

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
MESTRADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

NAIROMBERG CAVALCANTI PORTELA JUNIOR

PERFIL PROTEICO DA HEMOLINFA DE *Biomphalaria glabrata* e linhagens de *B. straminea*, FRENTE À EXPOSIÇÃO AO *Schistosoma mansoni*

Recife

2016

NAIROMBERG CAVALCANTI PORTELA JUNIOR

PERFIL PROTEICO DA HEMOLINFA DE *Biomphalaria glabrata* e linhagens de *B. straminea*, FRENTE À EXPOSIÇÃO AO *Schistosoma mansoni*

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para a obtenção do grau de mestre em Ciências.

Orientador: Dr. Luiz Carlos Alves

Coorientador: Dr. Fábio André Brayner dos Santos

Recife

2016

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

- P843p Portela Junior, Nairomberg Cavalcanti.
Perfil proteico da hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* e linhagens de *B. straminea*, frente à exposição ao *Schistosoma mansoni* / Nairomberg Cavalcanti Portela Junior. - Recife: [s.n.], 2016.
56 p. ilus., graf., tab.
- Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2016.
Orientador: Luiz Carlos Alves; coorientador: Fábio André Brayner dos Santos.
1. *Biomphalaria*. 2. Hemolinfa. 3. Proteômica. 4. *Biomphalaria* - genética. I. Alves, Luiz Carlos. II. Santos, Fábio André Brayner dos. III. Título.

CDU 616.995.122

NAIROMBERG CAVALCANTI PORTELA JUNIOR

PERFIL PROTEICO DA HEMOLINFA DE *Biomphalaria glabrata* e linhagens de *B. straminea*, FRENTE À EXPOSIÇÃO AO *Schistosoma mansoni*

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para a obtenção do grau de mestre em Ciências.

Aprovado em 24.02.2016

BANCA EXAMINADORA

Dr. Luiz Carlos Alves
FIOCRUZ PERNAMBUCO

Dra. Claudia Maria Fontes de Oliveira
FIOCRUZ PERNAMBUCO

Dra. Marília Gabriela dos Santos Cavalcanti
Universidade Federal da Paraíba

Aos meus pais e orientadores (meus segundos pais).

AGRADECIMENTOS

Ao bom Deus, por me permitir despertar todas as manhãs.

Ao meu pai, por me ensinar os caminhos da honestidade, seriedade e retidão.

A minha mãe, por toda doçura e amor, me ensinando sempre que a educação abre portas no mundo.

A minha família pela paciência em todos os meus momentos de presença e ausência, sendo o pilar e porto seguro para os momentos mais escuros.

Ao meu orientador, Luiz Alves, por se tornar um grande mentor, acreditando nos momentos que nem eu acreditei.

Ao meu orientador, Fábio Brayner, pelo companheirismo e suporte dentro e fora do laboratório.

Aos amigos do LBCM, hoje amigos de vida, com quem divido todos os momentos felizes, discussões acadêmicas e psicológicas, sessões de terapia existencial e baladas.

Aos meus demais amigos, que me acompanham e acreditam na minha conquista.

A todos que fazem a FIOCRUZ-PE, em especial aos que fazem o departamento de Parasitologia, pela estrutura e suporte no desenvolvimento do trabalho.

A todos que fazem parte do LIKA-UFPE, em especial do Laboratório de Proteômica da Biotecnologia, pela recepção e paciência nos momentos cruciais do trabalho.

Aos colaboradores da plataforma de Proteômica da FIOCRUZ-PR pelo auxílio e colaboração, abrindo portas para novos trabalhos.

Por fim, agradeço aos que fizeram parte direta e indiretamente das etapas de desenvolvimento do trabalho.

“Deixe algum sinal de alegria por onde passes. ”

(Chico Xavier)

PORTELA JUNIOR, Nairomberg Cavalcanti. **Perfil proteico da hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* e linhagens de *B. straminea*, frente à exposição ao *Schistosoma mansoni*.** 2016. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2016.

RESUMO

O gênero *Biomphalaria* possui espécies de grande relevância médica uma vez que atuam como hospedeiros intermediários naturais do parasita *Schistosoma mansoni*, causador da esquistossomose. Dentro desse gênero de moluscos, três espécies são tidas como hospedeiros naturais do parasita, *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*. O perfil de suscetibilidade à infecção por *S. mansoni* dentro do gênero é muito variado e muitas pesquisas buscam elucidar a dinâmica da relação parasita-hospedeiro intermediário na finalidade de criar novas medidas de controle da doença. Por isso, esse estudo tem como objetivo determinar o perfil bidimensional de proteínas que podem estar envolvidas na resposta imune contra o *S. mansoni* comparando duas espécies com diferentes perfis de susceptibilidade *B. glabrata*, *B. straminea* além de uma refratária ao *S. mansoni*, a *B. straminea* R3. Para isso, os caramujos de cada espécie foram divididos em dois grupos: Infectado, expostos aos miracídios do *S. mansoni*; e Controle, submetidos ao estresse do processo de infecção livre de miracídios. A hemolinfa foi retirada 24 horas após a exposição. Foi feito o extrato proteico total e determinada a concentração das proteínas totais para cada grupo investigado. As proteínas foram separadas por eletroforese bidimensional onde foi obtido o ponto isoelétrico e peso molecular de todos os *spots* nos géis. Estes géis foram comparados entre as condições expostos e não expostos ao parasita e os *spots* que se mostraram diferenciais foram utilizados para uma busca por homologia em bancos de dados de proteínas já descritas. Na dosagem proteica, a espécie *B. glabrata* se mostrou estável nas duas condições, enquanto que podemos observar aumento na concentração proteica nas duas linhagens de *B. straminea*. A presença de diversas proteínas homólogas envolvidas em processos metabólicos de adesão e reconhecimento celular, homeostase de ions entre outras relacionadas à resposta imune foram identificadas entre as espécies e na linhagem resistente.

Palavras Chave: *Biomphalaria*, Hemolinfa, Proteômica.

PORTELA JUNIOR, Nairoberg Cavalcanti. **Protein profile of hemolymph of *Biomphalaria glabrata* and strains of *B. straminea*, against the exposure to the *Schistosoma mansoni*.** 2016. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2016.

ABSTRACT

The *Biomphalaria* has species of great medical relevance since that act as natural intermediate hosts of the parasite *Schistosoma mansoni*, which causes schistosomiasis. Within this kind of mollusks, three species are considered natural hosts of the parasite, *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* and *B. tenagophila*. The profile of susceptibility to *S. mansoni* infection within the genre is very varied and many studies seek to elucidate the dynamics of host-parasite relationship intermediary in order to create new disease control measures. Therefore, this study aims to determine the two-dimensional profile of proteins that may be involved in the immune response against *S. mansoni* comparing two species with different susceptibility profiles *B. glabrata*, *B. straminea* and a refractory to *S. mansoni*, *B. straminea* R3. For that, the snails of each species were divided into two groups: Infected exposed to miracidia of *S. mansoni*; and control, subjected to stress the miracidia free infection process. The hemolymph was removed 24 hours after exposure. It was made the total protein extract and determined the concentration of total protein for each group investigated. Proteins were separated by two-dimensional electrophoresis was obtained where the isoelectric point and molecular weight of all the spots in the gels. These gels were compared between the exposed and unexposed conditions to the parasite and which show differential spots were used for a homology search of protein databases already described. In protein dosage, the species *B. glabrata* remained stable in both conditions, while we observed an increase in protein concentration in both strains of *B. straminea*. The presence of several homologous proteins involved in metabolic processes of adhesion and cell recognition, homeostasis of ions among others related to the immune response were identified among species and resistant strain.

Key words: *Biomphalaria*, hemocytes, proteomic.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição geográfica de <i>Biomphalaria glabrata</i> no Brasil	16
Figura 2 - Distribuição geográfica de <i>Biomphalaria straminea</i> no Brasil.	17
Figura 3 - Ciclo do parasita <i>Schistosoma mansoni</i> .	19
Figura 4 - Processo de compatibilidade entre <i>Biomphalaria</i> /parasita	22
Figura 5 - Concentração proteica total da hemolinfa de <i>Biomphalaria spp.</i>	33
Figura 6 - Perfis bidimensionais de <i>B. glabrata</i> sadio e exposto ao <i>S. mansoni</i> .	34
Quadro 1 - <i>Spots</i> com expressão diferencial em <i>B. glabrata</i> sadio com homologia com proteínas descritas na literatura.	36
Quadro 2 - <i>Spots</i> com expressão diferencial em <i>B. glabrata</i> exposto ao <i>S. mansoni</i> com homologia com proteínas descritas na literatura.	36
Figura 7 - Perfis bidimensionais de <i>B. straminea</i> sadio e exposto ao <i>S. mansoni</i> .	38
Quadro 3 - <i>Spots</i> com expressão diferencial em <i>B. straminea</i> sadio com homologia com proteínas descritas na literatura.	39
Quadro 4 - <i>Spots</i> com expressão diferencial em <i>B. straminea</i> exposto ao <i>S. mansoni</i> com homologia com proteínas descritas na literatura.	39
Figura 8 - Perfil bidimensional de <i>B. straminea</i> R3 sadio e exposto ao <i>S. mansoni</i> .	42
Quadro 5 - <i>Spots</i> com expressão diferencial em <i>B. straminea</i> R3 sadio com homologia com proteínas descritas na literatura.	43
Quadro 6 - <i>Spots</i> com expressão diferencial em <i>B. straminea</i> R3 exposto ao <i>S. mansoni</i> comparados por homologia com proteínas conhecidas.	44

LISTA DE ABREVIATURAS

CEUA – Comitê de Ético no Uso de Animais

ESI – *Electro Spray Ionization*

FREP – *Fibrinogen Related Protein*

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*

LIKA – Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

MG – Minas Gerais

mL – mililitro

µL – microlitro

µg – micrograma

MS – *Mass Spectrometer*

PE – Pernambuco

pH – potencial Hidrogeiônico

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

pI – ponto isoelétrico

MW – *Molecular Weight*

KDa – kilo Dalton

ID – número de identificação

mA - miliAmpére

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL	15
2.1 Gênero Biomphalaria	15
2.2 A doença e o parasita	17
2.3 A dinâmica Schistosoma-Biomphalaria	20
2.4 Proteínas imunorelevantes nos invertebrados	22
2.5 A proteômica	24
3 JUSTIFICATIVA	26
4 OBJETIVOS	27
4.1 Objetivo geral	27
4.2 Objetivos Específicos	27
5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	28
5.1 Obtenção dos moluscos	28
5.2 Grupos de análise	28
5.3 Obtenção dos miracídios	28
5.4 Exposição dos caramujos	29
5.5 Processamento da hemolinfa	29
5.6 Preparação do extrato proteico	29
5.7 Determinação da concentração proteica	29
5.8 Clarificação das amostras para eletroforese bidimensional	29
5.9 Eletroforese Bidimensional – Focalização Isoelétrica	30
5.10 Eletroforese Bidimensional – SDS-PAGE	30
5.11 Análise dos géis bidimensionais	30
6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	31
7 RESULTADOS	32
7.1 Concentração proteica da hemolinfa de <i>Biomphalaria spp.</i>	32
7.2 Perfil Bidimensional de <i>Biomphalaria spp.</i>	32
8 DISCUSSÃO	44
9 CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS	51
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Uso de Animais	56

1 INTRODUÇÃO

Moluscos do gênero *Biomphalaria* agem como hospedeiro intermediário carregando o parasita *Schistosoma mansoni*, causador da esquistossomose. Até o momento, no Brasil onze espécies desse gênero são descritas, destas, as espécies *Biomphalaria glabrata* Say, 1818, *Biomphalaria straminea* Dunker, 1848 e *Biomphalaria tenagophila* Orbigny, 1835 são encontradas naturalmente infectadas com o parasita (SCHOLTE *et al.*, 2012).

O perfil de resistência e susceptibilidade à infecção varia entre as espécies transmissoras da esquistossomose e depende de vários fatores sendo um deles o sistema de defesa interno do próprio molusco, formado por componentes celulares, os hemócitos circulantes, e por constituintes solúveis da hemolinfa, proteínas plasmáticas (NEGRÃO-CORRÊA *et al.*, 2012). Os hemócitos circulantes são considerados os principais atores do sistema de defesa interno dos moluscos, fagocitando ou encapsulando os agentes infecciosos que em seguida serão lesados por metabólitos secretados pelos próprios hemócitos e por componentes solúveis da hemolinfa (SANTOS *et al.*, 2011).

Diversos trabalhos já foram desenvolvidos para a melhor compreensão dos mecanismos pelos quais os hemócitos destroem o parasito, porém, ainda não foram completamente elucidados, mas sabe-se que há uma intensa interação entre os hemócitos e os fatores solúveis (proteínas plasmática) presentes na hemolinfa.

Na década de 1980, foram desenvolvidos os primeiros trabalhos nessa temática, como o de Bayne *et al.* (1980) que verificaram a forte interação dos fatores solúveis da hemolinfa com os hemócitos. Granath e Yoshino (1984) também relataram que a transferência de plasma obtido de linhagem resistente para linhagem susceptível de *B. glabrata*, resultou em uma redução da taxa de infecção da linhagem de *B. glabrata* susceptível pelo *S. mansoni*.

A partir da descoberta das lectinas por Loker *et al.* (1984) e Renwranz (1986), que consistem em moléculas com capacidade de opsonização e aglutinação de partículas, começou a intensificação nos estudos mais refinados da hemolinfa de *B. glabrata*.

Além das lectinas, outras proteínas têm sido identificadas na hemolinfa de moluscos, parecendo ter função homóloga a mediadores celulares já caracterizadas em vertebrados, e podem estar envolvidas na ativação dos hemócitos durante a infecção.

Diante do exposto, lectinas, proteínas semelhantes à citocinas pró-inflamatórias e peptídeos antimicrobianos podem ser importantes mediadores, ativando e potencializando a resposta imune celular de *Biomphalaria*. Contudo, há escassez na literatura de trabalhos que

caracterizem o perfil proteico do sistema interno de defesa do *Biomphalaria*, dificultando o entendimento da interação parasita-hospedeiro intermediário.

2 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL

2.1 Gênero *Biomphalaria*

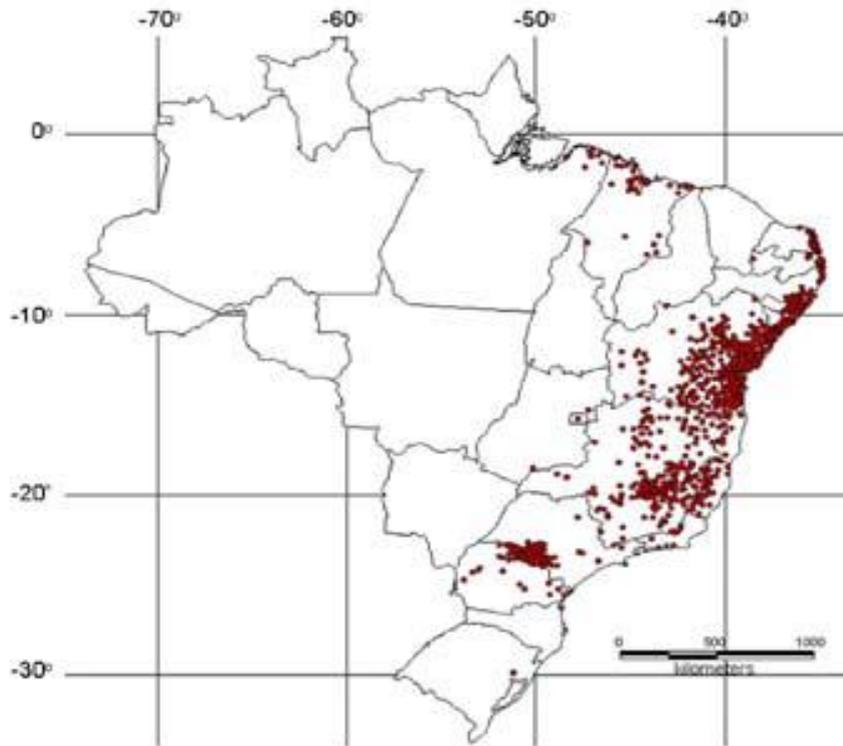
Os caramujos do gênero *Biomphalaria* pertencem à classe Gastropoda do filo Mollusca. Possuem grande relevância médica, pois agem como hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni*, agente etiológico da esquistossomose. Onze espécies deste gênero são descritas no Brasil, destas, *B. glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila* são encontradas naturalmente infectadas com o parasita (SCHOLTE *et al.*, 2012).

Os indivíduos desse gênero habitam ambientes aquáticos, principalmente lagos, poços e riachos. Podem colonizar grandes áreas e possuem boa tolerância a adversidades ambientais, como variações nas características físicas, químicas e biológicas. Além disso, esses moluscos possuem uma boa capacidade de ocupar novos nichos ecológicos, tornando-se assim, oportunistas ambientais (GUIMARÃES *et al.*, 2009)

Além dos criadouros naturais desses vetores, alguns eventos climáticos ou antropológicos tendem ao surgimento de ambientes propícios à colonização dos caramujos. Com a expansão imobiliária e o crescimento desordenado de habitações em áreas próximas a criadouros naturais, surgem os criadouros artificiais (BARBOSA *et al.*, 2011).

Entre as espécies que carregam o parasita, a principal é a *B. glabrata*, que possui alta susceptibilidade ao *S. mansoni*, agindo eficientemente como vetor do parasita, agravando ainda mais a distribuição da doença no país. Sua alta taxa de susceptibilidade, confere a espécie um potencial alvo de estudos de interação parasita-hospedeiro, auxiliando no desenvolvimento do conhecimento acerca desse importante tema. Essa espécie se encontra distribuída em 16 estados e Distrito Federal (Figura 1) (BRASIL, 2007).

Figura 1 - Distribuição geográfica de *Biomphalaria glabrata* no Brasil.



Fonte: Brasil (2007)

Por sua vez, a espécie *B. straminea*, apesar de não ser um hospedeiro intermediário de extrema susceptibilidade ao *S. mansoni*, possui uma alta dispersão geográfica, ocorrendo em 24 estados e o Distrito Federal (Figura 2) (BRASIL, 2007), mostrando-se como principal agente na manutenção do ciclo do parasita (FERNANDEZ; PIERI, 2001).

A linhagem R3 é uma variação da espécie *B. straminea* mantida e selecionada em laboratório originária da cidade de Sete Lagoa-MG. Esta linhagem é composta por caramujos resistentes à infecção pelo *S. mansoni*. Possui a mesma morfologia da espécie *B. straminea* natural excetuando-se pelo albinismo presente em todos os indivíduos do grupo (BARBOSA, 1992).

Figura 2 - Distribuição geográfica de *Biomphalaria straminea* no Brasil.



Fonte: Brasil (2007)

No ciclo do parasita, a cercária, forma infectante ao ser humano, é liberada pelo hospedeiro intermediário. Esta fase evolutiva se multiplica de forma exponencial, no caramujo através da divisão de células germinativas presentes no esporocisto. Segundo dados da literatura, cada esporocisto estabelecido em caramujos susceptíveis libera cerca de 100 a 300 mil cercárias (SILVA; NEVES; GOMES, 2008).

2.2 A doença e o parasita

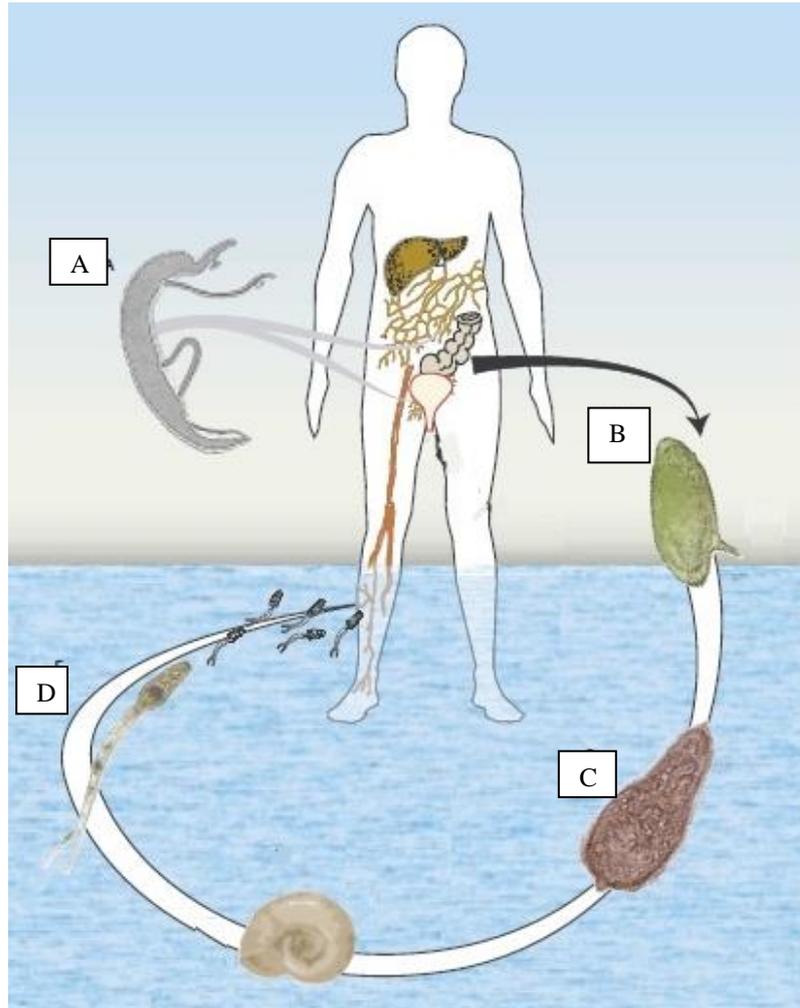
A esquistossomose é uma doença presente em todas as regiões do globo, principalmente em áreas menos favorecidas de saneamento básico. A veiculação do agente etiológico é por meio hídrico, uma vez que, fases do ciclo de vida do parasita ocorrem no meio aquático, onde a forma infectante do hospedeiro vertebrado, a cercária, é liberada por caramujos infectados (BRASIL, 2007).

No Brasil, a única espécie envolvida com a esquistossomose é a *S. mansoni*. Os vermes adultos possuem corpo cilíndrico variando de 7-20 mm e é a única espécie de trematódeo que apresenta distinção de sexo. Alojaram-se em casal no plexo venoso inferior se alimentando de

compostos sanguíneos como as globulinas e hemácias do hospedeiro. Uma vez na fase reprodutiva, a fêmea pode produzir centenas de ovos por dia que vão ser excretados nas fezes. (GRYSEELS *et al.*, 2006). Quando encontram boas condições ambientais, ocorre a eclosão de formas ciliadas chamadas miracídios. A forma de miracídio possui capacidade de infectar moluscos vetores, não vetores e em alguns casos até girinos. No molusco vetor, o miracídio perde os cílios passando para a forma evolutiva de esporocisto, onde a reprodução é assexuada, dando origem a mais de 100 mil cercárias. As cercárias são liberadas a partir da luminosidade e temperatura do ambiente, podendo sobreviver até dois dias após a liberação. Nesse momento, o parasita nada livremente em busca do hospedeiro definitivo, que varia de mamíferos até aves. A entrada da cercária é feita pela pele, mas também é descrita a invasão por meio de mucosas. Após a entrada, essas cercárias se tornam esquistossômulos (GRIMES *et al.*, 2015).

Os esquistossômulos alcançam a rede vascular dos pulmões através dos vasos cutâneos, em seguida, chega ao coração onde são enviados pela circulação a vários locais do corpo. Quando conseguem atingir o sistema porta intra-hepático, terminam seu desenvolvimento, chegando ao amadurecimento sexual e acasalamento. Nesse estágio, o casal se localiza nas regiões mais inferiores dos plexos mesentéricos. Estando em seu habitat definitivo, a fêmea fecundada começa a liberar os ovos. Após um período de aproximadamente 40 dias, os ovos já podem ser vistos nas fezes do indivíduo parasitado, tempo geralmente definido para diagnóstico e posteriormente o tratamento do doente (Figura 3) (REY, 2002).

Figura 3 - Ciclo do parasita *Schistosoma mansoni*.



Fonte: Adaptado de Colley *et al.* (2014).

Legenda: Estágios evolutivos do *Schistosoma mansoni*: A – vermes adultos; B – ovo; C – miracídio; D – cercárias.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2013), são estimadas cerca de 261 milhões de pessoas com esquistossomose pelo *S. mansoni* ao redor do mundo, sendo que muitos outros milhões se encontram expostos ao risco de serem infectados ao longo de áreas endêmicas presente em mais de 78 países. No Brasil a esquistossomose é endêmica em 19 dos 27 estados da federação com quase seis milhões de pessoas de casos notificados. (NASCIMENTO, 2013).

Alguns alvos de intervenção, bastante relevantes, são propostos para o controle da doença: a) tratamento dos infectados; b) destruição ou realocação dos hospedeiros intermediários por controle biológico; c) mudança dos hábitos sanitários para a prevenção da infecção dos caramujos hospedeiros e d) educação sanitária para a prevenção da infecção das pessoas expostas ao risco. No entanto, as tentativas de controle que atingem diretamente o caramujo, vêm sendo falhas, apesar de se mostrarem efetivas contra os moluscos, influenciam

também no ciclo de vida de outras espécies do mesmo nicho ecológico, acarretando desequilíbrio no ambiente (ROLLINSON *et al.*, 2013).

2.3 A dinâmica *Schistosoma-Biomphalaria*

A dinâmica de resistência e susceptibilidade à infecção entre as espécies transmissoras da esquistossomose depende de vários fatores, sendo o sistema de defesa interno do próprio molusco o mais importante, formado por componentes celulares, os hemócitos circulantes, e por constituintes solúveis da hemolinfa, proteínas plasmáticas. O hemócito circulante é considerado o principal efetor do sistema de defesa interno nesses moluscos. Essas células agem contra a invasão de parasitas e bactérias, fagocitando ou encapsulando esses agentes infecciosos que em seguida são lesados por metabólitos secretados pelos próprios hemócitos e por componentes solúveis da hemolinfa (NEGRÃO-CORRÊA *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2011).

A origem dos hemócitos em *Biomphalaria* ainda é motivo de discussão. Duas linhas são defendidas por grupos de pesquisas, uma mais antiga defende uma origem multicêntrica no tecido conjuntivo do molusco, enquanto a outra aponta a existência de um órgão especial, o APO (*Amebocyte producing organ*), como sendo o local de origem dos hemócitos (BARBOSA *et al.*, 2007).

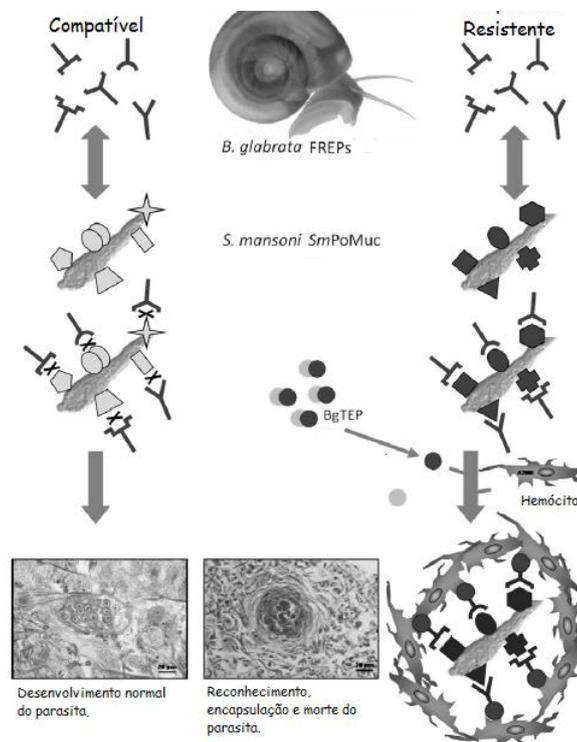
Os mecanismos pelos quais os hemócitos destroem o parasito ainda não foram completamente elucidados, mas sabe-se que há uma intensa interação entre os hemócitos e os fatores solúveis (proteínas plasmática) presentes na hemolinfa. Sabe-se que a resistência aos parasitas é multifatorial, incluindo não só a presença de hemócitos no local da infecção como também a capacidade dessas células de aderirem, opsonizarem ou fagocitarem o parasita (LARSON *et al.*, 2014).

Em um trabalho clássico, Bayne *et al.* (1980a, 1980b) verificaram que a hemolinfa livre de células e retirada de linhagens susceptíveis e resistentes de *B. glabrata* não é competente em alterar visivelmente a morfologia do esporocisto *in vitro*, o mesmo acontecendo com a hemolinfa contendo hemócitos de linhagens susceptíveis. Em contra partida, o esporocisto é destruído quando incubado com fatores solúveis da hemolinfa e hemócitos de linhagens resistentes. Outro fato relatado pelos autores é que hemócitos de linhagens susceptíveis, quando incubados juntamente com fatores solúveis da hemolinfa de linhagens resistentes, adquirem capacidade de destruir os esporocistos. A importância dos fatores solúveis da hemolinfa no processo de destruição de esporocistos de *S. mansoni* foi comprovada, *in vivo*, a

partir de experimentos de transferência plasmática. Granath e Yoshino (1984) relataram que a transferência de plasma obtido de linhagens resistentes de *B. glabrata* para linhagens suscetíveis, resultou em uma redução da taxa de infecção de linhagens de *B. glabrata* suscetíveis pelo *S. mansoni*.

Os intensivos estudos sobre essa dinâmica sugerem um cenário hipotético capaz de elucidar como essa interação *Biomphalaria*-parasita ocorre. É o que nos mostram Mitta *et al.* (2012) que inserem pela primeira vez as mucinas polimórficas secretadas pelo parasita e que interagem com os FREPs produzidos pelos moluscos. Essa interação é descrita como dinâmica e mutável, chamada de polimorfismo de compatibilidade entre parasita e hospedeiro. Durante a infecção, as mucinas presentes na superfície dos miracídios podem ou não serem reconhecidas pelo arsenal de FREPs dos moluscos. Havendo reconhecimento, o granuloma é formado e a infecção é debelada antes do desenvolvimento completo do parasita. Mas quando o caramujo não é capaz de reconhecer ou não possui a molécula FREP compatível para o reconhecimento das Mucinas, o parasita consegue avançar no processo infeccioso (MITTA, 2012) (Figura 4).

Figura 4 - Processo de compatibilidade entre *Biomphalaria*/parasita



Fonte: Adaptado de Mitta *et al.* (2012).

Nota: Tipos de interação entre miracídio *Schistosoma mansoni* e *Biomphalaria glabrata*. Em cada situação é mostrado como pode haver o reconhecimento das moléculas FREPs contra as SmPoMucs.

2.4 Proteínas imunorelevantes nos invertebrados

A resposta imune de certos grupos de invertebrados sempre foi objeto de estudo de vários grupos de pesquisa pelo fato de mostrar evidências da variabilidade e complexidade na montagem da resposta imune contra invasores. Alguns autores defendem a ideia de que mesmo o grupo invertebrado possuindo um sistema menos sofisticado, em relação aos vertebrados, é capaz de defender de forma específica aos possíveis agentes patogênicos. (BAILEY; CHRISTOFORIDOU; LEWIS, 2013; SUN; UGOLINI; VIVIER, 2014).

Diferente do que foi acreditado no passado, muitos estudos descrevem a presença de moléculas relacionadas à resposta imune nos invertebrados, semelhantes a alguns casos de resposta em organismos mais complexos. Uma resposta imune mais complexa é montada gerando uma grande diversidade de moléculas responsáveis pela defesa desses organismos aos mais diferentes agentes patogênicos (CERENIUS; SÖDERHÄLL, 2013).

Loker *et al.* (1984) e Renwrantz (1986) detectaram na hemolinfa de moluscos fatores que aglutinam e opsonizam partículas, sendo estes fatores identificados como lectinas. As lectinas presentes na hemolinfa de gastrópodes poderiam mediar o reconhecimento de partículas estranhas ou parasitas. Nos moluscos as lectinas são secretadas pelos hemócitos e podem estar solúveis na hemolinfa ou expressas na superfície dos hemócitos circulantes (RICHARDS; RENWRANTZ, 1991). A ligação lectina-carboidrato permite a opsonização e aglutinação de partículas presentes na hemolinfa dos moluscos. Segundo Bayne (1990), a ligação lectina-carboidrato possivelmente leva a uma mudança conformacional do complexo, que pode resultar na ativação do hemócito.

Além das lectinas, outras proteínas têm sido identificadas na hemolinfa de moluscos. Estas proteínas parecem ter função homóloga a mediadores celulares já caracterizadas em vertebrados, e podem estar envolvidas na ativação dos hemócitos durante a infecção.

Analisando outros grupos de moluscos, Ottaviani *et al.* (1992) relatam a presença de uma variedade de moléculas proteicas semelhantes às citocinas de vertebrados (interleucina 1 alfa, interleucina 1 beta, interleucina 2, interleucina 6 e Fator de Necrose Tumoral alfa) em hemócitos de duas espécies, *Planorbarius corneus* e *Viviparus ater*, estando presentes somente nos hemócitos com atividade fagocitária. Apesar destas proteínas apresentarem semelhanças funcionais com citocinas de vertebrados, fazem-se necessários estudos mais sofisticados, para estabelecer o grau de homologia entre estas proteínas.

Granath *et al.* (1994) identificaram uma proteína semelhante ao Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF - α) na hemolinfa de Gastropoda. Esta proteína também foi encontrada na

hemolinfa de *B. glabrata* por Boyer (1994), sendo que o seu nível encontra-se diminuído durante a infecção por *S. mansoni*.

Outra proteína encontrada na hemolinfa de *B. glabrata* apresenta características semelhantes à interleucina 1 (IL-1), estando associada à ativação e proliferação celular (HUGHES *et al.*, 1991; RAFTOS *et al.*, 1991), ao aumento da fagocitose (BURKE; WATKINS, 1991; BECK *et al.*, 1993) e com a produção de superóxidos (GRANATH *et al.*, 1994). Caramujos de linhagens resistentes de *B. glabrata*, apresentam níveis maiores de proteínas semelhantes a IL-1 do que as linhagens suscetíveis, e estes caramujos mantiveram quantidades significativamente altas durante a exposição ao parasita *S. mansoni* em relação às linhagens suscetíveis (GRANATH *et al.*, 1994).

Adema *et al.* (1997) descobriram a presença dos FREPs utilizando o modelo *Biomphalaria glabrata/Echinostoma caproni*, onde foi visto que linhagens resistentes possuíam uma maior expressão dessas proteínas com função de se ligar e precipitar moléculas secretadas por parasitas, retirando-as da circulação, sendo um importante componente de defesa desses organismos.

Outros tipos de FREPs também são encontrados com alta expressão em diferentes modelos parasita-hospedeiro reconhecendo e aglutinando outros parasitas e bactérias nos diferentes grupos de invertebrados (YANG *et al.*, 2014).

Além de FREPs, pouco se sabe sobre a complexidade proteica presente tanto nos hemócitos, quanto no plasma de *B. glabrata*, quando desafiados por diferentes parasitas. Ainda no modelo *B. glabrata/E. caproni*, Vergote *et al.* (2005) um aumento significativo nos níveis de expressão proteica quando comparadas linhagens resistentes e suscetíveis. Avaliando apenas o plasma, foi possível identificar proteínas relacionadas à homeostase de cálcio no plasma, indicando ligação com o processo de resposta uma vez que a via de adesão celular é cálcio-dependente como as lectinas.

Logo depois, em um estudo proteômico dos hemócitos de linhagens resistentes de *B. glabrata* desafiados com *E. caproni*, foram encontradas diversas proteínas com função semelhante a sinalizadores celulares humanos, uma delas, a enzima citidina deaminase, proveniente de hemócitos de linhagem resistente capaz de ativar a função granulocítica além de participar na regulação da mitose dos hemócitos, podendo estar relacionada a resposta celular durante a eliminação do parasito nos caramujos resistentes (BOUCHUT, 2006).

Uma proteína citolítica semelhante às aerolisinas produzidas por bactérias, denominada de *Biomphalysin* capaz de se ligar nas membranas dos parasitas e se polimerizar promovendo a formação de poros (GALINIER *et al.*, 2013).

Também são descritas em outras espécies de moluscos desafiados com parasitas, a expressão diferencial de proteínas relacionadas à ligação celular e atividades catalíticas, assim como proteínas de choque térmico (HSPs) (PRASOPDEE *et al*, 2015).

2.5 A proteômica

A ciência proteômica é um campo relativamente novo que se baseia principalmente no estudo do proteoma, conjunto de proteínas expressas por um determinado genoma. É uma abordagem crescente nos dias atuais que busca não só a caracterização das proteínas, como também a disposição de suas modificações e isoformas, além de suas funções e possíveis interações com outras proteínas. Para as análises, várias técnicas foram desenvolvidas, porém a maioria com os mesmos objetivos, consistindo em separação da amostra por parâmetros como massa e ponto isoelétrico, até chegar na análise propriamente dita pelos espectrômetros de massas. Apesar de ser uma ciência recente, já apresenta muitas evoluções metodológicas e de análise (BANTSCHIEFF, 2007; DREISEWERD, 2014).

As análises das proteínas por separação em gel foram o passo inicial e até hoje respondem questionamentos nos mais diversos campos da ciência. A principal metodologia dessa análise é sem dúvida a eletroforese bidimensional, que consiste em dois passos: separação das proteínas pelo seu ponto isoelétrico, isoeletrofocalização, e pelo peso molecular ou massa molecular por meio da SDS-PAGE. Com o passar do tempo, a técnica foi sendo aperfeiçoada e seu uso se tornou mais frequente, estando presente nos mais diversificados estudos de proteínas (GÖRG, 2004; O'FARREL, 1975).

Os avanços dos estudos no campo da genômica trouxeram à tona uma gama de perguntas que não poderiam ser respondidas apenas com as técnicas tradicionais, uma vez que, existe um universo de acontecimentos entre o gene a ser expresso e a síntese da proteína propriamente dita. Com a utilização dos espectrômetros de massas, muitas dessas perguntas foram elucidadas, levando a conclusões ou até mesmo novas perguntas a serem desvendadas. A espectrometria de massas é atualmente, uma das mais sensíveis e acuradas tecnologias quando temos como objetivo identificar e caracterizar proteínas. Esses equipamentos são formados por três partes essenciais: uma fonte de ionização, que converte as moléculas em íons gasosos; um analisador, que mede a relação massa-carga (m/z) de cada analito; e um detector, que registra a quantidade de íons para cada valor m/z (AEBERSOLD; MANN, 2003; YATES, 2000).

A combinação da eletroforese bidimensional com a espectrometria de massas foi um ponto crucial na história do estudo proteômico dos organismos.

Entretanto, com a necessidade de identificação de proteínas em larga escala, novas abordagens surgiram fazendo com que o enfoque da proteômica clássica, baseada em gel, fosse transferido para a chamada Proteômica “*shotgun*”, que consiste na identificação total dos peptídeos digeridos através do acoplamento do sistema de separação com o aparelho de espectrometria de massas. Esse modelo de análise permite um número muito maior de identificações, assim como evita uma maior perda de material, uma vez que reduz consideravelmente o manuseio da amostra a ser analisada (BOERSEMA *et al.*, 2015; LINK, 1999; ZHANG *et al.*, 2013).

3 JUSTIFICATIVA

No sentido de contribuir no conhecimento referentes a relação do parasita no hospedeiro intermediário, e de fornecer possíveis explicações para as variações nos níveis de suscetibilidade, o objetivo do presente trabalho tem grande relevância por sugerir quais os possíveis componentes proteicos envolvidos na resposta imune de *Biomphalaria*, quando expostos *S. mansoni*.

Apesar de ser um tema bastante interessante à comunidade acadêmica e de grande importância à saúde e, por consequência, à economia, poucos estudos desse âmbito têm sido conduzidos com os caramujos do gênero *Biomphalaria*, principalmente quando se trata de espécies como *B. straminea* que apesar de não apresentar grande susceptibilidade ao parasita, é um dos maiores responsáveis pela manutenção da esquistossomose, uma vez que é a espécie mais dispersa geograficamente.

Devido às dificuldades de controle da esquistossomose com métodos tradicionais, e aos recentes relatos de cepas de parasitas resistentes aos fármacos, torna-se necessário a busca de conhecimentos que possam auxiliar na construção de novas estratégias para o controle da doença.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Estabelecer o perfil proteico da hemolinfa de *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. straminea* R3 expostos e não expostos ao *S. mansoni*.

4.2 Objetivos Específicos

- a) Determinar a concentração proteica total da hemolinfa entre *B. glabrata*, *B. straminea* e *B. straminea* R3 sadios e expostos ao *S. mansoni*;
- b) Determinar por eletroforese bidimensional o perfil proteico da hemolinfa de *B. glabrata*, sadios e expostos ao *S. mansoni*;
- c) Determinar por eletroforese bidimensional o perfil proteico da hemolinfa de *B. straminea*, sadios e expostos ao *S. mansoni*;
- d) Determinar por eletroforese bidimensional o perfil proteico da hemolinfa de *B. straminea* R3, sadios e expostos ao *S. mansoni*;
- e) Identificar proteínas com expressão diferencial entre as espécies e linhagem sadias e expostas ao *S. mansoni*;
- f) Buscar possíveis proteínas homólogas a partir das características obtidas pelo perfil bidimensional proteico.

5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

5.1 Obtenção dos moluscos

Os moluscos utilizados no estudo foram cedidos pelo Laboratório de Malacologia do Serviço de Referência em Esquistossomose da FIOCRUZ PERNAMBUCO. As linhagens das espécies *B. glabrata* e *B. straminea* são originárias de São Lourenço da Mata-PE, e a linhagem de *B. straminea* R3 é proveniente de Sete Lagoas – MG. Os caramujos foram mantidos no biotério experimental do laboratório de imunopatologia Keizo Asami-LIKA/UFPE em aquários com água livre de cloro a 24°C, com *pH* controlado frequentemente e suplementados com carbonato de cálcio para que a acidez da água fosse sempre controlada.. Foram alimentados com alfaces previamente higienizadas em solução de hipoclorito de sódio em água destilada e com ração de peixe (GoldFish Colour Bits, Alcon).

5.2 Grupos de análise

Os caramujos de cada espécie foram divididos nos seguintes grupos de análise:

- a) **Expostos:** 5 Caramujos submetidos à infecção por miracídios de *Schistosoma mansoni*;
- b) **Controle:** 5 Caramujos submetidos ao estresse da infecção, mas com água livre de miracídios.

5.3 Obtenção dos miracídios

Os miracídios destinados à infecção dos moluscos foram obtidos a partir de camundongos infectados com a cepa LE de *S. mansoni* segundo a aprovação do CEUA 58/2014 do CPqAM – FIOCRUZ/PE. Foi realizada a técnica de sedimentação espontânea das fezes dos camundongos. As fezes foram maceradas, diluídas em água destilada, filtradas em peneira em um cálice de sedimentação e lavadas com água destilada para a retirada dos sedimentos presentes no material. Passada essa etapa, o material foi deixado em repouso *overnight*, a uma temperatura média de 8°C, na ausência de luz. Os ovos, uma vez depositados no fundo do cálice, foram expostos à luz artificial pelo período de uma hora para a eclosão dos miracídios. Os miracídios recuperados foram contados para o cálculo da média de miracídios presentes por mL de água.

5.4 Exposição dos caramujos

Os caramujos de cada grupo foram colocados em placa com poços individuais onde foram expostos a água com cerca de 10 miracídeos por caramujo. As placas com os moluscos foram expostas a luz artificial por um período de 1 hora para a estimulação da infecção.

5.5 Processamento da hemolinfa

Após um período de 24 horas da exposição, a hemolinfa dos caramujos dos grupos infectados e controle foram retirados por punção céfalopodal utilizando ponteiras siliconizadas para impedir a aderência dos hemócitos.

5.6 Preparação do extrato proteico

A hemolinfa dos caramujos foi mergulhada, duas vezes, em nitrogênio líquido para rompimento dos hemócitos intercalados com homogeneizações em vórtex.

Foi adicionada 400µL de solução tampão de lise (pH 7,5 contendo Uréia 8M, Tris 40mM, DTT (Ditiotreitol) 1% e CHAPS ((3-[(3-Colamidopropil)-dimetil amónio]-propano-sulfonato) 4%) (Bouchut *et al.* 2006) sendo incubada por 2h em temperatura ambiente sob agitação. Após o tempo de incubação, a amostra foi centrifugada a 15.000g por 30min a 4°C. O sobrenadante contendo as proteínas foi recuperado e armazenado a -80°C.

5.7 Determinação da concentração proteica

A concentração das proteínas extraídas dos hemócitos foi determinada pelo 2D QuantKit (GE Healthcare Life Sciences), seguindo protocolo do próprio fabricante e utilizando uma curva de calibração feita com albumina de soro bovino como padrão para a quantificação total das proteínas. Foi utilizado um volume de 15µL de cada extrato total para a dosagem comparativa entre as condições, sadio e exposto, de cada espécie.

5.8 Clarificação das amostras para eletroforese bidimensional

Um volume equivalente a 300µg do extrato proteico da hemolinfa foi utilizado para purificação utilizando o kit 2D Clean UP Kit (GE Healthcare Life Sciences), seguindo

protocolo do próprio fabricante e as amostras foram resuspensas em tampão de reidratação (Ureia 7M, Tiourea 2M, CHAPS 2%, IPG Buffer 2%, Azul de bromofenol 0,002%).

5.9 Eletroforese Bidimensional – Focalização Isoelétrica

As amostras foram utilizadas para reidratação de fitas IPG DryStrips (GE Healthcare) de *pH* Linear 3-10. Após 16hrs sendo reidratadas, as fitas foram colocadas em IPGphor 3 (GE Healthcare) para a isoeletrofocalização das fitas sendo corridas por 8 horas sob condição de voltagem padrão estabelecida pelo aparelho.

5.10 Eletroforese Bidimensional – SDS-PAGE

Uma vez focalizadas, as fitas foram equilibradas em tampão de equilíbrio com DTT por 15 minutos e iodoacetamida também por 15 minutos. As fitas foram colocadas no gel de poliacrilamida 12,5% e seladas com gel de agarose 0,5% com Azul de Bromofenol. A corrida foi realizada por 6 horas em 20mA para cada gel. A temperatura durante a corrida de eletroforese foi mantida em temperatura 20° com auxílio de refrigerador automático.

5.11 Análise dos géis bidimensionais

Os géis, corados com nitrato de prata, foram digitalizados em ImageScanner III (GE Healthcare) e analisados em software ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare). Os *spots* foram identificados e os géis para cada condição foram combinados para identificar quais *spots* eram comuns para a condição analisada.

O ponto isoelétrico (*pI*) e a massa molecular (MW) de cada *spot* selecionado foram determinados, assim como sua intensidade.

Uma lista de *spots* diferenciais para cada condição foi gerada onde foi realizada uma busca no UniProtKB/Swiss-Prot e UniProtKB/TrEMBL com auxílio da ferramenta TagIdent (EXPASY – Swiss Institute of Bioinformatics). A homologia foi dada a partir do *pI* com taxa de desvio padrão para o peso molecular de 2%. As buscas foram feitas a partir dos bancos de dados de *Biomphalaria*, *Mollusca* e *Eukaryota*.

6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os miracídios foram obtidos a partir de fezes de animais infectados com *S. mansoni* cedidas em colaboração com o projeto já aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz com o N° 58/2014. O parecer de aprovação se encontra em anexo A.

7 RESULTADOS

7.1 Concentração proteica da hemolinfa de *Biomphalaria spp.*

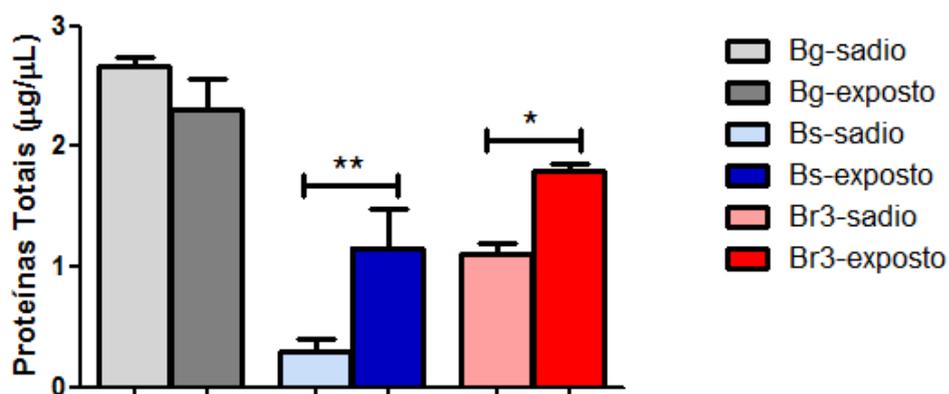
A dosagem das proteínas foi feita utilizando 15µL do extrato proteico de hemolinfa extraída através do 2D Quant Kit (GE). A análise estatística para comprovação da variância foi One Way ANOVA, utilizando o teste de comparação múltipla de Newman-Keuls.

Tabela 1 - Concentração do extrato proteico total da hemolinfa de *Biomphalaria spp.* sadios e expostos ao *S. mansoni*.

Grupos	Concentração (ug/uL)
Bg-sadio	2.66
Bg-exposto	2.53
Bs-sadio	0.48
Bs-exposto	1.34
Br3-sadio	1.11
Br3-exposto	1.85

Fonte: O autor.

Figura 5 - Concentração proteica total da hemolinfa de *Biomphalaria spp.*



Fonte: O autor.

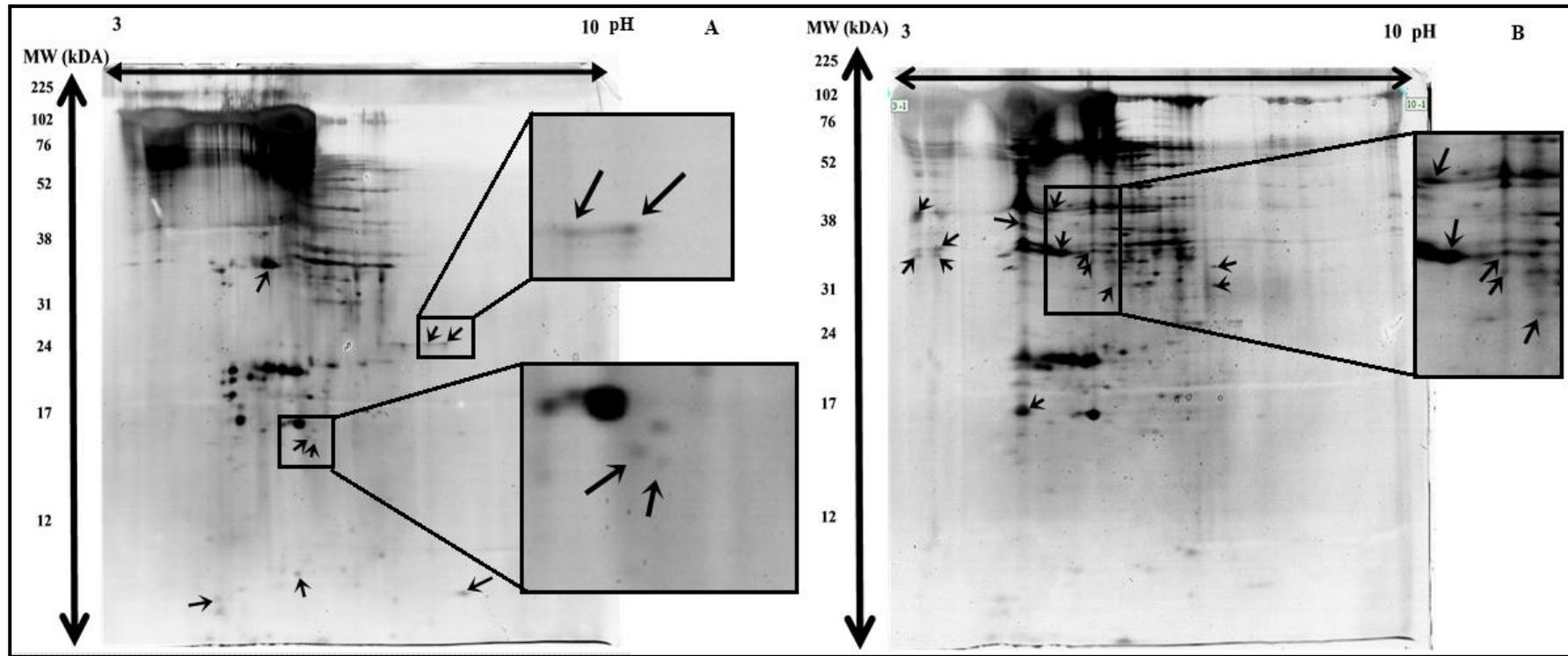
7.2 Perfil Bidimensional de *Biomphalaria spp.*

Utilizando um total de 300µg de extrato de proteínas foram feitos géis dos grupos sadios e expostos de cada espécie. Os *spots* de cada gel foram identificados automaticamente por *software*, porém selecionados manualmente, retirando *spots* duplos, artefatos de corrida e

de coloração no gel. Para cada *spot* foi estimado seu ponto isoelétrico (*pI*), peso molecular (MW) e intensidade para a busca na literatura por homologia com proteínas já descritas tanto em *Biomphalaria* quanto em outros modelos experimentais.

No perfil bidimensional de *B. glabrata* sadio (Bg-sadio) (Figura 6a) foram detectados 98 *spots*, enquanto que em *B. glabrata* exposto ao *S. mansoni* (Bg-exposto) (Figura 6b) foram detectados 99 *spots* para análise. Quando comparamos os dois perfis, encontramos 8 *spots* exclusivos para Bg-sadio, sendo 3 homólogos a proteínas já descritas (Quadro 1) e 13 *spots* exclusivos para Bg-exposto, sendo 4 com homologia com proteínas já conhecidas (Quadro 2).

Figura 6 - Perfis bidimensionais de *Biomphalaria glabrata* sadio e exposto ao *S. mansoni*.



Fonte: O autor.

Legenda: (A) Eletroforese bidimensional de *B. glabrata* sadio. (B) Eletroforese bidimensional de *B. glabrata* exposto ao *S. mansoni*. (SETAS) Proteínas que se mostraram diferencialmente expressas na comparação pré e pós-exposição ao *S. mansoni*. Coloração com Nitrato de Prata.

Quadro 1 - Spots com expressão diferencial em *B. glabrata* sadio com homologia com proteínas descritas na literatura.

Spot ID	pI	MW (KDa)	Proteína homóloga	Nº de acesso	Organismo	Função molecular
14390	7.77	24	Proteína não caracterizada	A0A0L8H3Y9	<i>Octopus bimaculoides</i>	Desconhecida
6782	8.03	24	Peptidoglycan recognition protein 3	A0A0C5PTA0	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Processo catabólico de peptideoglicanos.
14386	6.03	16	Superoxide dismutase	L7W598	<i>Perna indica</i>	Destrói radicais livres produzidos normalmente no interior celular.

Fonte: O autor.

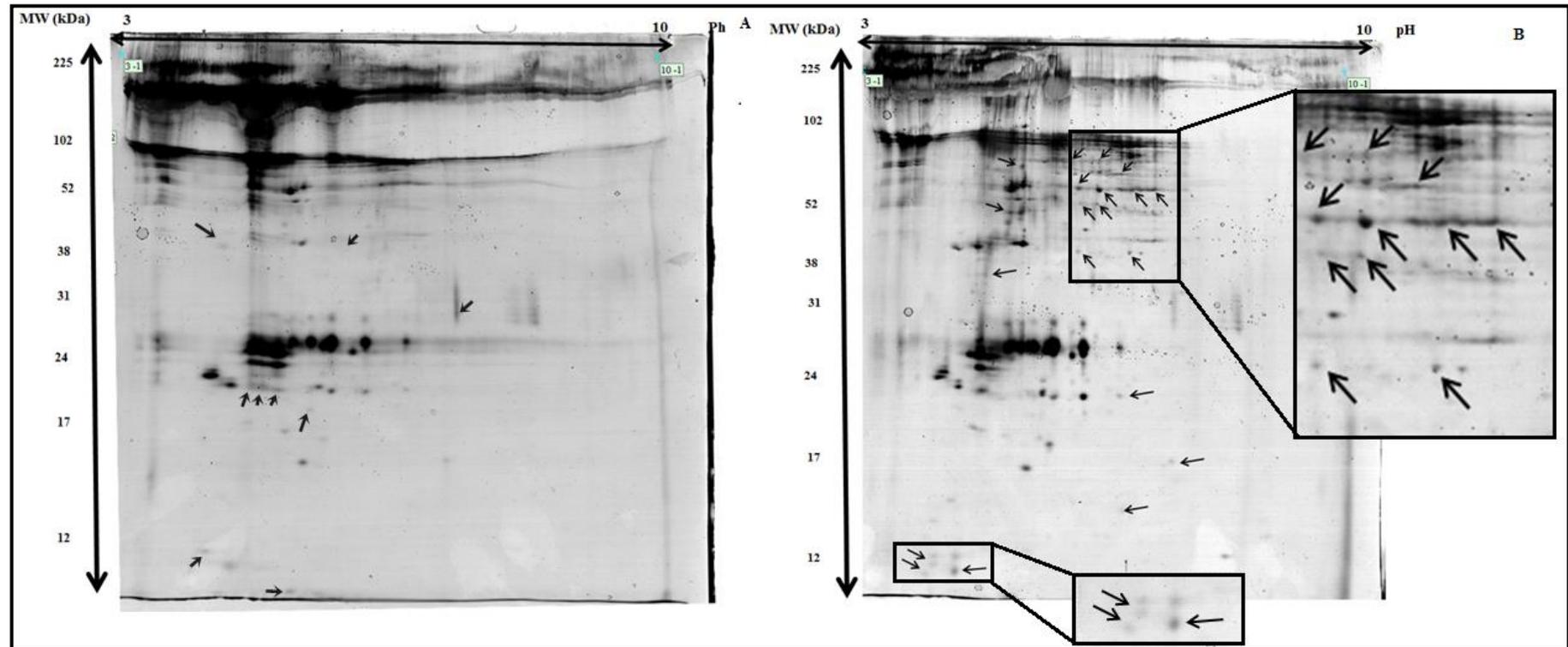
Quadro 2 - Spots com expressão diferencial em *B. glabrata* exposto ao *S. mansoni* com homologia com proteínas descritas na literatura.

Spot ID	pI	MW (KDa)	Proteína homóloga	Nº de acesso	Organismo	Função molecular
14266	6.05	30	Cytochrome c oxidase subunit 3	E6Y155	<i>Bulla sp.</i>	Cadeia transportadora de elétrons.
14230	4.45	30	Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 3	K1R589	<i>Crassostrea gigas</i>	Desconhecido
14229	7.44	32	Uncharacterized tatC-like protein ymf16 (P93312)	K1QWN2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Desconhecido
14208	4.82	17	Elongation factor 1-delta		<i>Crassostrea gigas</i>	Componente do processo de tradução.

Fonte: O autor.

Em *B. straminea* sadio (Bs-sadio) (Figura 8a), dos 78 spots disponíveis para análise foram encontrados 9 *spots* diferenciais quando comparado com a condição exposta ao *Schistosoma* sendo 4 homólogos a proteínas já descritas (Quadro 3). Em *B. straminea* pós-exposição ao *Schistosoma* (Bs-exposto) (Figura 8b) foram encontrados 28 spots exclusivos dos 96 analisados, onde, foi encontrada 20 homólogos com proteínas já descritas em bancos de dados (Quadro 4).

Figura 7 - Gel bidimensional de *Biomphalaria straminea* pré e pós exposição ao *S. mansoni*.



Fonte: O autor.

Legenda: (A) Eletroforese bidimensional de *B. straminea* sadio. (B) Eletroforese bidimensional de *B. straminea* exposto ao *S. mansoni*. (SETAS) Proteínas que se mostraram diferencialmente expressas na comparação pré e pós-exposição ao *S. mansoni*. Coloração com Nitrato de Prata.

Quadro 3 - Spots com expressão diferencial em *B. straminea* sadio com homologia com proteínas descritas na literatura.

Spot ID	pI	MW (KDa)	Proteína homóloga	Nº de acesso	Organismo	Função molecular
23065	4.75	21	Isoform 2 of Heme-binding protein 2	Q9Y5Z4-2	<i>Homo sapiens</i>	Regulação negativa do potencial de membrana mitocondrial.
23092	4.28	20	Calmodulin 2	D5G2D3	<i>Haliothis discus discus</i>	Ligante de íons de cálcio.
23093	5.38	18	GTPase IMAP family member 4	K1Q547	<i>Crassostrea gigas</i>	Ligante de GTP.
23096	5.91	38	Beta-hexosaminidase	K1RDE9	<i>Crassostrea gigas</i>	Processo metabólico de carboidratos.

Fonte: O autor

Quadro 4 - Spots com expressão diferencial em *B. straminea* exposto ao *S. mansoni* com homologia com proteínas descritas na literatura.

(Continua)

Spot ID	pI	MW (KDa)	Proteína homóloga	Nº de acesso	Organismo	Função molecular
24297	7.49	16	Lipopolysaccharide-induced TNF factor 2-c	W5XMC7	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Componente de membrana.
24296	6.77	16	Hemoglobin subunit beta	B3EWD2	<i>Sciurus carolinensis</i>	Transporte de oxigênio; Ligante de íons de Ferro.
24293	4.02	12	Protein LBH	Q5ZM46	<i>Gallus gallus</i>	Regulação da transcrição.
24290	4.33	11	FGGY carbohydrate kinase domain-containing protein	K1Q3X8	<i>Crassostrea gigas</i>	Atividade quinase. Catalisa a transferência de grupos fosfato.
14019	6.74	22	Thioredoxin peroxidase 2	B1N694	<i>Haliothis discus discus</i>	Atividade peroxidase.
12464	6.05	26	ATP synthase subunit a	I6QIV6	<i>Perna viridis</i>	Transporte transmembrana de íons de hidrogênio.
9434	4.80	36	Cathepsin D.	O93428	<i>Chionodraco hamatus</i>	Atividade protease.

Quadro 4 - Spots com expressão diferencial em *B. straminea* exposto ao *S. mansoni* com homologia com proteínas descritas na literatura.

(Conclusão)

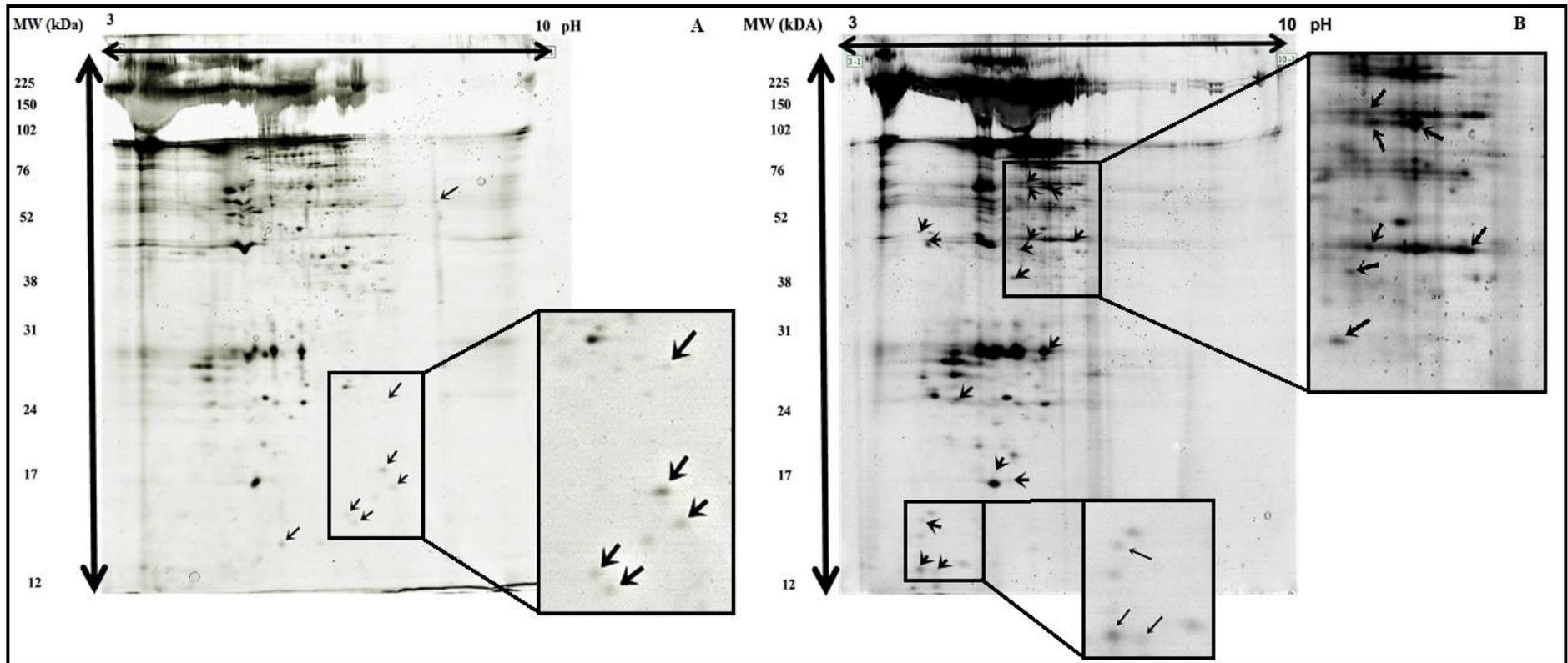
Spot ID	pI	MW (KDa)	Proteína homóloga	Nº de acesso	Organismo	Função molecular
8574	6.89	40	Acetyl-CoA carboxylase 1 (K1RG77)		<i>Crassostrea gigas</i>	Vias metabólicas e energéticas.
8496	7.05	40	Ataxin-7-like protein 3	A1L209	<i>Danio rerio</i>	Co-ativador de transcrição. Ligante de ions de Zinco.
7072	5.16	50	Peptidoglycan recognition protein	A0T2Q1	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Ligante de ions de Zinco. Envolvida em processos catabólicos de peptideoçanos.
6738	6.41	52	Cytochrome P450 4Z1	K1PLS9	<i>Crassostrea gigas</i>	Ligante de ions de Ferro. Atividade monooxigenase.
6759	6.17	52	Xylose isomerase	A0A0L8H1I1	<i>Octopus bimaculoides</i>	Atividade isomerase. Metabolismo de carboidratos.
6184	6.15	58	Cytochrome c oxidase subunit 1	Q94WR7	<i>Buteo buteo</i>	Atividade catalítica na cadeia respiratória.
5705	6.34	67	Heat shock 70 kDa protein 12A	K1S3V3	<i>Crassostrea gigas</i>	Proteína de choque térmico (HSP70) relacionada com resposta a stress.
5077	6.08	70	Caspase-2	K1R4J8	<i>Crassostrea gigas</i>	Processo apoptótico.
13219	6.12	20	Heat shock protein 22	R4TVA0	<i>Sinonovacula constricta</i>	Resposta a stress.
8381	4.38	41	Putative actin-27	Q54HE9	<i>Dictyostelium discoideum</i>	Componente estrutural do citoesqueleto.
8102	7.24	43	Cytochrome b	H6V554	<i>Berthellina sp.</i>	Transporte de eletrônico mitocondrial. Atividade carreadora de metais.

Fonte: O autor

O perfil bidimensional de *B. straminea* R3 sadio (R3-sadio) (Figura 8a) e exposto (R3-exposto) (Figura 8b) foram detectados respectivamente 114 e 126 *spots* disponíveis para análise.

Na comparação entre os dois perfis, em R3-sadio foram vistos 7 *spots* diferenciais sendo 5 homólogos a proteínas já descritas (Quadro 5). Enquanto isso, em R3-exposto foram encontrados 30 *spots* diferenciais, sendo 16 homólogos a proteínas descritas em banco de dados (Quadro 6).

Figura 8 - Perfil bidimensional de *B. straminea* R3 sadio e exposto ao *S. mansoni*.



Fonte: O autor.

Legenda: (A) Eletroforese bidimensional de *B. straminea* R3 sadio. (B) Eletroforese bidimensional de *B. straminea* R3 exposto ao *S. mansoni*. (SETAS) Proteínas que se mostraram diferencialmente expressas na comparação pré e pós-exposição ao *S. mansoni*. Coloração com Nitrato de Prata.

Quadro 5 - Spots com expressão diferencial em *B. straminea* R3 sadio com homologia com proteínas descritas na literatura.

Spot ID	pI	MW (KDa)	Proteína homóloga	Nº de acesso	Organismo	Função molecular
14457	8.42	55	Hyaluronidase	A0A0C9S0H7	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Processo metabólico de carboidratos.
10851	7,56	17	Proteína não caracterizada	A0A0L8FII8	<i>Octopus bimaculoides</i>	Desconhecida
14470	5.89	13	IL-5	O02699	<i>Equus caballus</i>	Resposta imunológica
14480	7.61	23	Glutathione S-transferase	P46088	<i>Nototodarus sloanii</i>	Diversos processos metabólicos (sinalização celular)
14473	7.74	16	Proline-rich transmembrane protein 1	K1R4L9	<i>Crassostrea gigas</i>	Responsável por estímulos bióticos.

Fonte: O autor.

Quadro 6 - Spots com expressão diferencial em *B. straminea* R3 exposto ao *S. mansoni* comparados por homologia com proteínas conhecidas.

Spot ID	pI	MW (KDa)	Proteína homóloga	Nº de acesso	Organismo	Função molecular
5792	4.3	44	Calreticulina	AAB24569.1	<i>Aplysia californica</i>	Proteína ligante de Ca ⁺ .
5771	6.7	45	Receptor de ácido retinóico RxR	Q8T5C6	<i>B. glabrata</i>	Desconhecida
4477	6.3	58	LBP – <i>lipid binding protein</i>	A0A06326C7	<i>B. glabrata</i>	Interação com membrana plasmática.
14904	6.0	59	Serina/treonina proteína quinase não específica	A0A0B6ZG63	<i>Arion vulgaris</i>	Ligante de ATP/ organização do filamento de Actina. Organização do citoesqueleto.
5749	5.9	45	Proteína transmembrana	A0A0A7RPU8	<i>Littorina littorea</i>	Componente da membrana celular.
6048	5.8	43	Mitogen-activated protein kinase	Q4JHP6	<i>B. glabrata</i>	Cascata de resposta imune inata contra patógenos ou danos teciduais.
6830	5.7	38	Protein binding nucleotide subunit beta	P23232	<i>Loligo forbesii</i>	Proteínas G são envolvidas na modulação de alguns sistemas de sinalização celular.
8683	6.2	28	Ferritina	A0A0B6Z0G8	<i>Arion vulgaris</i>	Importante na homeostase de Ferro.
9735	4.8	23	Calcineurin B-like protein 5	Q7FZF1	<i>Arabidopsis thaliana</i> :	Atua como sensor de cálcio que por sua vez está envolvido em diferentes processos, inclusive de adesão celular.
14915	5.4	17	Mucin-1	Q60528	<i>Mesocricetus auratus</i> celular.	Pode agir tanto como uma proteína de adesão como anti- adesão
14884	5.6	16	Immunogenic miracidial antigen 8I	P13524	<i>Schistosoma japonicum</i>	Atividade antigênica.
14873	4.2	14	Boophilin-H2	Q8WPI2	<i>Rhipicephalus microplus</i>	Evita a formação de coágulos.
14174	4.2	12	Protein LBH	Q5RD13	<i>Pongo abelii</i>	Fator de transcrição.
14891	4.4	12	Calumenin	K1R529	<i>Crassostrea gigas</i>	Ligante de íons de Ca ⁺ .

Fonte: O autor

8 DISCUSSÃO

Sabemos hoje que o sistema imune dos invertebrados é totalmente diferente do que imaginávamos no passado. A diversidade de agentes invasores somada a diferentes fatores moleculares envolvidos na defesa imunológica nos mostra o quanto essa resposta é complexa e muitas vezes específica.

Há algumas décadas os estudos com a resposta imunológica dos invertebrados vêm sendo intensificados e ao mesmo tempo, vem acompanhando o avanço tecnológicos nas diferentes áreas da ciência. Essas novas tecnologias abriram portas para novos ramos na mesma linha de estudo. Quando falamos de imunologia dos invertebrados, é possível identificar diferentes grupos de pesquisa, que desenvolvem trabalhos diferentes, porem complementares buscando melhores respostas para entender a dinâmica entre parasita-hospedeiro.

O surgimento das “ômicas” favoreceu todos os grupos de pesquisa, pois fracionou o conhecimento para ser mais bem analisado, criando assim, novas estratégias. Lembrando que, são vertentes dependentes entre si, evidenciando essa complementariedade de conhecimento.

O modelo *Biomphalaria glabrata*/*Schistosoma mansoni* já é bastante estudado nas diferentes vertentes (Genômica, Transcriptômica e Proteômica), oferecendo suporte para o desenvolvimento básico do estudo. Porém, o que sabemos ainda é pouco e ainda existem variáveis que nos impedem de desenvolver estratégias eficientes para o controle de esquistossomose. Uma dessas variáveis é a presença de diferentes espécies de hospedeiros intermediários, que mesmo com competência de transmissão menor que *B. glabrata*, se mostram importantes para a manutenção do ciclo do parasita no ambiente.

Portanto, os resultados obtidos neste trabalho se tornam pioneiros, pois é inserida a espécie *B. straminea* em análises de resposta imunológica. Sendo importante por dividir o mesmo ambiente que a *B. glabrata* e estar presente em todos os estados brasileiros. Esse pioneirismo de certa forma se torna uma limitação quando é necessário fazer comparações de resultados com a espécie mais próxima, no caso *B. glabrata*, que já possui diversos trabalhos nessa área, porém, o conceito da resposta imune ainda não é totalmente elucidado.

Oliveira (2015), desafiando a espécie *B. tenagophila* com o *S. mansoni*, não encontrou grande diferença na concentração de proteínas totais da hemolinfa. O que difere em partes da metodologia aqui empregada, pois que foram avaliadas duas espécies: *B. glabrata* e *B. straminea* (susceptível) e *B. streaminea* R3 (resistente ao *S. mansoni*) desafiados ao mesmo parasita. Em nosso estudo a espécie *B. glabrata* apresenta o mesmo comportamento que a *B.*

tenagophila no trabalho acima citado, sem aumento significativo da concentração proteica. Deve-se observar que ambas possuem susceptibilidade semelhante frente ao parasita, podendo assim, responder de forma semelhante à infecção. O mesmo foi observado por Tunholi *et al.* (2011) quando avaliaram as proteínas totais da hemolinfa de *B. glabrata*, mesmo após algumas semanas pós-exposição a outro trematódeo, o *Echinostoma paraensei*.

A diferença encontrada foi nas espécies *B. straminea* e *B. straminea* R3, estas apresentam aumento significativo das proteínas totais da hemolinfa. Essa diferença de padrão de resposta já oferece vestígios de possíveis explicações do fato de *B. straminea* ser uma espécie menos susceptível ao parasita. Dando-nos a ideia de uma resposta diferente da espécie susceptível.

As proteínas sempre foram peça fundamental na montagem das diferentes respostas, e quando falamos de resposta imune de *Biomphalaria* não poderia ser diferente. A técnica de eletroforese bidimensional é uma ferramenta proteômica antiga, porém ainda utilizada em estudos de comparação de proteomas expressos em diferentes condições, como é observado em trabalhos como o de Chenglong *et al.* (2013) e Wu *et al.* (2013), avaliando a resposta de *Mytilus galloprovincialis* contra diferentes tipos de bactérias.

Grande parte dos estudos que envolvem a dinâmica *Biomphalaria*/*Schistosoma* se concentra em nível de expressão gênica. São encontrados alguns trabalhos determinando o perfil proteico bidimensional em *Biomphalaria*, como é o caso de Vergote *et al.* (2005) e Bouchut *et al.* (2006), ambos utilizando linhagens susceptível e resistente de *B. glabrata* contra o trematódeo *E. caproni*. Nos dois trabalhos, foram encontradas proteínas expressas de forma exclusiva em hemócitos e outras no plasma das linhagens resistentes de *B. glabrata* quando submetidas ao desafio pelo trematódeo *E. caproni*. Tais proteínas foram identificadas com associação das técnicas de eletroforese 2D e espectrometria de massa, sendo os níveis de expressão genica confirmados por PCR em tempo real.

Nos resultados obtidos a análise inicial foi para *B. glabrata* por ser a espécie mais próxima para a identificação de homologia entre as proteínas, uma vez que quase nada é encontrado se tratando de *B. straminea*. Como os dados do proteoma de *B. glabrata* ainda são escassos e incompletos, a busca foi feita também homologia com bancos de dados de *Mollusca* e *Eucariota*, nesse caso, restringindo ainda mais os parâmetros de busca para evitar ou diminuir possíveis falhas na relação de homologia.

Outro fator que prejudica melhores esclarecimentos é o fato do principal banco de dados de proteínas, no caso *UniProt*, possuir informações incompletas sobre boa parte das proteínas relacionadas ao gênero *Biomphalaria*. Portanto, para maior probabilidade de

associações a busca foi realizada tanto no espaço SwissProt/UniProt quanto no TrEMBL/UniProt.

Avaliando o perfil bidimensional 2D da hemolinfa de *B. glabrata* sadio comparando com sua condição exposta ao parasita, foi observado que em ambos os casos as alterações são pequenas em relação ao número de *spots* identificados. Mesmo na espécie mais estudada, quando observamos a interação *Biomphalaria/Schistosoma*, as proteínas encontradas são geralmente de expressão conservada, independentes do estresse da infecção.

Quando analisamos a espécie *B. straminea* e comparamos a condição sadia e exposta, podemos ver um aumento significativo tanto do número de *spots* analisados, quanto do número de *spots* diferenciais. A susceptibilidade mediana da espécie nos sugere ideia de uma resposta melhor elaborada. Porém, como já foi dito, a busca por homologia foi mais limitada nesse grupo pelo fato de se tratar de uma espécie diferente e raramente estudada. Dando um enfoque nas proteínas diferenciais da condição pós-exposição ao parasita.

Os resultados sobre o spot 14019 mostram uma homologia com a proteína Tioredoxina peroxidase membro de uma superfamília de proteínas importantes no sistema antioxidante mitocondrial, descrita por Zoysa *et al.* (2008) em *Haliotis discus discus*, um gastrópode marinho. Sendo encontrada também nos mais diversos grupos de eucariotos, com ação peroxidase reguladora do stress oxidativo, além de auxiliar na eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e minimização de danos ao DNA. No caramujo *B. straminea* esta proteína pode estar relacionada com função defensiva podendo estar envolvida no processo de diminuição dos danos causados pela infecção.

Nas buscas por homologias, foram encontrados diversos *spots* que são homólogos a proteínas responsáveis por funções metabólicas em geral. Os *spots* 8574 e 8496 são homólogos respectivamente às proteínas Acetil-CoA carboxilase, Ataxin-7-like e Xilose isomerase. A Acetil-CoA carboxilase foi descrita por Zhang *et al.* (2012) em ostras *Crassostrea gigas* em uma análise em larga escala do genoma desse bivalve. Já a Ataxin-7-like foi encontrada na espécie de peixe *Danio rerio* por Howe *et al.* (2013) quando sequenciou o genoma desse organismo em busca de relações com o genoma humano. Ambos os autores não conferem relação dessas proteínas com a defesa imune dos organismos em questão, porém, a presença dessas proteínas e algumas outras relacionadas à vias metabólicas e catalíticas em Bs-exposto, nos sugere mudança no ambiente celular com objetivo de uma possível resposta ao parasita.

Janotti-Passos *et al.* (2008) encontraram a proteína HSP70 em linhagem resistente de *B. tenagophila* tanto sadio quando desafiado ao *Schistosoma*, diferindo dos resultados obtidos onde encontramos no *spot* 5705 uma proteína bastante semelhante apenas em *B. straminea* exposta ao parasita. Nosso achado corrobora com Li *et al.* (2016) que identifica a presença de HSP70 em bivalves *Pinctada martensii* desafiados com agentes patógenos, nesse caso, bactérias, como também a desafios abióticos como mudanças termais e baixa salinidade no ambiente.

Garrido *et al.* (2012) alegam que as proteínas do grupo *small Heat Shock Protein* (sHSP) de tamanho entre 15-30 kDa são geralmente postas de lado pelo fato dos estudos se concentrarem nas de maior peso molecular (HSP70 e HSP90). No *spot* encontramos uma proteína homóloga a *Heat Shock protein 22*. Essa proteína é descrita por Zhang *et al.* (2013) em bivalves, *Sinonovacula constricta*, atuando como resposta a estresses ambientais como presença de metais pesados no meio. A falta de relação com respostas a patógenos não descarta a possibilidade da proteína encontrada em nosso estudo estar relacionada com a defesa contra o parasita, uma vez que as sHSP são associadas a alguns estados patológicos em vertebrados.

O *spot* 9434, homólogo à proteína *Cathepsin D*, que se trata de uma das proteases envolvidas na degradação proteica celular sendo encontrada com as mesmas propriedades tanto em vertebrados quanto em invertebrados. Apesar de nosso *spot* apresentar homologia estrutural com a *Cathepsin D* encontrada por Capasso *et al.* (1999) em peixes *Chionodraco hamatus*, Venugopal e Kumar (2014) realizaram uma caracterização bioquímica da *Cathepsin D* do molusco *Lamellidens corrianus*, atribuindo também uma função protease a essa proteína. A presença de proteases como resposta ao parasita já é bem descrito que uma das vias de atuação da resposta imune dos invertebrados é composta por ação de proteases e inibidores de proteases do hospedeiro intermediário.

A linhagem *B. straminea* R3 utilizada neste estudo serviu como padrão de referência de uma resposta competente contra o parasita *S. mansoni* uma vez que se trata de uma linhagem refratária ao *S. mansoni*. Essa resposta distinta é vista primeiramente na dosagem das concentrações proteicas da hemolinfa, quando detectamos um aumento significativo da quantidade de proteínas extraídas. Outro parâmetro interessante é que mesmo apresentando quantidades de *spots* semelhantes nas duas condições, o número de *spots* que se mostraram diferenciais é mais elevado que as outras espécies analisadas anteriormente.

Em R3-sadio, encontramos apenas *spots* homólogos a proteínas envolvidas com processos metabólicos e estímulos bióticos, uma possível resposta pode ocorrer naturalmente pelo estresse gerado no processo de infecção.

O *spot* 14470 nos chama atenção pela sua homologia com a citocina IL-5 de *Equus caballus*. Lopez *et al.* (1988) associam esta citocina a alguns estágios de eosinofilia humana. Um quadro semelhante é observado por Riihimäki *et al.* (2008), onde encontraram aumento nos níveis de expressão dessa citocina em *Equus caballus* com eosinofilia pulmonar transitória. Apesar de ser vista em R3-sadio e não aparecer na condição exposta ao parasita, essa proteína pode ter sua expressão suprimida devido à tentativa de infecção do *Schistosoma mansoni*.

Apesar de apresentar um número grande de *spots* diferenciais em R3-exposto, a quantidade de proteínas homólogas encontradas é baixa pelo fato de se tratar de uma espécie sem o genoma e proteoma totalmente sequenciados. Mesmo assim, devemos levar em conta a hipótese de que novas proteínas podem surgir durante essa resposta contra o parasita, devido a resistência dessa linhagem. Ainda assim, grande parte das proteínas com homologia encontrada apresentam funções relacionadas à resposta imunológica.

As proteínas presentes nos *spots* 5792, 9735 e 14891 são homólogas respectivamente às proteínas *Calreticulin*, *Calcineurin B-like protein 5* e *Calumenin*. Esse grupo de proteína está envolvido no transporte e sinalização de íons de Cálcio em diferentes organismos, que por sua vez influencia nos processos de adesão celular. Vergote *et al.* (2005) encontraram aumento de expressão gênica de moléculas com função semelhante, chamadas CaBPs (*Calcium Binding Proteins*), no plasma de linhagem resistente de *B. glabrata* ao *Echinostoma paraensei*. Nossos resultados são embasados também com o estudo de como Liu *et al.* (2013) que comprovam o efeito dessas proteínas Cálcio-moduladoras na resposta contra agentes patógenos, nesse caso, na infecção de *Branchiostoma japonicum* com bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) quanto com gram-negativa (*Escherichia coli*).

No *spot* 6048 encontramos a proteína homóloga à *Mitogen-activated protein kinase* que é descrita por Johnson e Lapadat (2002) como uma proteína importante que controla vários processos biológicos por fazer parte da cascata de várias vias de sinalização celular. Essa descrição é reforçada por Humphries *et al.* (2006) quando verificam que os produtos excretores e secretores do *S. mansoni* ativam algumas proteínas de sinalização celular em *B. glabrata*. A presença dessa proteína na linhagem R3-exposto sugere que essa via de sinalização esteja respondendo à infecção, fazendo com que a resposta seja eficiente.

A proteína correspondente ao *spot* 8683 se mostra semelhante à *Ferritin*. É uma proteína relacionada ao armazenamento de íons de Ferro no interior celular e além de ser encontrada em nossa linhagem R3-exposta, sua expressão gênica foi descrita por Otho *et al.* (2016) na resposta imune de bicho-da-seda *Bombyx mori* quando desafiados com bactérias gram-negativas e gram-positivas. Da mesma forma que é mostrada a função imunorelevantes pelos autores, em *B. straminea* R3 a Ferritina pode estar intimamente ligada a resposta ao *Schistosoma*.

Um interessante achado em nossos resultados foi à presença do *spot* 14884 relacionado à proteína *Immunogenic miracidial antigen 8I*. Essa proteína foi construída por Scallon *et al.* (1989) buscando novos antígenos de *Schistosoma japonicum*. O achado dessa proteína do parasita no interior da espécie resistente nos remete a ideia da competência do sistema imune mesmo após a entrada do miracídio no interior do caramujo.

Observamos que os resultados deste estudo mostram um quadro pioneiro no perfil proteico da espécie *B. straminea*, e que abre portas para diversos outros trabalhos que vão complementar os resultados aqui obtidos.

9 CONCLUSÃO

A exposição dos caramujos *Biomphalaria spp* ao *Schistosoma mansoni* sugere que a resposta imunológica contra esse parasita é dinâmica.

Em *B. glabrata* a resposta se mostra pouco eficiente em relação à expressão de proteínas quando expostos ao Schistosoma.

A espécie susceptível e resistente (*B. straminea* e *B. straminea* R3) ao *S. mansoni* apresentam indícios de melhor competência na resposta imunológica, produzindo um arsenal mais complexo de proteínas no momento 24hrs pós-exposição ao *S. mansoni*.

A presença de proteínas celulares e de fatores presentes no plasma confirma à existência da interação entre resposta celular e humoral em *B. glabrata* e linhagens de *B. straminea*.

Proteínas de regulação de Cálcio são comumente encontradas nas espécies expostas ao parasita pois existe uma forte ligação da homeostase do Cálcio e o processo de adesão celular. Indicando a dinâmica hemocitária durante as fases de defesa contra o parasita.

As proteínas relacionadas ao estresse oxidativo (HSPs) encontradas na linhagem resistente desafiada com *S. mansoni* mostram sua participação não só em adversidades abióticas como também na resposta contra possíveis patógenos.

Concluimos que ainda é necessária uma intensificação nos estudos, principalmente ligados a outras espécies hospedeiras que possuem ligação comprovada com a manutenção do ciclo do parasita.

REFERÊNCIAS

- ADEMA, C. M. *et al.* A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate after infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 94, n. 16, p. 8691-8696, 1997.
- AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, London, v. 422, n. 6928, p. 198-207, 2003.
- BAILEY, M.; CHRISTOFORIDOU, Z.; LEWIS, M. Autoimmunity Reviews Evolution of immune systems: Specificity and autoreactivity. **Autoimmunity Reviews**, Amsterdam, v. 12, p. 643–647, 2013.
- BANTSCHEFF, Marcus *et al.* Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. **Analytical and bioanalytical chemistry**, Heidelberg, v. 389, n. 4, p. 1017-1031, 2007.
- BARBOSA, C. S. *et al.* The endemisation of schistosomiasis in Porto de Galinhas, Pernambuco, Brazil, 10 years after the first epidemic outbreak. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n. 7, p. 878-883, 2011.
- BARBOSA, F. S. *et al.* Dynamics of snail populations of *Biomphalaria glabrata* and *B. straminea* under semi-natural conditions. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 2, p. 157-167, 1992.
- BARBOSA, L. **Cultivo primário do órgão hematopoiético de moluscos do gênero *Biomphalaria*: caracterização morfológica e funcional**. 104 f. Tese (Doutorado) - Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
- BAYNE, C. J. Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates. **BioScience**, Washington, v. 40, n. p. 723-731, 1990.
- BAYNE, C. J.; BUCKLEY, P. M.; DEWAN, P. C., Macrophagelike hemocytes of resistant *Biomphalaria glabrata* are cytotoxic for sporocysts of *Schistosoma mansoni* *in vitro*. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 66 n. 3 p. 413-419, 1980a.
- BAYNE, C. J.; BUCKLEY, P. M.; DEWAN, P. C., *Schistosoma mansoni*: Cytotoxicity of hemocytes from susceptible snail hosts for sporocysts in plasma from resistant *Biomphalaria glabrata*. **Experimental Parasitology**, New York, v. 50 p. 409-416, 1980b.
- BECK, G. *et al.* Invertebrate cytokines III: Invertebrate interleukin-1-like molecules stimulate phagocytosis by tunicate and echinoderm cells. **Cellular Immunology**, New York, v. 146, p. 284-299, 1993.
- BOERSEMA, P. J.; KAHRAMAN, A.; PICOTTI, P. Proteomics beyond large-scale protein expression analysis. **Current opinion in biotechnology**, London, v. 34, p. 162-170, 2015.
- BOUCHUT, A. *et al.* Compatibility in the *Biomphalaria glabrata*/*Echinostoma caproni* model: Potential involvement of proteins from hemocytes revealed by a proteomic approach. **Acta tropica**, Basel, v. 98, n. 3, p. 234-246, 2006.

BOYER, O. O. M. O. Characterization of immunoreactive TNF α molecules in the gastropod *Biomphalaria glabrata*. **Developmental & Comparative Immunology**, Elmsford, v. 18, n. 3, p. 211-218, 1994.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde. 2007. 180 p.

BURKE, R. D.; WATKINS, R. F., Stimulation of starfish coelomocytes by interleukin-1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 180: p. 579-584, 1991.

CARVALHO, P. C. *et al.* *PatternLab* for proteomics: a tool for differential shotgun proteomics. **BMC Bioinformatics**, London, v. 9, n. 1, p. 316, 2008.

CERENIUS, L.; SÖDERHÄLL, K. Variable immune molecules in invertebrates. **The Journal of experimental biology**, London, v. 216, n. 23, p. 4313-4319, 2013.

CHENGLONG, J.I, *et al.* Responses of *Mytilus galloprovincialis* to bacterial challenges by metabolomics and proteomics. **Fish & shellfish immunology**, London, v. 35, n. 2, p. 489-498, 2013.

DE ZOYSA, M. *et al.* Mitochondrial thioredoxin-2 from disk abalone (*Haliotis discus discus*): molecular characterization, tissue expression and DNA protection activity of its recombinant protein. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 149, n. 4, p. 630-639, 2008.

DREISEWERD, K. Recent methodological advances in MALDI mass spectrometry. **Analytical and bioanalytical chemistry**, Heidelberg, v. 406, n. 9-10, p. 2261-2278, 2014.

FERNANDEZ, M. A.; PIERI, O. S. Infection by *Schistosoma mansoni* Sambon 1907 in the first four months of life of *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, p. 185-192, 2001.

FERNANDEZ, M. A.; THIENGO, S. C. Susceptibility of *Biomphalaria amazonica* and *Biomphalaria occidentalis* from Manso Dam, Mato Grosso, Brazil to infection with three strains of *Schistosoma mansoni*. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.101, supl. 1, p. 235-237, 2006

GALINIER, R. *et al.* *Biomphalysin*, a new β pore-forming toxin involved in *Biomphalaria glabrata* immune defense against *Schistosoma mansoni*. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 9, n. 3, p. e1003216, 2013.

GARRIDO, C. *et al.* The small heat shock proteins family: the long forgotten chaperones. **The international journal of biochemistry & cell biology**, Oxford, v. 44, n. 10, p. 1588-1592, 2012.

GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, Weinheim, v. 4, n. 12, p. 3665-3685, 2004.

GRANATH JR., W. O.; CONNORS, V. A.; TARLETON, R. L., Interleukin-1 activity in hemolymph from strains of the snail *Biomphalaria glabrata* varying in susceptibility to the

human blood fluke, *Schistosoma mansoni*: Presence, differential expression, and biological function. **Cytokine**, San Diego, v. 6: p. 21-27, 1994.

GRANATH Jr., W. O.; YOSHINO, T. P., *Schistosoma mansoni* passive transfer of resistance by serum in the vector snail *Biomphalaria glabrata*. **Experimental Parasitology**, New York, v. 58: p. 188-193, 1984.

GRIMES, J. E. *et al.* The role of water, sanitation, and hygiene in reducing schistosomiasis: a review. **Parasite & Vectors**, London, v. 8, p. 766, 2015.

GRYSEELS, B. *et al.* Human schistosomiasis. **Lancet**, London, v. 368, n. 9541, p. 1106-1118, 2006.

GUIMARÃES, R. J. P. S. *et al.* Spatial distribution of *Biomphalaria* mollusks at São Francisco River Basin, Minas Gerais, Brazil, using geostatistical procedures. **Acta tropica**, Basel, v. 109, n. 3, p. 181-186, 2009.

HOWE, K. *et al.* The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, London, v. 496, n. 7446, p. 498-503, 2013

HUGHES, T. K. *et al.*; LPS stimulated invertebrate hemocytes: A role for immunoreactive TNF and IL-1. **Developmental & Comparative Immunology**, Elmsford, v. 15: p. 117-122, 1991.

HUMPHRIES, J. E.; YOSHINO, T. P. *Schistosoma mansoni* excretory–secretory products stimulate a p38 signalling pathway in *Biomphalaria glabrata* embryonic cells. **International journal for parasitology**, New York, v. 36, n. 1, p. 37-46, 2006

LADRAT, C. *et al.* In vitro proteolysis of myofibrillar and sarcoplasmic proteins of white muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): effects of cathepsins B, D and L. **Food Chemistry**, Barking, v. 81, n. 4, p. 517-525, 2003.

LARSON, M. K.; BENDER, R. C.; BAYNE, C. J. Resistance of biomphalaria glabrata 13-16-R1 snails to *Schistosoma mansoni* PR1 is a function of haemocyte abundance and constitutive levels of specific transcripts in haemocytes. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 44, n. 6, p. 343–353, 2014.

LI, J. *et al.* Co-expression of heat shock protein (HSP) 40 and HSP70 in *Pinctada martensii* response to thermal, low salinity and bacterial challenges. **Fish & shellfish immunology**, London, v. 48, p. 239-243, 2016.

LINK, A. J. (Ed.). **2-D proteome analysis protocols**. Totowa, NJ: Humana Press, 1999.

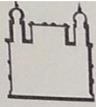
LIU, X.; XU, N.; ZHANG, S. Calreticulin is a microbial-binding molecule with phagocytosis-enhancing capacity. **Fish & shellfish immunology**, London, v. 35, n. 3, p. 776-784, 2013.

LOKER, E. S., YUI, M. A., BAYNE, C. J. *Schistosoma mansoni*: Agglutination of sporocysts, and formation of gels on miracidia transforming in plasma of *Biomphalaria glabrata*. **Experimental Parasitology**, New York, v. 58, n. p. 56-62, 1984

- LOPEZ, A. F. *et al.* Recombinant human interleukin 5 is a selective activator of human eosinophil function. **The Journal of experimental medicine**, Tokyo, v. 167, n. 1, p. 219-224, 1988.
- MITTA, G. *et al.* Compatibility polymorphism in snail/schistosome interactions: From field to theory to molecular mechanisms. **Developmental & Comparative Immunology**, Elmsford, v. 37, n. 1, p. 1-8, 2012.
- NASCIMENTO, G. L. **Formas graves da esquistossomose mansoni: carga epidemiológica e custos no Brasil em 2010**. 73f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília. 2013.
- NEGRÃO-CORRÊA, D. *et al.* Interaction of *Schistosoma mansoni* Sporocysts and Hemocytes of Biomphalaria. **Journal of Parasitology Research**, Berlin, v. 2012, 2012.
- O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 250, n. 10, p. 4007-4021, 1975.
- OLIVEIRA, I. H. R. **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)**. 73p. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Schistosomiasis: population requiring preventive chemotherapy and number of people treated in 2010. **Weekly epidemiological record**, Geneve, n. 4, p. 37-44, 2012.
- OTHO, S. A. *et al.* Silkworm ferritin 1 heavy chain homolog is involved in defense against bacterial infection through regulation of haemolymph iron homeostasis. **Developmental & Comparative Immunology**, Elmsford, v. 55, p. 152-158, 2016.
- OTTAVIANI, E. Immunorecognition in the gastropod molluscs with particular reference to the freshwater snail *Planorbis corneus* (L.) (Gastropoda, Pulmonata). **Italian Journal of Zoology**, Roma, v. 59, n. p. 129-139, 1992.
- RAFTOS, D. A. *et al.* Invertebrate cytokines: Tunicate cell proliferation stimulated by an interleukin-1-like molecule. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 88: p. 9518-9522, 1991.
- REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 379 p.
- RICHARDS, C. S.; RENWRANTZ, L. R. 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. **Journal of Comparative Physiology**, Berlin, v. 161, n. 43, 1991.
- RIIHIMÄKI, M. *et al.* Clinical alterations and mRNA levels of IL-4 and IL-5 in bronchoalveolar cells of horses with transient pulmonary eosinophilia. **Research in veterinary science**, London, v. 85, n. 1, p. 52-55, 2008.

- ROLLINSON, D. *et al.* Time to set the agenda for schistosomiasis elimination. **Acta tropica**, Basel, v. 128, n. 2, p. 423-440, 2013.
- SANTOS, D. V. V. *et al.* Hemocyte production in *Biomphalaria glabrata* snails after exposure to different *Schistosoma mansoni* infection protocols. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Ananindeua, v. 2, n. 2, p. 33-38, 2011.
- SCALLON, B. J.; BOGITSH, B. J.; CARTER, C. E. Characterization of a large gene family in *Schistosoma japonicum* that encodes an immunogenic miracidial antigen. **Molecular and biochemical parasitology**, Amsterdam, v. 33, n. 2, p. 105-112, 1989.
- SCHOLTE, R. G. C. *et al.* Spatial distribution of *Biomphalaria* spp., the intermediate host snails of *Schistosoma mansoni*, in Brazil. **Geospatial Health**, Napoli, v. 6, n. 3, p. S95-S101, 2012.
- SUN, J. C.; UGOLINI, S.; VIVIER, E. Immunological memory within the innate immune system. **The EMBO journal**, Oxford, v. 33, n. 12, p. 1295–303, 2014.
- TUNHOLI, V. M. *et al.* Biochemical profile of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda) after infection by *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). **Parasitology research**, Berlin, v. 109, n. 3, p. 885-891, 2011.
- VENUGOPAL, A.; KUMAR, N. S. Biochemical characterization of cathepsin D from the mussel *Lamellidens corrianus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 169, p. 25-30, 2014
- VERGOTE, D. *et al.* Characterization of proteins differentially present in the plasma of *Biomphalaria glabrata* susceptible or resistant to *Echinostoma caproni*. **International journal for parasitology**, New York, v. 35, n. 2, p. 215-224, 2005.
- W.U, H. *et al.* Proteomic and metabolomic responses in hepatopancreas of *Mytilus galloprovincialis* challenged by *Micrococcus luteus* and *Vibrio anguillarum*. **Journal of proteomics**, Weinheim, v. 94, p. 54-67, 2013.
- YANG, C. *et al.* A new fibrinogen-related protein from *Argopecten irradians* (AiFREP-2) with broad recognition spectrum and bacteria agglutination activity. **Fish & shellfish immunology**, London, v. 38, n. 1, p. 221-229, 2014.
- YATES III, J. R. Mass spectrometry: from genomics to proteomics. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 16, n. 1, p. 5-8, 2000.
- ZHANG, A. *et al.* A small heat shock protein (sHSP) from *Sinonovacula constricta* against heavy metals stresses. **Fish & shellfish immunology**, London, v. 34, n. 6, p. 1605-1610, 2013
- ZHANG, G. *et al.* The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. **Nature**, London, v. 490, n. 7418, p. 49-54, 2012
- ZHANG, Y. *et al.* Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. **Chemical reviews**, Washington, v. 113, n. 4, p. 2343-2394, 2013.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Uso de Animais



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificado de Aprovação

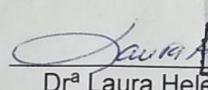
Certificamos que o projeto intitulado: **Estudo comparativo da expressão de genes de adesão celular entre as espécies *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. occidentalis*, frente à infecção por *Schistosoma mansoni***, protocolado sob nº 58/2014 pelo (a) pesquisador (a) Luiz Carlos Alves.

Está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/CPqAM) em 15/09/2014. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até 17 de setembro de 2016.

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie	Nº de Animais
Camundongo heterogênico Swiss Webster	100

We certify that project entitled **Estudo comparativo da expressão de genes de adesão celular entre as espécies *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. occidentalis*, frente à infecção por *Schistosoma mansoni***. Protocol nº 58/2014, coordinated by Luiz Carlos Alves. Is according to the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian law 11.794/2008 and so was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz on September, 15, 2014. In present version this project is licensed and valid until September, 17, 2016.

Recife (PE, Brazil) September, 17, 2014.


 DRA. LAURA GIL
 Coordenadora da Comissão de
 Ética no Uso de Animais - CEUA
 Mail: SHAPE.01@fio-cruz.br
 E-mail: laura@cpqam.fiocruz.br
 Dra Laura Helena Vega Anjos Gil
 Coordenadora CEUA/CPqAM

Av. Professor Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária - Campus da UFPE
 Recife - PE - CEP: 50.670-420
 Telefone: (81) 2101-2500/2101-2600 Fax: (81) 3453-1911
 www.ccpam.fiocruz.br