



Universidade Federal de Ouro Preto
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
Laboratório de Enzimologia e Proteômica



**Complexidade do proteoma de *Schistosoma mansoni* na miniatura da fase larval
miracídio**

Mariana Siqueira Lacerda Mamede

Ouro Preto – MG

2017

Universidade Federal de Ouro Preto
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
Laboratório de Enzimologia e Proteômica

**Complexidade do proteoma de *Schistosoma mansoni* na miniatura da fase larval
miracídio**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte das exigências do programa para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, com área de concentração em Bioquímica Estrutural e Biologia Molecular.

Autora: Mariana Siqueira Lacerda Mamede

Orientador: William de Castro Borges

Ouro Preto – MG

2017

M31c

Mamede, Mariana Siqueira Lacerda.

Complexidade do proteoma de *Schistosoma mansoni* na miniatura da fase larval miracídio [manuscrito] / Mariana Siqueira Lacerda Mamede. - 2017. xiv, 66f.: il.: color; grafs; tabs; mapas.

Orientador: Prof. Dr. William de Castro Borges.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica Estrutural e Biologia Molecular.

1. Trematódeo. 2. *Schistosoma mansoni*. 3. Proteômica. I. Borges, William de Castro. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 616.993.122

Catálogo: www.sisbin.ufop.br



Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

“COMPLEXIDADE DO PROTEOMA DE *SCHISTOSOMA MANSONI* NA MINIATURA DA FASE LARVAL MIRACÍDIO ”

Aos quinze dias do mês de dezembro de 2017, às 13:00 horas, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna **Mariana Siqueira Lacerda Mamede**. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por APROVAR a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

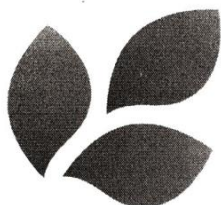
Membros da Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Renata Guerra de Sá Cota
Examinadora (UFOP)

Prof.^a Dr.^a Rosilane Aparecida da Silva Pereira
Examinadora (FIOCRUZ)

Prof. Dr. William de Castro Borges
Presidente (UFOP)

DATA DA DEFESA: **15/12/2017**



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NUPEB - Bloco I / Universidade Federal de Ouro Preto Campus Universitário
Morro do Cruzeiro / CEP 35.400-000 – Ouro Preto - MG - Brasil Tel: 55 (31) 3559-1681
E-mail: cbiol@nupeb.ufop.br / www.nupeb.ufop.br/cbiol

Aos meus amados pais Marilia e José Flavio, aos meus queridos irmãos Matheus e Mariely e às minhas mães de coração Erli e Angela.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por ser o meu guia, a minha luz e pelo Seu amor incondicional, que me fortaleceu por todo esse tempo.

Aos meus amados pais, Marília Siqueira Lacerda e José Flavio Mamede da Silva, pela dedicação integral, incentivo e por me apoiarem ao longo de toda a minha formação profissional.

Aos meus queridos irmãos, Matheus Lacerda e Mariely Lacerda, pelo carinho e assistência.

Às minhas mães de coração, tia Angela Lacerda e Erli de Souza, pelos conselhos afetuosos.

A todos os meus familiares, em especial, minhas avós Maria de Lourdes Siqueira Lacerda e Nair do Rego da Silva, pela atenção e cuidados.

Ao professor William de Castro Borges pela orientação, amizade, paciência e confiança depositada.

Ao professor Marcos Aurélio de Santana pela amizade, pelos conselhos assertivos e pela orientação no estágio docência.

Aos técnicos e amigos, Bruno Mattei e José Henrique Braga Fortes, pela eficiência, disposição e pelas horas divertidas de convívio.

Aos amigos do LEP, por proporcionarem um ambiente de trabalho agradável. Ao Leandro Neves pela disponibilidade e pelo auxílio com os experimentos. À Ananda Sanson, pela solicitude. À Luciana Inácio, Juliana Silveira e ao Luis Henrique Nilsen, pela valiosa amizade e por todas as alegrias divididas.

Às Patroas, por me apoiarem, genuinamente, desde a graduação.

À República Três Irmãs, em especial, a Poly Zito, Júlia Mendes e Márlea Helena, por me acolherem, gentilmente, em minha chegada à Ouro Preto.

À República Ohana, pelo aconchego do lar.

Às meninas do estudo bíblico, por me ensinarem, um pouco mais, sobre a relação com Deus e com o próximo.

À Isabela Araújo, pela irmandade, por tornar os meus dias mais leves e por toda a ajuda com as figuras da dissertação.

À Luana Duarte, Daniela Batista, Dona Maria e ao Ewerton de Andrade, pela amizade e por todos os momentos compartilhados.

À Susi por toda sua sensibilidade e afeto.

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao CBIOL, CCA, LIP, NUPEB e à UFOP por todo o conhecimento transmitido e por disponibilizar o uso de suas instalações.

E a todos que contribuíram de alguma maneira para a realização desse trabalho, o meu sincero agradecimento.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana,
seja apenas outra alma humana.”

Carl G. Jung

RESUMO

A esquistossomose é um problema de saúde pública muito comum nas regiões tropicais ou subtropicais do globo. No Brasil, o agente etiológico da esquistossomose é o *Schistosoma mansoni*, uma das principais espécies do gênero responsáveis pelo alto índice de morbidade e impacto socioeconômico provocados pela doença. Esse parasito possui um ciclo biológico complexo envolvendo dois hospedeiros: um definitivo mamífero, que inclui os seres humanos, e um hospedeiro intermediário, representados, no Brasil, por moluscos do gênero *Biomphalaria*. Existem muitos estudos publicados abordando a análise proteômica de alguns estágios de vida desse platelminto, porém a caracterização proteômica em larga escala da fase larval de vida livre, a qual infecta o hospedeiro invertebrado, ainda é muito restrita. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o proteoma solúvel e de membrana do miracídio de *S. mansoni*. Os ovos foram recuperados a partir da digestão trípica dos fígados de camundongos BALB/c infectados. As proteínas solúveis foram obtidas por intermédio da homogeneização da larva em tampão Tris-HCl pH 7,5 contendo inibidores de proteases e a fração de membrana recuperada por centrifugação. Em ambos os extratos foi adicionado surfactante para garantir uma melhor solubilização das proteínas hidrofóbicas. Os peptídeos oriundos da digestão trípica das proteínas foram analisados por nanocromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Ao todo, 2.555 sequências de proteínas foram identificadas. As análises individuais dos proteomas solúvel e de membrana forneceram 1.604 e 1.947 identidades, respectivamente. A categorização funcional das proteínas ocorreu via *Gene Ontology*, sendo possível detectar uma variedade de vias metabólicas e de sinalização celular nesse estágio larval. Um conjunto seletivo de peptídeos, tais como *NPP-1 prepropeptide* e *Putative neuropeptide Y prohormone 1*, bem como proteínas relacionadas ao sistema nervoso do parasito foram identificados, pioneiramente, nesse trabalho. A quantificação *label free* das proteínas totais, por sua vez, determinou a abundância relativa de 642 biomoléculas, as quais incluem proteínas de membranas, proteínas secretadas, proteínas *Venom Allergen-Like* e proteases. A análise proteômica *shotgun* dessa fase larval de *S. mansoni* contribuiu para o melhor entendimento da composição molecular do parasito e apontou vias que podem ser de particular interesse no contexto da relação parasito-hospedeiro.

Palavras-chave: miracídio, *Schistosoma mansoni*, proteômica, *shotgun*.

ABSTRACT

Schistosomiasis is a very common public health problem in tropical or subtropical regions worldwide. In Brazil, the etiologic agent of schistosomiasis is *Schistosoma mansoni*, one of the major species of the genus responsible for the high morbidity index and socioeconomic impact caused by the disease. This parasite has a complex biological cycle involving two hosts: a mammalian definitive host, including human beings, and an intermediate host, represented in Brazil by mollusks of the genus *Biomphalaria*. There are many published studies approaching the proteomic analysis of some stages of life of this flatworm, but the shotgun proteomic characterization of the free-living larval phase, which infects the invertebrate host, is still very restricted. In this context, the aim of this work was to characterize the soluble and membrane proteome of the miracidium of *S. mansoni*. The eggs were recovered from tryptic digestion of the livers of infected BALB/c mice. Soluble proteins were obtained through homogenization of the larvae in pH 7.5 Tris-HCl buffer containing protease inhibitors and the membrane fraction recovered by centrifugation. In both extracts surfactant was added to ensure a better solubilization of the hydrophobic proteins. The peptides from tryptic digestion of proteins were analyzed by nano-liquid chromatography coupled to mass spectrometry. In all, 2,555 protein sequences were identified. Individual analysis of the soluble and membrane proteomes provided 1,604 and 1,947 identities, respectively. The functional categorization of proteins occurred via Gene Ontology, being possible to detect a range of metabolic and cell signaling pathways at this larval stage. A select set of peptides, such as NPP-1 prepropeptide³ Putative neuropeptide and neuropeptide Y prohormone 1, as well as proteins related to the parasite's nervous system were first identified in this work. The label free quantification of total proteins, in turn, determined the relative abundance of 642 biomolecules, which include membrane proteins, secreted proteins, Venom Allergen-Like proteins and proteases. The shotgun proteomic analysis of this larval stage of *S. mansoni* added to the better understanding of the molecular composition of the parasite and pointed to pathways that may be of particular interest in the context of the host-parasite relationship.

Keywords: miracidium, *Schistosoma mansoni*, proteomics, shotgun.

SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
1.1 Aspectos gerais da esquistossomose.....	1
1.2 O ciclo biológico do <i>S. mansoni</i>	3
1.3 O miracídio de <i>S. mansoni</i>	5
1.4 Genoma, transcriptoma e proteoma de <i>S. mansoni</i>	11
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 Declaração de ética para manuseio de animais.....	17
3.2 Obtenção da fase larval miracídio de <i>S. mansoni</i>	17
3.3 Preparação das frações proteicas do miracídio	19
3.3.1 Extração das proteínas solúveis.....	19
3.3.2 Recuperação da fração de membrana.....	19
3.4 Eletroforese unidimensional (SDS-PAGE).....	20
3.5 Coloração por Coomassie coloidal	20
3.6 Digestão em solução do extrato solúvel	21
3.7 Digestão em solução do proteoma do miracídio utilizando surfactante	21
3.8 Análises MS/MS	22
3.9 Busca em banco de dados	24
3.9.1 Proteome Discoverer	24
3.9.2 PEAKS	24
3.10 Avaliação dos parâmetros espectrométricos.....	25
3.11 Categorização das proteínas e análises de bioinformática.....	25
4. RESULTADOS	27
4.1 Análise eletroforética e composicional do extrato solúvel do miracídio.....	27

4.2 Avaliação eletroforética comparativa entre a fração solúvel e de membrana do miracídio e parâmetros espectrométricos para análise das frações por proteômica <i>shotgun</i>	30
4.3 Categorização funcional do proteoma total	32
4.4 Categorização funcional das proteínas solúveis e de membranas	34
4.5 Análise quantitativa e composicional das frações	36
5. DISCUSSÃO	48
6. CONCLUSÕES	56
7. PERSPECTIVAS	57
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
9. ANEXOS	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição geográfica da esquistossomose no mundo em 2012.	1
Figura 2: Ciclo biológico dos vermes do gênero <i>Schistosoma</i>	5
Figura 3: Imagem DIC do miracídio de <i>S. mansoni</i>	6
Figura 4: Imagens de microscopia eletrônica e confocal do miracídio.....	7
Figura 5: Fluxo de trabalho para a obtenção da larva.	18
Figura 6: Procedimentos demonstrando a separação do extrato solúvel (A) e do <i>pellet</i> de membrana (B).	19
Figura 7: Delineamento experimental ilustrando a digestão enzimática das proteínas solúveis e de membrana do miracídio.	22
Figura 8: Gel de poliacrilamida unidimensional do extrato solúvel da larva.....	27
Figura 9: Distribuição das proteínas solúveis em Tris.	28
Figura 10: Categorização das 358 proteínas que correspondem a 90% do proteoma solúvel do miracídio.	29
Figura 11: Géis SDS-PAGE da fração solúvel (A) e de membrana (B) da larva.	30
Figura 12: Cromatogramas <i>base peak</i> de uma amostra da fração solúvel e outra da fração de membrana.....	31
Figura 13: Top N íons de uma replicata técnica de cada preparação ao longo do gradiente.	31
Figura 14: Categorização das proteínas de ambas as frações.....	32
Figura 15: Classificação das proteínas totais na categoria de componente celular.....	33
Figura 16: Classificação do proteoma total na categoria de processo biológico.	33
Figura 17: Classificação das identidades das frações solúvel e de membrana na categoria de componente celular.	35
Figura 18: Classificação das proteínas de membranas e das proteínas solúveis em Tris na categoria de processo biológico.	36
Figura 19: Proteínas estatisticamente significativas dos extratos solúvel e de membrana.	37
Figura 20: Abundância relativa de 642 proteínas de ambas as frações.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Proteínas relacionadas ao sistema nervoso do miracídio encontradas em ambos os extratos	34
Tabela 2: Categorização das sequências do proteoma solúvel e de membrana	35
Tabela 3: Proteínas com domínios transmembrana preditos	40
Tabela 4: Proteínas com sítios de clivagem de peptídeos sinais preditos	44
Tabela 5: Proteínas VALs identificadas pelas análises <i>shotgun</i> do proteoma solúvel e de membrana.....	46
Tabela 6: Identidades relacionadas a proteases e/ou suas subunidades obtidas pela análise proteômica em larga escala do extrato solúvel e de membrana	47

ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP: Trifosfato de adenosina

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

cDNA: DNA complementar

DIC: *Differential Interference Contrast*

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EST: *Expressed Sequence Tag*

F: Fenilalanina

G: Glicina

GABA: Ácido γ -aminobutírico

GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase

GO: *Gene Ontology*

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência

HSP: *Heat Shock Protein*

IgG: Imunoglobulina G

K: Lisina

LC-MS: Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

nanos: RNA-binding protein Nanos

OMS: Organização Mundial da Saúde

ORESTES: *Open Reading Frame Expressed Sequence Tags*

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PNA: *Peanut Agglutinin*

R: Arginina

RER: Retículo Endoplasmático Rugoso

RNA: Ácido ribonucleico

RT-PCR: *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*

S: Serina

SDS-PAGE: *Sodium Dodecyl-Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

T: Treonina

TGF- β : *Transforming Growth Factor-Beta*

UHPLC: *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*

VAL: *Venom Allergen-Like*

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Aspectos gerais da esquistossomose

A esquistossomose é um problema de saúde pública que atinge cerca de 240 milhões de indivíduos em todo o mundo (TURNER *et al.*, 2017). Essa doença tem como agente etiológico platelmintos do gênero *Schistosoma* e ocupa uma posição no ranking das doenças tropicais negligenciadas. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 66,5 milhões de pessoas foram tratadas com esquistossomose em 2015 e estima-se que mais de 700 milhões estejam sujeitas a contrair a doença (TURNER *et al.*, 2017; WHO, 2017). O Brasil está entre os 78 países afetados, que incluem os países da África, América do Sul, Caribe, Oriente Médio e Ásia (Fig. 1) (OLVEDA, D. U. *et al.*, 2014; WHO, 2017). A esquistossomose humana pode ser provocada por cinco espécies diferentes – *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. mekongi* e *S. intercalatum*, sendo que as três primeiras são as principais responsáveis pela alta taxa de mortalidade associada à doença (OLVEDA, D. U. *et al.*, 2014).

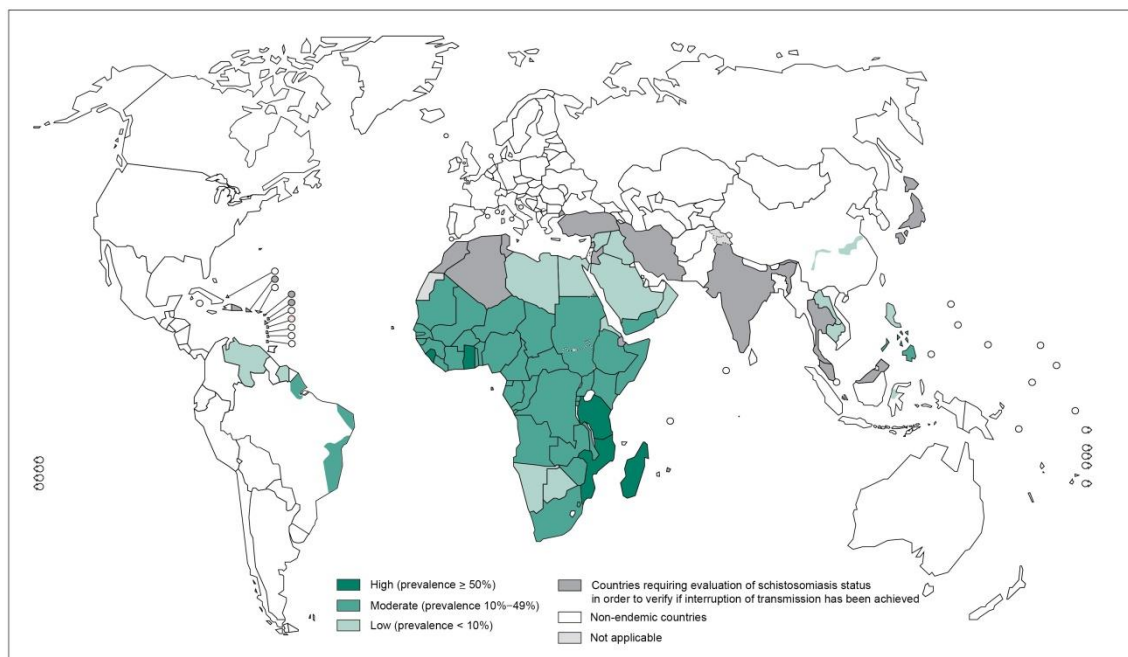


Figura 1: Distribuição geográfica da esquistossomose no mundo em 2012. A prevalência da doença varia com a intensidade de cor, conforme a legenda. Quanto mais intenso o verde naquele local, maior a prevalência da doença (WHO, 2017).

A bilharzíase pode ser classificada em duas fases, de acordo com os sintomas clínicos que ela apresenta. A fase aguda normalmente acontece concomitantemente à penetração das cercárias e às etapas subsequentes de migração do parasito. As principais

manifestações da fase aguda envolvem: a coceira do nadador, a dermatite cercariana, a broncopneumonia e a síndrome de Katayama. A primeira é uma inflamação local acompanhada de edema e capilares dilatados. A dermatite cercariana, por sua vez, é uma erupção cutânea que se apresenta no local de invasão da larva, assim como ocorre na coceira do nadador (BARSOUM; ESMAT; EL-BAZ, 2013). Cerca de 70% dos pacientes infectados com *Schistosoma mansoni* retratam sintomas respiratórios, que se manifestam devido à migração dos esquistossômulos pelo pulmão (BARSOUM; ESMAT; EL-BAZ, 2013; ROSS *et al.*, 2002). Entre 4-8 semanas após a infecção, os indivíduos doentes podem apresentar febre, fadiga, mialgia, mal-estar, eosinofilia, artralgia e crioglobulinemia – febre de Katayama (BARSOUM; ESMAT; EL-BAZ, 2013; GRYSEELS *et al.*, 2006). Os pacientes que não conseguem se recuperar após 2-10 semanas, podem evoluir para um quadro clínico mais grave, que engloba perda de peso, dispneia, diarreia, dor abdominal difusa, toxemia, hepatoesplenomegalia e erupções cutâneas generalizadas (GRYSEELS *et al.*, 2006).

A fase crônica da esquistossomose mansônica é resultado da retenção dos ovos nos tecidos do hospedeiro humano, a qual provoca uma reação granulomatosa como resposta do sistema imune aos antígenos secretados pelo ovo. As manifestações intestinais mais comuns dessa fase consistem em diarreia com e sem sangue, dor abdominal, hiperplasia, ulceração, formação de microabscessos e polipose. Ainda no início da infecção crônica, o fígado apresenta um aumento anormal de seu volume. Já a fibrose periportal em *S. mansoni*, leva de 5-15 anos para se desenvolver, podendo causar a obstrução do fluxo sanguíneo, hipertensão portal, esplenomegalia, circulação venosa colateral e varizes intestinais (GRYSEELS *et al.*, 2006; ROSS *et al.*, 2002).

Segundo a OMS, o teste diagnóstico recomendado para o controle da doença é o método de Kato-Katz, que é fundamentado na detecção de ovos viáveis em amostras de 40-50 mg de fezes (COLLEY *et al.*, 2014; ROSS *et al.*, 2002). Entretanto, o emprego desse único teste pode não ser a melhor escolha para o diagnóstico da esquistossomose, visto que, em alguns casos, os indivíduos infectados podem exibir um número bastante reduzido de ovos nas fezes (ROSS *et al.*, 2002). Sendo assim, foi proposta uma alternativa que combina a análise de três lâminas pela técnica de Kato-Katz ao diagnóstico sorológico de ELISA (IgG anti-*S. mansoni*) para aumentar a sensibilidade do método (ELBAZ; ESMAT, 2013). Testes sorológicos, a técnica de PCR para a detecção de DNA circulante e a procura de marcadores bioquímicos de fibrose hepática

também são ferramentas disponíveis para o estudo do caso clínico do paciente. Em último caso, pode ser feita a biópsia da mucosa retal, do intestino e do fígado (ELBAZ; ESMAT, 2013; ROSS *et al.*, 2002).

O praziquantel é o quimioterápico preferencialmente utilizado no tratamento da esquistossomose (COLLEY *et al.*, 2014). Ainda não se sabe ao certo o mecanismo de ação dessa droga, mas acredita-se que ela provoque a formação de vacúolos no tegumento do verme adulto, além de promover uma contração tetânica do parasito, em decorrência do influxo de cálcio resultante da alteração da função dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem. Esses eventos expõem componentes extratecuiduais do *Schistosoma* ao sistema imune do hospedeiro, contribuindo com a sua morte (ROSS *et al.*, 2002; SILVA, V. B. R. DA *et al.*, 2017). A administração de duas a três doses de 20 mg/kg de massa corporal é o indicado para o tratamento da doença, mas uma única dose oral de 40 mg/kg tem sido utilizada com eficácia pelos programas de controle (COLLEY *et al.*, 2014; ROSS *et al.*, 2002). Por ser incapaz de matar esquistossômulos, a ação sinérgica do praziquantel com fármacos antimaláricos pode ser necessária para auxiliar nessa função (ELBAZ; ESMAT, 2013; ROSS *et al.*, 2002). Outra intervenção terapêutica para esquistossomose mansônica é a oxamniquina, porém sua disponibilidade é restrita (ROSS *et al.*, 2002).

1.2 O ciclo biológico do *S. mansoni*

Os esquistossomos possuem um ciclo de vida heteróximo complexo, dividido em fase sexuada e assexuada (Fig. 2). Os vermes do gênero são dioicos, diferentemente dos outros parasitos da sua classe – Trematoda (GRYSEELS *et al.*, 2006). Os hospedeiros intermediários das principais espécies de *Schistosoma*, as quais têm como hospedeiro definitivo o ser humano, são moluscos dos gêneros *Biomphalaria*, *Bulinus*, *Neotricula* e *Oncomelania* (WEERAKOON *et al.*, 2015). No Brasil, a fase assexuada da esquistossomose mansônica ocorre em caramujos das espécies *B. glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila* (FONSECA *et al.*, 2014).

Na fase sexuada do ciclo, vermes adultos macho e fêmea, que se alojam no plexo venoso mesentérico do hospedeiro vertebrado, encontram-se pareados, dando início a ovoposição (COLLEY *et al.*, 2014; GRIMES *et al.*, 2015). Nesse estágio de vida, os parasitos se alimentam, por meio da glicólise anaeróbica, de eritrócitos do hospedeiro e centenas de ovos são produzidos diariamente pela oxidação de ácidos

graxos (COLLEY *et al.*, 2014; GRIMES *et al.*, 2015; GRYSEELS *et al.*, 2006). A via de sinalização do TGF- β e de proteínas tirosina quinases parecem regular o processo de emparelhamento, bem como o de proliferação, de diferenciação e de expressão de genes das células vitelinas e embriogênese do ovo (LOVERDE, Philip T.; ANDRADE; OLIVEIRA, G., 2009).

Os ovos podem ficar retidos no fígado ou intestino do hospedeiro, causando uma reação inflamatória provocada pela secreção de enzimas proteolíticas produzidas pelo miracídio. Durante a migração intestinal, essas substâncias podem, eventualmente, facilitar a eliminação dos ovos pelas fezes (COLLEY *et al.*, 2014; GRYSEELS *et al.*, 2006). Uma série de fatores influencia na eclosão dos ovos, tais como os estímulos químicos e luminosos, a pressão osmótica, a temperatura e a velocidade da água. Os miracídios liberados nas coleções hídricas nadam a uma velocidade de 2 mm/s, por, aproximadamente, seis horas em busca do hospedeiro invertebrado, penetrando preferencialmente na base das suas antenas e na massa cefalopodal (MASAMBA *et al.*, 2016; WALKER, 2011).

No tegumento do caramujo, essa forma larval se diferencia assexuadamente em esporocistos primários, que, sucessivamente, dão origem aos esporocistos secundários. Esses migram dos músculos da região cefalopodal para as glândulas digestivas ou hepatopâncreas, possibilitando a formação das cercárias (MASAMBA *et al.*, 2016). Cerca de 250 a 600 delas são produzidas diariamente de um molusco infectado, sendo um único miracídio capaz de gerar mais de 20.000 cercárias (GRIMES *et al.*, 2015). A procura pelo hospedeiro definitivo e a eficiência da infecção dependem das condições ambientais, como a turbulência da água e a sombra, além de estímulos químicos, como ácido linoleico, arginina e ceramidas presentes na pele do hospedeiro. Essa busca pode durar até 72 h, enquanto durarem suas reservas de glicogênio (GRYSEELS *et al.*, 2006; WALKER, 2011).

Após penetrar a pele do hospedeiro mamífero, onde ficam por no mínimo 48 h, as cercárias perdem a calda bifurcada e o glicocálix, para dar lugar a uma membrana externa de bicamada dupla e a outras glicoproteínas, originando os esquistossômulos (WALKER, 2011). As larvas da pele ganham a circulação sanguínea, passam pelos pulmões, migram até o fígado e no sistema porta-hepático se pareiam após a maturação

sexual. Depois de 4-6 semanas na veia porta, deslocam-se até as vênulas mesentéricas, dando continuidade ao ciclo (GRYSEELS *et al.*, 2006).

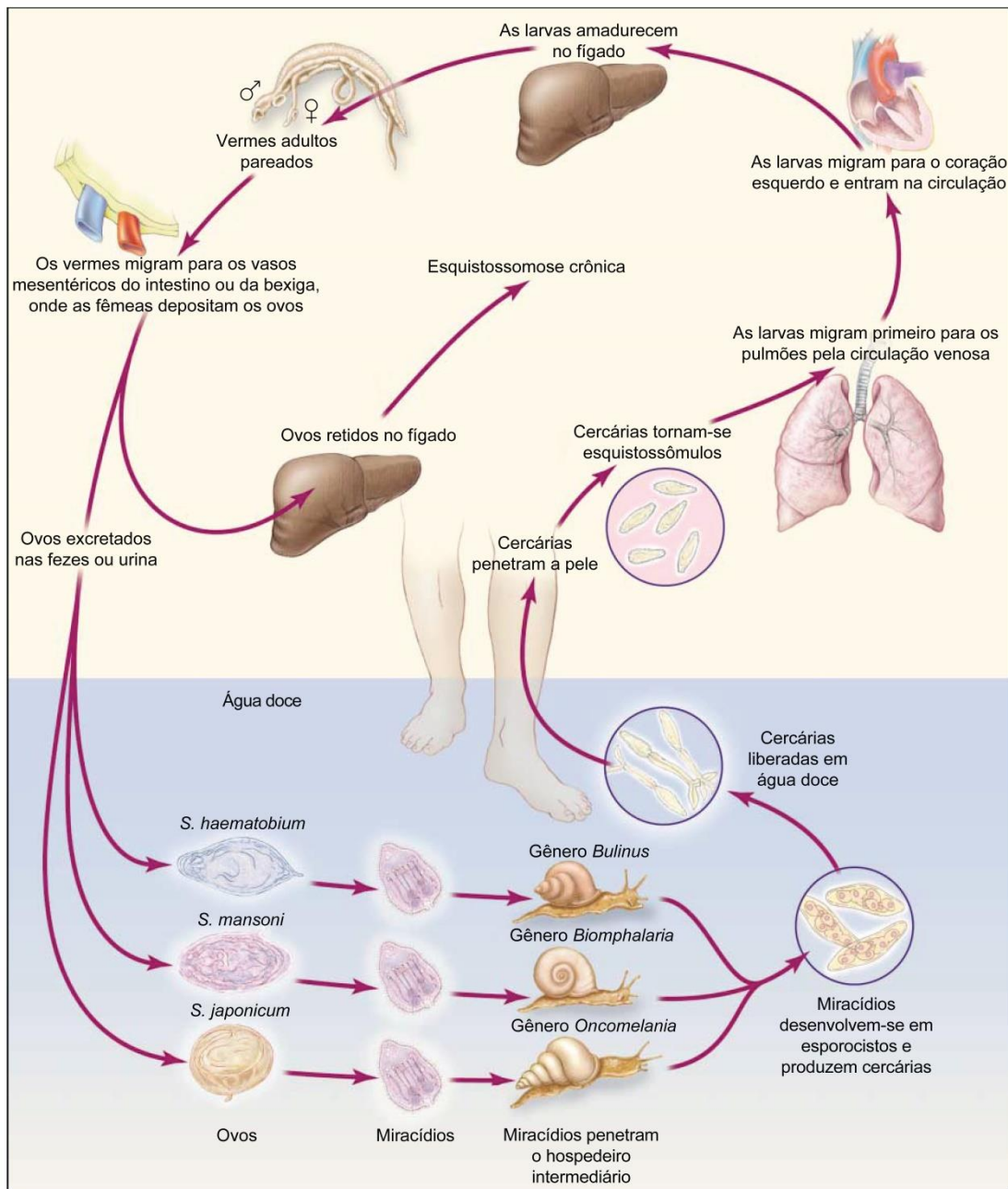


Figura 2: Ciclo biológico dos vermes do gênero *Schistosoma*. São representados os ciclos de vida das três principais espécies que infectam o ser humano. Adaptado de ROSS *et al.*, (2002).

1.3 O miracídio de *S. mansoni*

O miracídio de *S. mansoni* corresponde à fase larval de vida livre que infecta o hospedeiro intermediário do gênero *Biomphalaria*. Apesar do tamanho – $136 \pm 3 \mu\text{m}$ de comprimento e $54 \pm 1 \mu\text{m}$ de largura, exibe uma estrutura bastante complexa (EKL-

NATEY *et al.*, 1985). O miracídio apresenta uma organização celular bem definida, que consiste de oito sistemas principais: sistema epitelial, *terebratorium*, glândulas de penetração, musculatura, células intersticiais, sistema excretor, sistema nervoso e células germinativas (PAN, 1980).

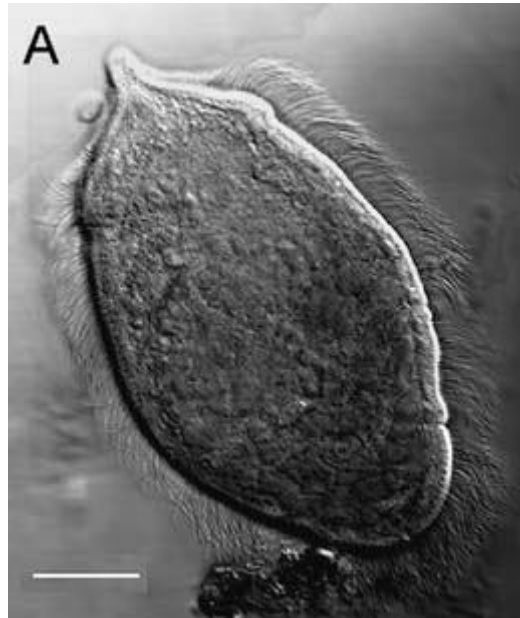


Figura 3: Imagem DIC do miracídio de *S. mansoni*. A figura mostra a grande quantidade de cílios que essa larva possui. Barra da escala, 20 μm (BAHIA *et al.*, 2006).

O sistema epitelial é formado pelas placas e cristas epidérmicas. Essa larva é revestida por 21 placas epidérmicas ciliadas, distribuídas em quatro camadas: a primeira camada contendo seis placas (Fig. 4D), a segunda contendo oito ou nove, a terceira contendo quatro e a última contendo três (EKLU-NATEY *et al.*, 1985; PAN, 1980). Entre as placas, encontram-se cristas epidérmicas não ciliadas, as quais dividem o parasito tanto longitudinalmente (com exceção da primeira camada), quanto latitudinalmente, separando o corpo do miracídio em três anéis transversais – anel anterior, anel médio e anel posterior (EKLU-NATEY *et al.*, 1985). As cristas e as placas epidérmicas estão conectadas umas as outras por junções septadas e ambas apresentam, em suas superfícies, microvilosidades (~50 nm de altura e diâmetro) (EKLU-NATEY *et al.*, 1985; SAMUELSON; CAULFIELD, 1985).

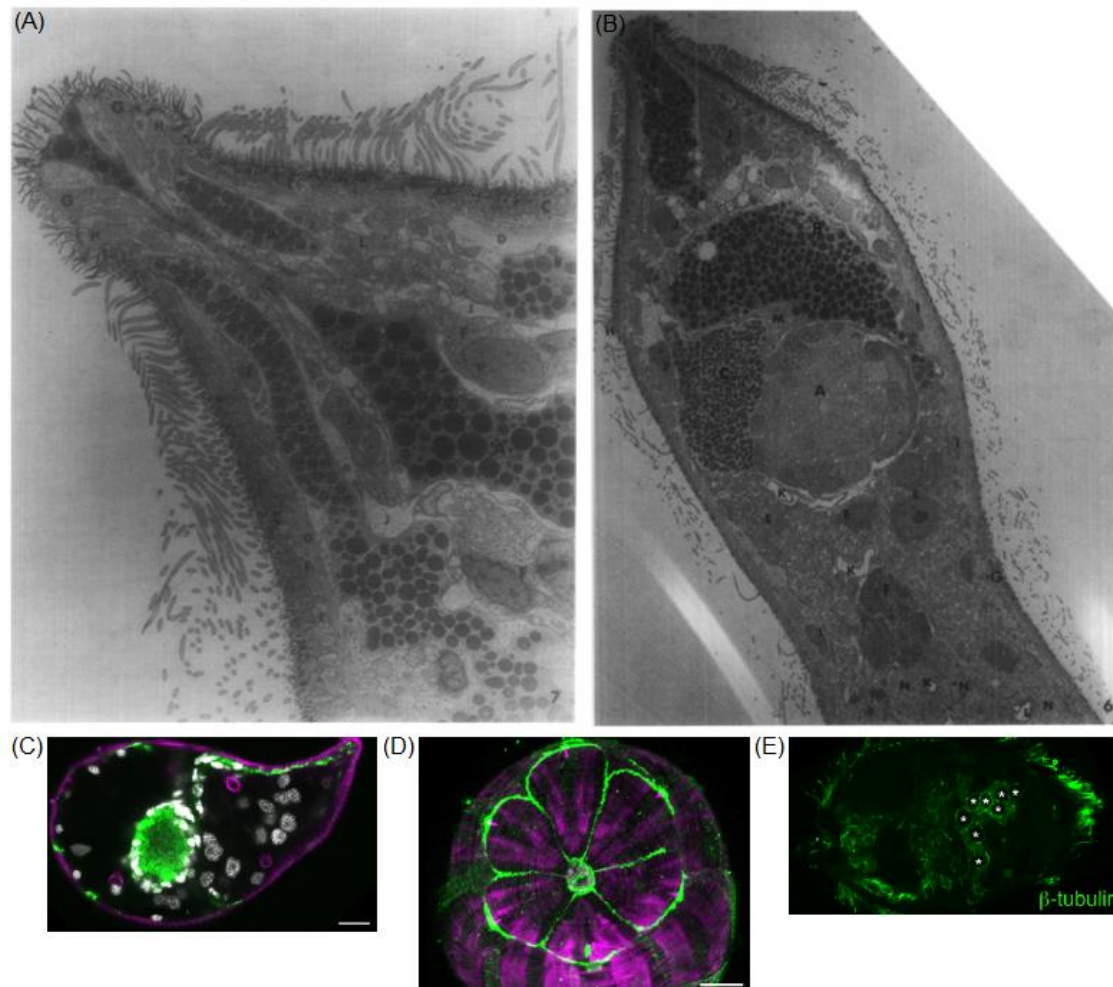


Figura 4: Imagens de microscopia eletrônica e confocal do miracídio. (A) Micrografia eletrônica de um corte sagital da porção anterior desse estágio larval, mostrando as glândulas apical e laterais (x5.390). (B) Imagem de microscopia eletrônica de uma seção sagital da larva, exibindo as glândulas apical e lateral e a massa neural (x2.940). (C) Imagem de microscopia confocal retratando os neurópilos (verde), os núcleos dos gânglios nervosos (cinza) e os músculos e as células-flama (magenta) dessa fase larval, pela coloração com anti-sinapsina, DAPI e faloidina, respectivamente. (D) Micrografia confocal da extremidade anterior do miracídio corada com anti-*phospho* S/T (verde) e faloidina (magenta), salientando o *terebratorium* e as placas epidérmicas da primeira camada. (E) Células germinativas (asteriscos) e cílios evidenciados pela coloração com β -tubulina. Barras da escala, 10 μ m. Adaptado de COLLINS *et al.*, (2011); PAN, (1980).

Os inúmeros cílios móveis que surgem das placas epidérmicas possuem, cada um, dois microtúbulos centrais e nove pares de microtúbulos circundantes (Fig. 3 e Fig. 4E) (PAN, 1980). Eles medem de 4-12 μ m na primeira camada e cerca de 12 μ m nas demais, permitindo o deslocamento dessa forma larval na busca pelo hospedeiro invertebrado (EKLUNATEY *et al.*, 1985). Corpos ovais a redondos, densos em elétrons e associados à membrana situam-se entre as raízes ciliares. Logo abaixo, existe uma camada de mitocôndrias banhada pelo citoplasma das placas epidérmicas, o qual possui uma textura granular e partículas de glicogênio. O citoplasma é delimitado

inferiormente pela superfície basal das placas, que se liga através da lâmina basal às fibras musculares por intermédio das máculas aderentes (PAN, 1980).

Os corpos celulares das cristas epidérmicas não ciliadas localizam-se na extremidade posterior do miracídio e estão unidos a elas por pontes citoplasmáticas. Essas células possuem, em média, de dois a três núcleos redondos com nucléolos proeminentes. Ao redor do núcleo, encontram-se organelas, como o retículo endoplasmático rugoso (RER) e o aparelho de Golgi. Um número considerável de mitocôndrias está presente na periferia dos RERs. O citoplasma dessas células, relativamente denso em elétrons, é preenchido por partículas de glicogênio e vesículas associadas à membrana. Tais vesículas parecem estar relacionadas ao armazenamento de membrana para produção do tegumento na transformação do miracídio em esporocistos primários (PAN, 1980).

A porção anterior da larva exibe uma estrutura chamada *terebratorium* ou papila anterior, que é bem característica nas diferentes espécies de *Schistosoma* (Fig. 4D). O *terebratorium* de *S. mansoni* se assemelha a um favo de mel visto por microscopia eletrônica de varredura e constitui-se de um aglomerado de expansões citoplasmáticas entrelaçadas, como pequenas ventosas que facilitam a fixação dessa fase larval no molusco (EKLU-NATEY *et al.*, 1985; LOVERDE, P.T., 1975; PAN, 1980). A papila anterior apresenta pelo menos 12 receptores sensoriais em sua superfície, além de três aberturas de glândulas, sendo que duas delas situam-se na sua base, próximo à primeira camada de placas epidérmicas (PAN, 1980).

Essas três glândulas unicelulares que abrem no *terebratorium* ocupam um volume considerável da extremidade dianteira do miracídio que antecede a massa neural (Fig. 4A e Fig. 4B). Todas elas, uma glândula apical e duas laterais, incluem um corpo celular e um ducto secretório. A glândula apical possui quatro núcleos de forma irregular envolvidos por ribossomos livres e por RERs. Seu citoplasma é repleto de gotículas secretórias redondas, associadas à membrana e de tamanhos distintos, além de partículas de glicogênio, aparelhos de Golgi e mitocôndrias. As duas glândulas laterais exibem uma composição muito parecida com a da glândula apical, entretanto, compreendem apenas um núcleo redondo cada e suas gotas secretórias são menores e menos densas em elétrons (PAN, 1980). A coloração desse estágio de vida com PNA

evidencia essa heterogeneidade, por mostrar uma diferença na quantidade de lectinas das glândulas apical e laterais (COLLINS *et al.*, 2011).

O tecido muscular do miracídio é constituído por uma camada longitudinal interna, e uma camada circular externa, que contorna praticamente todo o corpo do parasito (Fig. 4C) (PAN, 1980). As miofibrilas da camada longitudinal se apresentam como seis fitas de aproximadamente 2,4-4,3 μm de largura, que confluem na metade posterior da larva. As fibras musculares da camada circular, por sua vez, possuem 1 μm de espessura e estão a 1,4 μm de distância umas das outras (BAHIA *et al.*, 2006). Uma zona fibrilar externa e uma zona afibrilar interna compõem a miofibrila. A zona fibrilar consiste dos filamentos finos e grossos, enquanto que a zona afibrilar abrange o núcleo oval com nucléolo pequeno e com pouca heterocromatina, várias mitocôndrias, gotículas lipídicas e partículas de glicogênio. O retículo sarcoplasmático encontra-se preferencialmente nos arredores das fibras musculares (PAN, 1980).

Essa fase larval não se alimenta no ambiente aquático e pelo menos 20 células parecem manter seu estoque de energia (PAN, 1980; WALKER, 2011). As células intersticiais, como são chamadas, estão localizadas entre os corpos celulares das cristas epidérmicas não ciliadas e abaixo do anel neural. Delas prolongam-se processos que permeiam as células germinativas, as células-flama e os túbulos excretores, os nervos e os neurônios. Essas células de formato irregular apresentam um núcleo pequeno e um citoplasma contendo RERs, ribossomos, muitas mitocôndrias, partículas de glicogênio e gotas lipídicas. Evidências de que manchas dos RERs estendem dos processos das células intersticiais, somadas à presença de organelas e moléculas ligadas à produção de energia, reforçam a função dessas células (PAN, 1980).

O sistema excretor do miracídio compreende dois pares de células-flama formados, cada unidade, por um corpo celular, no qual fica o núcleo achatado, e um cilindro oco que circunda inúmeros cílios (Fig. 4C) (BAHIA *et al.*, 2006; PAN, 1980). O cilindro oco provavelmente corresponde aos túbulos ricos em actina, preenchidos com tubulina, mencionados por BAHIA (2006) e colaboradores. Das células-flama emergem, de cada lado do corpo da larva, os túbulos excretores, que convergem no túbulo comum. Esses vão ao encontro das vesículas excretoras que, por sua vez, terminam nos dois poros excretores posicionados à mesma distância nas cristas entre as placas da terceira camada (EKLU-NATEY *et al.*, 1985; PAN, 1980).

O sistema nervoso central desse estágio de vida é composto por uma camada de neurônios de pequenos núcleos ovoides, que englobam axônios e dendritos para formar a massa ou anel neural (Fig. 4B e Fig. 4C) (COLLINS *et al.*, 2011; PAN, 1980). Surpreendentemente, essa massa neural corresponde a cerca de 10% do volume do parasito (PAN, 1980). Adicionalmente, o sistema nervoso apresenta alguns cordões nervosos localizados na porção anterior da larva e outros dois na extremidade posterior, sendo eles um cordão dorsal e outro ventral (COLLINS *et al.*, 2011). Vesículas sinápticas neurosecretoras de tamanhos e composições diferentes (tipos A, B, C e D) e organelas sensoriais também fazem parte desse sistema (PAN, 1980).

Segundo PAN (1980), existem seis tipos de organelas sensoriais, que são: terminação nervosa “cova-profunda” multiciliada, terminação nervosa uniciliada, papila lateral, organela sensorial sacular multiciliada, terminação nervosa “cova-rasa” multiciliada e papila sensorial multiciliada. As duas primeiras encontram-se no *terebratorium*, em número de quatro e oito (no mínimo), respectivamente (PAN, 1980). EKLUNATEY (1985) e colaboradores relataram de 10-12 receptores uniciliados na papila anterior do miracídio de *S. mansoni*. Duas papilas laterais localizam-se, simetricamente, na crista do anel anterior e à frente de uma terminação nervosa uniciliada (EKLUNATEY *et al.*, 1985; PAN, 1980). Entre a papila lateral e a organela sensorial sacular multiciliada, posiciona-se uma terminação nervosa “cova-rasa” multiciliada. Por volta de 12 papilas sensoriais multiciliadas situam-se no anel médio (PAN, 1980).

Na porção posterior dessa fase larval, as células germinativas ostentam um núcleo oval de 3 μm ocupando uma fração significativa da célula, que tem aproximadamente 5 μm de diâmetro e está embebida pelo citoplasma rico em ribossomos e mitocôndrias, além de alguns aparelhos de Golgi, RERs e partículas de glicogênio (Fig. 4E) (PAN, 1980). Morfologicamente, essas células se assemelham, em alguns aspectos, aos neoblastos das planárias. Embora existam controvérsias quanto à capacidade de regeneração dos vermes amputados, tal como ocorre com as planárias, as células germinativas possuem em comum algumas proteínas dos neoblastos, como as proteínas da família das argonautas e proteínas *Vasa-like*. Ao que tudo indica, existem dois grupos de células germinativas nos esporocistos-mãe (*nanos*⁺ e *nanos*⁻) que ou estão envolvidas com a diferenciação dos esporocistos ou que desempenham sua função como células-tronco (WENDT; COLLINS, 2016). Sendo assim, essas células serão

responsáveis pelo encadeamento do ciclo, uma vez que a presença de muitos ribossomos em seu citoplasma viabilizará a síntese proteica para a produção assexuada dos esporocistos (PAN, 1980).

1.4 Genoma, transcriptoma e proteoma de *S. mansoni*

Com o intuito de investigar novos alvos terapêuticos para o tratamento da doença, desenvolver vacinas e propor testes diagnósticos melhorados, a OMS iniciou, em 1994, o Projeto Genoma do *Schistosoma* (BALKOM *et al.*, 2005; HU *et al.*, 2004; LOVERDE, Philip T. *et al.*, 2004). Nesse ano, aconteceu o primeiro encontro da SGN (*Schistosome Genome Network*), que listou algumas propostas que iriam viabilizar uma melhor compreensão da organização do genoma do *Schistosoma*, bem como proporcionar a base molecular da interação parasito-hospedeiro e, assim, possivelmente alcançar esse objetivo. Entre elas, estava catalogar novos genes do parasito, criar bancos de dados acessíveis ao público e desenvolver a bioinformática (BALKOM *et al.*, 2005; LOVERDE, Philip T. *et al.*, 2004).

Esse evento foi o estopim para o surgimento de trabalhos que visassem o sequenciamento do genoma, transcriptoma e proteoma do parasito e foi nesse contexto que surgiu o primeiro estudo do transcriptoma do *S. mansoni*, publicado em 1995. FRANCO (1995) e colaboradores construíram uma biblioteca de cDNA de vermes adultos, da qual foram obtidas 607 ESTs (*Expressed Sequence Tags*) a partir de 429 clones diferentes. Dos 169 genes encontrados, 15 correspondiam a genes já identificados e outros 154 representavam genes novos (FRANCO *et al.*, 1995; LOVERDE, Philip T. *et al.*, 2004; WILSON *et al.*, 2006).

Alguns anos depois, em 2003, foram disponibilizados dois bancos de dados de transcriptoma, um para o *S. mansoni* (VERJOVSKI-ALMEIDA *et al.*, 2003) e outro para o *S. japonicum* (HU *et al.*, 2003), representando um progresso para a pesquisa em proteômica do *Schistosoma* (VERJOVSKI-ALMEIDA; DEMARCO, 2008). Desse primeiro trabalho, realizado por um consórcio brasileiro, foram obtidas 163.586 ESTs para o transcriptoma de *S. mansoni*, das quais 151.684 foram produzidas utilizando minibibliotecas de ORESTES dos seis estágios do ciclo biológico do parasito, enquanto os 11.902 *reads* restantes resultaram da biblioteca normalizada de cDNA do verme adulto. Após filtrarem esses dados, um número total de 30.988 ESTs foram montadas, o

que os autores imaginaram corresponder a aproximadamente 92% do transcriptoma (HU *et al.*, 2004; VERJOVSKI-ALMEIDA *et al.*, 2003; WILSON *et al.*, 2006).

No ano seguinte, foi publicada a primeira análise do proteoma do *Schistosoma*, utilizando quatro fases do ciclo de vida do parasito. Essa abordagem consistiu na separação por eletroforese bidimensional das proteínas solúveis de cercárias, esquistossômulos, vermes adultos e ovos de *S. mansoni*, que eram, até o momento, preparações antigênicas testadas em laboratório. Dos 40 *spots* mais abundantes selecionados para cada amostra, foram identificadas 32 proteínas distintas. A composição das quatro amostras, por sua vez, não apresentou diferença significativa, o que revelou uma necessidade de buscar proteínas que sejam verdadeiramente específicas de estágio para a efetividade dos ensaios imunológicos (CURWEN, Rachel S. *et al.*, 2004).

Em 2005, dois estudos proteômicos abordando outra estrutura/característica do *S. mansoni* foram publicados. O primeiro em maio, referindo-se à análise do subproteoma do tegumento (BALKOM *et al.*, 2005), e o segundo em agosto, discorrendo a respeito da análise proteômica das secreções das cercárias (KNUDSEN, 2005). BALKOM (2005) e colaboradores isolaram o tegumento dos vermes, separaram suas proteínas por eletroforese unidimensional SDS-PAGE e, após a digestão trípica, os peptídeos obtidos foram submetidos à cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas para as análises em *tandem*. De um total de 740 proteínas identificadas, considerando as amostras do tegumento e do “restante” do verme, 43 correspondiam a proteínas específicas do tegumento (BALKOM *et al.*, 2005).

Dois métodos diferentes foram utilizados pelo grupo de KNUDSEN (2005) para a obtenção das secreções cercarianas. Em um dos métodos, as secreções das cercárias foram liberadas em resposta ao estímulo dos lipídeos da pele humana, mimetizando o estímulo biológico. Foram encontradas 72 proteínas, as quais estavam envolvidas em processos como a regulação e ligação de cálcio, a via glicolítica e as três isoformas da elastase. O outro método alternativo consistiu na indução da secreção pela transformação mecânica das larvas. Constatou-se a presença de 85 proteínas, dentre elas as três isoformas da elastase, as proteínas motoras, as proteínas do choque térmico e as proteínas do citoesqueleto. Assim como no trabalho supracitado, as proteínas de ambas

as amostras foram separadas por SDS-PAGE, digeridas e analisadas por LC-MS/MS (KNUDSEN, 2005).

Passados dois anos, foram disponibilizados os proteomas da transformação larval de dois parasitos do molusco da espécie *B. glabrata*: *S. mansoni* e *Echinostoma caproni*. As proteínas liberadas nas primeiras 24 h da transformação em cultura do miracídio a esporocisto-mãe foram separadas por eletroforese bidimensional. A partir das análises nanoLC-MS/MS dos 25 *spots* mais abundantes para *S. mansoni*, foram identificadas sete proteínas envolvidas em funções metabólicas, na eliminação de espécies reativas de oxigênio e com a ligação de cálcio (GUILLOU *et al.*, 2007; WU, X.-J. *et al.*, 2009).

Ainda em 2007, foi publicada a análise proteômica das secreções dos ovos do *Schistosoma*, utilizando, pela primeira vez para *S. mansoni*, proteômica MudPIT (*Multidimensional Protein Identification Technology*). Para obtenção das identidades, os peptídeos das proteínas secretadas pelos ovos foram submetidos a uma cromatografia de troca iônica, seguida por uma cromatografia de fase reversa, acoplada ao espectrômetro de massas. As análises LC/LC-MS/MS forneceram 188 proteínas, das quais 32 representavam proteínas ainda não caracterizadas. Essas estavam associadas, de uma maneira geral, a produção de energia, a sinalização celular e a manutenção do balanço redox (CASS *et al.*, 2007).

Finalmente, no ano de 2009, foi concluída a montagem do genoma *draft* de *S. mansoni* (PROTASIO *et al.*, 2012). O sequenciamento *shotgun* do genoma total das cercárias gerou 5.745 *scaffolds* e, pelo menos, 11.809 genes putativos, codificando 13.197 transcritos, foram identificados. Do genoma nuclear de 363 Mb, 40% foram representadas por sequências repetitivas, 43% corresponderam aos oito cromossomos de *S. mansoni* (um sexual e sete autossomos), 15% da montagem do genoma foi atribuída às repetições terminais longas (LTR) e 5% aos transposons não-LTR (BERRIMAN *et al.*, 2009). A sequência genômica de *S. japonicum* foi disponibilizada nesse mesmo ano (ZHOU, Y. *et al.*, 2009), enquanto que o genoma de *S. haematobium* foi publicado só em 2012 (YOUNG, N. D. *et al.*, 2012).

Em 2010, uma análise comparativa do proteoma do ovo, utilizando uma abordagem diferente daquelas mencionadas acima, foi publicada por MATHIESON; WILSON (2010). Os autores propuseram uma metodologia de separação dos ovos

imaturos e maduros em gradiente de Percoll e fracionamento dos ovos completamente desenvolvidos em miracídios, proteínas secretadas dos ovos e “*hatch fluid*”, que seria o fluido presente entre a casca do ovo e o envelope de von Lichtenberg e entre o envelope e o miracídio. Para isso, as proteínas solúveis das cinco amostras foram separadas por eletroforese 2D. As três principais categorias encontradas para as quatro amostras, com exceção das proteínas secretadas, foram, em ordem decrescente de nível de expressão, as chaperonas, as proteínas motoras e as proteínas do metabolismo energético. As secreções foram atribuídas às múltiplas isoformas de um número pequeno de proteínas (MATHIESON; WILSON, 2010).

Dando continuidade ao estudo das frações proteicas do ovo, alguns pesquisadores sentiram a necessidade de estudar o esqueleto insolúvel desse estágio de vida do parasito. Nesse trabalho, os ovos foram lavados em quatro etapas com reagentes de solubilidades diferentes e os peptídeos trípticos oriundos da digestão *in-gel* foram analisados por cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas. Das 118 proteínas imediatamente identificadas após o isolamento da casca do ovo, somente 45 persistiram até a etapa final de purificação. Surpreendentemente, a maior parte das identidades eram proteínas não estruturais e não específicas do ovo (DEWALICK *et al.*, 2011).

Em janeiro de 2016 foi publicada a análise proteômica do miracídio de *S. mansoni*. WANG, T. (2016) e colaboradores utilizaram um protocolo de purificação dos ovos empregando colunas Percoll, com o intuito de minimizar as contaminações oriundas do hospedeiro vertebrado. Os ovos isolados foram incubados em água ultrapura, condicionada com carbonato de cálcio por duas horas e as proteínas extraídas dos miracídios eclodidos foram submetidas à eletroforese unidimensional. As análises LC-MS/MS forneceram 1.910 identidades, entre proteases, proteínas VAL – *Venom Allergen-Like*, receptores e proteínas envolvidas com o metabolismo energético (WANG, T. *et al.*, 2016).

Evidentemente, nesse intervalo de tempo, outras pesquisas foram desenvolvidas abordando o proteoma do tegumento (CASTRO-BORGES, William *et al.*, 2011) e das secreções cercarianas de *S. mansoni* (CURWEN, R. S., 2006), por exemplo, além de trabalhos proteômicos envolvendo o *S. japonicum* (CHENG *et al.*, 2005). Entretanto, foram evidenciados acima os estudos pioneiros de cada fase do ciclo biológico de *S.*

mansoni. Sendo assim, pouco se sabe em termos proteômicos sobre a fase larval do miracídio. Os dados disponíveis na literatura referem-se, principalmente, à morfologia desse estágio de vida, possivelmente devido à dificuldade de se obter grandes quantidades de amostra.

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi aumentar o repertório de proteínas conhecidas do miracídio de *S. mansoni*, mediante caracterização proteômica em larga escala dos extratos solúvel e de membrana da larva. Os resultados dessa abordagem agregam conhecimento à biologia desses animais e respaldam a elucidação dos mecanismos de adaptação do parasito ao hospedeiro e à variação das condições ambientais. Espera-se que o presente estudo possa contribuir, futuramente, para a elaboração de estratégias capazes de interromper o ciclo do *Schistosoma* ainda dentro do ovo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar o proteoma do miracídio de *S. mansoni* em larga escala utilizando metodologia de análise proteômica.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a composição proteica da fração solúvel do miracídio de *S. mansoni*;
- Determinar a composição proteica do extrato de membrana do miracídio;
- Categorizar as proteínas de ambas as frações por meio de ferramentas de bioinformática;
- Quantificar as proteínas solúveis e de membranas dessa larva por espectrometria de massas;
- Identificar proteínas relacionadas ao sistema nervoso do parasito.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Declaração de ética para manuseio de animais

Todos os experimentos realizados com animais estavam de acordo com o protocolo n° 2011/55, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA/UFOP), preservando a integridade e o bem-estar deles conforme as orientações do comitê. No decorrer do experimento, os camundongos foram mantidos em microisoladores com ambiente climatizado (18-26°C) e períodos de luz de 12 horas/24 horas, recebendo água filtrada e ração à vontade.

3.2 Obtenção da fase larval miracídio de *S. mansoni*

Para a infecção com *S. mansoni* e obtenção do miracídio, camundongos da linhagem BALB/c (*Mus musculus*) foram fornecidos pelo Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CCA/UFOP), campus Ouro Preto, com cerca de quatro a cinco semanas de nascimento e pesando de 20,0 a 25,0 g. Inicialmente, os animais receberam anestesia por administração via intraperitoneal de cloridrato de xilazina 20,0 mg/kg e cloridrato de cetamina 80,0 mg/kg. Quando em analgesia, tiveram suas caudas mergulhadas em água, a fim de facilitar a penetração das cercárias. Em seguida, foram posicionados em decúbito ventral com a cauda envolvida em anel de aço inoxidável (1,9 cm de diâmetro externo, 1,7 cm de profundidade), previamente vedado em uma das extremidades por uma fita adesiva. Cercárias de *S. mansoni* da linhagem LE, gentilmente cedidas pelo Laboratório de Malacologia do Centro de Pesquisas René Rachou – Fundação Oswaldo Cruz (CPqRR/FIOCRUZ), em Belo Horizonte, foram diluídas em água filtrada e 2 mL dessa solução, contendo 250 cercárias, foram adicionados aos anéis. A exposição ao parasito durou 30 minutos.

Aproximadamente 45 dias após a infecção, os camundongos foram eutanasiados por administração via intraperitoneal de cloridrato de xilazina a uma dose de 60,0 mg/kg e cloridrato de cetamina a uma dose de 240,0 mg/kg. O sistema porta-hepático dos animais foi perfundido com meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), contendo HEPES 20 mM (Sigma-Aldrich) e 4 U/mL de heparina, segundo descrito por SMITHERS; TERRY (1965), com algumas modificações. Os fígados foram extraídos para processamento com auxílio de um liquidificador, na presença de Na₂HPO₄ 0,895% (p/v) e KH₂PO₄ 0,045% (p/v), pH 8,3 (Fig. 5). Em seguida, adicionou-se 20,0 mg de tripsina (*Trypsin from porcine pancreas* tipo IX-S – Sigma-Aldrich) a cada dez fígados. O homogenato

foi mantido a 37°C, sob agitação, por cerca de três horas. Os ovos foram recolhidos por tamisação da mistura em peneiras de 50 *mesh* e 80 *mesh* e decantados em gral, com movimentos circulares, em solução de NaCl 0,85% (p/v). Posteriormente, eles foram lavados nessa solução e, finalmente, incubados em água filtrada à temperatura ambiente, na presença de luz e oxigênio, por volta de uma hora. Essa incubação foi realizada em um balão volumétrico de 100 mL, envolto em parte por um papel preto, de forma que aproximadamente 2,0 cm do recipiente ficassem expostos à luz, criando um gradiente de luz e forçando a localização das larvas na sua parte superior. Os miracídeos liberados pela eclosão dos ovos foram transferidos para um tubo tipo falcon de 15 mL e submetidos a um banho de gelo para decantação. O excesso de água foi retirado, os miracídeos foram transferidos para microtubos, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -20°C para uso posterior.

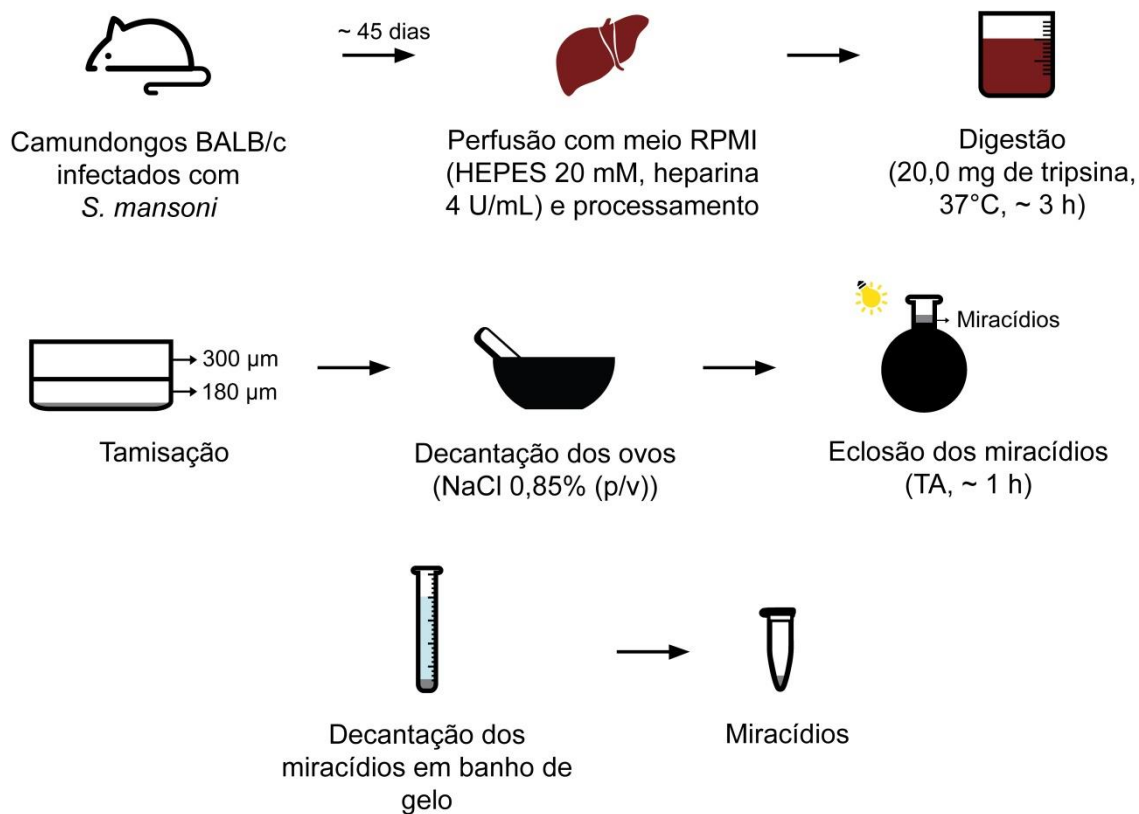


Figura 5: Fluxo de trabalho para a obtenção da larva. São representadas desde a etapa inicial de infecção dos camundongos até a obtenção dos miracídeos de *S. mansoni*. TA: Temperatura Ambiente.

3.3 Preparação das frações proteicas do miracídio

3.3.1 Extração das proteínas solúveis

Miracídios, provenientes de ovos de 19 fígados de camundongos infectados com *S. mansoni*, foram utilizados para produção do extrato proteico solúvel por sonicação em tampão contendo Tris-HCl 25 mM pH 7,5, DTT 1 mM e PIC P8340 1% (v/v) (Sigma-Aldrich) (Fig. 6). Foram realizados dois ciclos de 30 pulsos (100 ms) em banho de gelo, *output control* 5, utilizando o Branson Sonifier 250 (Branson Ultrasonics), com intervalo de 1 min entre as séries. Em seguida, a preparação foi submetida a uma centrifugação a 20.000 x g, a 4°C, durante 90 min e o sobrenadante recolhido e armazenado a -20°C para análises subsequentes.

3.3.2 Recuperação da fração de membrana

Para a obtenção da fração de membrana, repetiu-se o procedimento descrito em 3.3.1, porém, os miracídios utilizados para esse fim eram oriundos de ovos de 30 fígados de camundongos infectados (Fig. 6). O *pellet* remanescente da centrifugação foi, portanto, ressuspensionado na presença de Tris-HCl 25 mM pH 7,5, DTT 1 mM e PIC P8340 1% (v/v) (Sigma-Aldrich), além de homogeneizado em banho de gelo, utilizando o Branson Sonifier 250 (Branson Ultrasonics) em uma série de 20 pulsos (100 ms), *output control* 5. O homogenato foi imediatamente centrifugado a 20.000 x g, a 4°C, por 90 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* armazenado a -20°C até a sua utilização.

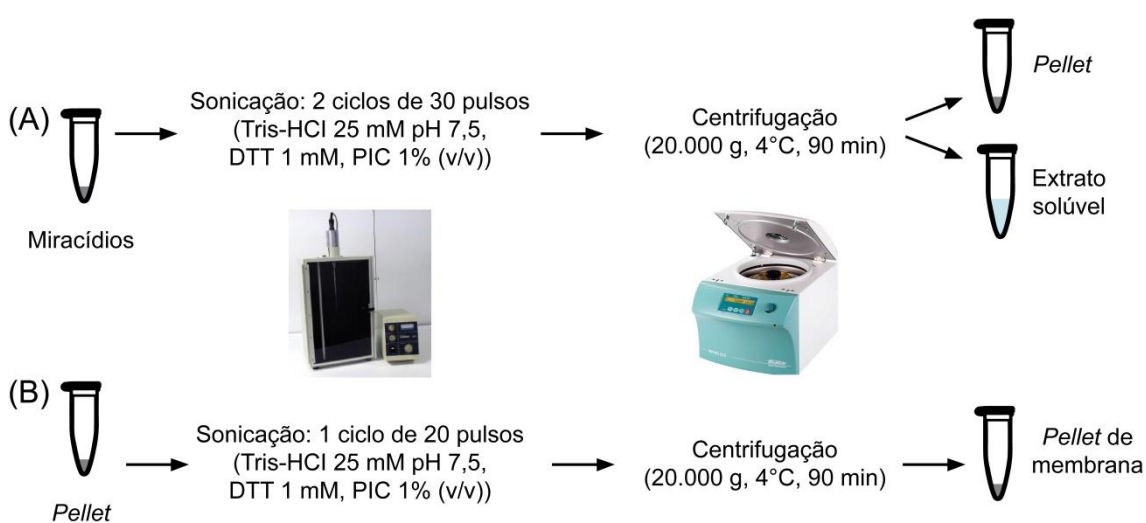


Figura 6: Procedimentos demonstrando a separação do extrato solúvel (A) e do *pellet* de membrana (B). O recolhimento da fração de membrana foi proporcionado por uma segunda centrifugação do *pellet* resultante da centrifugação da fração solúvel.

3.4 Eletroforese unidimensional (SDS-PAGE)

Primeiramente, determinou-se a concentração das proteínas totais da fração solúvel pelo método do ácido bicinconínico, utilizando o Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) e albumina bovina como padrão, conforme as recomendações dos fabricantes. A fim de avaliar a qualidade e integridade das amostras, géis de poliacrilamida unidimensionais (8,0 cm x 10,0 cm x 0,1 cm) foram confeccionados em condições desnaturantes, segundo descrito por LAEMMLI (1970), sendo que os géis de separação e de concentração continham 12% e 5% de poliacrilamida/bis-acrilamida, respectivamente.

Alíquotas de 22,5 µg do extrato solúvel e de 8,0 µg do extrato de membrana do miracídio foram diluídas em tampão de amostra (Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8, SDS 2% (p/v), glicerol 10% (v/v), DTT 100 mM e azul de bromofenol 0,001% (p/v)), para, na sequência, serem fervidas a 100°C por 5 min, garantindo, assim, a desnaturação proteica. As amostras e o padrão de massa molecular (14,4-116,0 kDa) foram aplicados aos géis e prosseguiu-se a corrida eletroforética a uma corrente constante de 20 mA/gel, utilizando o tampão de corrida contendo Tris 0,025 M pH 8,3, glicina 0,192 M e SDS 0,1% (p/v).

3.5 Coloração por Coomassie coloidal

Ao término da corrida eletroforética, os géis SDS-PAGE foram fixados em solução de ácido ortofosfórico 2% (v/v) e etanol 30% (v/v) perfazendo três incubações, sendo a primeira por aproximadamente 16 h e as duas subsequentes com duração de 30 min. Em seguida, os géis foram incubados por três vezes na presença de ácido ortofosfórico 2% (v/v), cada incubação com duração de 10 min. Adicionou-se, logo depois, uma solução contendo ácido ortofosfórico 2% (v/v), etanol 18% (v/v) e sulfato de amônio 15% (p/v), sendo os géis mantidos nessas condições por 30 min. A etapa de coloração se deu em solução com a mesma composição da etapa anterior, porém acrescida de Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich) a 0,02% (p/v). A revelação procedeu-se até a intensidade desejada de visualização das bandas e foi interrompida pela lavagem dos géis em etanol 20% (v/v). Todas as etapas supracitadas foram feitas sob agitação e os géis foram escaneados pelo ImageScanner III (GE Healthcare).

A partir da digitalização do gel, foi possível determinar a concentração da fração de membrana do miracídio pela análise densitométrica utilizando o *software* Quantity One v.4.6.9 (BioRad) e a concentração da fração solúvel, obtida de acordo com 3.4 como referência.

3.6 Digestão em solução do extrato solúvel

Para digestão triptica do extrato solúvel do miracídio, diluiu-se cerca de 45,0 µg de proteínas em NH_4HCO_3 100 mM. A redução das proteínas em suas pontes dissulfeto ocorreu na presença de DTT 4 mM, a 56°C durante 15 min. Transcorrido esse tempo, a mistura foi incubada em solução de iodoacetamida 8 mM à temperatura ambiente por mais 15 min, ao abrigo da luz, para alquilação das proteínas reduzidas. Em seguida, a solução foi diluída em 125 µL de água ultrapura e bicarbonato de amônio reajustado para concentração final de 100 mM. A digestão enzimática foi proporcionada pela adição de tripsina (*Sequencing Grade Modified Trypsin, Porcine* – Promega) na razão de 1: 25 (enzima/substrato) a 37°C, por um período de 20 h. A reação foi interrompida pela adição de 10 µL de ácido acético glacial (J. T. Baker).

Os peptídeos foram extraídos em fase sólida por fase reversa em um cartucho Strata C18-E (55 µm, 70 Å – Phenomenex), previamente tratado com acetonitrila 80% (v/v) e equilibrada com ácido fórmico 0,1% (v/v). A eluição dos peptídeos foi promovida por uma solução de acetonitrila 50% (v/v) e ácido fórmico 0,1% (v/v), sendo concentrados com o auxílio de um liofilizador. Os peptídeos foram ressuspensos em solução de ácido trifluoroacético 0,1% (v/v) (Sigma-Aldrich).

3.7 Digestão em solução do proteoma do miracídio utilizando surfactante

Ambos os extratos foram submetidos à digestão em solução, utilizando detergente ácido-lábil para favorecer a solubilização das proteínas de membranas, sem interferir na atividade da tripsina (Fig. 7). Para isso, cerca de 40,0 µg de proteínas solúveis e 30,0 µg de proteínas de membranas foram diluídas em uma solução estoque de NH_4HCO_3 25 mM à temperatura de 4°C, até atingirem o volume final de 160 µL. Em seguida, adicionou-se RapiGest SF (Waters) 0,1% (p/v) à mistura, que permaneceu a 80°C por 10 min. Na sequência, as proteínas foram reduzidas na presença de DTT 3 mM, a 60°C, durante 10 min e alquiladas em solução de iodoacetamida 9 mM, à temperatura ambiente, por mais 45 min, ao abrigo da luz. A digestão foi proporcionada

pela enzima tripsina (*Sequencing Grade Modified Trypsin, Porcine* – Promega), na proporção de 1:50 (enzima/substrato) a 37°C, por aproximadamente 17 h.

A reação foi interrompida pela adição de ácido trifluoroacético 0,4% (v/v) (Sigma-Aldrich). Após a confirmação da acidificação das amostras em uma fita de pH, elas foram incubadas a 37°C por 45 min. Logo depois, foram centrifugadas a 20.000 x g, por 15 min, a 7°C. Os sobrenadantes foram transferidos para microtubos novos e submetidos a uma segunda centrifugação sob as mesmas condições. O sobrenadante de cada fração foi recolhido e transferido para novos microtubos, para posterior análise via nanocromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.

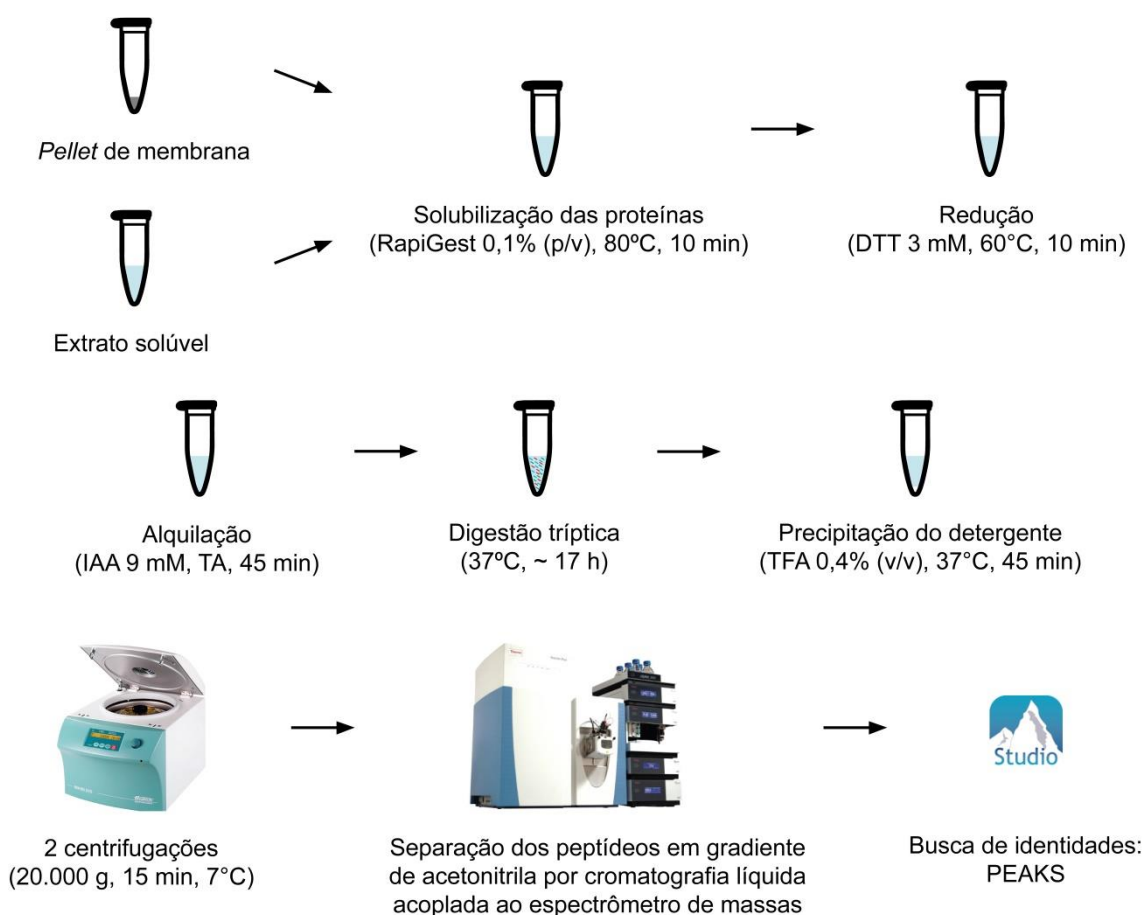


Figura 7: Delineamento experimental ilustrando a digestão enzimática das proteínas solúveis e de membrana do miracídio. Utilizou-se RapiGest SF para facilitar a solubilização das proteínas hidrofóbicas, em especial, das proteínas de membranas. IAA: iodoacetamida, TA: Temperatura Ambiente, TFA: ácido trifluoroacético.

3.8 Análises MS/MS

500,0 ng de peptídeos tripticos – replicatas técnicas, oriundos da digestão do proteoma solúvel (4 amostras) e de membrana (3 amostras) do miracídio (item 3.7),

foram injetados em um cromatógrafo de ultra eficiência UltiMate 3000 UHPLC system (Thermo Scientific), equipado com um nano-trap C18 Acclaim PepMap100 (75,0 $\mu\text{m} \times 2,0 \text{ cm}$, 3,0 μm , 100 \AA – Thermo Scientific) e uma coluna C18 RSLC Acclaim PepMap100 (75,0 $\mu\text{m} \times 15,0 \text{ cm}$, 2,0 μm , 100 \AA – Thermo Scientific), disponível no Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da UFOP (NUPEB/UFOP). O *trap* e a coluna foram mantidos a 40°C e os solventes utilizados para as análises eram grau HPLC para LC-MS adquiridos da J. T. Baker.

Os peptídeos foram eluídos em gradiente, utilizando-se dos solventes A: 0,1% de ácido fórmico (v/v) e solvente B: acetonitrila 80% (v/v) e ácido fórmico 0,08% (v/v). Iniciou-se o gradiente com 3,8% do solvente B, durante 3 min, aumentando, na sequência, para 30% ao longo de 117 min e para 55% nos outros 30 min. Posteriormente, aumentou-se o gradiente para 99%, após 2 min, permanecendo sob essas condições por mais 10 min, seguido da regeneração da coluna ao atingir 4% do solvente B ao longo de 2 min e mantendo nessa condição por 16 min.

Os peptídeos eluídos foram direcionados ao espectrômetro de massas Q-exactive (Thermo Scientific), equipado com uma fonte *nanospray* (*eleto*spray nanométrico), que permitiu a ionização da amostra por meio de um *emitter* de aço inoxidável, operando sob uma voltagem de 1,9 kV em modo positivo e com a temperatura do capilar de 250°C.

Conforme proposto por KELSTRUP (2012) e colaboradores, as varreduras dos íons precursores foram realizadas com uma resolução de 70.000, tempo máximo de injeção de 120 ms, acúmulo de 1×10^6 íons e janela de detecção de 300-1.750 m/z . Esses foram fragmentados por colisão com N_2 em uma cela HCD (*Higher-energy Collisional Dissociation*) e energia de colisão de $\sim 30\text{V}$. Espectros MS2 foram adquiridos dos doze íons mais abundantes, com resolução de 17.500 e tempo máximo de injeção de 60 ms, acumulando 5×10^5 íons, com janela de detecção de 200-2.000 m/z , janela de isolamento de 2 m/z e exclusão dinâmica de 60 s. Os íons de cargas não detectadas, os de carga 1 e os de carga ≥ 5 foram excluídos.

Para os peptídeos trípticos do extrato solúvel (item 3.6), as análises foram feitas sobre as mesmas condições, com as seguintes modificações: foram injetados 3,0 μg de peptídeos no cromatógrafo; iniciou-se o gradiente com 4% do solvente B, prosseguiu-se da mesma forma que anteriormente, até aumentar o gradiente para 90% do solvente B,

em vez de 99%; a voltagem do *emitter* foi de 2,8 kV; para o MS1, o tempo máximo de injeção foi de 100 ms, acúmulo de 3×10^6 íons e janela de detecção de 300-2.000 *m/z*; para o MS2, o tempo máximo de injeção foi de 150 ms, acumulando 2×10^5 íons; e, além dos íons de cargas 1 e os de carga não detectadas, exclui-se os íons de massa ≥ 6 .

3.9 Busca em banco de dados

3.9.1 Proteome Discoverer

Os espectros de massas obtidos a partir da fração solúvel, descrito em 3.6, foram analisados pelo *software* Proteome Discoverer v.1.4 (Thermo Scientific), por meio do algoritmo SequestHT, por combinar resultados de MS1 e MS2 com o banco de dados de proteômica de *S. mansoni* disponível no Laboratório de Enzimologia e Proteômica da UFOP (LEP/UFOP) – 10.777 sequências e 5.136.095 resíduos. O algoritmo realizou uma digestão *in silico*, utilizando padrões de digestão da tripsina (após cada K e R) com no máximo 2 sítios de clivagem perdidos; modificações pós-traducionais, como a oxidação de metionina dinâmica, carbamidometilação de cisteína fixa e acetilação do amino-terminal; tolerância de massa de 10 ppm para o precursor e 0,1 Da para fragmentos. Posteriormente, essa digestão *in silico* foi confrontada com os espectros experimentais obtidos. Os peptídeos identificados foram agrupados em graus de confiança e foi considerada admissível um taxa de falsa descoberta de 1%.

3.9.2 PEAKS

Partindo dos espectros de massas dos extratos solúvel e de membrana do miracídio (item 3.7), utilizou-se o *software* PEAKS Studio v.8.0 (Bioinformatics Solutions Inc.), empregando os parâmetros padrões para o sequenciamento DE NOVO e um filtro de qualidade dos espectros $> 0,65$. Para a busca de identidades, fez-se uso do banco de dados de proteômica de *S. mansoni* disponível no laboratório (10.780 sequências e 5.136.659 resíduos), segundo os parâmetros: enzima: tripsina; número máximo de perdas de sítios de clivagem: 2; modificações fixas: carbamidometilação da cisteína; modificações variáveis: oxidação da metionina e acetilação N-terminal; tolerância de massa de íons parentais: 10 ppm e tolerância de massa de íons fragmentados: 0,1 Da. A quantificação por *label free* ocorreu por meio dos seguintes parâmetros: tolerância de erro de massa: 10,0 ppm; tolerância de tempo de retenção: 3,0 min; taxa de falsa descoberta: 1%. Das proteínas identificadas, foram utilizadas para a

interpretação dos resultados aquelas que obedeceram tais condições: $fold \geq 1$; qualidade $\geq 0,5$; método de significância: ANOVA.

As análises dos proteomas solúvel e de membrana feitas separadamente utilizaram dos mesmos parâmetros acima para o sequenciamento DE NOVO e busca de identidades.

3.10 Avaliação dos parâmetros espectrométricos

Para avaliar a qualidade dos dados gerados pelo espectrômetro de massas, os dados *raw* de uma replicata técnica de cada uma das frações, obtidas de acordo com 3.7, foram analisados pelo RawMeat v.2.1 (Vast Scientific).

3.11 Categorização das proteínas e análises de bioinformática

A classificação preliminar das proteínas solúveis (item 3.6) foi fundamentada em pesquisas no GeneDB (<http://www.genedb.org/Homepage>), UniProt (<http://www.uniprot.org/>) e literatura publicada. Os valores de \log_2 das áreas (divididas por 10^6) dessas identidades, fornecidas pelo *software* Proteome Discoverer, foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, utilizando o GraphPad Prism v.6 para Windows.

Ao submeter os dados *raw* das replicatas técnicas do extrato solúvel e de membrana à busca contra o banco de dados pelo PEAKS, o *software* gerou uma lista de proteínas compreendendo todas as identidades presentes no somatório das frações e outra lista abrangendo aquelas diferencialmente expressas – *heatmap*. As sequências em formato FASTA dessa primeira lista foram carregadas no Blast2GO v.4.1 e submetidas a um BLAST local contra o banco de dados de *S. mansoni* do UniProt – *blood fluke* (13.041 sequências e 6.006.423 resíduos), utilizando o *E-value* de $1,0 \times 10^{-5}$, número de BLAST *hits* 5 e valores padrões para os parâmetros restantes. Esse procedimento foi necessário para encontrar a correspondência entre as entradas das proteínas do banco de dados de *S. mansoni* disponível no laboratório e do banco de *S. mansoni* do Uniprot, possibilitando, assim, a atribuição de termos GO (*Gene Ontology*) a essas identidades.

Logo depois, as proteínas resultantes dessa análise foram conduzidas a um BLAST local contra as sequências das frações obtidas individualmente (item 3.9.2), conforme os parâmetros seguintes: *E-value* $1,0 \times 10^{-100}$, número de BLAST *hits* 1 e valores padrões para os outros parâmetros. As proteínas daquela fração que não se alinharam com nenhuma sequência do proteoma total foram removidas, sendo um

segundo BLAST realizado entre as identidades remanescentes e o banco de dados do UniProt ($E\text{-value } 1,0 \times 10^{-5}$, número de BLAST *hits* 1 e valores padrões para os demais parâmetros). Isso possibilitou inferir quais proteínas pertenciam a cada extrato, especificamente. Finalmente, as proteínas totais, solúveis e de membrana geradas a partir dessas análises foram submetidas à busca de sequências relacionadas a motivos estruturais conhecidos, por meio do InterPro, para, em seguida, serem mapeadas e anotadas segundo os termos GO para componente celular, função molecular e processo biológico.

A fim de verificar a presença de hélices transmembrana nas sequências do *heatmap*, utilizou-se a versão da web do *software* TMHMM v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), aplicando os parâmetros padrões. Os peptídeos sinais preditos para essas proteínas foram determinados pelo servidor SignalP v.4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (PETERSEN *et al.*, 2011), empregando os parâmetros padrões.

4. RESULTADOS

4.1 Análise eletroforética e composicional do extrato solúvel do miracídio

Com o intuito de avaliar o perfil eletroforético e a integridade da amostra, o extrato obtido pela homogeneização, seguida de centrifugação da larva em tampão Tris contendo inibidores de proteases, foi analisado por SDS-PAGE. A separação das proteínas revelou um padrão de bandas bem definido, apresentando uma ampla faixa de massas moleculares. A presença de proteínas de alta massa, bem como a ausência de um acúmulo de bandas de baixa massa molecular, sugere que a preparação apresentou-se em bom estado de integridade (Fig. 8).

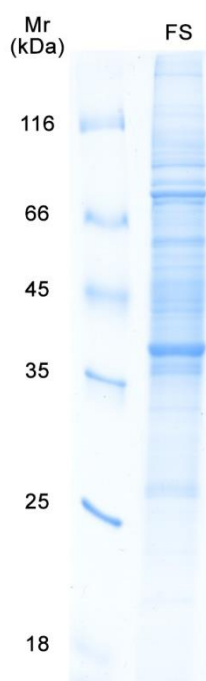


Figura 8: Gel de poliacrilamida unidimensional do extrato solúvel da larva. Separação das proteínas em poliacrilamida 12% e subsequente coloração por Coomassie coloidal. FS: Fração Solúvel.

Um total de 1.273 proteínas foi identificado pelo *software* Proteome Discoverer, como resultado da separação por cromatografia líquida de fase reversa e fragmentação dos peptídeos trípticos da fração solúvel no espectrômetro de massas. Desse total, 1.251 proteínas tiveram seus valores de área (estimados a partir da média dos três peptídeos mais abundantes) fornecidos pelo *software*. Com base nesses resultados, foi possível constatar que apenas um número pequeno de proteínas é relativamente abundante na amostra, ao passo que cerca de 1.120 sequências são pouco representativas (Fig. 9A).

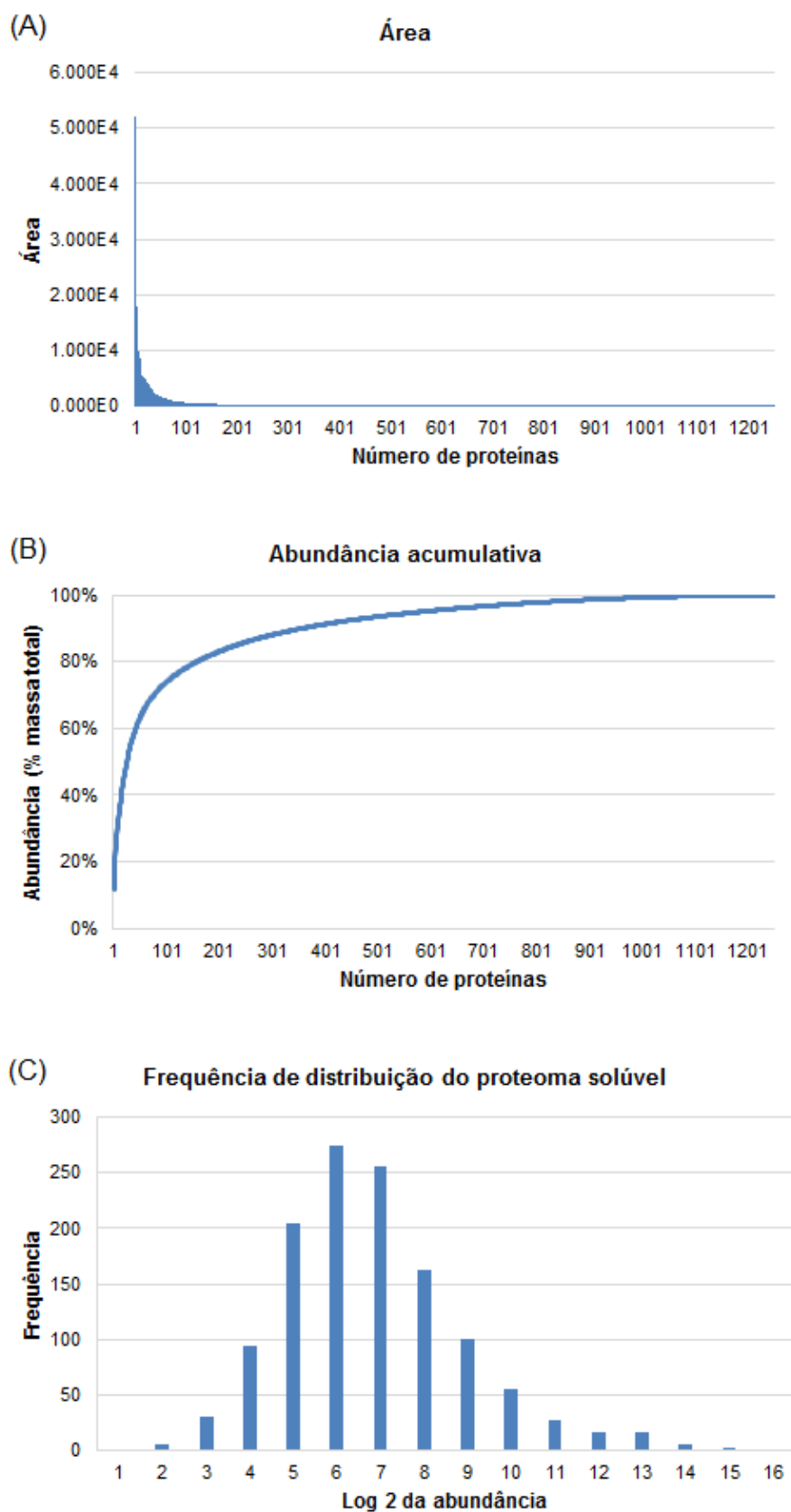


Figura 9: Distribuição das proteínas solúveis em Tris. (A) Número de proteínas associado ao seu valor de área dividido por 10^6 . (B) Abundância acumulativa do proteoma. (C) Frequência de distribuição calculada pelo \log_2 da área dividida por 10^6 .

A abundância acumulativa calculada a partir da porcentagem individual das identidades revelou que uma única proteína corresponde a aproximadamente 11% da massa total do proteoma solúvel do miracídio – *major egg antigen* (Tabela Suplementar 1). Além disso, 90% do proteoma é representado por 358 sequências (Fig. 9B). A frequência de distribuição das proteínas solúveis, determinada pela função logarítmica (base 2) das áreas divididas por 10^6 , evidentemente não apresenta uma distribuição normal, com $p = 0,0023$ (Fig. 9C).

As 358 proteínas mais abundantes do extrato foram classificadas de acordo com o processo biológico no qual estão inseridas (Fig. 10). As chaperonas representam a segunda classe mais abundante nesse estágio larval. Proteínas motoras e do citoesqueleto são igualmente numerosas (11%), assim como proteínas do metabolismo energético (10%), que inclui enolase, aldolase, citrato sintase, entre outras. Moléculas envolvidas com a biossíntese (6%) e catabolismo de proteínas (8%), metabolismo de carboidratos (3%), lipídeos (3%) e RNA (3%) também são encontradas na preparação.

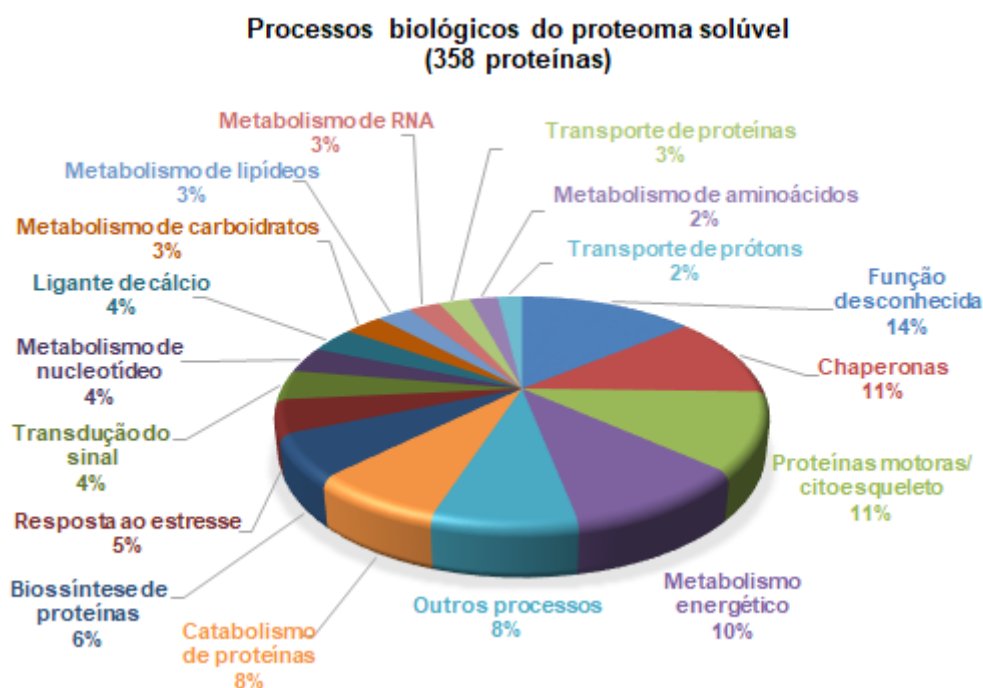


Figura 10: Categorização das 358 proteínas que correspondem a 90% do proteoma solúvel do miracídio. As proteínas foram classificadas e agrupadas segundo os processos biológicos nos quais estão envolvidas.

4.2 Avaliação eletroforética comparativa entre a fração solúvel e de membrana do miracídio e parâmetros espectrométricos para análise das frações por proteômica *shotgun*

Ao que se pode observar na Fig. 11, géis de poliacrilamida unidimensionais, confeccionados a partir das amostras da fração solúvel (Fig. 11A) e de membrana (Fig. 11B) do miracídio, tornam evidentes as diferenças das preparações, assegurando as análises que sucedem. É importante ressaltar que as proteínas de membranas foram obtidas por uma etapa adicional de sonicação e centrifugação, a fim de minimizar a contaminação com o extrato solúvel.

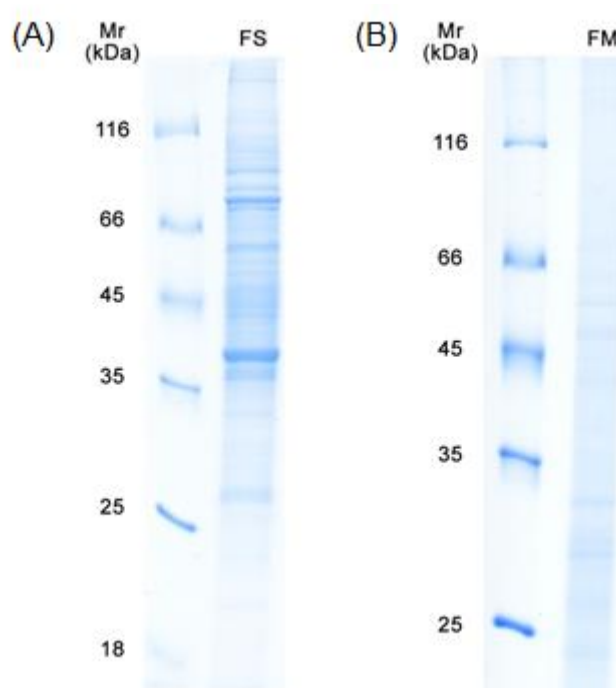


Figura 11: Géis SDS-PAGE da fração solúvel (A) e de membrana (B) da larva. Ambos os géis de poliacrilamida 12% foram corados com Coomassie coloidal. FS: Fração Solúvel, FM: Fração de Membrana.

O gráfico da Fig. 12 mostra a correlação da intensidade dos íons com o tempo de retenção, em minutos, da corrida cromatográfica de uma replicata técnica de cada fração. O perfil claramente distinto do extrato solúvel e de membrana, demonstrado no gráfico, é consistente com os resultados apresentados pela separação eletroforética de suas proteínas constituintes.

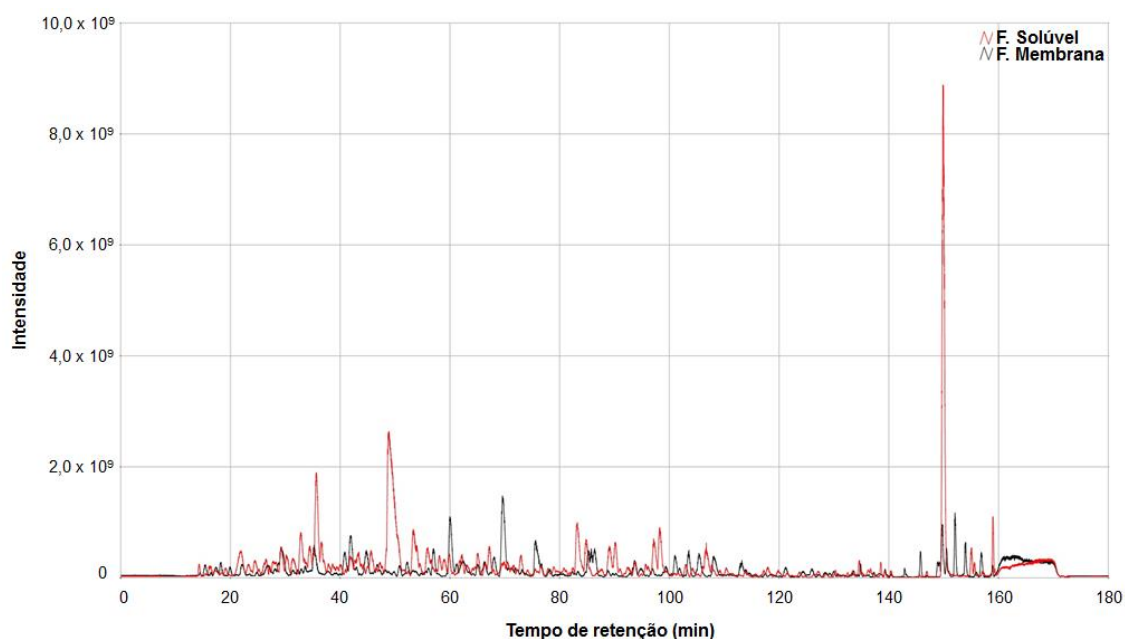


Figura 12: Cromatogramas *base peak* de uma amostra da fração solúvel e outra da fração de membrana. Nota-se que íons mais intensos em cada uma das preparações apresentam tempos de retenção distintos.

Até 12 íons mais intensos obtidos pela digestão trípica das proteínas de ambas as amostras foram selecionados para a fragmentação no espectrômetro de massas. Entretanto, a distribuição dos íons durante a cromatografia mostra que os espectros MS2 foram adquiridos, majoritariamente, dos quatro a seis íons mais abundantes, por predominarem em quase toda a corrida (Fig. 13).

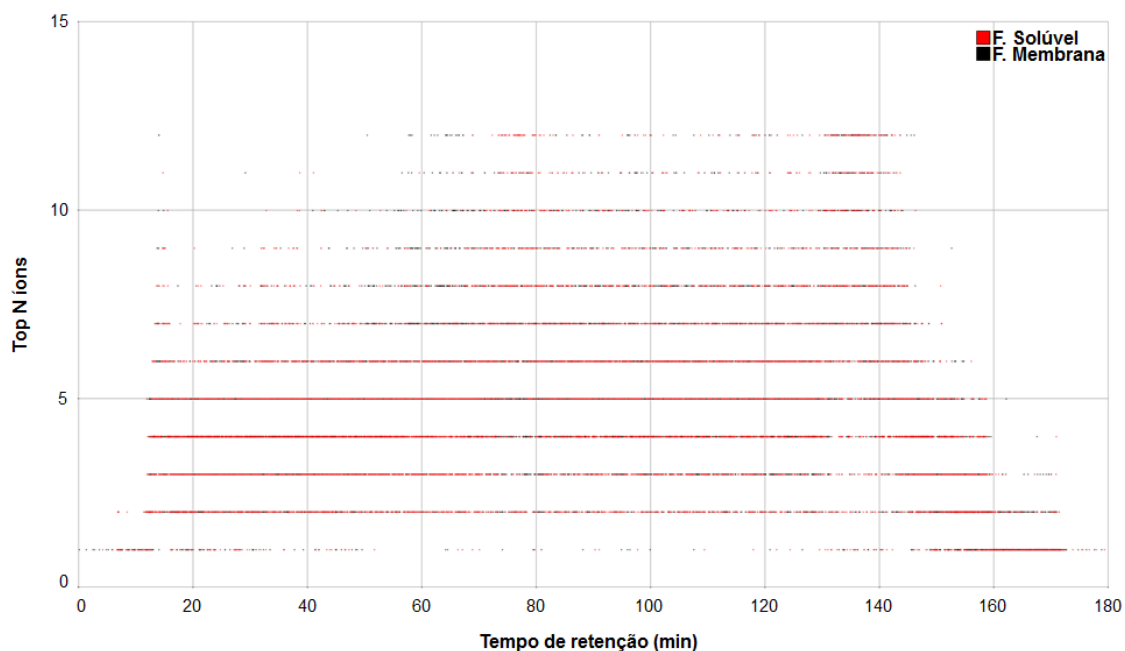


Figura 13: Top N íons de uma replicata técnica de cada preparação ao longo do gradiente. Fragmentações de quatro a seis íons prevaleceram ao longo da corrida cromatográfica.

4.3 Categorização funcional do proteoma total

As 2.555 sequências do proteoma total identificadas pelo PEAKS, na busca contra o banco de dados de *S. mansoni*, foram categorizadas com base nas classes definidas pelo *Gene Ontology*, por meio das anotações funcionais do Blast2GO (Fig. 14). Dentre elas, 83% foram classificadas por componente celular (56%), função molecular (70%) e/ou processo biológico (60%). As demais pertencem à classe das HSPs – *Heat Shock Proteins* (2%), das proteínas VALs (2%), das proteínas não categorizadas (59%) ou a outros processos (37%).

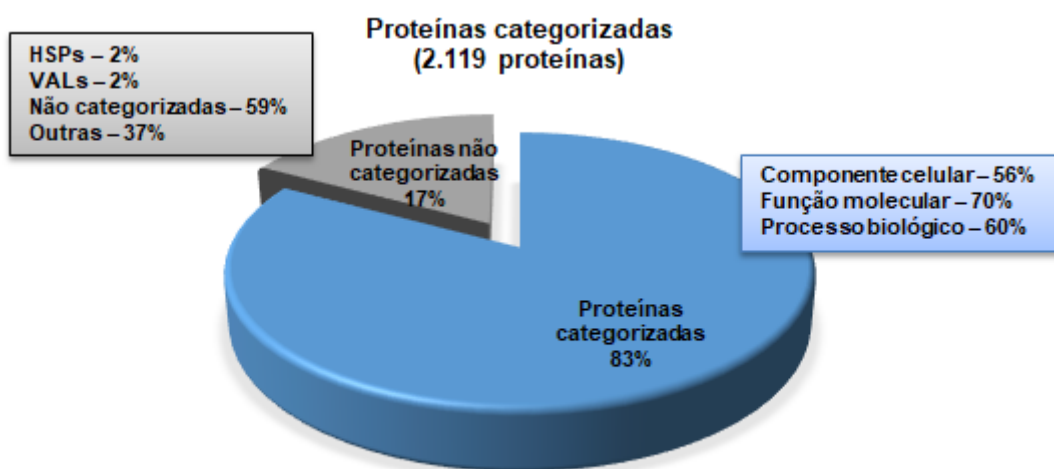


Figura 14: Categorização das proteínas de ambas as frações. As identidades foram atribuídas às categorias GO de componente celular, função molecular e processo biológico. HSPs: *Heat Shock Proteins*, VALs: proteínas *Venom Allergen-Like*.

Na categoria de componente celular, 1.422 proteínas foram anotadas e os termos mais relevantes foram escolhidos para serem representados em um gráfico multinível (Fig. 15). Baseado na classificação funcional, um número considerável de proteínas é intracelular (75%), 56% delas foram atribuídas às organelas, 47% ao citoplasma, 40% às membranas e 19% ao núcleo.

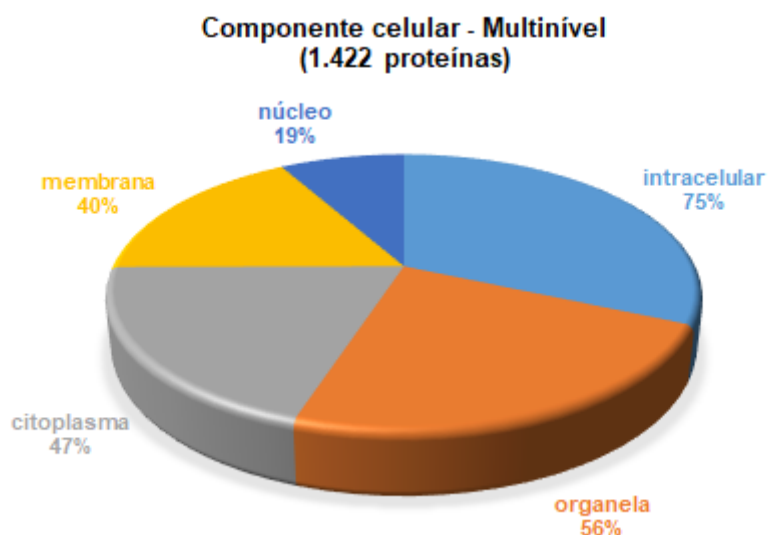


Figura 15: Classificação das proteínas totais na categoria de componente celular. Um total de 1.422 sequências foi atribuído aos termos: citoplasma, intracelular, membrana, núcleo e/ou organela.

Em relação à categoria de processo biológico, 1.541 sequências foram distribuídas em 22 termos dentro do nível 4 (Fig. 16). A porcentagem de proteínas que abrange os processos metabólicos de macromoléculas é muito pronunciada (43%), enquanto que apenas 10% delas são representadas pelos processos metabólicos de moléculas pequenas derivadas de bases nitrogenadas. Além disso, cerca de 27% das moléculas estão envolvidas com processos biossintéticos celulares.

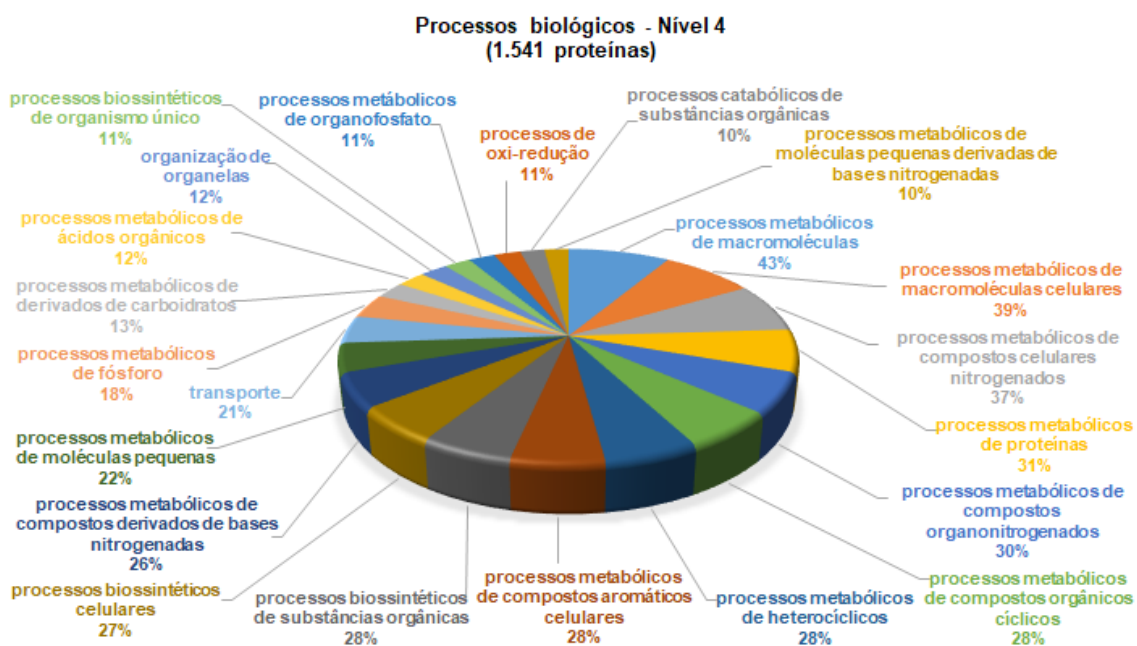


Figura 16: Classificação do proteoma total na categoria de processo biológico. De 2.555 identidades, 1.541 foram categorizadas entre os 22 termos representados no nível 4.

Foram listadas 25 sequências de proteínas que muito provavelmente estão envolvidas com o sistema nervoso do miracídio. Entre elas, dois neuropeptídeos (*neuropeptide Y prohormone 1* e *NPP-1 prepropeptide*\x3b *Putative neuropeptide*), duas proteínas associadas ao receptor GABA (A) (*Gaba(A) receptor associated protein*) e proteínas relacionadas às sinapses nervosas (Tabela 1).

Tabela 1: Proteínas relacionadas ao sistema nervoso do miracídio encontradas em ambos os extratos

Acesso	Descrição	Cobertura (%)	#Peptídeos
Smp_130280.1	Neurogenic locus notch protein	28	53
Smp_159230.1	Synaptic vesicle membrane protein VAT 1	52	17
Smp_083040.1	Nervous system adducin	28	14
Smp_126990.1	Synapsin	17	11
Smp_175900.1	Synaptotagmin	30	13
Smp_148020.1	Neuroglian	5	7
Smp_050630.1	Extended synaptotagmin protein 2a	17	4
Smp_059670.1	Synaptogyrin 2	22	5
Smp_081820.1	Synaptic glycoprotein sc2	25	5
Smp_085530.1	Synapse-associated protein putative	13	5
Smp_073790.1	Gaba(A) receptor associated protein	45	6
Smp_087940.1	Gaba(A) receptor associated protein	38	5
Smp_142690.1	Neuronal acetylcholine receptor subunit alpha 4	4	4
Smp_159670.1	Synaptojanin 1	2	2
Smp_047450.1	Synaptobrevin YKT6	8	1
Smp_176920.1	Neuronal rhoA GEF protein	1	1
Smp_055260.1	Sodium dependent neurotransmitter transporter	5	1
Smp_080100.1	Synaptophysin	9	1
Smp_037960.1	Neuronal acetylcholine receptor subunit alpha 4	2	1
Smp_159950.1	Neuropeptide Y prohormone 1	11	1
Smp_151600.1	Neuronal calcium sensor 2	4	1
Smp_042120.1	NPP-1 prepropeptide\x3b Putative neuropeptide	17	1
Smp_171870.1	Synaptic vesicle 2 protein	1	1
Smp_163650.1	C terminal pdz ligand of neuronal nitric oxide	1	1
Smp_129920.1	Sodium dependent neurotransmitter transporter	2	1

4.4 Categorização funcional das proteínas solúveis e de membranas

Semelhante ao que foi feito para as proteínas totais, análises LC-MS/MS das frações solúvel e de membrana forneceram, por meio do *software* PEAKS, 1.604

identidades para a primeira preparação e 1.947 identidades para a segunda. Essas proteínas foram submetidas a um BLAST local contra as sequências identificadas do proteoma total, utilizando a plataforma Blast2GO, o que reduziu seu número a 1.377 e 1.709, respectivamente.

Tabela 2: Categorização das sequências do proteoma solúvel e de membrana

	Fração de membrana	Fração solúvel
Proteínas categorizadas	83%	84%
Proteínas categorizadas por CC	55%	50%
Proteínas categorizadas por FM	68%	76%
Proteínas categorizadas por PB	60%	64%

CC: Componente Celular, FM: Função Molecular, PB: Processo Biológico.

A categorização funcional dessas biomoléculas indicou que 83% do extrato de membrana e 84% do extrato solúvel foram anotados. Dentre as proteínas classificadas na categoria de componente celular, representando 55% e 50% dos proteomas, respectivamente (Tabela 2), 427 sequências (46%) da fração de membrana foram atribuídas à membrana, demonstrando o enriquecimento da preparação, enquanto que a fração solúvel contribuiu com 167 sequências (24%), apenas. Além disso, 84% das proteínas solúveis são intracelulares, ao passo que 71% das proteínas de membranas também o são (Fig. 17).

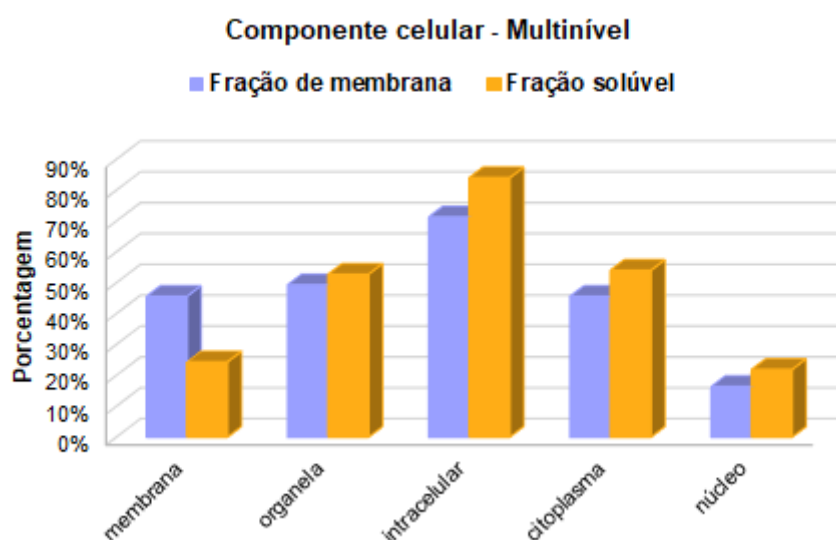


Figura 17: Classificação das identidades das frações solúvel e de membrana na categoria de componente celular. As 687 e 937 proteínas, respectivamente, foram distribuídas entre cinco categorias.

Para a categoria de processo biológico nível 4, 60% do extrato de membrana e 64% do extrato solúvel foram anotados (Tabela 2). Destacam-se, para ambos, os processos metabólicos de macromoléculas. As principais diferenças estão para os termos GO de transporte (22% do proteoma de membrana e 16% do proteoma solúvel), organização de organelas, exibido somente no primeiro (12%), além de processos catabólicos de substâncias orgânicas, presente exclusivamente no segundo (12%) (Fig. 18).

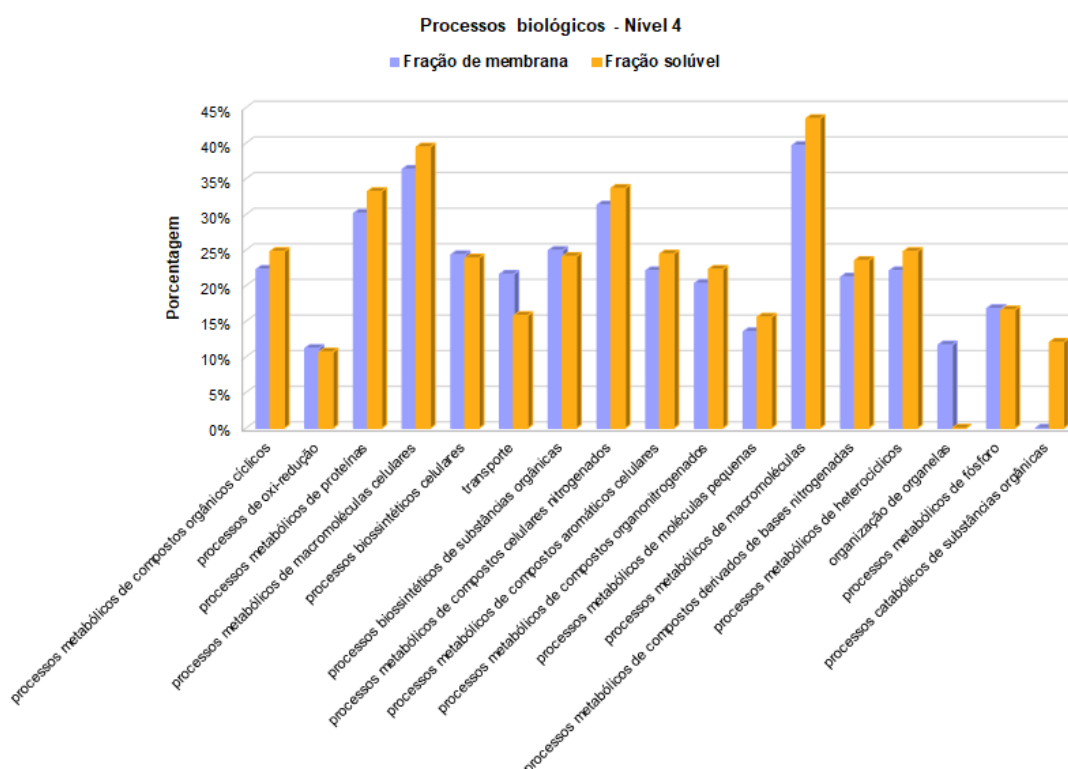


Figura 18: Classificação das proteínas de membranas e das proteínas solúveis em Tris na categoria de processo biológico. Dezessete termos foram apresentados para o nível 4.

4.5 Análise quantitativa e composicional das frações

A quantificação das proteínas de ambas as frações, realizada pelo *software* PEAKS, proporcionou a visualização das sequências estatisticamente significativas em relação à variação do *fold* por intermédio de um gráfico vulcano (Fig. 19). Os pontos verdes e vermelhos representam as proteínas estatisticamente significativas das frações solúvel e de membrana, respectivamente, considerando $p < 0,01$.

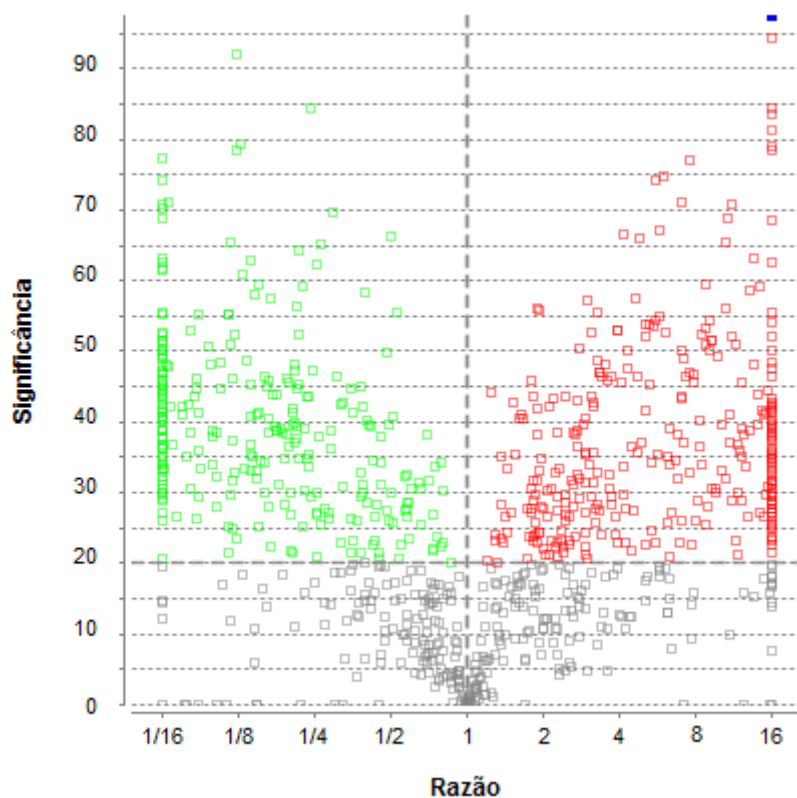


Figura 19: Proteínas estatisticamente significativas dos extratos solúvel (verde) e de membrana (vermelho). A linha tracejada horizontal determina o limite de significância escolhido.

A análise quantitativa das amostras também forneceu o *heatmap* das 642 proteínas com abundâncias relativas distintas (Fig. 20). As cores verde e vermelha caracterizam as proteínas reguladas negativamente e positivamente, nessa ordem, considerando o $fold \geq 1$. O agrupamento hierárquico das identidades reflete a predominância das primeiras no extrato de membrana e a prevalência das últimas no extrato solúvel.

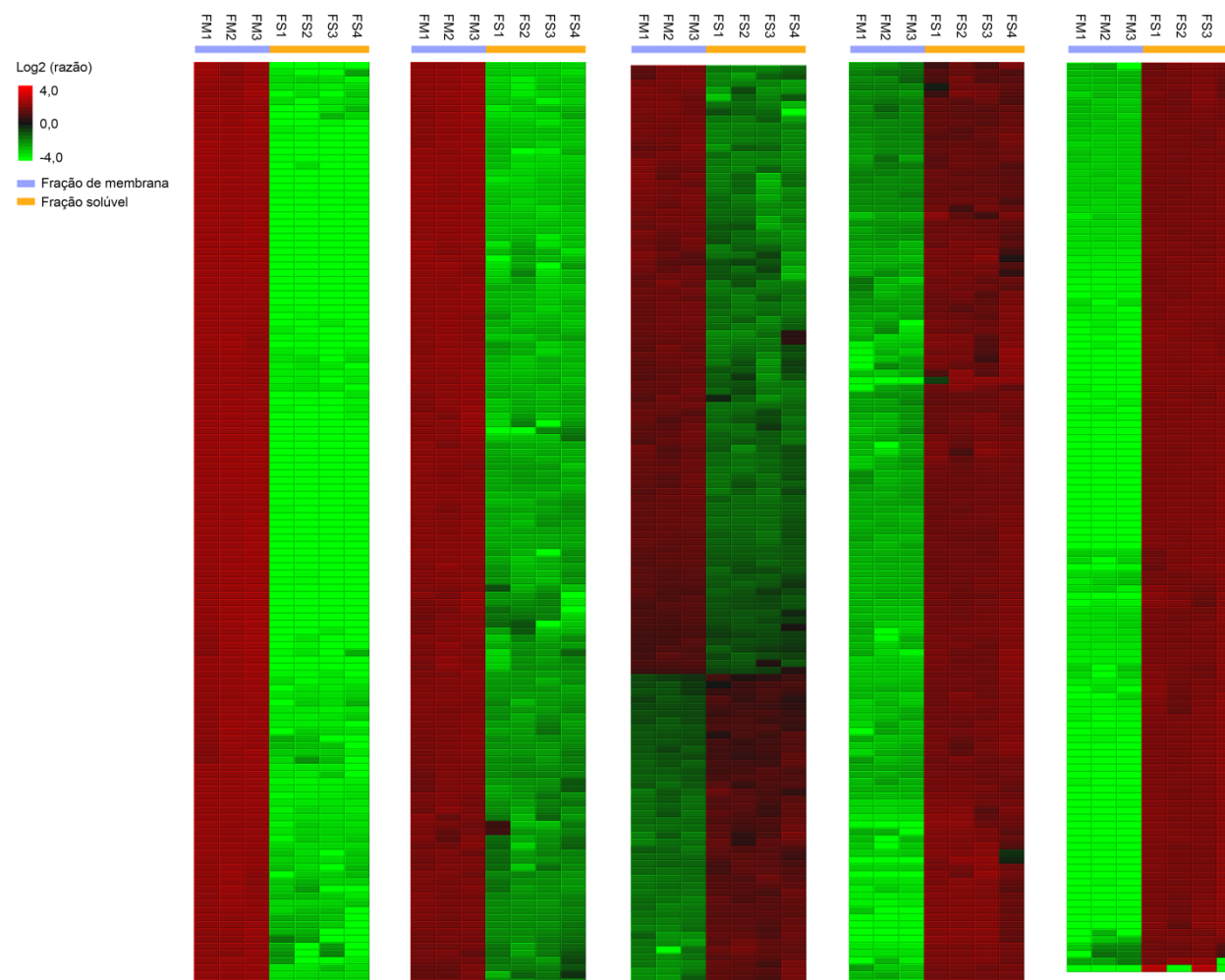


Figura 20: Abundância relativa de 642 proteínas de ambas as frações. A cor da célula representa o \log_2 da abundância de cada replicata das frações de membrana (azul) e solúvel (amarelo) pela abundância média, considerando o $fold \geq 1$. FM: Fração de Membrana, FS: Fração Solúvel.

A fim de estudar a composição proteica das preparações, as sequências do *heatmap* foram submetidas à busca de predições de hélices transmembrana e peptídeos sinais. Pelo menos 61 proteínas apontaram a presença de domínios transmembrana. Dessas, 47 são relativamente abundantes no proteoma de membrana, comprovando, mais uma vez, o enriquecimento dessa fração. As identidades incluem *lipase maturation fator*, com nove hélices preditas, *sodium potassium transporting ATPase alpha subunit*, com uma hélice a menos e *sodium driven chloride bicarbonate exchanger*, com 12 hélices (Tabela 3).

Conforme a busca de predições de sítios de clivagem de peptídeos sinais pelo servidor SignalP, estima-se que 39 proteínas possuem sequências sinais. Essas, encontradas principalmente no extrato solúvel, compreendem *78 kDa glucose regulated protein*, *peptidyl prolyl cis trans isomerase B* e *secretory glycoprotein k5* (Tabela 4).

Surpreendentemente, as seis proteínas VALs identificadas estão distribuídas de maneira uniforme entre as amostras. A VAL23, encontrada preferencialmente no proteoma solúvel, possui uma hélice transmembrana. A VAL27, predominante na mesma fração e também com uma hélice, contém, além disso, uma sequência sinal. Por último, a proteína VAL9, abundante no extrato de membrana, conserva uma hélice e um peptídeo sinal em sua sequência (Tabela 5).

Um total de dez identidades relacionadas a proteases e/ou suas subunidades foi encontrado nas preparações. Distribuídas igualmente entre as frações, apenas em uma delas foi observada uma sequência sinal – *cathepsin d (lysosomal aspartyl protease)*. Seis representantes da subunidade regulatória do proteassoma 26S foram quantificadas (Tabela 6).

Tabela 3: Proteínas com domínios transmembrana preditos

Acesso	Descrição	Cobertura (%)	#Peptídeos	Perfil do grupo (razão)	FM	FS	#HTs
Smp_004550.1	Hypothetical protein	39	4	44.62:1.00	↑	↓	1
Smp_147710.1	Hypothetical protein	45	5	4.17:1.00	↑	↓	1
Smp_191010.1	Clathrin heavy chain	37	8	10.47:1.00	↑	↓	1
Smp_130280.1	Neurogenic locus notch protein	14	28	4.64:1.00	↑	↓	2
Smp_036940.1	Protein transport protein Sec61 subunit	15	1	3.27:1.00	↑	↓	1
Smp_099890.1	Receptor expression enhancing protein 5	33	8	5.53:1.00	↑	↓	3
Smp_197690.1	BTB domain containing protein	33	18	11.00:1.00	↑	↓	1
Smp_159930.1	ADP ribosylation factor 3	22	4	9.81:1.00	↑	↓	1
Smp_063090.1	Aconitate hydratase mitochondrial	46	21	0.11:1.00	↓	↑	1
Smp_026910.1	Lipase maturation fator	13	6	3.50:1.00	↑	↓	9
Smp_152050.1	Tetraspanin similiar to uroplakin 1	4	1	3.72:1.00	↑	↓	2
Smp_141390.1	Innexin unc 9	16	6	7.29:1.00	↑	↓	4
Smp_160250.1	Venom allergen (val) protein, VAL23	23	2	0.05:1.00	↓	↑	1
Smp_079310.1	Transmembrane emp24 domain containing protein	8	2	15.46:1.00	↑	↓	1
Smp_154290.1	Venom allergen-like (VAL) 27 protein	43	7	0.17:1.00	↓	↑	1
Smp_055210.1	Microsomal glutathione S transferase 3	41	7	255.76:1.00	↑	↓	3
Smp_079220.1	ATP:ADP antiporter	54	19	255.67:1.00	↑	↓	2
Smp_005290.1	Ubiquinol cytochrome c reductase cytochrome c1	52	11	70.06:1.00	↑	↓	2
Smp_174720.1	Hypothetical protein	53	4	20.71:1.00	↑	↓	1

Tabela 3 (Continua)

Tabela 3 (Continuação)

Acesso	Descrição	Cobertura (%)	#Peptídeos	Perfil do grupo (razão)	FM	FS	#HTs
Smp_072950.1	Transmembrane emp24 domain containing protein 4	27	5	22.56:1.00	↑	↓	1
Smp_203090.1	<i>Uncharacterized protein</i>	10	1	0.19:1.00	↓	↑	1
Smp_198650.1	Ankyrin:unc	12	4	0.10:1.00	↓	↑	1
Smp_015020.1	Sodium potassium transporting ATPase alpha subunit	22	19	255.46:1.00	↑	↓	8
Smp_140000.1	Tetraspanin CD63 receptor	22	4	156.42:1.00	↑	↓	4
Smp_082570.1	Zinc finger CDGSH domain containing protein 1	56	8	83.56:1.00	↑	↓	1
Smp_035030.1	Dosage compensation regulator	7	6	2.95:1.00	↑	↓	2
Smp_065110.1	LETM1 and EF hand domain containing protein 1	33	23	1.95:1.00	↑	↓	1
Smp_130300.1	Na ⁺ :K ⁺ ATPase alpha subunit	56	45	81.70:1.00	↑	↓	5
Smp_017430.1	Multivalent antigen sj gapdh	21	3	32.92:1.00	↑	↓	4
Smp_080610.1	<i>Hypothetical protein</i>	33	5	91.94:1.00	↑	↓	1
Smp_127940.1	Sodium driven chloride bicarbonate exchanger	12	14	113.36:1.00	↑	↓	12
Smp_141010.1	Dysferlin1	7	11	3.02:1.00	↑	↓	1
Smp_020370.1	Reticulon 1	23	6	8.47:1.00	↑	↓	4
Smp_033550.1	Sodium:potassium transporting ATPase subunit	41	6	255.11:1.00	↑	↓	1
Smp_160560.1	Dyp type peroxidase	20	11	0.04:1.00	↓	↑	1
Smp_198890.1	<i>Hypothetical protein</i>	5	1	20.75:1.00	↑	↓	1
Smp_102510.1	Peripheral type benzodiazepine receptor	47	5	255.42:1.00	↑	↓	5
Smp_059670.1	Synaptogyrin 2	14	3	9.17:1.00	↑	↓	4

Tabela 3 (Continua)

Tabela 3 (Continuação)

Acesso	Descrição	Cobertura (%)	#Peptídeos	Perfil do grupo (razão)	FM	FS	#HTs
Smp_143730.1	Nodal modulator 1	3	3	0.60:1.00	↓	↑	1
Smp_194070.1	Sorting nexin 14	1	1	9.53:1.00	↑	↓	1
Smp_173350.1	Egg protein CP391S-like	33	11	202.95:1.00	↑	↓	1
Smp_042110.1	<i>Hypothetical protein</i>	3	1	2.26:1.00	↑	↓	2
Smp_053230.1	Cytochrome b reductase	63	17	203.18:1.00	↑	↓	1
Smp_036470.1	Oxalate:formate antiporter	3	1	0.40:1.00	↓	↑	6
Smp_162980.1	Rhodopsin orphan GPCR	1	1	1.96:1.00	↑	↓	7
Smp_049230.1	Major egg antigen (p40)	59	13	0.27:1.00	↓	↑	1
Smp_090870.1	Protein sec13	1	1	0.58:1.00	↓	↑	10
Smp_136210.1	Putative testis development protein nyd-sp29	2	2	17.03:1.00	↑	↓	1
Smp_173150.1	Cd63 antigen	20	4	3.21:1.00	↑	↓	4
Smp_175660.1	B cell receptor associated protein	9	2	14.29:1.00	↑	↓	3
Smp_152830.1	Sodium calcium exchanger	4	2	0.02:1.00	↓	↑	9
Smp_176180.1	Venom allergen-like (VAL) 9 protein	42	8	2.08:1.00	↑	↓	1
Smp_145110.1	<i>Hypothetical protein</i>	2	1	0.08:1.00	↓	↑	7
Smp_046250.1	Transmembrane emp24 domain containing protein 2	24	6	17.78:1.00	↑	↓	2
Smp_179560.1	Multiple inositol polyphosphate phosphatase	15	6	0.59:1.00	↓	↑	1
Smp_035180.1	Potassium voltage gated channel subfamily D	2	1	17.32:1.00	↑	↓	1
Smp_098710.1	Quiescin q6 sulfhydryl oxidase	6	2	1.81:1.00	↑	↓	1

Tabela 3 (Continua)

Tabela 3 (Continuação)

Acesso	Descrição	Cobertura (%)	#Peptídeos	Perfil do grupo (razão)	FM	FS	#HTs
Smp_022540.1	Hypothetical protein	14	3	11.43:1.00	↑	↓	1
Smp_143410.1	Hypothetical protein	2	1	7.63:1.00	↑	↓	1
Smp_127820.1	Hypothetical protein	13	9	0.45:1.00	↓	↑	1
Smp_046290.1	CKLF MARVEL transmembrane domain containing protein	13	2	35.27:1.00	↑	↓	4

As descrições em itálico foram anotadas manualmente. FM: Fração de Membrana, FS: Fração Solúvel, HTs: Hélices Transmembrana.

Tabela 4: Proteínas com sítios de clivagem de peptídeos sinais preditos

Acesso	Descrição	Cobertura (%)	#Peptídeos	Perfil do grupo (razão)	FM	FS
Smp_142550.1	Nuclear pore membrane glycoprotein gp210-related	6	12	5.69:1.00	↑	↓
Smp_147710.1	Hypothetical protein	45	5	4.17:1.00	↑	↓
Smp_172110.1	Protein disulfide isomerase A6	58	14	0.50:1.00	↓	↑
Smp_042400.1	Arginine rich mutated in early stage tumors	44	8	0.11:1.00	↓	↑
Smp_005060.1	Hypothetical protein	47	5	20.49:1.00	↑	↓
Smp_030370.1	Calreticulin	51	24	0.01:1.00	↓	↑
Smp_013040.1	Cathepsin d (lysosomal aspartyl protease)	10	3	0.01:1.00	↓	↑
Smp_160830.1	Phospholipase d3	7	3	7.61:1.00	↑	↓
Smp_113750.1	<i>Hypothetical protein</i>	21	5	0.06:1.00	↓	↑
Smp_049550.1	78 kDa glucose regulated protein	59	40	0.12:1.00	↓	↑
Smp_179250.1	Alpha galactosidase:alpha n	62	28	0.19:1.00	↓	↑
Smp_079310.1	Transmembrane emp24 domain containing protein	8	2	15.46:1.00	↑	↓
Smp_040790.1	Peptidyl prolyl cis trans isomerase B	58	10	0.01:1.00	↓	↑
Smp_154290.1	Venom allergen-like (VAL) 27 protein	43	7	0.17:1.00	↓	↑
Smp_164760.1	Cell adhesion molecule	6	5	7.05:1.00	↑	↓
Smp_145300.1	Peptidylglycine alpha hydroxylating	26	7	0.08:1.00	↓	↑
Smp_079770.1	Protein disulfide-isomerase ER-60 precursor (ERP60) putative	68	34	0.06:1.00	↓	↑
Smp_072950.1	Transmembrane emp24 domain containing protein 4	27	5	22.56:1.00	↑	↓

Tabela 4 (Continua)

Tabela 4 (Continuação)

Acesso	Descrição	Cobertura (%)	#Peptídeos	Perfil do grupo (razão)	FM	FS
Smp_089670.1	Alpha 2 macroglobulin	13	22	0.18:1.00	↓	↑
Smp_203090.1	<i>Uncharacterized protein</i>	10	1	0.19:1.00	↓	↑
Smp_133880.1	Cd109 antigen	5	5	10.86:1.00	↑	↓
Smp_056760.1	Protein disulfide isomerase	69	32	0.02:1.00	↓	↑
Smp_018760.1	Neutral alpha glucosidase AB	22	15	0.01:1.00	↓	↑
Smp_088720.1	Hypothetical protein	30	7	0.09:1.00	↓	↑
Smp_150240.1	Secretory glycoprotein k5	27	9	0.04:1.00	↓	↑
Smp_143150.1	Elongation factor 2	70	34	0.74:1.00	↓	↑
Smp_179420.1	Egg protein CP391S	18	5	0.06:1.00	↓	↑
Smp_112110.1	Interleukin 4 inducing protein	37	5	0.03:1.00	↓	↑
Smp_017730.1	200-kDa GPI-anchored surface glycoprotein	14	18	0.56:1.00	↓	↑
Smp_160560.1	Dyp type peroxidase	20	11	0.04:1.00	↓	↑
Smp_002150.1	Mastin	20	8	4.17:1.00	↑	↓
Smp_105220.1	Hypothetical protein	37	4	29.28:1.00	↑	↓
Smp_041550.1	<i>Hypothetical protein</i>	34	4	2.00:1.00	↑	↓
Smp_176180.1	Venom allergen-like (VAL) 9 protein	42	8	2.08:1.00	↑	↓
Smp_205580.1	<i>Unnamed protein product</i>	44	4	28.10:1.00	↑	↓
Smp_056460.1	Hypothetical protein	16	4	0.28:1.00	↓	↑
Smp_046250.1	Transmembrane emp24 domain containing protein 2	24	6	17.78:1.00	↑	↓

Tabela 4 (Continua)

Tabela 4 (Continuação)

Acesso	Descrição	Cobertura (%)	#Peptídeos	Perfil do grupo (razão)	FM	FS
Smp_179560.1	Multiple inositol polyphosphate phosphatase	15	6	0.59:1.00	↓	↑
Smp_127820.1	Hypothetical protein	13	9	0.45:1.00	↓	↑

As descrições em itálico foram anotadas manualmente. FM: Fração de Membrana, FS: Fração Solúvel.

Tabela 5: Proteínas VALs identificadas pelas análises *shotgun* do proteoma solúvel e de membrana

Acesso	Descrição	Cobertura (%)	#Peptídeos	Perfil do grupo (razão)	FM	FS
Smp_002630.1	Venom allergen-like (VAL) 2 protein	52	10	0.29:1.00	↓	↑
Smp_160250.1	Venom allergen (val) protein, <i>VAL23</i>	23	2	0.05:1.00	↓	↑
Smp_154290.1	Venom allergen-like (VAL) 27 protein	43	7	0.17:1.00	↓	↑
Smp_070250.1	Venom allergen (val) protein, <i>VAL15</i>	54	20	14.51:1.00	↑	↓
Smp_176180.1	Venom allergen-like (VAL) 9 protein	42	8	2.08:1.00	↑	↓
Smp_179480.1	Venom allergen-like (VAL) 5 protein	53	21	11.64:1.00	↑	↓

As descrições em itálico foram anotadas manualmente. FM: Fração de Membrana, FS: Fração Solúvel.

Tabela 6: Identidades relacionadas a proteases e/ou suas subunidades obtidas pela análise proteômica em larga escala do extrato solúvel e de membrana

Acesso	Descrição	Cobertura (%)	#Peptídeos	Perfil do grupo (razão)	FM	FS
Smp_074500.1	Proteasome subunit beta 2 (T01 family)	22	3	0.02:1.00	↓	↑
Smp_013040.1	Cathepsin d (lysosomal aspartyl protease)	10	3	0.01:1.00	↓	↑
Smp_017660.1	Proteasome activator pa subunit	12	2	0.01:1.00	↓	↑
Smp_213040.1	26S proteasome non ATPase regulatory subunit	8	2	4.85:1.00	↑	↓
Smp_058650.1	26S proteasome non ATPase regulatory subunit	9	4	0.22:1.00	↓	↑
Smp_026630.1	26S proteasome non ATPase regulatory subunit 7	24	5	3.15:1.00	↑	↓
Smp_012470.1	26S protease regulatory subunit 7	9	4	30.20:1.00	↑	↓
Smp_085310.1	26S proteasome regulatory subunit S3	36	12	1.83:1.00	↑	↓
Smp_017070.1	26S protease regulatory subunit s10b	19	7	0.59:1.00	↓	↑
Smp_126490.1	Lon protease protein mitochondrial	8	7	2.44:1.00	↑	↓

FM: Fração de Membrana, FS: Fração Solúvel.

5. DISCUSSÃO

Nos diferentes estágios de vida e sobre condições ambientais distintas, os transcritos e os padrões de expressão proteica variam drasticamente em um organismo, sendo de fundamental importância analisar o proteoma de todas as fases do ciclo de vida do parasito (VERJOVSKI-ALMEIDA; DEMARCO, 2008). Desde o surgimento da proteômica, sobretudo os vermes adultos, as cercárias e os ovos de *S. mansoni* têm sido extensivamente estudados, entretanto, a caracterização molecular da fase larval que infecta o hospedeiro intermediário foi negligenciada, provavelmente por não se tratar da forma infectante para o homem. Contudo, essa abordagem é muito valiosa, tendo em vista que o miracídio é o único estágio do ciclo que se locomove por intermédio de cílios, apresentando menor contribuição de massa muscular e, conseqüentemente, menor supressão de sinal devido às proteínas motoras, o que poderia favorecer a visualização de proteínas dos outros tecidos, como o sistema nervoso, por exemplo, o qual representa quase 10% do volume da larva (CURWEN, Rachel S. *et al.*, 2004; PAN, 1980). Nesse contexto, esse trabalho propôs a análise proteômica *shotgun* dos extratos solúvel e de membrana do miracídio de *S. mansoni*, utilizando nanocromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.

Diante da complexidade dessa fase larval, optou-se por realizar uma análise preliminar de suas proteínas solúveis em Tris. Como mencionado anteriormente, foram identificadas 1.273 sequências na fração solúvel, resultado comparável ao obtido pela separação das proteínas do miracídio de *S. mansoni* por SDS-PAGE, que revelou a presença de 1.910 identidades, tendo em mente que, nesse estudo, a extração das proteínas se deu em solução de ureia/tiourea contendo CHAPS (WANG, T. *et al.*, 2016). Agentes caotrópicos, como ureia e tiourea, perturbam as ligações de hidrogênio e interações hidrofílicas das proteínas, proporcionando a solubilização dessas biomoléculas. O CHAPS, por sua vez, é um detergente zwitteriônico que perturba as interações hidrofóbicas, atuando simultaneamente na solubilização das proteínas (BODZON-KULAKOWSKA *et al.*, 2007). Portanto, embora WANG, T. (2016) e sua equipe tenham encontrado um número relativamente maior de identidades, deve-se levar em consideração que esse valor engloba também proteínas de membranas.

Das sequências identificadas, foram atribuídos valores de área para 1.251 delas. Com esse dado foi possível calcular a abundância individual, a acumulativa e a

frequência de distribuição das proteínas solúveis. Resumidamente, poucas proteínas correspondem a uma fração significativa do proteoma solúvel, enquanto a grande maioria delas representa uma pequena parcela do proteoma. O mesmo foi observado por CASS (2007) e colaboradores ao analisarem a abundância das proteínas secretadas pelo ovo de *S. mansoni* por intermédio da contagem dos espectros e pelo grupo de NEVES (2015) ao avaliar a abundância dos principais constituintes do SWAP (*soluble adult worm antigen preparation*). Nesse último trabalho, o \log_2 da área das proteínas do SWAP não apresentou uma distribuição normal, similar ao constatado para o extrato solúvel do miracídio.

Segundo a categorização funcional das sequências que correspondem a 90% da fração solúvel, a classe das chaperonas (11%) é a mais abundante desse estágio larval, perdendo apenas para as proteínas de função desconhecida (14%). As proteínas motoras e do citoesqueleto (11%) representam a terceira classe mais abundante, seguidas pelas proteínas do metabolismo energético (10%). Consistente com esses resultados, a categoria mais representada encontrada por MATHIESON; WILSON (2010) na preparação das proteínas solúveis do miracídio, com exceção dos *spots* não identificados (45%), foi a categoria das chaperonas, equivalente a 22,5% do volume total do *spot* no gel bidimensional. Por sua vez, as sequências envolvidas com o metabolismo energético pertenciam à segunda classe mais numerosa nesse estudo (9,8%), muito próxima, em termos de nível de expressão, da categoria das proteínas motoras (9,5%). A disparidade entre as porcentagens das classes e a inversão da segunda e terceira categoria mais abundante entre esse trabalho e a pesquisa realizada por MATHIESON; WILSON (2010) são razoáveis, considerando as diferenças nas abordagens para o cálculo de abundância relativa das identidades, as quais não fornecem, rigorosamente, medidas quantitativas absolutas (CASS *et al.*, 2007). Independentemente de valores, já era esperado detectar predominantemente proteínas *housekeeping* no extrato solúvel do miracídio, como actina, tubulina, ciclofilina e GAPDH (Tabela Suplementar 1), uma vez que elas são indispensáveis à manutenção das funções celulares basais do organismo (EISENBERG; LEVANON, 2013).

Para obter uma visão mais abrangente da composição proteica da larva, o miracídio foi fracionado em duas preparações, uma compreendendo as proteínas solúveis e a outra contendo as proteínas de membranas. Em ambas as frações, um detergente ácido-lábil foi adicionado para promover uma melhor solubilização das

proteínas hidrofóbicas e, conseqüentemente, das proteínas de membranas da segunda amostra. A busca de identidades empregando o *software* PEAKS forneceu 2.555 sequências para o proteoma total, 645 proteínas a mais do que o encontrado pela equipe de WANG, T. (2016) ao utilizar quatro ferramentas de busca e 1.048 sequências a mais ao comparar com o resultado fornecido separadamente, nesse mesmo estudo, pelo PEAKS. Isso significa que o uso desse surfactante foi, de fato, eficiente na solubilização dessas biomoléculas, pois mais proteínas foram identificadas ao empregar o mesmo *software*, embora existam outras variáveis que também influenciam esse resultado, como o espectrômetro de massas utilizado, os parâmetros de busca aplicados e os bancos de dados empregados.

Entre as proteínas totais estão a *major egg antigen* (p40) (Tabela Suplementar 2), um antígeno da família das pequenas proteínas do choque térmico (sHSPs – do termo em inglês *small Heat Shock Proteins*), as quais impedem a agregação proteica, mediante atividade independente de ATP, em situações de estresse ambiental, fisiológico ou patológico; e a HSP70, que trabalha em cooperação com os membros da família das sHSPs no enovelamento correto das proteínas mal dobradas, de maneira dependente de ATP (ABOUEL-NOUR *et al.*, 2006; GARRIDO *et al.*, 2012; MATHIESON; WILSON, 2010). Ambas foram encontradas nos extratos solúveis do ovo, do miracídio, nas secreções dos ovos, nas secreções cercarianas e entre as proteínas liberadas ao longo da transformação *in vitro* do miracídio a esporocisto (CASS *et al.*, 2007; CURWEN, Rachel S. *et al.*, 2004; KNUDSEN, 2005; MATHIESON; WILSON, 2010; WU, X.-J. *et al.*, 2009). A presença dessas biomoléculas no secretoma dos ovos e nos ovos maduros, principalmente, sugere que elas desempenhem sua função como chaperonas durante a migração do ovo pelo sistema hepático (ABOUEL-NOUR *et al.*, 2006). Curiosamente, a *interleukin 4 inducing protein* (IPSE), uma das principais hepatotoxinas secretadas pelos ovos de *S. mansoni* (ABDULLA *et al.*, 2011; CASS *et al.*, 2007), identificada nesse trabalho, não foi encontrada na preparação desse estágio larval por MATHIESON; WILSON (2010). Nenhuma proteína da família das MEGs (*Micro-Exon Genes*) foi identificada na larva, conforme previsto pela análise de ESTs realizada no projeto genoma de *S. mansoni* (BERRIMAN *et al.*, 2009).

Além de atuarem como chaperonas moleculares durante a migração dos ovos das veias mesentéricas ao lúmen intestinal, no hospedeiro mamífero, as HSPs também induzem uma resposta ao estresse celular provocado pela passagem por mais de um

hospedeiro e pelas mudanças abruptas das condições ambientais ao longo do ciclo biológico do parasito (ABOUEL-NOUR *et al.*, 2006; CASS *et al.*, 2007; PÉREZ-MORALES; ESPINOZA, 2015). A presença de membros dessa família, entre HSP70, HSP60, HSP40 e p40, no miracídio de *S. mansoni*, pode ser justificada pelo aumento da temperatura no momento da infecção (MARESCA; CARRATU, 1992). No ambiente aquático, os miracídios eclodem a temperaturas entre 10°C e 30°C, todavia, do instante em que as larvas penetram o hospedeiro invertebrado até o início da liberação das cercárias, elas estão sujeitas a temperaturas de 30°C a 35°C, por um período de, no mínimo, 17 dias (WALZ *et al.*, 2015). Distintivamente, quando os ovos maduros migram nos tecidos do hospedeiro definitivo, que mede cerca de 37°C, são, em seguida, eliminados pelas fezes e alcançam uma fonte de água doce, os miracídios têm que se adaptar a uma diminuição de temperatura (MARESCA; CARRATU, 1992). Nesse sentido, foram encontradas duas proteínas contendo o domínio de choque frio no proteoma total dessa fase larval – *cold shock domain protein A*. Em eucariotos, esse domínio, altamente conservado com a família de proteínas CspA de *E. coli*, parece estar envolvido na regulação da tradução (GRAUMANN; MARAHIEL, 1998; THIERINGER; JONES; INOUE, 1998). Seis representantes de outra classe de proteínas (*Universal Stress Proteins*) superexpressas, sob condições de estresse associadas ao desenvolvimento do ciclo, também foram identificados nesse estágio larval (MASAMBA *et al.*, 2016).

Assim que os miracídios emergem dos ovos, eles nadam ativamente em busca de um hospedeiro intermediário compatível. Como a larva não se alimenta no ambiente aquático, sua atividade é mantida essencialmente pelo estoque de glicogênio endógeno (WALKER, 2011). Desse modo, enzimas pertencentes à via de degradação do glicogênio, como glicogênio-fosforilase e enzima de desramificação do glicogênio, foram encontradas nessa fase larval. Os resíduos de glicose oriundos da glicogenólise, portanto, alimentam a via glicolítica, que é muito bem delineada no proteoma do miracídio. A partir da energia produzida pelo metabolismo de glicose, esse estágio larval se movimenta com o auxílio dos cílios. Os cílios, formados por microtúbulos (polímeros de dímeros de α - e β -tubulina), geralmente apresentam, em sua base, uma raiz cujo componente estrutural principal é uma proteína chamada *rootletin* (CRAFT *et al.*, 2015; STYCZYNSKA-SOCZKA; JARMAN, 2015). A função dessa raiz está relacionada à manutenção da estabilidade e funcionamento dos cílios diante de situações

de estresse mecânico (STYCYNSKA-SOCZKA; JARMAN, 2015). Tanto a *rootletin*, quanto subunidades da tubulina estão presentes nos extratos proteicos do miracídio. Ademais, outras proteínas envolvidas com os mecanismos de adaptação do parasito podem ser encontradas nas preparações proteicas da larva.

Dentre as 2.119 sequências (83%) do proteoma total, anotadas por meio da ferramenta Blast2GO, 1.541 foram classificadas segundo a ontologia de processos biológicos. Baseado nisso, os processos metabólicos de macromoléculas (43%) representam a categoria mais bem representada do miracídio. As moléculas envolvidas com os processos metabólicos de proteínas, essenciais para a manutenção e sobrevivência das células, correspondem a 31% das proteínas totais. Em relação à localização dessas biomoléculas (1.422 proteínas anotadas), 40% delas foram atribuídas às membranas, enquanto 47% encontram-se no citoplasma. Uma análise muito semelhante realizada por WANG, T. (2016) e colaboradores ordenou as sequências mapeadas e anotadas dentro do nível dois pelo Blast2GO em ordem de abundância. Aproximadamente 85% do proteoma dessa fase larval foi categorizado. A classe de processos celulares predominou sobre as demais, seguida pelas categorias de processos metabólicos e processos de organismo único, nesta ordem. As classes mais abundantes obtidas no estudo supracitado diferiram, um pouco, do observado nesse trabalho, mesmo porque, a categorização funcional desse último empregou o nível quatro para a ontologia de processos biológicos. Quanto à ontologia de componente celular, a pesquisa do grupo de WANG, T. (2016) apresentou como categoria mais abundante a das células, seguida pela classe das organelas e pela categoria de complexo macromolecular, na terceira posição.

A título de conhecimento, as proteínas identificadas pelas análises individuais das frações solúvel e de membrana também foram categorizadas pela plataforma Blast2GO. Entre as sequências anotadas, correspondente a 84% e 83% dos proteomas, respectivamente, 43% das proteínas do extrato solúvel e 40% das proteínas do extrato de membrana, classificadas conforme a ontologia de processos biológicos nível 4, foram atribuídas à classe de processos metabólicos de macromoléculas, como esperado. Em relação à categoria de componente celular, 46% das sequências do proteoma de membrana e 24% das sequências do proteoma solúvel foram conferidas ao termo GO de membrana, enquanto 71% e 84% dos proteomas, nessa mesma ordem, são intracelulares. Esses resultados sugerem que, embora esteja comprovado o

enriquecimento das frações, existe um nível de contaminação aceitável pela literatura, considerando a fonte das amostras, a maneira como foram preparadas e a sensibilidade do método.

A presença de dois neuropeptídeos entre as proteínas totais, *NPP-1 prepropeptide* e *Putative neuropeptide* e *neuropeptide Y prohormone 1* (Tabela Suplementar 2), previamente descritos pelo consórcio que sequenciou o genoma de *S. mansoni* (BERRIMAN *et al.*, 2009), demonstra a sensibilidade da metodologia empregada nesse trabalho, apesar da identificação de neuropeptídeos por espectrometria de massas representar um gargalo nos estudos de platelmintos, até mesmo para métodos desenvolvidos para esse fim (MCVEIGH *et al.*, 2009). A complexidade na obtenção desses peptídeos a partir de parasitos desse filo consiste na dificuldade em conseguir grandes quantidades de amostra que, nesse caso, deve ser cultivada em hospedeiros animais e na contaminação do tecido nervoso com parênquima circundante, uma vez que esses vermes acelomados não possuem um sistema circulatório apropriado, o que indica que a comunicação a longas distâncias deve ser realizada pelo sistema nervoso por meio dos sistemas aminérgicos e peptidérgicos, por exemplo (GUSTAFSSON *et al.*, 2002; MCVEIGH *et al.*, 2009). É possível que esse trabalho seja o primeiro a detectar neuropeptídeos no proteoma do miracídio de *S. mansoni*, tendo em mente que na publicação de WANG, T. (2016) e sua equipe nenhum neuropeptídeo foi identificado pela análise proteômica em si, entretanto, a expressão dos genes de cinco neuro-hormônios foi comprovada por RT-PCR.

Um dos neuropeptídeos encontrados, o *neuropeptide Y prohormone 1* (NPP-21b), pertence a uma família de neuropeptídeos numerosos entre os parasitos invertebrados – a família dos neuropeptídeos F (NPFs). Evidências sugerem que os NPFs estão intimamente relacionados à superfamília de neuropeptídeos Y (NPY) dos vertebrados, por apresentarem algumas características em comum, como a conservação da via bioquímica de sinalização, além da presença de 36 a 40 aminoácidos compreendendo um motivo GRXRF-NH₂ na extremidade C-terminal e resíduos de tirosina nas posições 10 e 17 em relação a essa extremidade. Essas similaridades respaldam a teoria de que as famílias NPF e NPY possuem um ancestral comum (BERRIMAN *et al.*, 2009; HUMPHRIES *et al.*, 2004).

Embora as concentrações de ambos os neuropeptídeos supracitados não tenham sido determinadas pela análise quantitativa *label free* realizada pelo PEAKS, outras biomoléculas relevantes para a interação parasito-hospedeiro foram mensuradas. Nesse contexto, uma representante da família dos canais iônicos controlados por voltagem, a *potassium voltage gated channel subfamily D*, apresentando uma hélice transmembrana segundo a predição fornecida pelo servidor TMHMM, foi identificada preferencialmente no proteoma de membrana da larva. Proteínas dessa classe são alvos terapêuticos promissores, assim como outras proteínas de membranas, devido à diversidade de funções que elas abrangem, as quais incluem desde a atuação como canais, até funções como transportadores, receptores e enzimas (BERRIMAN *et al.*, 2009; VIT; PETRAK, 2017). Exemplos de proteínas de membranas que têm sido estudadas como vacinas candidatas são as *tetraspanins*, moléculas presentes no tegumento externo de *S. mansoni* (LOUKAS; TRAN; PEARSON, 2007). Uma delas foi quantificada nesse trabalho com duas hélices transmembrana: a *tetraspanin similar to uroplakin 1*.

Quando trabalham como canais, as proteínas integrais de membrana normalmente medeiam à importação ou exportação de outras proteínas pela membrana plasmática ou pelas membranas de algumas organelas, por meio do reconhecimento de sequências sinais (SCHATZ; DOBBERSTEIN, 1996). Entre as proteínas identificadas no miracídio, com peptídeo sinal predito pelo servidor SignalP, está a *calreticulin*, a única proteína secretada em comum com o proteoma excretor-secretor dessa fase larval (GUILLOU *et al.*, 2007). Essa biomolécula também foi encontrada nas secreções cercarianas (KNUDSEN, 2005) e no secretoma dos ovos (CASS *et al.*, 2007). Surpreendentemente, pelo menos mais três proteínas possivelmente secretadas pelo miracídio, conforme predições de sítios de clivagem de peptídeos sinais, foram identificadas nas secreções das cercárias (KNUDSEN, 2005): a *peptidyl prolyl cis trans isomerase B*, a *protein disulfide isomerase* e a *200-kDa GPI-anchored surface glycoprotein* (ou *surface protein, fluke*). Essa última encontra-se entre as proteínas da transformação larval (WU, X.-J. *et al.*, 2009) e uma *protein disulfide-isomerase ER-60 precursor (ERP60) putative* diferente está presente entre as moléculas secretadas pelos ovos (CASS *et al.*, 2007).

Ao todo, seis proteínas VALs, outra classe de biomoléculas relacionadas à interação com o hospedeiro, estão distribuídas entre as preparações da fração solúvel e

de membrana da larva. Três delas, a VAL23, a VAL27 e a VAL9 possuem uma hélice transmembrana, dentre as quais as duas últimas apresentam, ademais, uma sequência sinal. Todas as proteínas VALs identificadas no proteoma do miracídio pertencem as SmVALs do grupo 1, que caracterizam-se pela presença de peptídeos sinais, três pontes dissulfeto conservadas e uma região de primeiro loop estendida (CHALMERS; HOFFMANN, 2012). As SmVAL2, 5 e 9, encontradas nesse estudo, também foram identificadas em dois trabalhos anteriores, no secretoma dos ovos (CASS *et al.*, 2007) e entre as proteínas liberadas ao longo da transformação *in vitro* do miracídio a esporocisto (CHALMERS; HOFFMANN, 2012; WU, X.-J. *et al.*, 2009). Esses resultados, tomados em conjunto, sugerem que as SmVALs mencionadas acima estão associadas a embolização ou migração dos ovos pelos tecidos durante a infecção crônica (CHALMERS; HOFFMANN, 2012).

Finalmente, dez identidades relacionadas a proteases e/ou suas subunidades foram encontradas entre as proteínas do miracídio. Proteases, ou enzimas proteolíticas, são proteínas envolvidas com o *turnover* celular, presentes tanto no núcleo, quanto no citoplasma da maioria das células eucarióticas. Entre as proteases quantificadas, seis são representantes da subunidade regulatória do proteassoma 26S, estrutura constituída pelo proteassoma 20S acrescido de dois complexos regulatórios 19S (CASTRO-BORGES, William *et al.*, 2007; RAMOS, 2011). Estudos sugerem que a via proteolítica da ubiquitina-proteassoma, evidenciada em diferentes fases do ciclo de vida do *S. mansoni*, contribui para a homeostase proteica sob condições de estresse celular, como durante o desenvolvimento do parasito (PAULA, DE *et al.*, 2015). Portanto, a presença dessa via nesse estágio larval pode estar relacionada à penetração do miracídio no molusco. Similarmente, acredita-se que a associação dos processos proteolíticos e mecânicos seja responsável pela penetração das cercárias, através da pele, no hospedeiro mamífero (GUERRA-SÁ *et al.*, 2005).

Essas análises permitiram aumentar significativamente o conhecimento sobre a composição proteica do miracídio de *S. mansoni*, revelando sua complexidade. Algumas biomoléculas importantes para a interação parasito-hospedeiro foram reconhecidas, porém estudos adicionais são necessários para agregar caracterização funcional e confirmação da localização celular dessas biomoléculas.

6. CONCLUSÕES

- As análises realizadas nesse trabalho possibilitaram a validação de um repertório significativo de genes expressos, cujas proteínas compõem as frações solúvel e de membrana do miracídio de *S. mansoni*;
- O emprego de separação cromatográfica de peptídeos em alta resolução, acoplado à identificação de peptídeos em larga escala, proporcionou uma boa cobertura do proteoma do parasito nessa fase larval, revelando a complexidade molecular que garante a sobrevivência no meio aquático;
- As identidades proteicas obtidas evidenciaram a importância de vias centrais do metabolismo do miracídio, tais como a classe de chaperonas, metabolismo energético e proteínas que medeiam a interação com o caramujo.

7. PERSPECTIVAS

- A fim de eliminar a supressão que as proteínas ciliares causam, pretende-se sequenciar o proteoma da fase larval do esporocisto cultivada *in vitro*;
- Empregar métodos específicos para ampliar o repertório de peptídeos relacionados à condução nervosa e, conseqüentemente, expandir o conhecimento sobre o tecido nervoso em *S. mansoni*;
- Empregar métodos de cromatografia de afinidade (ex. colunas de lectinas) para possibilitar a identificação de moléculas potencialmente ligadas à interação com o caramujo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLA, M-H.; LIM, K-C.; MCKERROW, J. H.; CAFFREY, C. R. Proteomic identification of ipse/alpha-1 as a major hepatotoxin secreted by *Schistosoma mansoni* eggs. **Plos neglected tropical diseases**, 25 out. 2011. v. 5, n. 10, p. e1368.

ABOUEL-NOUR, M. F.; LOTFY, M.; ATTALLAH, A. M.; DOUGHTY, B. L. *Schistosoma mansoni* major egg antigen smp40: molecular modeling and potential immunoreactivity for anti-pathology vaccine development. **Memorias do instituto oswaldo cruz**, 2006. v. 101, n. 4, p. 365–372.

BAHIA, D.; AVELAR, L. G. A.; VIGOROSI, F.; CIOLI, D.; OLIVEIRA, G. C.; MORTARA, R. A. The distribution of motor proteins in the muscles and flame cells of the *Schistosoma mansoni* miracidium and primary sporocyst. **Parasitology**, 2 set. 2006. v. 133, n. Pt 3, p. 321–329.

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

BARSOUM, R. S.; ESMAT, G.; EL-BAZ, T. Human schistosomiasis: clinical perspective: review. **Journal of advanced research**, set. 2013. v. 4, n. 5, p. 433–444.

BERRIMAN, M.; HAAS, B. J.; LOVERDE, P. T.; WILSON, R. A.; DILLON, G. P.; CERQUEIRA, G. C.; MASHIYAMA, S. T.; AL-LAZIKANI, B.; ANDRADE, L. F.; ASHTON, P. D.; ASLETT, M. A.; BARTHOLOMEU, D. C.; BLANDIN, G.; CAFFREY, C. R.; COGHLAN, A.; COULSON, R.; DAY, T. A.; DELCHER, A.; DEMARCO, R.; DJIKENG, A.; EYRE, T.; GAMBLE, J. A.; GHEDIN, E.; GU, Y.; HERTZ-FOWLER, C.; HIRAI, H.; HIRAI, Y.; HOUSTON, R.; IVENS, A.; JOHNSTON, D. A.; LACERDA, D.; MACEDO, C. D.; MCVEIGH, P.; NING, Z.; OLIVEIRA, G.; OVERINGTON, J. P.; PARKHILL, J.; PERTEA, M.; PIERCE, R. J.; PROTASIO, A. V.; QUAIL, M. A.; RAJANDREAM, M-A.; ROGERS, J.; SAJID, M.; SALZBERG, S. L.; STANKE, M.; TIVEY, A. R.; WHITE, O.; WILLIAMS, D. L.; WORTMAN, J.; WU, W.; ZAMANIAN, M.; ZERLOTINI, A.; FRASER-LIGGETT, C. M.; BARRELL, B. G.; EL-SAYED, N. M. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. **Nature**, 16 jul. 2009. v. 460, n. 7253, p. 352–358.

BODZON-KULAKOWSKA, A.; BIERCZYNSKA-KRZYSIK, A.; DYLAG, T.; DRABIK, A.; SUDER, P.; NOGA, M.; JARZEBINSKA, J.; SILBERRING, J. Methods for samples preparation in proteomic research. **Journal of chromatography b**, abr. 2007. v. 849, n. 1–2, p. 1–31.

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

CASTRO-BORGES, W.; CARTWRIGHT, J.; ASHTON, P. D.; BRASCHI, S.; SÁ, R. G.; RODRIGUES, V.; WILSON, R. A.; CURWEN, R. S. The 20s proteasome of *Schistosoma mansoni*: a proteomic analysis. **Proteomics**, abr. 2007. v. 7, n. 7, p. 1065–1075.

CASTRO-BORGES, W.; DOWLE, A.; CURWEN, R. S.; THOMAS-OATES, J.; WILSON, R. A. Enzymatic shaving of the tegument surface of live schistosomes for proteomic analysis: a rational approach to select vaccine candidates. **Plos neglected tropical diseases**, 29 mar. 2011. v. 5, n. 3, p. e993.

CHALMERS, I. W.; HOFFMANN, K. F. Platyhelminth venom allergen-like (val) proteins: revealing structural diversity, class-specific features and biological associations across the phylum. **Parasitology**, 2 set. 2012. v. 139, n. 10, p. 1231–1245.

CHENG, G-F.; LIN, J-J.; FENG, X-G.; FU, Z-Q.; JIN, Y-M.; YUAN, C-X.; ZHOU, Y-C.; CAI, Y-M. Proteomic analysis of differentially expressed proteins between the male and female worm of *Schistosoma japonicum* after pairing. **Proteomics**, fev. 2005. v. 5, n. 2, p. 511–521.

COLLEY, D. G.; BUSTINDUY, A. L.; SECOR, W. E.; KING, C. H. Human schistosomiasis. **The lancet**, jun. 2014. v. 383, n. 9936, p. 2253–2264.

COLLINS III, J. J.; KING, R. S.; COGSWELL, A.; WILLIAMS, D. L.; NEWMARK, P. A. An atlas for *Schistosoma mansoni* organs and life-cycle stages using cell type-specific markers and confocal microscopy. **Plos neglected tropical diseases**, 8 mar. 2011. v. 5, n. 3, p. e1009.

CRAFT, J. M.; HARRIS, J. A.; HYMAN, S.; KNER, P.; LECHTRECK, K. F. Tubulin

transport by ift is upregulated during ciliary growth by a cilium-autonomous mechanism. **The journal of cell biology**, 19 jan. 2015. v. 208, n. 2, p. 223–237.

CURWEN, R. S.; ASHTON, P. D.; JOHNSTON, D. A.; WILSON, R. A. The *Schistosoma mansoni* soluble proteome: a comparison across four life-cycle stages. **Molecular and biochemical parasitology**, nov. 2004. v. 138, n. 1, p. 57–66.

CURWEN, R. S.; ASHTON, P. D.; SUNDARALINGAM, S.; WILSON, R. A. Identification of novel proteases and immunomodulators in the secretions of schistosome cercariae that facilitate host entry. **Molecular & cellular proteomics**, 31 jan. 2006. v. 5, n. 5, p. 835–844.

DEWALICK, S.; BEXKENS, M. L.; BALKOM, B. W. M. van; WU, Y-P.; SMIT, C. H.; HOKKE, C. H.; GROOT, P. G. de; HECK, A. J. R.; TIELENS, A. G. M.; HELLEMOND, J. J. van. The proteome of the insoluble *Schistosoma mansoni* eggshell skeleton. **International journal for parasitology**, abr. 2011. v. 41, n. 5, p. 523–532.

EISENBERG, E.; LEVANON, E. Y. Human housekeeping genes, revisited. **Trends in genetics**, out. 2013. v. 29, n. 10, p. 569–574.

EKLU-NATEY, D. T.; WÜEST, J.; SWIDERSKI, Z.; STRIEBEL, H. P.; HUGGEL, H. Comparative scanning electron microscope of miracidia of four human schistosome (sem) study species. **International journal for parasitology**, 1985. v. 15, n. 1, p. 33–42.

ELBAZ, T.; ESMAT, G. Hepatic and intestinal schistosomiasis: review. **Journal of advanced research**, set. 2013. v. 4, n. 5, p. 445–452.

FONSECA, F.; FREITAS, C.; DUTRA, L.; GUIMARÃES, R.; CARVALHO, O. Spatial modeling of the schistosomiasis mansoni in Minas Gerais State, Brazil using spatial regression. **Acta tropica**, maio. 2014. v. 133, n. 1, p. 56–63.

FRANCO, G. R.; ADAMS, M. D.; SOARES, M. B.; SIMPSON, A. J. G.; VENTER, J. C.; PENA, S. D. J. Identification of new *Schistosoma mansoni* genes by the EST strategy using a directional cDNA library. **Gene**, 1995. v. 152, p. 141–147.

GARRIDO, C.; PAUL, C.; SEIGNEURIC, R.; KAMPINGA, H. H. The small heat shock proteins family: the long forgotten chaperones. **The international journal of**

biochemistry & cell biology, out. 2012. v. 44, n. 10, p. 1588–1592.

GRAUMANN, P. L.; MARAHIEL, M. A. A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain. **Trends in biochemical sciences**, ago. 1998. v. 23, n. 8, p. 286–290.

GRIMES, J. E.; CROLL, D.; HARRISON, W. E.; UTZINGER, J.; FREEMAN, M. C.; TEMPLETON, M. R. The roles of water, sanitation and hygiene in reducing schistosomiasis: a review. **Parasites & vectors**, 13 dez. 2015. v. 8, n. 1, p. 156.

GRYSEELS, B.; POLMAN, K.; CLERINX, J.; KESTENS, L. Human schistosomiasis. **The lancet**, set. 2006. v. 368, n. 9541, p. 1106–1118.

GUERRA-SÁ, R.; CASTRO-BORGES, W.; EVANGELISTA, E. A.; KETTELHUT, I. C.; RODRIGUES, V. *Schistosoma mansoni*: functional proteasomes are required for development in the vertebrate host. **Experimental parasitology**, abr. 2005. v. 109, n. 4, p. 228–236.

GUILLOU, F.; ROGER, E.; MONÉ, Y.; ROGNON, A.; GRUNAU, C.; THÉRON, A.; MITTA, G.; COUSTAU, C.; GOURBAL, B. E. F. Excretory–secretory proteome of larval *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma caproni*, two parasites of *Biomphalaria glabrata*. **Molecular and biochemical parasitology**, set. 2007. v. 155, n. 1, p. 45–56.

GUSTAFSSON, M. K. S.; HALTON, D. W.; KRESHCHENKO, N. D.; MOVSESSIAN, S. O.; RAIKOVA, O. I.; REUTER, M.; TEREININA, N. B. Neuropeptides in flatworms. **Peptides**, nov. 2002. v. 23, n. 11, p. 2053–2061.

HU, W.; YAN, Q.; SHEN, D-K.; LIU, F.; ZHU, Z-D.; SONG, H-D.; XU, X-R.; WANG, Z-J.; RONG, Y-P.; ZENG, L-C.; WU, J.; ZHANG, X.; WANG, J-J.; XU, X-N.; WANG, S-Y.; FU, G.; ZHANG, X-L.; WANG, Z-Q.; BRINDLEY, P. J.; MCMANUS, D. P.; XUE, C-L.; FENG, Z.; CHEN, Z.; HAN, Z-G. Evolutionary and biomedical implications of a *Schistosoma japonicum* complementary DNA resource. **Nature genetics**, 14 out. 2003. v. 35, n. 2, p. 139–147.

HU, W.; BRINDLEY, P. J.; MCMANUS, D. P.; FENG, Z.; HAN, Z-G. Schistosome transcriptomes: new insights into the parasite and schistosomiasis. **Trends in molecular medicine**, maio. 2004. v. 10, n. 5, p. 217–225.

HUMPHRIES, J. E.; KIMBER, M. J.; BARTON, Y-W.; HSU, W.; MARKS, N. J.; GREER, B.; HARRIOTT, P.; MAULE, A. G.; DAY, T. A. Structure and bioactivity of neuropeptide F from the human parasites *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. **Journal of biological chemistry**, 17 set. 2004. v. 279, n. 38, p. 39880–39885.

KELSTRUP, C. D.; YOUNG, C.; LAVALLEE, R.; NIELSEN, M. L.; OLSEN, J. V. Optimized fast and sensitive acquisition methods for shotgun proteomics on a quadrupole orbitrap mass spectrometer. **Journal of proteome research**, jun. 2012. v. 11, n. 6, p. 3487–3497.

KNUDSEN, G. M.; MEDZIHRADSKY, K. F.; LIM, K-C.; HANSELL, E.; MCKERROW, J. H. Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* cercarial secretions. **Molecular & cellular proteomics**, 23 ago. 2005. v. 4, n. 12, p. 1862–1875.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 15 ago. 1970. v. 227, n. 5259, p. 680–685.

LOUKAS, A.; TRAN, M.; PEARSON, M. S. Schistosome membrane proteins as vaccines. **International journal for parasitology**, mar. 2007. v. 37, n. 3–4, p. 257–263.

LOVERDE, P. T. Scanning electron microscope observations on the miracidium of *Schistosoma*. **International journal for parasitology**, fev. 1975. v. 5, n. 1, p. 95–97.

LOVERDE, P. T.; HIRAI, H.; MERRICK, J. M.; LEE, N. H.; EL-SAYED, N. *Schistosoma mansoni* genome project: an update. **Parasitology international**, jun. 2004. v. 53, n. 2, p. 183–192.

LOVERDE, P. T.; ANDRADE, L. F.; OLIVEIRA, G. Signal transduction regulates schistosome reproductive biology. **Current opinion in microbiology**, ago. 2009. v. 12, n. 4, p. 422–428.

MARESCA, B.; CARRATU, L. The biology of the heat-shock response in parasites. **Parasitology today**, 1992. v. 8, n. 8, p. 260–266.

MASAMBA, P.; ADENOWO, A. F.; OYINLOYE, B. E.; KAPPO, A. P. Universal stress proteins as new targets for environmental and therapeutic interventions of schistosomiasis. **International journal of environmental research and public health**,

30 set. 2016. v. 13, n. 10, p. 972.

MATHIESON, W.; WILSON, R. A. A comparative proteomic study of the undeveloped and developed *Schistosoma mansoni* egg and its contents: the miracidium, hatch fluid and secretions. **International journal for parasitology**, abr. 2010. v. 40, n. 5, p. 617–628.

MCVEIGH, P.; MAIR, G. R.; ATKINSON, L.; LADURNER, P.; ZAMANIAN, M.; NOVOZHILOVA, E.; MARKS, N. J.; DAY, T. A.; MAULE, A. G. Discovery of multiple neuropeptide families in the phylum Platyhelminthes. **International journal for parasitology**, set. 2009. v. 39, n. 11, p. 1243–1252.

NEVES, L. X.; SANSON, A. L.; WILSON, R. A.; CASTRO-BORGES, W. What's in swap? Abundance of the principal constituents in a soluble extract of *Schistosoma mansoni* revealed by shotgun proteomics. **Parasites & vectors**, 19 dez. 2015. v. 8, n. 1, p. 337.

OLVEDA, D. U.; OLVEDA, R. M.; MCMANUS, D. P.; CAI, P.; CHAU, T. N. P.; LAM, A. K.; LI, Y.; HARN, D. A.; VINLUAN, M. L.; ROSS, A. G. P. The chronic enteropathogenic disease schistosomiasis. **International journal of infectious diseases**, nov. 2014. v. 28, p. 193–203.

PAN, S. C. The fine structure of the miracidium of *Schistosoma mansoni*. **Journal of invertebrate pathology**, nov. 1980. v. 36, n. 3, p. 307–372.

PAULA, R. G. de; ORNELAS, A. M. M.; MORAIS, E. R.; GOMES, M. S.; AGUIAR, D. P.; MAGALHÃES, L. G.; RODRIGUES, V. Proteasome stress responses in *Schistosoma mansoni*. **Parasitology research**, 10 maio. 2015. v. 114, n. 5, p. 1747–1760.

PÉREZ-MORALES, D.; ESPINOZA, B. The role of small heat shock proteins in parasites. **Cell stress and chaperones**, 5 set. 2015. v. 20, n. 5, p. 767–780.

PETERSEN, T. N.; BRUNAK, S.; HEIJNE, G. von; NIELSEN, H. Signalp 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature methods**, 29 set. 2011. v. 8, n. 10, p. 785–786.

PROTASIO, A. V.; TSAI, I. J.; BABBAGE, A.; NICHOL, S.; HUNT, M.; ASLETT,

M. A.; SILVA, N. de; VELARDE, G. S.; ANDERSON, T. J. C.; CLARK, R. C.; DAVIDSON, C.; DILLON, G. P.; HOLROYD, N. E.; LOVERDE, P. T.; LLOYD, C.; MCQUILLAN, J.; OLIVEIRA, G.; OTTO, T. D.; PARKER-MANUEL, S. J.; QUAIL, M. A.; WILSON, R. A.; ZERLOTINI, A.; DUNNE, D. W.; BERRIMAN, M. A. A systematically improved high quality genome and transcriptome of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. **Plos neglected tropical diseases**, 10 jan. 2012. v. 6, n. 1, p. e1455.

RAMOS, P. C. A via proteolítica dependente de ubiquitina/proteassoma. **Química**, 2011. v. 1, n. 8, p. 57–63.

ROSS, A. G. P.; BARTLEY, P. B.; SLEIGH, A. C.; OLDS, G. R.; LI, Y.; WILLIAMS, G. M.; MCMANUS, D. P. Schistosomiasis. **The new england journal of medicine**, 2002. v. 346, n. 16, p. 1212–1220.

SAMUELSON, J. C.; CAULFIELD, J. P. Role of pleated septate junctions in the epithelium of miracidia of *Schistosoma mansoni* during transformation to sporocysts in vitro. **Tissue and cell**, jan. 1985. v. 17, n. 5, p. 667–682.

SCHATZ, G.; DOBBERSTEIN, B. Common principles of protein translocation across membranes. **Science**, 15 mar. 1996. v. 271, n. 5255, p. 1519–1526.

SILVA, V. B. R. da; CAMPOS, B. R. K. L.; OLIVEIRA, J. F. de; DECOUT, J.-L.; LIMA, M. do C. A. de. Medicinal chemistry of antischistosomal drugs: praziquantel and oxamniquine. **Bioorganic & medicinal chemistry**, jul. 2017. v. 25, n. 13, p. 3259–3277.

SMITHERS, S. R.; TERRY, R. J. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. **Parasitology**, 10 nov. 1965. v. 55, n. 4, p. 695–700.

STYCZYNSKA-SOCZKA, K.; JARMAN, A. P. The *Drosophila* homologue of rootletin is required for mechanosensory function and ciliary rootlet formation in chordotonal sensory neurons. **Cilia**, 2 dez. 2015. v. 4, n. 1, p. 9.

THIERINGER, H. A.; JONES, P. G.; INOUE, M. Cold shock and adaptation [review]. **Bioessays**, 1998. v. 20, n. 1, p. 49–57.

TURNER, H. C.; TRUSCOTT, J. E.; BETTIS, A. A.; FARRELL, S. H.; DEOL, A. K.; WHITTON, J. M.; FLEMING, F. M.; ANDERSON, R. M. Evaluating the variation in the projected benefit of community-wide mass treatment for schistosomiasis: implications for future economic evaluations. **Parasites & vectors**, 28 dez. 2017. v. 10, n. 1, p. 213.

VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; DEMARCO, R.; MARTINS, E. A. L.; GUIMARÃES, P. E. M.; OJOPI, E. P. B.; PAQUOLA, A. C. M.; PIAZZA, J. P.; JR., M. Y. N.; KITAJIMA, J. P.; ADAMSON, R. E.; ASHTON, P. D.; BONALDO, M. F.; COULSON, P. S.; DILLON, G. P.; FARIAS, L. P.; GREGORIO, S. P.; HO, P. L.; LEITE, R. A.; MALAQUIAS, L. C. C.; MARQUES, R. C. P.; MIYASATO, P. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O.; OHLWEILER, F. P.; REIS, E. M.; RIBEIRO, M. A.; SÁ, R. G.; STUKART, G. C.; SOARES, M. B.; GARGIONI, C.; KAWANO, T.; RODRIGUES, V.; MADEIRA, A. M. B. N.; WILSON, R. A.; MENCK, C. F. M.; SETUBAL, J. C.; LEITE, L. C. .C.; DIAS-NETO, E. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. **Nature genetics**, 14 out. 2003. v. 35, n. 2, p. 148–157.

VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; DEMARCO, R. Current developments on *Schistosoma* proteomics. **Acta tropica**, nov. 2008. v. 108, n. 2–3, p. 183–185.

VIT, O.; PETRAK, J. Integral membrane proteins in proteomics. how to break open the black box? **Journal of proteomics**, fev. 2017. v. 153, p. 8–20.

WALKER, A. Insights into the functional biology of schistosomes. **Parasites & vectors**, 2011. v. 4, n. 1, p. 203.

WALZ, Y.; WEGMANN, M.; DECH, S.; RASO, G.; UTZINGER, J. Risk profiling of schistosomiasis using remote sensing: approaches, challenges and outlook. **Parasites & vectors**, 17 dez. 2015. v. 8, n. 1, p. 163.

WANG, T.; ZHAO, M.; ROTGANS, B. A.; STRONG, A.; LIANG, D.; NI, G.; LIMPANONT, Y.; RAMASSOTA, P.; MCMANUS, D. P.; CUMMINS, S. F. Proteomic analysis of the *Schistosoma mansoni* miracidium. **Plos one**, 22 jan. 2016. v. 11, n. 1, p. e0147247.

WEERAKOON, K. G. A. D.; GOBERT, G. N.; CAI, P.; MCMANUS, D. P. Advances

in the diagnosis of human schistosomiasis. **Clinical microbiology reviews**, 29 out. 2015. v. 28, n. 4, p. 939–967.

WENDT, G. R.; COLLINS, J. J. Schistosomiasis as a disease of stem cells. **Current opinion in genetics & development**, out. 2016. v. 40, p. 95–102.

WILSON, R. A.; ASHTON, P. D.; BRASCHI, S.; DILLON, G. P.; BERRIMAN, M.; IVENS, A. ‘Oming in on schistosomes: prospects and limitations for post-genomics. **Trends in parasitology**, jan. 2006. v. 23, n. 1, p. 14–20.

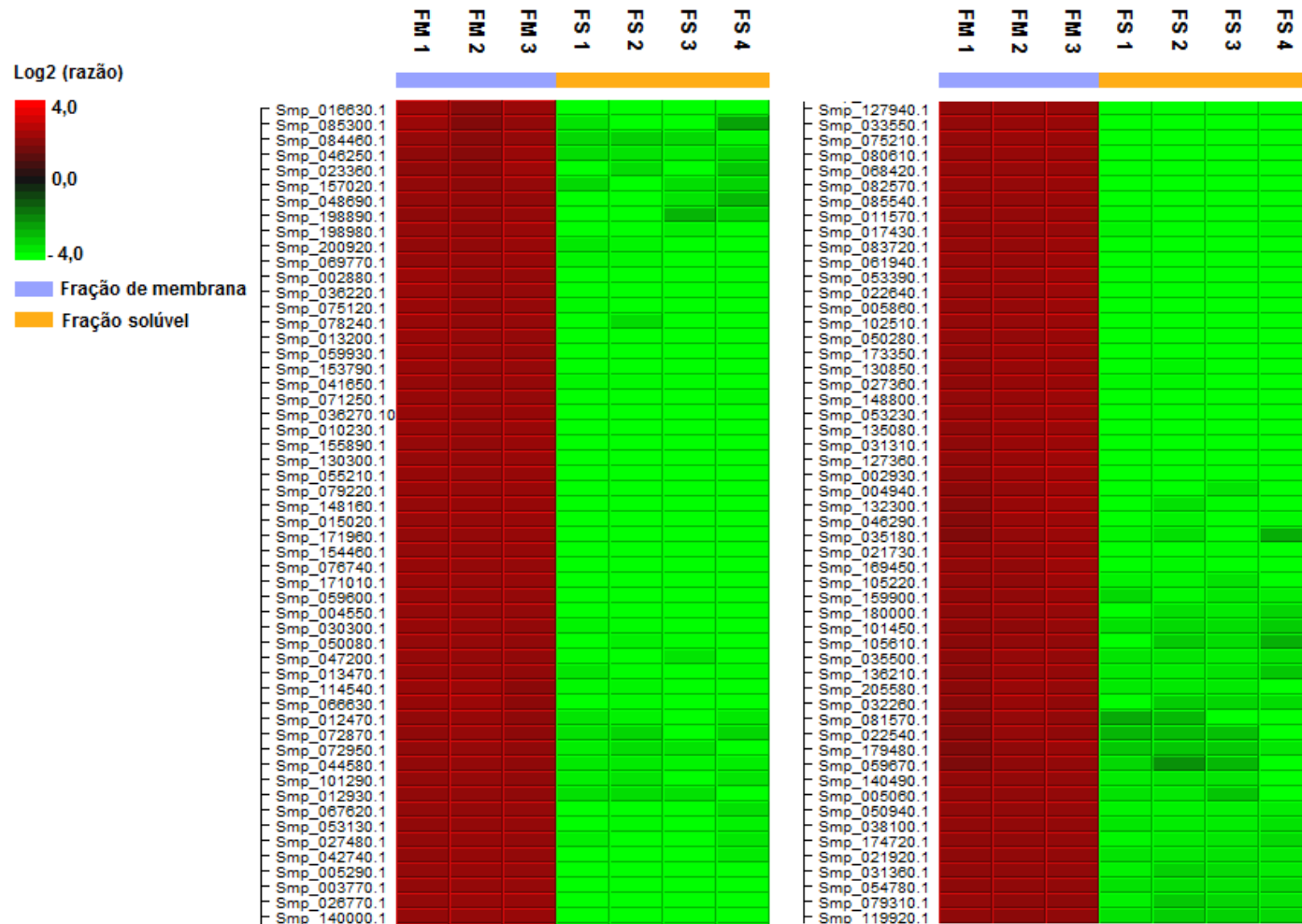
WU, X-J.; SABAT, G.; BROWN, J. F.; ZHANG, M.; TAFT, A.; PETERSON, N.; HARMS, A.; YOSHINO, T. P. Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* proteins released during in vitro miracidium-to-sporocyst transformation. **Molecular and biochemical parasitology**, mar. 2009. v. 164, n. 1, p. 32–44.

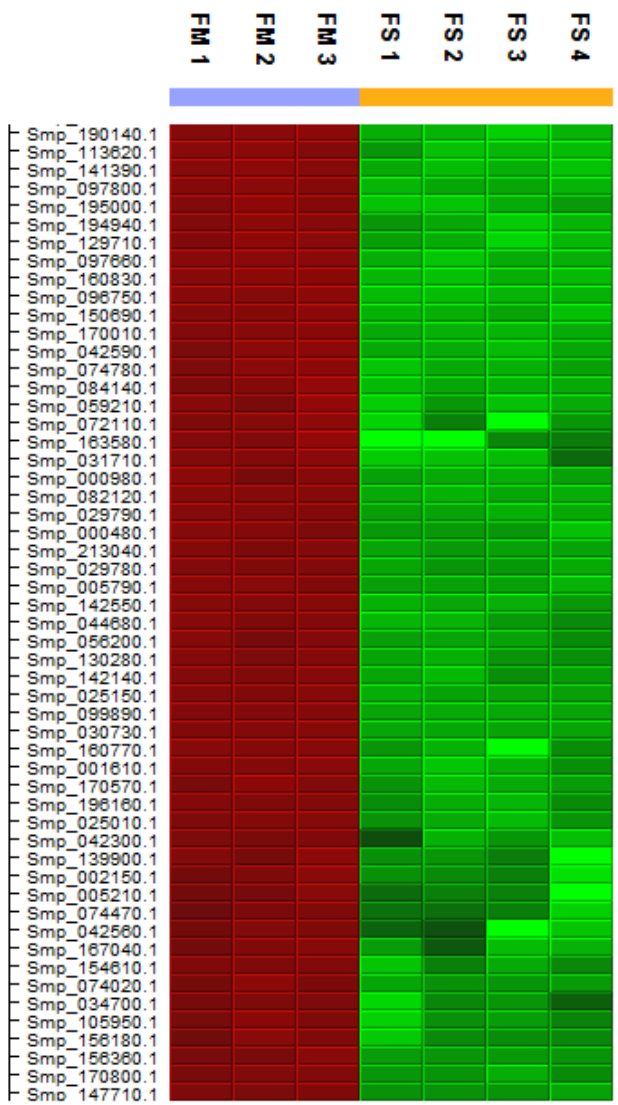
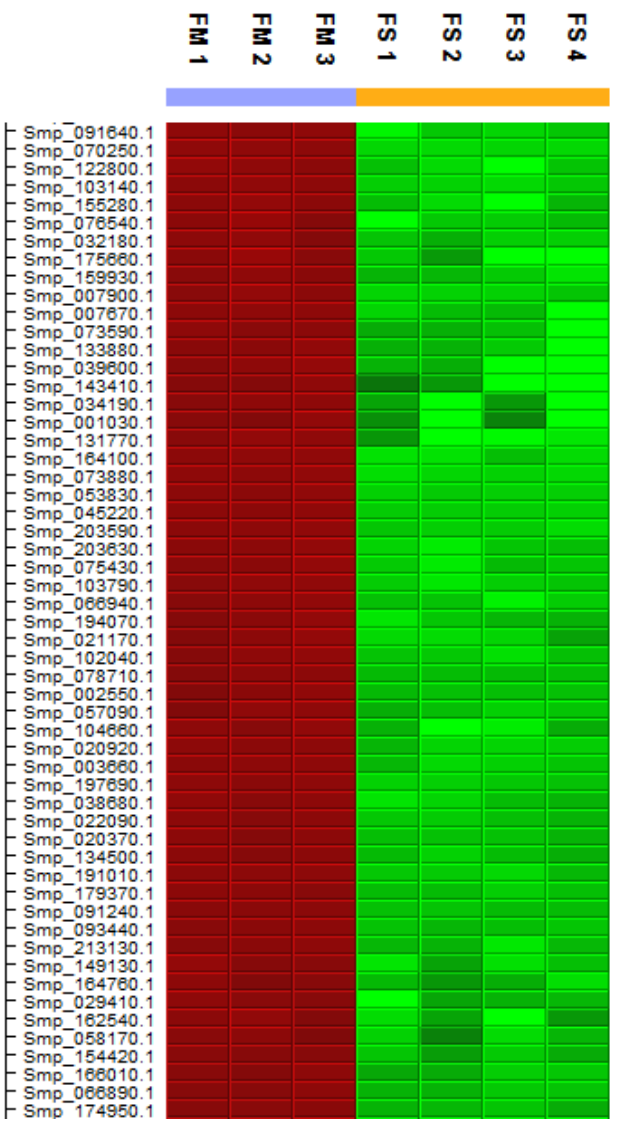
YOUNG, N. D.; JEX, A. R.; LI, B.; LIU, S.; YANG, L.; XIONG, Z.; LI, Y.; CANTACESSI, C.; HALL, R. S.; XU, X.; CHEN, F.; WU, X.; ZERLOTINI, A.; OLIVEIRA, G.; HOFMANN, A.; ZHANG, G.; FANG, X.; KANG, Y.; CAMPBELL, B. E.; LOUKAS, A.; RANGANATHAN, S.; ROLLINSON, D.; RINALDI, G.; BRINDLEY, P. J.; YANG, H.; WANG, J.; WANG, J.; GASSER, R. B. Whole-genome sequence of *Schistosoma haematobium*. **Nature genetics**, 15 jan. 2012. v. 44, n. 2, p. 221–225.

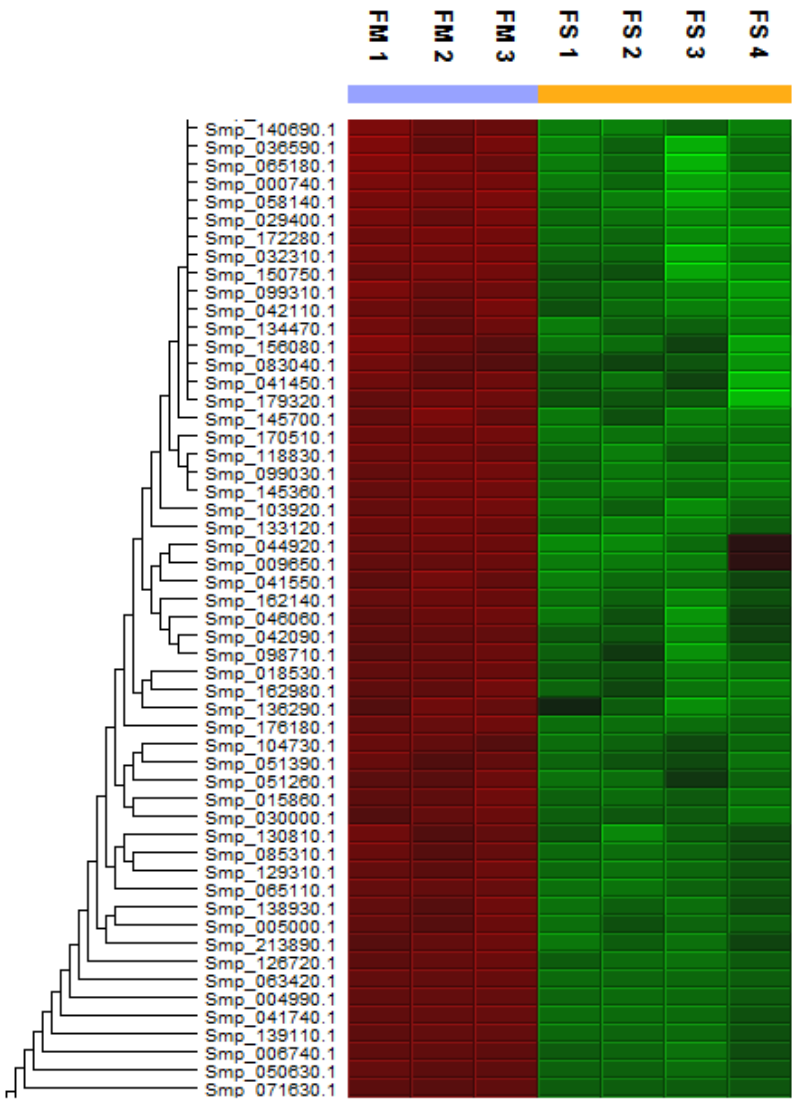
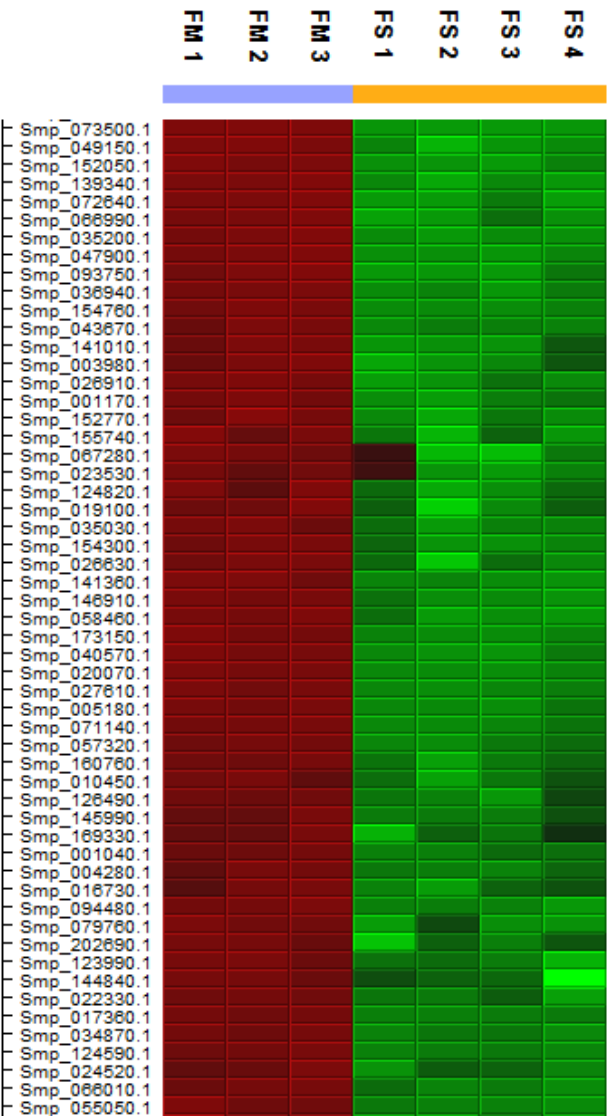
ZHOU, Y.; ZHENG, H.; CHEN, X.; ZHANG, L.; WANG, K.; GUO, J.; HUANG, Z.; ZHANG, B.; HUANG, W.; JIN, K.; TONGHAI, D.; HASEGAWA, M.; WANG, L.; ZHANG, Y.; ZHOU, J.; TAO, L.; CAO, Z.; LI, Y.; VINAR, T.; BREJOVA, B.; BROWN, D.; LI, M.; MILLER, D. J.; BLAIR, D.; ZHONG, Y.; CHEN, Z.; LIU, F.; HU, W.; WANG, Z-Q.;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

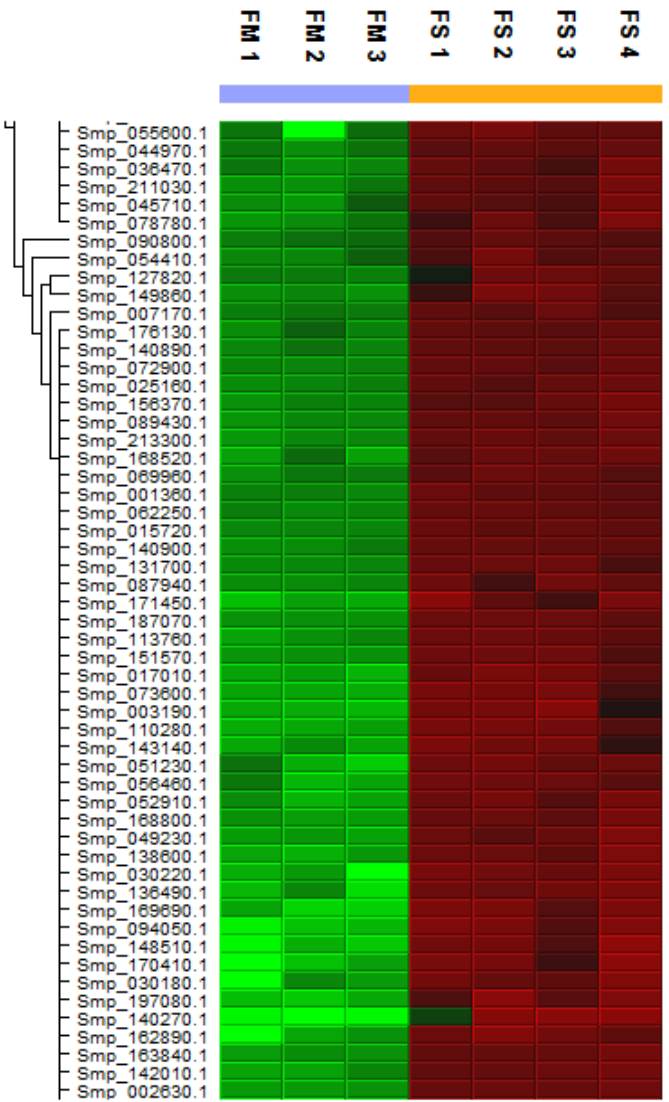
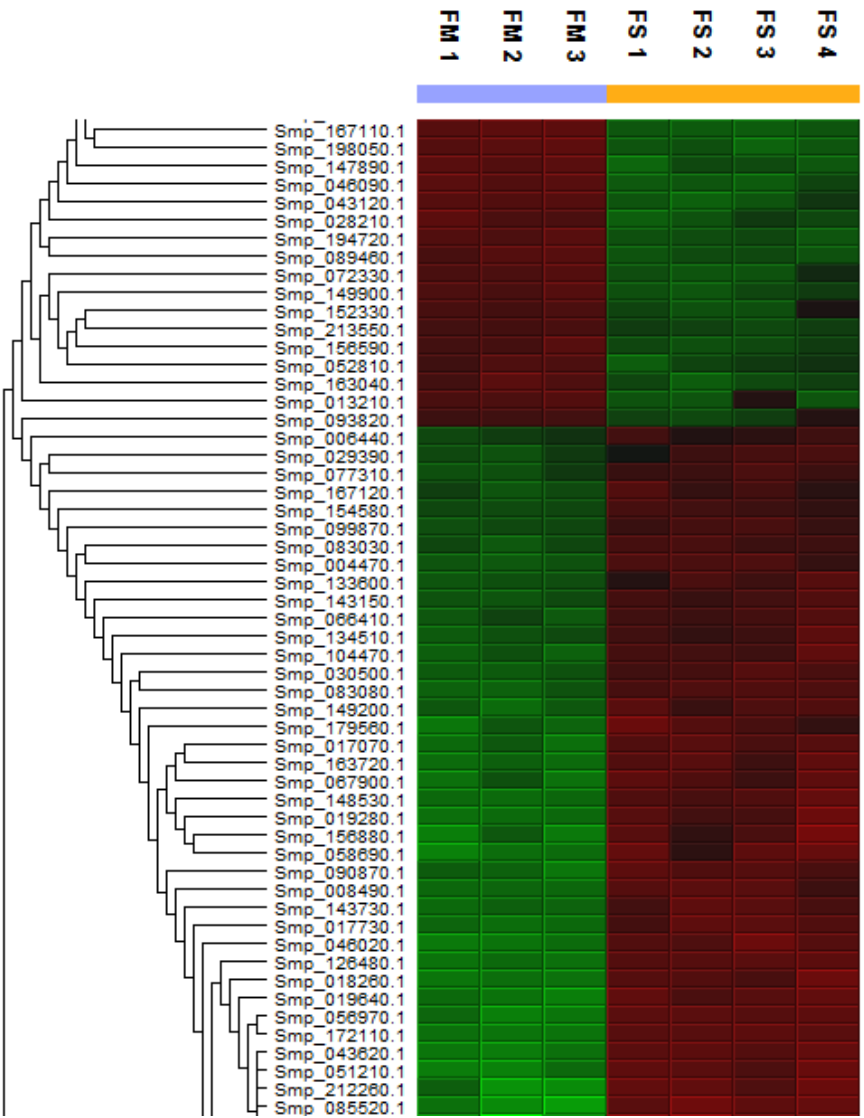
9. ANEXOS

Anexo I: *Heatmap* das 642 proteínas das frações solúvel (amarelo) e de membrana (azul) mostrando o agrupamento hierárquico. A cor da célula representa o \log_2 da abundância de cada replicata pela abundância média, considerando o $fold \geq 1$. FM: Fração de Membrana, FS: Fração Solúvel.

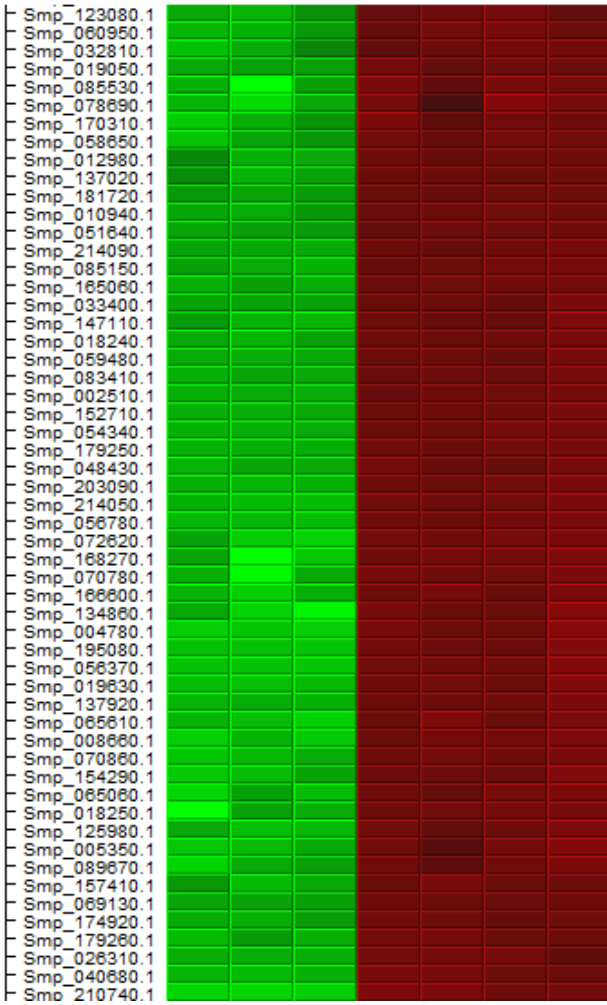




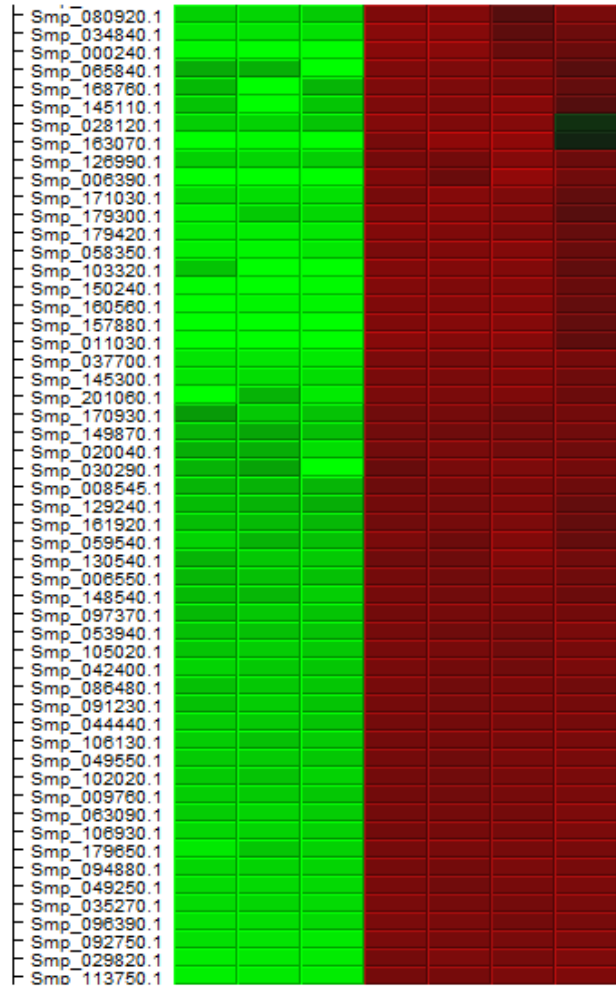




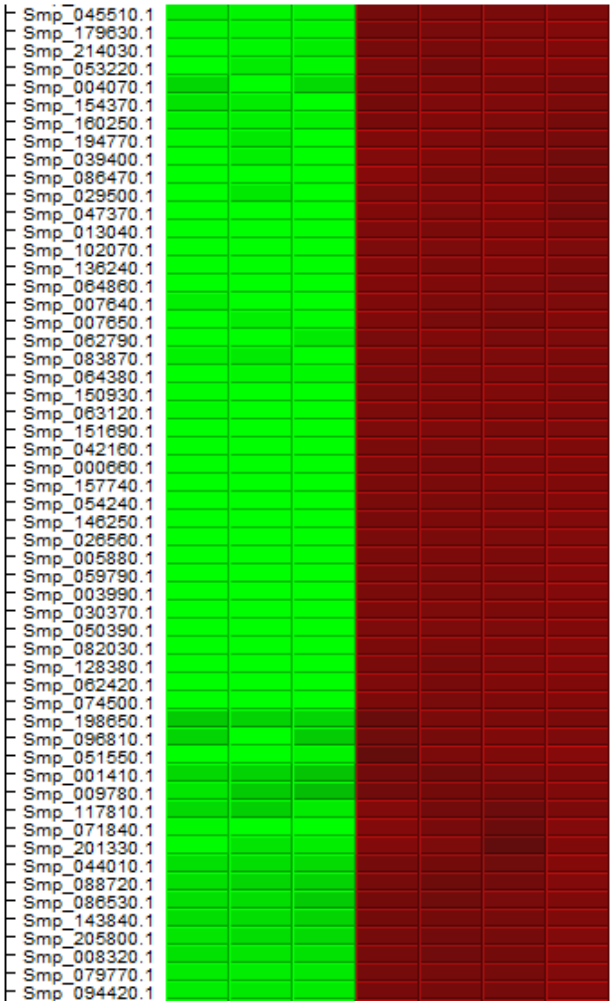
FS 4
FS 3
FS 2
FS 1
FM 3
FM 2
FM 1



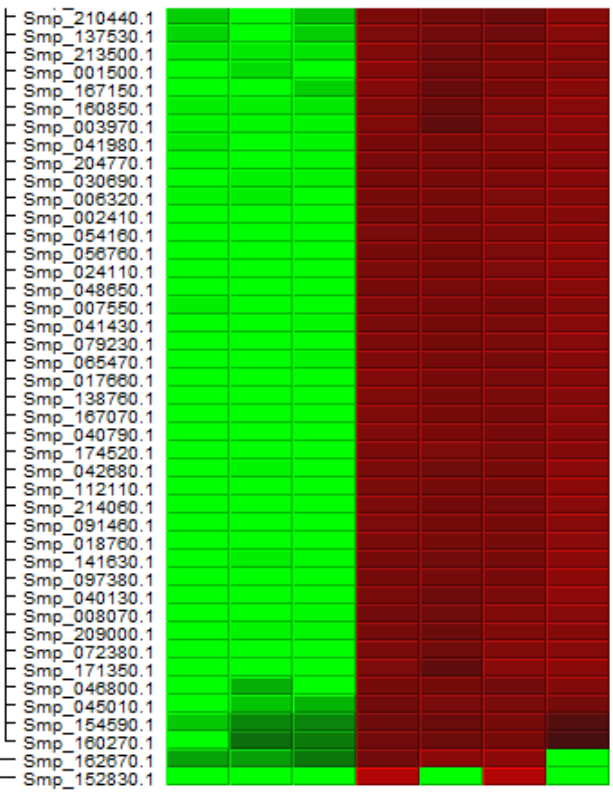
FS 4
FS 3
FS 2
FS 1
FM 3
FM 2
FM 1



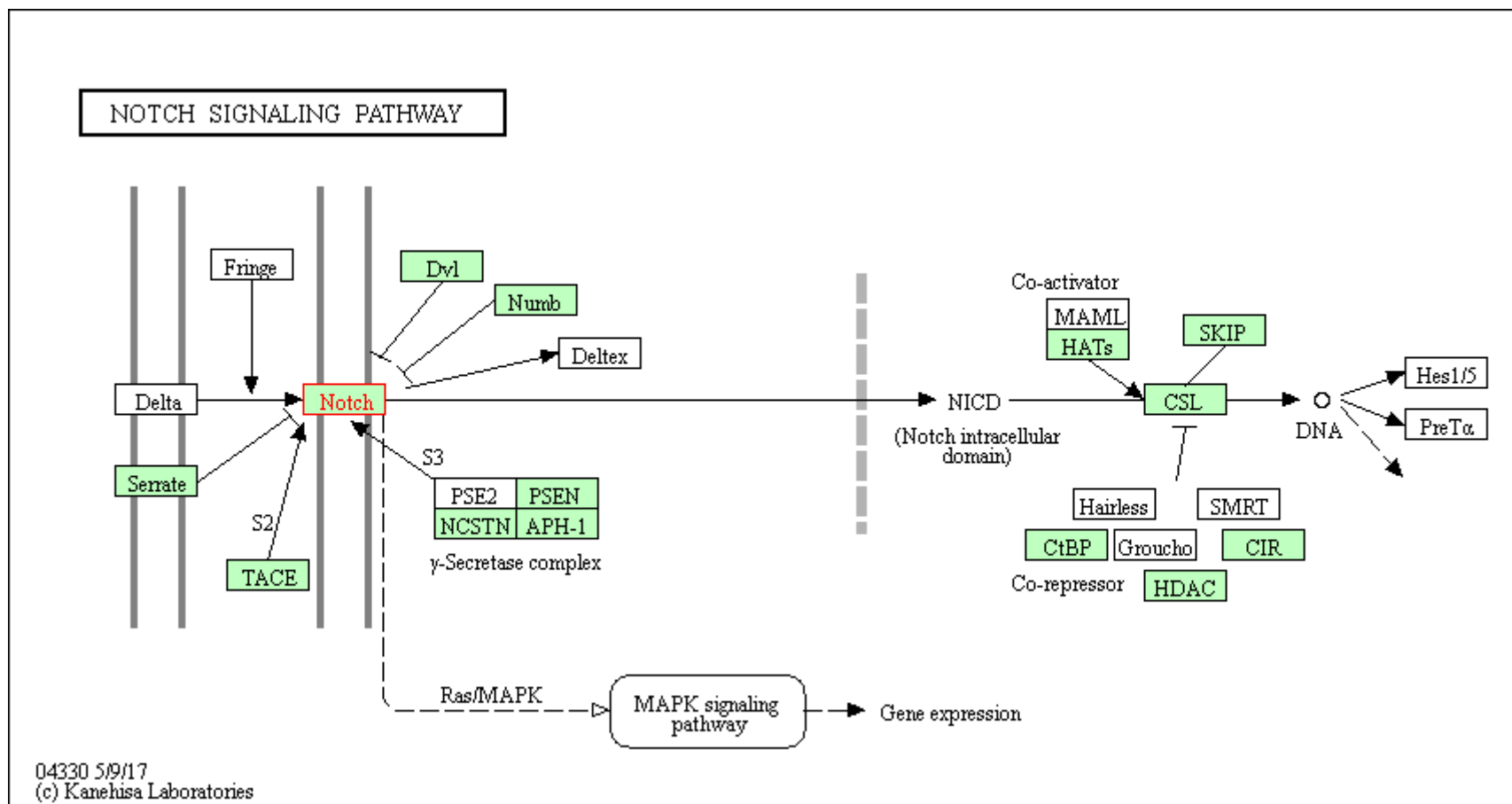
FS 4
FS 3
FS 2
FS 1
FM 3
FM 2
FM 1



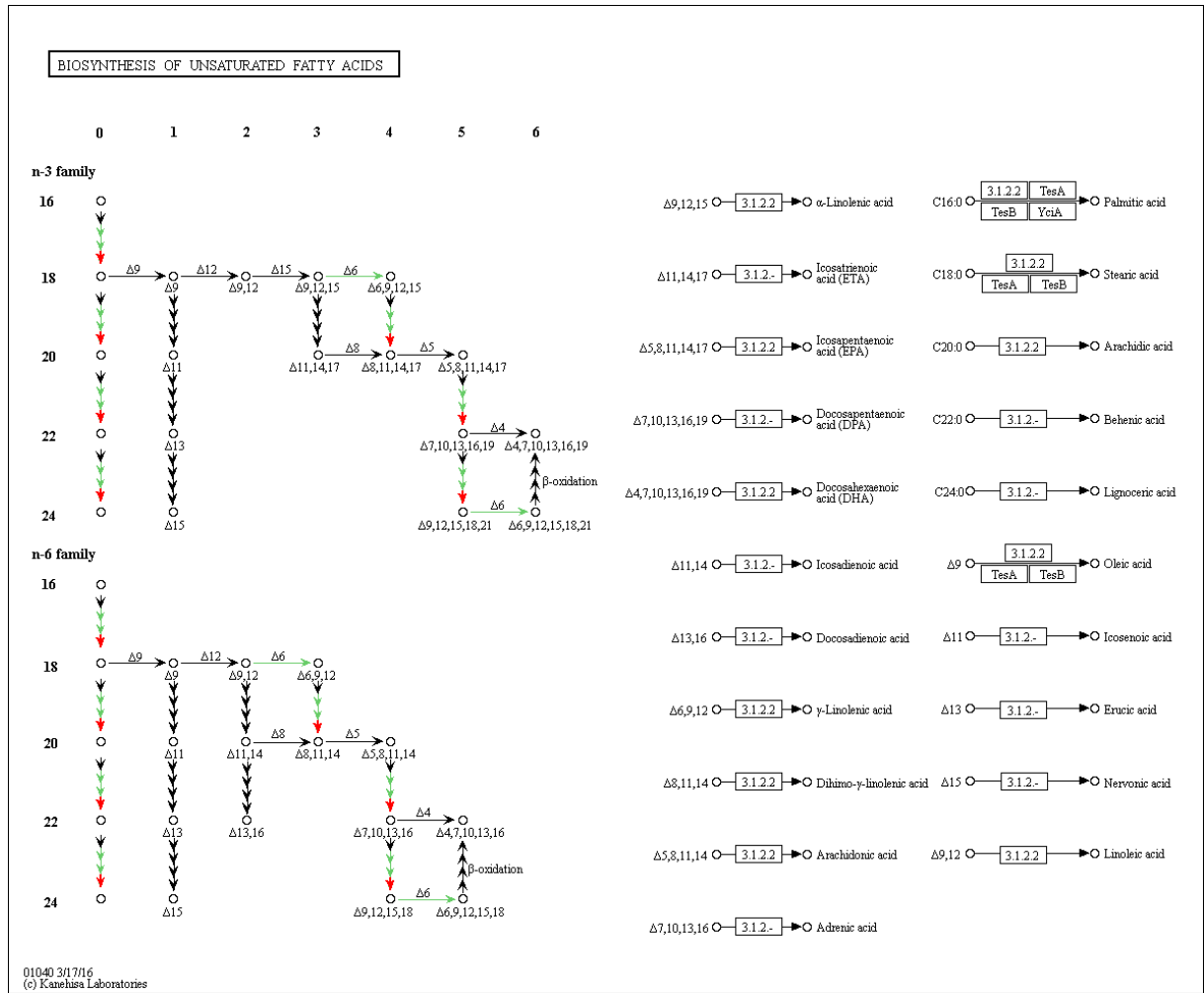
FS 4
FS 3
FS 2
FS 1
FM 3
FM 2
FM 1



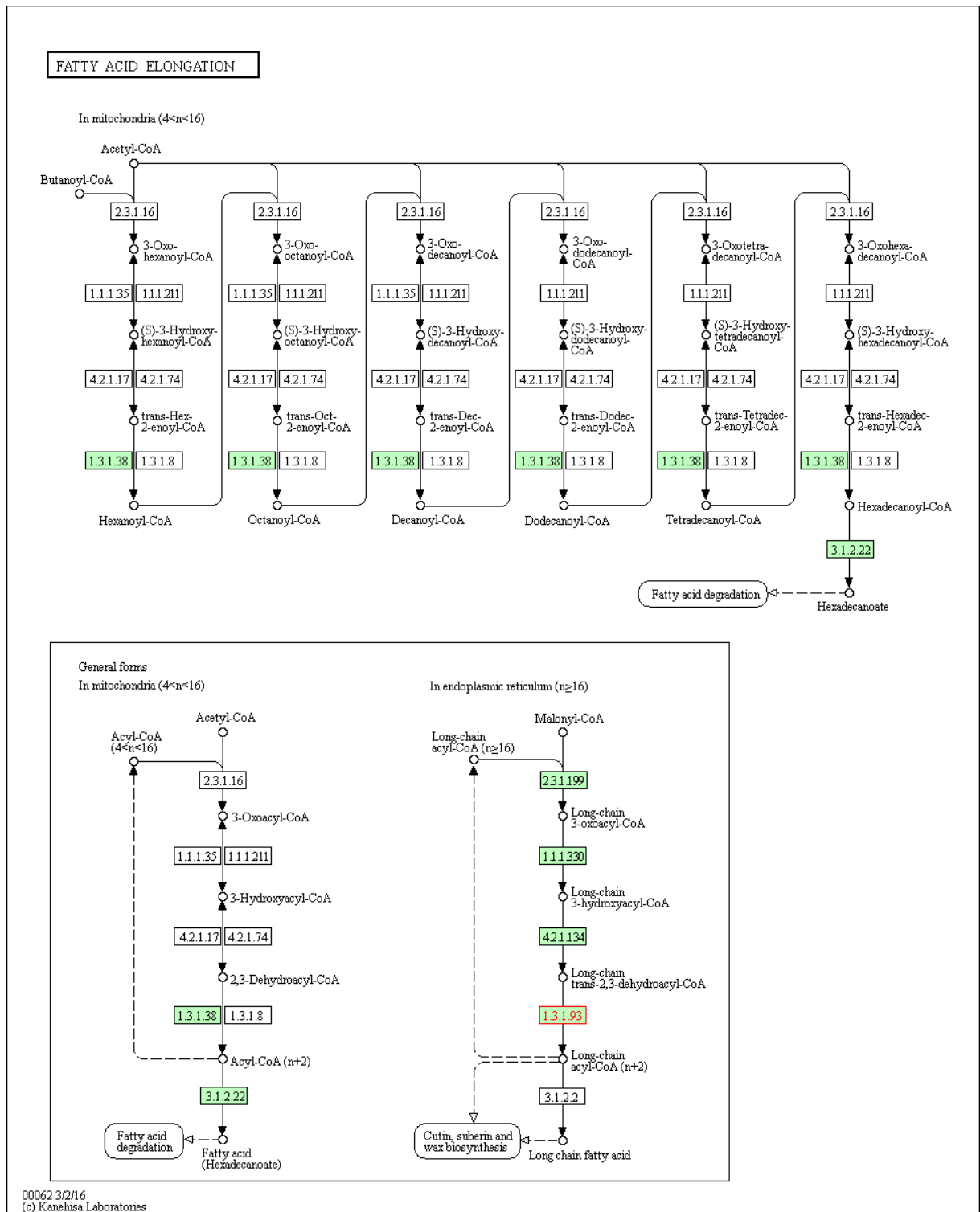
Anexo II: Diagrama gráfico da via de sinalização Notch gerado pelo KEGG. As caixas verdes representam os genes de *S. mansoni* expressos na via em questão. Em vermelho, está evidenciada a proteína *neurogenic locus notch protein* da Tabela 1.



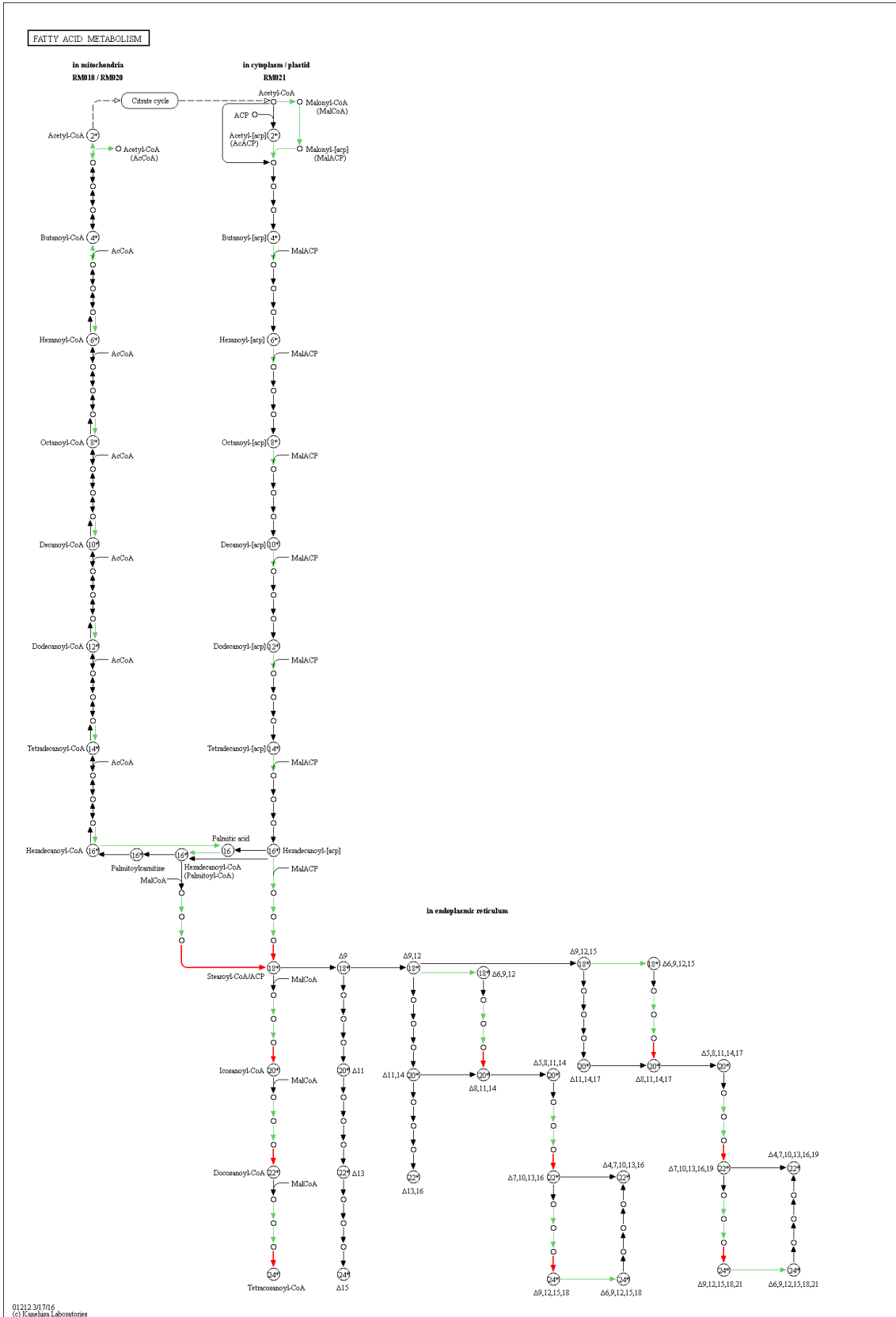
Anexo III: Diagrama gráfico da via de biossíntese de ácidos graxos insaturados gerado pelo KEGG. As setas verdes representam os genes de *S. mansoni* expressos na via em questão. Em vermelho, está evidenciada a proteína *synaptic glycoprotein sc2* da Tabela 1.



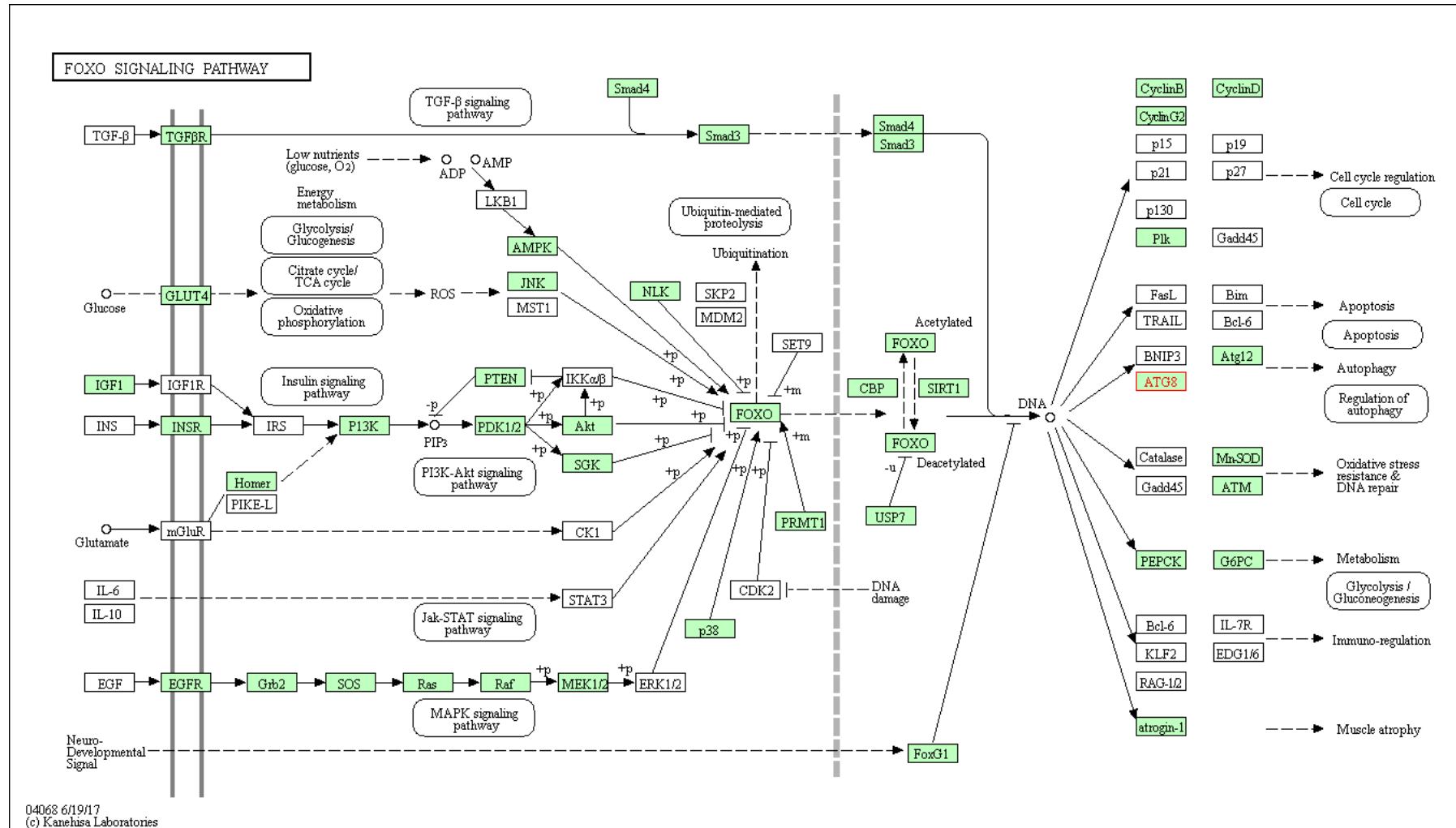
Anexo IV: Diagrama gráfico da via de alongamento de ácidos graxos gerado pelo KEGG. As caixas verdes representam os genes de *S. mansoni* expressos na via em questão. Em vermelho, está evidenciada a proteína *synaptic glycoprotein sc2* da Tabela 1.



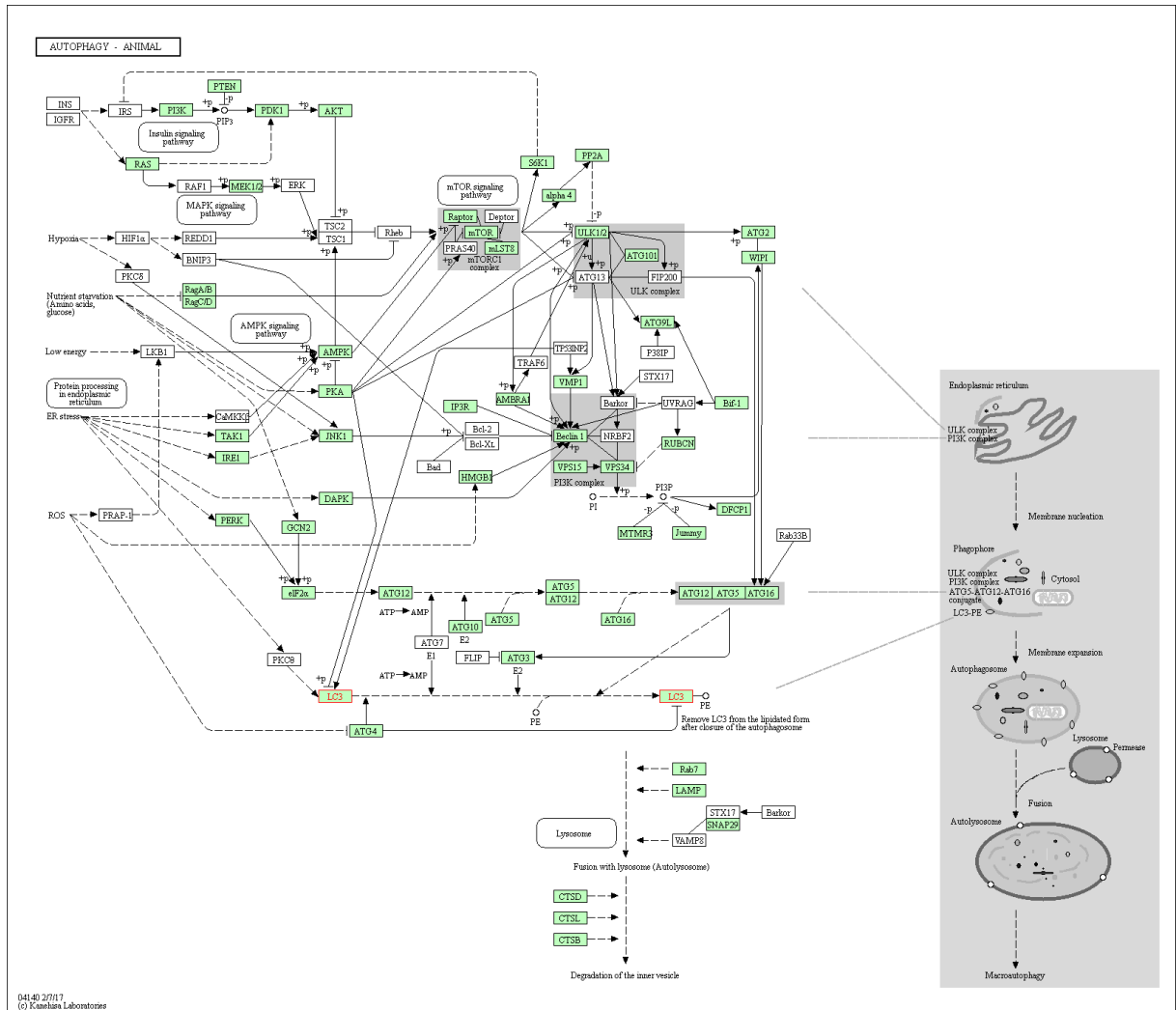
Anexo V: Diagrama gráfico do metabolismo de ácidos graxos gerado pelo KEGG. As setas verdes representam os genes de *S. mansoni* expressos na via em questão. Em vermelho, está evidenciada a proteína *synaptic glycoprotein sc2* da Tabela 1.



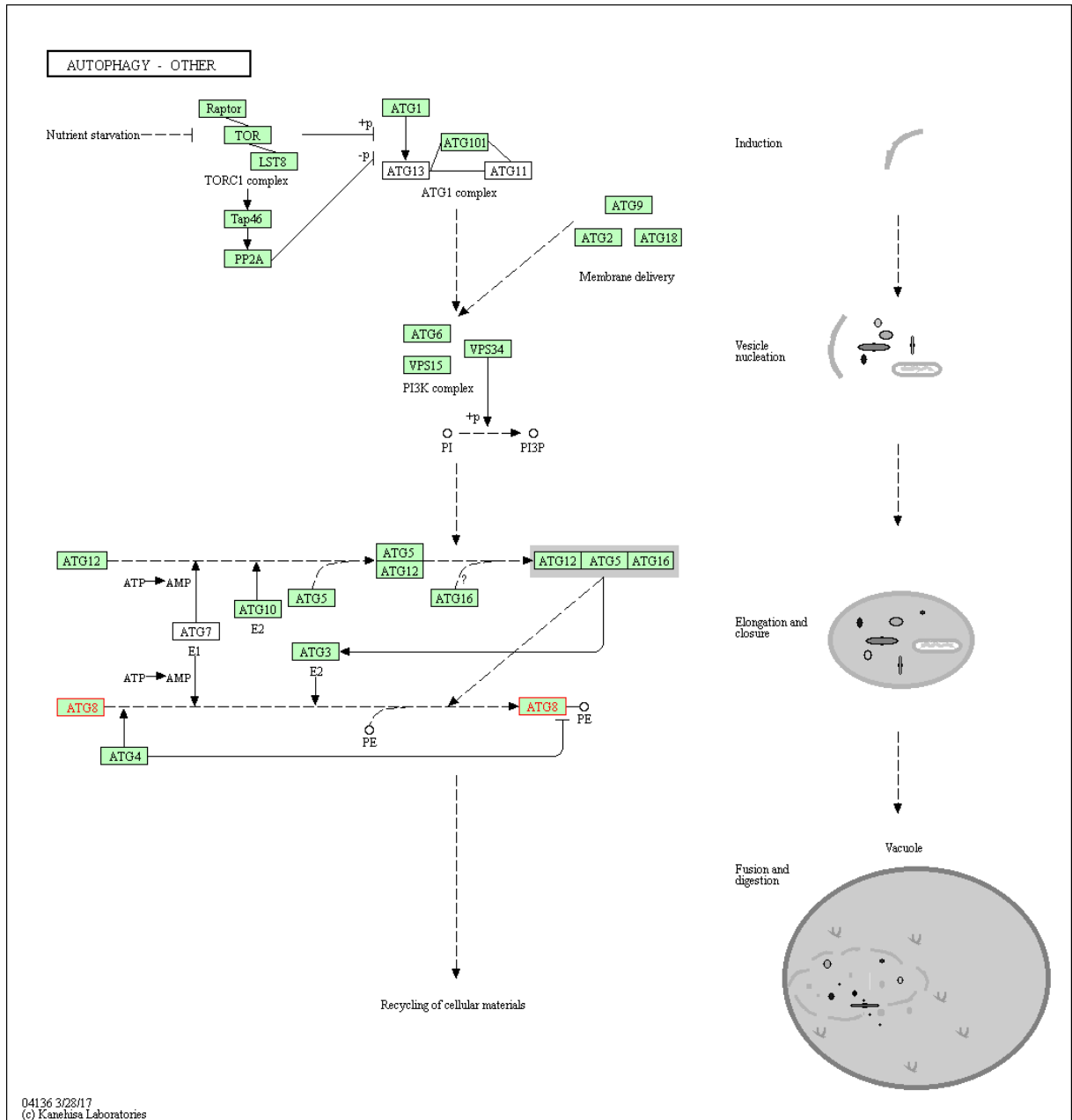
Anexo VI: Diagrama gráfico da via de sinalização FOXO gerado pelo KEGG. As caixas verdes representam os genes de *S. mansoni* expressos na via em questão. Em vermelho, estão evidenciadas as duas sequências *gaba(A) receptor associated protein* da Tabela 1.



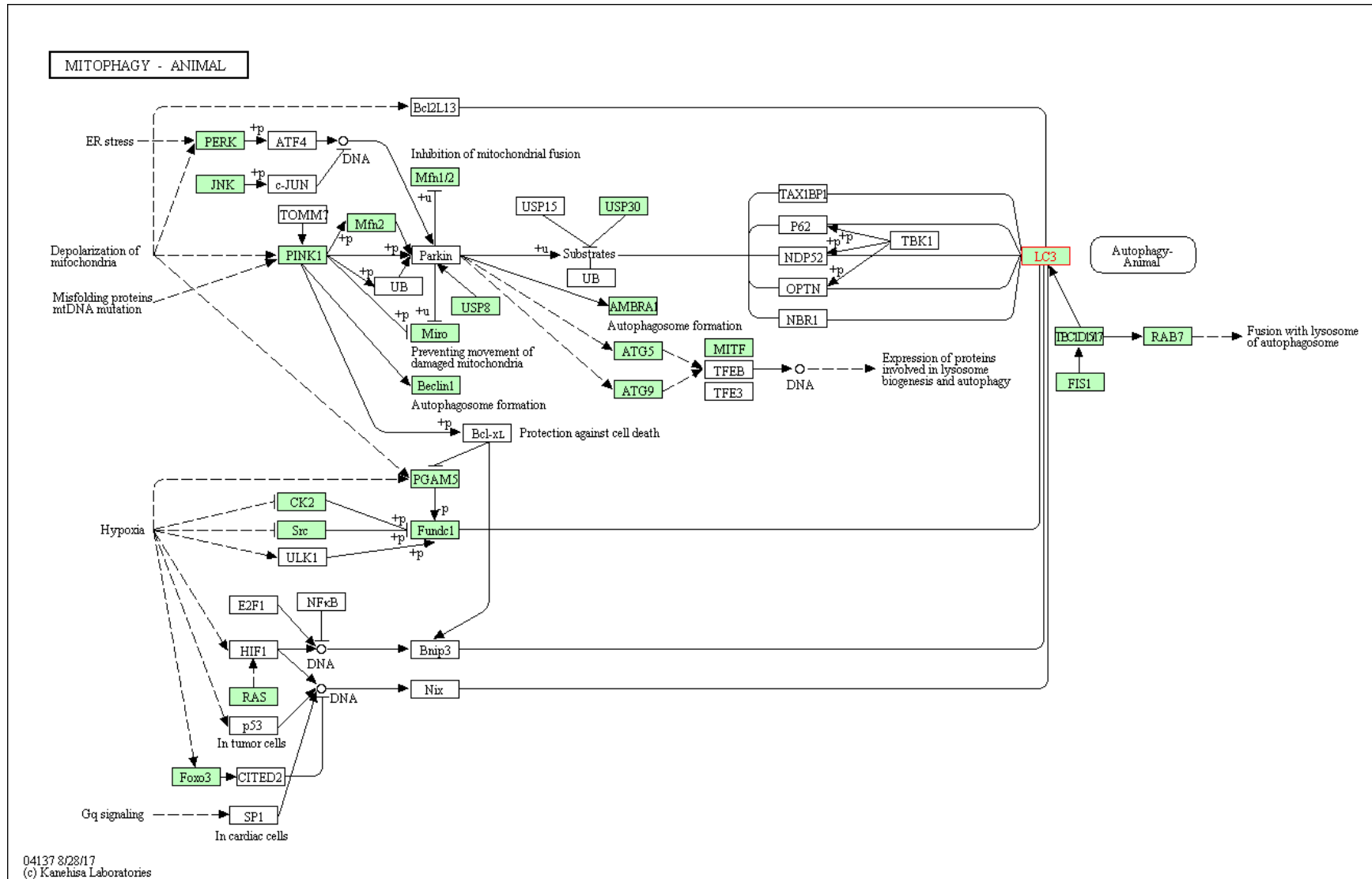
Anexo VII: Diagrama gráfico da via de autofagia gerado pelo KEGG. As caixas verdes representam os genes de *S. mansoni* expressos na via em questão. Em vermelho, estão evidenciadas as duas sequências *gaba(A) receptor associated protein* da Tabela 1.



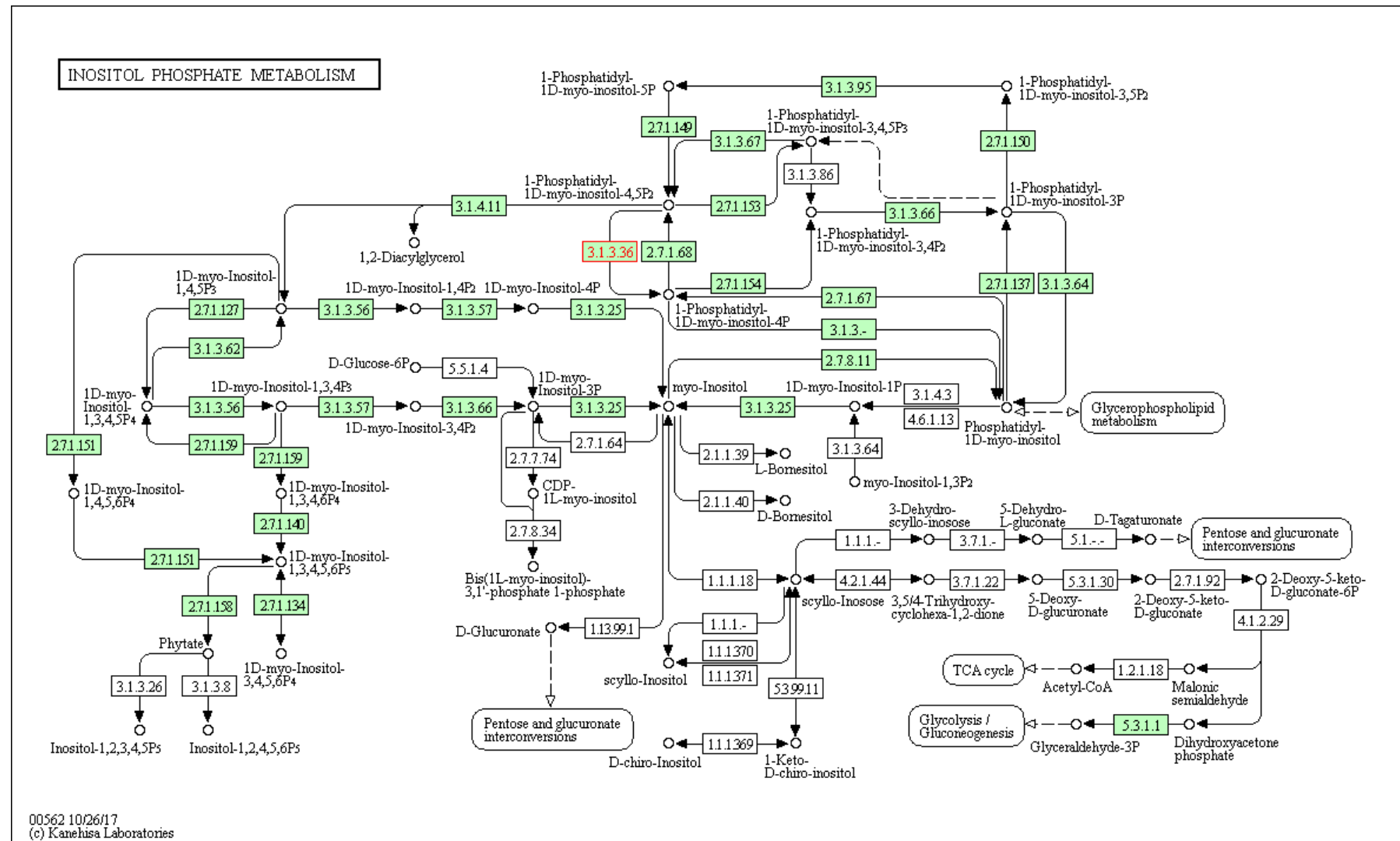
Anexo VIII: Diagrama gráfico da via de autofagia gerado pelo KEGG. As caixas verdes representam os genes de *S. mansoni* expressos na via em questão. Em vermelho, estão evidenciadas as duas sequências *gaba(A) receptor associated protein* da Tabela 1.



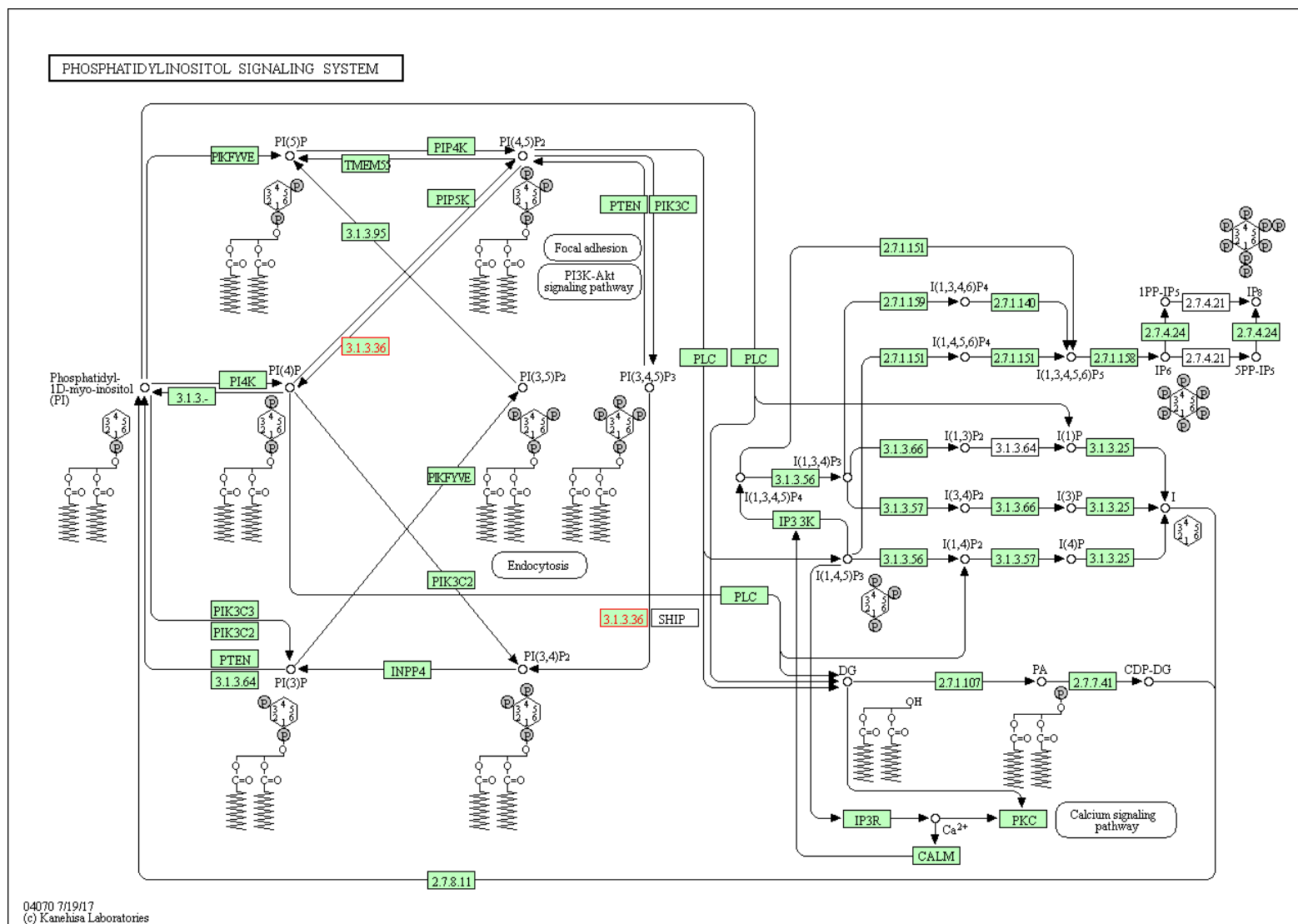
Anexo IX: Diagrama gráfico da via de mitofagia gerado pelo KEGG. As caixas verdes representam os genes de *S. mansoni* expressos na via em questão. Em vermelho, estão evidenciadas as duas sequências *gaba(A) receptor associated protein* da Tabela 1.



Anexo X: Diagrama gráfico do metabolismo de fosfato de inositol gerado pelo KEGG. As caixas verdes representam os genes de *S. mansoni* expressos na via questão. Em vermelho, está evidenciada a proteína *synaptojanin 1* da Tabela 1.



Anexo XI: Diagrama gráfico do sistema de sinalização de fosfatidilinositol gerado pelo KEGG. As caixas verdes representam os genes de *S. mansoni* expressos na via em questão. Em vermelho, está evidenciada a proteína *synaptojanin 1* da Tabela 1.



Anexo XII: Diagrama gráfico do transporte vesicular mediado por SNARE gerado pelo KEGG. As caixas verdes representam os genes de *S. mansoni* expressos na via em questão. Em vermelho, está evidenciada a proteína *synaptobrevin YKT6* da Tabela 1.

