



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA



Identificação das proteínas diferencialmente expressas nos hemócitos de populações de *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) (Gastropoda: Planorbidae) suscetível e resistentes a *Schistosoma mansoni* Sambon 1907 (Trematoda: Schistosomatidae)

Ivana Helena Rocha Oliveira

Belo Horizonte

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA



Identificação das proteínas diferencialmente expressas nos hemócitos de populações de *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) (Gastropoda: Planorbidae) suscetível e resistentes a *Schistosoma mansoni* Sambon 1907 (Trematoda: Schistosomatidae)

por

Ivana Helena Rocha Oliveira

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

Orientadora: Profa. Dra. Héli da Monteiro de Andrade
Coorientadora: Dra. Roberta Lima Caldeira

Belo Horizonte

2015

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de
água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”*

- Madre Teresa de Calcutá

AGRADECIMENTOS

A meus pais, pessoas admiráveis e exemplos de vida, pelo amor e carinho em todos os dias da minha vida, batalhando para me proporcionar uma boa educação. Muito obrigada pela compreensão, incentivo e apoio incondicionais em todos os momentos.

A minha irmã Isis, presente de Deus, por ser parte de mim. Obrigada pela amizade, pela irmandade, amor e carinho.

Ao Thiago, por trazer muita alegria e brilho a minha vida! Seu carinho, sorriso fácil, e companheirismo tornam a caminhada mais leve.

A meus familiares e amigos pelo incentivo e vibração a cada conquista.

À Dra. Héliida Monteiro de Andrade, minha orientadora, pelo acolhimento tão carinhoso, paciência e ensinamentos. Obrigada por compartilhar seus conhecimentos e contribuir para minha formação.

A minha coorientadora Dra. Roberta Lima Caldeira, que admiro desde a Iniciação Científica, agradeço pela oportunidade e confiança.

À Dra. Liana Konovallof Jannotti Passos pelas contribuições.

À equipe do Moluscário Lobato Paraense pela criação e infecção dos moluscos.

Aos amigos do LHMM pela longa parceria e ajuda nos mutirões da hemolinfa.

À “Turma do Naldo” pela amizade. Vocês tornaram prazerosos os momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. Alexandre Marques, Adriana, Ana Paula, Angélica, Bruna, Elaine, Gabriela, Henrique, João Carlos, Jordanna, Luísa, Nayara, Ramon, Sílvia, Simone e Tamara pela alegria e convivência harmoniosa.

Ao Luís Carlos Fialho Júnior pela paciência, disponibilidade e imensurável ajuda.

À Luciana, Newmar, Raquel Fellet, Grasi, Thessa e demais amigos do LATEC pela motivação e apoio nos estudos para a prova do Mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do ICB/UFMG.

A todos os funcionários, professores e alunos do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG.

À CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

A esquistossomose mansoni é uma das principais doenças parasitárias no mundo, sendo provocada por trematódeo da espécie *Schistosoma mansoni*, o qual possui caramujos do gênero *Biomphalaria* como hospedeiros invertebrados. No Brasil, *Biomphalaria tenagophila* é o segundo mais importante hospedeiro, apresentando linhagens altamente suscetíveis ao parasito e outras absolutamente resistentes. A natureza da resistência e suscetibilidade de *B. tenagophila* não é completamente esclarecida, mas admite-se que os hemócitos, células efetoras do sistema interno de defesa dos moluscos, desempenham papel crucial na contenção da infecção. Assim, o estudo expressão proteica pelos hemócitos em resposta à infecção por *S. mansoni* pode gerar informações relevantes que contribuam para a melhor compreensão de aspectos da interação parasito-hospedeiro. Este estudo comparou os perfis proteômicos de hemócitos da hemolinfa de populações de *B. tenagophila* resistentes (Taim/RS e Anchieta/ES) e suscetível (Cabo Frio/RJ), desafiadas ou não por *S. mansoni*. Através do DIGE e eletroforese bidimensional os perfis proteicos das três populações antes e após o desafio foram avaliados e, posteriormente, as proteínas diferencialmente expressas foram identificadas por espectrometria de massa. Foi possível observar proteínas com expressão alterada entre populações resistentes e suscetíveis, principalmente após a exposição a *S. mansoni*. Na população de Taim desafiada foi observada expressão aumentada de um componente da família das proteínas que contem tioéster (TEP) que é relacionada à fagocitose ou encapsulação de patógenos, bem como da proteína hipotética LOTGIDRAFT_234865 envolvida com a ligação e transporte de um produto resultante da formação de espécies reativas de oxigênio. O aumento da expressão de HSP70 e de frutose-bisfosfato aldolase em Cabo Frio desafiada pode estar relacionada com o fenótipo suscetível desta linhagem. A identificação das proteínas e a análise nos bancos de dados foram afetadas pela ausência do genoma completo de *B. glabrata*. Ainda assim, os resultados encontrados foram significativos e confirmaram a já conhecida complexidade da interação molecular entre *Biomphalaria* e *S. mansoni*.

Palavras-chave: *Biomphalaria tenagophila*, resistência, proteômica, *Schistosoma mansoni*, hemócitos

ABSTRACT

Schistosomiasis mansoni remains one of the main parasitic diseases in the world and is caused by a trematode of the species *Schistosoma mansoni*, whose invertebrate hosts are molluscs of the genus *Biomphalaria*. *Biomphalaria tenagophila* is an important host in Brazil, with some strains being highly susceptible to the parasite, whereas others are absolutely resistant to infection. The nature of the resistance and susceptibility of *B. tenagophila* is not completely understood, but it is assumed that the hemocytes, effector cells of molluscs internal defense system, play a crucial role in controlling trematode infections. Thus, the study of proteins produced by hemocytes in response to infection by *S. mansoni* can generate relevant contributions to a better understanding of host-parasite interaction. This study compared the proteomic profiles of hemocytes from the hemolymph of resistant *B. tenagophila* populations (Taim / RS and Anchieta / ES) and a susceptible one (Cabo Frio / RJ), challenged or not with *S. mansoni*. Through the two-dimensional electrophoresis and DIGE the protein profiles of the three populations before and after challenge were evaluated and then differentially expressed proteins were identified by mass spectrometry. The findings showed proteins with altered expression between resistance and susceptibility phenotypes, especially after exposure to *S. mansoni*. In the Taim challenged population, it was observed an elevation of two relevant proteins: a member of the thioester-containing proteins (TEP) family, which is related to phagocytosis or encapsulation of pathogens; and a hypothetical protein LOTGIDRAFT_234865 involved in binding and transport of a product of reactive oxygen species formation. Increased HSP70 and fructose-bisphosphate aldolase expression in Cabo Frio challenged may be related to this strain susceptible phenotype. The absence of the complete *B. glabrata* genome affected proteins identification and database analysis. Nevertheless, results were significant and confirmed the already known complexity of the molecular interaction between *Biomphalaria* and *S. mansoni*.

Keywords: *Biomphalaria tenagophila*, resistance, proteomics, *Schistosoma mansoni*, hemocytes

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Representação esquemática das populações utilizadas no estudo, seus fenótipos de suscetibilidade/resistência a *S. mansoni* e condições de desafio para realização dos procedimentos experimentais.....25
- Figura 2** Gel SDS-PAGE a 12% dos extratos proteicos dos grupos não desafiados (SD) e desafiados (CD) das três populações de *B. tenagophila* (ANC-Anchieta; CF – Cabo Frio; e TM-Taim).....37
- Figura 3** Imagens representativas de géis bidimensionais SDS-PAGE a 12% corados pela prata (*Strips* 7 cm, pH 4-7) mostrando o perfil proteômico da população de Anchieta sem desafio (A) e com desafio (B)..... 37
- Figura 4** Gel de DIGE nº 8 em *strips* de 18 cm pH 4 – 7 contendo amostras de populações não desafiadas por *S. mansoni* (imagem em preto e branco). A) Mix das amostras marcadas com Cy2 utilizado para a normalização, sendo o controle interno da reação; B) Anchieta marcado com Cy3; C) Taim marcado com Cy5; D) Sobreposição das 3 imagens (Cy2, Cy3 e Cy5).....38
- Figura 5** Gel de DIGE nº 5 em *strips* de 18 cm pH 4 – 7 contendo amostras de populações desafiadas por *S. mansoni* (imagem em preto e branco). A) Mix das amostras marcadas com Cy2 utilizado para a normalização, sendo o controle interno da reação; B) Taim marcado com Cy3; C) Cabo Frio marcado com Cy5; D) Sobreposição das 3 imagens (Cy2, Cy3 e Cy5).....38
- Figura 6** Imagem representativa de *spots* com diferença de expressão nas populações de Cabo Frio (A e E) e Taim (C e G) desafiadas, após as análises estatísticas no BVA. *Spot* da linhagem de CF (A) com expressão aumentada em relação ao mesmo *spot* em TM (C). *Spot* de TM (G) mais expresso quando comparado ao mesmo *spot* em CF (E). B, D, F e H representam as imagens tridimensionais dos seus respectivos *spots*.....40
- Figura 7** Agrupamento hierárquico (*Pattern Analysis*) da análise das populações não desafiadas com base no padrão de *spots* diferencialmente expressos ($P \leq 0,05$) selecionados (*spots* de interesse). Os valores de expressão relativa estão exibidos na escala colorimétrica usando o log de abundância padronizado, variando de -1 (regulado-negativamente; verde) para 1 (regulado-positivamente; vermelha).....41
- Figura 8** Agrupamento hierárquico (*Pattern Analysis*) da análise das populações desafiadas com base no padrão de *spots* diferencialmente expressos ($P \leq 0,05$) selecionados (*spots* de interesse). Os valores de expressão relativa estão exibidos na escala colorimétrica usando o log de abundância padronizado, variando de -1 (regulado-negativamente; verde) para 1 (regulado-positivamente; vermelha).....42
- Figura 9** Géis com os *spots* diferencialmente expressos e estatisticamente

significativos ($p \leq 0,05$) selecionados após testes *T-sudent* e *One-Way* ANOVA. Os *spots* de cada população e grupo receberam codificação. A) ANC-SD; B) CF-SD; C) TM-SD; D) ANC-CD; E) CF-CD e F) TM-CD.....44

Figura 10 Diagramas de Venn demonstrando o número de proteínas com aumento de expressão entre as populações resistentes e suscetível, sem (SD) e com (CD) desafio. A intersecção mostra a quantidade de proteínas com expressão aumentada em ambas as condições.....53

Figura 11 Categorização funcional das proteínas aumentadas oriunda da comparação entre as linhagens resistentes (ANC e TM) e a linhagem suscetível (CF) antes (A e C) e após (B e D) o desafio.....56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Programa de isoeletrofocalização utilizado para <i>strips</i> de 7 cm, pH 4-7....	28
Tabela 2	Marcação com <i>CyDye</i> dos extratos proteicos das populações do grupo desafiado. Cada amostra foi marcada com os três fluoróforos (Cy2, Cy3 e Cy5) e aparece em, no mínimo, três géis para que as análises estatísticas possam ser realizadas.....	30
Tabela 3	Marcação com <i>CyDye</i> dos extratos proteicos das populações do grupo não desafiado. Cada amostra foi marcada com os três fluoróforos (Cy2, Cy3 e Cy5) e aparece em, no mínimo, três géis para que as análises estatísticas possam ser realizadas.....	30
Tabela 4	Programa de isoeletrofocalização utilizado para <i>strips</i> de 18 cm, pH 4-7.....	31
Tabela 5	Quantidade de caramujos obtidos para os experimentos, volume de hemolinfa recuperado em cada população por grupo experimental e concentração média de proteínas.....	36
Tabela 6	Total de <i>spots</i> detectados por imagem/gel após análise no módulo DIA.....	39
Tabela 7	Dados detalhados sobre a quantidade de <i>spots</i> selecionados por análise/grupo.....	43
Tabela 8	Número de <i>spots</i> com expressão aumentada selecionados em cada população por grupo experimental.....	43
Tabela 9	Dados sobre a seleção e identificação dos <i>spots</i> através da espectrometria de massa por população/grupo experimental: os <i>spots</i> em vermelho foram identificados por MALDI).....	46
Tabela 10	Descrição dos sobre os <i>spots</i> retirados e identificados através da espectrometria de massa nas populações de cada uma das análises /grupo: os <i>spots</i> em vermelho foram identificados pelo MALDI.....	47
Tabela 11	Lista de proteínas identificadas com detalhes a respeito da população/grupo em que apresentou expressão aumentada, <i>spots</i> em que foi encontrada, <i>GenInfo Identifier</i> (GI) e o organismo em que foi identificada.....	49
Tabela 12	Comparação do aumento de expressão das proteínas identificadas neste estudo por população, antes e após o desafio.....	52
Tabela 13	Categorização funcional das proteínas identificadas segundo análise no <i>Gene Ontology</i> e <i>FunCat</i>	54

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

2-DE	Eletroforese Bidimensional
APO	rgo Produtor de Hemócitos (<i>Amoebocyte-Producing Organ</i>)
BLAST	Ferramenta de Busca de Alinhamento Local Básico
BVA	Análise de Variao Biológica (<i>Biological Variation Analysis</i>)
CBSS	Soluo salina balanceada de Chernin
CHAPS	3-[(3-cholamidopropil) dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propanesulfonato
DIA	Análise Diferencial no gel (<i>Differential in-gel Analysis</i>)
DIGE	Gel de Eletroforese Diferencial (<i>Differential Gel Electrophoresis</i>)
DTT	Ditiotreitol
EDA	Análise de Dados Estendido (<i>Extended Data Analysis</i>)
FREP	Proteína Relacionada a Fibrinognio
FunCat	Catálogo Funcional (<i>Functional Catalogue</i>)
GI	Identificador <i>GenInfo</i>
GO	<i>Gene Ontology</i>
HSP70	Proteína de choque térmico 70
IAA	Iodoacetamida
IEF	Focalizao isoelétrica
IPG	Gradiente de pH Imobilizado (<i>Immobilized pH Gradient</i>)
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization
MM	Massa Molecular
MS	Espectrometria de massa (<i>Mass Spectrometry</i>)
NCBI	Centro Nacional para Informao em Biotecnologia (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)
pI	Ponto Isoelétrico
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio
SID	Sistema Interno de Defesa
TA	Temperatura Ambiente
TEP	Proteína que Contem Tioéster
ToF/ToF	Tempo de voo (<i>Time of Flight</i>)
UniProt	Recurso de Proteína Universal (<i>Universal Protein Resource</i>)
WHO	Organizao Mundial da Saúde (<i>World Health Organization</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	JUSTIFICATIVA	22
3	OBJETIVOS	23
3.1	Objetivo geral	23
3.2	Objetivos específicos	23
4	MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1	Moluscos	24
4.2	<i>Schistosoma mansoni</i>	24
4.3	Limpeza e desinfecção dos moluscos	24
4.4	Desafio dos moluscos a <i>Schistosoma mansoni</i>	25
4.5	Coleta da hemolinfa	25
4.6	Separação do hemócito	26
4.7	Análise Proteômica	26
4.7.1	<i>Extração das proteínas dos hemócitos</i>	26
4.7.2	<i>SDS/PAGE</i>	27
4.7.3	<i>Eletroforese Bidimensional (2-DE)</i>	27
4.7.3.1	<i>Focalização isoeletrica</i>	27
4.7.3.2	<i>SDS-PAGE</i>	28
4.7.4	<i>Gel de Eletroforese Diferencial</i>	29
4.7.5	<i>Análise dos géis fluorescentes</i>	310
4.7.6	<i>Tratamento dos spots para espectrometria de massas</i>	33
4.7.7	<i>Espectrometria de Massa (MS)</i>	344
4.7.8	<i>Categorização funcional das proteínas</i>	34
5	RESULTADOS	366
5.1	Moluscos	366
5.2	Análise proteômica	366
5.2.1	<i>Gel de eletroforese diferencial</i>	388
5.2.2	<i>Análise dos géis fluorescentes</i>	399
5.2.3	<i>Identificação das proteínas</i>	455
5.2.4	<i>Categorização funcional das proteínas</i>	544
6	DISCUSSÃO	588

7	CONCLUSÃO	655
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	666

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma parasitose tropical que tem como agentes etiológicos trematódeos digenéticos pertencentes ao gênero *Schistosoma* (Trematoda: Schistosomatidae). São cinco as espécies que causam infecções de importância médica no homem, sendo elas: *Schistosoma haematobium* (Bilharz, 1852), *Schistosoma japonicum* Katsurada, 1904, *Schistosoma mekongi* Vogt, Brickner e Bruce, 1978, *Schistosoma intercalatum* Fischer, 1934 e *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907. A transmissão destas espécies já foi reportada em 78 países distribuídos nas regiões tropicais e subtropicais do globo (WHO 2014). Estima-se que cerca de 200 milhões de indivíduos estejam infectados no mundo e que o número de pessoas vivendo em áreas de risco ultrapasse os 770 milhões (Chitsulo et al. 2000, Steinmann et al. 2006). Entretanto, estes números podem ser questionados, uma vez que o cenário epidemiológico em muitos países se alterou nos últimos anos e há escassez de estudos atualizados (Utzinger et al. 2011, WHO 2012). Ainda assim, dados da Organização Mundial de Saúde (WHO) (2014) mostram que aproximadamente 249 milhões de indivíduos requisitaram quimioterapia preventiva em 31 países no ano de 2012, e que 42,1 milhões reportaram terem sido tratados no período compreendido entre 2011-2012. Em virtude desta realidade, a esquistossomose ocupa a posição de segunda mais importante doença parasitária no mundo.

No Brasil, a única espécie de *Schistosoma* com transmissão estabelecida e que causa a doença em humanos é *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907. Baseando-se em dados da Fundação Nacional de Saúde, Katz & Peixoto (2000) estimaram que 6,3 milhões de indivíduos de 18 estados da federação eram portadores do parasito. No país a esquistossomose é endêmica nos estados de Alagoas, Maranhão, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Paraíba, Sergipe, Espírito Santo e Minas Gerais. Em outros estados como Pará, Piauí, Ceará, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e no Distrito Federal a doença ocorre de maneira focal, abrangendo áreas pouco extensas (Ministério da Saúde 2012).

No ciclo de *S. mansoni*, ovos do parasito contidos nas fezes de indivíduo infectado atingem a água e o miracídio eclode, nadando ativamente até penetrar o tegumento dos hospedeiros intermediários, caramujos do gênero *Biomphalaria*. Neste processo, o parasito sofre mudanças fisiológicas e morfológicas que o transformam em esporocisto primário, o qual se reproduz assexuadamente e modifica-se para esporocisto

secundário duas semanas após a penetração. Este último migra para o hepatopâncreas e órgãos reprodutivos do caramujo onde serão formadas as cercárias, cuja liberação pelo caramujo se dá cerca de trinta dias depois. O homem é infectado ao entrar em contato com água contaminada com as cercárias, as quais penetram a pele, se transformam em esquistossômulos e finalmente atingem a fase adulta e maturidade sexual no sistema porta (Melo & Coelho 2010).

A esquistossomose configura-se como relevante problema de saúde pública, estando intimamente associada à pobreza e ao baixo desenvolvimento econômico e social (Katz & Peixoto 2000, Utzinger et al. 2011). Os focos de transmissão da doença se estabelecem quando coleções aquáticas são contaminadas com fezes humanas contendo ovos de *Schistosoma mansoni*, o que se dá quando há ausência de sistema de saneamento adequado. Aliado a isto, para que a transmissão ocorra, também é condição fundamental que tais coleções abriguem populações suscetíveis de *Biomphalaria*. Este fato é ilustrado por estudo de Scholte et al. (2014), o qual utilizou dados de prevalência da esquistossomose no Brasil e modelos geoestatísticos para construção de um mapa de risco para a enfermidade. A partir dos resultados encontrados, os autores demonstraram que quanto maior a probabilidade da presença do hospedeiro intermediário, maior o risco de esquistossomose.

O controle da esquistossomose mostra-se um desafio, principalmente nos países onde ela é altamente endêmica. Encontram-se entre as medidas de controle: educação em saúde da população de risco, obras de engenharia sanitária que incluam o tratamento de esgoto e fornecimento de água potável, tratamento individual ou em massa dos indivíduos residentes em área de alta prevalência, bem como eliminação dos caramujos através de métodos químicos, físicos e biológicos (Katz 1998, Coura & Amaral 2004). Esta última medida tem sido considerada importante alternativa para o controle, uma vez que a principal estratégia dos programas de controle baseia-se na quimioterapia preventiva com praziquantel, a única droga atualmente disponível (WHO 2006).

O gênero *Biomphalaria* está compreendido no filo Mollusca, classe Gastropoda, subclasse Pulmonata, Ordem Basommatophora e família Planorbidae. É caracterizado por espécies pulmonadas e límnicas que apresentam uma concha discoidal enrolada em espiral plana (planispiral), a qual apresenta um aprofundamento do giro central de ambos os lados, o que deu origem ao termo que denomina o gênero (*Biomphalaria*: do latim *bis* = duas vezes, do grego *omphalos* = umbigo) (Paraense

2008). A hemolinfa destes caramujos é vermelha em virtude da alta concentração de hemoglobina no plasma (Zelck et al. 1995).

Atualmente são reconhecidas 11 espécies e uma subespécie de *Biomphalaria* no território brasileiro: *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835), *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848), *Biomphalaria peregrina* (Orbigny, 1835), *Biomphalaria schrammi* (Crosse, 1864), *Biomphalaria kuhniana* (Clessin, 1883), *Biomphalaria intermedia* Paraense & Deslandes, 1962, *Biomphalaria amazonica* Paraense, 1966, *Biomphalaria cousini* Paraense, 1966, *Biomphalaria oligoza* Paraense, 1974, *Biomphalaria occidentalis* Paraense, 1981 e *Biomphalaria tenagophila guaibensis* Paraense, 1984. Destas, somente *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* são encontradas naturalmente infectadas pelo *S. mansoni*, enquanto *B. amazonica*, *B. peregrina* e *B. cousini* são consideradas hospedeiras em potencial, visto que podem se infectar experimentalmente (Corrêa & Paraense 1971, Paraense & Corrêa 1973, Teodoro et al. 2010).

Dentre as espécies hospedeiras invertebradas de *S. mansoni*, a de maior importância epidemiológica nas Américas é *B. glabrata* pelo seu alto grau de suscetibilidade ao parasito, bem como pela extensa distribuição geográfica – principalmente nas regiões Sudeste e Nordeste (Paraense 2008).

Biomphalaria tenagophila é o segundo mais importante hospedeiro intermediário da esquistossomose no Brasil, apresentando crescente importância epidemiológica devido à descoberta de novos focos da doença mantidos por ela no país (Souza et al. 1995a, Paraense 2001). Sua distribuição geográfica compreende larga faixa costeira que se inicia no sul da Bahia e alcança o Rio Grande do Sul, sendo responsável pela transmissão da doença no estado de São Paulo e alguns focos isolados em Santa Catarina, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul (Paraense 1986, Carvalho et al. 2008).

Biomphalaria straminea é encontrada em altas densidades populacionais no Nordeste brasileiro, onde é a hospedeira intermediária de *S. mansoni*. Contudo, as taxas de infecção natural desta espécie são baixas (Barbosa 1995).

Diversos trematódeos digenéticos dependem de moluscos gastrópodes para completar seu ciclo de vida, uma vez que é no interior destes invertebrados que realizam a reprodução assexuada (van der Knaap & Loker 1990). Este fenômeno em que o parasito utiliza um restrito grupo de hospedeiros é conhecido como especificidade. Sendo assim, a maioria das espécies de trematódeos digenéticos é capaz de obter

sucesso na infecção em uma única família, gênero ou mesmo espécie de caramujo. É o caso da interação entre *S. mansoni* e caramujos do gênero *Biomphalaria*, pois o primeiro só é capaz de infectar e se desenvolver em determinadas espécies ou linhagens geográficas do seu hospedeiro intermediário (Loker et al. 2004).

Dá-se o nome de compatibilidade à relação que permite o parasito reconhecer, penetrar e se desenvolver dentro do caramujo, e posteriormente liberar cercárias (van der Knaap & Loker 1990, Souza et al. 1995a, Webster & Davies 2001). Uma interação incompatível, que ocorre nos caramujos resistente, acontece quando o miracídio de *S. mansoni* falha ao completar algum destes eventos, ou, caso consiga, é reconhecido pelo organismo do caramujo como um corpo estranho e é então destruído pelo sistema interno de defesa (Webster & Davies 2001). A especificidade tem como efeito prático a definição de locais onde o parasito pode ser encontrado, limitados a áreas ocupadas por caramujos compatíveis, o que é consideravelmente significativo considerando as espécies de *Schistosoma* de importância médica (van der Knaap & Loker 1990, Loker et al. 2004).

A suscetibilidade das diferentes espécies de *Biomphalaria* à infecção pelo *S. mansoni* é variável, podendo ser dependente da cepa do parasito. *Biomphalaria glabrata* é a espécie mais compatível, enquanto *B. tenagophila* apresenta-se mais resistente à infecção pelo *S. mansoni*, conforme demonstrado por Silva et al. (1994) e Souza et al. (1995a,b).

Paraense & Corrêa (1963) relataram diferentes níveis de suscetibilidade de 23 populações de *B. glabrata* quando submetidas à infecção por uma linhagem de *S. mansoni* proveniente de Belo Horizonte. Entretanto, esta espécie não mostra resistência absoluta ao parasito, nem mesmo a linhagens artificialmente selecionadas em laboratório (Coelho et al. 2004). Por outro lado, *Biomphalaria tenagophila* é a espécie que possui as maiores variações nos níveis de suscetibilidade ao parasito. Paraense & Corrêa (1978) demonstraram que *B. tenagophila* de 18 localidades brasileiras apresentou linhagens altamente suscetíveis e totalmente resistentes à infecção (níveis variando de 91,5 a 0%) quando submetida à cepa SJ (São José dos Campos, SP) de *S. mansoni*. Corrêa et al. (1979) mostraram que duas linhagens distintas de *B. tenagophila* apresentaram total incompatibilidade quando expostas à cepa LE (Belo Horizonte, MG) do parasito, mas bons índices de infecção foram alcançados quando se utilizou a cepa SJ.

Foi demonstrado que *B. tenagophila* oriunda da região de Cabo Frio (RJ) é 100% suscetível à cepa SJ de *S. mansoni* (Corrêa et al. 1979), sendo utilizada em diversos estudos de investigação da suscetibilidade desta espécie (Coelho & Bezerra 2006, Pereira et al. 2008, Nacif-Pimenta et al. 2012). Em contrapartida, a linhagem de *B. tenagophila* proveniente da Estação Ecológica de Taim (RS) apresenta consistente resistência frente à infecção por diferentes cepas de *S. mansoni* e cargas de miracídio (Santos et al. 1979, Bezerra et al. 2003, Martins-Souza et al. 2003, Rosa et al. 2005, Barbosa et al. 2006). Esta população tornou-se um bom modelo experimental, sendo utilizada em muitos estudos de interação parasito-hospedeiro envolvendo a relação de suscetibilidade e resistência a *S. mansoni* (Coelho et al. 2004). Além disso, os conhecimentos gerados por estes estudos podem ser aplicados no desenvolvimento de um modelo de controle biológico. Exemplo disso é o estudo realizado por Marques et al. (2014) no município de Bananal (SP). Em um córrego povoado por *B. tenagophila* suscetíveis a *S. mansoni* foram introduzidos espécimes de *B. tenagophila* da linhagem de Taim, que possui um marcador genético populacional, conforme estabelecido por Barbosa et al. (2006), que possibilita posterior identificação. Amostras dos descendentes gerados foram capturadas e examinadas em diferentes intervalos de tempo e, ao longo de 14 meses, observou-se que a taxa de infecção dos caramujos pelo parasito sofreu significativa redução (38,6-26,5% para 2,1%). Ainda foi possível estabelecer correlação entre a ausência da infecção e a presença do marcador molecular de 350pb característico da linhagem de Taim, uma vez que somente 2,3% dos espécimes capturados e que apresentavam o marcador estavam infectados. Em contraste, a infecção foi identificada em 30,2% dos caramujos capturados e que não possuíam o marcador.

Investigações conduzidas por Jannotti-Passos et al. (2012) constataram que outra população de *B. tenagophila* oriunda de Anchieta (ES) também demonstra total resistência às cepas LE, SJ e AL de *S. mansoni*. Três grupos de 100 caramujos foram expostos individualmente a uma carga infectante de 100 miracídios/molusco das três cepas do parasito e em todas as situações foi verificada uma taxa de infecção de 0%.

Até recentemente, pouco se sabia a respeito da modulação dos fenótipos de resistência e suscetibilidade, bem como dos mecanismos fisiológicos de defesa dos moluscos do gênero *Biomphalaria*. Newton (1952) investigou pela primeira vez a natureza de alguns fatores que influenciavam a suscetibilidade de *B. glabrata* a *S. mansoni*, concluindo ser um caráter herdado e condicionado a múltiplos fatores genéticos. Posteriormente, esta ideia foi reforçada por Richards et al. (1976, 1977,

1987), cujos estudos revelaram que o caráter resistência, adquirido na maturidade, é determinado por um único gene dominante, com herança mendeliana. Investigações relacionadas com aspectos genéticos da resistência à infecção também foram feitas utilizando *B. tenagophila*. Rosa et al. (2005) realizaram cruzamentos entre *B. tenagophila* de Taim e *B. tenagophila* de Joinville (suscetível ao parasito) a fim de estudar a transmissão genética do caráter de resistência à infecção por *S. mansoni* e puderam observar que tal resistência é dominante e influenciada por um gene principal, embora outros genes secundários também participem.

Um dos elementos que influenciam a suscetibilidade e que pode ser geneticamente determinado é a atividade do sistema interno de defesa (SID) dos caramujos. Este sistema, embora não apresente elementos capazes de gerar a diversidade de reconhecimento observada durante a resposta imunológica dos vertebrados, é utilizado pelos caramujos para combater organismos invasores em virtude de sua capacidade de discriminar e destruir agentes infecciosos (van der Knaap & Loker 1990, Negrão-Corrêa et al. 2008).

O SID dos caramujos é composto por elementos celulares, constituídos pelos hemócitos ou amebócitos, e por fatores solúveis presentes na hemolinfa (van der Knaap & Loker 1990), e ambos atuam em associação durante a resposta do caramujo frente à infecção.

A principal função dos hemócitos é circular livremente na hemolinfa e nos tecidos para reconhecer e fagocitar antígenos *non-self*, incluindo microrganismos invasores como vírus e bactérias, ou encapsular estruturas maiores como helmintos, e então destruí-los (van der Knaap & Loker 1990). Estas células de defesa apresentam origem multicêntrica, sendo observada a produção em vários tecidos hematopoéticos (Souza & Andrade 2006, 2012), e sua importância no mecanismo de destruição de larvas de *S. mansoni* já foi evidenciada em diversos estudos (Sullivan & Spence 1994, Sullivan et al. 1995, Nacif-Pimenta et al. 2012). Análises histopatológicas de *B. tenagophila* de Cabo Frio e Taim infectados com *S. mansoni* mostraram que a infiltração de hemócitos ao redor do parasito foi mais rápida e exacerbada em linhagens de caramujos mais resistentes (Nacif-Pimenta et al. 2012). Além disso, experimentos nos quais *B. glabrata* suscetíveis receberam, através de transplante, o órgão produtor de hemócitos (APO) (Vasquez & Sullivan 2001) de *B. tenagophila* resistentes (Taim) foi, demonstraram aumento de resistência à infecção pelo parasito nestes moluscos (Barbosa et al. 2006).

Dois principais tipos de hemócitos circulantes podem ser distinguidos na hemolinfa de *Biomphalaria*: os hialinócitos e os granulócitos. Os hialinócitos são células esféricas quando aderidas à superfície do vidro, caracterizadas pela pequena quantidade de organelas no citoplasma, pouco ou nenhum grânulo semelhante a lisossomos e ausência de pseudópodes extensos. Os granulócitos, em contrapartida, apresentam-se maiores, com presença de pseudópodes e capacidade de fagocitose e encapsulação (Harris 1975, Barraco et al. 1993, Borges & Andrade 2003). Para alguns autores, os granulócitos de Gastropoda exerceriam função semelhante à dos macrófagos de mamíferos. Com relação à quantidade e morfologia dos granulócitos e hialinócitos, Barraco et al. (1993) mostraram que as subpopulações destes dois tipos celulares apresentam similaridade em *B. glabrata* e *B. tenagophila*.

Observa-se que os hemócitos modulam os fenótipos de suscetibilidade e resistência do molusco. Desta forma, o estudo dos mesmos tem sido considerado de extrema importância para o entendimento dos processos relacionados à infecção, bem como dos processos que fazem do molusco resistente ou suscetível ao parasito (Oliveira et al. 2010).

Os hemócitos produzem e secretam proteínas proteolíticas que tem o papel de opsonizar e agregar antígenos estranhos a fim de facilitar a fagocitose (Richards & Renwranz 1991). Estes fatores solúveis da hemolinfa participam dos mecanismos de proteção contra patógenos, através de interações diretas com os mesmos, levando à produção de substâncias tóxicas ou peptídeos líticos. Outra possível alternativa é que tal interação ocorra de maneira indireta, por meio de moléculas mediadoras com papel de reconhecer o agente infeccioso ou ativar as células de defesa (Negrão-Corrêa et al. 2007). Resultados encontrados por Van der Knaap et al. (1981) sugeriram que amebócitos de *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758) (Gastropoda, Basommatophora) sintetizavam e expressavam lectinas em sua superfície para atuarem como receptores para agentes estranhos ao organismo do animal. Lectinas são proteínas com habilidade de se ligar especificamente e de forma reversível em carboidratos, tendo como principal função facilitar o contato entre células. Os hemócitos de moluscos produzem lectinas que podem atuar de maneiras distintas: elas podem ser liberadas no plasma, onde imobilizam material particulado por aglutinação; ou são expressas na membrana dos hemócitos circulantes para atuarem como receptores citofílicos para corpos estranhos (van der Knaap & Loker 1990). Zelck et al. (1995) investigaram as proteínas do plasma de quatro diferentes linhagens de *B. glabrata* resistentes e suscetíveis a duas cepas de

S. mansoni e observaram que todos os caramujos apresentaram glicoproteínas e lectinas no plasma. As lectinas mostram especificidade para carboidratos que ocorrem na superfície de hemócitos e do próprio parasito atuando, portanto, como aglutininas e opsoninas.

O mecanismo de reconhecimento e destruição dos esporocistos pelos moluscos é resultado de ação conjunta de hemócitos e fatores solúveis (Bayne et al. 1980). A defesa dos caramujos geralmente ocorre por intermédio da destruição total ou parcial do esporocisto primário de *S. mansoni* nas primeiras horas após a penetração do miracídio. Os esporocistos seriam destruídos pelos hemócitos por meio de um processo que se inicia com a atração destas células para a proximidade do esporocisto primário, sugerindo uma resposta quimiotática (Negrão-Corrêa et al. 2008).

O reconhecimento da presença do parasito pelos hemócitos é a primeira etapa que deve ocorrer para que os mecanismos de defesa sejam ativados. O tegumento do miracídio em transformação é uma importante interface para comunicação molecular entre o hospedeiro e o trematódeo (Johnston & Yoshino 1996), sendo composto por moléculas altamente glicosiladas que se ligam aos fatores solúveis da hemolinfa. Estes componentes solúveis tem um papel relevante no reconhecimento do parasito pelos hemócitos e também na sua ativação. Além disso, as glicoproteínas excretadas e secretadas pelo parasito também se ligam a hemócitos através de receptores de carboidratos, formando-se uma ligação de lectina com carboidratos que pode mediar a associação de hemócitos com o tegumento do *S. mansoni*. Uma vez que o esporocisto de *S. mansoni* penetra no caramujo *Biomphalaria* resistente, em pouco tempo ocorre seu reconhecimento pelos hemócitos e posterior encapsulação. Foi observado que ocorre significativa redução do número de hemócitos circulantes na hemolinfa poucas horas após a infecção, principalmente nas linhagens resistentes do caramujo o que, provavelmente, está associado ao recrutamento destas células de defesa para o local da infecção por um processo de quimiotaxia (Negrão-Corrêa et al. 2008, 2012). Nas linhagens suscetíveis foi observado que os produtos excretados e secretados por esporocistos de *S. mansoni* inibem a mobilidade de hemócitos, enquanto que nas cepas resistentes esta mobilidade é estimulada (Lodes & Yoshino 1990).

Os mecanismos efetores pelos quais os hemócitos ativados matam a larva do parasito ainda não estão completamente elucidados (Negrão-Corrêa et al. 2007). Evidências mostram que, em resposta à infecção por trematódeos, os hemócitos são

capazes de produzir espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico que estão envolvidos na morte do esporocisto primário (Adema et al 1994, Bayne et al. 2001).

Uma alternativa para melhor entender os mecanismos envolvidos na suscetibilidade de *B. tenagophila*, especialmente das populações de Taim, Cabo Frio e Anchieta, é obter informações sobre as diferenças de expressão das proteínas dos hemócitos de caramujos que se infectam ou não. Para identificar e compreender essas diferenças é fundamental conhecer as alterações nos níveis de expressão de proteínas dos hemócitos em cada fenótipo.

As proteínas são as macromoléculas mais abundantes nas células vivas, ocorrendo em todas as células e partes delas. Exibem grande diversidade de funções biológicas, atuando como os instrumentos moleculares por meio dos quais a informação genética é expressa. As proteínas são responsáveis pela determinação de fenótipos celulares em organismos procariotos e eucariotos.

O conjunto de proteínas expressas pelo genoma, célula ou tecido é denominado proteoma. Além de ser bastante complexo, o proteoma é dinâmico, uma vez que se modifica sob diferentes condições e pode ser distinto em diferentes tecidos de um único organismo (Wilkins et al. 1996). O proteoma pode ser investigado através das ferramentas tecnológicas proporcionadas pela proteômica, a qual busca dar às proteínas identidade, quantidade e função.

Para análises proteômicas, a combinação de gel de eletroforese bidimensional (2-DE) e espectrometria de massa é frequentemente utilizada (Peng & Gygi 2001). A primeira foi inicialmente proposta por O'Farrell (1975) e consiste na utilização de géis de poliacrilamida para separar proteínas pelo seu ponto isoelétrico em primeira dimensão, e posteriormente separá-las pela sua massa molecular com dodecil sulfato de sódio (SDS) na segunda dimensão. A 2-DE é uma ferramenta poderosa e amplamente utilizada para análise de misturas complexas de proteínas extraídas de células, tecidos ou outras amostras biológicas, apesar de apresentar limitações quanto à reprodutibilidade e sensibilidade.

A superação para tais limitações surgiu com o desenvolvimento da técnica de gel de eletroforese diferencial (DIGE) apresentada por Unlü et al. (1997). Esta técnica é uma modificação do gel bidimensional convencional e consiste na utilização de três diferentes corantes fluorescentes que se ligam covalentemente às proteínas de distintas amostras, não interferindo na migração dessas proteínas durante a corrida eletroforética. Desta forma, o DIGE permite a comparação de duas ou três amostras proteicas

simultaneamente em um mesmo gel de poliacrilamida, aumentando expressivamente a reprodutibilidade e sensibilidade (Minden JS 2007). O fracionamento das proteínas proporcionado pela eletroforese reduz sua complexidade, o que é condição fundamental para que sua identificação por espectrometria de massa seja possível. Esta importante ferramenta tem como finalidade a identificação das proteínas por meio da ionização da amostra e avaliação da razão carga/massa dos íons (Minden JS 2007, Barbosa et al. 2012).

Jannotti-Passos et al. (2008) utilizaram uma abordagem proteômica para melhor entender os mecanismos de defesa de *B. tenagophila* frente à infecção por *S. mansoni*. Neste estudo, 79 proteínas diferencialmente expressas nos tecidos cardíaco e pericardíaco de *B. tenagophila* foram detectadas em linhagens resistentes e suscetíveis desafiadas ou não com *S. mansoni*, mas somente nove foram identificadas devido à baixa disponibilidade de sequências de nucleotídeos no GenBank.

Sabendo-se que as proteínas estão sendo expressas por determinada célula em um dado momento e em determinada condição, pode-se obter informações a respeito da função de genes. A busca por diferenças na expressão de genes entre caramujos suscetíveis e resistentes à infecção pode levar à identificação de marcadores responsáveis por estas características (Jannotti-Passos et al. 2008).

Diante de todas as considerações, o presente trabalho propõe que os fenótipos de resistência e suscetibilidade de três populações de *B. tenagophila* estão relacionados com a expressão proteica dos hemócitos, a qual pode ser estudada através de abordagens proteômicas.

2 JUSTIFICATIVA

A esquistossomose ainda constitui grave problema de saúde pública no Brasil, principalmente nas regiões de maior pobreza. Dentre os principais fatores relacionados à expansão da doença, estão a disseminação de caramujos *Biomphalaria* suscetíveis à infecção pelo *S. mansoni* e a presença de espécies potencialmente transmissoras. Uma das abordagens para o controle da doença é o desenvolvimento de estratégias de combate aos caramujos que visem o emprego de moluscidas de origem química ou vegetal, métodos físicos e o controle biológico. No entanto, esta tarefa tem se mostrado um desafio em virtude da alta capacidade adaptativa às condições ambientais de *Biomphalaria* e seu grande potencial biológico.

Biomphalaria tenagophila, a segunda mais importante espécie transmissora de *S. mansoni* no Brasil, apresenta uma linhagem oriunda da Estação Ecológica do Taim que mostra consistente resistência à infecção pelo trematódeo. Tal resistência tem sido explorada na tentativa de desenvolver estratégias de controle biológico através da introdução desta linhagem em áreas onde a transmissão seja mantida pela espécie. Entretanto, os mecanismos relacionados com a suscetibilidade do caramujo ao parasito ainda não foram completamente elucidados. Estudos evidenciam que a resistência de *B. tenagophila* do Taim está intimamente relacionada à resposta do sistema interno de defesa (SID) do molusco frente à infecção, porém existe uma necessidade urgente de melhor esclarecer as vias de controle desta resposta.

A fim de corroborar com os conhecimentos já existentes, bem como possibilitar novos entendimentos e abordagens sobre o mecanismo de defesa de *B. tenagophila* contra o parasito, o intuito do presente trabalho foi identificar as proteínas diferencialmente expressas nos hemócitos de populações de *B. tenagophila* suscetível (Cabo Frio/RJ) e resistentes (Anchieta/ES e Taim/RS) a *S. mansoni*. As proteínas que apresentarem expressão diferenciada foram selecionadas para investigação da sua função, em busca de associações com o fenótipo de resistência.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar as proteínas diferencialmente expressas nos hemócitos de populações de *Biomphalaria tenagophila* suscetível (Cabo Frio/RJ) e resistentes (Anchieta/ES e Taim/RS) a *Schistosoma mansoni*.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar e comparar o perfil proteômico de hemócitos de *B. tenagophila* das populações resistentes e suscetível, expostas e não expostas a *S. mansoni*;
- Selecionar e identificar proteínas diferencialmente expressas nos grupos comparados;
- Classificar funcionalmente as proteínas quanto à função, em busca de associações com o fenótipo de resistência.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Moluscos

Para a realização do estudo foram selecionadas três populações de *B. tenagophila* oriundas de: 1) Cabo Frio (RJ), que apresentam 100% de suscetibilidade à cepa SJ de *S. mansoni* (Corrêa et al. 1979); 2) Taim (RS), que é originária da Estação Ecológica do Taim (RS) e é totalmente refratária à infecção pelo parasito (Santos et al. 1979); e 3) Anchieta (ES), linhagem que tem se mostrado resistente à infecção por diferentes cepas do *S. mansoni* (Jannotti-Passos et al. 2012).

As populações utilizadas são criadas no moluscário “Lobato Paraense” do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR), FIOCRUZ, em Belo Horizonte (MG). As colônias são mantidas a 24°C em aquários com a água corrente, substrato com carbonato de cálcio e alimentação diária com alface e ração. Para os experimentos foram utilizados indivíduos adultos com idade entre 2-3 meses, tempo suficiente para alcançarem o diâmetro de 12-14 mm.

4.2 *Schistosoma mansoni*

Foi utilizada a cepa SJ de *S. mansoni*, isolada em 1963, de moluscos da espécie *B. tenagophila* naturalmente infectados, oriundos da região de São José dos Campos (SP) e mantida rotineiramente no moluscário “Lobato Paraense” do CPqRR. O ciclo do parasito é mantido através de sucessivas passagens por hamsters (*Mesocricetus auratus*) e *B. glabrata*, de acordo com a técnica descrita por Pellegrino & Katz (1968) e modificada por Jannotti-Passos et al. (2008).

4.3 Limpeza e desinfecção dos moluscos

Todos os caramujos foram submetidos a um procedimento de limpeza e desinfecção anteriormente à retirada da hemolinfa. Oitocentos exemplares de cada população foram higienizados individualmente com *swab* embebido em solução de Extran[®] MA02 (Merck) a 0,1%. Em seguida os caramujos foram divididos em dois grupos, cada um com 400 indivíduos, separados em aquários com água desclorada e submetidos a estímulo luminoso por três horas, para confirmar que não havia liberação

de cercárias. Após este tempo, cada grupo foi colocado em novo aquário contendo solução de hipoclorito de sódio (seis litros de água tipo I e 720 µl de hipoclorito de sódio) por 48 horas, e em seguida transferido para aquário com solução de antibiótico – Ampicillin Sodium Salt (Gibco®) a 0,1µg/ml e gentamicina (Garamicina® Schering-Plough) a 13,3µg/ml, por 24 horas.

4.4 Desafio dos moluscos a *Schistosoma mansoni*

A exposição dos 400 moluscos de um subgrupo de cada população se deu conforme Jannotti-Passos et al. (2008). Os caramujos foram expostos individualmente a 50 miracídeos de *S. mansoni* por um período de duas horas, tempo no qual já é observada expressão diferencial de genes envolvidos na geração de componente para a montagem da resposta imune (Lockyer et al. 2012), e em seguida foi realizada a retirada da hemolinfa. As taxas de infecção das populações de *B. tenagophila* do estudo à cepa SJ são bem estudadas.

A Figura 1 mostra a organização das amostras para a realização dos experimentos.

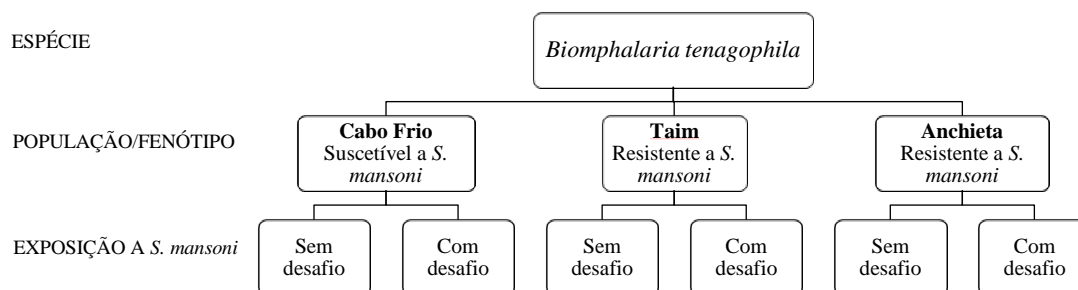


Figura 1 Representação esquemática das populações utilizadas no estudo, seus fenótipos de suscetibilidade/resistência a *S. mansoni* e condições de desafio para realização dos procedimentos experimentais.

4.5 Coleta da hemolinfa

O procedimento de retirada da hemolinfa dos grupos com desafio (CD) e sem desafio (SD) das três populações de *B. tenagophila* utilizadas no estudo foi realizada no Laboratório de Helminologia e Malacologia Médica (LHMM) do CPqRR e se deu de forma idêntica. Inicialmente a concha de cada indivíduo teve o excesso de água retirado com papel absorvente, e então foi limpa com algodão embebido em álcool 70%. Uma agulha de 21G acoplada em seringa de 1 ml foi utilizada para perfurar a concha do

molusco na região do pericárdio, onde esse encontra o coração, para que ocorresse o extravasamento da hemolinfa, a qual foi aspirada com o auxílio da seringa e transferida para tubos de polipropileno mantidos no gelo. A hemolinfa de todos os caramujos de cada grupo de uma mesma população foi coletada em um único tubo, em pool.

4.6 Separação do hemócito

Após a coleta, todo o volume recuperado de hemolinfa total foi centrifugado a 2.000 rotações por minuto (rpm) a 4 °C por dez minutos. Parte do sobrenadante foi transferida para três microtubos de 1,5 ml, congelada em nitrogênio líquido, estocada a -80 °C e o restante desprezado. O precipitado recolhido sofreu três lavagens com 200 µl de solução salina balanceada de Chernin (CBSS) estéril (47,7 mM de NaCl, 2 mM de KCl, 0,49 mM de Na₂HPO₄, 1,8 mM de MgSO₄ · 7H₂O, 3,6 mM de CaCl₂ · 2H₂O, 0,59 mM de NaHCO₃, 5,5 mM de glicose e 3 mM de trealose, pH 7,4) através de centrifugação a 2.000 rpm a 4 °C por três minutos. Antes da primeira lavagem o conteúdo foi transferido para microtubos de 1,5 ml para que, finalizado o processo, o precipitado fosse congelado em nitrogênio líquido e acondicionado a -80 °C.

4.7 Análise Proteômica

Todos os experimentos deste estudo proteômico foram realizados no Laboratório de Leishmanioses do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas, UFMG.

4.7.1 *Extração das proteínas dos hemócitos*

O precipitado resultante das lavagens com CBSS foi ressuspenso em tampão de lise (Uréia 8 M, Tiouréia 2M, CHAPS 4%, Tris 1 M) acrescido de um coquetel de inibidores de proteases (*Protease Inhibitor Mix* – GE Healthcare) conforme recomendação do fabricante. Para que as células de defesa fossem lisadas e as proteínas solubilizadas, as amostras ficaram sob agitação por duas horas a temperatura ambiente (TA). A seguir, o lisado celular foi submetido a dez passagens através de agulha 26G para completar a lise celular, desta vez mecânica, e então centrifugado a 14.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi recolhido e dividido em alíquotas de 10 µl que foram

mantidas a -80 °C até utilização. A concentração de proteínas totais obtidas no processo de extração foi determinada por meio do *2-D Quant Kit* (GE Healthcare), conforme orientações do fabricante.

4.7.2 SDS/PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS foi realizada para verificar a qualidade do extrato proteico e aferir a dosagem das proteínas das amostras. Para isto, tampão desnaturante 2X foi adicionado a 20 µg de cada amostra na proporção 1:1 (v/v), havendo posterior incubação em banho-maria a 100 °C por cinco minutos para desnaturação das proteínas. Em seguida, as amostras foram aplicadas em mini-géis de poliacrilamida a 12% (solução de acrilamida/bis-acrilamida 30% (29:1), Tris 1,5 M pH 8,8, SDS 10%, persulfato de amônio 10%, TEMED) com gel de concentração *stack* a 4% (solução de acrilamida/bis-acrilamida 30% (29:1), Tris 1,0 M pH 6,8, SDS 10%, persulfato de amônio 10%, TEMED). O padrão de peso molecular utilizado foi o LMS-SDS Marker (GE Healthcare). A eletroforese teve duração aproximada de 1h30min, ocorrendo sob 70 V nos primeiros 15 minutos e 100 V no tempo restante.

Finalizada a eletroforese, os géis foram colocados em solução de coloração rápida de *Coomassie R-250* a 0,25% por uma hora e após este tempo foram transferidos para solução descorante contendo ácido acético a 5% e metanol a 10%, onde permaneceram *overnight* para visualização das bandas.

4.7.3 Eletroforese Bidimensional (2-DE)

4.7.3.1 Focalização isoelétrica

Na focalização isoelétrica (IEF), as proteínas totais foram separadas de acordo com seu ponto isoelétrico (pI) através de um gradiente de pH. Assim, para padronização da técnica e avaliação da qualidade dos perfis proteicos das amostras, foram utilizadas *strips Immobilized pH Gradient* (IPG) (GE Healthcare) de 7 cm de comprimento e gradiente de pH 4-7.

Inicialmente as *strips* foram hidratadas com 100µg de proteína. Neste processo as amostras foram diluídas em Tampão IEF (Uréia 8M, Tiouréia 2M, CHAPS a 4%, Azul de Bromofenol a 0,0025%) e IPG *Buffer* 1% (GE Healthcare) pH 4-7, em um

volume total de 125 μ l por *strip*. Para total homogeneização, esta solução permaneceu sob agitação a TA por uma hora e a seguir foi adicionada à *strip* em um aparato de reidratação para que se sucedesse a hidratação passiva por um período de 12 horas a TA. A IEF ocorreu em sequência no equipamento *Ettan™IPGPhor™ 3* (GE-Healthcare) a 50 μ A/gel, nas seguintes condições (Tabela 1):

Tabela 1 Programa de isoeletrofocalização utilizado para *strips* de 7cm, pH 4-7

Passo	Voltagem	Tempo/Vh
1	500V	5:00 h
2	1000V	1:00 h
3	4000V	1:00 h
4	4000V	16000 Vh
5	500V	1:00 h

Concluída a IEF, as *strips* foram equilibradas antes da realização da segunda dimensão. Na primeira etapa do equilíbrio foi utilizado o DTT. As fitas de IPG foram incubadas em Tampão de Equilíbrio (50 mM de Tris 1,5 M pH 8,8, 6 M Uréia, 30% Glicerol, 2% Dodecil Sulfato de Sódio - SDS, 0,001% v/v Azul de Bromofenol 0,5%) contendo 10 mg/ml de DTT por 15 minutos sob leve agitação a TA. Depois as *strips* foram incubadas com Iodoacetamida (IAA) 25 mg/ml em Tampão de Equilíbrio nas mesmas condições. O excesso de solução de equilíbrio foi retirado das *strips* através de rápida lavagem em Tampão Tris-Glicina 1%.

4.7.3.2 SDS-PAGE

Para a segunda dimensão, as *strips* foram dispostas horizontalmente na parte superior de mini géis de poliacrilamida a 12% contendo SDS previamente preparados e imobilizadas com agarose 0,5% contendo azul de bromofenol 0,002%. A eletroforese vertical ocorreu no sistema *Mini-PROTEAN® Tetra System* (BIO-RAD) contendo tampão Tris-Glicina 1%, e os géis foram submetidos a uma voltagem de 70 V nos primeiros 15 minutos, e posteriormente 100 V.

Finalizada a eletroforese, os géis foram corados com *Coomassie* coloidal G-250 segundo Neuhoff et al. (1988). O procedimento se resume em deixar os géis sob agitação lenta em solução fixadora I (Etanol 30% e Ácido Ortofosfórico 2%) por 12 horas a TA, seguido de três lavagens de dez minutos com solução fixadora II (Ácido Ortofosfórico 2%) e finalmente deixados em solução fixadora III (Ácido Ortofosfórico 2%, Etanol 18% e Sulfato de Amônio 12%) por 30 minutos. Após este intervalo, foi adicionado *Coomassie Brilliant Blue* G-250 4% em quantidade suficiente para uma concentração final de corante equivalente a 0,1%. Os géis permaneceram mergulhados nesta solução sob agitação lenta por um período de cinco dias, tempo suficiente para que todas as proteínas fossem coradas. Finalmente, os géis sofreram rápida lavagem com Etanol 20% para remoção de excesso de corante e foram digitalizados utilizando-se o *scanner ImageScanner* (Amersham Biosciences).

4.7.4 Gel de Eletroforese Diferencial

Após a realização da eletroforese bidimensional e consequente verificação da qualidade das amostras e padronização da IEF, as proteínas foram submetidas à técnica de gel de eletroforese diferencial (DIGE).

Cada extrato proteico referentes aos seis grupos das três populações foi marcado com diferentes corantes fluorescentes CyDye™ (GE Healthcare), a fim de eliminar quaisquer interferências decorrentes das diferenças de intensidade dos fluoróforos usados. Desta forma, a marcação das proteínas foi realizada garantindo a inversão das amostras com diferentes fluoróforos (*Dye Swab* com Cy3 e Cy5) e, para normalização dos dados, uma mistura de todas as amostras foi marcada com o fluoróforo Cy2, sendo este o padrão interno que elimina variações experimentais entre géis. Os experimentos de DIGE foram realizados em duas etapas, sendo que na primeira delas foram analisadas as amostras das três populações desafiadas (CD) por *S. mansoni* e na segunda as amostras não desafiadas (SD). As Tabelas 2 e 3 demonstram o desenho experimental para o DIGE.

Tabela 2 Marcação com *CyDye* dos extratos proteicos das populações do grupo desafiado. Cada amostra foi marcada com os três fluoróforos (Cy2, Cy3 e Cy5) e aparece em, no mínimo, três géis para que as análises estatísticas possam ser realizadas.

GEL	Cy3	Cy5	Cy2
1	Anchieta CD	Cabo Frio CD	Mistura das amostras*
2	Taim CD	Anchieta CD	Mistura das amostras*
3	Anchieta CD	Taim CD	Mistura das amostras*
4	Cabo Frio CD	Taim CD	Mistura das amostras*
5	Taim CD	Cabo Frio CD	Mistura das amostras*

*ANC CD + CF CD + TM CD

Tabela 3 Marcação com *CyDye* dos extratos proteicos das populações do grupo não desafiado. Cada amostra foi marcada com os três fluoróforos (Cy2, Cy3 e Cy5) e aparece em, no mínimo, três géis para que as análises estatísticas possam ser realizadas.

GEL	Cy3	Cy5	Cy2
6	Anchieta SD	Cabo Frio SD	Mistura das amostras*
7	Taim SD	Anchieta SD	Mistura das amostras*
8	Anchieta SD	Taim SD	Mistura das amostras*
9	Cabo Frio SD	Taim SD	Mistura das amostras*
10	Taim SD	Cabo Frio SD	Mistura das amostras*

*ANC SD + CF SD + TM SD

No DIGE, as amostras são marcadas com os diferentes fluoróforos antes que se inicie a separação das proteínas na primeira dimensão. Primeiramente, o pH das amostras foi medido e, quando necessário, ajustado para 8,5 com HCl 0,5 mM ou NaOH 500 mM. A cada amostra contendo 50 µg de proteína foi adicionado 400 pmol de cada corante (Cy2, Cy3 e Cy5). Após esta marcação as amostras foram homogeneizadas, brevemente centrifugadas e mantidas no gelo por 30 minutos no escuro para que o fluoróforo se ligasse aos resíduos de lisina das proteínas. Após esse tempo, foi adicionado 1 µl de Lisina 10 mM para que a marcação das proteínas com os fluoróforos fosse interrompida e, novamente, as amostras foram mantidas no gelo por dez minutos ao abrigo da luz. Após a marcação, três das cinco *strips* foram carregadas com extrato proteico de uma determinada população para futura coloração com nitrato de prata. Às amostras foi adicionado tampão IEF (Uréia 7M, Tiouréia 2M, CHAPS 4%)

acrescido de 10mg/ml de DTT e IPG 1%, totalizando um volume final de 340 μ l, em incubação no gelo por dez minutos ao abrigo da luz. Esta solução foi utilizada na hidratação passiva de *strips* de 18 cm com pH 4-7 por 12 horas, de forma que uma mesma *strip* continha amostras de cada população de *B. tenagophila*, além de uma mistura das três populações marcadas com o mesmo padrão interno (Cy2). A IEF foi realizada sob as seguintes condições (Tabela 4):

Tabela 4 Programa de isoeletrofocalização utilizado para *strips* de 18cm, pH 4-7

Passo	Voltagem	Tempo/Vh
1	500 V	5:00 h
2	1000 V	1:00 h
3	8000 V	1:00 h
4	8000 V	4000 Vh
5	500 V	2:00 h
6	500V	20:00 h

O equilíbrio das *strips* foi feito conforme descrito anteriormente. Para a segunda dimensão as *strips* foram dispostas horizontalmente na parte superior de géis de poliacrilamida a 12% contendo SDS e imobilizadas com agarose 0,5%. Foi utilizado o sistema vertical *Ettan DALTsix Electrophoresis Unit* (GE Healthcare). A corrida se deu a 50V/gel e 25mA/gel a 10°C e os géis foram protegidos da luz durante todo o processo.

Imediatamente após a eletroforese, os géis foram digitalizados no *scanner Typhoon FLA 9000* (GE-Healthcare) utilizando os seguintes parâmetros para excitação e emissão de comprimentos de onda: Cy2 (488/520nm), Cy3 (532/580nm) e Cy5 (633/670nm).

4.7.5 *Análise dos géis fluorescentes*

As imagens dos géis geradas no *Typhoon* foram analisadas utilizando o *DeCyder™ 2-D Differential Analysis Software v7.2* (GE Healthcare). Através do módulo *Image Loader* as imagens dos géis foram importadas para o banco de dados do *DeCyder™* ficando, assim, acessíveis para os outros módulos do programa. Nessa importação, as três imagens geradas de cada fluoróforo (Cy2, Cy3 e Cy5) foram agrupadas. Também foram ajustados o brilho e contraste.

Após o carregamento das imagens, seguiu-se a análise no módulo DIA (*Differential In-Gel Analysis*), o qual fez uma sobreposição das três imagens de cada gel gerando uma única. Os *spots* foram detectados e quantificados pelo DIA em uma imagem combinada derivada de uma mescla de imagens individuais, assegurando que todos os *spots* detectados estivessem representados em todas as imagens. A detecção dos *spots* foi realizada de acordo com os parâmetros escolhidos: inclinação ($\geq 0,87$), volume, área (≤ 350) e tamanho do pico. Estes valores de inclinação e área foram utilizados com a finalidade de eliminar artefatos equivocadamente detectados como *spots*, porém ainda houve a necessidade de se realizar uma cuidadosa edição manual para exclusão de artefatos.

Em seguida, as imagens foram exportadas para o módulo BVA (*Biological Variation Analysis*) o qual utilizou os arquivos gerados pelo modo DIA e as imagens originais para realizar o *match* e identificar os *spots* de proteínas comuns entre os diferentes géis. Foi necessário revisar e conferir os *matches* manualmente e, após esta etapa, o BVA realizou análises estatísticas com *teste T-student* e *One-Way ANOVA*. Todos os *spots* com $p \leq 0,05$ e *folding* $> 1,5$ foram considerados diferencialmente expressos.

Esses *spots* foram exportados para o módulo *Extended Data Analysis* (EDA), que é utilizado para análises multivariáveis de expressão de proteínas provenientes do módulo BVA. Além de avaliar dados univariáveis, como *Test T Student* e também análise de variância *One-Way ANOVA*, também foi realizada uma Análise de Padrões (*Pattern Analysis*), reconhecendo padrões nas expressões de proteínas.

Finalizada a análise no *DeCyder*, os *spots* com diferenças estatisticamente significativas de expressão foram selecionados e excisados manualmente dos géis para a identificação por espectrometria de massa MALDI-ToF/ToF. Para esta extração, os géis de DIGE foram corados pela prata, utilizando um protocolo compatível com a espectrometria de massas (Rabilloud et al. 1988). A primeira etapa da coloração foi a fixação, em que o gel sofreu três lavagens de 30 minutos com solução de etanol 40% e

ácido acético 10%, e uma lavagem de 10 minutos com solução de etanol 20%. Em seguida o gel foi sensibilizado com ditonito de sódio (0,3 g/l) por um minuto. A coloração com nitrato de prata (2 g/l) se deu por 40 minutos e a ela se seguiu a revelação, em que o gel foi deixado em solução de carbonato de potássio (30 g/l), formaldeído (250 µl/l) e tiosulfato de sódio (10 mg/l) por aproximadamente dez minutos. A solução de Tris (40 g/l) e ácido acético 2% foi utilizada para parar a revelação. Foi preparada uma solução de etanol 20% para estocar o gel até a excisão dos spots.

4.7.6 Tratamento dos spots para espectrometria de massas

Os *spots* selecionados foram excisados dos géis com auxílio de pipeta Pasteur descartáveis e, para retirada da prata, foi utilizado o protocolo proposto por Terry et al. (2004), com modificações. Os *spots* foram descorados adicionando-se 200 µl de solução de ferricianeto de potássio 15 mM e tiosulfato de sódio 50 mM por seis minutos. Após a remoção da solução descorante, os *spots* foram lavados com água de injeção, macerados e então desidratados com a adição de 500 µl de acetonitrila 90% por um minuto. Em seguida, a acetonitrila foi retirada e os microtubos contendo as amostras ficaram abertos até a completa secagem dos pedaços de gel. Foram adicionados 10 µl de tripsina (Promega) a 20 ng/µl e as amostras foram deixadas no gelo por dez minutos para que a enzima penetrasse no gel. Posteriormente foram adicionados 20 µl de bicarbonato de amônio 50 mM e as amostras permaneceram a 37 °C por 16 horas para que ocorresse a completa digestão das proteínas. Esta solução de tripsina e bicarbonato de amônio foi transferida para novos tubos e aos tubos anteriores foram acrescentados 30 µl de solução de ácido fórmico 5% e acetonitrila 50% por 30 minutos sob agitação para extração dos peptídeos. Este conteúdo foi transferido para aqueles tubos que já continham a primeira solução retirada. Esta última etapa foi repetida mais uma vez, sendo a solução de ácido fórmico e acetonitrila também transferida para os tubos novos. Os tubos contendo a junção das soluções de tripsina e bicarbonato de amônio, bem como as de ácido fórmico e acetonitrila foram levados para o aparelho *Concentrator Plus*[®] (Eppendorf) para concentração das amostras até o volume de 10 µl.

As amostras foram passadas em colunas *ZipTip*[®]C18 (Millipore) para que fossem dessalinizadas e os peptídeos concentrados.

4.7.7 *Espectrometria de Massa (MS)*

As análises de espectrometria de massa foram realizadas no Laboratório de Toxinologia do Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

O volume de 0,3 µl da amostra foi misturado à mesma quantidade de uma solução saturada de matriz (ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico) em uma placa MTP *AnchorCHIP™* 600/384 (Bruker Daltonics), onde foram deixadas para secagem em TA. Os dados brutos para identificação das proteínas foram obtidos no espectrômetro de massa *AB SCIEX MALDI TOF-TOF™ 5800 System* (Applied Biosystems, USA). A calibração externa do equipamento foi realizada através da utilização de uma mistura de peptídeos: des-Arg1- bradicinina (m/z = 904.468), angiotensina I (m/z = 1296.685), Glu1-fibrinopeptídeo B (m/z = 1570.677) e hormônio adenocorticotrópico (18-39) (m/z = 2465.199). Os parâmetros usados para a busca foram os seguintes: sem restrição para peso molecular da proteína, um sítio de clivagem da tripsina perdido, modificações variáveis da metionina (oxidação) e da cisteína (carbamidometilação), formação de piroglutamato na extremidade N-terminal da glutamina sem outras modificações pós-traducionais. A tolerância de massa para os peptídeos nas buscas foi de 0,8 Da para espectros MS e 0,6 Da para espectros MS/MS.

Os dados obtidos para cada *spot* foram reunidos em um arquivo texto e foi realizada a busca no banco de dados MASCOT (Matrix Science, USA – www.matrixscience.com). Na identificação, foram consideradas somente as proteínas com valores de score em que $p \leq 0,05$.

Considerando que *B. tenagophila* não possui genoma completamente sequenciado, a identificação das proteínas seria feita por homologia utilizando dados do genoma de *B. glabrata*. Entretanto, o genoma desta espécie não foi finalizado no tempo esperado. Desta forma, para a identificação das proteínas foi necessário utilizar o BLAST para a busca de sequências similares nos bancos de dados do NCBI.

4.7.8 *Categorização funcional das proteínas*

A categorização funcional das proteínas identificadas pelo MALDI foi realizada em duas etapas. Primeiramente, foram feitas buscas por proteína no banco de dado *UniProt – Universal Protein Resource* (<http://www.uniprot.org/>) e na ferramenta

QuickGO - (<http://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>), que forneceram informações detalhadas a respeito de processos biológicos e funções moleculares para as proteínas de *B. tenagophila* e demais organismos. Em seguida, para melhor agrupamento das proteínas, foi utilizado o esquema de anotação funcional para classificação sistemática de proteínas (*FunCat – Functional Catalogue*), de acordo com Ruepp et al. (2004).

5 RESULTADOS

5.1 Moluscos

Na Tabela 5 estão sendo mostrados o número de caramujos e o volume aproximado de hemolinfa recuperado por grupo experimental.

Tabela 5 Quantidade de caramujos obtidos para os experimentos, volume de hemolinfa recuperado em cada população por grupo experimental e concentração média de proteínas.

Grupo experimental	População	Nº de caramujos	Volume de hemolinfa (ml)	Concentração média de proteínas (µg/µl)
	Anchieta (ANC)	355	20	7
Sem desafio a	Cabo Frio (CF)	414	21	10,7
<i>S. mansoni</i>	Taim (TM)	403	19	6,3
	Anchieta (ANC)	450	34	8,3
Com desafio a	Cabo Frio (CF)	417	20	8,6
<i>S. mansoni</i>	Taim (TM)	380	18	9,7

A diferença de 95 exemplares na população de Anchieta está relacionada à morte de alguns exemplares na etapa de limpeza e desinfecção, o que não prejudicou a obtenção de um volume adequado de hemolinfa.

5.2 Análise proteômica

Foram obtidos extratos proteicos dos dois grupos (sem e com desafio) das três populações de *B. tenagophila*. A dosagem das proteínas dos extratos foi realizada pelo *2-D Quant Kit* (GE Healthcare) e confirmada através de géis SDS-PAGE, que também demonstraram que as amostras não estavam degradadas e, portanto, eram adequadas para serem utilizadas nos experimentos subsequentes (Figura 2).

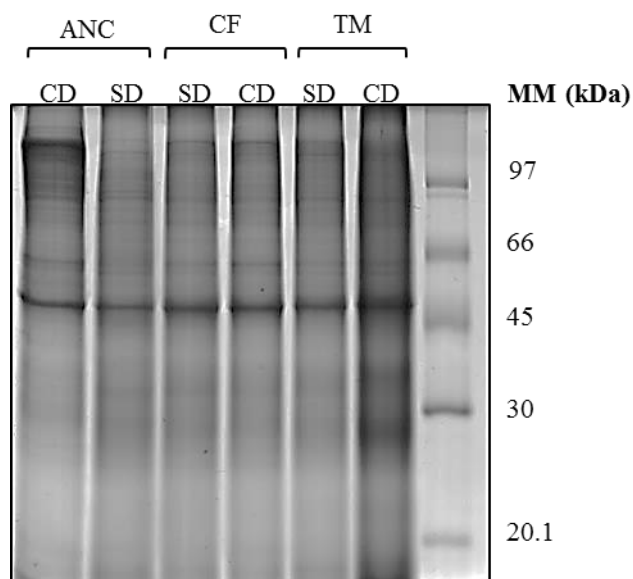


Figura 2 Gel SDS-PAGE a 12% dos extratos proteicos dos grupos não desafiados (SD) e desafiados (CD) das três populações de *B. tenagophila* (ANC-Anchieta; CF – Cabo Frio; e TM-Taim)

Para obter o perfil de expressão de proteínas das três populações em cada grupo foram confeccionados géis 2-DE de 7 cm carregados com 150 μ g de proteína e corados pela prata, e o resultado mostrou separação proteica satisfatória em ambas as dimensões (Figura 3).

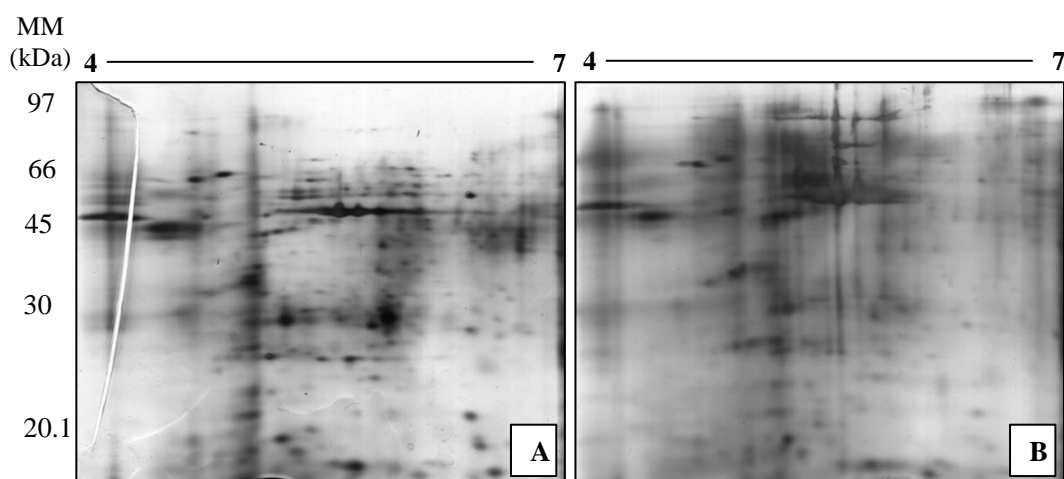


Figura 3 Imagens representativas de géis bidimensionais SDS-PAGE a 12% corados pela prata (*Strips* 7cm, pH 4-7) mostrando o perfil proteômico da população de Anchieta sem desafio (A) e com desafio (B).

Aferida a eficiência da isoeletrofocalização e a qualidade das amostras, as quais mostraram boa resolução do perfil proteico, o próximo passo foi avaliar as proteínas diferencialmente expressas através da técnica de DIGE.

5.2.1 Gel de eletroforese diferencial

Foram feitas comparações dos perfis de expressão de proteínas entre as três distintas populações de *B. tenagophila* do grupo desafiado por *S. mansoni* e também entre as populações do grupo não desafiado. Além disso, comparou-se a expressão diferencial de proteínas entre as mesmas populações, sem e com desafio.

Os géis produzidos pelo DIGE foram digitalizados no *scanner Typhoon FLA 9000* (GE Healthcare) que gerou imagens dos géis fluorescentes, conforme exemplificado nas Figuras 4 e 5.

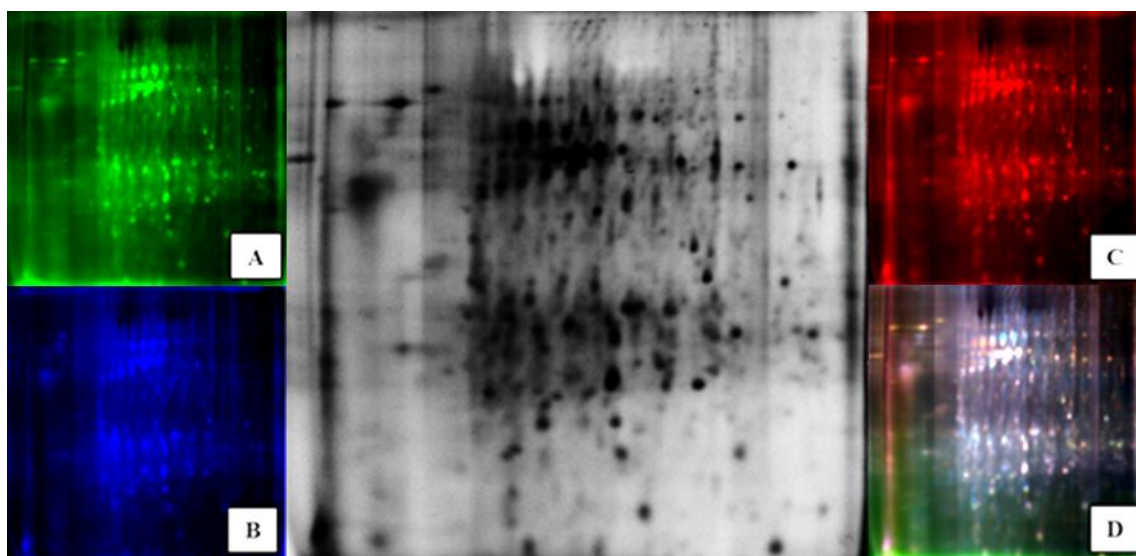


Figura 4 Gel de DIGE nº 8 em *strips* de 18 cm pH 4 – 7 contendo amostras de populações não desafiadas por *S. mansoni* (imagem em preto e branco). A) Mix das amostras marcadas com Cy2 utilizado para a normalização, sendo o controle interno da reação; B) Anchieta marcado com Cy3; C) Taim marcado com Cy5; D) Sobreposição das três imagens (Cy2, Cy3 e Cy5).

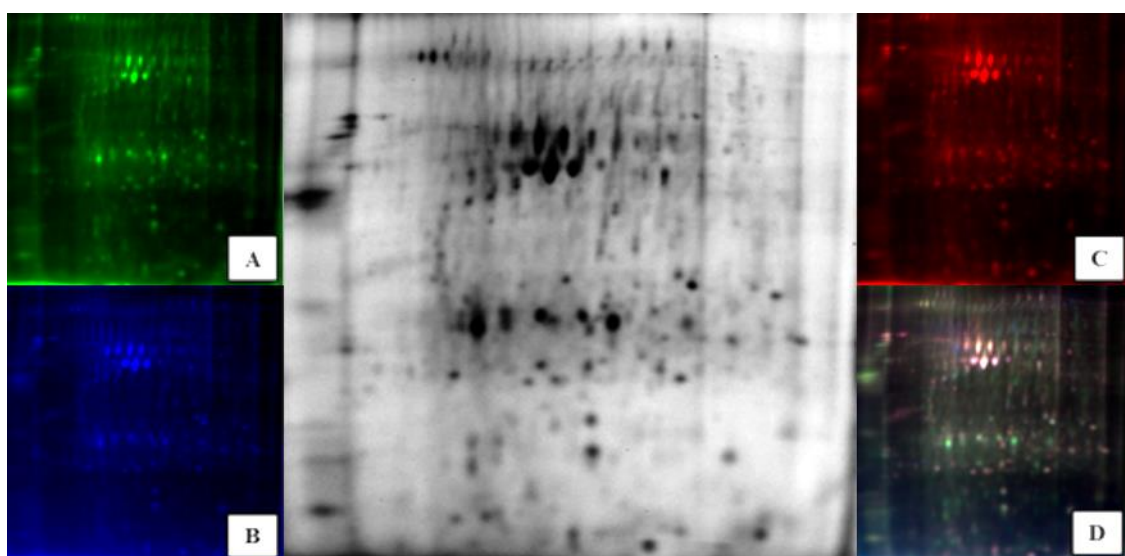


Figura 5 Gel de DIGE nº 5 em *strips* de 18cm pH 4 – 7 contendo amostras de populações desafiadas por *S. mansoni* (imagem em preto e branco). A) Mix das amostras marcadas com Cy2 utilizado para a normalização, sendo o controle interno da reação; B) Taim marcado com Cy3; C) Cabo Frio marcado com Cy5; D) Sobreposição das três imagens (Cy2, Cy3 e Cy5).

5.2.2 Análise dos géis fluorescentes

Após o escaneamento, as imagens foram importadas para o *software DeCyder* por meio do módulo *Image Loader* e, em seguida, analisadas pelo DIA para detectar e quantificar os *spots* automaticamente de acordo com os parâmetros determinados. Foram reconhecidos aproximadamente 2300 *spots* em cada gel, contudo foi necessário realizar edição manual, uma vez que, por meio do programa, diversos *spots* foram excluídos erroneamente, além de artefatos terem sido considerados como *spots*. Concluída esta etapa, o número de *spots* incluídos por gel foi reduzido revelando a média de 1684 *spots* nos géis pertencentes ao grupo desafiado e 1426 *spots* no grupo sem desafio. Os dados estão expostos na Tabela 6:

Tabela 6 Total de *spots* detectados por imagem/gel após análise no módulo DIA

Gel	Nº <i>spots</i> incluídos por imagem
1	1389
2	1384
3	1931
4	1858
5	1858
6	1623
7	1441
8	1300
9	1498
10	1271

A próxima etapa foi exportar as imagens para o modo BVA, em que foram realizados os *matches* entre os géis e observados os *spots* comuns entre eles. Finalizada a edição, por meio do BVA foram realizados os testes estatísticos *T-student* e *One-Way ANOVA* para avaliar a diferença de expressão dos *spots* entre as populações de cada grupo (Figura 6). Dessa forma, no grupo desafiado e não desafiado foram avaliados os *spots* diferencialmente expressos entre ANC e CF, ANC e TM, e CF e TM. Foram considerados diferencialmente expressos os *spots* com $p \leq 0,05$.

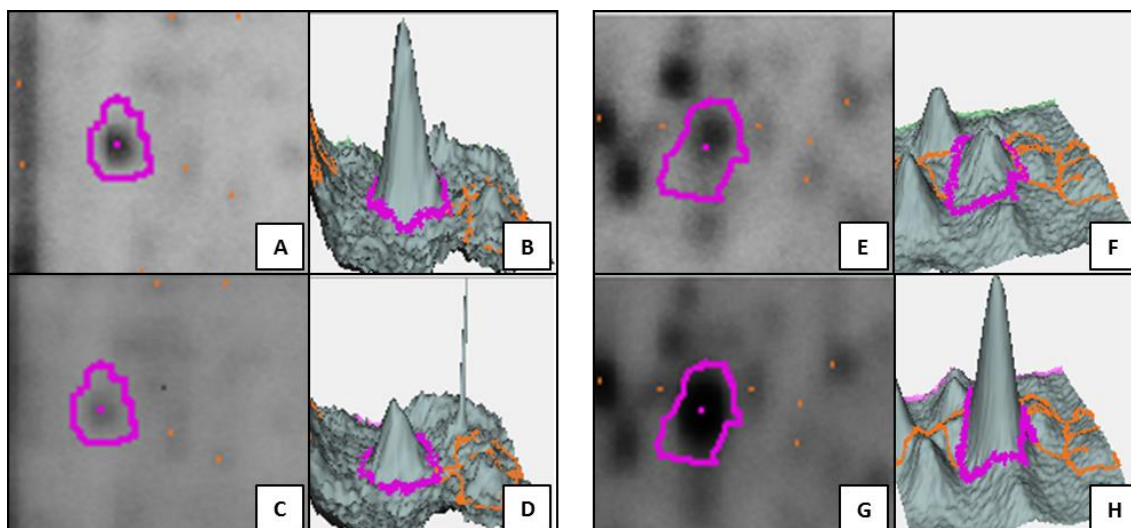


Figura 6 Imagem representativa de *spots* com diferença de expressão nas populações de Cabo Frio (A e E) e Taim (C e G) desafiadas, após as análises estatísticas no BVA. *Spot* da linhagem de CF (A) com expressão aumentada em relação ao mesmo *spot* em TM (C). *Spot* de TM (G) mais expresso quando comparado ao mesmo *spot* em CF (E). B, D, F e H representam as imagens tridimensionais dos seus respectivos *spots*.

O último módulo utilizado foi o EDA, o qual realizou análise do padrão de expressão comparando somente os *spots* de interesse, ou seja, aqueles selecionados como diferencialmente expressos ($p \leq 0,05$) entre as populações. Desta forma, foram gerados três gráficos para a condição de ausência de desafio (Figura 7) e outros três para o grupo desafiado (Figura 8), sendo a comparação feita da seguinte forma: Anchieta x Cabo Frio, Anchieta x Taim e Cabo Frio x Taim.

GRUPO SEM DESAFIO

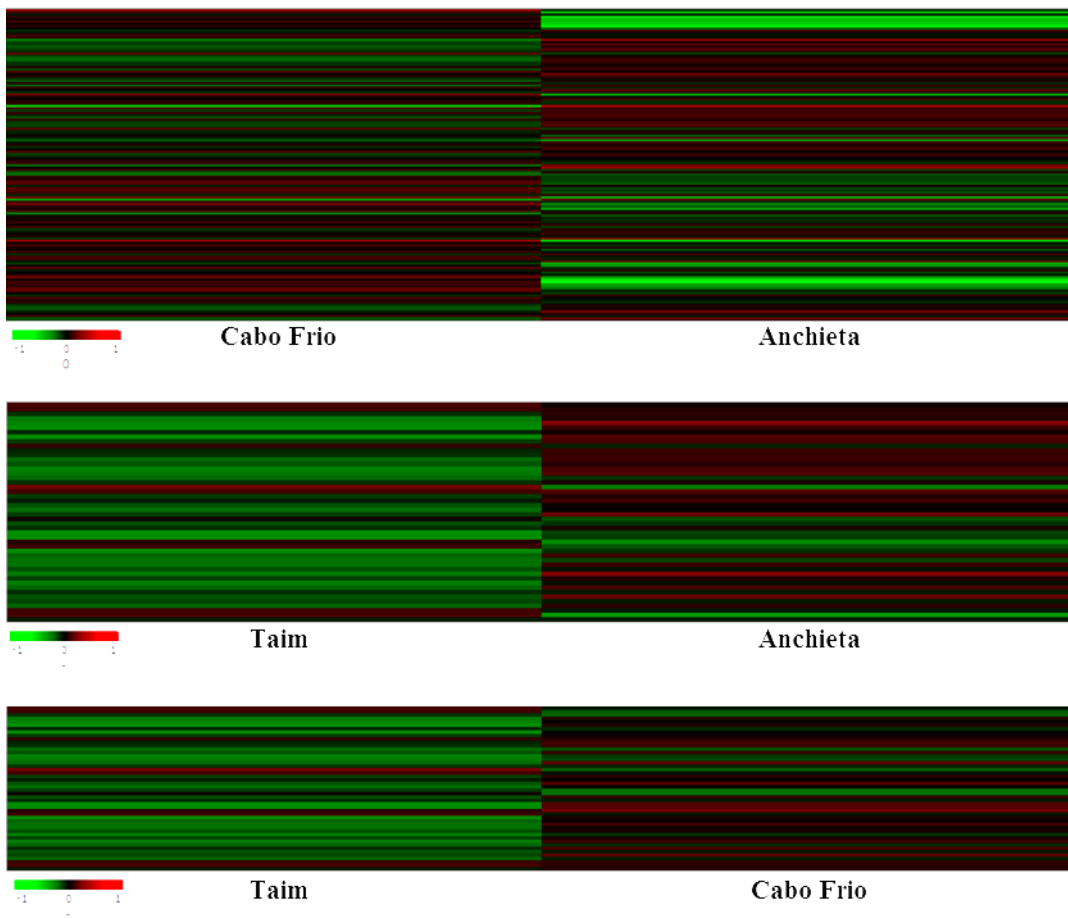


Figura 7 Agrupamento hierárquico (*Pattern Analysis*) da análise das populações não desafiadas com base no padrão de *spots* diferencialmente expressos ($P \leq 0,05$) selecionados (*spots* de interesse). Os valores de expressão relativa estão exibidos na escala colorimétrica usando o log de abundância padronizado, variando de -1 (regulado-negativamente; verde) para 1 (regulado-positivamente; vermelha).

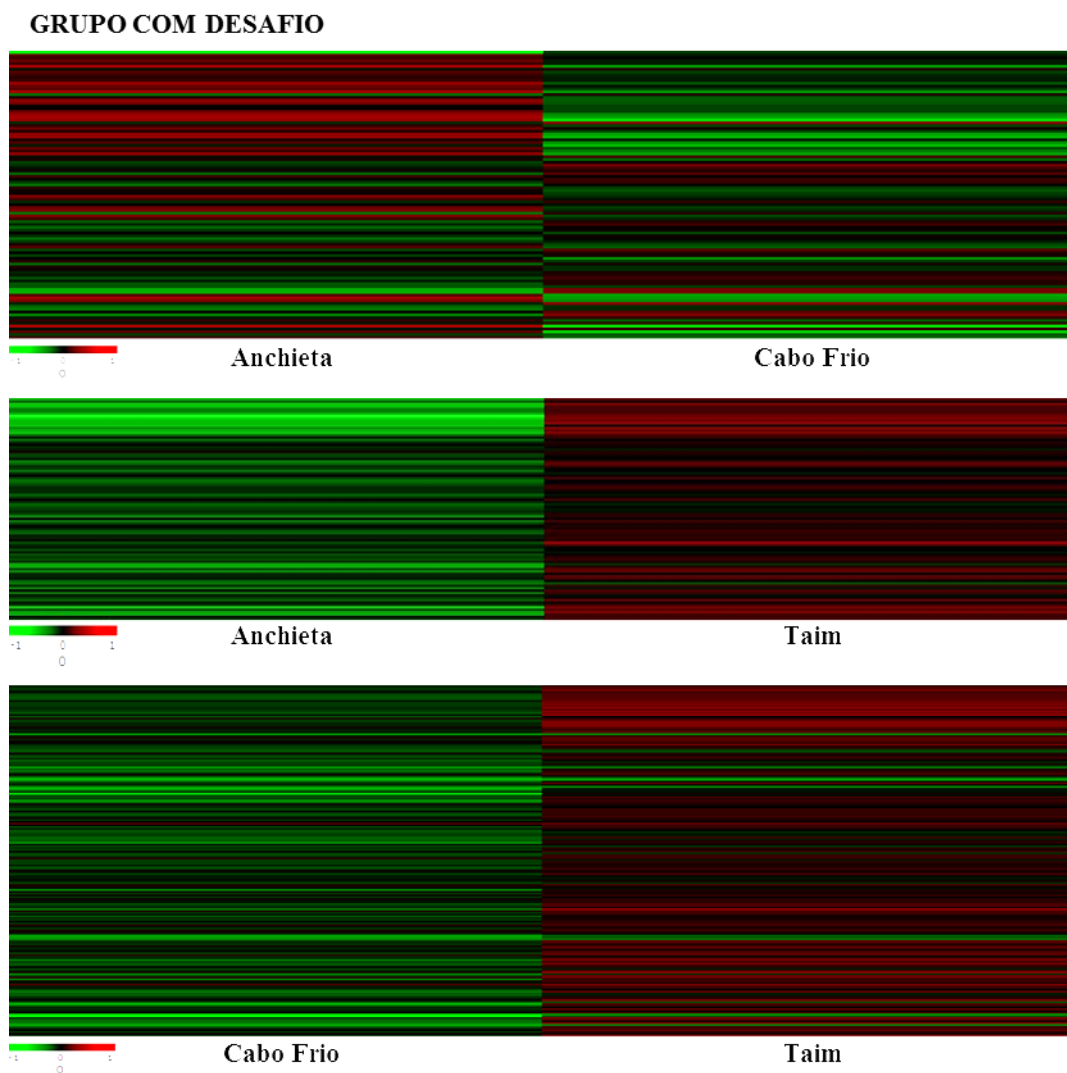


Figura 8 Agrupamento hierárquico (*Pattern Analysis*) da análise das populações desafiadas com base no padrão de *spots* diferencialmente expressos ($P \leq 0,05$) selecionados (*spots* de interesse). Os valores de expressão relativa estão exibidos na escala colorimétrica usando o log de abundância padronizado, variando de -1 (regulado-negativamente; verde) para 1 (regulado-positivamente; vermelha).

As análises de ambos os grupos experimentais revelaram a seleção de 431 *spots* com diferenças de expressão estatisticamente significativas e intensidade de expressão com *fold*ing > 1,5. Um total de 101 correspondeu ao grupo não desafiado por *S. mansoni*, sendo 70 em ANC x CF, 22 em ANC x TM e nove em CF x TM. No grupo desafiado foram selecionados 330 *spots*, um aumento expressivo que ocorreu nas análises de ANC x TM (116 *spots*) e CF x TM (152 *spots*). Em ANC x CF foram detectados 62 *spots*. Estes resultados e detalhes sobre a quantidade de *spots* detectados em cada população da análise são demonstrados na Tabela 7.

Tabela 7 Dados detalhados sobre a quantidade de *spots* selecionados por análise/grupo

Grupo	Análise	↑ Expressão	Nº de <i>spots</i> selecionados
Sem desafio	ANC x CF	ANC	33
		CF	37
	ANC x TM	ANC	18
		TM	4
	CF x TM	CF	9
		TM	0
Subtotal		101	
Com desafio	ANC x CF	ANC	43
		CF	19
	ANC x TM	ANC	74
		TM	42
	CF x TM	CF	68
		TM	84
Subtotal		330	
Total		431	

Observando a Tabela 8 é possível perceber com clareza o considerável aumento do total de *spots* selecionados nas populações do grupo desafiado.

Tabela 8 Número de *spots* com expressão aumentada selecionados em cada população por grupo experimental

Grupo	Nº total de <i>spots</i> selecionados em cada população		
	Anchieta	Cabo Frio	Taim
Sem desafio	51	46	4
Com desafio	117	87	126

A fim de facilitar a codificação e excisão dos *spots* nos géis de prata, foi necessário que todos os *spots* com expressão aumentada de uma determinada população e em cada grupo fossem reunidos em única imagem de gel. Para isto foi realizada minuciosa edição manual que resultou na geração de três imagens por grupo, uma para cada população, conforme demonstrado na Figura 9.

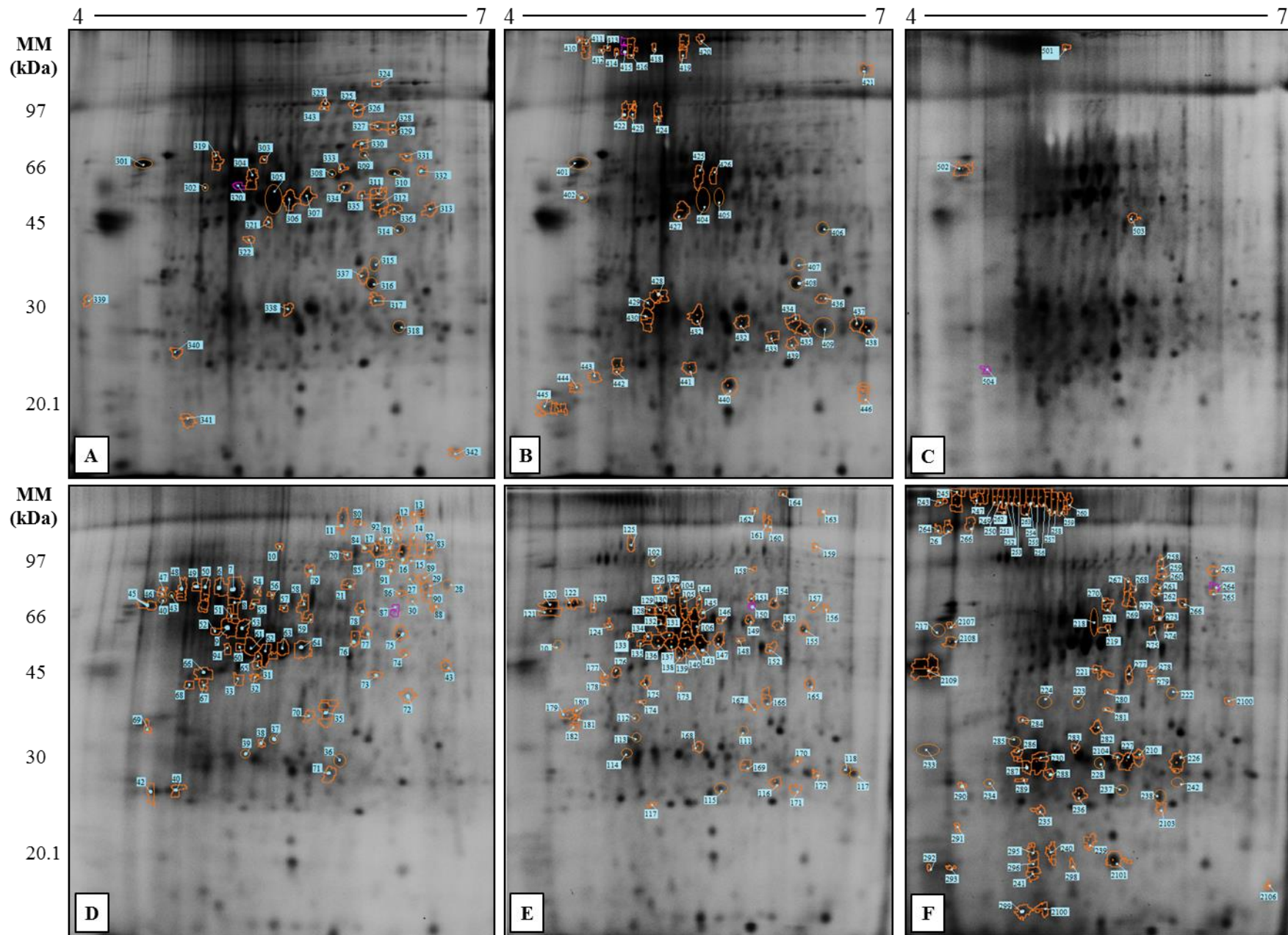


Figura 9: Géis 2-DE SDS-PAGE a 12% em *strips* de 18cm, pH 4-7. Em destaque os *spots* diferencialmente expressos e estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$) selecionados após testes *T-sudent* e *One-Way* ANOVA. Os *spots* de cada população e grupo receberam codificação. A) ANC-SD; B) CF-SD; C) TM-SD; D) ANC-CD; E) CF-CD e F) TM-CD.

Após o escaneamento, os géis confeccionados para o DIGE foram submetidos à coloração por prata para posterior retirada dos *spots*.

5.2.3 Identificação das proteínas

Para a identificação das proteínas por espectrometria de massas, os *spots* diferencialmente expressos foram excisados dos géis, recebendo uma codificação para facilitar o rastreamento dos dados posteriormente. Dos 431 *spots* selecionados, 255 foram retirados dos géis, tratados com tripsina e submetidos à espectrometria de massas. Esta diferença se deve ao fato de que muitos *spots* não puderam ser visualizados no gel de prata, corante menos sensível do que os fluoróforos, e também porque muitos outros eram, na verdade, artefatos que não foram devidamente excluídos.

Do total de 255 *spots* retirados, 129 (50,6%) foram identificados com sucesso e corresponderam a 23 proteínas. Os demais *spots* não obtiveram *score* suficiente no MASCOT, significando que não foram estatisticamente significativos. Na ausência do genoma completo de *B. glabrata*, organismo cuja similaridade com *B. tenagophila* permitiria que a busca de sequências nucleotídicas fosse feita por homologia, foi necessário utilizar o BLAST para buscar sequências de peptídeos similares nos bancos de dados do NCBI. Assim, uma melhor identificação das proteínas encontradas neste estudo foi impossibilitada.

As Tabelas 9 e 10 mostram os dados dos *spots* retirados e identificados em cada uma das populações sem e com desafio, bem como da quantidade de proteínas identificadas.

Tabela 9 Dados sobre a seleção e identificação dos *spots* através da espectrometria de massa por população/grupo experimental: os *spots* em vermelho foram identificados por MALDI

Grupo	População	Spots selecionados	Spots retirados	Codificação dos <i>spots</i> retirados	Nº de <i>spots</i> identificados
Sem desafio	Anchieta	51	51	301, 302, 303a, 303b, 304a, 304b, 305, 306a, 306b, 307a, 307b, 308, 309, 310, 311a, 311b, 312a, 312b, 313a, 313b, 314, 315, 316, 317a, 317b, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343	35
	Cabo Frio	46	28	401, 402, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 445	16
	Taim	4	4	501, 502, 503, 504	3
Com desafio	Anchieta	117	59	6a, 6b, 7a, 7b, 8a, 8b, 9a, 9b, 16a, 16b, 17a, 17b, 21a, 21b, 22a, 22b, 28, 29a, 29b, 33a, 33b, 35a, 35b, 36, 37, 38, 39, 40a, 40b, 42a, 42b, 43a, 43b, 50, 53, 57, 60, 61, 62, 63, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 86, 87, 88, 89, 90	45
	Cabo Frio	87	46	103a, 103b, 111, 113, 114, 115, 116a, 116b, 117, 118, 120, 121, 122, 123, 128, 131, 132, 134, 135, 136, 137, 139, 141, 142, 145, 147, 148, 149, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 165, 166, 167, 168, 169, 172, 175, 176, 179, 180, 181, 183	22
	Taim	126	67	218, 219a, 219b, 221a, 221b, 222, 223, 224, 226a, 226b, 227a, 227b, 228, 229, 230a, 230b, 231, 233, 234, 235a, 235b, 236a, 236b, 237, 238, 239a, 239b, 240a, 240b, 242, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 292, 293, 294, 299, 2100, 2101, 2104, 2105, 2107, 2108, 2109, 2110	8
Total				255	129

Tabela 10 Descrição dos sobre os *spots* retirados e identificados através da espectrometria de massa nas populações de cada uma das análises /grupo: os *spots* em vermelho foram identificados pelo MALDI

Grupo	Análise	População com ↑ expressão	<i>Spots</i> retirados	Nº de <i>spots</i> identificados	Nº de proteínas identificadas
Sem desafio	ANC x CF	ANC	303b, 304b, 306b, 307b, 311b, 312b, 313b, 317b, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343	22	6
		CF	425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 445	11	6
	ANC x TM	ANC	301, 302, 303a, 304a, 305, 306a, 307a, 308, 309, 310, 311a, 312a, 313a, 314, 315, 316, 317a, 318	13	11
		TM	501, 502, 503, 504	3	3
Com desafio	CF x TM	CF	401, 402, 404, 405, 406, 407, 408, 409	5	4
		TM	-	-	-
	ANC x CF	ANC	6a, 7a, 8a, 9a, 16a, 17a, 21a, 22a, 28, 29a, 33a, 35a, 36, 37, 38, 39, 40a, 42a, 43a	15	7
		CF	103a, 111, 113, 114, 115, 116a, 117, 118	4	3
	ANC x TM	ANC	6b, 7b, 8b, 9b, 16b, 17b, 21b, 22b, 29b, 33b, 35b, 40b, 42b, 43b, 50, 53, 57, 60, 61, 62, 63, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 86, 87, 88, 89, 90	30	9
		TM	218, 219a, 221a, 222, 223, 224, 226a, 227a, 228, 229, 230a, 231, 233, 234, 235a, 236a, 237, 238, 239a, 240a, 242	1	1
CF x TM		CF	103b, 116b, 120, 121, 122, 123, 128, 131, 132, 134, 135, 136, 137, 139, 141, 142, 145, 147, 148, 149, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 165, 166, 167, 168, 169, 172, 175, 176, 179, 180, 181, 183	18	10
		TM	219b, 221b, 226b, 227b, 230b, 235b, 236b, 239b, 240b, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 292, 293, 294, 299, 2100, 2101, 2104, 2105, 2107, 2108, 2109, 2110	7	9
Total			255	129	69*

* Número que considera proteínas redundantes, as quais, se excluídas, totalizam 23

Duas proteínas hipotéticas foram observadas em seis *spots* deste estudo. VITISV_008938 (*Vitis vinifera*) foi encontrada nos *spots* 42a,b (ANC CD), 179 (CF CD), 2108 (TM CD) e 445 (CF SD); no *spot* 2105 (TM CD) foi encontrada a proteína LOTGIDRAFT_234865 (*Lottia gigantea*).

As proteínas identificadas, a população/grupo em que tiveram expressão aumentada, sua massa molecular e pI preditos, bem como o *GenInfo Identifier* (GI) e o organismo no qual a proteína foi identificada estão discriminados na Tabela 11.

Tabela 11 Lista de proteínas identificadas com detalhes a respeito da população/grupo em que apresentou expressão aumentada, *spots* em que foi encontrada, *GenInfo Identifier* (GI) e o organismo em que foi identificada

<i>Spot</i>	<i>Proteína</i>	<i>População</i>	<i>GI</i>	<i>Organismo</i>
35a,b, 36, 60, 61, 62, 63, 64, 66, 67, 68, 71	Actina	↑ANC/CD	gi 47116420	<i>Biomphalaria tenagophila</i>
134, 135, 136, 139, 142, 147, 166, 176		↑CF/CD	gi 47116420	<i>Biomphalaria tenagophila</i>
240a,b		↑TM/CD	gi 89953743	<i>Saccharomycopsis fibuligera*</i>
2100		↑TM/CD	gi 47116420	<i>Biomphalaria tenagophila</i>
305, 306a,b, 307a,b, 312a,b, 336, 338		↑ANC/SD	gi 47116420	<i>Biomphalaria tenagophila</i>
404, 405, 409, 427, 428, 429, 431		↑CF/SD	gi 47116420	<i>Biomphalaria tenagophila</i>
502, 503		↑TM/SD	gi 47116420	<i>Biomphalaria tenagophila</i>
29a,b	Albumina	↑ANC/CD	gi 528078183	<i>Mesocricetus auratus*</i>
29a,b		↑ANC/CD	gi 149033753	<i>Rattus norvegicus*</i>
29a,b		↑ANC/CD	gi 3121749	<i>Meriones unguiculatus*</i>
2105		↑TM/CD	gi 528078183	<i>Mesocricetus auratus*</i>
50	Tubulina	↑ANC/CD	gi 524868474	<i>Aplysia californica</i>
319		↑ANC/SD	gi 524868474	<i>Aplysia californica</i>
6a,b, 7a,b, 8a,b, 50		↑ANC/CD	gi 333449475	<i>Crassostrea ariakensis</i>
			gi 577029901	<i>Biomphalaria glabrata</i>
			gi 405959361	<i>Crassostrea gigas</i>
319		↑ANC/SD	gi 333449475	<i>Crassostrea ariakensis</i>
			gi 405959361	<i>Crassostrea gigas</i>
120	Calreticulina	↑CF/CD	gi 568801456	<i>Hirudo medicinalis*</i>
301		↑ANC/SD	gi 677988415	<i>Acanthisitta chloris*</i>
			gi 568801456	<i>Hirudo medicinalis*</i>
120		↑CF/CD	gi 524916025	<i>Aplysia californica</i>
301		↑ANC/SD	gi 524916025	<i>Aplysia californica</i>
434, 437, 438	Cisteíno peptidase catepsina-L-like	↑CF/SD	gi 118425914	<i>Radix peregra</i>
122	Dissulfeto isomerase	↑CF/CD	gi 563426273	<i>Biomphalaria glabrata</i>
72	Endo-1,4-beta-mannanase 1	↑ANC/CD	gi 56462580	<i>Biomphalaria glabrata</i>
314	Endo-1,4-beta-mannanase 1	↑ANC/SD	gi 56462580	<i>Biomphalaria glabrata</i>
75	Enolase	↑ANC/CD	gi 524916025	<i>Aplysia californica</i>
155		↑CF/CD	gi 524916025	<i>Aplysia californica</i>
310		↑ANC/SD	gi 524916025	<i>Aplysia californica</i>

33a,b, 35a,b, 43a,b, 66	Fator 1 de liberação da cadeia de peptídeo <i>like</i>	↑ANC/CD	gi 524878697	<i>Aplysia californica</i>
115		↑CF/CD	gi 524878697	<i>Aplysia californica</i>
313a,b, 331, 333, 335		↑ANC/SD	gi 524878697	<i>Aplysia californica</i>
501		↑TM SD	gi 524878697	<i>Aplysia californica</i>
122, 123, 136, 148	Frutose-bisfosfato aldolase	↑CF/CD	gi 572264787	<i>Apis dorsata</i> *
16a,b, 17a,b, 21a,b, 22a,b, 76, 86, 88, 89	Hemoglobina	↑ANC/CD	gi 110319967	<i>Biomphalaria glabrata</i>
312a,b, 316, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 334, 336, 337, 343		↑ANC/SD	gi 110319967	<i>Biomphalaria glabrata</i>
407		↑CF/SD	gi 110319967	<i>Biomphalaria glabrata</i>
503		↑TM/SD	gi 110319967	<i>Biomphalaria glabrata</i>
74		↑ANC/CD	gi 110319969	<i>Biomphalaria glabrata</i>
323, 335, 343		↑ANC/SD	gi 110319969	<i>Biomphalaria glabrata</i>
263		↑TM/CD	gi 122508	<i>Vulpes vulpe</i> *
165	Precursor de serino protease	↑CF/CD	gi 16716569	<i>Mus musculus</i> *
2100		↑TM/CD	gi 16716569	<i>Mus musculus</i> *
315, 335		↑ANC/SD	gi 16716569	<i>Mus musculus</i> *
2105	Proteína 1.4 que contém tioéster	↑TM/CD	gi 293595795	<i>Biomphalaria glabrata</i>
2100	Proteína 93 com domínio <i>coiled-coil</i>	↑TM/CD	gi 405978711	<i>Crassostrea gigas</i>
134, 135	Proteína cognata de choque térmico 70 (HSP70)	↑CF/CD	gi 225906407	<i>Haliotis diversicolor</i>
272, 273	Proteína de ligação a DNA	↑TM/CD	gi 652405222	<i>Pontibacillus halophilus</i> *
409		↑CF/SD	gi 652405222	<i>Pontibacillus halophilus</i> *
2105	Proteína hipotética LOTGIDRAFT_234865	↑TM/CD	gi 676478548	<i>Lottia gigantea</i>
42a,b	Proteína hipotética VITISV_008938	↑ANC/CD	gi 147816050	<i>Vitis vinifera</i> *
179		↑CF/CD	gi 147816050	<i>Vitis vinifera</i> *
2108		↑TM/CD	gi 147816050	<i>Vitis vinifera</i> *
111	Provável proteína de canal seletivo a ânion dependente de voltagem 2	↑CF/CD	gi 51105062	<i>Lymnaea stagnalis</i>
315, 316		↑ANC/SD	gi 51105062	<i>Lymnaea stagnalis</i>
407, 408		↑CF/SD	gi 51105062	<i>Lymnaea stagnalis</i>
132, 134, 135	Subunidade β da ATP sintase	↑CF/CD	gi 51714799	<i>Butyricimonas synergistica</i> *

303a,b		↑ANC/SD	gi 654866444	<i>Desulfobulbus elongatus*</i>
			gi 71370914	<i>Acyrtosiphon pisum*</i>
134, 132, 135, 169		↑CF/CD	gi 374534595	<i>Acyrtosiphon pisum*</i>
303a,b		↑ANC/SD	gi 374534595	<i>Acyrtosiphon pisum*</i>
7a,b, 8a,b, 38, 40		↑ANC/CD	gi 374534595	<i>Acyrtosiphon pisum*</i>
308	Subunidade β de peptidase de processamento mitocondrial <i>like</i>	↑ANC/SD	gi 524889526	<i>Aplysia californica</i>
175	Transaldolase	↑CF/CD	gi 524882120	<i>Aplysia californica</i>
117, 117	Triosefosfato isomerase	↑CF/CD	gi 71370922	<i>Haliotis rufescens</i>
318		↑ANC/SD	gi 71370922	<i>Haliotis rufescens</i>

*Organismos não pertencentes ao filo Mollusca

Notou-se que determinadas proteínas apareceram como super expressas em ambas as populações comparadas. No grupo desafiado, a análise ANC x CF mostrou que fator 1 de liberação da cadeia de peptídeo estava presente em ambas as populações. Actina foi identificada nas duas populações de ANC x TM, e actina e precursor de serino protease foram comuns em ambas as linhagens de CF x TM. Este fato também ocorreu no grupo não desafiado em que actina e subunidade β da ATP sintase mitocondrial estavam aumentadas tanto em ANC quanto em CF quando elas foram comparadas. O mesmo ocorreu com actina, hemoglobina tipo 1 e fator 1 de liberação da cadeia de peptídeo na análise de ANC x TM.

Além de averiguar a expressão diferencial de proteínas entre as populações dentro de cada grupo experimental, também foi realizada a comparação das proteínas diferencialmente expressas em Anchieta, Cabo Frio e Taim antes e após o desafio com *S. mansoni*. Os resultados encontrados são descritos na Tabela 12, que apresenta a lista de proteínas identificadas neste estudo e seu aparecimento nas três populações de *B. tenagophila* em questão, desafiadas ou não pelo parasito.

Tabela 12 Comparação da diferença de expressão das proteínas identificadas neste estudo por população, antes e após o desafio

População	Anchieta		Cabo Frio		Taim	
	SD	CD	SD	CD	SD	CD
Actina	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Albumina	–	↑	–	↓	–	↑
Calreticulina	↑	–	↑	↑	↓	↓
Cisteíno peptidase catepsina-L like	↓	–	↑	–	–	–
Dissulfeto isomerase	–	–	–	↑	–	↓
Endo-1,4- β -mannanase	↑	↑	–	–	↓	↓
Enolase	↑	↑	–	↑	↓	↓
Fator 1 de liberação da cadeia de peptídeo	↑	↑	↓	↑	↑	↓
Frutose-bisfosfato aldolase	–	–	–	↑	–	↓
Hemoglobina	↑	↑	↑	↓	↑	↑
Precursor de serino protease	↑	–	↓	↑	↓	↑
Proteína cognata de choque térmico 70	–	–	–	↑	–	↓
Proteína de ligação a DNA	–	–	↑	↓	↓	↑
Proteína 1.4 com ligação a tioéster	–	–	–	↓	–	↑
Proteína 93 com domínio <i>coiled-coil</i>	–	–	–	↓	–	↑
Proteína hipotética LOTGIDRAFT_234865	–	–	–	↓	–	↑
Proteína hipotética VITISV_008938	↓	↑	↑	↑	–	↑
Provável proteína de canal seletivo a ânion dependente de voltagem 2	↑	–	↑	↑	↓	–
Subunidade β da ATP sintase	↑	↑	↑	↑	↓	↓

Subunidade β de peptidase de processamento mitocondrial	↑	-	-	-	↓	-
Transaldolase	-	-	-	↑	-	↓
Triosefosfato isomerase	↑	-	↑	↑	↓	-
Tubulina	↑	↑	↓	↓	-	↓

Os diagramas de Venn da Figura 10 demonstram o número de proteínas com expressão aumentada entre as populações resistentes e suscetível, antes e após o desafio.

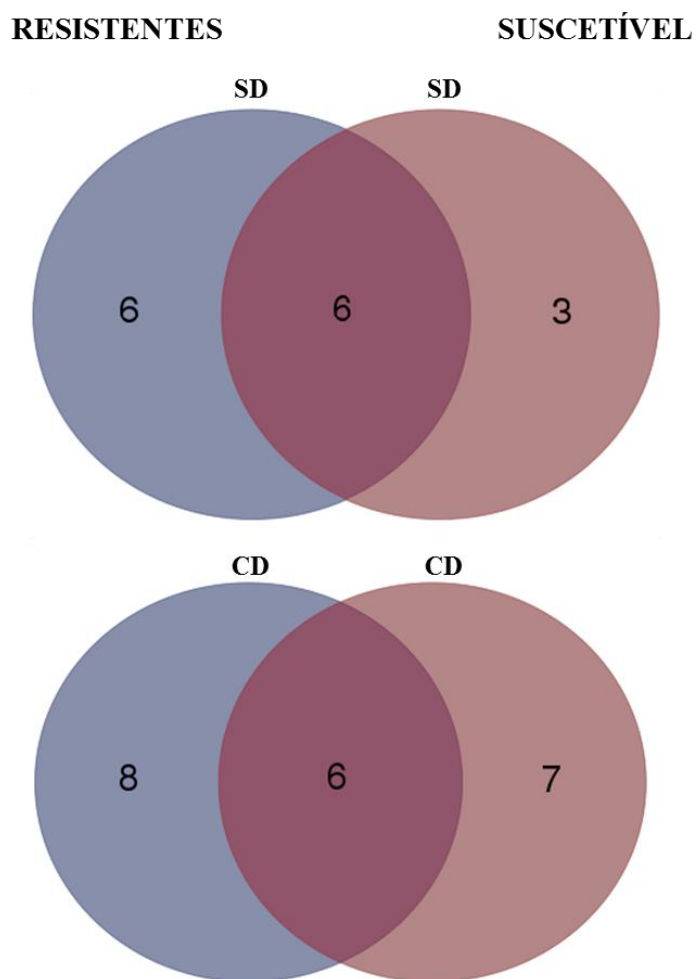


Figura 10: Diagramas de Venn demonstrando o número de proteínas com aumento de expressão entre as populações resistentes e suscetível, sem (SD) e com (CD) desafio. A intersecção mostra a quantidade de proteínas com expressão aumentada em ambas as condições.

As proteínas calreticulina, precursor de serino protease, provável proteína de canal seletivo a ânion dependente de voltagem 2, subunidade β de peptidase de processamento mitocondrial e triosefosfato isomerase estavam mais expressas em ANC

antes do desafio, enquanto albumina e a proteína hipotética VITISV_008938 demonstraram aumento de expressão nesta população quando foi desafiada. Além disso, outras sete proteínas apareceram super expressas em ambas as condições: actina, enolase, endo-1,4- β -mannanase, fator 1 de liberação de cadeia de peptídeo, hemoglobina, subunidade β da ATP sintase e tubulina.

Três proteínas estavam aumentadas em CF antes do desafio, sendo elas cisteíno peptidase catepsina-L *like*, hemoglobina e proteína de ligação a DNA. Posteriormente ao desafio, foram caracterizadas com aumento de expressão as proteínas: dissulfeto isomerase, enolase, frutose-bisfosfato aldolase, HSP70, fator 1 de liberação da cadeia de peptídeo, precursor de serino protease e transaldolase. Seis proteínas foram coincidentes: actina, calreticulina, subunidade β da ATP sintase, proteína hipotética VITISV_008938, provável proteína de canal seletivo a ânion dependente de voltagem 2 e triosefosfato isomerase.

Finalmente, notou-se significativa mudança de expressão proteica na população de TM frente ao desafio. Antes da exposição a *S. mansoni* somente fator 1 de liberação da cadeia de peptídeo estava aumentada. Após o desafio, surgiram albumina, precursor de serino protease, proteína 1.4 com ligação a tioéster, proteína 93 com domínio *coiled-coil*, proteína de ligação a DNA e as duas proteínas hipotéticas. Actina e hemoglobina foram super expressas em ambas as condições.

5.2.4 *Investigação da função das proteínas*

As 23 proteínas identificadas foram agrupadas em 11 categorias funcionais de acordo com o *FunCat*. Observou-se que algumas proteínas foram classificadas em mais de uma função, conforme demonstrado na Tabela 13.

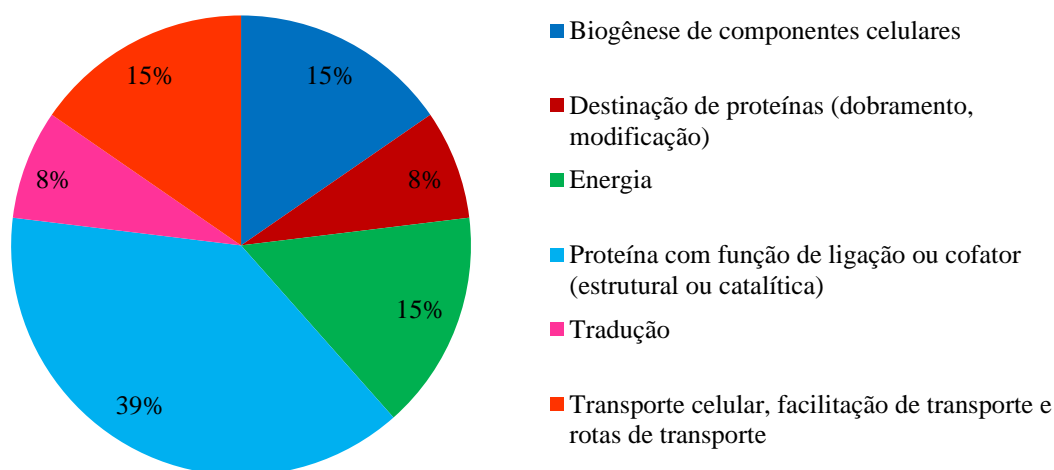
Tabela 13 Categorização funcional das proteínas identificadas segundo análise no *Gene Ontology* e *FunCat*

CATEGORIA FUNCIONAL	TOTAL
PROTEÍNA COM FUNÇÃO DE LIGAÇÃO OU COFATOR (ESTRUTURAL OU CATALÍTICA)	16
Actina	
Albumina	
Calreticulina	
Enolase	
Frutose-bisfosfato aldolase	

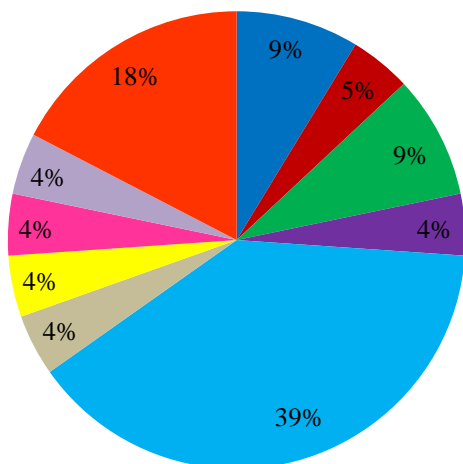
Hemoglobina	
Precursor de serino protease	
Proteína cognata de choque térmico 70	
Proteína de ligação a DNA	
Proteína hipotética LOTGIDRAFT_234865	
Proteína hipotética VITISV_008938	
Subunidade β da ATP sintase	
Subunidade β de peptidase de processamento mitocondrial <i>like</i>	
Transaldolase	
Triosefosfato isomerase	
Tubulina	
METABOLISMO	4
Dissulfeto isomerase	
Endo-1,4- β -mannanase	
Transaldolase	
Triosefosfato isomerase	
TRANSPORTE CELULAR, FACILITAÇÃO DE TRANSPORTE E ROTAS DE TRANSPORTE	5
Albumina	
Hemoglobina	
Proteína hipotética LOTGIDRAFT_234865	
Provável proteína de canal seletivo a ânion dependente de voltagem 2	
Subunidade β da ATP sintase	
RESGATE CELULAR, DEFESA E VIRULÊNCIA	1
Proteína cognata de choque térmico 70	
INTERAÇÃO COM O AMBIENTE CELULAR	2
Dissulfeto isomerase	
Proteína hipotética LOTGIDRAFT_234865	
BIOGÊNESE DE COMPONENTES CELULARES	2
Actina	
Tubulina	
ENERGIA	4
Triosefosfato isomerase	
Enolase	
Fator 1 de liberação da cadeia de peptídeo	
Subunidade β da ATP sintase	
TRANSCRIÇÃO	1
Proteína de ligação a DNA	
TRADUÇÃO	1
Fator 1 de liberação da cadeia de peptídeo	
DESTINAÇÃO DE PROTEÍNAS (DOBRAMENTO, MODIFICAÇÃO)	4
Calreticulina	
Cisteíno peptidase catepsina-L- <i>like</i>	
Precursor de serino protease	
Subunidade β de peptidase de processamento mitocondrial <i>like</i>	
REGULAÇÃO DO METABOLISMO E FUNÇÃO DE PROTEÍNA	1

As proteínas com expressão aumentada oriundas da comparação entre as linhagens resistentes e a linhagem suscetível, antes e após o desafio, foram categorizadas funcionalmente e os resultados são mostrados na Figura 11. Foi possível observar predominância de proteínas com função de ligação ou cofator em todas as comparações realizadas. Nas populações resistentes desafiadas comparadas com a suscetível, destacaram-se também proteínas relacionadas com transporte celular (18%) (Figura 11B). Enquanto isso, a população suscetível, quando comparada às populações resistentes, apresentou grande porcentagem de proteínas na categoria Energia (16%) após o desafio (Figura 11D).

A) Resistente x Suscetível sem desafio

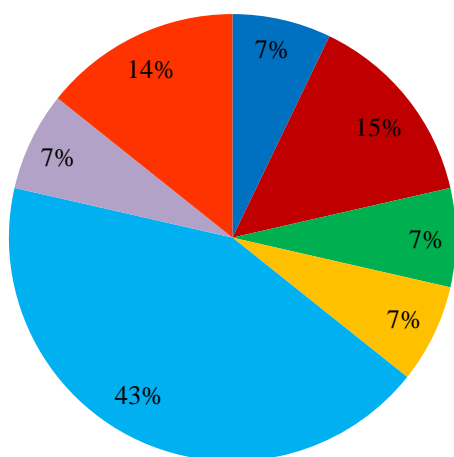


B) Resistente x Suscetível com desafio



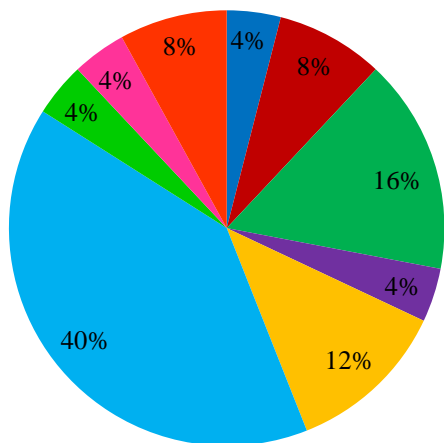
- Biogênese de componentes celulares
- Destinação de proteínas (dobramento, modificação)
- Energia
- Interação com o ambiente celular
- Proteína com função de ligação ou cofator (estrutural ou catalítica)
- Proteínas não categorizadas
- Regulação do metabolismo e função de proteína
- Tradução
- Transcrição
- Transporte celular, facilitação de transporte e rotas de transporte

C) Suscetível x Resistente sem desafio



- Biogênese de componentes celulares
- Destinação de proteínas (dobramento, modificação)
- Energia
- Metabolismo
- Proteína com função de ligação ou cofator (estrutural ou catalítica)
- Transcrição
- Transporte celular, facilitação de transporte e rotas de transporte

D) Suscetível x Resistente com desafio



- Biogênese de componentes celulares
- Destinação de proteínas (dobramento, modificação)
- Energia
- Interação com o ambiente celular
- Metabolismo
- Proteína com função de ligação ou cofator (estrutural ou catalítica)
- Resgate celular, defesa e virulência
- Tradução
- Transporte celular, facilitação de transporte e rotas de transporte

Figura 11 Categorização funcional das proteínas aumentadas oriunda da comparação entre as linhagens resistentes (ANC e TM) e a linhagem suscetível (CF) antes (A e C) e após (B e D) o desafio.

6 DISCUSSÃO

Sabe-se que fatores celulares são importantes na determinação do sucesso ou falha da infecção de *S. mansoni* nos hospedeiros invertebrados. Desta forma, este estudo realizou comparação dos padrões de proteínas produzidas pelos hemócitos presentes na hemolinfa de caramujos da espécie *B. tenagophila* resistentes e suscetível à infecção por *S. mansoni*. O principal objetivo foi identificar proteínas diferencialmente expressas que poderiam estar envolvidas com os fenótipos de resistência ou suscetibilidade. Proteínas diferencialmente expressas pelos hemócitos de *B. tenagophila* foram encontradas em ambos os fenótipos resistentes e suscetíveis a *S. mansoni*.

Pela primeira vez a técnica de DIGE foi utilizada para investigar o perfil diferencial de expressão proteica em uma espécie do gênero *Biomphalaria*. Na literatura científica disponível predominam estudos que utilizam a eletroforese bidimensional convencional (2-DE) associada à espectrometria de massas para avaliar a expressão de proteínas, o que tem possibilitado melhores entendimentos sobre a interação entre *Biomphalaria* e trematódeos (Bouchut et al. 2006, Jannotti-Passos et al. 2008, Roger et al. 2008). Entretanto, a 2-DE está sujeita a considerável variabilidade técnica relacionada, dentre outros fatores, à preparação das amostras, tipos de reagentes utilizados, métodos de coloração e manipulação do indivíduo que conduz o experimento. Com o advento do DIGE estas variáveis foram amenizadas, uma vez que a técnica permite que até três amostras sejam marcadas com diferentes corantes e submetidas à eletroforese em um único gel, além de propiciar maior precisão e reprodutibilidade nos *matches* dos *spots* (Tannu & Hemby 2006).

A técnica de DIGE já foi aplicada com sucesso em diversos estudos com o intuito de investigar a relação da expressão diferencial de proteínas com o fenótipo de resistência ou virulência de diferentes organismos (Doliwa et al. 2013, Jenkins et al. 2014, Pires et al. 2014).

São raros os trabalhos que utilizam *B. tenagophila* para investigar as bases moleculares da sua interação com *S. mansoni*, pois o foco direciona-se para *B. glabrata*, o principal hospedeiro invertebrado deste helminto no novo mundo. A maioria dos estudos moleculares com *B. glabrata* tem como enfoque a tentativa de entender as bases da resistência à invasão do parasito (Knight et al. 2000). Investigações proteômicas envolvendo a relação de resistência/suscetibilidade de caramujos do gênero

Biomphalaria à infecção por *S. mansoni* são escassas, apesar do impacto que estes organismos exercem na saúde pública.

Muitos estudos existentes estão relacionados com a busca do perfil de expressão gênica, via RNA, resultante da exposição de *B. glabrata* a *S. mansoni*, o que tem gerado relevantes conhecimentos. Sabe-se, contudo, que a associação direta entre RNA e níveis de proteínas deve ser cautelosa, visto que pode ser afetada por fatores como genes que são traduzidos em mais de um produto proteico, responsividade diferencial de RNAm e proteínas a estímulos intra e extracelulares, modificações pós-transcricionais ou pós-traducionais, e microRNAs (Tannu & Hemby 2006). Exemplo disto é o estudo de Bouchut et al. (2006) que verificou a expressão diferencial de proteínas nos hemócitos de *B. glabrata* resistentes e suscetíveis a *Echinostoma caproni* (Trematoda: Echinostomatidae), e caracterizou os genes codificadores das proteínas encontradas. Os resultados mostraram que, em alguns casos, a proteína foi detectada em hemócitos de uma única linhagem, embora os transcritos correspondentes estivessem igualmente aumentados em ambas as cepas, sugerindo a ocorrência de processos pós-transcricionais ou traducionais. Comparando técnicas de estudo de expressão de RNAm e de proteínas, Greenbaum et al. (2003) afirmaram que conhecer os valores de expressão de RNAm é significativo e útil, mas os resultados obtidos são correlativos. Para se compreender verdadeiramente as forças que causam alterações celulares é essencial que se determine a alternância de proteínas expressas, bem como suas interações.

A identificação das proteínas de um organismo através de sequências peptídicas é facilitada quanto mais completo seu genoma. Tyers & Mann (2003) afirmaram que a proteômica não seria possível sem as conquistas da genômica, a qual proporcionou a predição de possíveis produtos gênicos que são o ponto focal dos estudos proteômicos. Apesar de *B. tenagophila* não apresentar o genoma sequenciado, havia grandes expectativas de que o genoma de *B. glabrata* fosse concluído e disponibilizado no ano de 2014, pois os estudos já se encontravam bastante avançados. Desta forma, a similaridade entre estas duas espécies permitiria que as sequências de nucleotídeos fossem encontradas por homologia. Entretanto, contrariando as expectativas, o genoma de *B. glabrata* foi finalizado, mas ainda não disponibilizado e publicado. Desta forma, melhor identificação das proteínas pelo *software* MASCOT foi impossibilitada, sendo necessário utilizar o BLAST para buscar sequências similares nos bancos de dados do NCBI. Outro reflexo da ausência do genoma foi a escassez de

informações completas sobre proteínas de *Biomphalaria* nos bancos de dados destinados a este fim, o que prejudicou a construção de redes de interação.

Diante desta realidade, parte da discussão do presente trabalho baseou-se em estudos de expressão gênica por RNA.

A caracterização de perfis transcritos de linhagens de *Biomphalaria* resistentes a *S. mansoni* tem revelado fatores associados a esta resistência. Dentre eles estão as proteínas relacionadas ao fibrinogênio (FREPs), as quais tem a capacidade de reconhecer moléculas derivadas de esporocistos de trematódeos digenéticos, precipitando produtos excretados e secretados pelos parasitos e se ligando a diversas glicoproteínas produzidas por eles. Essas proteínas são produzidas por hemócitos e se mostram aumentadas após a infecção por trematódeos, e diversos trabalhos já atestaram seu papel na proteção e defesa de invertebrados contra antígenos não-próprios (Adema et al. 1997, Hanington et al. 2010, Hanington & Zhang 2011, Hanington et al. 2012). Interessante observar que neste trabalho nenhuma FREP foi encontrada como diferencialmente expressa nas três populações de *B. tenagophila* independentemente do desafio, apesar da conhecida participação na contenção da infecção de trematódeos em moluscos deste gênero. A busca de informações sobre as FREPs de *Biomphalaria* no banco de dados UniProt revelou que elas são proteínas com massa molecular de aproximadamente 12 kDa. Além disso, o preparo do extrato proteico pode romper interações entre aminoácidos, clivando a molécula e estas aparecerem no gel em pedaços menores que a massa molecular predita. Diante desta informação foi feita uma análise dos géis do DIGE e constatou-se que o *spot* 2100, que se encontra muito próximo à extremidade inferior do Gel 6, apresentou massa molecular experimental de 12kDa. Desta forma, pode-se suspeitar que as FREPs tenham saído do gel em virtude da sua baixa massa molecular, sendo provavelmente necessário aumentar a concentração do gel de acrilamida utilizado nos experimentos para que estas proteínas possam ser detectadas.

O numero maior de spots em relação ao numero de proteínas identificadas se deve ao fato de que muitas vezes a mesma proteína apareceu em *spots* diferentes, o que pode ser devido a isoformas das proteínas ou modificações pós-traducionais.

Das 23 proteínas aqui identificadas, duas eram proteínas hipotéticas identificadas em *Lottia gigantea* (Mollusca: Gastropoda) e *Vitis vinífera* (Viridiplantae: Spermatophyta), o que significa que foram preditas por ferramentas de

identificação de genes durante a análise do genoma destes organismos, porém sem evidências experimentais.

As proteínas diferencialmente expressas entre os hemócitos das diferentes linhagens de *B. tenagophila* possibilitam um conhecimento dos complexos processos moleculares envolvidos na resposta de defesa a *S. mansoni*.

Albumina e hemoglobina, proteínas de ligação a íons metal e, no caso da hemoglobina, a heme e oxigênio também, apresentaram variação da expressão entre as linhagens suscetíveis e resistentes com relação ao desafio. A albumina estava diferencialmente aumentada nas duas populações resistentes desafiadas. Quanto à hemoglobina, as populações de Cabo Frio e Anchieta apresentaram expressão aumentada antes do desafio e, nesta última, a tendência se manteve posteriormente à exposição ao parasito; em Taim também houve aumento após o desafio. Hanelt et al. (2008) relataram aumento de transcritos de genes envolvidos na ligação a heme, íons metal e transporte de oxigênio em *B. glabrata* em resposta ao desafio com *S. mansoni* e bactérias, o que caracteriza uma resposta ancestral de defesa do hospedeiro contra patógenos.

Em Anchieta antes e após o desafio e Taim desafiada notou-se elevação das proteínas envolvidas na transcrição e tradução, indicando possível elevação da atividade celular que, no caso das linhagens resistentes, é consistente com a geração de componentes necessários para a montagem de uma resposta de defesa (Lockyer et al. 2012).

A Proteína 1.4 que contém tioéster (TEP) foi encontrada em um *spot* na população resistente de Taim desafiada quando comparada a Cabo Frio desafiada e foi categorizada no processo biológico de regulação negativa de atividade de endopeptidase. Esta proteína pertence a uma categoria molecular que tem papel na fagocitose ou encapsulação de um patógeno após seu reconhecimento. Investigando a formação de imunocomplexos decorrentes da interação entre moléculas imunoreceptoras de *B. glabrata* contidas no extrato do plasma e antígenos do extrato de duas linhagens de *S. mansoni*, Moné et al. (2010) descobriram que proteínas que contêm tioéster participam do complexo formado pelas proteínas relacionadas ao fibrinogênio (FREPs) e pelas mucinas polimórficas de *S. mansoni*. As três famílias de TEPs são compostas por proteínas macroglobulinas $\alpha 2$ (A2M) inibidoras universais de proteases em vertebrados e invertebrados, proteínas que participam do sistema complemento dos vertebrados (C3/C4/C5), e A2M não clássicas que incluem um subgrupo exclusivo de

espécies de invertebrados e isoformas de TEP de superfície celular. Os autores ainda comentam que a TEP de *B. glabrata* apresenta resíduos de cisteína comuns às TEPs de *Drosophila*, *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) e *Chlamys farreri* (Mollusca: Pectinidae), além de compartilhar outras características com TEP2 de *D. melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) envolvida com a fagocitose de *Escherichia coli*. Lagueux et al. (2000) mencionam a descoberta de quatro genes que codificam TEPs em *Drosophila* significativamente similares às proteínas que contêm tioéster da superfamília do complemento. Os genes são expressos em níveis baixos em todos os estágios de vida do díptero, mas a expressão é aumentada após o desafio com *E. coli*.

Em *A. gambiae*, a TEP1 apresenta grande similaridade com fatores do complemento dos vertebrados e seu papel na resposta contra bactérias é claro. No mosquito, os hemócitos produzem TEP1 e a liberam na hemolinfa como uma molécula de cadeia única, e os níveis de expressão da proteína também sofrem elevação quando há infecções bacterianas ou parasitárias. A ativação da TEP requer exposição da ligação tioéster na sua porção C-terminal, o que se dá através de clivagem proteolítica. Desta forma, a proteína pode se ligar à superfície do seu alvo, permitindo a fagocitose pelo hemócito (Blandin & Levashina 2004, Blandin & Levashina 2007). A TEP encontrada em *B. glabrata* por Moné et al. (2010) apresentava sinais de clivagem, indicando que estava em sua forma ativa no imunocomplexo, exercendo seu papel de opsonização. De forma semelhante, a TEP encontrada neste trabalho apresentou indícios de clivagem. A sua massa molecular predita foi de aproximadamente 160kDa, mas foi encontrada com massa molecular experimental de 30kDa, indicando possibilidade de estar em sua forma ativa.

A proteína de choque térmico 70 (HSP70) pertence a uma família de proteínas chaperonas que atuam na proteção das células contra danos irreversíveis e morte, ocasionados por infecções, inflamações e variações de temperatura (Zahoor et al. 2010). Foi identificado aumento desta proteína de resposta ao estresse na população de Cabo Frio após o desafio (*spots* 134 e 135). A análise proteômica de tecido cardíaco e pericárdio de *B. tenagophila* realizada por Jannootti-Passos et al. (2008) indicou aumento da expressão da HSP70 na população de Taim antes e após o desafio com *S. mansoni*, e na população de Cabo Frio somente após a infecção. Muitos estudos relatam a expressão gênica diferencial da HSP70 em hemócitos de linhagens resistentes de *B. glabrata* após a infecção por *S. mansoni* (Lockyer et al. 2008, Lockyer et al. 2012), porém Ittiprasert et al. (2009) demonstraram que transcritos de HSP70 tiveram

regulação intensificada em moluscos jovens de *B. glabrata* suscetível ao trematódeo em comparação com uma linhagem resistente. Interessante notar que Arikan-Goktas et al. (2014) mostraram evidências de que *S. mansoni* foi capaz de reorganizar o genoma de *B. glabrata* suscetível e regular de forma positiva a transcrição de determinados genes, dentre eles o da HSP70, duas horas após a infecção, o que não ocorreu com a cepa resistente. Além disso, alguns experimentos mostram que a inibição das HSPs em caramujos suscetíveis os torna resistentes e que, por outro lado, quando indivíduos resistentes são expostos a mudanças de calor, os mesmos tornam-se suscetíveis (Ittiprasert & Knight 2012, Arikan-Goktas et al. 2014). Indícios levam a crer que a presença das HSPs são importantes para o sucesso da infecção do parasito em seu hospedeiro, porém as divergências expõem a necessidade de mais estudos que busquem o melhor entendimento de como a expressão do gene e proteína HSP influenciam o efeito celular frente à infecção por *S. mansoni*.

Em quatro *spots* (122, 123, 136 e 148) da população de CF desafiada foi encontrada a isoforma da frutose-bisfosfato aldolase, enzima que atua na via da glicólise. Um estudo que realizou comparações dos padrões proteicos de hemócitos de caramujos suscetíveis e resistentes à infecção utilizando o modelo *B. glabrata/E. caproni* também detectou frutose-bisfosfato aldolase somente no extrato das células da linhagem suscetível (Bouchut et al. 2006). Além da função catalítica, foi observado por Wang et al. (1996) que frutose-1,6-bisfosfato aldolase pode interagir com proteínas do citoesqueleto, como a actina, exercendo papel de organização do citoplasma. Estudos em *Toxoplasma gondii* (Apicomplexa: Sarcocystidae) demonstraram que aldolase pode promover a conexão entre moléculas de adesão do parasito com o citoesqueleto do hospedeiro, fornecendo um modelo que faz ligação entre adesão e motilidade. Sendo assim, o envolvimento da aldolase na interação entre *B. glabrata/E. caproni* pode ter relação com a compatibilidade das linhagens de caramujo, uma vez que a diferença na expressão desta proteína entre as linhagens pode explicar a diferença na motilidade e adesão dos hemócitos das cepas suscetíveis que falham em encapsular o parasito (Bouchut et al. 2006).

A proteína hipotética LOTGIDRAFT_234865 foi encontrada diferencialmente expressa em TM desafiado e foi inserida em três categorias pelo *FunCat*, sendo elas: proteína com função de ligação ou cofator, proteína de transporte e proteína de interação com o ambiente celular. Quanto à função de ligação, a busca detalhada no *UniProt* revela que a LOTGIDRAFT_234865 está associada à ligação a ferro férrico (Fe³⁺) e

transporte de íons de Fe. Sabe-se que hemócitos de *Biomphalaria* produzem espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), as quais tem papel crucial na eliminação do esporocisto de *S. mansoni*. Além disso, trabalhos mostram que hemócitos de linhagens resistentes produzem significativamente mais espécies reativas do que as suscetíveis (Moné et al. 2011). O íon ferroso (Fe^{2+}) catalisa a formação do radical livre hidroxila (OH) a partir de H_2O_2 , gerando Fe^{3+} (Aguiar & Ferraz 2007, Lockyer et al 2012). Assim, embora não tenha sido observado aumento de proteína com papel oxidativo, o aumento de uma proteína com função de ligação à Fe^{3+} , produto da transformação de peróxido de hidrogênio, em uma população resistente posteriormente à exposição ao parasito sugere crescimento na atividade oxidante dos hemócitos desta linhagem.

O presente trabalho descreveu conjuntamente proteínas de hemócitos de *B. tenagophila* com expressão alterada em relação aos fenótipos de resistência e suscetibilidade antes e após o desafio por *S. mansoni*. A hipótese proposta para contribuir com o entendimento do fenótipo resistente é que, inicialmente e em resposta à infecção, caramujos de linhagens suscetíveis aumentam a expressão da proteína frutose-bisfosfato aldolase que favorece o estabelecimento e desenvolvimento do esporocisto, fato que não ocorre em caramujos resistentes. Como o contato entre o molusco e o parasito pode promover o aumento de Fe^{3+} decorrente da ligação do íon Fe^{2+} com o peróxido de hidrogênio produzido para eliminação o trematódeo, os caramujos resistentes elevam a expressão da proteína hipotética LOTGIDRAFT_234865 capaz de se ligar ao Fe^{3+} liberado. Os hemócitos de cepas resistentes podem ter maior ativação da fagocitose em vista do aumento da proteína 1.4 que contém tioéster, ao passo que não aumentam a expressão de HSP70 como ocorre na linhagem suscetível devido à desorganização do genoma após contato com *S. mansoni*, o que foi demonstrado só para este fenótipo.

7 CONCLUSÃO

Este trabalho introduziu a aplicação do DIGE no estudo da interação *Biomphalaria tenagophila*-*S. mansoni*. A técnica se mostrou sensível na detecção de proteínas diferencialmente expressas nos hemócitos das três populações da espécie utilizada.

O fenótipo de resistência ou suscetibilidade de *B. tenagophila* não depende de alterações em um único gene ou proteína, sendo consequência da complexa interação entre diversos fatores biológicos.

Foram encontradas proteínas cuja participação nos fenótipos de resistência/suscetibilidade a *S. mansoni* já tinham sido descritas em outros estudos, como ocorreu com a proteína 1.4 que contém tioéster em Taim, e as proteínas HSP70 e frutose-bisfosfato aldolase em Cabo Frio.

Não foi encontrado indício de resistência/suscetibilidade natural nas três populações de *B. tenagophila* estudadas, uma vez que a expressão das principais proteínas estava aumentada ou diminuída após a exposição ao parasito.

O completo sequenciamento do genoma de um organismo é imprescindível para a realização de estudos proteômicos. Neste trabalho, a não conclusão do genoma de *B. glabrata* prejudicou muitos dos processos que se seguiram à retirada dos *spots* dos géis, indo da identificação das proteínas no MALDI, busca de informações nos bancos de dados de proteínas à construção de rede de interação entre as proteínas encontradas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adema CM, van Deutekom-Mulder EC, van der Knaap WPW, Sminia T 1994. Schistosomicidal activities of *Lymnaea stagnalis* hemocytes: the role of oxygen radicals. *Parasitology* 109: 479-485.
- Adema CM, Hertel LA, Miller RD, Loker ES 1997. A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate after infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 8691-8696.
- Aguiar A, Ferraz A 2007. Mecanismo e aplicações da reação de fenton assistida por compostos fenólicos redutores de ferro. *Quim. Nova* 30: 623-628.
- Arican-Goktas HD, Ittiprasert W, Bridger JM, Knight M 2014. Differential spatial repositioning of activated genes in *Biomphalaria glabrata* snails infected with *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis* 8(9): e3013.
- Barbosa EB, Vidotto A, Polachini GM, Henrique T, Marqui ABT, Tajara EH 2012. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. *Rev Assoc Med Bras* 58: 366-375.
- Barbosa FS 1995. Sistemática e Biogeografia. In: Barbosa FS, *Tópicos em malacologia médica*. Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 15-114.
- Barbosa L, Caldeira RL, Carvalho OS, Vidigal THDA, Jannotti-Passos LK, Coelho PMZ 2006. Resistance to *Schistosoma mansoni* by transplantation of APO *Biomphalaria tenagophila*. *Parasite Immunology* 28: 209-212.
- Barraco MA, Steil AA, Gargioni R 1993. Morphological characterization of the hemocytes of the pulmonate snail *Biomphalaria tenagophila*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 88: 73-83.
- Bayne CJ, Buckley PM, de Wan PC 1980. *Schistosoma mansoni*: cytotoxicity of hemocytes from susceptible snails hosts for sporocysts in plasma from resistant *Biomphalaria glabrata*. *Exp Parasitol* 50: 409-416.
- Bayne CJ, Hahn UK, Bender RC 2001. Mechanisms of molluscan host resistance and of parasite strategies for survival. *Parasitology* 123: S159-S167.
- Bezerra FSM, Nogueira-Machado JA, Martins-Souza RL, Chaves MM, Correa RF, Coelho PMZ 2003. Effect of gamma radiation on the activity of hemocytes and on the course of *Schistosoma mansoni* infection in resistant *Biomphalaria tenagophila* snails. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 73-75.
- Blandin S, Levashina EA 2004. Thioester-containing proteins and insect immunity. *Molecular Immunology* 40: 903-908.
- Blandin S, Levashina EA 2007. Phagocytosis in mosquito immune responses. *Immunological Reviews* 219: 8-16.
- Borges CMC, Andrade ZA 2003. Extra-cellular matrix changes in *Schistosoma mansoni*-infected *Biomphalaria glabrata*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 135-139.

Bouchut A, Sautiere PE, Coustau C, Mitta G 2006. Compatibility in the *Biomphalaria glabrata*/*Echinostoma caproni* model: Potential involvement of proteins from hemocytes revealed by a proteomic approach. *Acta Tropica* 98: 234-246.

Carvalho OS, Jannotti-Passos LK, Caldeira RL 2008. Importância epidemiológica e biologia molecular aplicada ao estudo dos moluscos do gênero *Biomphalaria*. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL, *Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar*. Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 311-145.

Chitsulo L, Engels D, Montresor A, Savioli L 2000. The global status os schistosomiasis and its control. *Acta Tropica* 77: 41-51.

Coelho JR, Bezerra FSM 2006. Compatibility of *Biomphalaria tenagophila* with *Schistosoma mansoni*: a study of hologous plasma transference. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 111-112.

Coelho PMZ, Carvalho OS, Andrade ZA, Martins-Souza RL, Rosa FM, Barbosa L, Pereira CAJ, Caldeira RL, Jannotti-Passos LK, Godard ALB, Moreira LA, Oliveira GC, Franco GR, Teles HMS, Negrão-Corrêa D 2004. *Biomphalaria tenagophila*/*Schistosoma mansoni* interaction: premises for a new approach to biological control of schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 109-111.

Corrêa MCR, Coelho PMZ, Freitas JR 1979. Susceptibilidade de linhagens de *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria glabrata* a duas cepas de *Schistosoma mansoni* – (LE – Belo Horizonte – MG e SJ – São José dos Campos – SP). *Rev Inst Med Trop São Paulo* 21: 72-76.

Corrêa LR, Paraense LW 1971. Susceptibility of *Biomphalaria amazonica* to infection with two strains of *Schistosoma mansoni*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 13: 387-390.

Costa MM, Andrade HM, Bartholomeu DC, Pires SF, Chapeaurouge AD, Gazzinelli RT 2011. Analysis of *Leishmania chagasi* by 2-D Difference Gel Eletrophoresis (2-D DIGE) and Immunoproteomic: Identification of Novel Candidate Antigens for Diagnostic Tests and Vaccine. *J. Proteome Res* .10: 2172–2184.

Coura JR, Amaral RS 2004. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in brazilian endemic areas. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99 (Suppl. I): 13-19.

Doliwa C, Xia D, Escotte-Binet S, Newsham EL, Sanderson SJ, Aubert D, Randle N, Wastling JM, Villena I 2013. Identification of differentially expressed proteins in sulfadiazine resistant and sensitive strains of *Toxoplasma gondii* using difference-gel electrophoresis (DIGE). *International Journal for Parasitology: Drugs and Drugs Resistance* 3: 35-44.

Greenbaum D, Colangelo C, Williams K, Gerstein M 2003. Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biology* 4: 1-8.

Hanelt B, Lun CM, Adema CM 2008. Comparative ORESTES-sampling of transcriptomes of immune-challenged *Biomphalaria glabrata* snails. *Journal of nvertebrate Pathology* 99: 192–203.

Hanington PC, Forys MA, Dragoo JW, Zhang SM, Adema CM, Loker ES 2010. Role for a somatically diversified lectin in resistance of an invertebrate to parasite infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:21087-92.

Hanington PC, Zhang SM 2011. The primary role of fibrinogen-related proteins in invertebrates is defense, not coagulation. *J Innate Immun* 3: 17-27.

Hanington PC, Forys MA, Loker ES 2012. A somatically diversified defense factor, FREP3, is a determinant of snail resistance to schistosome infection. *Plos Negl Trop Dis* 6: 1-9.

Harris KR 1975. The fine structure of encapsulation in *Biomphalaria glabrata*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 266: 446-464.

Ittiprasert W, Nene R, Miller A, Raghavan N, Lewis F, Hodgson J, Knight M 2009. *Schistosoma mansoni* infection of juvenile *Biomphalaria glabrata* induces a differential stress response between resistant and susceptible snails. *Experimental Parasitology* 123: 203–211.

Ittiprasert W, Knight M 2012. Reversing the resistance phenotype of the *Biomphalaria glabrata* snail host *Schistosoma mansoni* infection by temperature modulation. *PLoS Pathog* 8(4): e1002677.

Jannotti-Passos LK, Andrade HM, Caldeira RL, Romanha AJ, Murta SMF, Chapeaurouge DA, Perales J, Coelho PMZ, Carvalho OS 2008. Proteome analysis of the cardiac and pericardial tissue of *Biomphalaria tenagophila* populations susceptible and resistant to *Schistosoma mansoni* infection. *Acta Tropica* 105: 229-234.

Jannotti-Passos LK, Teodoro TM, Caldeira RL, Carvalho OS. The resistance of *Biomphalaria tenagophila* (Mollusca: Gastropoda) of Espírito Santo state to *Schistosoma mansoni* infection. In: XI International Congress on Medical and Applied Malacology, 2012. Rio de Janeiro, Brazil. Anais... Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Malacologia, 2012, p. 194.

Jenkins R, Burton N, Cooper R 2014. Proteomic and genomic analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) exposed to manuka honey *in vitro* demonstrated down-regulation of virulence markers. *J Antimicrob Chemother* 69: 603–615.

Johnston LA, Yoshino TP 1996. Analysis of lectin and snail plasma binding glycopeptides associated with the tegumental surface of the primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 112: 469-479.

Katz N 1998. Schistosomiasis control in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93 (Suppl. I): 33-35.

Katz N, Peixoto SV 2000. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 33: 303-308.

Knight M, Ongele E, Lewis FA 2000. Molecular studies of *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *International Journal of Parasitology* 30: 535-541.

Lagueux M, Perrodou E, Levashina EA, Capovilla M, Hoffmann J 2000. Constitutive expression of a complement-like protein in Toll and JAK gain-of-function mutants of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97: 11427-32.

Lockyer AE, Spinks J, Kane RA, Hoffmann KF, Fitzpatrick JM, Rollinson D, Noble LR, Jones CS 2008. *Biomphalaria glabrata* transcriptome: cDNA microarray profiling identifies resistant- and susceptible-specific gene expression in haemocytes from snail strains exposed to *Schistosoma mansoni*. *BMC Genomics* 9:634.

Lockyer AE, Emery AM, Kane RA, Walker AJ, Mayer CD, Mitta G, Coustau C, Adema CM, Hanelt B, Rollinson D, Noble LR, Jones C 2012. Early differential gene expression in haemocytes from resistant and susceptible *Biomphalaria glabrata* strains in response to *Schistosoma mansoni*. *Plos One* 7: 1-16.

Lodes MJ, Yoshino TP 1990. The effect of schistosome excretory-secretory products on *Biomphalaria glabrata* hemocyte motility. *J Invert Pathol* 56: 75-85.

Loker ES, Adema CM, Zhang SM, Kepler TB 2004. Invertebrate immune systems – not homogeneous, not simple, not well understood. *Immunological Reviews* 198: 10-24.

Marques DPA, Rosa FM, Maciel E, Negrão-Corrêa D, Teles HMS, Caldeira RL, Jannotti-Passos LK, Coelho PMZ 2014. Reduced susceptibility of a *Biomphalaria tenagophila* population to *Schistosoma mansoni* after introducing the resistant Taim/RS strain of *B. tenagophila* into Herivelton Martins stream. *PLoS ONE* 9: e99573.

Martins-Souza RL, Pereira CAJ, Coelho PMZ, Negrão-Corrêa D 2003. Silica treatment increases the susceptibility of the Cabo Frio strain of *Biomphalaria tenagophila* to *Schistosoma mansoni* infection but does not alter the natural resistance of the Taim strain. *Parasitol Res* 91: 500-507.

Melo AL, Coelho PMZ 2010. *Schistosoma mansoni* e a doença. In: Neves DP, *Parasitologia humana*, Atheneu, 11^a ed., p. 193-212.

Minden JS 2007. Comparative proteomics and difference gel electrophoresis. *Biotechniques* 43: 739, 743, 743 e 745.

Ministério da Saúde 2012. Plano integrado de ações estratégicas de eliminação da hanseníase, filariose, esquistossomose e oncocercose como problema de saúde pública, tracoma como causa de cegueira e controle das geohelmintíases: plano de ação 2011–2015. Ministério da Saúde, Brasília, 100p. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano_integrado_acoes_estrategicas_2011_2015.pdf.

Moné Y, Gourbal B, Duval D, Du Pasquier L, Kieffer-Jaquinod S, et al. 2010. A Large Repertoire of Parasite Epitopes Matched by a Large Repertoire of Host Immune Receptors in an Invertebrate Host/Parasite Model. *PLoS Negl Trop Dis* 4(9): e813. doi:10.1371/journal.pntd.0000813

Moné Y, Ribou AC, Cosseau C, Duval D, Therón A, Mitta G, Gourbal B 2011. An example of molecular co-evolution: Reactive oxygen species (ROS) and ROS scavenger levels in *Schistosoma mansoni*/*Biomphalaria glabrata* interactions. *International Journal for Parasitology* 41: 721–73.

- Nacif-Pimenta R, Mattos ACA, Orfanó AS, Barbosa L, Pimenta PFP, Coelho PMZ 2012. *Schistosoma mansoni* in susceptible and resistant snail strains *Biomphalaria tenagophila*: in vivo tissue response and in vitro hemocyte interactions. *Plos One* 7: 1-12.
- Negrão-Corrêa D, Pereira CAJ, Rosa FM, Martins-Souza RL, Andrade ZA, Coelho PMZ 2007. Molluscan response to parasite: *Biomphalaria* and *Schistosoma mansoni* interaction. *Invertebrate Survival Journal* 4: 101-111.
- Negrão-Corrêa D, Coelho PMZ, Andrade ZA, Martins-Souza RL, Pereira CAJ 2008. *Biomphalaria* e *Schistosoma mansoni*: papel do sistema interno de defesa do molusco na suscetibilidade do parasito. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL, *Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar*. Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 485-510.
- Negrão-Corrêa D, Mattos ACA, Pereira CAJ, Martins-Souza RL, Coelho PMZ 2012. Interaction of *Schistosoma mansoni* sporocysts and hemocytes of *Biomphalaria*. *J Parasitol Research* 2012: 1-6.
- Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W 1988. Improved staining of protein in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9: 255-262.
- Newton WL 1952. The inheritance of susceptibility to infection with *Schistosoma mansoni* in *Australorbis glabratus*. *Exp. Parasitol* 2: 242-257.
- O'Farrell PH 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 250: 4007-4021.
- Oliveira ALD, Silva D, Manzano BC, Abdel-Hamid AZ, Marcelino MY, Zanotti-Magalhães EM, Magalhães LA, Ribeiro-Paes JT 2010. Genetic differences between strains of *Biomphalaria glabrata* (Planorbidae) that are susceptible and unsusceptible to schistosomiasis. *Genet Mol Res* 9: 1450-1459.
- Paraense WL, Corrêa LR 1963. Variation in susceptibility of populations of *Australorbis glabratus* to a strain of *Schistosoma mansoni*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 5: 15-22.
- Paraense WL, Corrêa LR 1973. Susceptibility of *Biomphalaria peregrina* from Brazil and Ecuador to two strains of *Schistosoma mansoni*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 15: 127-130.
- Paraense WL, Corrêa LR 1978. Differential susceptibility of *Biomphalaria tenagophila* populations to infection with a strain of *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol* 64: 822-826.
- Paraense WL 1986. Distribuição dos caramujos no Brasil. In: Reis FA, Faria I, Katz N, *Modernos conhecimentos sobre a esquistossomose mansônica*. Na Acad Mineira Med, Belo Horizonte, p. 117-128.
- Paraense WL 2001. The schistosome vectors in the Americas. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 7-16.
- Paraense WL 2008. Histórico do Gênero *Biomphalaria*, Morfologia e Sistemática Morfológica. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL, *Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar*. Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 285-308.

- Pellegrino J, Katz N 1968. Experimental chemotherapy of *Schistosomiasis mansoni*. *Adv Parasitol* 6: 233-290.
- Peng J, Gygi SP 2001. Proteomics: the move to mixtures. *J. Mass Spectrom.* 36: 1083-1091.
- Pereira CAJ, Martins-Souza RL, Corrêa JR A, Coelho PMZ, Negrão-Corrêa D 2008. Participation of cell-free haemolymph of *Biomphalaria tenagophila* in the defence mechanism against *Schistosoma mansoni* sporocysts. *Parasite Immunology* 30: 610-619.
- Pires SF, Fialho LCJ, Silva SO, Melo MN, Souza CCS, Tafuri WL, Romero OB, Andrade HM 2014. Identification of virulence factors in *Leishmania infantum* strains by a proteomic approach. *J. Proteome Res.* 13: 1860–1872.
- Rabilloud T, Carpentier G, Tarroux P 1988. Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite *Electrophoresis* 9: 288-290.
- Richards CS 1976. Variations in infectivity for *Biomphalaria glabrata* in strains of *Schistosoma mansoni* from the same geographical area. *Bull. WHO* 54: 706-707.
- Richards CS 1977. *Schistosoma mansoni*: susceptibility reversal with age in the snails host *Biomphalaria glabrata*. *Exp. Parasitol* 42: 165-168.
- Richards CS, Shade PC 1987. The genetic variation of compatibility in *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni* infection. *J. Parasitol* 73: 1146-1151.
- Richards CS, Renwranz LR 1991. Two lectins on the surface of *Helix pomatia* haemocytes: a Ca²⁺ dependent, GalNac-specific lectin and a Ca²⁺ independent, mannose 6-phosphate-specific lectin which recognizes activated homologous opsonins. *J Comp Physiol* 161: 43-54.
- Roger E, Mitta G, Moné Y, Bouchut A, Rognon A, Grunau C, Boissier J, Therón A, Gourbal BEF 2008. Molecular determinants of compatibility polymorphism in the *Biomphalaria glabrata/Schistosoma mansoni* model: New candidates identified by a global comparative proteomics approach. *Molecular & Biochemical Parasitology* 157: 205-216.
- Rosa FM, Godard ALB, Azevedo V, Coelho PMZ 2005. *Biomphalaria tenagophila*: dominant character of the resistance to *Schistosoma mansoni* in descendants of crossbreedings between resistant (Taim, RS) and susceptible (Joinville, SC) strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 19-23.
- Ruepp A, Zollner A, Maier D, Albermann K, Hani J, Mokrejs M, Tetko I, Güldener U, Mannhaupt G, Münsterkötter M, Mewes HW 2004. The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. *Nucleic Acids Research* 32: 5539-5545.
- Santos MBL, Freitas JR, Correia MCR, Coelho PMZ 1979. Suscetibilidade ao *Schistosoma mansoni* de híbridos de *Biomphalaria tenagophila* do Taim, RS, Cabo Frio, RJ, e Belo Horizonte, MG. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 21: 281-286.

Scholte RGC, Gosoniu L, Manole JB, Chammartin F, Utzinger J, Vounatsou P 2014. Predictive risk of schistosomiasis in Brazil using Bayesian geostatistical models. *Acta Tropica* 132:57-63.

Silva RE, Melo AL, Pereira LH 1994. Suscetibilidade de *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria glabrata* de uma mesma região a duas cepas de *Schistosoma mansoni*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 36: 409-415.

Souza CP, Jannotti-Passos LK, Freitas JR 1995a. Degree of host-parasite compatibility between *Schistosoma mansoni* and their intermediate molluscan hosts in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90: 5-10.

Souza CP, Cunha RCP, Andrade ZA 1995b. Development of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria tenagophila*, *Biomphalaria straminea* and *Biomphalaria glabrata*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 37: 201-206.

Souza SS, Andrade ZA 2006. On the origin of the *Biomphalaria glabrata* hemocytes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 213-218.

Souza SS, Andrade ZA 2012. The significance of the amoebocyte-producing organ in *Biomphalaria glabrata*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107: 598-603.

Steinmann P, Keiser J, Bos R, Tanner M, Utzinger J 2006. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect Dis* 6: 411-425.

Sullivan JT, Spence JV 1994. Transfer of resistance to *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata* by allografts of amoebocyte-producing organ. *J Parasitol* 80: 449-453.

Sullivan JT, Spence JV, Nunez JKZ 1995. Killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts in *Biomphalaria glabrata* implanted with amoebocyte-producing organ allografts from resistant snails. *J Parasitol* 81: 829-833.

Tannu NS, Hemby SE 2006. Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis for comparative proteomics profiling. *Nat Protoc* 1: 1732-1742.

Teodoro TM, Janotti-Passos LK, Carvalho OS, Caldeira RL 2010. Occurrence of *Biomphalaria cousini* (Mollusca: Gastropoda) in Brazil and its susceptibility to *Schistosoma mansoni* (Platyhelminths: Trematoda). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57: 144-151.

Terry DE, Umstot E, Desiderio DM 2004. Optimized sample-processing time and peptide recovery for the mass spectrometric analysis of protein digests. *J Am Soc Mass Spectrom* 15: 784-794.

Tyer M, Mann M 2003. From genomics to proteomics. *Nature* 422: 192-197.

Ünlü M, Morgan ME, Minden JS 1997. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 18: 2071-2077.

Utzinger J, N'Goran EK, Caffrey CR, Keiser J 2011. From innovation to application: Social-ecological context, diagnostics, drugs and integrated control of schistosomiasis. *Acta Tropica* 120S: S121-S137.

van der Knaap WP, Boerrigter-Barendsen LH, van den Hoeven DS, Sminia T 1981. Immunocytochemical demonstration of a humoral defense factor in blood cells (Amoebocytes) of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Cell Tissue Res* 219: 291-6.

van der Knaap WPW, Loker ES 1990. Immune mechanisms in trematode-snail interaction. *Parasitology Today* 6: 175-182.

Vasquez RE, Sullivan JT 2001. Hepatopoietic tissue allografts in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata) induce humoral immunity to *Schistosoma mansoni*. *Dev. Comp. Immunol* 25: 561-564.

Webster JP, Davies CM 2001. Coevolution and compatibility in the snail-schistosome system. *Parasitology* 123: S41-S56.

Zahoor Z, Davies AJ, Kirk RS 2010. Larval excretory-secretory products from the parasite *Schistosoma mansoni* modulate HSP70 protein expression in defence cells of its snail host, *Biomphalaria glabrata*. *Cell Stress and Chaperones* 15: 639-650.

Zelck UE, Becker W, Bayne C 1995. The plasma proteins of *Biomphalaria glabrata* in the presence and absence of *Schistosoma mansoni*. *Dev Comp Immunol* 19: 181-194.

Wang J, Morris AJ, Tolan DR, Pagliaro L 1996. The Molecular Nature of the F-actin Binding Activity of Aldolase Revealed with Site-directed Mutants. *The Journal Of Biological Chemistry* 271:6861-6865.

Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, Williams KL 1996. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 13: 19-50.

WHO - World Health Organization 2006. Preventive chemotherapy in human helminthiasis. Geneva, 59p.

WHO - World Health Organization 2012. Schistosomiasis: population requiring preventive chemotherapy and number of people treated in 2010. *WHO – Weekly epidemiological record* 4: 37-44.

WHO - World Health Organization 2014. Schistosomiasis. Fact sheet n° 115. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>>. Acesso em: 04 de fevereiro de 2015.