis. **Clinical And Vaccine Immunology**, v. 17, n. 2, p. 298-303, 2009. <http://dx.doi.org/10.1128/cvi.00400-09>.

ENK, M. J. et al. The effect of the number of stool samples on the observed prevalence and the infection intensity with *Schistosoma mansoni* among a population in an area of low transmission. **Acta Tropica**, v. 108, n. 2-3, p. 222-228, 2008.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.09.016>.

EZEH, C. et al. Urinary schistosomiasis in Nigeria: a 50 year review of prevalence, distribution and disease burden. **Parasite**, v. 26, p. 1-19, 2019.
<http://dx.doi.org/10.1051/parasite/2019020>.

FAIRFAX, K. C. et al. IL-10R blockade during chronic schistosomiasis mansoni results in the loss of B cells from the liver and the development of severe pulmonary disease. **Plos Pathogens**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2012. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002490>.

FAVRE, T. C. et al. Avaliação das ações de controle da esquistossomose implementadas entre 1977 e 1996 na área endêmica de Pernambuco, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 6, p. 569-576, 2001. <http://dx.doi.org/10.1590/s0037-86822001000600012>.

FELDMEIER, H. et al. Detection and quantification of circulating antigen in schistosomiasis by monoclonal antibody. II The quantification of circulating antigens in human schistosomiasis mansoni and haematobium: relationship to intensity of infection and disease status. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 65, p. 232-243, fev. 1986.

FENWICK, A.; ROLLINSON, D.; SOUTHGATE, V. Implementation of human schistosomiasis control: challenges and prospects. **Advances In Parasitology**, v. 61, p. 567-622, 2006. [http://dx.doi.org/10.1016/s0065-308x\(05\)61013-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0065-308x(05)61013-5).

FERREIRA, F. T. et al. Sensitivity and specificity of the circulating cathodic antigen rapid urine test in the diagnosis of schistosomiasis mansoni infection and evaluation of morbidity in a low- endemic area in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 3, p. 358-364, 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0423-2016>.

- FLEMING, F. M. et al. Synergistic associations between hookworm and other helminth species in a rural community in Brazil. **Tropical Medicine And International Health**, v. 11, n. 1, p. 56-64, 2006. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3156.2005.01541.x>.
- GEIGER, S. M. et al. Cellular responses and cytokine production in post-treatment hookworm patients from an endemic area in Brazil. **Clinical And Experimental Immunology**, v. 136, n. 2, p. 334-340, 2004. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02449.x>.
- GIBELLINI, D. et al. Microplate capture hybridization of amplified parvovirus B19 DNA fragment labelled with digoxigenin. **Molecular And Cellular Probes**, v. 7, n. 6, p. 453-458, 1993. <http://dx.doi.org/10.1006/mcpr.1993.1067>.
- GOLDRING, O. L. et al. Acquisition of human blood group antigens by *Schistosoma mansoni*. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 26, n. 1, p. 181-187, 1976.
- GOMES, J. F. et al. Evaluation of a novel kit (TF-Test) for the diagnosis of intestinal parasitic infections. **Journal Of Clinical Laboratory Analysis**, v. 18, n. 2, p. 132-138, 2004. <http://dx.doi.org/10.1002/jcla.20011>.
- GOMES, L. I. et al. Development and evaluation of a sensitive PCR-ELISA system for detection of *Schistosoma* infection in feces. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 4, p. 1-8, 2010. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000664>.
- GONÇALVES, M. M. L. et al. Immunoassays as an auxiliary tool for the serodiagnosis of *Schistosoma mansoni* infection in individuals with low intensity of egg elimination. **Acta Tropica**, v. 100, n. 1-2, p. 24-30, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2006.09.004>.
- GOPAL, G. J.; KUMAR, A. Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. **The Protein Journal**, v. 32, n. 6, p. 419-425, 2013. <http://dx.doi.org/10.1007/s10930-013-9502-5>.
- GÖTZ, B. et al. Expression of an active cathepsin B-like protein Sm31 from *Schistosoma mansoni* in insect cells. **Tropical Medicine & Parasitology**, v. 43, n. 4, p. 282-284, 1992.
- GRENFELL, R. F. Q. et al. Immunodiagnostic methods: what is their role in areas of low endemicity? **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1-5, 2012. <http://dx.doi.org/10.1100/2012/593947>.
- _____. Innovative methodology for point-of-care Circulating Cathodic Antigen with rapid urine concentration for use in the field for detecting low *Schistosoma mansoni* infection and for control of cure with high accuracy. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 112, n. 1, p. 1-7, 2018. <http://dx.doi.org/10.1093/trstmh/try014>.

_____. New approaches with different types of Circulating Cathodic Antigen for the diagnosis of patients with low *Schistosoma mansoni* load. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 2, p. 1-10, 2013. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002054>.

GRIMES, J. et al. The roles of water, sanitation and hygiene in reducing schistosomiasis: a review. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1-16, 2015. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-0766-9>.

GRYSEELS, B. et al. Human schistosomiasis. **The Lancet**, v. 368, n. 9541, p. 1106-1118, 2006. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(06\)69440-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(06)69440-3).

GUO-JING, Y. et al. A review of geographic information system and remote sensing with applications to the epidemiology and control of schistosomiasis in China. **Acta Tropica**, v. 96, n. 2-3, p. 117-129, 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2005.07.006>.

HAAS, W. et al. Recognition and invasion of human skin by *Schistosoma mansoni* cercariae: the key-role of L-arginine. **Parasitology**, v. 124, n. 2, p. 153-167, 2002. <http://dx.doi.org/10.1017/s0031182001001032>.

_____. *Schistosoma mansoni* cercariae: stimulation of acetabular gland secretion is adapted to the chemical composition of mammalian skin. **Journal of Parasitology**, v. 83, n. 6, p. 1079-1085, 1997.

HANCOCK, K. et al. A recombinant protein from *Schistosoma mansoni* useful for the detection of *S. mansoni* and *Schistosoma haematobium* antibodies. **The Journal Of Parasitology**, v. 83, n. 4, p. 612-618, 1997. <http://dx.doi.org/10.2307/3284233>.

HASSAN, M. M.; BADAWI, M. A.; STRAND, M. Circulating schistosomal antigen in diagnosis and assessment of cure in individuals infected with *Schistosoma mansoni*. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 46, n. 6, p. 737-744, 1992. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.1992.46.737>.

HEID, C. A. et al. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, v. 6, n. 10, p. 986-994, 1996. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.6.10.986>.

HIGUCHI, R. et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Nature Biotechnology**, v. 11, p. 1026-1030, 1993. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt0993-1026>.

HOFFMAN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. The sedimentation-concentration method in schistosomiasis mansoni. **Puerto Rico Journal of Public Health**, v. 9, p. 281-298, 1934.

HOKKE, C. H.; FITZPATRICK, J. M.; HOFFMANN, K. F. Integrating transcriptome, proteome and glycome analyses of *Schistosoma* biology. **Trends In Parasitology**, v. 23, n. 4, p. 165-174, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2007.02.007>.

HOLLAND, P. M. et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 88, n. 16, p. 7276-7280, 1991.
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.88.16.7276>.

HOTEZ, P. et al. Control of neglected tropical diseases. **New England Journal Of Medicine**, v. 357, n. 10, p. 1018-1027, 2007. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmra064142>.

_____. The global burden of disease study 2010: interpretation and implications for the neglected tropical diseases. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, p. 1-9, 2014.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002865>.

_____. The neglected tropical diseases: the ancient afflictions of stigma and poverty and the prospects for their control and elimination. **Advances In Experimental Medicine And Biology**, v. 582, p. 23-33, 2006. http://dx.doi.org/10.1007/0-387-33026-7_3.

HOTEZ, P.; FUJIWARA, R. Brazil's neglected tropical diseases: an overview and a report card. **Microbes And Infection**, v. 16, n. 8, p. 601-606, 2014.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2014.07.006>.

ISHII, S. Legumain: asparaginyl endopeptidase. **Methods In Enzymology**, p. 604-615, 1994.
[http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)44044-1](http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879(94)44044-1).

JANKOVIC, D. et al. CD4+ T cell-mediated granulomatous pathology in schistosomiasis is downregulated by a B cell-dependent mechanism requiring fc receptor signaling. **The Journal Of Experimental Medicine**, v. 187, n. 4, p. 619-629, 1998.
<http://dx.doi.org/10.1084/jem.187.4.619>.

JASSIM, A.; CATTY, D.; HASSAN, K. Antibody isotypes of immune complexes in schistosomiasis mansoni in Sudan. **Parasite Immunology**, v. 9, n. 6, p. 651-665, 1987.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3024.1987.tb00536.x>.

JESPERSEN, M. C. et al. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 1, p. 24-29, 2017.
<http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkx346>.

JESUS, A. R. et al. Human immune responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens. **Infection And Immunity**, v. 68, n. 5, p. 2797-2803, 2000.
<http://dx.doi.org/10.1128/iai.68.5.2797-2803.2000>.

JIN, Y. et al. Comparison of recombinant proteins from *Schistosoma japonicum* for schistosomiasis diagnosis. **Clinical And Vaccine Immunology**, v. 17, n. 3, p. 476-480, 2010.
<http://dx.doi.org/10.1128/cvi.00418-09>.

JIZ, M. et al. Immunoglobulin E (IgE) responses to paramyosin predict resistance to reinfection with *Schistosoma japonicum* and are attenuated by IgG₄. **Infection And Immunity**, v. 77, n. 5, p. 2051-2058, 2009. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.00012-09>.

JONES, M. E.; MITCHELL, R. G.; LEEN, C. I. S. Long seronegative window in *Schistosoma* infection. **The Lancet**, v. 340, n. 8834-8835, p.1549-1550, 1992. [http://dx.doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)92805-p](http://dx.doi.org/10.1016/0140-6736(92)92805-p).

JONGE, N. et al. Detection of circulating anodic antigen by ELISA for seroepidemiology of schistosomiasis mansoni. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 82, n. 4, p. 591-594, 1988. [http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(88\)90523-8](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(88)90523-8).

JOSHI, M.; DESHPANDE, J. D. Polymerase chain reaction: methods, principles and application. **International Journal Of Biomedical Research**, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2011. <http://dx.doi.org/10.7439/ijbr.v2i1.83>.

JURBERG, A. D. et al. A new miracidia hatching device for diagnosing schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 1, p. 112-114, 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762008005000005>.

KAMINENI, S.; HUANG, C. The antibacterial effect of sonication and its potential medical application. **Sicot-j**, v. 5, p. 3-12, 2019. <http://dx.doi.org/10.1051/sicotj/2019017>.

KANAMURA, H. Y. et al. A comparative epidemiologic study of specific antibodies (IgM and IgA) and parasitological findings in an endemic area of low transmission of *Schistosoma mansoni*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 40, n. 2, p. 85-91, 1998. <http://dx.doi.org/10.1590/s0036-46651998000200004>.

KATZ, N. **Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geohelmintoses (2010-2015)**. Instituto Rene Rachou - Fiocruz. Belo Horizonte, 2018.

_____. Schistosomiasis control in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 1, p. 33-35, 1998. <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02761998000700005>.

KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 14, n. 6, p. 397-400, 1972.

KEMP, W. M. et al. Immunocytochemical localization of mouse alpha 2-macroglobulinlike antigenic determinants on *Schistosoma mansoni* adults. **Journal of Parasitology**, v. 62, n. 3, p. 413-419, 1976.

KHAN, S. et al. Role of recombinant DNA technology to improve life. **International Journal Of Genomics**, v. 2016, p. 1-14, 2016. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2405954>.

KINKEL, H. et al. Evaluation of eight serological tests for diagnosis of imported schistosomiasis. **Clinical And Vaccine Immunology**, v. 19, n. 6, p. 948-953, 2012. <http://dx.doi.org/10.1128/cvi.05680-11>.

KLINKERT, M. Q. et al. Expression of diagnostic 31/32 kilodalton proteins of *Schistosoma mansoni* as fusions with bacteriophage MS2 polymerase. **Molecular And Biochemical Parasitology**, v. 27, n. 2-3, p. 233-239, 1988. [http://dx.doi.org/10.1016/0166-6851\(88\)90042-4](http://dx.doi.org/10.1016/0166-6851(88)90042-4).

_____. Immunological analysis of cloned *Schistosoma mansoni* antigens Sm31 and Sm32 with sera of schistosomiasis patients. **Tropical Medicine & Parasitology**, v. 42, n. 4, p. 319-324, 1991.

_____. Primary structures of Sm31/32 diagnostic proteins of *Schistosoma mansoni* and their identification as proteases. **Molecular And Biochemical Parasitology**, v. 33, n. 2, p. 113-122, 1989. [http://dx.doi.org/10.1016/0166-6851\(89\)90025-x](http://dx.doi.org/10.1016/0166-6851(89)90025-x).

KOENIG, G. L. Viability of and plasmid retention in frozen recombinant *Escherichia coli* over time: a ten-year prospective study. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 69, n. 11, p. 6605-6609, 2003. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.69.11.6605-6609.2003>.

KOLASKAR, A. S.; TONGAONKAR, P. C. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. **FEBS Letters**, v. 276, n. 1-2, p. 172-174, 1990. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80535-q](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(90)80535-q).

KONERMANN, L. Protein unfolding and denaturants. **Els**, p. 1-7, 2012. <http://dx.doi.org/10.1002/9780470015902.a0003004.pub2>.

KONGS, A. et al. The unreliability of the Kato-Katz technique limits its usefulness for evaluating *S. mansoni* infections. **Tropical Medicine And International Health**, v. 6, n. 3, p. 163-169, 2001. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3156.2001.00687.x>.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970. <http://dx.doi.org/10.1038/227680a0>.

LAMBERTON, P. H. L. et al. Sensitivity and specificity of multiple Kato-Katz thick smears and a Circulating Cathodic Antigen test for *Schistosoma mansoni* diagnosis pre- and post-repeated-praziquantel treatment. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 9, p. 1-15, 2014. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003139>.

LAMBERTUCCI, J. R. Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 4, p. 422-435, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762010000400012>.

LAMBERTUCCI, J. R. et al. An outbreak of acute *Schistosoma mansoni* schistosomiasis in a nonendemic area of Brazil: a report on 50 cases, including 5 with severe clinical manifestations. **Clinical Infectious Diseases**, v. 57, n. 1, p. 1-6, 2013. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cit157>.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 159-174, 1977.

LAWRENCE, J. D. The ingestion of red blood cells by *Schistosoma mansoni*. **The Journal Of Parasitology**, v. 59, n. 1, p. 60-63, 1973. <http://dx.doi.org/10.2307/3278572>.

LETTE, F.; TEMESGEN, Z. Parasitic and fungal infections. **Neurology And Clinical Neuroscience**, p. 1273-1295, 2000. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-323-03354-1.50098-5>.

LIM, M. D. et al. Diagnostic tools for soil-transmitted helminths control and elimination programs: a pathway for diagnostic product development. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 3, p. 1-18, 2018. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0006213>.

LIN, X.; CHEN, Y.; YAN, J. Recombinant multiepitope protein for diagnosis of leptospirosis. **Clinical And Vaccine Immunology**, v. 15, n. 11, p. 1711-1714, 2008. <http://dx.doi.org/10.1128/cvi.00189-08>.

LINDOSO, J.; LINDOSO, A. Neglected tropical diseases in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, n. 5, p. 247-253, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/s0036-46652009000500003>.

LIPPS, G.; FÜLLKRUG, R.; BECK, E. Cathepsin B of *Schistosoma mansoni*. Purification and activation of the recombinant proenzyme secreted by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 271, n. 3, p. 1717-1725, 1996. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.271.3.1717>.

LUNDE, M. N.; OTTESEN, E. A. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for detecting IgM and IgE antibodies in human schistosomiasis. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 29, n. 1, p. 82-85, 1980. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.1980.29.82>.

LUSTIGMAN, S. et al. A research agenda for helminth diseases of humans: the problem of helminthiasis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 4, p. 1-13, 2012. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001582>.

LUTZ, A. Caramujos de água doce do gênero *Planorbis*, observados no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 10, n. 1, p. 65-82, 1918. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761918000100004>

LUTZ, A. *Schistosomum mansoni* and schistosomiasis observed in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 11, n. 1, p. 109-140, 1919.

MADIGAN, M. T. et al. Estruturas celulares microbianas e suas funções. *In*: MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre: ARTMED Editora LTDA, 2016. p. 25-72.

MAKRIDES, S. C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. **Microbiology Reviews**, v. 60, n. 3, p. 512-538, 1996.

MARSTON, F. A. O. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. **Biochemical Journal**, v. 240, n. 1, p. 1-12, 1986. <http://dx.doi.org/10.1042/bj2400001>.

MARTINS-MELO, F. et al. Mortality from neglected tropical diseases in Brazil, 2000–2011. **Bulletin Of The World Health Organization**, v. 94, n. 2, p. 103-110, 2015. <http://dx.doi.org/10.2471/blt.15.152363>.

MCMANUS, D. P. et al. Schistosomiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p.1-19, 2018. <http://dx.doi.org/10.1038/s41572-018-0013-8>.

MELO, A. G. S. et al. Schistosomiasis mansoni in families of fishing workers of endemic area of Alagoas. **Escola Anna Nery**, v. 23, n. 1, p. 1-10, 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/2177-9465-ean-2018-0150>.

MENEZES-SOUZA, D. et al. Mapping B-cell epitopes for the peroxidoxin of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and its potential for the clinical diagnosis of tegumentary and visceral leishmaniasis. **Plos One**, v. 9, n. 6, p. 1-10, 2014. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0099216>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SUCAM. **Levantamento Nacional de Prevalência da esquistossomose mansoni, 1975-1979**. Programa Especial de Controle da Esquistossomose. Brasília. 41 pp. 1976.

MITRA, A.; MAWSON, A. Neglected tropical diseases: epidemiology and global burden. **Tropical Medicine And Infectious Disease**, v. 2, n. 3, p. 36-51, 2017. <http://dx.doi.org/10.3390/tropicalmed2030036>.

MOSER, D.; DOENHOFF, M. J.; KLINKERT, M. A stage-specific calcium-binding protein expressed in eggs of *Schistosoma mansoni*. **Molecular And Biochemical Parasitology**, v. 51, n. 2, p. 229-238, 1992. [http://dx.doi.org/10.1016/0166-6851\(92\)90073-s](http://dx.doi.org/10.1016/0166-6851(92)90073-s).

MOSMANN, T. R. T lymphocyte subsets, cytokines, and effector functions. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**, v. 664, n. 1, p. 89-92, 1992. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.1992.tb39751.x>.

MUSIANI, M. et al. Qualitative PCR–ELISA protocol for the detection and typing of viral genomes. **Nature Protocols**, v. 2, n. 10, p. 2502-2510, 2007. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2007.311>.

MUTAPI, F. et al. Differential recognition patterns of *Schistosoma haematobium* adult worm antigens by the human antibodies IgA, IgE, IgG₁ and IgG₄. **Parasite Immunology**, v. 33, n. 3, p. 181-192, 2011. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3024.2010.01270.x>.

NASH, T. E. Localization of the circulating antigen within the gut of *Schistosoma mansoni*. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 23, n. 6, p. 1085-1087, 1974. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.1974.23.1085>.

NASH, T. E.; OTTESEN, E. A.; CHEEVER, A. W. Antibody response to a polysaccharide antigen present in the schistosome gut. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 27, n. 5, p. 944-950, 1978. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.1978.27.944>.

NAUS, C. W. A. et al. Human IgE, IgG subclass, and IgM responses to worm and egg antigens in schistosomiasis haematobium: a 12-month study of reinfection in cameroonian children. **Clinical Infectious Diseases**, v. 26, n. 5, p. 1142-1147, 1998. <http://dx.doi.org/10.1086/520310>.

NOYA, O. et al. Schistosomiasis in America. **Neglected Tropical Diseases**, p. 11-43, 2015. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-7091-1422-3_2.

_____. Immunogenicity of synthetic peptides from the Sm31 antigen (cathepsin B) of the *Schistosoma mansoni* adult worms. **Parasite Immunology**, v. 23, n. 11, p. 567-573, 2001. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3024.2001.00414.x>.

_____. Use of synthetic peptides derived from adult worm proteins of *Schistosoma mansoni*, in the diagnosis of schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 1, p. 157-158, 1998. <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02761998000700022>.

NOYA, O.; ALARCÓN DE NOYA, B. The multiple antigen blot assay (MABA): a simple immunoenzymatic technique for simultaneous screening of multiple antigens. **Immunology Letters**, v. 63, n. 1, p. 53-56, 1998. [http://dx.doi.org/10.1016/s0165-2478\(98\)00055-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0165-2478(98)00055-8).

OCHODO, E. A. et al. Circulating antigen tests and urine reagent strips for diagnosis of active schistosomiasis in endemic areas. **Cochrane Database Of Systematic Reviews**, n. 3, p. 1-298, 2015. <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.cd009579.pub2>.

OLIVEIRA, E. J. et al. Application of synthetic peptides in development of a serologic method for laboratory diagnosis of schistosomiasis mansoni. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 355-357, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762006000900058>.

_____. ELISA-IgM para diagnóstico da esquistossomose mansoni em área de baixa endemicidade. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 1, p. 255-261, 2003. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-311x2003000100028>.

_____. Synthetic peptides as an antigenic base in an ELISA for laboratory diagnosis of schistosomiasis mansoni. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 102, n. 4, p. 360-366, 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2007.11.008>.

OLIVEIRA, E. J.; KANAMURA, H. Y.; LIMA, D. M. C. Efficacy of an enzyme-linked immunosorbent assay as a diagnostic tool for schistosomiasis mansoni in individuals with low worm burden. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 4, p. 421-425, 2005. <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762005000400013>.

OLIVEIRA, L. M. A. et al. Evaluation of polymerase chain reaction as an additional tool for the diagnosis of low-intensity *Schistosoma mansoni* infection. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 68, p. 416-421, 2010.

OLIVEIRA, R. R. et al. Factors associated with resistance to *Schistosoma mansoni* infection in an endemic area of Bahia, Brazil. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 86, n. 2, p. 296-305, 2012. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0204>.

OLIVEIRA, W. J. et al. Evaluation of diagnostic methods for the detection of intestinal schistosomiasis in endemic areas with low parasite loads: Saline gradient, Helmintex, Kato-Katz and rapid urine test. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 2, p. 1-22, 2018. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0006232>.

OVERTON, T. W. Recombinant protein production in bacterial hosts. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 5, p. 590-601, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2013.11.008>.

PALOMARES, L. A.; ESTRADA-MONDACA, S.; RAMÍREZ, O. T. Production of recombinant proteins: challenges and solutions. **Recombinant Gene Expression**, v. 267, p. 15-52, 2004. <http://dx.doi.org/10.1385/1-59259-774-2:015>.

PAZ, V. R. F.; SEQUEIRA, D.; PYRRHO, A. Infection by *Schistosoma mansoni* during pregnancy: Effects on offspring immunity. **Life Sciences**, v. 185, p. 46-52, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2017.07.021>.

PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 7, p. 499-511, 2002. <http://dx.doi.org/10.1038/nri843>.

PELLON, A. B.; TEIXEIRA, I. **Distribuição da Esquistossomose Mansônica no Brasil**. Rio de Janeiro, Divisão de Organização Sanitária do Ministério da Saúde. 1950.

_____. **O Inquérito helmintológico escolar em cinco Estados das Regiões: Leste, Sul, e Centro Oeste**. Divisão de Organização Sanitária do Ministério da Saúde. 1950.

PETERS, B. et al. The design and implementation of the immune epitope database and analysis resource. **Immunogenetics**, v. 57, n. 5, p. 326-336, 2005. <http://dx.doi.org/10.1007/s00251-005-0803-5>.

PINHEIRO, M. C. C. et al. The combination of three faecal parasitological methods to improve the diagnosis of schistosomiasis mansoni in a low endemic setting in the state of Ceará, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 7, p. 873-876, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762012000700006>.

POLMAN, K. et al. Specificity of circulating antigen detection for schistosomiasis mansoni in Senegal and Burundi. **Tropical Medicine And International Health**, v. 5, n. 8, p. 534-537, 2000. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3156.2000.00600.x>.

PONTES, L. A. 2003. Comparison of a polymerase chain reaction and the Kato-Katz technique for diagnosing infection with *Schistosoma mansoni*. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 68, n. 3, p. 652-656, 2003.

PONTES, L. A.; DIAS-NETO, E.; RABELLO, A. Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and feces. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 66, n. 2, p. 157-162, 2002. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2002.66.157>.

RABELLO, A. L. T. et al. Diagnóstico parasitológico, imunológico e molecular da esquistossomose mansoni. In: CARVALHO, O.S. et al. **Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2008, pp 895-925.

_____. Humoral immune responses in acute schistosomiasis mansoni: relation to morbidity. **Clinical Infectious Diseases**, v. 21, n. 3, p. 608-615, 1995. <http://dx.doi.org/10.1093/clinids/21.3.608>.

RATHORE, A. S.; BILBREY, R. E.; STEINMEYER, D. E. Optimization of an osmotic shock procedure for isolation of a protein product expressed in *E. coli*. **Biotechnology Progress**, v. 19, n. 5, p. 1541-1546, 2003. <http://dx.doi.org/10.1021/bp034030s>.

RIDI, R. A. F. E.; TALLIMA, H. A. Novel therapeutic and prevention approaches for schistosomiasis: review. **Journal Of Advanced Research**, v. 4, n. 5, p. 467-478, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2012.05.002>.

ROBERTS, S. M. et al. Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni: quantitative and qualitative antibody responses to tegumental membrane antigens prepared from adult worms. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 81, n. 5, p. 786-793, 1987. [http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(87\)90034-4](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(87)90034-4).

ROLLINSON, D. et al. Time to set the agenda for schistosomiasis elimination. **Acta Tropica**, v. 128, n. 2, p. 423-440, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.04.013>.

ROSS, A. G. P. et al. Schistosomiasis. **New England Journal Of Medicine**, v. 346, n. 16, p. 1212-1220, 2002. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmra012396>.

RUPPEL, A. et al. Immunoblot analysis of *Schistosoma mansoni* antigens with sera of schistosomiasis patients: diagnostic potential of an adult schistosome polypeptide. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 62, p. 499-506, 1985b.

_____. *Schistosoma mansoni*: immunoblot analysis of adult worm proteins. **Experimental Parasitology**, v. 60, n. 2, p. 195-206, 1985a. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-4894\(85\)90023-2](http://dx.doi.org/10.1016/0014-4894(85)90023-2).

SAIKI, R. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, n. 4732, p. 1350-1354, 1985. <http://dx.doi.org/10.1126/science.2999980>.

SANTOS, J. P. **Epidemiologia da esquistossomose mansoni nos municípios do Parque Nacional da Serra do Cipó (Parnacipó): desempenho de métodos de diagnóstico, monitoramento da transmissão, e de marcadores de morbidade em escolares**. Belo Horizonte, 2018. 213p. Tese de Doutorado – Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais.

SCHWARTZ, C.; FALLON, P. G. *Schistosoma* “eggs-iting” the host: granuloma formation and egg excretion. **Frontiers In Immunology**, v. 9, p. 1-16, 2018. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2018.02492>.

SECOR, W. E. Water-based interventions for schistosomiasis control. **Pathogens And Global Health**, v. 108, n. 5, p. 246-254, 2014. <http://dx.doi.org/10.1179/2047773214y.0000000149>.

SHANE, H. L. et al. Evaluation of urine CCA assays for detection of *Schistosoma mansoni* infection in western Kenya. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2011. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000951>.

SHEBEL, H. et al. Genitourinary schistosomiasis: Life cycle and radiologic-pathologic findings. **Radiographics**, v. 32, n. 4, p. 1031-1046, 2012. <http://dx.doi.org/10.1148/rg.324115162>.

SIDDIQUI, A.; SIDDIQUI, S. Sm-p80-based schistosomiasis vaccine: preparation for human clinical trials. **Trends In Parasitology**, v. 33, n. 3, p. 194-201, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2016.10.010>.

SILVA, J. R. M.; NEVES, R. H.; GOMES, D. C. Filogenia, co-evolução, aspectos morfológicos e biológicos das diferentes fases de desenvolvimento do *Schistosoma mansoni*. In: CARVALHO, O. S. et al. **Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2008, pp. 43-84.

SILVA, P. Contribuição para o estudo da Schistosomíase na Bahia. **Brazil Medico**, n. 29, 1908.

SILVA, R. E. **Alternativas para o diagnóstico da esquistossomose mansoni em áreas de baixa e moderada endemicidade no município de Januária, Minas Gerais**. Belo Horizonte, 2018. Tese de Doutorado (em andamento) – Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais.

SILVA-MORAES, V. et al. Antischistosomal activity of a calcium channel antagonist on schistosomula and adult *Schistosoma mansoni* worms. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 5, p. 600-604, ago. 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/0074-0276108052013011>.

_____. Biomarkers for schistosomiasis: Towards an integrative view of the search for an effective diagnosis. **Acta Tropica**, v. 132, p. 75-79, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.12.024>.

SILVEIRA, A. M. S. et al. Evaluation of the CCA immuno-chromatographic test to diagnose *Schistosoma mansoni* in Minas Gerais State, Brazil. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. 1-20, 2016. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0004357>.

SIQUEIRA, L. M. V. et al. Evaluation of parasitological and molecular techniques for the diagnosis and assessment of cure of schistosomiasis mansoni in a low transmission area. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 2, p. 209-214, 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760140375>.

_____. Evaluation of two coproscopic techniques for the diagnosis of schistosomiasis in a low-transmission area in the state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 7, p. 844-850, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762011000700010>.

_____. Performance of POC-CCA® in diagnosis of schistosomiasis mansoni in individuals with low parasite burden. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 3, p. 341-347, 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0070-2016>.

SKEIKY, Y. et al. Protective efficacy of a tandemly linked, multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (Leish-111f) formulated in MPLS adjuvant. **Vaccine**, v. 20, n. 27-28, p. 3292-3303, 2002. [http://dx.doi.org/10.1016/s0264-410x\(02\)00302-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0264-410x(02)00302-x).

SMITH, H. et al. Comparison of *Schistosoma mansoni* soluble cercarial antigens and soluble egg antigens for serodiagnosing schistosome infections. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 9, p. 1-14, 2012. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001815>.

SODING, J. Protein homology detection by HMM-HMM comparison. **Bioinformatics**, v. 21, n. 7, p. 951-960, 2004. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bti125>.

SOMBETZKI, M. et al. Host defense versus immunosuppression: unisexual infection with male or female *Schistosoma mansoni* differentially impacts the immune response against invading cercariae. **Frontiers In Immunology**, v. 9, p. 1-10, 2018. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2018.00861>.

SØRENSEN, H.; MORTENSEN, K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. **Microbial Cell Factories**, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2005. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-4-1>.

STACK, C. M. et al. De-glycosylation of *Pichia pastoris*-produced *Schistosoma mansoni* cathepsin B eliminates non-specific reactivity with IgG in normal human serum. **Journal Of Immunological Methods**, v. 304, n. 1-2, p. 151-157, 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2005.07.019>.

STEINMANN, P. et al. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 6, n. 7, p. 411-425, 2006. [http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099\(06\)70521-7](http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099(06)70521-7).

TARP, B.; BLACK, F. T.; PETERSEN, E. The immunofluorescence antibody test (IFAT) for the diagnosis of schistosomiasis used in a non-endemic area. **Tropical Medicine And International Health**, v. 5, n. 3, p. 185-191, 2000. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3156.2000.00539.x>.

TEIXEIRA, C. F. et al. Detection of *Schistosoma mansoni* eggs in feces through their interaction with paramagnetic beads in a magnetic field. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 1, n. 2, p. 1-5, 2007. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000073>.

TENAILLON, O. et al. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 207-217, 2010. Springer <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2298>.

TORT, J. et al. Proteinases and associated genes of parasitic helminths. **Advances In Parasitology**, v. 43, p. 161-266, 1999. [http://dx.doi.org/10.1016/s0065-308x\(08\)60243-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0065-308x(08)60243-2).

UTZINGER, J. et al. From innovation to application: social–ecological context, diagnostics, drugs and integrated control of schistosomiasis. **Acta Tropica**, v. 120, p. 121-137, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.08.020>.

_____. New diagnostic tools in schistosomiasis. **Clinical Microbiology And Infection**, v. 21, n. 6, p. 529-542, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2015.03.014>.

VALE, N. et al. Praziquantel for schistosomiasis: single-drug metabolism revisited, mode of action, and resistance. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 61, n. 5, p. 1-16, 2017. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.02582-16>.

VALLI, L. C. P. et al. Characterization of a clone from an adult worm cDNA library selected with anti-*Schistosoma mansoni* human antibodies dissociated from immune complexes: a preliminary report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 3, p. 187-189, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/s0036-46652007000300009>.

VAN DAM, G. J. Detection of IgM antibodies directed against the gut-associated circulating cathodic antigen in sera from *Schistosoma mansoni* infected patients. Development and comparison of three enzyme-linked immunoassays. **Tropical and Geographical Medicine**, v. 45, n.2, p. 59-65, 1993.

_____. Diagnosis of schistosomiasis by reagent strip test for detection of circulating cathodic antigen. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5458-5461, 2004. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.42.12.5458-5461.2004>.

_____. *Schistosoma mansoni*: in vitro and in vivo excretion of CAA and CCA by developing schistosomula and adult worms. **The Journal Of Parasitology**, v. 82, n. 4, p. 557-564, 1996. <http://dx.doi.org/10.2307/3283780>.

_____. The immunologically reactive O-linked polysaccharide chains derived from circulating cathodic antigen isolated from the human blood fluke *Schistosoma mansoni* have Lewis x as repeating unit. **European Journal Of Biochemistry**, v. 225, n. 1, p. 467-482, 1994. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.00467.x>.

VAN ETTEN, L. et al. Rapid diagnosis of schistosomiasis by antigen detection in urine with a reagent strip. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 10, p. 2404-2406, 1994.

VAN GOOL, T. et al. Serodiagnosis of imported schistosomiasis by a combination of a commercial indirect hemagglutination test with *Schistosoma mansoni* adult worm antigens and an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with *S. mansoni* egg antigens. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 9, p. 3432-3437, 2002. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.40.9.3432-3437.2002>.

VAN LIESHOUT, L.; POLDERMAN, A. M.; DEELDER, A. M. Immunodiagnosis of schistosomiasis by determination of the circulating antigens CAA and CCA, in particular in individuals with recent or light infections. **Acta Tropica**, v. 77, n. 1, p. 69-80, 2000. [http://dx.doi.org/10.1016/s0001-706x\(00\)00115-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0001-706x(00)00115-7).

VENDRAME, C. M. V. et al. Evaluation of anti-*Schistosoma mansoni* igG antibodies in patients with chronic schistosomiasis mansoni before and after specific treatment. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, n. 3, p. 153-159, 2001. <http://dx.doi.org/10.1590/s0036-46652001000300007>.

VITA, R. et al. The Immune Epitope Database 2.0. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 1, p. 854-862, 2009. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkp1004>.

VLAS, S. J.; GRYSEELS, B. Underestimation of *Schistosoma mansoni* prevalences. **Parasitology Today**, v. 8, n. 8, p. 274-277, 1992. [http://dx.doi.org/10.1016/0169-4758\(92\)90144-q](http://dx.doi.org/10.1016/0169-4758(92)90144-q).

WAINE, G. J.; MCMANUS, D. P. Schistosomiasis vaccine development? The current picture. **Bioessays**, v. 19, n. 5, p. 435-443, maio 1997. <http://dx.doi.org/10.1002/bies.950190511>.

WALL, K. et al. Schistosomiasis is associated with incident HIV transmission and death in Zambia. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 12, p. 1-17, 2018. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0006902>.

WANG, J. et al. Intake of erythrocytes required for reproductive development of female *Schistosoma japonicum*. **Plos One**, v. 10, n. 5, p. 1-17, 2015. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0126822>.

WANG, Z. et al. Production and evaluation of recombinant granule antigen protein GRA7 for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in cattle. **Foodborne Pathogens And Disease**, v. 11, n. 9, p. 734-739, 2014. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2014.1749>.

WEBSTER, M. et al. The influence of sex and age on antibody isotype responses to *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum* in human populations in Kenya and the Philippines. **Parasitology**, v. 114, n. 4, p. 383-393, 1997. <http://dx.doi.org/10.1017/s003118209600858x>.

WEERAKOON, K. et al. Advances in the diagnosis of human schistosomiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 4, p. 939-967, 2015. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00137-14>.

WHO. Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiases: number of people treated in 2016. **Weekly Epidemiological Record**, v. 92, n. 49, p. 749-760, 2017. Disponível em: <<https://www.who.int/wer/2017/wer9249/en/>>.

_____. Neglected tropical diseases. Disponível em: <https://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/>. Acesso em 22/07/2019.

_____. Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: numbers of people treated in 2017. **Weekly Epidemiological Record**, v. 93, n. 50, p. 681-692, 2018. Disponível em: < https://www.who.int/neglected_diseases/resources/who_wer9350/en/>.

_____. Schistosomiasis: progress report 2001–2011 and strategic plan 2012–2020. 2013. Disponível em: < <https://apps.who.int/iris/handle/10665/78074>>.

_____. Sixty-fifth World Health Assembly: resolutions and decisions. 2012. Disponível em: < http://apps.who.int/gb/DGNP/pdf_files/A65_REC1-en.pdf>.

_____. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected tropical diseases. 2013. Disponível em: < https://www.who.int/neglected_diseases/9789241564540/en/>.

_____. WHA65.21. Elimination of schistosomiasis. Sixty-Fifth World Health Assembly. Disponível em: < https://www.who.int/neglected_diseases/mediacentre/WHA_65.21_Eng.pdf>.

WHO/PAHO. Schistosomiasis Regional Meeting: Defining a road map toward verification of elimination of schistosomiasis transmission in Latin America and the Caribbean by 2020. 2014. Disponível em: < <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2014/2014-cha-sch-regional-meeting-report.pdf>>.

WILSON, M. S. et al. Immunopathology of schistosomiasis. **Immunology and Cell Biology**, v. 85, n. 2, p. 148-154, 2007. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.icb.7100014>.

WOOLHOUSE, M. E. J.; HAGAN, P. Seeking the ghost of worms past. **Nature Medicine**, v. 5, n. 11, p. 1225-1227, 1999. <http://dx.doi.org/10.1038/15169>.

WU, G.; BAZER, F. W. Application of new biotechnologies for improvements in swine nutrition and pork production. **Journal Of Animal Science And Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 1-16, 2019. <http://dx.doi.org/10.1186/s40104-019-0337-6>.

YAMAGUCHI, H.; MIYAZAKI, M. Refolding Techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies. **Biomolecules**, v. 4, n. 1, p. 235-251, 2014. <http://dx.doi.org/10.3390/biom4010235>.

YE, C. et al. Recombinant antigens rLipL21, rLoa22, rLipL32 and rLigACon4-8 for serological diagnosis of leptospirosis by enzyme-linked immunosorbent assays in dogs. **Plos One**, v. 9, n. 12, p. 1-12, 2014. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0111367>.

YOKOI, H.; KINOSHITA, T.; ZHANG, S. Dynamic reassembly of peptide RADA16 nanofiber scaffold. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 102, n. 24, p. 8414-8419, 2005. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0407843102>.

YU, J. M. et al. Comparison of the Kato-Katz technique, hatching test and Indirect Hemagglutination Assay (IHA) for the diagnosis of *Schistosoma japonicum* infection in China. **Parasitology International**, v. 56, n. 1, p. 45-49, 2007.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2006.11.002>.

APÊNDICE A – Formulação das soluções utilizadas

1- Meio Luria-Bertani-ágar pH 7,0

Ágar bacteriológico -----	7,5 g
Extrato de levedura-----	5 g
Triptona-----	5 g
Cloreto de sódio -----	2,5 g
Hidróxido de sódio 1M -----	0,5 mL
Água destilada -----	q.s.p 500 mL

2- Meio SOC

Triptona -----	20 g
Extrato de levedura -----	5 g
Glicose -----	3,6 g
Cloreto de magnésio -----	1,9 g
Cloreto de sódio -----	0,5 g
Cloreto de potássio-----	0,186 g
Água destilada -----	q.s.p 1000 mL

3- Meio Terrific Broth

Extrato de levedura -----	48 g
Triptona -----	24 g
Glicerol -----	8 mL
Água destilada-----	q.s.p 100 mL

4- Salina tamponada com fosfato

Cloreto de sódio -----	8,76 g
Fosfato de sódio dibásico -----	1,178 g
Fosfato de sódio monobásico -----	0,256 g
Água destilada -----	q.s.p 1000 mL

5- Solução acrilamida-bisacrilamida 30%

Acrilamida -----	29 g
Bisacrilamida -----	1 g
Água destilada -----	q.s.p 100 mL

6- Solução de Coomassie Brilliant R-250

Coomassie Brilliant Blue R-250 -----	1 g
Álcool metílico -----	225 mL
Ácido acético -----	50 mL
Água destilada -----	q.s.p 1000 mL

7- Solução de nitrato de prata

Nitrato de prata -----2 g
 Água destilada -----q.s.p 1000 mL

8- Solução de Tris/Borato/EDTA

Tris base -----54 g
 Ácido bórico -----27,5 g
 EDTA -----3,72 g
 Água destilada -----q.s.p 1000 mL

9- Solução descorante

Álcool etílico -----262,5 mL
 Ácido acético -----100 mL
 Água destilada -----q.s.p 1000 mL

10- Solução fixadora

Álcool etílico -----100 mL
 Ácido acético -----5 mL
 Água destilada -----q.s.p 1000 mL

11- Solução reveladora

Hidróxido de sódio -----30 g
 Água destilada -----q.s.p 1000 mL

12- Tampão de amostra 5X

Glicerol -----2,5 mL
 SDS a 10% -----2 mL
 Tampão Tris 1 M pH 6,8 -----0,6 mL
 Azul de bromofenol -----0,01 g
 Água destilada -----q.s.p 10 mL

13- Tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6

Bicarbonato de sódio -----2,93 g
 Carbonato de sódio -----1,59 g
 Água destilada -----q.s.p 1000 mL

14- Tampão de eluição pH 4,3

Tampão fosfato A* -----2,9 mL
 Tampão fosfato B** -----47,1 mL
 Imidazol -----0,34 g
 Ureia -----240 g
 BetOH -----0,5 mL
 Água destilada -----q.s.p 500 mL

15- Tampão de lavagem 1 pH 7,8

Tampão fosfato A*	-----	2,9 mL
Tampão fosfato B**	-----	47,1 mL
Imidazol	-----	0,34 g
Ureia	-----	240 g
BetOH	-----	0,5 mL
Água destilada	-----	q.s.p 500 mL

16- Tampão de lavagem 2 pH 6,3

Tampão fosfato A*	-----	2,9 mL
Tampão fosfato B**	-----	47,1 mL
Imidazol	-----	0,34 g
Ureia	-----	240 g
BetOH	-----	0,5 mL
Água destilada	-----	q.s.p 500 mL

17- Tampão de lavagem dos corpos de inclusão pH 8,0

Ureia	-----	180,3 g
NaCl	-----	29,2 g
Tris base	-----	6,055 g
EDTA	-----	0,074 g
Água destilada	-----	q.s.p 1000 mL

18- Tampão de lise pH 8,0

Sucrose	-----	30 g
NaCl	-----	29,2 g
Tris base	-----	6,055 g
EDTA	-----	0,074 g
Triton X 100	-----	10 mL
Água destilada	-----	q.s.p 1000 mL

19- Tampão de solubilização dos corpos de inclusão pH 7,8

Cloridrato de guanidina	-----	57,3 g
NaCl	-----	1,169 g
NaH ₂ PO ₄	-----	0,138 g
Tris base	-----	0,121 g
BetOH	-----	0,1 mL
Água destilada	-----	q.s.p 100 mL

20- Tampão de transferência

Tris base	-----	3 g
Glicina	-----	14,4 g
Metanol	-----	200 mL
Água destilada	-----	q.s.p 1000 mL

21- Tampão tris-glicina

Tris base -----	3 g
Glicina-----	15 g
SDS -----	0,1 g
Água destilada -----	q.s.p 1000 mL

22- Tampão tris salina

NaCl-----	8 g
Tris base -----	3 g
Cloreto de potássio -----	0,2 g
Água destilada -----	q.s.p 1000 mL

* Tampão fosfato A

Cloreto de sódio -----	29,2 g
Fosfato de sódio monobásico-----	2,399 g
Água destilada-----	q.s.p 100 mL

** Tampão fosfato B

Cloreto de sódio -----	29,2 g
Fosfato de sódio dibásico -----	2,839 g
Água destilada -----	q.s.p 100 mL

ANEXO A – Certificado de análise do minigene P1-P5



Make Research Easy
CONFIDENTIAL

Certificate of Analysis

Project ID: U8601DD050-1

Construct Information:

Gene Name: Chimeric Sm_pET-28a(+)

Clone ID: C59831

Gene Length: 975 bp

Cloning Vector: pET-28a(+)

Cloning Strategy: BamHI / HindIII

QC Items	Specifications	Results	
Sequencing Alignment	Sequencing results are consistent with the targeted insert sequence.	Pass	Consistent
Vector Sequence	The flanking sequences of the cloning site are correct.	Pass	Correct Shown in the SQD file
Restriction Digests	The size of inserted fragment is correct and free of unexpected bands suggesting contamination.	Pass	Correct Shown in attachment 1
DNA Quality	Miniprep: 4 µg OD260/280=1.8~2.0 Free of contamination	Pass	≥ 4 µg OD260/280=1.85 Pure
Quality grade	Research Grade	Pass	Research Grade
Appearance	Clear and free of foreign particles.	Pass	Clear Free of foreign particles
Additional Test		N/A	

NOTE

Shipping at	Plasmid Storing at	Bacstab Storing at	Glycerol Stock Storing at
Room Temperature	-20°C	4°C	-20°C/-80°C

Morgan

Certified by:

Date: 08/01/2018

Thank you for your patronage to our Gene services! To maintain this working relationship, we shall be grateful if you can add our webpage URL into your lab website. As a token of appreciation, you will be rewarded by 1,000 EZcoupon™ points. For more information, please contact us by e-mail at web@genscript.com.

For research use only

860 Centennial Ave., Piscataway, NJ 08854, USA

Toll-Free: 1-877-436-7274

Tel: 1-732-885-9188

Fax: 1-732-210-0262

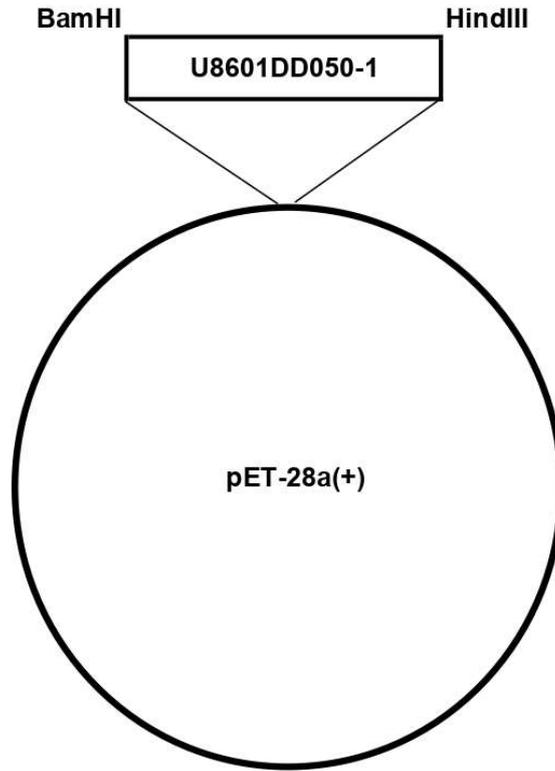
Email: order@genscript.com

Web: www.genscript.com

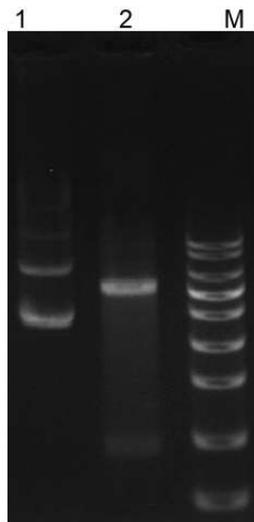
Attachment 1

Plasmid Construct Map

The gene was cloned in pET-28a(+) by BamHI / HindIII.

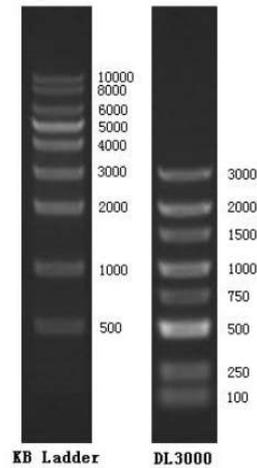


Enzyme Digestion



Lane M: KB Ladder
Lane 1: U8601DD050-1 plasmid
Lane 2: U8601DD050-1 plasmid digested by BamHI and HindIII

Digestion Conditions:
About 300ng plasmid digested
Digestion in water-bath, 37°C for 40 minutes
1% Agarose Gel



For research use only

860 Centennial Ave., Piscataway, NJ 08854, USA

Toll-Free: 1-877-436-7274

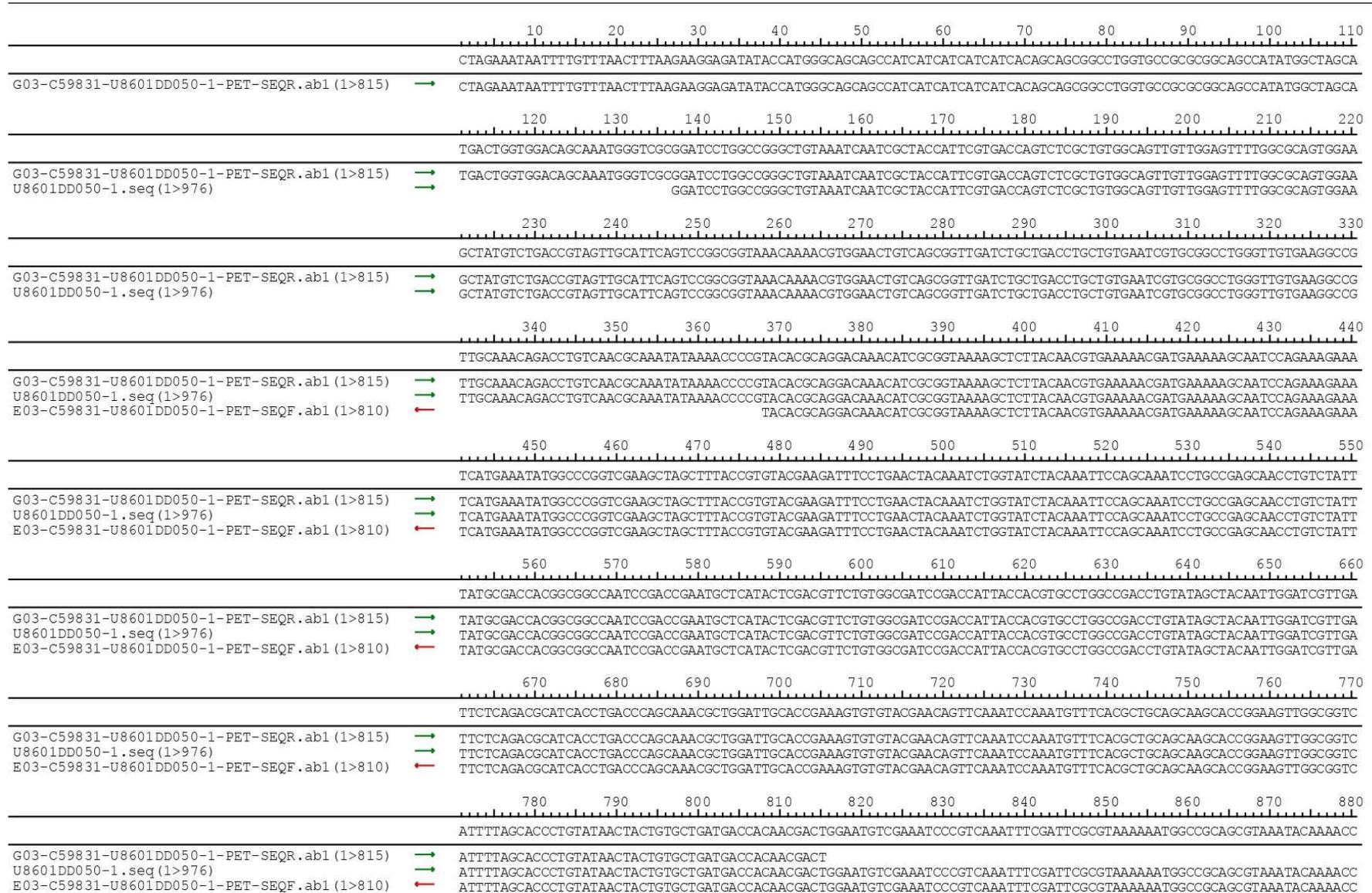
Tel: 1-732-885-9188

Fax: 1-732-210-0262

Email: order@genscript.com

Web: www.genscript.com

ANEXO B – Sequenciamento do plasmídeo pET-28a(+) com o minigene P1-P5



ANEXO C – Alinhamento do antígeno multiepítópos com a catepsina B humana

```

F8E060B506 -----
TR|B4DL49|B4DL49_HUMAN MWQLWASLCCLLVLANARSRPSFHPVSDLVNRYVNRNTTWQAGHNFYNVDMSYLKRLCG 60

F8E060B506 -----WPGCKSIATIRDQSRCGSCWSFGAVEAMSDR 31
TR|B4DL49|B4DL49_HUMAN TFLGGPKPPQRMFTEDLKLPA SF DAREQWPQCPTIKEIRDQSGSCGSCWAFGAVEAISDR 120
** * .* *****. *****:*****.***

F8E060B506 SCIQSGGKQNVELSAVDLLTCCESCGLGCEGRCKQTCQRKYKTPYTQDKHRGKSSYNVKN 91
TR|B4DL49|B4DL49_HUMAN ICIHVNGSRPPC-----TGEGDTPKCSKICEPGYSPTYKQDKHYGYNSYSVSN 168
**:. *.: * * :*.: *:* * . * .***** * .**.*.*

F8E060B506 DEKAIQKEIMKYGPVEASFTVYEDFLNYKSGIYKFQQILPS---NLSIYATTAANPTECS 148
TR|B4DL49|B4DL49_HUMAN SEKDIMAEIYKNGPVEGAFSVYSDFLLYKSGVYQHVTGEMMGHAI RILG----- 218
.* * * * * *****.:*:*.* ** *****:*:. : * .

F8E060B506 YSTFCGDPTITTTCLADLYSYNWI VDSQTHHLTQQTL DCTESVYEQFKSKCFTLQQAPEVG 208
TR|B4DL49|B4DL49_HUMAN WGVENGTPYW--LVANSWNTDWGDNGFFKILRGQ-DHCGIE-----SEVVAGIPRT- 266
:.. * * :*: :. :* :. : * * .* . . : * ..

F8E060B506 GHFSTLYNYCADDHNDWNVEI PSNFD SRKKWPQRKYKTPYTQDKHRGKSSYNVKNDEKAI 268
TR|B4DL49|B4DL49_HUMAN -----DQYWEKI----- 273
.: *:

F8E060B506 QKEIMKYGPVEAHRQFCETKLIVLCRIFSNHTHTVESLAI IILLKCAQVCIKI 320
TR|B4DL49|B4DL49_HUMAN -----

```