

**Ministério da Saúde**  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
**Centro de Pesquisas René Rachou**  
**Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

Aspectos da interação parasito hospedeiro na infecção com *Schistosoma* sp.:  
imunidade inata em *Biomphalaria* sp. e oncogênese no hospedeiro vertebrado

**por**

**Rafael Nacif Pimenta**

**Belo Horizonte**

**2017**

**TESE DCS-CPqRR**

**R.N. PIMENTA**

**2017**

**Rafael Nacif Pimenta**

Aspectos da interação parasito hospedeiro na infecção com *Schistosoma* sp.:  
imunidade inata em *Biomphalaria* sp. e oncogênese no hospedeiro vertebrado

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências - área de concentração Biologia Celular e Molecular

Orientador: Dr. Paulo Marcos Zech Coelho

Belo Horizonte

2017

Catálogo-na-fonte  
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do IRR  
CRB/6 1975

P644a Pimenta, Rafael Nacif.  
2017

Aspecto da interação parasito hospedeiro na infecção com *Schistosoma* sp: imunidade inata em *Biomphalaria* sp. e oncogênese no hospedeiro vertebrado / Rafael Nacif Pimenta – Belo Horizonte, 2017.

VII; 83 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 66-83

Tese (Doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutora em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. *Schistosoma* 2. Interação 3. *Biomphalaria*. I. Título. II. Coelho, Paulo Marcos Zech (Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.963

## Agradecimentos

A minha esposa... de namorada à minha companheira, de colega de trabalho à esposa, nossa jornada está apenas começando. Estamos nos conhecendo e aprendendo um com o outro constantemente. Você não só ajudou esse trabalho se tornar realidade, você foi meu porto seguro e sempre continuará sendo a pessoa que mais admiro nesse mundo. Te amo.

Ao meu pai, pela incrível confiança, inabalavelmente incondicional, depositado em mim. Nenhum problema era grande suficiente que não dava para a gente atacar juntos. Desde criança, sempre me levantava quando caía e até hoje gosto de ouvir com atenção a sua sabedoria e orientação. Me sinto inspirado em seguir os seus passos, mas sabendo que foram com as minhas próprias pernas. Reconheço seus sacrifícios e obrigado por oferecer tantas oportunidades.

Ao meu orientador, Dr. Paulo Marcos, pela paciência e confiança depositada em mim durante todos esses anos. O senhor sempre abordou nossos encontros com calma e serenidade, me senti tranquilizado nos momentos difíceis e confiante de seguir em frente sabendo que podia contar com você. Foram grandes momentos de ensinamentos e várias horas de conversas, (relacionada ou não ao nosso trabalho) que me ajudaram a ser o pesquisador que sou hoje.

À minha mãe e irmã, sempre nos bastidores, me encorajando e iluminando meu caminho. Vocês foram um ouvido para escutar meus problemas e sempre estavam presentes com palavras de carinho e amor para me acolher.

Ao Dr. Gabriel Rinaldi, meu querido amigo que me deu uma grande oportunidade de ensinamento. Aprendi muito com você e através da ciência (e Beattles) ficamos amigos.

À Cecília, tolerando as placas intermináveis, finalmente conseguimos acabar... espero poder continuar fazendo parte da sua vida. Você e seu marido serão pais incríveis e me inspiro em vocês.

Ao pessoal do moluscário, em especial, Delza, Dílcia e Kleiton, pelos ensinamentos e pelas agradáveis horas de trabalho e convivência. Sem ajuda de vocês não seria capaz de completar esse trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Esquistossomose, obrigado pela amizade, espero poder continuar trabalhando e formando uma amizade ainda maior ao longo dos próximos anos.

À Jussara, sempre com um sorriso no rosto. Agradeço a extrema competência e agilidade com que você sempre me ajudou. Mesmo eu estando longe, você sempre fez questão de me incluir nas atividades sociais do laboratório. Obrigado por me fazer sentir parte do grupo.

Ao laboratório de Entomologia médica.

À Nágila, minha primeira orientadora, por sempre pensar em mim e me ajudar a traçar meu caminho profissional.

Aos Coordenadores e funcionários do Programa de Pós-Graduação, pela acessibilidade e presteza.

*If I have seen further it is by standing on the shoulders of Giants*

(Isaac Newton)

## Resumo

Atualmente existem cerca de 200 milhões de pessoas infectadas em 74 países com uma das cinco espécies de *Schistosoma* sp. A compatibilidade entre o parasito e o hospedeiro intermediário tem como componente fundamental o sistema de defesa interno do caramujo, fato este que determina a susceptibilidade ou a resistência à infecção. Este estudo avaliou a resposta do processo de infecção de *B. glabrata* “primados” (infectados por *S. mansoni* e curados por quimioterapia) e reinfectedos. Avaliou-se se a hemolinfa de caramujos primados atuam em caramujos normais após infecção, através da transferência da hemolinfa. Também analisou-se como linhagens de células epiteliais humanas do fígado e da ureta reagem a ovos de *S. mansoni* e *S. haematobium*. A resposta dos hemócitos e fatores solúveis de *B. glabrata* primados contra os esporocistos teve uma predominância de esporocistos em comparação com os exemplares controle (infectados uma vez). Quando a hemolinfa de *B. glabrata* primados foi transferida para caramujos normais, a quantidade de cercarias liberadas foi menor após 5 semanas comparando com o controle. Já na 6 semanas após a infecção, os caramujos que receberam a hemolinfa de *B. glabrata* tiveram o número de cercárias reduzido. Porém, o grupo de *B. glabrata* que recebeu hemolinfa primado continuou liberando menos cercárias. A resposta contra *S. mansoni* ocorreu de forma mais rápida quando se transferiu hemolinfa de *B. glabrata* primados, após re-infecção por *S. mansoni*. Nossos resultados mostram pela primeira vez uma imunidade parcial em *B. glabrata* completamente curados de uma infecção primária e infectados novamente. A outra parte do estudo mostra a indução de crescimento de ovos de *S. mansoni* e *S. haematobium* com linhagens de células humanas e a análise de expressão gênica após contato inicial (2h) e contato prolongado (24h) das células com os ovos. Observamos que ambas as espécies estimulam crescimento celular em linhagens de células epiteliais da ureta causando morte celular em linhagens de células de colangiócitos. Os ovos de *S. mansoni* induziram a via de sinalização do câncer colorretal no tempo de 2 h após interação com as células urotelias. No tempo de 24 h ambas as espécies causaram a inibição da via de supressor de tumor P53. Porém, os genes responsáveis por essa inibição variaram dependendo da espécie de *Schistosoma*. Nos colangiócitos foi observado a morte das células após a interação com os ovos. Os resultados mostram que a resposta proliferativa ou o declínio de crescimento é influenciado não somente pela espécie de *Schistosoma* mas também pela origem de células epiteliais.

**Palavras chaves:** *Schistosoma*, *Biomphalaria*, imunidade inata, oncogênese, vertebrado.

## Abstract

There are currently about 200 million people infected in 74 countries with one of five species of *Schistosoma* sp. The compatibility between the parasite and the intermediate host has as its fundamental component the internal defense system of the snail, a fact that determines the susceptibility or resistance to infection. This study evaluated the response of the infection process of "primed" *B. glabrata* (infected with *S. mansoni* and cured by chemotherapy) and reinfected. It was evaluated whether the hemolymph of primate snails act on normal snails after infection, by transferring hemolymph. We also analyzed how human epithelial cell lines from the liver and urethra react to *S. mansoni* and *S. haematobium* eggs. The response of hemocytes and soluble factors of *B. glabrata* against sporocysts had a predominance of sporocysts compared to control (infected only once). When the hemolymph of primed *B. glabrata* was transferred to normal snails, the amount of cercariae released was lower after 5 weeks compared to the control. As early as 6 weeks after infection, the snails that received the hemolymph of *B. glabrata* had a reduced number of cercariae. However, the group of *B. glabrata* that received hemolymph primate continued to release less cercariae. The response to *S. mansoni* occurred more rapidly when transferring hemolymph from primed *B. glabrata* after re-infection by *S. mansoni*. Our results show for the first time a partial immunity in *B. glabrata* completely cured from a primary infection and infected again. The other part of the study shows the induction of growth of *S. mansoni* and *S. haematobium* eggs with human cell lines and the analysis of gene expression after initial contact (2h) and prolonged contact (24h) of the cells with the eggs. We observed that both species stimulate cell growth in urethra epithelial cell lines causing cell death in the cell lines. *S. mansoni* eggs induced the colorectal cancer signaling pathway at 2 h after interaction with urothelial cells. At the time of 24 h both species caused inhibition of the P53 tumor suppressor pathway. However, the genes responsible for this inhibition varied depending on the species of *Schistosoma*. Cholangiocytes were observed to kill the cells after interaction with the eggs. The results show that the proliferative response or the growth decline is influenced not only by the *Schistosoma* species but also by the origin of epithelial cells.

**Key words:** *Schistosoma*, *Biomphalaria*, innate immunity, oncogenesis, vertebrate.



## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Distribuição do esquistossomose no mundo.....	9
<b>Figura 2:</b> Distribuição do hospedeiro intermediário <i>Biomphalaria</i> no mundo .....	11
<b>Figura 3:</b> Distribuição de <i>Bulinus truncatus</i> no mundo. ....	11
<b>Figura 4:</b> Mapa da distribuição do gênero <i>Biomphalaria</i> e sua associação com a esquistossomose. ....	12
<b>Figura 5:</b> Ciclo de vida do <i>Schistosoma</i> sp. ....	15
<b>Figura 6:</b> Histologia de caramujos 1 hora e 12 horas após infecção primária.. ....	27
<b>Figura 7:</b> Histologia de caramujos 12 horas após infecção primária e secundária.. ....	28
<b>Figura 8:</b> Histologia de caramujos de 24 horas até 30 dias em caramujos de infecção secundária. ....	29
<b>Figura 9:</b> Transferência de hemolinfa <i>B. glabrata</i> em diferentes condições de imunidades. ....	30
<b>Figura 10:</b> Ensaio de titulação celular para células uroteliais humanas HCV29.....	50
<b>Figura 11:</b> Proliferação de células uroteliais e colangiócitos em resposta a ovos de <i>Schistosoma</i> .....	52
<b>Figura 12:</b> Ovos de <i>Schistosoma</i> induziram a desregulação de oncogenes, supressores de tumores e genes relacionados com EMT em células HCV29. ....	52
<b>Figura 13:</b> Ovos de <i>Schistosoma</i> induziram a desregulação de genes relacionados à apoptose em células H69.. ....	54
<b>Figura 14:</b> Desregulação significativa de genes envolvidos na Via de Sinalização de Câncer Colorectal em células uroteliais .....	55
<b>Figura 15:</b> Desregulação significativa da via P53 em células uroteliais expostas aos ovos <i>S. Haematobium</i> ou <i>S. mansoni</i> no tempo de 24 horas.. ....	57
<b>Figura 16:</b> O receptor de estrógeno e beta-estradiol são previsto a serem inibidos em células uroteliais de HCV29 co-cultivadas com ovos de <i>S. haematobium</i> por 24 horas.....	59

## **Lista de tabelas**

**Tabela 1:** Genes diferencialmente expressos associados a Via de Sinalização do Câncer .....55

**Tabela 2:** Genes expressos diferencialmente associados a Via de Sinalização P53 .....57

## Lista de abreviaturas

- AIF - allograft inflammatory fator
- APO – amebocyte producing organ
- BgTEP - B. glabrata thioester-containing protein
- CCA – colangiocarcinoma
- CCE – Células escamosas da bexiga
- DALY's - Disability Adjusted Light Years
- EGF - esquistossomose genital feminina
- FREPs - fibrinogen related proteins
- GDE – Genes diferencialmente expressos
- GDE – genes diferencialmente expressos
- H69 – linhagem de células humanas derivadas de colangiócitos
- HCV-29 – linhagem de células humanas da uretra
- kg – kilograma
- LTP - larval transformation products
- mg – miligrama
- MIF - macrophage migration inhibitory
- OXA – Oxamniquina
- PZQ – Praziquantel
- Sh – *Schistosoma haematobium*
- SID – Sistema Interno de Defesa
- Sm – *Schistosoma mansoni*
- ul – microlitro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>8</b>
<b>1.1 Hospedeiro invertebrado .....</b>	<b>10</b>
1.1.1 <i>Schistosoma mansoni</i> x hospedeiro intermediários (no Brasil).....	12
1.1.2 <i>Schistosoma haematobium</i> x hospedeiros intermediários .....	13
<b>1.2 Ciclo de vida da esquistossomose .....</b>	<b>14</b>
<b>CAPÍTULO 1: “AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA ADQUIRIDA EM <i>BIOMPHALARIA GLABRATA</i> PREVIAMENTE INFECTADA POR <i>SCHISTOSOMA MANSONI</i>, E CURADAS POR ASSOCIAÇÃO DE PRAZIQUANTEL (PZQ) E OXAMNIQUINA (OXA).” .....</b>	<b>17</b>
<b>1. INTRODUÇÃO: .....</b>	<b>17</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>21</b>
<b>3. OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>22</b>
<b>3.1 Objetivos específicos.....</b>	<b>22</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>

<b>4.1 Caramujos utilizados.....</b>	<b>23</b>
<b>4.2 Obtenção dos miracídios.....</b>	<b>23</b>
<b>4.3 Infecção de Caramujos.....</b>	<b>23</b>
<b>4.4 Verificação de caramujos infectados .....</b>	<b>23</b>
<b>4.5 Tratamento dos caramujos infectados.....</b>	<b>24</b>
<b>4.6 Verificação de caramujos curados .....</b>	<b>24</b>
<b>4.7 Re-infecção de caramujos curados.....</b>	<b>24</b>
<b>4.8 Análise histopatológica dos caramujos .....</b>	<b>25</b>
<b>4.9 Transferência de hemolinfa .....</b>	<b>25</b>
<b>4.10 Gráficos de transferência de hemolinfa.....</b>	<b>26</b>
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>27</b>
<b>5.1 ANÁLISES HISTOLÓGICAS .....</b>	<b>27</b>
5.1.1 Exame histológico de <i>B. glabrata</i> após interação com <i>s. mansoni</i> (infecção primária) 1 hora após infecção .....	27
5.1.2 Exame histológico de <i>B. glabrata</i> 12 horas após a re-infecção (infecção secundária) com <i>S. mansoni</i> .....	27
5.1.3 Exame histológico dos fenótipos de <i>B. glabrata</i> 24 horas, 15 e 30 dias após a re-infecção (infecção secundária) com <i>S. mansoni</i> .....	28
<b>5.2 Transferência de hemolinfa de <i>B. glabrata</i> em diferentes condições e subsequente infecção em caramujos receptores. ....</b>	<b>29</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>31</b>
<b>7- CONCLUSÃO .....</b>	<b>35</b>
<b>8 PERSPECTIVAS PARA FUTURO EXPERIMENTOS .....</b>	<b>36</b>

<b>CAPÍTULO 2: “AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DIFERENCIADA DE LINHAGENS DE CÉLULAS EPITELIAIS DO TRATO BILIAR E DA BEXIGA FRENTE A INTERAÇÃO COM OVOS DE <i>SCHISTOSOMA HAEMATOBIMUM</i> E <i>SCHISTOSOMA MANSONI</i>” .....</b>	<b>37</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>37</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
2.1 Declaração de ética animal e infecção dos camundongos.....	43
2.2 Obtenção dos ovos de <i>S. haematobium</i> e <i>S. mansoni</i> de fígados de hamsters e camundongos.....	43
2.3 Manutenção e plaqueamentos das linhagem de células h69 e hcv29.....	44
2.4 Experimentos de co-cultura de H69 e HCV29 com ovos de <i>S. haematobium</i> e <i>S. mansoni</i> .....	45
2.5 Avaliação em tempo real da proliferação celular pelo sistema Xcelligence .....	45
2.6. Análise dos “arrays” dos genes .....	46
2.6.1 Extração de rna de células de H69 e HCV9. ....	46
2.6.2 Síntese de cdna de célulasH69 e HCV29. ....	47
2.7 Análise dos genes das vias gênicas .....	48
<b>2.8 Análise estatística.....</b>	<b>49</b>
<b>3. RESULTADOS:.....</b>	<b>50</b>

<b>3.1 Os ovos de <i>Schistosoma</i> promoveram o crescimento das células uroteliais, mas inibiram crescimento de colangiócitos.....</b>	<b>50</b>
<b>3.2. A desregulação gênica foi dependente da espécie de <i>Schistosoma</i> e do tempo de contato dos ovos .....</b>	<b>52</b>
<b>3.3 Os genes envolvidos no Via de Sinalização da Metástase do Câncer Colorectal foram afetados por ovos de <i>S. mansoni</i> em células uroteliais humanas.....</b>	<b>54</b>
<b>3.4 A via associada ao supressor tumoral P53 foi desregulado negativamente tanto por ovos <i>S. mansoni</i> quanto por de <i>S. haematobium</i> .....</b>	<b>56</b>
<b>3.5 Receptor de estrógeno e beta-estradiol é desregulado por ovos de <i>Schistosoma</i> .....</b>	<b>58</b>
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>60</b>
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>65</b>
<b>6 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>66</b>

## **1 Introdução**

Atualmente existem cerca de 200 milhões de pessoas infectadas em 74 países com uma das cinco espécies de *Schistosoma sp.* (WHO, 2016; King, 2010; King et al., 2005). Conforme a Organização Mundial de Saúde, a esquistossomose é considerada uma das doenças mais negligenciadas em países em desenvolvimento perdendo somente para a malária em termos de morbidade e impacto socioeconômico (Sarvel et al., 2016).

Apesar de ser uma doença que causa baixa mortalidade, a alta morbidade da esquistossomose causa diversos problemas, tanto físicos como socioeconômicos nos indivíduos infectados (Mbabazi et. Al., 2011). O número de anos de vida perdidos (DALY'S, Disability Adjusted Light Years), devido à esquistossomose pode ser estimado em 1,53 milhões/ DALY's anualmente (Steinmann et al., 2006) e de acordo com algumas estimativas recentes pode chegar até a 70 milhões/ DALY's milhões (Botelho et al., 2015).

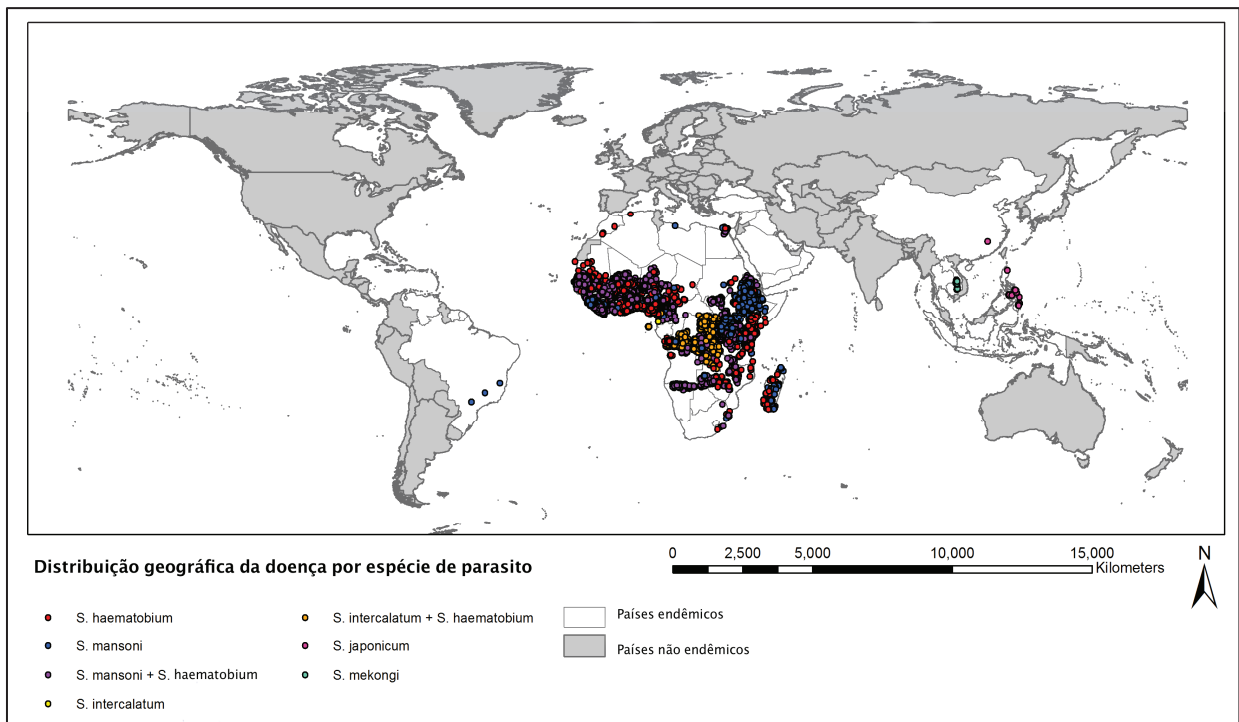
Além disso, não existem vacinas contra esquistossomose e o tratamento atualmente conta somente com uma única droga, o praziquantel (Doenhoff et al., 2009; Cioli et al., 2014). O tratamento com essa droga não previne a re-infecção (Tebeje et al., 2016; Ridi & Talima, 2014) e parasitos resistentes podem ser facilmente obtidos em laboratório (Fallon & Doenhoff, 1994). Melman e colaboradores (2009) já demonstraram que existe um aumento de parasitos que eram inicialmente susceptíveis tornando-se resistentes ao praziquantel, no Kênia.

Em áreas endêmicas a maioria dos indivíduos se infectam na infância e mesmo tratados se re-infectam ao longo da vida, devido à constante exposição de cercárias presentes em águas contaminadas (Rosin et. al., 1994). Os problemas que essa doença causa podem durar décadas. As crianças podem vir a sofrer de anemia atrapalhando o desenvolvimento intelectual e nos adultos diminuem a capacidade de trabalho, o que resulta em perdas socioeconômicas substanciais (van der Werf et al, 2003; Hotez et al 2009).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, em 2013, pelo menos 261 milhões de pessoas foram submetidas a tratamentos preventivos contra esquistossomose e mais de 40 milhões de pessoas foram tratadas contra as sequelas da doença (WHO, 2015). Acredita-se que atualmente menos de 10% da população parasitada recebe algum tipo de tratamento contra infecções para esquistossomose como de helmintos de infecções intestinais (Hotez & Fenwick, 2009).



A esquistossomose é causada por vermes trematódeos digenéticos, do gênero *Schistosoma*. Dentro desse gênero, existem três principais espécies que são capazes de infectar o homem: o *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907), encontrado principalmente na América do Sul, África e Caribe (Paraense, 1981) (Figura 1); o *S. haematobium* (Bilharz, 1852) com ampla distribuição na África e Oriente Médio (Figura 1) e o *S. japonicum* (Karsurada, 1904) encontrado na Indonésia, China e Sudeste Asiático (Figura 1). Existem outras duas espécies encontradas na África, as quais são consideradas de menor importância em saúde pública. O *S. mekongi* (Voge, Buckner & Bruce 1978) encontrado no Camboja e no Laos (Attwood et al 2008) e o *S. intercalatum* (Fisher, 1934) com distribuição no oeste e centro da África. Das cinco espécies que podem infectar frequentemente o homem, o *S. haematobium* é o único que desenvolve a forma urogenital da doença, sendo as demais espécies responsáveis pela forma intestinal (Kuper, 2000). É possível ainda encontrar outras espécies de *Schistosoma* que infectam aves e outros mamíferos e que em humanos podem vir a causar alguns tipos de dermatites (CDC, 2015).



**Figura 1: Distribuição do esquistossomose no mundo.** (adaptado. Disponível em [www.thiswormyworld.org/maps/distribution-of-soil-transmitted-helminth-survey-data-in-brazil](http://www.thiswormyworld.org/maps/distribution-of-soil-transmitted-helminth-survey-data-in-brazil)).

A patogenicidade da esquistossomose decorre da reação imunológica aos ovos que se encontram alojados principalmente no fígado e outros órgãos causando granulomas. Os antígenos liberados pelos ovos estimulam uma reação granulamentosa das células T, macrófagos e eosinófilos (Abd El-Aal et al., 2015). Dependendo da espécie de *Schistosoma* e

consequentemente da localização final desses ovos, uma pessoa infectada pode ter esquistossomose intestinal ou urogenital. No caso da esquistossomose intestinal os sintomas podem ser, dor abdominal, diarreia e sangue nas fezes. Em casos avançados pode ocorrer o aumento do fígado associado com acúmulo de líquido na cavidade peritoneal e hipertensão dos vasos sanguíneos, onde também pode ocorrer aumento do baço e varizes esofagianas e intestinais. Já na esquistossomose urogenital, causada pela infecção por *S. haematobium*, observa-se sintomas como hematúria (sangue na urina), fibrose da bexiga e do ureter e em casos avançados, pode ocorrer dano no fígado e também câncer de bexiga (Brindley & Hoetz, 2013; Botelho et al., 2009). A longo prazo, pode ocorrer infertilidade em homens e mulheres infectados com *S. haematobium* (Kjetland et al., 2005; WHO, 2015).

A interação co-evolucionária entre caramujos e *Schistosoma* sp. existe há mais de 200 milhões de anos (Blair et al., 2001). Entender os mecanismos de interação entre o hospedeiro invertebrado e o parasito pode trazer novos mecanismos para interromper a transmissão dessa doença.

### 1.1 Hospedeiro invertebrado

A ampla distribuição da esquistossomose está diretamente relacionada com a distribuição do seu hospedeiro invertebrado, que no caso da esquistossomose intestinal, são caramujos pulmonados de água doce do gênero *Biomphalaria*. A região neotropical do globo concentra cerca de 70% das espécies de *Biomphalaria* sp. existentes no mundo. Os outros 30% restantes são encontrados principalmente na África (Tuan et al., 2012) (Figura 2). Em relação à esquistossomose urogenital, o principal hospedeiro invertebrado é o caramujo *Bulinus truncatus* com distribuição na África e partes do Oriente Médio (Watson, 1958) (Figura 3).



Figura 2: Distribuição do hospedeiro intermediário *Biomphalaria* no mundo. (Fonte: Palasio,R.G.S., 2011).



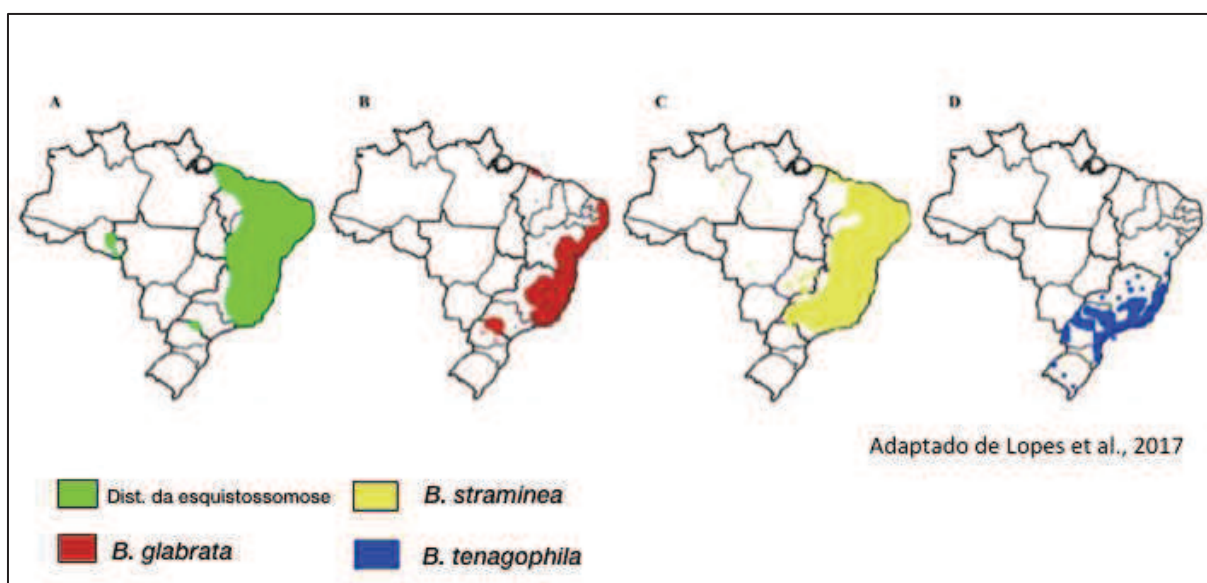
Figura 3: Distribuição de *Bulinus truncatus* no mundo. (Fonte: IUCN List Of Threatened Species).

Existem muitas diferenças entre as duas principais espécies de hospedeiros invertebrados, *B. glabrata* (hospedeiro intermediário de *S. mansoni*) e *B. truncatus* (hospedeiro intermediário de *S. haematobium*). A distinção mais óbvia é que o primeiro somente é encontrado no Brasil e o outro está restrito principalmente ao continente africano (Palasio, 2011). Outras diferenças existem, tal como o número de embriões por desovas que é diferente entre as duas espécies, sendo menor em *B. truncatus* ( $\pm 20$ ) quando comparado com

*B. glabrata* ( $\pm 30$ ). Além disso, o tempo necessário para *B. truncatus* atingir o tamanho adulto é menor quando comparado com *B. glabrata* (Liang et al., 1987) e finalmente, a quantidade de cercárias liberadas por *B. truncatus* (300-500) também é menor quando comparada com *B. glabrata* (2000-4000) (Tucker et al., 2013).

### **1.1.1 Schistosoma mansoni x hospedeiro intermediários (no Brasil)**

Das 26 espécies de *Biomphalaria* encontradas na América do Sul, 11 estão no Brasil e 3 destas espécies são de importância epidemiológica sendo elas *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* (figura 4). Em ecossistemas naturais é possível encontrar esses hospedeiros com porcentagens de infecção natural diferentes, em *B. straminea* com até 4% e atingir até 52% em *B. glabrata* (Callisto et al 2005). Entretanto é interessante ressaltar que *B. straminea* já foi encontrada infectada com *S. mansoni* com uma taxa de infecção de 28% no município de Jaboticatubas em Minas Gerais (Massara et al., 2002). Independentemente do modelo estudado, existe uma forte correlação entre a abundância do hospedeiro invertebrado de uma determinada área com a taxa global de infecção (Favre et al., 2002).



**Figura 4:** Mapa da distribuição do gênero *Biomphalaria* e sua associação com a esquistossomose. (Adaptado de Lopes et al., 2017)

No Brasil, o *B. glabrata* é o hospedeiro invertebrado de maior importância devido à sua ampla distribuição e altos índices de infecção. Esse hospedeiro pode ser encontrado em muitas bacias de água doce do país. Neste hospedeiro, o desenvolvimento do *S. mansoni* ocorre de uma forma mais eficiente do que nas outras espécies hospedeiras (Lutz, 1999; Paraense e Correa, 1963).

Na região sudeste e sul do Brasil, a *B. tenagophila* é o principal hospedeiro do *S. mansoni* (Simões et al., 2013). Esses caramujos são considerados um complexo de espécies que incluem a subespécie *B. tenagophila guaibensis* (Paraense, 1984) e a espécie *B. occidentalis* (Paraense, 1981; Tuan et al 2012). Em alguns locais existe alta prevalência de *B. tenagophila*, mas sempre com menores índices de infecção quando comparados com *B. glabrata* (Carvalho, 1992).

Com relação à *Biomphalaria straminea*, é encontrada na natureza com menores taxas de infecção quando comparado com *B. glabrata* e *B. tenagophila* (Carvalho, 1992). Caramujos da espécie *B. straminea* são considerados hospedeiros intermediário com a melhor capacidade de adaptação ao meio ambiente (fatores climáticos) e podem ser encontrados em quase todas as bacias de água doce do Brasil (Paraense, 1986); porém, é no Nordeste que esse hospedeiro é considerado um transmissor importante de *S. mansoni*, sendo que no Ceará é a única espécie transmissora do parasito (Paraense & Correa 1987).

### **1.1.2 Schistosoma haematobium x hospedeiros intermediários**

Das 207 milhões de pessoas estimadas de estarem infectadas com algum tipo de esquistossomose no mundo, 85% estão localizadas na África sendo mais da metade destas, infectadas por *S. haematobium* (WHO, 2017). A distribuição dessa espécie é limitada pela distribuição dos seus hospedeiros intermediários (Agatsuma, 2003) que são caramujos do gênero *Bulinus* (Muller, 1781). No total existem 37 espécies pertencentes a esse gênero, (Brown, 1994) porém somente algumas espécies (*Bulinus africanus*, *Bulinus forskalii*, *B. globosus*, *Bulinus reticulatus*, *B. nasutus*, *B. senegalensis* e *Bulinus truncatus*) estão envolvidos na transmissão do *S. haematobium* (Salawu & Odiabo, 2012).

Como citado anteriormente, *Bulinus truncatus* (Audouin, 1827) é o principal hospedeiro intermediário de *S. haematobium*. Esse caramujo ocorre principalmente na África, onde está concentrado no Sul do Egito, Sudão, Mauritania, África do Norte e todas as regiões do Oeste até o Leste da África (Rollinson et al., 2001). O país mais ao norte onde é possível encontrar esse caramujo é Portugal, Itália (Sardenha) e França (Córsega) A transmissão já foi descrita na região mediterrânea e no sudoeste asiático, onde foi encontrado na Arábia Saudita e Iêmen (Van Damme et al., 2012).

Existem outras espécies do gênero *Bulinus* que já foram descritas infectadas com *S. haematobium*, e portanto, possuem importância como hospedeiros intermediários (Vercruysse et al., 1994; Rollinson et al., 1997). Existe uma adaptação entre as cepas de *S. haematobium* e os seus hospedeiros intermediários locais, pois nos focos onde se encontra uma cepa de *S.*

*haematobium* infectando *Bulinus globosus*, essa mesma cepa não é compatível com *B. senegalensis* (Southgate *et al.*, 2000).

De uma forma geral, é difícil determinar “a priori” qual a espécie de hospedeiro intermediário ou linhagem geográfica que melhor se adapta ao seu parasito. O papel de cada espécie varia de acordo com os países em que se encontram. Por exemplo, em Camarões, o *B. truncatus* é mais importante na transmissão de *S. haematobium* do que *B. globosus* (Njiokou *et al* 2004) enquanto no Senegal, os principais vetores de *S. haematobium* são: *B. globosus*, *B. senegalensis* and *B. umbilicatus* (Sène, Southgate & Vercruyse, 2003).

## 1.2 Ciclo de vida da esquistossomose

O ciclo de vida do parasito (figura 5) ocorre quando os ovos do parasita são eliminados pelas fezes ou pela urina, dependendo se o hospedeiro vertebrado se encontra infectado com *S. mansoni* ou *S. haematobium*, respectivamente. Os miracídios presentes dentro dos ovos, eclodem quando são estimulados por alguns fatores, tais como a presença de iluminação, temperatura e contato com a água. Esses parasitos são ciliados e com movimentação ativa. Nessa fase, o miracídio tem um período de tempo curto para encontrar e penetrar nos seus hospedeiros intermediários. Uma vez dentro do tecido dos caramujos, os miracídios perdem seus cílios e ocorre degeneração gradativa do terebratorium, a parte anterior do miracídio. Com estas mudanças morfológicas, o parasito torna-se imóvel e passa a ser chamado de esporocisto primário. Duas semanas após a infecção, o esporocisto primário migra para o hepatopâncreas (glândula digestiva) e para os ovotestis (glândula reprodutiva) passando a ser chamado de esporocisto secundário. Esses esporocistos secundários contêm as células germinativas, que darão início a formação das cercárias dentro do caramujo. A eliminação de cercárias em *S. mansoni*, ocorre mais ou menos 30 dias após a penetração do miracídio. Uma vez na água, as cercárias são capazes de penetrar na pele e mucosa de algumas ordens de mamíferos. (Carvalho *et al.*, 1992)

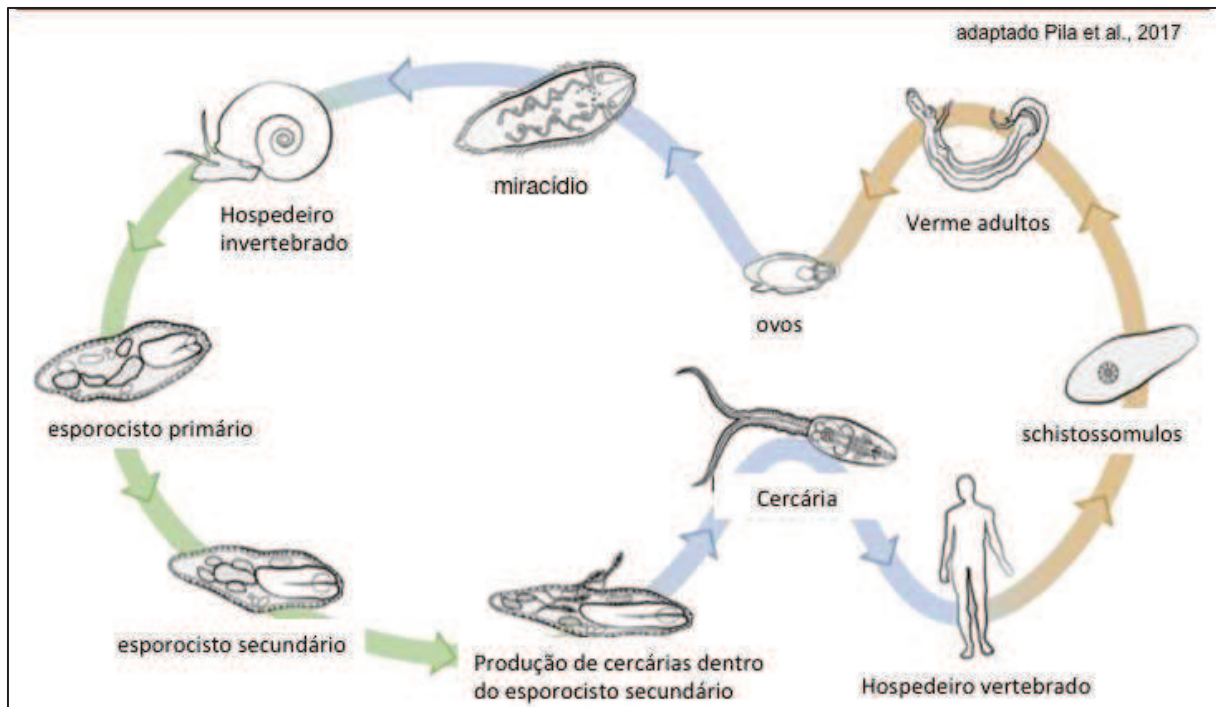


Figura 5: Ciclo de vida do *Schistosoma* sp. (Adaptado de Pila et al., 2017).

Nesta etapa, após a penetração no hospedeiro vertebrado, as cercárias perdem a cauda, o revestimento externo (glicocálice) e o conteúdo glandular, e então, passam a serem chamadas de esquistossômulos. No caso do *S. mansoni*, após chegarem aos pulmões os esquistossômulos migram para o fígado, no qual atingem a maturidade sexual. Nessa etapa ocorre uma clara distinção entre o verme macho e o verme fêmea, e então, ocorrerá o acasalamento. Os casais de vermes agora são encontrados juntos, onde a fêmea está localizada dentro do canal ginecóforo do macho e ambos no fígado migram preferencialmente para as vênulas do plexo hemorroidário, onde depositam seus ovos nos tecidos, os quais irão se desenvolver até o estágio de maturação (formação dos mirácidos). Ao atravessarem a mucosa intestinal, alguns ovos são eliminados pelas fezes dando continuidade ao ciclo, e outros podem ficar depositados no fígado e outros órgãos, causando manifestações clínicas e levando a uma resposta imuno-inflamatória, os granulomas, que são elementos fundamentais para a patologia da esquistossomose.

No ciclo do *S. haematobium*, os vermes adultos são encontrados nos principais órgãos localizados no plexo vesical, pélvis, bexiga, útero e cérvix. A fêmea libera os ovos que penetram nesses tecidos, os quais passam a serem excretados preferencialmente na urina, para que o ciclo possa continuar. Assim como os ovos do *S. mansoni*, os ovos do *S. haematobium* podem não saírem pela urina e ficarem presos nos tecidos dos órgãos pélvicos, bexiga, útero e os órgãos genitais masculinos e femininos. Os ovos presos induzem a formação de granulomas e eventualmente, pequenos nódulos fibróticos conhecidos como “sandy patches”

(Botelho *et al.*, 2011; Brindley & Hotez, 2013). A presença de diversos granulomas e “sandy patches” causam inflamação da bexiga e da uretra, os quais são associados a sintomas como hematúria em mais de 50% dos casos (Van der Werf *et al.*, 2003). Os demais sintomas que podem ocorrer são a obstrução da uretra causando deformidade do órgão, infecção secundária renal e do canal urinário, hidronefrose (inchaço do rim) e por fim falência, a total desse órgão. A associação do parasitismo e a sua relevância com o desenvolvimento de câncer é um dos aspectos mais preocupantes da doença. (Botelho *et al.*, 2009).



## **Capítulo 1: “Avaliação da resistência adquirida em *Biomphalaria glabrata* previamente infectada por *Schistosoma mansoni*, e curadas por associação de praziquantel (PZQ) e oxamniquina (OXA).”**

### **1. Introdução:**

A compatibilidade entre o parasito e o hospedeiro intermediário tem como componente fundamental o sistema de defesa interno (SID) do caramujo, fato este que determina a susceptibilidade ou a resistência à infecção. (Basch, 1976; Negrão-Corrêa *et al.*, 2007; Mitta *et al.*, 2017). Uma hipótese que explica essa complexa interação que conduz a susceptibilidade ou resistência de um hospedeiro invertebrado, é o fato do individuo possuir os mecanismos para combater a infecção, sendo que uma infecção estabelecida revela o “status” de susceptibilidade do hospedeiro (Webster & Davies, 2001). Nesse caso, a interação do sistema efetor e anti-efetor do hospedeiro e parasito tenderia ao processo de resistência (Mitta *et al.*, 2017)

Por outro lado, existe uma segunda hipótese que defende a idéia de que todos os hospedeiros invertebrados seriam capazes de apresentar um *status* de resistência ou de susceptibilidade dependendo do fenótipo conjunto do parasita e hospedeiro (Theron & Coustau, 2005). Nessa hipótese, todos os caramujos seriam potencialmente susceptíveis se expostos ao parasito de fenótipo correspondente (Theron *et al.*, 2008). Nessa situação, a diversificação e polimorfismos dos antígenos e receptores imunológicos vão caminhar para uma combinação que levaria ao parasitismo efetivo ou não do par *Biomphalaria/Schistosoma* (Mitta *et al.*, 2017).

Diferentemente do sistema imune dos vertebrados, os caramujos não possuem linfócitos e sistema de complemento, porém existe uma capacidade de reconhecimento do próprio e do não-próprio (Bayne, 1983). O sistema de defesa interno (SID) é composto por hemócitos que possuem semelhanças com macrófagos de mamíferos e por fatores solúveis da hemolinfa geralmente produzidos pelos hemócitos. (Pereira *et al.*, 2008)

Os fatores solúveis estão envolvidos diretamente na destruição de esporocisto e também na preparação de hemócitos para montarem uma resposta celular (Pila *et al.*, 2017). Entre as proteínas encontradas nos fatores solúveis envolvidas na resposta imune, pode-se citar: os receptores de reconhecimento de padrão (RRP) como o “*B. glabrata* thioester-containing protein” (BgTEP), citotoxinas, como as espécies reativas de oxigênio e

biomphalysina (moléculas capazes de lisar células alvo) e lectinas, como proteínas chamadas FREPs (“fibrinogen related proteins”)(Wu et al., 2017).

Os hemócitos podem ser circulantes ou estarem fixos nos tecidos do caramujo e são os principais responsáveis pela destruição dos esporocistos (Pila et al., 2017). Estas células são produzidas pelo tecido hematopoético encontrado em diversas partes do caramujo, incluindo o denominado “*amebocyte producing organ*” (APO), órgão produtor de amebócitos localizado na parede pericardial anterior (Lie et al., 1975; Souza e Andrade, 2005; Jeong et al., 1983). Este órgão é composto por tecidos de células estratificadas na região reno-epicardial, o qual, quando estimulado sofre sucessivas mitoses formando os hemócitos (Souza & Andrade 2005). Deve-se notar que a produção de hemócitos já foi documentada não somente no APO mas também em tecidos da glândula digestiva e na região cefalopodal do molusco (Pila et al, 2016).

No que se diz respeito à resposta protetora, os hemócitos realizam fagocitose, encapsulamento e exercem a citotoxicidade em patógenos (Ataev et al., 2016; Humphries & Yoshino, 2008). De acordo com a nomenclatura atual, os hemócitos são divididos em granulócitos e hialinócitos, dependendo da granulidade e do tamanho da célula (Ataev et al., 2016; Adema et al., 1992; Cheng, 1975). A quantidade e a proporção dessas células no molusco variam de acordo com infecções por patógenos, assim como as de espécie de caramujo (Ataev et al., 2016; Pila et al., 2016; Noda & Loker, 1989).

Após a infecção com o *S. mansoni*, os hemócitos sofrem proliferação e diferenciação em subconjuntos funcionais distintos (Pila et al., 2017). A subdivisão de hemócitos têm sido recentemente investigada, principalmente através da presença ou ausência de fatores associado aos hemócitos, BgFrep3 e BgTLR, importantes na defesa contra *S. mansoni* (Haninton et al., 2010; Pila et al., 2016).

Ambo, granulócitos e hialinócitos, podem realizar fagocitose, e se tratando de partículas maiores (como a fase intralarval do *Schistosoma* ssp.), a fagocitose se resumiria em descamar as microvilosidades do tegumento do esporocisto em pequenos fragmentos (Ataev et al., 2016; Loker et al., 1982). Contudo, a principal função da fagocitose é a eliminação de “debris” elulares provenientes de parasitos mortos (Loker et al., 1982). O encapsulamento é o principal mecanismo de eliminação de parasitos. Os granulócitos são atores essenciais na resposta protetora contra o *Schistosoma*, realizando o encapsulamento dos esporocistos em até uma hora após a penetração do miracídio, em cepas de caramujos resistentes (Bayne et al., 1980; Nacif-Pimenta et al., 2012). O recrutamento de hemócitos para o local da invasão dos parasitos ocorre através da produção de quimiocinas produzidas tanto pelos hemócitos quanto

pelo parasito (Pila et al., 2017). A única quimiocina caracterizada funcionalmente até o momento em *B. glabrata* é o “macrophage migration inhibitory fator” (MIF) (Huang et al., 2017; Baeza Garcia et al., 2010). Outro fator excretado que potencialmente possui caráter de quimiocina é o “allograft inflammatory fator” (AIF). Outra evidência indicativa da função de uma quimiocina é o aumento de transcritos após as infecções com parasitos e a expressão basal mais elevada em cepas de *B. glabrata* resistentes (Locker et al., 2012; Larson et al., 2014). No genoma do *B. glabrata* já foi identificado múltiplos homólogos de MIF, interleukina-17 e fator de necrose tumoral (TNF), porém estes ainda não foram funcionalmente caracterizados (Adema et al., 2017)

Nacif-Pimenta e colaboradores (2012) estudaram o processo de interação na fase inicial da infecção entre os esporocistos de *S. mansoni* e o SID do caramujo *B. tenagophila* usando linhagens resistentes e susceptíveis ao parasita. Os resultados obtidos através da microscopia *laser* confocal, microscopia óptica e ensaios *in vitro* de interação mostraram uma destruição rápida e total dos esporocistos quando em contato com os hemócitos da linhagem *B. tenagophila* resistente (cepa Taim). Porém, quando em contato com hemócitos da linhagem *B. tenagophila* susceptível (cepa Cabo Frio), observou-se uma mortalidade parcial permanecendo vários esporocistos vivos.

Algumas hipóteses que explicam a capacidade de uma mesma cepa de *S. mansoni* induzir resposta diferentes em *B. glabrata* são consideradas. A mais discutida seria a incapacidade dos hemócitos de *B. glabrata* susceptíveis de reconhecer o parasito invasor. (Pila et al., 2017; Mitta et al., 2017). Outra hipótese considerada seria que *S. mansoni* produziria fatores conhecidos como “produtos de transformação larval” (PTL) que inibem a ação de hemócitos de caramujos susceptíveis. As interferências afetariam a mobilidade, a proliferação celular síntese de proteínas e a produção de espécies reativas de oxigênio (Lodes et al., 1990; Lodes et al., 1991; Zahoor et al., 2009). Independentemente do mecanismo de ação, a falta de reconhecimento impediria a cascata de resposta protetora: 1-recrutamento dos hemócitos ao local de invasão → 2-produção de proteínas possibilitando interações células à célula → 3-ativação dos hemócitos → 4-encapsulamento do parasito → 5-produção de fatores citotóxicos → 6-destruição do parasito (Negrão et al., 2007).

Outro aspecto interessante é o uso de drogas ativas contra o *S. mansoni* como o Praziquantel (PZQ) associado com a Oxamniquina (OXA), os quais atuam na fase intramolusco, destruindo os esporocistos. Mattos e colaboradores (2006, 2007) através de marcadores fluorescentes específicos avaliaram a ação dessas drogas sobre o tegumento e vesículas ácidas presente no interior do parasita. Verificou-se que a associação OXA/PZQ no

período patente não somente interrompeu a eliminação de cercárias como também levou à “cura” dos caramujos previamente infectados.

Praziquantel e OXA são fármacos amplamente utilizados no tratamento da esquistossomose em humanos no Brasil. Um dos modos de ação do PZQ é a diminuição do fluxo de íons de  $Ca^{++}$  na musculatura do parasito, atuando principalmente nas fêmeas, impedindo a contração e o relaxamento muscular controlado, ocasionando mudanças no tegumento. A partir de então, o parasito não consegue mais se fixar na parede da musculatura do hospedeiro e é expelido. Já a OXA, outrora utilizada no tratamento de *S. Mansoni*, inibe a síntese de ácidos nucleicos, porém não possui eficácia em *S. haematobium* e *S. japonicum*. A OXA atua principalmente sobre os parasitos machos. (Tebeje et al., 2016)

Até o momento, todos os estudos relacionados à resistência adquirida em moluscos foram realizados baseados em infecções consecutivas de trematódeos da mesma espécie ou em espécies diferentes, irradiados ou não (Lie & Heyneman, 1972; Van der Knaap & Loker, 1990; Loker, 1994; Lie, Heyneman & Richards 1977 a, b ; Southgate et al. 1989; Sousa, 1992; Sire, 1998; Lie & Heyneman, 1975; Lie, Heyneman & Lim, 1975, Lie & Heyneman, 1979b), ou seja, os miracídios/esporocistos da primeira infecção estavam sempre presentes até o momento da segunda infecção.

Considerando o exposto, foi desenvolvida uma metodologia de cura de caramujos infectados, utilizando-se a associação de duas drogas esquistomicidas (Praziquantel® e Oxaminiquina®) que matam o esporocisto secundário intra-molusco da primeira infecção (Mattos et al., 2007). Com essa nova abordagem foi possível estudar, o efeito de resistência adquirida residual dos caramujos sem a presença dos parasitos da primeira infecção e também transferência de resistência por transfusão de hemolinfa dos caramujos “curados” para controle normais.

## **2. Justificativa**

O capítulo 1 desse trabalho visa ampliar o conhecimento do processo de interação do parasito *S. mansoni* com o hospedeiro invertebrado, o caramujo *B. glabrata*. O uso conjunto e o domínio de várias técnicas abrem perspectivas interessantes para estudos da resposta do hospedeiro invertebrado à infecção pelo parasita. Conhecendo como os mecanismos de resposta protetora atuam no parasito pode-se ter ferramentas para controle da doença em intervenções por introdução de linhagens resistentes de *Biomphalaria*. Além do mais, experimentos que ajudam a elucidar os mecanismos por trás da memória da resposta imune inata irá contribuir para o conhecimento geral de imunidade dos invertebrados.

### **3. Objetivo Geral**

Avaliar comparativamente o processo de reinfecção do *Biomphalaria glabrata* primo infectado e curado (tratado com PZQ e OXA) e desafiado pelo *S. mansoni* (infecção secundária) tendo como controle a infecção primária de caramujos normais.

#### 3.1 Objetivos específicos

- a) Analisar a histopatologia geral do processo de re-infecção (infecção secundária) de caramujos primo infectados e curados, comparando-os com caramujos que somente desenvolveram uma infecção primária.
- b) Verificar as principais estruturas anatomo-morfológicas do hospedeiro invertebrado através da cinética de infecção do *S. mansoni*.
- c) Avaliar o efeito da transferência das hemolinfas de caramujos *B. glabrata* tratados e curados e estudados a dinâmica de infecção pelo *S. mansoni* considerando os 4 grupos citados.

## **4 Material e Métodos**

### 4.1 Caramujos utilizados

Serão utilizados caramujos da espécie *B. glabrata* (Barreiro de Cime) mantidos rotineiramente por mais de 30 anos no Moluscário do Instituto de Pesquisa René Rachou (FIOCRUZ). Os caramujos foram divididos em 4 grupos experimentais sendo: **grupo A** - infectados (infecção primária), **grupo B** – não infectados (controle) **grupo C** – não infectados e tratados (controle do tratamento) e **grupo D** – infectados, tratados e re-infectados. No grupo de caramujos tratados foram realizados dois tratamentos sendo cada tratamento com duração de 5 dias consecutivos e uma semana de intervalo entre eles. A dosagem fornecida foi de 500mg/Kg de OXA (Mansil -Pfizer S.A) e 1000mg/Kg de PZQ (Cestox - MERCK), misturados na ração de consumo diária (Mattos et al., 2007).

### 4.2 Obtenção dos miracídios

Os parasitos utilizados foram *S. mansoni* da cepa LE, isolada pelo Dr. José Pellegrino em 1968 e mantida por mais de 35 anos no Moluscário/ Laboratório de Esquistossomose do Instituto de Pesquisa René Rachou. Os ovos foram obtidos a partir de fígado de hamsters infectados com *S. mansoni* e expostos à luz artificial para liberação do miracídio. Os miracídios foram separados e a concentração de 10 miracídios por ml. Sendo que cada caramujo recebeu 1ml.

### 4.3 Infecção de Caramujos

Caramujos de cada grupo foram expostos, individualmente, a 10 miracídios de *S. mansoni* (cepa LE), segundo a técnica descrita por Souza (1993). Resumidamente, em torno de 500 ul de água desclorada foi colocada em placas de culturas de 24 poços. Uma concentração final de 10 miracídios foi colocada dentro de cada poço. Em seguida, os caramujos foram colocados individualmente em cada poço na presença de luz em torno de 4 horas para estimular a infecção. Após essa infecção os caramujos foram colocados em cubas e feita a sua manutenção de rotina, conforme o procedimento do moluscario do Instituto de Pesquisa René Rachou.

### 4.4 Verificação de caramujos infectados

Após 30 dias, os caramujos foram colocados novamente em placas de culturas de 24 poços com 500ul de água. Na presença da luz os caramujos foram mantidos por 40-60 minutos e sob uma lupa, cada poço foi examinado para determinar a presença ou ausência de

cercárias. Desse momento em diante, somente os caramujos, nos quais foram encontradas cercárias, permaneceram no grupo de caramujos infectados. Os caramujos onde não foram encontradas cercárias foram descartados.

#### 4.5 Tratamento dos caramujos infectados

Nos grupos de caramujos tratados, a dosagem fornecida foi de 500 mg/Kg de OXA (Mansil - Pfiser S.A) e 1000 mg/Kg de PZQ (Cestox - MERCK) por caramujo. O tratamento dos caramujos foi realizado de acordo com Mattos e colaboradores em 2007. Resumidamente, cada caramujo foi pesado individualmente e uma média do peso total do grupo foi obtida para cada grupo. Uma combinação de ração de camundongo (Nuvital) triturada e aPZQ/OXA foi fornecida a cada caramujos com as devidas proporções. Baseado no peso médio dos caramujos foi feita uma pasta com água, ração e as drogas. Cada caramujo recebeu 100 mg dessa combinação por dia. O tratamento durou 2 semanas com um intervalo de uma semana sem medicamento. A comida normal (alface) dos caramujos foi interrompida e na primeira semana os caramujos receberam o tratamento durante 5 dias consecutivos, onde 100 mg da combinação de ração e drogas foi colocada para cada caramujo diariamente. Cada novo dia de tratamento a água do recipiente onde o caramujo se encontrava foi trocada e verificou-se que os caramujos tinham ingerido toda a ração de consumo diária com a dosagem de medicamento. Na segunda semana, os caramujos tiveram uma pausa no tratamento e a alface voltou a ser fornecida para cada caramujo sendo neste momento interrompido o tratamento. Na terceira semana, a ração com as drogas voltou a ser fornecida para os caramujos sendo seguido o mesmo esquema descrito anteriormente.

#### 4.6 Verificação de caramujos curados

Trinta dias após o tratamento, os caramujos foram examinados para verificação da eliminação cercárias. Os exames ocorreram até 4 semanas após o término do tratamento. Os caramujos que permaneceram sem eliminar cercarias foram considerados curados. Desse momento em diante, somente os caramujos que não tivessem liberando cercarias continuaram no grupo. Os caramujos nos quais o tratamento não funcionou, sendo verificada a presença de cercárias, foram descartados.

#### 4.7 Re-infecção de caramujos curados

Após a confirmação de cura dos caramujos tratados, foi feita a re-infecção desses caramujos. Os caramujos primo infectados foram individualmente expostos novamente a 10



miracídios cada por 4 horas na presença de luz. Caramujos da mesma idade e nunca infectados, foram também expostos aos miracídeos e utilizados de grupo controle, bem como para comparação da resposta frente ao parasito. Os caramujos foram examinados em tempos definidos após a reinfecção.

#### 4.8 Análise histopatológica dos caramujos

Para obtenção dos cortes histológicos, as partes moles dos caramujos foram fixadas por no mínimo 4 horas em Bouin (solução de ácido pícrico, formaldeído e ácido acético), nos tempos específicos após a sua exposição aos miracídios. O material foi então submetido ao processo de emblocamento com parafina e cortados em micrótomo. Após a obtenção das lâminas, os cortes foram corados com hematoxilina e eosina, e montados para observação no microscópio ótico.

#### 4.9 Transferência de hemolinfa

Para experimentos de transferência de hemolinfa, os caramujos foram separados em 4 grupos:

- 1) Controle: caramujos sem receber hemolinfa
- 2) Receptores de hemolinfa de curados: caramujos que receberam hemolinfa de caramujos que foram infectados e curados (descritos acima)
- 3) Receptores de hemolinfa de infectados: caramujos que receberam hemolinfa de caramujos infectados
- 4) Receptores de hemolinfa de sadios: caramujos que receberam hemolinfa de caramujos sadios (sem infecção)

O processo de transferência de hemolinfa ocorreu da seguinte forma: caramujos receptores de hemolinfa foram anestesiados com pentobarbitol sódico diluído em água (Martins-Souza et al., 2001) por 8 horas. A anestesia permite o relaxamento muscular da parte mole do caramujo, impedindo que a região cefalopodal se retraia no momento da injeção.

Em seguida, os caramujos doadores de hemolinfa foram separados e higienizados rapidamente com algodão em solução de etanol 70%. Através do uso de uma lupa o coração foi localizado e perfurado com uma agulha de insulina. O líquido extravasado foi recolhido com auxílio de uma seringa siliconizada e transferido para tubos Ependdorf siliconizados. Um

“pool” de hemolinfa foi utilizado até completar a capacidade dos tubos de 1,5ml. Os caramujos doadores de hemolinfa foram descartados após a extração.

Imediatamente após a extração da hemolinfa dos grupos doadores, os caramujos receptores anestesiados foram brevemente higienizados com algodão em solução de etanol 70% e injetados com a hemolinfa do grupo de interesse. Cada caramujo recebeu 200  $\mu$ l de hemolinfa na região cefalopodal. Após a transferência de hemolinfa, os caramujos foram transferidos para aquários de plástico e mantidos rotineiramente no moluscário.

Após 24 horas, os três grupos de caramujos receptores e controle foram infectados com miracídeos seguindo protocolo descrito anteriormente. Após 4 semanas e novamente com 5 semanas, foram realizados exames de contagem individual do número de possíveis cercárias liberadas de todos os caramujos. Primeiramente, foi feito o protocolo de liberação das cercárias, como descrito anteriormente em um volume de 5ml por poço e em seguida, 1ml de cada amostra foi recolhida e transferida para um tubo 1,5ml corretamente identificado. A contagem das cercárias foi feita com auxílio de lâminas escavadas, onde a totalidade do volume recolhido foi fixado e corado com lugol e espalhado na lâmina escavada e contado com auxílio de microscópio estereoscópio.

#### 4.10 Gráficos de transferência de hemolinfa

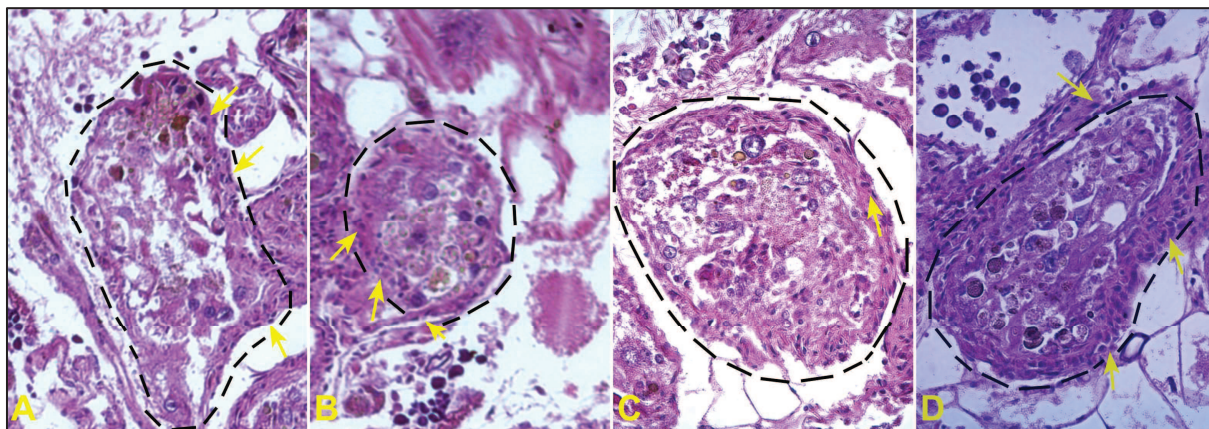
Análises estatísticas foram feitas usando o software GraphPad Prism (Prism 5.01; GraphPad Software Inc.). Foi utilizado o Teste T-Student para verificar diferenças estatísticas.

## **5 Resultados**

### 5.1 Análises histológicas

#### **5.1.1 Exame histológico de *B. glabrata* após interação com *S. mansoni* (infecção primária) 1 hora após infecção**

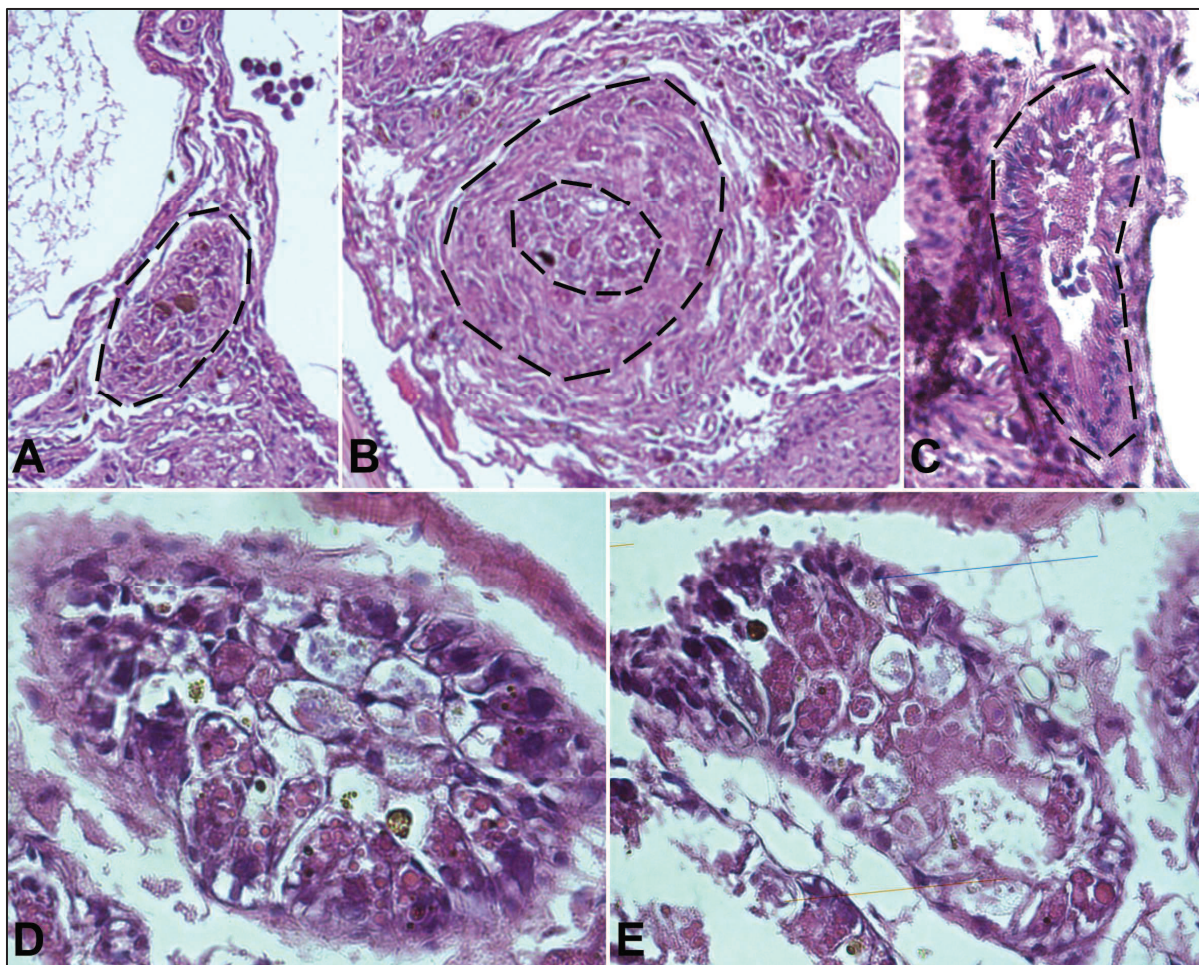
Usando o modelo de *B. glabrata* susceptível infectado com *S. mansoni*, foi possível observar diferentes reações do caramujo à infecção (figura 6). Uma hora após a infecção, nota-se que os hemócitos já são capazes de reconhecer a presença do parasito (figura 6A e 6B). E com 12 horas de penetração existem esporocistos com ausência parcial de hemócitos ou como esporocistos com presença mais forte de hemócitos (figura 6C e D).



**Figura 6. Histologia de caramujos 1 hora e 12 horas após infecção primária.** A e B- miracídio recém penetrado (linha tracejada) no tecido de *B. glabrata* 1 hora após interação 40x e 20x respectivamente. Nota-se a presença de hemócitos ao redor dos parasitos (setas amarelas). C- esporocisto primário (linha tracejada) após 12 horas de interação 40x. Nota-se a pouca quantidade de hemócitos ao redor do parasito (seta amarela). D- esporocisto primário (linha tracejada) após 12 horas de interação 40x. Observa-se uma maior quantidade de hemócitos ao redor do parasito (seta amarela).

#### **5.1.2 Exame histológico de *B. glabrata* 12 horas após a re-infecção (infecção secundária) com *S. mansoni***

Caramujos *B. glabrata* susceptíveis foram infectados, em seguida curados com a associação de oxaminiquina e praziquantel e posteriormente reinfetados. Após 12 horas foi possível observar que, ao contrário dos caramujos na infecção primária (figura 7B), houve a predominância de esporocistos com pouca ou nenhuma resposta celular (figura. 7C, 7D e 7E).

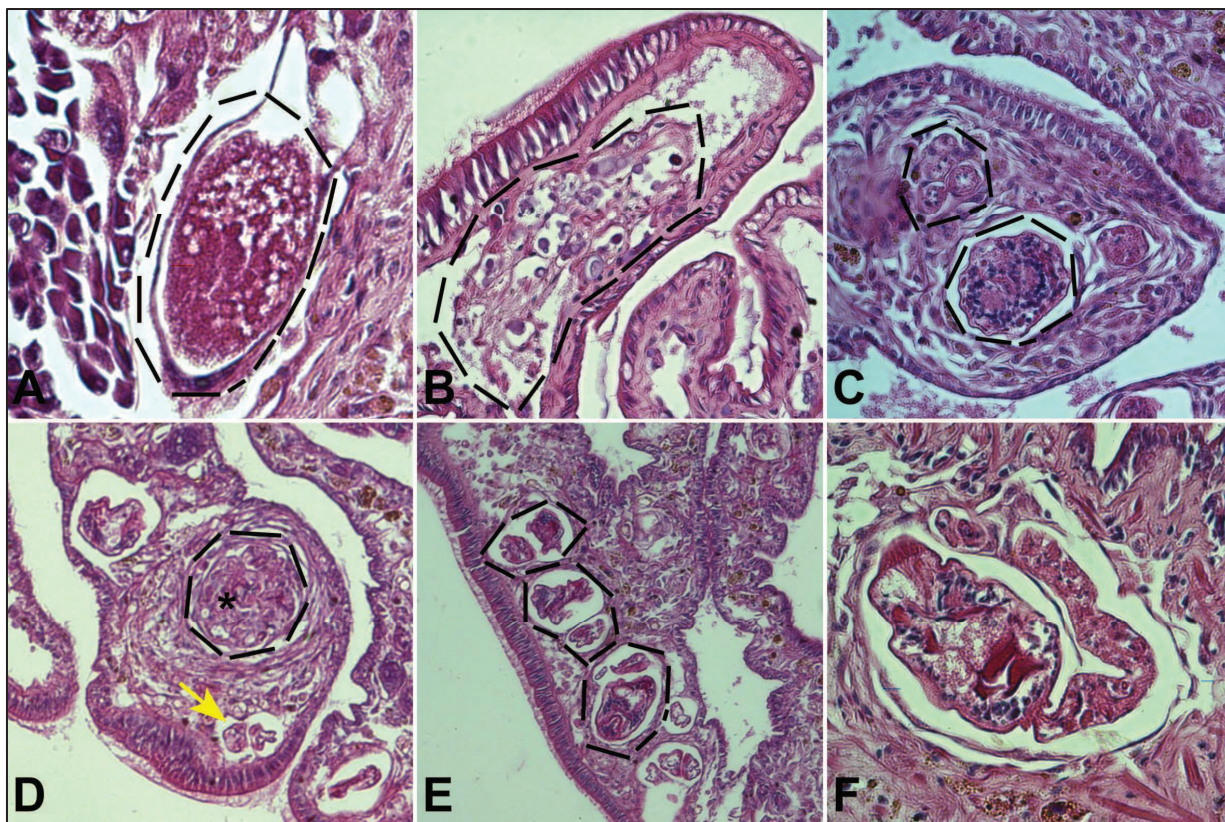


**Figura 7. Histologia de caramujos 12 horas após infecção primária e secundária.** A e B- esporocisto de infecção primária A- esporocisto (linha tracejada) com ausência de resposta celular 20x. B- esporocisto (linha tracejada interna) com intensa resposta celular (linha tracejada externa) 20x.C, D e E – esporocistos em caramujos de infecção secundária. C- esporocisto deteriorado (linha tracejada) com alguma resposta celular ao redor do tegumento 40x. D e E - esporocistos sem reação celular. 63x.

### **5.1.3 Exame histológico dos Fenótipos de *B. glabrata* 24 horas, 15 e 30 dias após a re-infecção (infecção secundária) com *S. mansoni***

No tempo de 24 horas após a infecção secundária foi possível observar esporocistos viáveis no tecido do caramujo (figura 8A) e também esporocistos com aspecto de deterioração do seu tegumento, apesar de não sido observado hemócitos ao seu redor (figura 8B). Após 15 dias, foi possível encontrar esporocistos em diferentes níveis de desenvolvimento (figura 8C e 8D). Na maioria dos esporocistos foi observado pouca ou nenhuma interação dos hemócitos com o parasito (figura 8C). Foi verificado poucos esporocistos com intensa resposta celular e de forma interessante, esses esporocistos se encontravam próximo a um esporocisto desenvolvido, onde o mesmo não possuía resposta celular (figura 8D).

Com 30 dias após a infecção secundária observou-se diversos esporocistos secundários com grau avançado de desenvolvimento (figura 8E) e também observou-se cercaria dentro de esporocisto (fig. 8F).



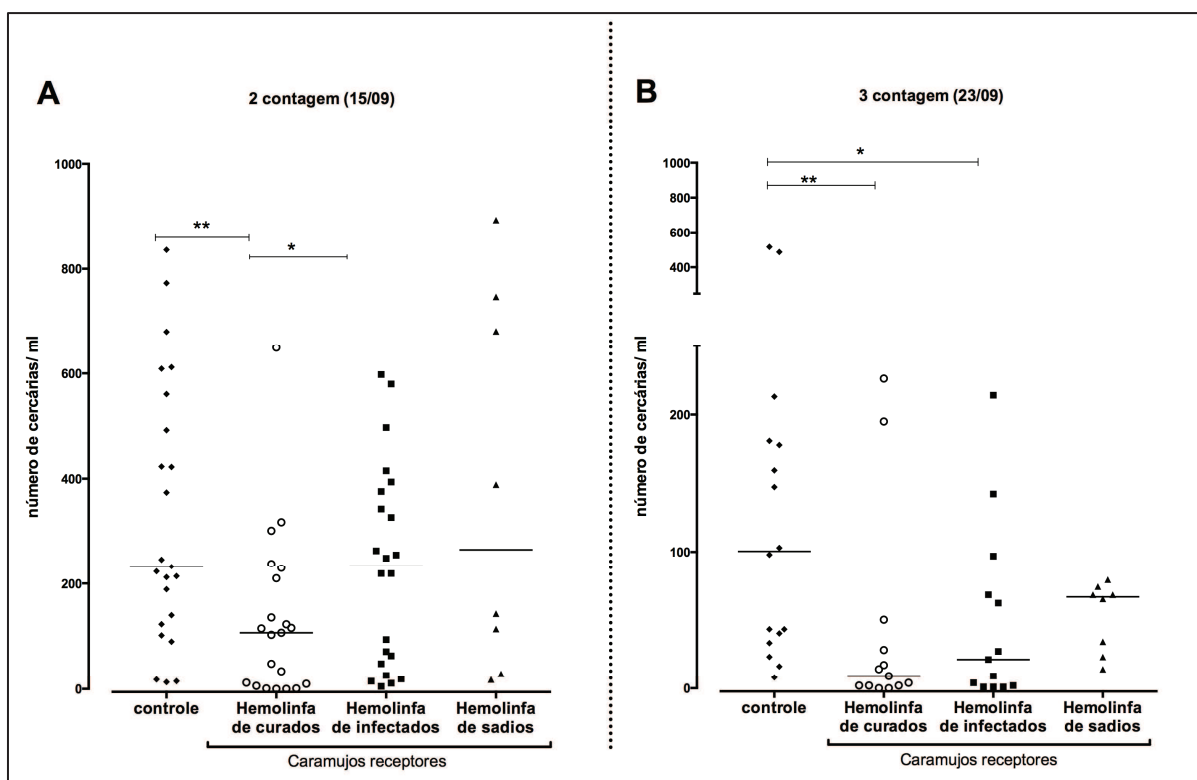
**Figura 8. Histologia de caramujos de 24 horas até 30 dias em caramujos de infecção secundária.** Diferentes respostas imunes A- esporocistos viável sem resposta celular após 24 horas. B- Esporocisto sofrendo deterioração após 48h. Nota-se ausência de resposta celular. 63x C- Esporocistos após 15 dias. Observa-se 3 esporocistos sem resposta celular ao redor.20x D- Esporocistos após 15 dias. Observa-se dois esporocisto com diferentes níveis de interação, uma resposta celular muito acentuada (asterisco) e outro sem resposta (seta) 40x. E- Após 30 dias observa-se esporocistos livres de resposta celular. 20x. F- cercaria localizada dentro de um esporocisto secundário

## 5.2 Transferência de hemolinfa de *B. glabrata* em diferentes condições e subsequente infecção em caramujos receptores.

Em seguida, foi retirada a hemolinfa de caramujos e separados nos seguintes grupos: 1) infectados e curados, 2) infectados e 3) nunca infectados. Essa hemolinfa obtida de cada um desses grupos foi injetada em três grupos de caramujos sadios: **Hemolinfa de curados:** são os caramujos que receberam hemolinfa de *B. glabrata* que foram infectados e curados da infecção. **Hemolinfa de infectados:** caramujos que receberam hemolinfa de *B. glabrata* que foram somente infectados. **Hemolinfa de sadios:** caramujos que receberam somente

hemolinfa de caramujos sadios. Além desses grupos, um grupo de caramujos sem ter recebido hemolinfa foi utilizado como controle. Todos os quatro grupos foram infectados e uma semana após completar 30 dias de infecção, foram realizadas as contagens de cercárias (figura 9A).

Somente o grupo que recebeu a hemolinfa de caramujos infectados e tratados (grupo: hemolinfa de curados), liberaram significativamente menor número de cercárias quando comparado com os outros grupos após 5 semanas (fig. 9A). E, após 6 semanas, foi observado continuou liberando estatisticamente menor número de cercárias quando comparado com o controle (Fig. 9B). Além disso, o grupo que recebeu hemolinfa de caramujos infectados também passou a liberar menor número de cercárias quando comparado com o grupo controle e com o grupo que recebeu hemolinfa de caramujos sadios (figura 9B).



**Figura 9. Transferência de hemolinfa *B. glabrata* em diferentes condições de imunidades.** Quatro grupos de *B. glabrata* foram investigados através da contagem de liberação de cercária. Um grupo controle (1), onde os exemplares não receberam nenhuma transferência de hemolinfa. Os próximos três grupos receberam hemolinfa em diferentes condições de imunidade e foram designados de caramujos receptores. *B. glabrata* que receberam hemolinfa dos caramujos que foram infectados e posteriormente tratados(2). *B. glabrata* que receberam hemolinfa que caramujos que foram somente infectados (3) e *B. glabrata* que receberam hemolinfa de caramujos sadios (4). Após a transferência de hemolinfa todos os grupos foram infectados e após 30 dias e uma semana foi realizado a contagem de cercárias. A- Após uma semana é possível observar que o grupo de recebeu hemolinfa de caramujos infectados e tratados liberam estatisticamente menos cercárias quando comparados com os outros grupos. B- Após duas semanas é possível observar que a quantidade de cercárias liberadas pelo grupo que recebeu hemilinf de tratados e curados continuou liberando menos cercárias e não tem diferença estatística do grupo que recebeu hemilinf de caramujos infectados. Porém esses dois grupos liberam menos cercária quando comparado com o grupo de caramujos controle.

## **6 Discussão**

Nos vertebrados, a memória imunológica é a capacidade de células específicas do sistema imune reconhecer e “lembrar” de patógenos previamente localizados e montar uma resposta quantitativamente e qualitativamente diferente (ex. mais forte e mais rápida) que a da primeira infecção (Sun et al., 2014). O próprio anticorpo e as células que produzem os anticorpos têm sido o principal foco de estudo e até o presente momento, considerados os únicos responsáveis pela capacidade dos vertebrados em desencadear uma memória imunológica que confere proteção contra patógenos a longo prazo. Desde a descoberta da vacina por Edward Jenner em 1796 contra varíola (Riedel, 2005), a implementação da vacina contra raiva de Louis Pasteur e a imunização passiva descoberta por Shibasaburo Kitasato and Emil von Behring (1890), os primeiros estudos de memória imunológica em vertebrados eram todos voltados para os anticorpos e as células produtoras de anticorpos (Sun et al., 2014).

Foi a partir dos anos de 1960 que pesquisadores descobriram que os linfócitos, produzidos no timo, também desempenham um papel no reconhecimento de antígenos (Miller & Mitchell, 1967; Mitchell & Miller, 1968). Desde então, formou-se o modelo de memória considerando-se que as células T CD8<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> são formadas contra a presença de patógenos (Williams & Bevan, 2007; Swain et al, 2012; Mueller et al, 2013).

Atualmente existe um debate questionando a exclusividade da memória adaptativa seja de uso exclusivo dos vertebrados (Kurtz, 2005; Sadd & Schmid-Hempel, 2006; Hauton & Smith, 2007; Vazquez, 2009). Ainda não foram consolidadas evidências que provem a existência de imunidade adaptativa em invertebrados. Deve-se considerar que no reino animal essa classe compõe mais de 97% das espécies conhecidas. Já se fizeram tentativas para justificar a ausência de anticorpos nos invertebrados. Seria o tempo de vida desses seres muito curto onde não seria, do ponto de vista evolutivo, vantajoso preparar o organismo contra uma segunda infecção, pois o organismo não viveria tempo suficiente para se infectar novamente (Kurtz, 2005).

Destaca-se, a partir dos anos 2000 um aumento no número de publicações onde a memória imunológica em invertebrados tem sido alvo de investigações e começou a ser descrita em diversos invertebrados (Kurtz, 2004; Kurtz & Franz, 2003; Rodrigues et al., 2010; Sadd & Schmid-Hempel, 2006; Hauton & Smith, 2007; Kurtz, 2005; Vazquez et al., 2009; Cooper et al., 1992; Little & Kraaijeveld, 2004; Pham et al., 2007).

Já foi demonstrado que em *B. glabrata* existe um processo primitivo, porém análogo aos dos mamíferos em relação ao rearranjo genético de receptores de antígeno e de

hipermutação somática (Zhang et., al 2004). Esse trabalho mostrou pela primeira vez que nas proteínas da hemolinfa, mais especificamente na região do domínio da superfamília de imunoglobulinas, existe uma diversidade de hipermutação somática formidável, similar aos vertebrados.

A resposta imune primária em *B. glabrata* é essencialmente dependente da resposta celular dos hemócitos, porém, tem sido estudado que, aparentemente, subseqüentes infecções por *S. mansoni* possivelmente desloca a resposta imune celular para uma resposta humoral (Pinaud et al., 2016). No entanto, para outros invertebrados já foi demonstrada a atuação dos hemócitos na resposta secundária (Rodrigues et al., 2010; Roth & Kurtz, 2009; Pope et al., 2011).

Os resultados do presente trabalho mostram que o *B. glabrata* não se tornam totalmente imune a uma segunda infecção após a cura da primeira infecção por *S. mansoni*. Contudo, o tratamento de quimioterapia foi capaz de eliminar os esporocistos da primeira infecção e após uma segunda infecção, claramente os caramujos apresentaram uma resposta celular menor (ausência de hemócitos ao redor dos esporocistos) à infecção e uma menor liberação de cercárias do grupo curado. Porém, não ficou elucidado o mecanismo que os caramujos curados utilizam para diminuir a liberação de cercárias. Resultados semelhantes com relação ao desenvolvimento do *S. mansoni* já foram demonstrados, porém utilizando-se uma abordagem diferente, como a habilidade de *B. glabrata* conseguir impedir o desenvolvimento do parasito após uma infecção secundária (Portela et al., 2013; Pinaud et al., 2016), entretanto, nesse caso, entende-se por infecção secundária caramujos que possuem o *S. mansoni* da primeira e da segunda infecção ao mesmo tempo (ou seja infecções concomitantes).

Nos estudos em que foram utilizados miracídios irradiados, os caramujos conseguem eliminar os esporocistos, e ao reinfectarem esses caramujos com miracídios sadios, os parasitos se desenvolvem apresentando a mesma prevalência dos caramujos controle (primeiro infectados) (Portela et al., 2013; Azevedo et al., 2006).

Portela e colaboradores (2013) argumenta que é necessário que *B. glabrata* tenha esporocistos da primeira infecção se desenvolvendo para que os esporocistos da segunda infecção se tornem inaptos à se desenvolverem dentro do caramujo. Esse argumento pode explicar os nossos resultados onde, existe a falta de capacidade do caramujos de eliminarem os esporocisto da segunda infecção uma vez que esses caramujos foram curados da primeira infecção com o tratamento por quimioterapia. Porém, mesmo com a ausência dos esporocistos da primeira infecção, a transferência de hemolinfa de caramujos “primados”,



conferiu uma diminuição no número de cercárias liberadas em caramujos que receberam essa hemolinfa e foram conseqüentemente infectados. Após 6 semanas de infecção, o grupo que recebeu hemolinfa dos caramujos infectados também teve o número de cercárias diminuídas, e o grupo que recebeu hemolinfa de *B. glabrata* infectados - tratados - curados, continuaram a liberar menos cercárias do que o grupo controle. Este fato sugere que a hemolinfa do grupo tratado e re-infectado acelera a resposta imunológica contra o parasito. Possivelmente, existem outros fatores que contribuem para essa resposta à infecção e não somente a ação direta dos hemócitos.

Pinaud e colaboradores (2016) recentemente mostraram a importância dos fatores solúveis, como por exemplo a biomphalysina, que possui a capacidade de diretamente causar a destruição dos esporocistos, e que após infecções secundária, *B. glabrata* “primados”, possuem níveis transcricionais mais elevados desse peptídeo. Em outros grupos de moluscos (escalope) também foi visto que lectinas (do tipo-C) são moduladas e participam da resposta de memória imune inata (Wang et al., 2013). Rodrigues et al. (2010) demonstraram a habilidade de hemócitos serem ativados após a transferência de plasma de mosquitos infectados.

O presente trabalho mostrou que apesar de não conceder imunidade total, o processo de infecção pelo *S. mansoni* e a cura dessa infecção, através de quimioterapia, resulta em algumas mudanças no sistema de defesa interno do *B. glabrata*. Contudo, através da histologia não foi possível determinar se houve uma maior migração de hemócitos e/ou destruição de esporocistos mais intensa ou rápida por fatores solúveis, quando esses exemplares curado foram re-infectados. Os resultados se mostraram inconclusivo pois, tanto nos cortes histológicos dos controles quanto no grupo de interesse, era possível observar: 1) reações intensas de hemócitos ao redor dos esporocistos 2) esporocistos destruídos sem resposta de hemócitos (levando a conclusão da ação de fatores solúveis) 3) esporocistos se desenvolvendo naturalmente.

É interessante comparar esses resultados com outros experimentos no qual os investigadores não curaram o *B. glabrata* antes de realizar a re-infecção. Nesses experimentos os exemplares foram infectados e após 25 dias foram re-infectado, e a imunidade contra a segunda infecção foi total somente nessas condições. Porém fica claro que essa imunidade é dependente da presença constante de esporocistos da primeira infecção. Portela et al., 2013 realizou infecções concomitantes e observou que quando se usa miracídio de *S. mansoni* irradiados na primeira infecção, na segunda infecção não foi obtida a proteção quando comparados com não irradiados. Ou seja, de acordo com os autores, somente com miracídios

normais e presentes dentro do tecido do caramujo é possível obter uma proteção total contra uma segunda infecção.

Porém, os nossos resultados de transferência de hemolinfa mostraram que existe algum tipo de proteção quando a hemolinfa de caramujos primados (infectados e curados) foram transferidos para exemplares controle. Após a infecção dos caramujos que receberam hemolinfa de caramujos primados, foi visto que a liberação de cercarias é estatisticamente menor quando comparado com os demais grupos.

A partir desses resultados é relevante verificar agora se a resposta contra a infecção secundária, que leva a uma proteção parcial, é liderada pelos hemócitos ou se existe uma tendência dessa resposta ser mais envolvida com os fatores humorais. Diversos autores têm demonstrado que a resposta celular é aumentada após um desafio secundário em diferentes grupos de invertebrados (Netea et al., 2011; Rowley & Powell, 2007; Wang et al., 2013; Rodrigues et al., 2010). Porém, um estudo recente obteve resultado prévio diferente mostrando uma mudança de resposta celular (na infecção primária) para um aumento de resposta humoral na infecção secundária (Pinaud et al., 2016).

De qualquer forma é fundamental enfatizar as diferenças metodológicas entre os experimentos. De acordo com o conhecimento atual da literatura, os nossos resultados mostram pela primeira vez uma imunidade parcial, em uma segunda infecção, em *B. glabrata* completamente curados da infecção primária.

## **7- Conclusão**

1. A histologia mostrou que não houve diferenças na reação ao redor dos esporocistos que foram infectados tratados e reinfectados comparado com os esporocistos do grupo controle.
2. Em ambos os grupos ocorreram reações forte da ação dos hemócitos quando foi possível observar esporocistos viáveis.
3. Esporocistos mortos sem a presença de hemócitos foram observados nos dois grupos, indicando destruição por ação dos fatores solúveis.
4. A transferência de hemolinfa de *B. glabrata* infectada e curada para um exemplar normal resultou em uma resistência parcial da infecção por *S. mansoni*
5. Hemolinfa de *B. glabrata* que foram “primados” (através de infecção e consequente cura por quimioterapia) se tornaram parcialmente resistentes quando essa hemolinfa foi transferida para outro caramujo seguido de uma infecção por *S. mansoni*.
6. A resistência parcial foi observada através do número de liberação de cercarias 5 semanas após a infecção por *S. mansoni*, número que foi estatisticamente menor quando comparado com os outros controles.
7. Após 6 semanas, o grupo que recebeu hemolinfa de curados e o grupo que recebeu hemolinfa de infectados tiveram o número de liberação de cercária estatisticamente diminuído.

## **8 Perspectivas para futuros experimentos**

Como recentemente tem sido levantada a hipótese de que fatores humorais da *B. glabrata* podem estar atuando na resposta à infecção secundária por *S. mansoni* (Pinaud et al., 2016), são necessários mais experimentos para se entender a relação desses fatores humorais com o modelo infecção – cura – reinfecção desenvolvido pelo nosso grupo. Com isso em mente, pretendemos no futuro:

- Realizar experimentos de transferência de hemolinfa, separando células e plasma e em seguida, avaliar o efeito na infecção e conseqüentemente na liberação de cercárias;
- Caracterizar a expressão da proteína FREP, biomphalysina e outros componentes presentes nos fatores solúveis de *Biomphalaria glabrata* (cepa susceptível, Barreiro de Cima) e resistente (Tororó) à infecção por *S. mansoni*) e *Biomphalaria tenagophila* (cepa susceptível (Cabo Frio) e resistente (Taim) à infecção por *S. mansoni*.
- Avaliar como caramujos curados de uma primo-infecção modulam a expressão de FREP, biomphalysina e outros componentes após uma segunda infecção.

## **Capítulo 2: “Avaliação da resposta diferenciada de linhagens de células epiteliais do trato biliar e da bexiga frente a interação com ovos de *Schistosoma haematobium* e *Schistosoma mansoni*”**

### **1. Introdução**

Dos aproximadamente 112 milhões de casos de infecção por *S. haematobium* na África subsaariana, 70 milhões estão associados à hematúria, 18 milhões com maior patologia da parede da bexiga e 10 milhões com hidronefrose levando a sérios danos nos rins (Hotez et al., 2009; King, 2010; Gryseel et al., 2006).

De extrema importância é o fato de que atualmente existe uma correlação extensivamente documentada entre a infecção por *S. haematobium* e a presença de câncer de bexiga em humanos (International Agency for Research on Cancer, 2011; Kuper et al 2000; Shiff et al 2009; King & Dangerfield-Cha, 2008; Botelho et al, 2010; Chen and Mott, 1989; Tawfik, 1988; Badawi et al., 1992; Mostafa et al., 1999; Fried & Mayer, 2011). Chegar a essa correlação foi uma tarefa complexa, principalmente quando se considera a interação do agente infeccioso, o parasito com o hospedeiro e certamente, também, aos longos períodos de tempo no qual a doença pode se encontrar latente no corpo do hospedeiro (Herrera & Ostrosky-Wegman, 2001).

Dentre os agentes infecciosos que possuem uma correlação comprovada com carcinomas em humanos podemos citar diversos vírus (HIV, HPV, Hepatite B e C, HHV8), bactérias como o *Helicobacter pylori*, e helmintos tais como *Schistosoma haematobium*, *Opisthorchis viverrini*, *Opisthorchis sinensis*, *Taenia solium*, e *Chlonorchis sinensis*, *Toxoplasma gondii*, *Theileria* spp., e *Tricomonas vaginalis* (Khurana et al., 2005; Herrera & Ostrosky-Wegman, 2001). Um dado interessante é que pessoas com carcinomas induzidos por parasitas têm geralmente o quadro clínico revertido depois que a infecção é debelada (Kuper, 2000). Estes aspectos dão suporte aos estudos da interação dos parasitas com manifestações oncogênicas.

O primeiro passo na tentativa de conectar um agente infeccioso com o desenvolvimento de carcinomas foi um estudo publicado em 1910 por Francis Peyton Rous no “Journal of Experimental Medicine”. O pesquisador demonstrou a capacidade de um câncer ter origem infecciosa, inoculando o sobrenadante de células de um sarcoma de uma ave doente para um exemplar sadio (Kuper et al., 2000). A importância deste estudo ajudou o pesquisador a obter prêmio o Nobel de Fisiologia e Medicina em 1966 (Rous, 1910).

Em 1926, outro pesquisador, Johannes Fibiger, também tornou-se ganhador do do

mesmo prêmio Nobel, quando demonstrou a relação entre *Spiroptera neoplastica* (hoje conhecido como *Gongylonema neoplasticum*) e carcinoma gástrico publicado em 1919. Baratas infectadas com *Spiroptera neoplastica* serviram de alimentos para camundongos que posteriormente desenvolveram carcinoma gástrico (Herrera & Ostrosky-Wegmana, 2001). Apesar do trabalho ter recebido diversas críticas de metodologia, sua contribuição foi fundamental para iniciar o desenvolvimento na área. Hoje não há dúvidas que existe relação de câncer com agentes infecciosos (Fried et al., 2011).

A partir de então, principalmente entre os anos de 1951 e 1972 mais de 25 oncovírus foram descritos em mamíferos, aumentando o interesse para estudar as possíveis relações entre causa e efeito de uma infecção e a formação de carcinomas (Kuper et al., 2000). Devido às essas descobertas o governo dos Estados Unidos criou em 1960 o “US Virus Cancer Program” solidificando a hipótese da origem de formação de carcinomas através de infecções (Kuper et al., 2000). O conhecimento atual do processo de carcinogênese indica que a formação de um carcinoma se inicia com o rompimento da regulação da proliferação celular, geralmente causado por fatores genéticos e epigenéticos, os quais culminam na instabilidade do genoma (Loeb & Loeb, 2000; Trosko & Ruch, 1998).

Os mecanismos em que uma infecção podem levar a formação de um carcinoma pode ser descritos de diferentes maneiras, como por exemplo, um agente infeccioso que persiste em um organismo por um tempo prolongado pode induzir uma inflamação crônica. Com o passar do tempo, a infiltração constante de fagócitos para o local da infecção induz a uma produção constante de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (NOS) (Oshima & Bartsch, 1994). Esta produção excessiva e constante de ROS e NOS pode ocasionar danos irreversíveis no DNA, proteínas, membranas de células modulação de atividades enzimáticas e afetando expressão gênica. Todas essas condições podem induzir um quadro de carcinogênese. Já foi também demonstrado que a produção de óxido nítrico não somente tem um papel no efeito citotóxico, mas também pode atuar como um genotóxico, influenciando a formação de células cancerígenas (Oshima et al., 1994; Wink et al., 1991). Devido à inflamação crônica, as células são estimuladas a se dividirem mais, aumentando a probabilidade de erros no DNA e conseqüentemente, proporcionando um aumento de células malignas (Cohen et al., 1991). Outro mecanismo de indução de oncogênes causados por agentes infecciosos é através da modificação de genes do hospedeiro os quais estimulam a ocorrência de mitoses sucessivas ou então inibem os genes supressores de tumor. Esses mecanismos são formas de estimular o crescimento de células cancerosas (Kuper et al., 2000).

Geralmente, o processo de carcinogênese é complexo e a relação parasito hospedeiro

pode estimular o início de diversas etapas que desencadeiam a formação de tumores (Herrera & Ostrosky-Wegmana, 2001). O processo de formação de câncer por agentes infecciosos, em pessoas que sofrem de imunossupressão, principalmente aquelas que são submetidas à inúmeras infecções por vírus, bactérias e fungos geralmente possuem uma forma muito agressiva de divisão celular desordenada (Beral & Newton, 1998).

Durante a infecção dos humanos pelo *Schistosoma*, em relação a localização dos ovos do parasita e o desenvolvimento de patologias ocorre uma distinção importante entre os órgãos alvos. O órgão alvo principal para os ovos de *S. mansoni* que não foram liberados na fezes é o fígado, levando a esquistossomose hepatointestinal e hepatoesplênica. Já o órgão alvo para os ovos de *S. haematobium* que não conseguem ser expelidos na urina é a parede da bexiga, causando a esquistossomose urogenital, que eventualmente pode levar ao desenvolvimento de câncer, entre outras patologias (Amorim et al., 2014).

A ocorrência do carcinoma de bexiga e a presença de esquistossomose urogenital estão intimamente conectadas (Khurana et al., 2005). A infecção prolongada com o *S. haematobium* tem um impacto significativo e específico no sistema uro-genital e possui uma forte associação com o carcinoma de bexiga (Botelho et al., 2011; Abd El-Aal et al., 2015). Atualmente cerca de 20% de todos os pacientes com carcinoma de bexiga podem ter o seu câncer correlacionado à uma infecção crônica e/ou inflamação (Nesi et al., 2015). Existem diversas estatísticas que mostram que nos países desenvolvidos o carcinoma de bexiga é apenas a quinta causa de câncer (dentre os sete tipos de carcinomas mais comuns), enquanto em vários países da África endêmicos para a esquistossomose vesical, o carcinoma de bexiga é o principal tipo de câncer (Botelho et al., 2011; Ferlay et al., 2012; Mostafa et al., 1999). Em algumas regiões onde *S. haematobium* é endêmico, o câncer de alta prevalência nessas regiões é o câncer de bexiga, em primeiro lugar para os homens e em segundo lugar para as mulheres, atrás somente de câncer de mama (Mostafa et al., 1999).

A deposição de ovos de parasita de *S. haematobium* eventualmente leva ao carcinoma de células escamosas da bexiga (CCE) (Hodder et al., 200; Parkin, 2006). Geralmente, os ovos que não são liberados ficam presos nos tecidos, causando resposta inflamatória granulomatosa. Após um período prolongado de infecção, existe a possibilidade de que uma pessoa continuamente infectada desenvolva um tipo de câncer específico e relativamente raro de câncer denominado carcinoma de CCE (Hansel et al., 2013).

O *S. haematobium* foi classificado como um carcinógeno do Grupo 1 (onde há evidência suficiente para correlacionar o parasito com a formação de cancer) pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) (I.W.G.o.t.E.o.C.R.t. Humans, Biological

agents, 2012), embora os mecanismos celulares / moleculares que ligam a infecção por *S. haematobium* com a carcinogênese da bexiga necessitam ser esclarecidos (Botelho et al., 2009). Além disso, cerca de 75% das mulheres infectadas com *S. haematobium* sofrem de esquistossomose genital feminina (EGF) do trato genital inferior (Hoetz, 2009). A EGF resulta da deposição de ovos de esquistossomose no útero, colo do útero, vagina e / ou vulva e com as respostas inflamatórias que se seguem, também aumenta a suscetibilidade ao HIV (Santos et al., 2014; Feldmeier et al., 1994; Jourdan et al., 2011; Kjetland et al., 2006).

A esquistossomose urogenital está associada com hematúria, hidronefrose levando a danos nos rins, formação de tubérculos, pólipos, úlceras, cistite cística, e/ou leucoplasia que são visíveis por exame endoscópico (Mostafa, 1999). A deposição crônica de ovos de *S. haematobium* frequentemente leva a carcinoma de células escamosas da bexiga. Os ovos desses parasitas precisam sobreviver em um ambiente hostil onde sofrem constante agressões do hospedeiro vertebrado. Para tanto, os parasitos secretam fatores solúveis que interagem com as células do hospedeiro (Herrera & Ostrosky-Wegman, 2001) inclusive modulando o seu sistema imune, podendo levar a transformação maligna destas células. Apesar do mecanismo dessa transformação ainda ser desconhecido, fica evidente que esse sistema induz instabilidade genética nestas células do hospedeiro (Herrera et al., 1994). Antígenos solúveis de ovos de *Schistosoma* já foram implicados na progressão de tumores (Ishii et al., 1989). Os cânceres de bexiga mais comuns e que estão relacionados com esquistossomose urogenital são os carcinomas de células escamosas (Botelho et al, 2011; Felix et al, 2008) podendo chegar a uma proporção de até 60-90% em países endêmicos para *S. haematobium* (Fried et al, 2011). Digno de nota que a esquistossomose urogenital é classificada como carcinogênica de categoria 1 pela Agência Internacional de Investigação ao Câncer (Pisani, 1990). Outras enfermidades, como infecções por *Opisthorchis viverrini* e *Clonorchis sinensis* também possuem a mesma classificação (Bouvard et al 2009; Fried et al., 2011). Em relação a esquistossomose urogenital, chega-se até a postular que a infecção com *S. haematobium* aumenta em até 5 vezes a probabilidade de câncer de células escamosas (Chugh et al., 1986). De fato, em regiões onde *S. haematobium* é endêmico, é possível correlacionar maior taxa de carcinoma de células escamosas na população (Eble et al., 2004).

Em relação às diferentes manifestações de carcinomas epiteliais, esses tumores podem ser divididos em carcinomas convencionais e não convencionais. Noventa por cento dos carcinomas epiteliais são do tipo convencional e resultam de lesões papilares ou planas *in situ*, enquanto que os carcinomas não convencionais incluem; carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma e carcinoma de células pequenas (Hansel et al., 2012). A



manifestação do carcinoma de células escamosas é caracterizada por células invasivas contendo desmossomas com formação de queratina (Hansel et al., 2013) na bexiga e, como mencionado acima, está intimamente relacionado com a infecção pelo *Schistosoma*, mais especificamente, com *S. haematobium*. As células escamosas são células epiteliais localizadas na camada externa da epiderme, passam por uma multiplicação rápida conforme a demanda por novas células. As células uroteliais (células escamosas especializadas na uretra) se estendem da pelve renal para a uretra e, sob certas condições, podem formar carcinoma de células escamosas (Ewis et al., 2007). Indivíduos que desenvolveram câncer a partir de uma infecção por *S. haematobium* possuem patologia e histologia de suas células malignas distintas das células malignas de câncer de outras origem (Botelho et al., 2011). Analisando a formação de câncer a partir da infecção por *S. haematobium* foi possível observar que o carcinoma de células escamosas é o mais frequente sendo o carcinoma de células transicionais, o mais comum em outro tipo de câncer não relacionado a infecção por *S. haematobium*. Em países como Egito, no Oriente Médio e alguns países africanos, a principal causa de CCE é devido à infecção crônica de *S. haematobium* (Shokeir et al., 2004). Existem outras causas de CCE que não estão relacionadas com a infecção por *S. haematobium*, como infecção crônica de cálculos urinários, cateteres e outras infecções que representam 20% de todos os SCC em países como o Egito (Bahnson, 1997).

Por outro lado, comparando vermes adultos de *S. haematobium*, com vermes, adultos de *S. mansoni*, verifica-se que vivem na região mesentérica e depositam ovos que podem ficar presos e causar fibrose do fígado. Porém, após exposição prolongada dos ovos, não há casos concretos de formação de tumores malignos hepáticos devido a esta presença demorada de ovos. Porém, levantamentos epidemiológicos recentes têm mostrado uma correlação estatisticamente significantes entre câncer coloretal em populações humana onde *S. mansoni* e *S. japonicum* estão presentes (Madbouly et al., 2007; Qiu et al., 2005; Nakatami et al., 2016).

Entre as diferentes espécies de *Schistosoma*, o *S. haematobium* também é considerada uma espécie negligenciada (Rinaldi et al., 2011; Abd El-Aal et al., 2015). O seu genoma foi sequenciado em 2012 por Young e colaboradores, mas ainda falta um maior número de estudos, ao contrário do *S. mansoni* que tem sido extensivamente estudado. A falta de esclarecimentos dos mecanismos moleculares e genéticos que levam ao desenvolvimento do câncer ainda não foram completamente compreendidos (Sripa et al., 2012; Herrera & Ostrosky-Wegmana, 2001) e isso faz com que esse parasito se torne um modelo interessante de se estudar. Mesmo considerando que no Brasil não existe o hospedeiro invertebrado do gênero *Bulinus* na natureza mas apesar de não existir a transmissão desta espécie (WHO

2012), existem imigrantes que podem estar infectados portanto é um parasito importante nos estudos comparativos entre a espécie *S. mansoni* e uma espécie africana de *S. haematobium*. Os resultados poderão ser relevantes pois comparando a patogenia entre essas duas espécies será possível entender quais os mecanismos determinantes da diferença no processo patológico entre elas.

No presente trabalho, foi examinado como as linhagens de células humanas estabelecidas do urotélio da bexiga humana (HCV29) e dos colangiócitos humanos (H69) respondem, *in vitro*, à presença de ovos de *S. haematobium* ou *S. mansoni*. As células foram co-cultivadas com ovos de ambas as espécies e a proliferação celular avaliada em tempo real através do “xCELLigence” um sistema para o monitoramento em tempo real da viabilidade celular (Ke et al., 2011). O aumento da proliferação de células uroteliais foi evidente quando exposto a ovos de *Schistosoma* sp. Por outro lado, os ovos de ambas espécies de esquistossomose induziram morte celular de colangiócitos. Estes efeitos fenotípicos foram associados à perturbação da expressão de genes envolvidos na oncogênese, transição epitelial-mesenquimatosa e via apoptose.

Mais especificamente, este nosso estudo pretende conhecer e identificar as estruturas e os mecanismos celulares e/ou moleculares que conectam a esquistossomose urogenital e intestinal ao desenvolvimento do câncer de bexiga e como estes possíveis mecanismos que poderiam ser implicados no câncer coloretal. Um conhecimento aprofundado destes mecanismos poderá auxiliar em futuras intervenções para essa grave doença negligenciada, a esquistossomose.

## **2. Materiais e métodos**

### 2.1 Declaração de ética animal e infecção dos camundongos

Hamsters machos da linhagem LVG foram inicialmente comprados de Charles River (Wilmington, MA, USA) e mantidos nas instalações de animais do Instituto de Pesquisa Biomédica (BRI) localizado na cidade de Rockville nos Estados Unidos, a qual é credenciada pela Associação Americana de Acreditação de Cuidados com Animais de Laboratório (AAALAC; # 000779) sendo registrado pela USDA em instalações para animais (51-R-0050). A BRI possui uma Garantia de Bem-estar Animal em arquivo com os Institutos Nacionais de Saúde (NIH) e com o Escritório de Bem-estar Animal de Laboratório (OLAW A3080-01).

A exposição dos hamsters às cercarias de *S. haematobium* e posterior colheita dos tecidos foram aprovadas pelo Comitê de Uso e Cuidados de Animais Institucionais do BRI. Todos os procedimentos empregados foram consistentes com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (número de aprovação do protocolo 09-03).

Os camundongos infectados com a linhagem NMRI de *S. mansoni* (Porto Rico) foram fornecidos pela BRI, de Rockville, MD, USA e mantidos conforme os protocolos seguidos e aprovados pelo Comitê Institucional de Caso Animal e Uso da Universidade George Washington, localizada em Washington DC, Estados Unidos.

### 2.2 Obtenção dos ovos de *S. haematobium* e *S. mansoni* de fígados de hamsters e camundongos.

A obtenção dos ovos a partir dos fígados de animais infectados ocorreu de acordo com a técnica descrita anteriormente por Mann. et al em 2009 e Rinaldi em 2011. *Schistosoma haematobium* é mantido em hamsters e o *S. mansoni* em camundongos. A extração dos fígados de camundongos e de hamsters são realizados da mesma forma e em capela de exaustão. Inicialmente, 3-5 fígados de camundongos (linhagem Balb/C) infectados com *S. mansoni* e 2-3 fígados de hamsters (linhagem Golden syrian) infectados com *S. haematobium* foram dissecados. Após uma breve lavagem em água seguida de uma solução de etanol a 70%, os órgãos foram picados finamente com uma lâmina de bisturi estéril em pequenos pedaços e transferidos para um tubo cônico de 50 ml contendo 45 ml de solução estéril de salina tamponada com fosfato (PBS), 2% de solução antibiótica antimicótica (Life Technologies) e 0,5% de colagenase (Sigma). Os pequenos pedaços de fígados foram

incubados com agitação suave ao longo da noite à 37°C. Após esse período a solução foi centrifugada a 400 g durante 5 minutos e lavados 3 vezes com PBS. Após a última lavagem, o sedimento foi ressuspensão em 25 ml de PBS e foi filtrado por várias vezes em filtros estéreis de 250  $\mu\text{m}$  e 150  $\mu\text{m}$  para a retirada de material biológico. O filtrado final foi centrifugado a 400 g durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensão em 3 ml de PBS, colocado em uma coluna de Percoll, constituída por uma mistura de 8 ml de Percoll (GE Healthcare Bio-Science AB) e 32 ml de sacarose 0,25 M. A solução filtrada foi centrifugado a 800 g durante 10 min. As células de fígado e os debris celulares que permaneceram no topo da coluna de Percoll foram removidos com uma pipeta Pasteur. Os ovos de *Schistosoma* se sedimentaram no fundo do tubo. O pellet contendo os ovos foram lavados 3 vezes com PBS para remoção dos resíduos teciduais.. A purificação adicional dos ovos foi obtida por ressuspensão em 0,5 ml de PBS e aplicação em uma segunda coluna Percoll, preparada misturando 2,5 ml de Percoll com 7,5 ml de sacarose 0,25 M. Finalmente, os ovos isolados foram sedimentados, lavados como antes, contados e mantidos em cultura em DMEM (Meio Dulbecco Modificado de Eagle), 10% de SFB (soro fetal bovino) e 2% de antibiótico-antimicótico a 37°C, 5% em câmara de cultivo contendo CO<sub>2</sub>. A viabilidade dos ovos foi avaliada através da incubação de uma alíquota contendo algumas centenas de ovos colocados na água e sob a luz, os quais liberaram miracídeos. Para os experimentos controles os ovos isolados para serem mortos foram transferidos para tubos Eppendorf e incubados em um bloco de calor a 80°C durante 10 minutos.

### 2.3 Manutenção e plaqueamentos das linhagem de células H69 e HCV29

A linhagem celular H69 de colangiócitos humanos é uma linha de células epiteliais derivadas do ducto biliar humano de um fígado normal [23, 24]. As células H69 foram utilizadas entre as passagens 10 e 30 e foram crescidas em meio de cultivo específico (DMEM 43,82%, 43,82% de DMEM / Ham F12, 10% SFB, suplementado com 1% de adenina, 0,1% de insulina, 0,1% de epinefrina, 0,1% de T3-T, 0,03% de EGF (factor de crescimento epidérmico), 0,03% de hidrocortisona diluída em 4% em DMEM e 1% de PS (penicilina / estreptomicina).

A linhagem celular HCV29 humana é uma linhagem celular derivada de uma célula epitelial de transição não maligna do ureter [25]. As células HCV29 foram utilizadas nas passagens de 10 a 30 e foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de PS.

As passagens de ambas linhagens celulares foram realizadas quando a confluência das células atingia 90% em uma garrafa de cultura de 75 cm<sup>2</sup>. Uma diluição de 1/10 de solução de tripsina foram utilizadas para desprender as células a cada nova passagem. Ambas as linhagens celulares foram rotineiramente testadas para a ausência de micoplasma (dado não mostrado).

#### 2.4 Experimentos de co-cultura de H69 e HCV29 com ovos de *S. haematobium* e *S. mansoni*

Antes da co-cultura com os ovos de *Schistosoma*, as células H69 e HCV29 foram semeadas em placas de 6 poços a uma concentração de  $3 \times 10^4$  células por poço contendo 2 ml de meio de cultura até atingir 80% -90% de confluência, geralmente num período de 12-24 horas. As foram células foram mantidas em meio de cultura diluído a 1/20 com 1% de PBS por 4 h antes da adição dos ovos

Posteriormente, os poços de células foram equipados com inserções Transwell de Corning 6 Well, Membrana de PET de 0,4  $\mu$  m, tratada por TC. A seguir 500 ovos de *S. mansoni* ou *S. haematobium* foram adicionados aos poços das placas inseridas no Transwell. O Transwell assegurou-se de expor as células ao produto excretor do ovo compartilhado num mesmo meio de cultivo porém sem contatos físicos diretos. Os Transwells foram removidos após dois tempos determinados: tempo inicial (2 horas) ou tempo tardio (24 horas). As células foram então recolhidas para isolamento de RNA e análise de expressão de genes conforme descrito abaixo. Células não expostas aos ovos, porém cultivadas nas mesmas condições, foram incluídas como controle.

#### 2.5 Avaliação em tempo real da proliferação celular pelo sistema xCELLigence

A proliferação das células H69 e HCV29 foi avaliada usando o sistema xCELLigence DP (ACEA Biosciences, San Diego, CA, EUA) projetado para monitorar eventos em tempo real. O equipamento mede a impedância elétrica com os microeletrodos interdigitados integrados no fundo da placa de cultura denominados E-placas (detalhes em <http://www.aceabio.com/main.aspx>) [20, 26].

As células H69 foram semeadas com cerca de 5 000 células por poço em E-placas em meio de culturas para H69, cultivadas durante um dia, lavadas com PBS e cultivadas em meio H69 diluído 1/20 em 50% de DMEM e 50% de DMEM /Ham F12 contendo 1% de PS com 0,5% de concentração final de SFB [27] para posterior co-cultura com os ovos.

Uma titulação inicial das células HCV29 determinou o ideal de 20.000 células por poço, para os experimentos subsequentes com a co-cultura dos ovos. As células HCV29 foram semeadas nas E-placas com meio DMEM completo, cultivadas durante um dia, lavadas com PBS e cultivadas em meio DMEM diluído 1/20 para posterior co-cultura com os ovos.

Ambas as linhagens celulares ficaram em meio de cultura incompleto ou seja, meio diluído 1/20 durante 4-6 h. Após esse tempo, as células foram co-cultivadas com os ovos de *S. mansoni* ou *S. haematobium* vivos ou "mortos por calor". Os ovos foram colocados em um dispositivo de inserção com 16 poços selados no fundo com uma membrana de tereftalato de polietileno microporoso (PET) com um tamanho médio de poros de 0,4  $\mu$  m (ACEA Biosciences, San Diego, CA, EUA), ou seja, as células no fundo de cada poço foram expostas aos produtos secretores/excretos (ES) dos ovos colocados em cima da membrana inserida. Os ovos não entraram em contato direto com as células em cultivo.

O crescimento celular foi monitorado em tempo real durante 60 horas. O índice de células normalizadas (IC), foi obtido dividindo o valor IC em cada ponto do tempo de experimentação pelo IC obtido no momento da adição dos ovos. Os dados obtidos foram verificados com a ajuda do software RTCA 1.2 (ACEA). Os valores cruciais de IC normalizados foram importados para análise no Microsoft Excel. O crescimento das células expostas aos ovos foi expresso como a porcentagem do IC normalizado das células cultivadas com ovos em comparação (dividido) com o IC normalizado das células controles incubadas com meios diluídos 1:20. A taxa de crescimento das células de controle foi considerada como sendo 100%. O significado estatístico entre os grupos foi avaliado usando Análise de Variância (ANOVA) e teste t de Student. Os valores de  $P \leq 0,05$  foram considerados significativos.

## 2.6. Análise dos “arrays” dos genes

### **2.6.1 Extração de RNA de células de H69 e HCV29.**

O RNA foi purificado das células através do miRNeasy Mini kit (Qiagen) de acordo com o protocolo do fabricante. De uma forma resumida, 700  $\mu$ l do reagente de lise QIAzol foi adicionado ao “pellet” de células frescas ou congeladas e a solução homogeneizada. A seguir, 140  $\mu$ l de clorofórmio foi adicionado nessa mistura que foi centrifugada a 12.000g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa superior foi transferida para um novo tubo contendo 100% de

etanol. . Depois de lavagens utilizando uma coluna, foi realizada o tratamento de DNase sendo obtido um volume final de 30 – 35 ul de RNA, os quais foram armazenados a -80°C.

### **2.6.2 Síntese de cDNA de células H69 e HCV29.**

A concentração e pureza do RNA foram determinados pelo Nanodrop® e também pelo sistema Agilent 2100 Bioanalyzer®, de acordo com os protocolos dos fabricantes. Todas as amostras foram normalizadas para uma concentração final de 1ug. O cDNA foi feito usando iSCRIPT Advanced cDNA Synthesis Kit para RT-qPCR. As amostras correram em uma máquina de PCR de tempo real em programação determinada pelo fabricante.

O qPCR das amostras foi realizado utilizando-se um Bio-Rad iCycler iQ5 com uma ativação inicial de 95 °C durante 10 min seguido de 40 ciclos de 95°C durante 10 segundos a 60°C durante 1 min. Uma análise de curva de fusão de 55°C a 95°C e 0,5°C de incremento de temperatura a cada 30 segundos foi incluída no final da corrida. O perfil de expressão gênica foi investigado usando-se RNA total (300-500ng) com o uso de PrimePCR™.

Os ensaios de qPCR foram realizados com o objetivo de investigar genes das seguintes vias:

1) Oncogenes e genes supressores de tumores. (“SAB Target List” em <http://www.bio-rad.com/en-uk/prime-pcr-assays/predesigned-plate/sybr-green-oncogenes-tumor-suppressor-genes-sab-target-list-h96>);

2) Transição epitelial para mesenquimatososa (EMT) (SAB Target List em <http://www.bio-rad.com/en-uk/prime-pcr-assays/predesigned-plate/sybr-green-epithelial-mesenchymal-transition-emt-sab-target-list-h96>)

3) Apoptose (SAB Target List em <http://www.bio-rad.com/en-uk/prime-pcr-assays/predesigned-plate/sybr-green-apoptosis-sab-target-list-h96>).

Esses arrays pré-designados permitem a detecção de até 84 genes, os quais incluem genes relacionados ao controle de contaminação do DNA, controle de qPCR positivo, controle de qualidade de RNA e o controle da transcrição reversa.

Os valores de Ct foram exportados e analisados usando o software Prime PCR Analysis (<http://www.bio-rad.com/en-us/sku/genestudy-1-0-030-1023-primepcr-analysis-software>). A quantificação relativa foi realizada usando-se o método 2- $\Delta\Delta$ Ct empregando um painel de 3 genes de manutenção: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, hipoxantina fosforibosiltransferase 1 e a proteína “TATA-box binding”. Os grupos controles constituídos de células que foram somente cultivadas na ausência dos ovos foram utilizados como

amostras de calibração. Pelo menos três repetições biológicas foram realizadas em todos os experimentos desenvolvidos.

## 2.7 Análise dos genes das vias de gênicas

A via funcional e a análise regulatória “upstream” (URA) dos genes das vias de investigação expressos diferencialmente (DEGs) foram realizadas com a ajuda do software Ingenuity Pathway Analysis (IPA QIAGEN Redwood City, [www.qiagen.com/ingenuity](http://www.qiagen.com/ingenuity)). O conjunto de dados obtidos das análises de PCR em tempo real foi importado para o IPA com a finalidade de definir os genes que foram significativamente desregulados para positivamente “up regulated” ou negativamente “down regulated”. Os valores de P foram configurados para serem significativos com valores igual ou menor que 0,05. O IPA usou o Teste Exato de Fisher de Right-Tailed para determinar quais funções biológicas e caminhos canônicos estavam significativamente associados aos genes de interesse em comparação com toda a base de conhecimento do IPA (<http://www.ingenuity.com/science/knowledge-base>).

Com a finalidade de determinar as previsões sobre o processo de fluxo ascendente, o IPA forneceu um escore z (z-score >2 ou <-2) foi considerado significativo. Este cálculo levou em conta o efeito direcional de uma molécula ou um processo em outra, e a direção da mudança de moléculas no conjunto de dados, isto é, a medida estatística da correlação entre a direção de relacionamento e a expressão gênica. ([https://chhe.research.ncsu.edu/wordpress/wp-content/uploads/2015/10/IPA-Data-Analysis-training-slides-2016\\_04.pdf](https://chhe.research.ncsu.edu/wordpress/wp-content/uploads/2015/10/IPA-Data-Analysis-training-slides-2016_04.pdf)).

As redes criadas foram classificadas, dependendo do número de genes significativamente expressos, os quais estão também presentes nas listas de doenças significativas e relevantes. Portanto, uma rede é considerada uma representação gráfica das relações moleculares entre moléculas. As moléculas são representadas como nós, e a relação biológica entre dois nós é representada como uma borda (linha). Todas as arestas são suportadas por pelo menos uma referência da literatura, ou informações canônicas armazenadas na Base de conhecimento do IPA. A intensidade da cor dos nós indica o grau de upregulation (vermelho) ou downregulation (verde). A versão de avaliação do software IPA foi utilizada.



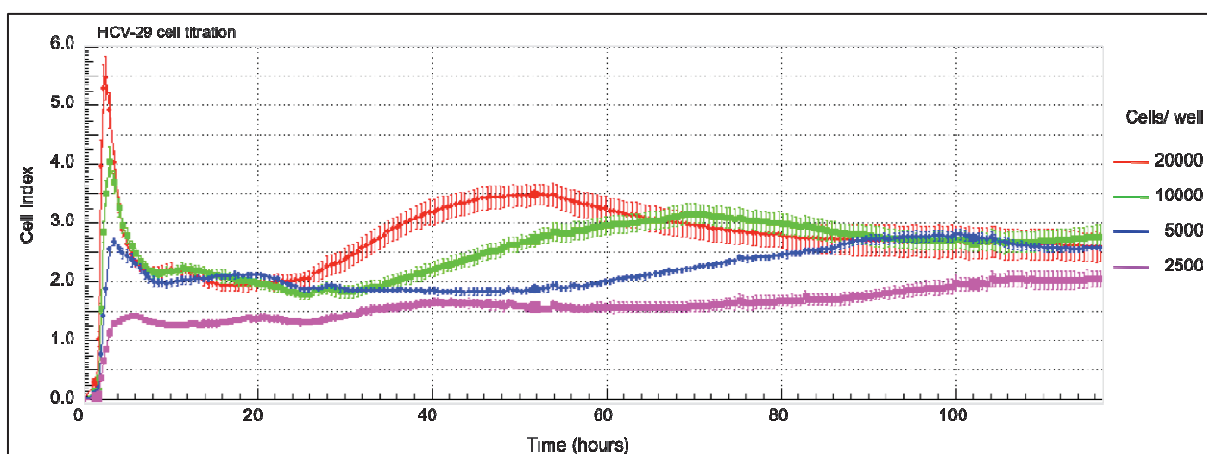
## 2.8 Análise estatística

Para os estudos da expressão gênica, os valores de “fold change” para os genes diferencialmente expressos ( $P \leq 0,05$ ) dos três arrays dos genes analisadas (descritos acima) através da análise do PCR em tempo real foram exportados para GraphPad Prism 6.02, agrupados e plotados em um “vulcano” plot. Os genes com valor de  $P \leq 0,05$  e fold change significativo  $> 1,5$  ou  $< -1,5$  para genes desregulados positivamente e negativamente, respectivamente, foram incluídos nas análises subsequentes.

### 3. Resultados:

#### 3.1 Os ovos de *Schistosoma* promoveram o crescimento das células uroteliais, mas inibiram crescimento de colangiócitos

O ensaio de proliferação de celular em tempo real foi utilizado para medir o efeito da co-cultura de ovos de *Schistosoma* com duas linhagem de células epiteliais humanas informativas. Ao contrário das células de colangiócitos humanas H69 (Matchimakul et al., 2015), esse estudo mostra pela primeira vez as respostas proliferativas da linhagem de células uroteliais humanas HCV29 pela abordagem de ensaio de células em tempo real xCELLigence. Foi realizada uma titulação para estabelecer parâmetros de ensaio, que inclui a densidade celular de semeadura (figura 10). É digno de nota que, independentemente do número inicial de células semeadas, todas as condições testadas mostraram um atraso de pelo menos 24 horas antes do índice de células (IC) ter aumentado, sendo 20 000 células por poço a condição que atingiu um IC de 3,0 dentro de aproximadamente 20 horas. Foi utilizada uma densidade celular de semeadura de 20 000 células por poço em análises subsequentes.

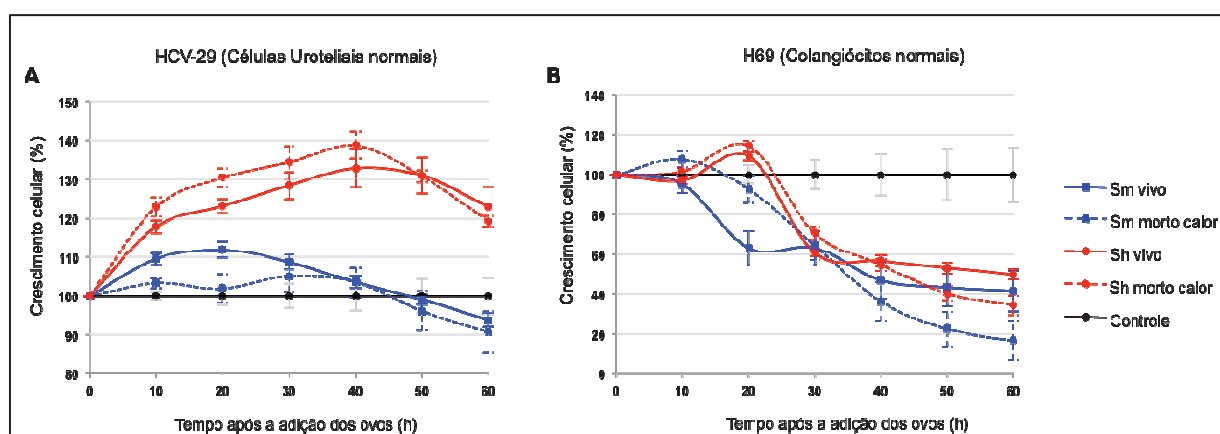


**Figura 10. Ensaio de titulação celular para células uroteliais humanas HCV29.** Para analisar a cinética de proliferação de células em tempo real para células HCV29, um ensaio de titulação celular semeando 2500, 5000, 10000 e 20000 células por poço foi realizado. Os dados não processados que mostram o índice de células ao longo do tempo para cada número de célula testado por poço, conforme indicado, são apresentados conforme exibido pelo software RTCA 1.2 (ACEA). Todas as curvas representam as médias de três replicatas experimentais e os desvios padrão são mostrados como barras de erro em cada ponto de dados.

As células HCV29 foram semeadas em placas de (ExCELLigence, ACEA Biosciences) e cultivadas até o CI (índice celular) atingir 1,0. Posteriormente, as células passaram por duas a quatro horas em meio incompleto, antes da co-cultura com ovos de *Schistosoma*, como descrito acima. Dentro de aproximadamente 10 horas após a adição dos

ovos, a proliferação das células acelerou, de forma dependente da concentração de ovos adicionado, em comparação com células cultivadas sem ovos. Os ovos de *S. mansoni* e *S. haematobium* ambos induziram a proliferação celular em células uroteliais (HCV29), embora os ovos de *S. haematobium* induziram proliferação marginalmente maior, (~30%) quando comparado com *S. mansoni* (~22%), (figura 11A). Por outro lado, ovos controle (mortos por calor) mostraram efeito semelhante aos ovos vivos na proliferação celular das células uroteliais (Figura 11A). Paralelamente, as células H69 foram co-cultivadas na presença de ovos de *Schistosoma* e, em contraste com o HCV29, os ovos de *Schistosoma* (vivos ou mortos) inibiram a proliferação celular de colangiócitos (Figuras 11B). Ambos os ovos das espécies reduziram  $\geq 30\%$  de crescimento celular (Figura 11B).

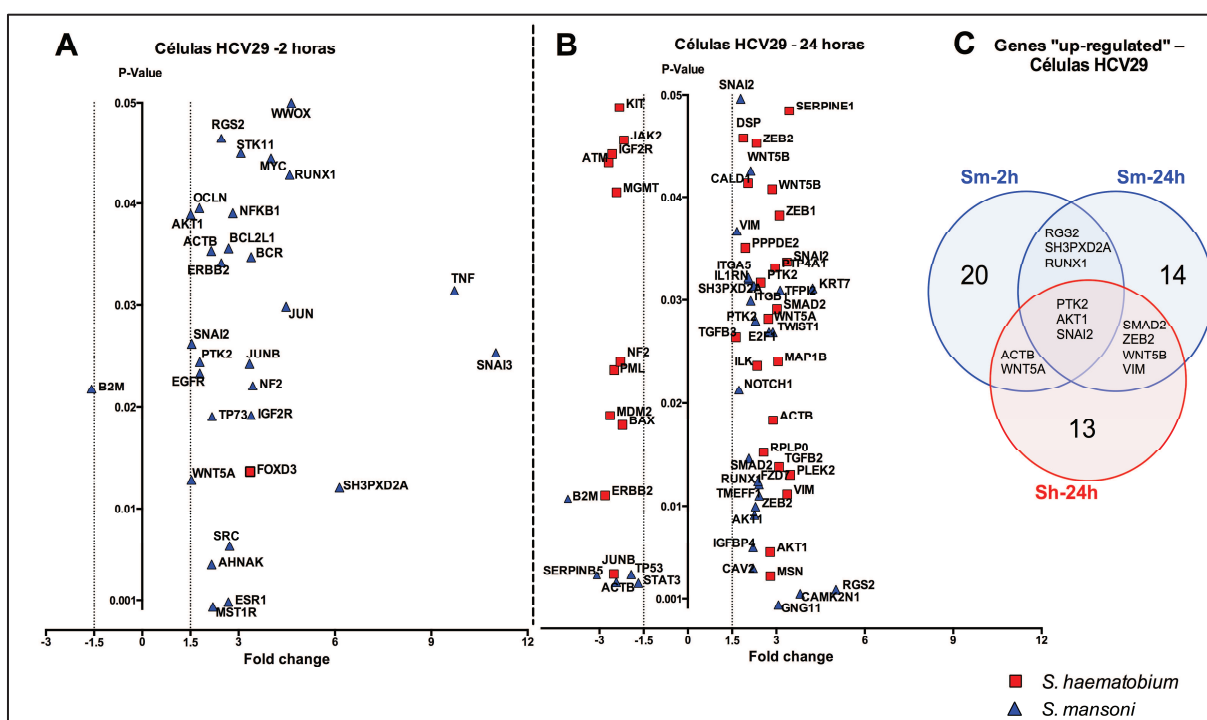
Para resumir, o efeito dos ovos sobre a proliferação celular depende principalmente do tipo de célula, isto é, células uroteliais (HCV29) ou colangiócitos (H69) e, aparentemente, não nas espécies de *Schistosoma*. Surpreendentemente, esse efeito proliferativo foi independente da viabilidade dos ovos.



**Figura 11. Proliferação de células uroteliais e colangiócitos em resposta a ovos de *Schistosoma* monitorados em tempo real utilizando o sistema xCELLigence. Co-cultura sem contato de ovos de *Schistosoma mansoni* e *S. haematobium* com células HCV29 (A) ou células H69 (B) ao longo do tempo após a adição dos ovos. O crescimento celular é expresso como porcentagem de Índice de Células Normalizadas de células co-cultivadas com ovos em comparação com as células controle (taxa de crescimento da célula de controle = 100%). Todas as curvas representam as médias de pelo menos três replicatas experimentais e os desvios padrão são mostrados como barras de erro em cada ponto de dados. Os asteriscos azuis e vermelhos indicam níveis de significância ( $P \leq 0,01$ ) das proporções de crescimento de células cultivadas com *S. mansoni* e ovos de *S. haematobium*, em comparação com células de controle cultivadas na ausência de ovos, respectivamente. Sm vivo: ovos vivos de *S. mansoni*; Sm calor morto: ovos de *S. mansoni* mortos por calor; Sh vivo: ovos vivos de *S. haematobium*; Sh calor morto: ovos de *S. haematobium* mortos por calor.**

### 3.2. A desregulação gênica foi dependente da espécie de *Schistosoma* e do tempo de contato dos ovos

Considerando que nas células uroteliais co-cultivadas com ovos de *S. mansoni* ocorreu uma rápida a desregulação de diversos genes (2h após a interação), na cultura com ovos de *S. haematobium* ocorreu apenas a desregulação de um gene (FOXD3 - repressor transcricional) (figura 12A). No grupo com ovos de *S. mansoni* co-cultivados com células uroteliais houve “up regulation” de 28 genes e “down regulation” de 1 gene (B2M - um componente de moléculas de MHC de classe I.) 2h após a interação. O TNF e o SNAI3 foram os genes mais desregulados em células HCV29 co-cultivadas com ovos de *S. mansoni* com “fold change” de 9.72 e 11.01, respectivamente. É digno de nota que o gene do receptor 1 de estrogênio (ESR1) foi desregulado 2,68 vezes em células HCV29 co-cultivadas com ovos de *S. mansoni* no tempo de 2h.

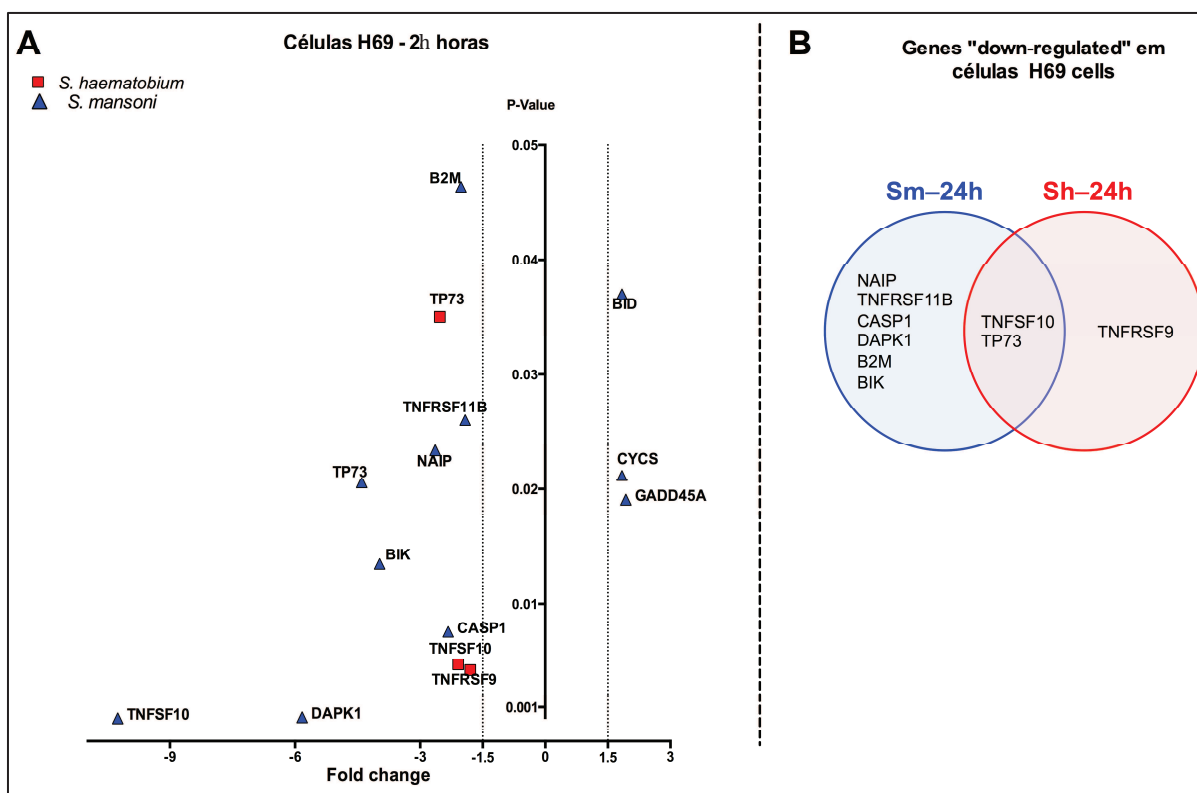


**Figura 12** Ovos de *Schistosoma* induziram a desregulação de oncogenes, supressores de tumores e genes relacionados com EMT em células HCV29. Gráficos do tipo “Volcano plot” mostram a resposta de genes da célula HCV29 a co-cultura sem contato com *S. mansoni* ou ovos de *S. haematobium* como indicado, para 2 horas (A) ou 24 horas (B). A expressão do gene foi medida usando matrizes de genes de qPCR projetadas para avaliar transcritos associados a oncogênese e EMT. São mostrados genes significativamente desregulados ( $P < 0,05$ ) com  $> \pm 1,5$  “fold change”. (C). O Diagrama Venn compilado apenas com as condições de cultura de células HCV29 que compartilham genes expressos diferencialmente (GDE) - somente os genes desregulados foram compartilhados entre as 3 condições indicadas.

As células uroteliais (HCV29) expostas aos ovos de *S. mansoni* durante 24h exibiram 29 genes desregulados (figura 12B). Curiosamente, neste "tempo tardio", os ovos de *S. mansoni* induziram a regulação negativa do gene supressor de tumor TP53 em 1,92 vezes

(figura 12B). A expressão de 7 genes desregulados no período de 2h continuou alterada no tempo de 24 (ACTB, AKT1, B2M, RGS2, RUNX1, SH3PXD2A, SNAI2) fig. 12C. No tempo de 24h os ovos de *S. haematobium* modificaram a expressão de vários genes quando comparados com o tempo de 2h; 33 genes foram desregulados no total (figura 12B) e a expressão de 7 genes foi modificada por *S. mansoni* e ovos de *S. haematobium* no ponto de tempo de 24h (ACTB, AKT1, SMAD2, SNAI2, VIM, WNT5B, ZEB2). Vale ressaltar que os ovos de *S. mansoni* desregularam positivamente 3,39 vezes a expressão do Receptor do Fator de Crescimento 2 da Insulina (IGF2R) nas células uroteliais no tempo de 2h e no ponto do tempo tardio. O mesmo gene foi 2,57 vezes reduzido por *S. haematobium*. No total, 64 genes foram desregulados por ovos *S. mansoni* e *S. haematobium* quando co-cultivados com células uroteliais.

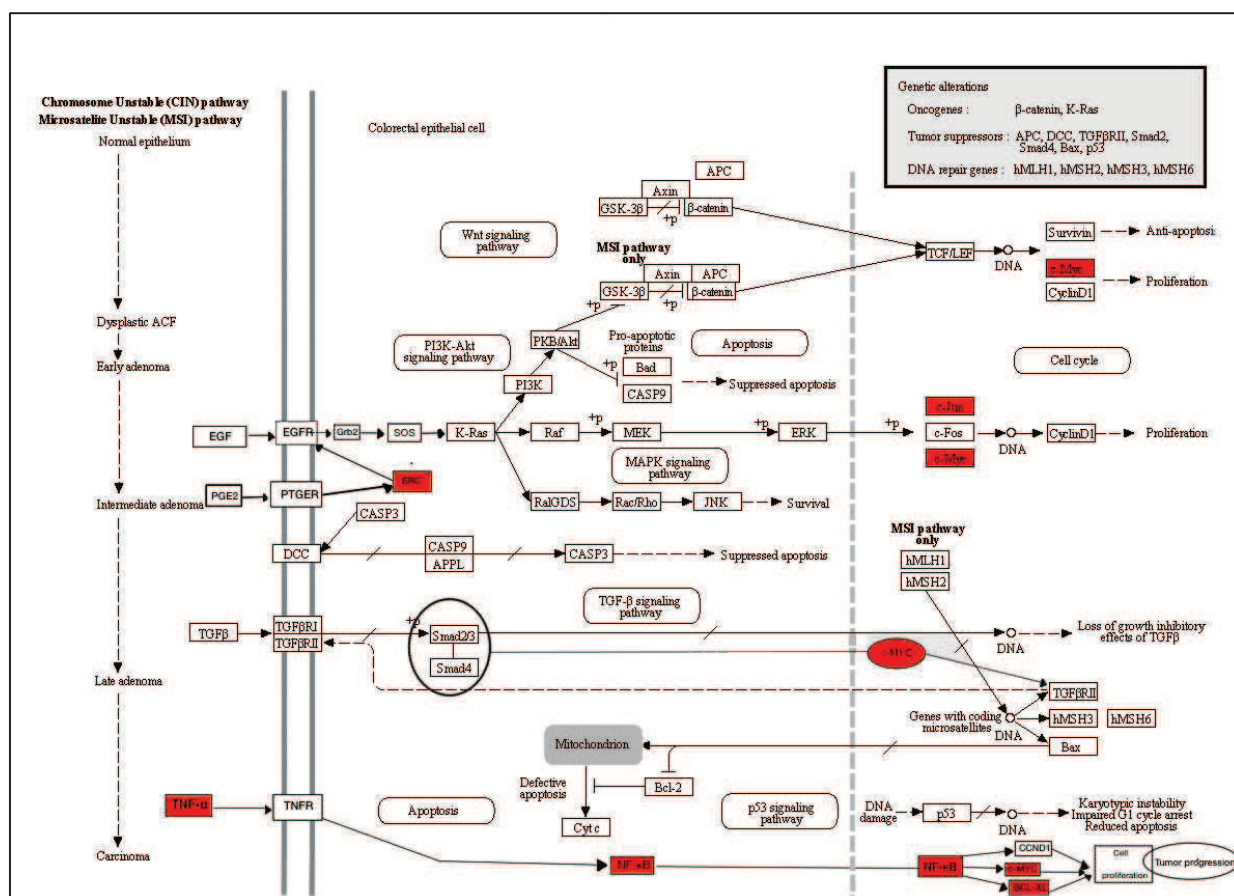
Dado que os ovos de *Schistosoma* inibiram o crescimento celular da linha celular de colangiócitos humanos H69, foi utilizado um arranjo de genes de apoptose para avaliar a desregulação da expressão gênica em células expostas a ovos. Doze genes foram desregulados quando as células foram co-cultivadas com *S. mansoni* e ovos de *S. haematobium* por 24 h (figura 13). Enquanto os genes TNFSF10 e TP73 foram desregulados por ambas as espécies de *Schistosoma*, os ovos de *S. mansoni* induziram a regulação positiva de três genes, BID, CYCS e GADD45A, e os ovos de *S. haematobium* induziram a regulação negativa de TNFRSF9, TNFSF10 e TP73 (figura 13).



**Figura 13** Ovos de *Schistosoma* induziram a desregulação de genes relacionados à apoptose em células H69. Gráficos do tipo “Vulcano Plot” mostram resposta do gene da célula H69 em co-cultura sem contato com *S. mansoni* ou ovos de *S. haematobium* como indicado em 24 horas. A expressão de genes foi medida usando matrizes de genes qPCR projetadas para avaliar transcritos associados a apoptose. São mostrados genes significativamente desregulados ( $P < 0,05$ ) com  $> \pm 1,5$  “fold change”. Painel B. Diagrama de Venn compilado apenas com as condições de cultura de células H69 que compartilham genes expressos diferencialmente (GED) - somente os genes desregulados negativamente foram compartilhados entre as 2 condições indicadas.

### 3.3 Os genes envolvidos no Via de Sinalização da Metástase do Câncer Coloretal foram afetados por ovos de *S. mansoni* em células uroteliais humanas.

Para detectar vias significativamente alterados em células expostas a ovos de *Schistosoma* spp, uma análise de vias funcionais de genes diferencialmente expressos foi realizada. No tempo de 2h após a incubação de células na presença de ovos do parasito, os genes associados à via de sinalização da metástase do Câncer Coloretal foram “upregulated” (figura 14) (Colussi et al., 2013). Esta via foi significativamente aumentada (com um escore z-positivo de 7,5 e um valor p de  $2,58 \times 10^{-08}$ ) mostrando uma cascata de genes positivamente desregulados com valores de p significativos estatisticamente. O TNF foi altamente desregulado 9.72x, o MYC foi desregulado 4.59x, JUN foi desregulado 4.48x, NFkB foi desregulado 2.82x, SRC foi desregulado 2.72x e BCL2 foi desregulado 2.69x (Tabela 1).



**Figura 14.** Desregulação significativa de genes envolvidos na Via de Sinalização de Câncer Colorectal em células uroteliais. A via foi significativamente desregulada no tempo de 2h após interação com células de HCV29 co-cultivadas por *S. mansoni*. Todos os genes desregulados positivamente (genes em vermelho).

**Tabela 1.** Genes diferencialmente expressos a Via de Sinalização do Câncer Colorectal identificados em células HCV29 expostas a ovos de *Schistosoma haematobium* ou *S. mansoni*. \*Fold change and *P* value, regulação positiva (↑), regulação negativa (↓), NS: não significante.

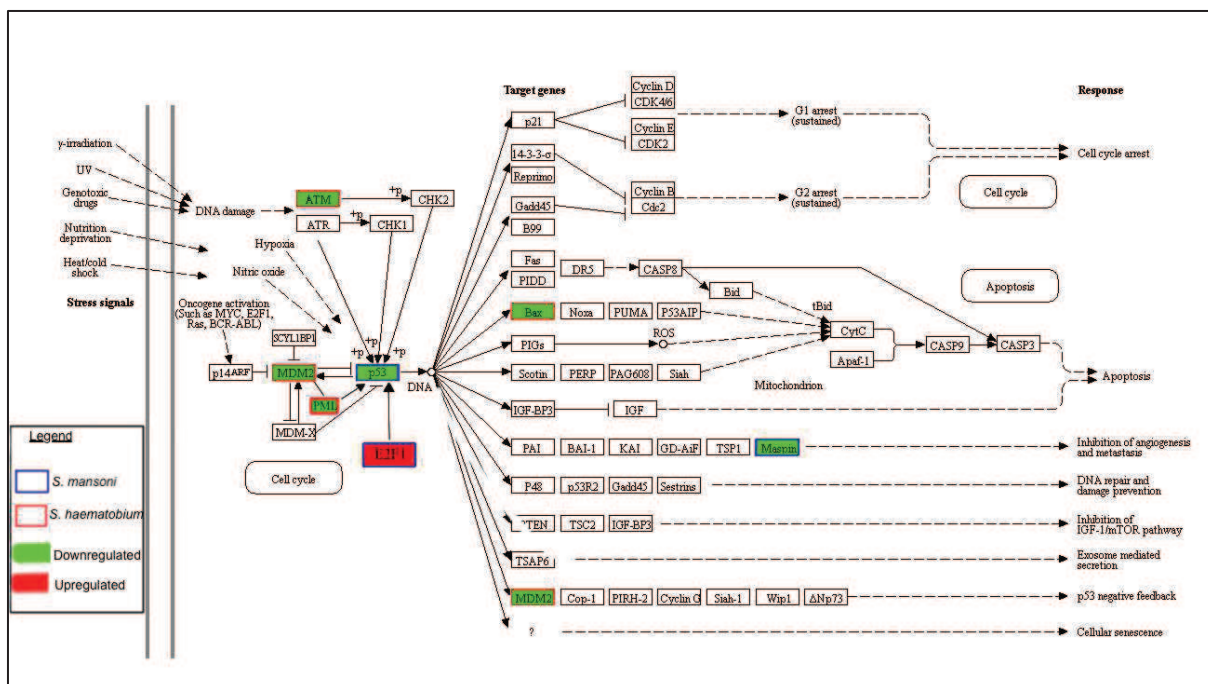
Nome do Gene	HCV29 linhagem celular*		Discrição do Gene	Referência
	Ovos Sh	Ovos Sm		
<b>TNF</b> (Tumor Necrosis Factor)	NS	↑ 9.72 (p=0.031)	Citocina pró-inflamatória que foi implicada em câncer colorectal e a regulação positiva tem sido associada à promoção do crescimento, proliferação e metástase do tumor	Popivanova et al., 2008 Colussi et al., 2013; Wang et al., 2009
<b>RUNX1</b> (Runt Related Transcription Factor 1)	NS	↑ 4.59 (p=0.042)	Fator de transcrição com funções de supressão de tumor associadas à promoção do crescimento de células tumorais de pele, oral, mama e ovário.	Wang et al., 2009
<b>MYC</b> (Proto-Oncogene)	NS	↑ 4.01 (P=0.044)	Fator de transcrição envolvido na proliferação celular, inibição da diferenciação celular e apoptose. Sobre expresso em mais de 50% de todos os cânceres, é considerado um marcador de metástase.	Rennoll et al., 2015; Morton et al., 2013; Wahlstrom et al., 2015; Dang et al., 2012
<b>JUN</b> (Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit)	NS	↑ 3.34 (P=0.029)	O fator de transcrição envolve a progressão do ciclo celular, sobrevivência celular, transformação e proliferação. A expressão excessiva de JUN foi relacionada à repressão p53.	Eferl et al., 2003; Schreiber et al., 1999; Brenner et al., 1989

<b>NFKB1</b> (Nuclear Factor Kappa B subunit 1)	NS	↑ <b>2.82</b> ( <i>P</i> = 0.039)	Fator de transcrição responsável pela regulação de ~ 300 genes envolvidos com processos imunes, de crescimento e inflamação. Expresso em muitos tipos de câncer, incluindo coloretal, mama, fígado, próstata e rim.	Colomer et al., 2017; Serasanambati et al., 2016
<b>SRC</b> (Proto-Oncogene, Non-Receptor Tyrosine Kinase)	NS	↑ <b>2.72</b> ( <i>P</i> = 0.006)	Proto-oncogene expresso em câncer coloretal, pâncreas e próstata, implicado na progressão tumoral, migração celular, angiogênese e metástase.	Liu et al., 2015; Chang et al., 2008; Nagathihalli et al., 2012 Talomonti et al., 1993
<b>BCL2</b> (regulador apoptose) de	NS	↑ <b>2.69</b> ( <i>P</i> = 0.035)	Regulador anti-apoptótico envolvido em vários linfomas. Quando sobre expressa, tem sido associada a baixa sobrevivência do linfoma difuso de células B	Hu et al., 2013; Kim et al., 2016; Hwang et al., 2017

### 3.4 A via associada ao supressor tumoral P53 foi desregulado negativamente tanto por ovos *S. mansoni* quanto por de *S. haematobium*

Após a ativação, a via de sinalização p53 é responsável por centenas de alvos de transcrição que levam a inibição do crescimento celular, indução de apoptose e regulação do metabolismo em resposta a vários sinais de estresse, incluindo a ativação oncogênica (Vousden & Lane, 2007; Lane & Levine, 2010). A via associada ao supressor de tumor P53 foi significativamente reduzida nas células uroteliais (HCV29) (figura 15) quando expostas aos ovos de *S. mansoni* e *S. haematobium*. Nota-se, diferentes conjuntos de genes dentro da via foram alterados pelas duas espécies de parasito. Por exemplo, *S. mansoni* reduziu a expressão de TP53 (“fold change” de -1,92x, p-valor = 0,0033) E2F1 (“fold change” de 2,75, p-valor = 0,0268) e SERPINB5 (“fold change” -3,09 e p-valor de 0,0032) genes, enquanto *S. haematobium* induziu a regulação do ATM (“fold change” de -2,69 e p-valor de 0,0433), MDM2 (fold change -2,64 e p-valor de 0,0187), PML (“fold change” 0 de -2,50 e p-valor de 0,0231) e BAX (“fold change” de -2,22 e p-valor de 0,0178) (Tabela 2).





**Figura 15.** Desregulação significativa da via P53 em células uroteliais expostas aos ovos *S. haematobium* ou *S. mansoni* no tempo de 24 horas. Via P53 destacando genes desregulados positivamente ou negativamente em vermelho ou verde, respectivamente. Os genes afetados por *S. mansoni* ou *S. haematobium* são indicados por quadrado azul ou vermelho, respectivamente.

**Tabela 2.** Genes expressos diferencialmente associados a Via de Sinalização P53 identificado em células HCV29 expostas aos ovos de *Schistosoma haematobium* ou *S. mansoni*. \*Fold change and *P*-value, regulação positiva (↑), regulação negativa (↓), NS: não significante.

Nome do Gene (ID)	HCV29 linhagem celular*		Descrição Gene	Referência
	Ovos <i>Sh</i>	Ovos <i>Sm</i>		
<b>SERPINB5</b> (Serpine Family B, member 5)	NS	↓ -3.09 ( <i>P</i> =0.003)	Inibidor da invasão de células cancerígenas, metástase e angiogênese. Expressão negativa associada a tumores de mama, próstata, tireóide e pele.	Bodenstine et al., 2012; Nosaka et al., 2015; Torre et al., 2011; Goulet et al., 2011
<b>ATM</b> (Ataxia Telangiectasia Mutated, Serine/Threonine kinase)	↓ -2.69 ( <i>p</i> =0.043)	NS	Mediador em cascata de quinase que controla a resposta ao dano do DNA, a progressão do ciclo celular, a recombinação do DNA e a apoptose. Regulação negativa inibe a p53 e a parada do ciclo celular.	Khanna et al., 2001; Shiloh, 2003; Abraham, 2004; Petersen et al., 2017; Kastan et al., 1992
<b>MDM2</b> (MDM2 Oncogene)	↓ -2.64 ( <i>P</i> =0.018)	NS	A ubiquitina E3 ligase que degrada P53 está sob o controle de p53 em um loop de feedback regulatório (Fig. 4)	Momand et al., 1992; Oliner et al., 1993; Leng et al., 2003; Mendoza et al., 2014; Wu et al., 1993; Leng et al., 1993
<b>PML</b> (Promyelocytic Leukemia)	↓ -2.50 ( <i>p</i> =0.023)	NS	Proteína nuclear envolvida na progressão do ciclo celular, resposta ao dano do DNA e apoptose, isto é, regulador chave na via p53. Camundongos deficientes em PML apresentam defeitos apoptóticos.	Sahin & Lallemand-Breitenbach, 2014; Bernaldi et al., 2008; Bernaldi & Pandolfi, 2007; Liu et al., 2017; Hofmann & Will 2003; Liu et al., 2017
<b>BAX</b> (BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator)	↓ -2.22 ( <i>P</i> =0.017)	NS	Principal promotor da apoptose é regulado pela p53, tem envolvido a tumorigênese ao interferir na morte celular.	RefSeq, Jul 2008; LeBlanc et al 2002

<b>TP53</b> (Tumor Protein P53)	NS	↓ -1.92 (P=0.003)	Supressor de tumor, fator de transcrição chave que inibe o desenvolvimento do câncer, sendo inativado na maioria dos tumores. Responde ao estresse celular ativando genes responsáveis pelo reparo do DNA, interrompimento do ciclo celular, anti-angiogênese, apoptose e autofagia	Freed-Pastor & Prives, 2012; Lane & Levin e, 2010; Berkers et al., 2013; Golo et al., 2014; Levine, 1997
<b>E2F1</b> (E2F Transcription Factor 1)	NS	↑ 2.75 (P=0.026)	Fator de transcrição que regula a progressão do ciclo celular, envolvido na oncogênese ou supressão tumoral dependendo de sinais celulares. Expressão positivamente desregulada é associada à transformação oncogênica em fibroblastos embrionários de roedores e tumorigênese.	Bertoli et al., 2013; Engelmann & Putzer 201; Xu et al., 2017

### 3.5 Receptor de estrogênio e beta-estradiol é desregulado por ovos de *Schistosoma*

O papel do estrogênio como fator de risco para o desenvolvimento da carcinogênese e do câncer tem sido associado ao aumento do risco com câncer (Santos et al., 2014). O receptor de estrogênio (ESR1) foi desregulado 2,68 vezes (p-value 0.001) em células uroteliais co-cultivadas com ovos de *S. mansoni* no ponto de 2h (figura 12A), mas não em células co-cultivadas com ovos de *S. haematobium*. No entanto, quando a análise regulatória a montante (URA) de genes expressos diferencialmente (DEGs) foi realizada tanto no receptor de estrogênio quanto no de beta estradiol, foram preditos para ser inibidos na co-cultura de células uroteliais durante 24 h. Apenas na cultura com ovos de *S. haematobium* houve a inibição prevista em células co-cultivadas com esta espécie (figura 16).

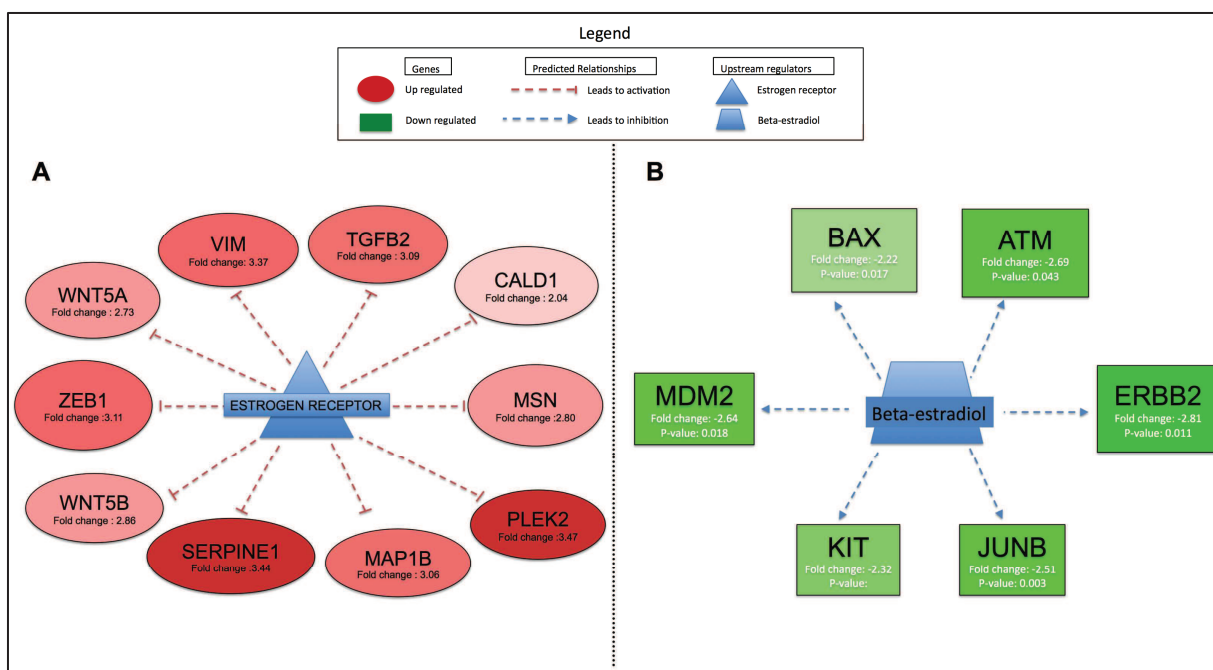


Figura 16. Os receptores de estrógeno e beta-estradiol são previstos a serem inibidos em células uroteliais de HCV29 co-cultivadas com ovos de *S. haematobium* por 24 horas. A “Upstream regulatory analysis” (URA) de genes expressos diferencialmente (GEDs) previu que o receptor de estrógeno e beta-estradiol ( $P < 0,05$ ) a serem inibidos na co-cultura de células HCV29 durante 24 h com ovos de *S. haematobium*. (A). Os genes significativamente desregulados são mostrados em vermelho. Esses genes, alterados negativamente (símbolo T) pelo receptor de estrogênio, foram regulados em células HCV29 co-cultivadas com ovos de *S. haematobium* por 24 horas (linhas tracejadas vermelhas indicam que esses genes foram ativados no conjunto de dados). Portanto, a análise URA previu significativamente o receptor de estrogênio como um regulador “upstream” inibido desse conjunto de genes. (B). Os genes desregulados negativamente são mostrados em verde. Estes genes, positivamente desregulados (seta) pelo beta-estradiol, foram alterados negativamente em células HCV29 co-cultivadas com ovos de *S. haematobium* por 24 horas (linhas tracejadas azuis indicam que esses genes foram inibidos em nosso conjunto de dados). Portanto, a análise URA previu significativamente o beta-estradiol como um regulador “upstream” inibido desse conjunto de genes no conjunto de dados.

#### **4. Discussão**

Doenças infecciosas são causadores de mais de 20% dos cânceres no terceiro mundo (I.W.G.o.t.E.o.C.R.t. 2012; , Martel et al., 2012, Zhu et al.,2016). Cerca de 12 agentes patogênicos, incluindo os mais estudados como vírus do papiloma humano, vírus de Epstein-Barr e vírus da hepatite B que são agentes bem conhecidos de infecções associadas ao câncer. Infecções com vários parasitas eucariotas também estão associadas à carcinogênese (I.W.G.o.t.E.o.C.R.t. 2012, Martel et al., 2012). A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) classifica a infecção com os trematódeos transmitidos por ingestão de peixe mal cozido *Opisthorchis viverrini* e *Clonorchis sinensis*, ambos parasitos bem estabelecidos do fígado e o *S. haematobium* como agentes cancerígenos biológicos do Grupo 1 (I.W.G.o.t.E.o.C.R.t. 2012).

Além de prejudicar diretamente o desenvolvimento, a saúde e a prosperidade das populações infectadas, a infecção desses parasitos leva ao colangiocarcinoma (CCA) (câncer de duto biliar) (*O. viverrini* e *C. sinensis*) e carcinoma de células escamosas (CCE) da bexiga urinária, (*S. haematobium*) (I.W.G.o.t.E.o.C.R.t. 2012). Por outro lado, infecção por outros parentes filogeneticamente próximos, também trematódeos do filo Platelintos, não foram comprovados na indução do câncer. Essas diferenças sugerem que existem metabólitos específicos dos helmintos contribuem diretamente para a tumorigênese e/ou que somente certos tecidos ou órgãos, direta ou indiretamente expostos ao parasita ou aos metabólitos derivados destes, são suscetíveis à malignidade induzida por infecção (Martel et al., 2012).

A esquistossomose urogenital (EUG), causada por essas infecções prolongadas de *S. haematobium*, está associada a uropatia, hematuria, patologia da parede da bexiga, hidronefrose e doença renal. Os mecanismos fisiológicos que ligam a UGS ao câncer de bexiga ainda não foram bem esclarecidos. Este estudo investigou os efeitos do estabelecimento de cultura celulares de células epiteliais derivadas de dois tecidos: 1) HCV29 estabelecida a partir do urotelio humano e 2) H69, estabelecida a partir de colangiócitos, na presença de ovos de *S. haematobium* ou *S. mansoni*. As células epiteliais do trato urinário e biliar mostraram respostas diferenciadas aos ovos de *S. haematobium* e *S. mansoni*. A resposta proliferativa e as mudanças associadas nas respostas das vias de sinalização dessas células foram aparentemente influenciadas tanto pela origem tecidual das células epiteliais como pelas espécies de *Schistosoma* no co-cultivo.

Nossos resultados mostram a interação de ovos de *S. mansoni* e *S. haematobium* em co-culturas com células uroteliais (mostraram crescimento celular) e colangiócitos (mostraram morte celular).

Através dos experimentos com xCELLigence foi visto que ambos os ovos de *S. mansoni* and *S. haemabotium* induziram crescimento celular em células uroteliais quando comparados com o células controle sem a presença de ovos.

Nesse contexto, a indução de crescimento celular, *in vitro*, por trematódeos já foi descrito na literatura. Por exemplo, produtos excretados de ovos de *O. viverrini* e *C. sinensis*, causadores de colangiocarcinoma em humanos, já foram descritos induzindo crescimento celular em fibroblasto de camundongo e de células epiteliais humanas (Thuwajit et al. 2004; Sirpa et al., 2007; Kim et al., 2008; Smout et al., 2009).

Botelho et al., 2009(a). demonstraram que ovos de *S. haematobium* induzem, em culturas de células, proliferação celular, resistência a morte celular (apoptose) e capacidade migratórias irregulares. É importante ressaltar que, células previamente tratadas com produtos excretados por ovos de *S. haematobium*, quando injetados em camundongos com sistema imune deprimido, causam desenvolvimento de câncer nesses camundongos (Botelho et al., 2009b). Crescimento celular, através de produtos excretados por ovos de *S. haematobium*, também foi visto em células uroteliais humanas e células endoteliais bovinas (El-Awady et al., 2001).

Em relação ao *S. mansoni*, foi visto que também excretam fatores que causam crescimento celular em cultura de células, já que os granulomas são regiões ricas em citocinas e fatores de crescimentos que estimulam proliferação tecidual e fibroplasia em tecidos humanos (Boloukhere et al., 1993). Além do mais, antígeno total do ovo (todas as proteínas presentes no ovo) de *S. mansoni* estimula proliferação de fibroblasto *in vitro* (Wyler and Tracy, 1982). Em contraste, os resultados com as células colangiócitos mostraram que ambas as espécies de ovos causaram diminuição no proliferação celular. Assim como a indução de proliferação celular pode ser o mecanismo de ação de preferência de alguns parasitos, a indução de apoptose igualmente é uma via utilizada por distintos patógenos para garantir a sobrevivência (Carneiro-Santos, 2000; Rutitzky et al., 2003). Mesmo quando os ovos foram inativados através de aquecimento o efeito continuou. Pereira et al., 2015 mostram resultados contraditórios usando antígeno total do ovo de *S. mansoni* em linhagem de colangiócitos murinos, com crescimento celular na presença de antígeno solúvel do ovo. Alguns fatores que podem ter influenciados esses resultados conflitantes são a espécie de mamífero doadores de célula e a concentração de antígeno utilizado. Rumbley e colaboradores (2001) mostram

como a proliferação ou morte celular de splenócitos depende da concentração de antígeno solúvel do ovo (SEA). Concentrações mais baixas do antígeno induziram crescimento celular e concentrações mais altas causaram morte celular. Células hepáticas estreladas, também sofrem morte celular na presença de SEA de *S. japonicum* (Duan et al., 2013; Wang et al., 2014; Liu et al., 2013)

Algumas das disparidades entre os resultados de diferentes autores pode ser devidas ao uso de antígeno total do ovo ao invés de usar o SEA nos experimentos. Aston and colaboradores, 2000, demonstraram que ovos secretam proteínas de tamanhos diferentes e proteases distintas quando se compara com o produto total com o produto excretado do ovo.

O programa “Ingenuity Pathway Analysis” possibilitou analisar prováveis vias canônicas expressas por células uroteliais e colangiócitos nos tempos de 2h e 24h. A via de sinalização de metástases colorretal foi identificada a partir de genes diferencialmente expressos em células uroteliais quando em co-cultura com ovos de *S. mansoni* no tempo de 2h. Apesar dos nossos resultados terem sido obtidos através de experimentos *in vitro* existem dados epidemiológicos em trabalhos de campo que corroboram nossos achados. Da mesma forma em que já está aceito por grande parte da comunidade científica a associação entre *S. haematobium* e câncer de bexiga, existem evidências crescentes proposta por alguns autores em fases iniciais de investigação, que indicam a mesma associação entre infecção prolongada por *S. mansoni* e câncer colorretal (Al-Mashat et al., 2001; Abdelkareem et al., 2014). Vale lembrar que *S. haematobium* é considerado um carcinogênico do grupo 1 (carcinogênico aos humanos) (IARC, 2012) enquanto *S. mansoni* pertence atualmente ao grupo 3, onde atualmente não existem evidência suficientes para determinar efeito cancerígeno. Não obstante parece existir uma possível correlação, pois onde existe incidência maior de câncer colorretal em áreas altamente endêmicas de *S. mansoni*. Ainda, a população afetada desencadeia a doença em idade mais cedo quando comparado com regiões onde não há presença de *S. mansoni* (Madbouly et al., 2006). Além disso, esta associação ocorre também com *S. japonicum*, relacionado ao câncer de colon na República da China (Xu & Su, 1984; Qui et al., 2005), reforçando ainda mais evidência entre a correlação entre as esquistossomoses e o desenvolvimento de câncer.

Deve-se destacar que, nenhuma via foi identificada nas células uroteliais cultivadas por *S. haematobium*. Somente um gene foi expresso diferencialmente, o FOXD3 foi positivamente desregulado 3.36 vezes. Esse gene é um fator de transcrição que atua essencialmente como células progenitoras de pluripotência e de diferenciação, regulando a transição celular da pluripotência “naïve” para um estado pluripotente (Plank-Bazinet &

Mundell, 2016; Respuela et al., 2016) Em relação ao desenvolvimento de cancer o FOXD3 tem sido relacionado como desregulado positivamente em cancer renal e endometrial e negativamente desregulado em cancer do cervix (Li et al., 2013).

O número de genes diferencialmente expressos nas células urotélias no tempo de 2h, após interação, variam imensamente entre *S. mansoni* e *S. haematobium*. Possivelmente o mecanismo de ação entre as duas espécies são distintas, onde apesar de ambas causarem proliferação celular, no tempo inicial, o *S. haematobium* não causa modificações genéticas nas células uroteliais, contrapondo com *S. mansoni*, que causa a modificação na regulação de diversos genes.

Os metabolitos semelhantes a estradiol já foram caracterizados em *S. haematobium* e na urina durante a esquistossomose urogenital (Gouveia et al 2015). Recentemetne foi previsto vias e enzimas que estão envolvidas na produção desses metabólitos e enfatizaram seus efeitos potenciais sobre a desregulação da expressão do gene p53 do gene supressor do tumor durante a esquistossomose urogenital (Vale et al 2017). As mutações de p53, no contexto de câncer de bexiga induzida por esquistossomose urogenital na Angola, juntamente com glicanos sialilados, foram sugeridas como biomarcadores substitutos da carcinogênese da bexiga associada à infecção por *S. haematobium*, evidenciando vínculos entre infecção e desenvolvimento de câncer (Santos et al 2014). Os ovos de *S. haematobium* expressam os antígenos sialyl-Lewis e sLex em mimetismo de glicosilação de leucócitos humanos, que podem desempenhar um papel na colonização e na disseminação da doença. Os supressores de tumores, incluindo P53 e os genes envolvidos na via P53 e os inibidores de metaloprotease, foram regulados de forma negativa quando expostos a ovos de schistosoma. Nos cânceres da bexiga, mutações recorrentes ocorrem em >30 outros genes envolvidos na proliferação celular, diferenciação, estabilidade genética e, especificamente, regulação do ciclo celular, regulação da cromatina e via de sinalização da quinase (N. Cancer Genome Atlas Research, 2014). A regulação neagativa do P53 é característica de câncer em geral e SCC da bexiga em particular. A via de sinalização P53 é responsável por centenas de metas transcricionais a jusante envolvidas na inibição do crescimento celular, indução de apoptose e regulação do metabolismo em resposta à ativação do oncogene e outros sinais [Vousden et al 2007; Lane et al., 2010). Em um modelo de camundongo e câncer de bexiga relacionado à infecção, as anormalidades uroteliais da bexiga induzidas por ovos de *S. haematobium* dependem do p53 e varia de acordo com o sexo [Honeycutt et al., 2014 & 2015].

A análise de regulação a montante (URA) de genes expressos diferencialmente (DEGs) previu que a exposição de células uroteliais a ovos de *S. haematobium*, mas não a *S.*

*mansoni*, modulou a expressão negativa do receptor de estrogênio. Já foi descrito anteriormente esse fenômeno em outros modelos experimentais mostrando que um antagonista da molécula tipo estradiol ao estradiol reprime a atividade transcricional do receptor de estrogênio (ER) (Gouveia et al 2015). Os extratos de óvulos de *S. haematobium* induziram fenótipos semelhantes a tumores em células cultivadas. Para concluir, as células H69 e HCV29 apresentaram respostas diferenciais aos ovos de *S. haematobium* e *S. mansoni*, apoiando a hipótese de que a natureza cancerígena da infecção com *S. haematobium* está relacionada à sua interação com o epitélio especializado da bexiga humana. As respostas proliferativas dessas células foram influenciadas tanto pela origem tecidual das células epiteliais como pelas espécies esquistossomóticas. Estudos focalizados dos mecanismos moleculares subjacentes à associação entre UGS e SSC da bexiga podem ser esperados para melhorar as perspectivas para gerenciar esse câncer de doença tropical negligenciado.



## **5 Conclusão**

1. Ambas as espécies de *Schistosoma* estudadas causam proliferação celular quando os ovos de ambas as espécies são co-cultivadas com linhagem de células de colangiócitos (H69).
2. Ovos de ambas as espécies de *Schistosoma* estudadas causam morte celular quando co-cultivadas com linhagem de células colangiócitos (H69).
3. Aparentemente a espécie do ovo não é o único fator determinante para a progressão da doença, sendo que o local de deposição do ovo também parece exercer papel no desenvolvimento do tumor.
4. Nos tempos iniciais de co-cultura é evidente que *S. mansoni* é responsável pela maioria dos genes expressos nas células HCV29, sendo que aparentemente o *S. mansoni* é capaz de causar modulação gênica nessas células de forma mais rápida do que o *S. haematobium*.
5. *Schistosoma mansoni* também foi o único que apresentou a via de cancer coloretal desregulada no tempo inicial de interação com células HCV29.
6. Após 24 horas, células HCV29 co-cultivadas com *S. haematobium* apresentaram um grande número de genes desregulados, enquanto que as células co-cultivadas com *S. mansoni* praticamente ficou estabilizada quando comparadas no tempo de 2 horas.
7. No tempo de 24 horas, também foi possível observar que as células co-cultivas com ambas as espécies de *Schistosoma* desregulou negativamente a via relacionado ao P53. Os genes responsáveis por essa desregulação foram diferentes dependendo da espécie de *Schistosoma*.
8. O receptor de estrógeno e beta-estradiol são previsto a serem inibidos em células uroteliais de HCV29 co-cultivadas com ovos de *S. haematobium* no tempo de 24 horas

## **6 Referências**

### **Referências da Introdução**

Agatsuma, T. (2003). Origin and evolution of *Schistosoma japonicum*. *Parasitology International*, 52(4), 335-340. doi:10.1016/s1383-5769(03)00049-7

Attwood SW, Fatih F a, Upatham ES. DNA-sequence variation among *Schistosoma mekongi* populations and related taxa; phylogeography and the current distribution of Asian schistosomiasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;2(3):e200.

Botelho M, Ferreira AC, Oliveira MJ, Domingues A, Machado JC, da Costa JMC. *Schistosoma haematobium* total antigen induces increased proliferation, migration and invasion, and decreases apoptosis of normal epithelial cells. *Int J Parasitol.*; 2009;39(10):1083–91.

Botelho M, Oliveira P, Gomes J, et al. (2009) Tumorigenic effect of *Schistosoma haematobium* total antigen in mammalian cells. *Int J Exp Pathol* 2009;90:448 –53. □

Botelho, M. C., Alves, H., Barros, A., Rinaldi, G., Brindley, P. J., & Sousa, M. (2015). The role of estrogens and estrogen receptor signaling pathways in cancer and infertility: the case of schistosomes. *Trends in Parasitology*, 31(6), 246-250. doi:10.1016/j.pt.2015.03.005

Botelho, M. C., Oliveira, P. A., Lopes, C., Costa, J. M., & Machado, J. C. (2011). Urothelial dysplasia and inflammation induced by *Schistosoma haematobium* total antigen instillation in mice normal urothelium. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 29(6), 809-814. doi:10.1016/j.urolonc.2009.09.017

Brindley, P. J., & Hotez, P. J. (2013). Break Out: Urogenital Schistosomiasis and *Schistosoma haematobium* Infection in the Post-Genomic Era. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(3). doi:10.1371/journal.pntd.0001961

Brown DS: Freshwater snails of Africa and their medical importance. (1994) In CRC Press. Volume 2. 2nd edition. Edited by Taylor and Francis ltd. London: 208–247.

Callisto M, Moreno P, Gonçalves JF, Ferreira WR, Gomes CLZ. Malacological assessment and natural infestation of *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) by *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907) And *Chaetogaster limnaei* (K. Von Baer, 1827) in an urban eutrophic watershed. *Braz J Biol* 2005;65(2):217–28.

Carvalho O de D. Intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* in Brazil. (1992) *Mem Inst Oswaldo Cruz.*; 87 Suppl 4:307-9.

Cioli D, Pica-Mattoccia L, Basso A, Guidi A. Schistosomiasis control: praziquantel forever? (2014) *Mol Biochem Parasitol.*;195(1):23–9.

Doenhoff, M.J., Hagan, P., Cioli, D., Southgate, V., Pica-Mattoccia, L., Botros, S., Coles, G., Tchuem Tchuente, L.A., Mbaye, A., Engels, D. (2009). Praziquantel: its use in control of schistosomiasis in sub-Saharan Africa and current research needs. *Parasitology* 136, 1825e1835.

- El-Aal, A. A., Bayoumy, I. R., Basyoni, M. M., El-Aal, A. A., Emran, A. M., El-Tawab, M. S., Diab, T. M. (2015). Genomic instability in complicated and uncomplicated Egyptian schistosomiasis haematobium patients. *Molecular Cytogenetics*, 8(1), 1. doi:10.1186/s13039-014-0104-5
- Fallon, P.G., Doenhoff, M.J., (1994). Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51, 83e88.
- Favre T C , OS Piere , Zani LC , Ferreira JM , Domas GG, Beck LH, Barbosa CS. A longitudinal study on the natural infection of *Biomphalaria straminea* and *B.glabrata* by *Schistosoma mansoni* in an endemic area of schistosomiasis in Pernanbuco, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002; 97: 465-475.
- Hotez, P. J., Fenwick, A., & Kjetland, E. F. (2009). Africa's 32 Cents Solution for HIV/AIDS. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(5). doi:10.1371/journal.pntd.0000430
- King, C. H. (2010). Parasites and poverty: The case of schistosomiasis. *Acta Tropica*, 113(2), 95-104. doi:10.1016/j.actatropica.2009.11.012
- King, C.H., Dickman, K., Tisch, D.J., 2005. Reassessment of the cost of chronic helminthic infection: a meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis.
- Kjetland EF, Ndhlovu PD, Mduluzi T, Gomo E, Gwanzura L, Mason PR, et al.(2005) Simple clinical manifestations of genital schistosoma *Haematobium* infection in rural Zimbabwean women. *Am J Trop Med Hyg.*; 72(3):311–9.
- Kuper H, Adami HO, Trichopoulos D. 2000 Infections as a major preventable cause of human cancer. *J Intern Med.*; 248(3):171–83.
- Liang YS, Bruce JI, David AB (1987). Laboratory cultivation of schistosome vector snails and maintenance of schistosome life cycles. *Proc. 1st Sino. Am. Symp.* 1:34-48.
- Lopes, T. A., Nobushige, S. Y., Silva, A. P., Goveia, C. D., Enk, M. J., Sampaio, I., . . . Luis F. Da S. Rodrigues Filho. (2017). Distribution and identification of the genus *Biomphalaria* Preston (1910): important insights into the epidemiology of Schistosomiasis in the Amazon region. *Revista da Biologia*, 17(2), 31-37. doi:10.7594/revbio.17.02.06
- Lutz A. Observações sobre a evolução do *Schistosoma mansoni*. *Revista Brasileira de Ciências Sociais.* 1999;41(3):145–147.
- Massara CL, Carvalho Odos S, Caldeira RL, Jannotti-Passos LK, Schall VT. First report on the presence of *Biomphalaria straminea* in the municipality of Jaboticatubas, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97 Suppl 1:27-9.
- Mbabazi PS, Andan O, Fitzgerald DW, Chitsulo L, Engels D, Downs JA. Examining the Relationship between Urogenital Schistosomiasis and HIV Infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(12):e1396. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0001396>
- Melman, S.D., Steinauer, M.L., Cunningham, C., Kubatko, L.S., Mwangi, I.N., Wynn, N.B., Mutuku, M.W., Karanja, D.M., Colley, D.G., Black, C.L., Secor, W.E., Mkoji, G.M., Loker,

E.S., (2009). Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*. PLoS Negl. Trop. Dis. 3, e504.

Njiokou F, Teukeng E, Bilong Bilong CF, Njiné T, Same Ekobo A: Experimental study of the compatibility between *Schistosoma haematobium* and two species of *Bulinus* in Cameroon. Bull Société Pathol Exot 2004, 97:43–46.

Palasio, R.G.S. Estudo da variabilidade genética e morfológica de *Biomphalaria tenagophila* Orbigny 1835 (Gastropoda, Planorbidae) procedente do Vale do Rio Ribeira do Iguape e do Litoral Norte do Estado de São Paulo. Projeto de Mestrado, UNICAMP, São Paulo, 2011; 32p

Paraense WL 1981. *Biomphalaria occidentalis* sp. n. from South America (Mollusca Basommatophora Pulmonata). Mem Inst Oswaldo Cruz 76: 199-211. □

Paraense WL, Corrêa LR. A potential vector of *Schistosoma mansoni* in Uruguay. Mem Inst Oswaldo Cruz 1989; 84: 281-288.

Paraense, W. L. & Corrêa, L. R. Probable extension of schistosomiasis to southernmost Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 82: 577, 1987.

Paraense, W. L. & Corrêa, L. R. Variation in susceptibility of populations of *Australorbis glabratus* to a strain of *Schistosoma mansoni*. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 5: 15-22, 1963.

Paraense, W. L. Distribuição dos caramujos no Brasil. In: Modernos conhecimentos sobre a esquistossomose mansônica. Biblioteca da Academia Mineira de Medicina, 1986, 117-128.

Pila E. A, Li H, R. Hambrook J. R, Wu X, and Hanington P. C. (2017) Schistosomiasis from a Snail's Perspective: Advances in Snail Immunity. Trends in Parasitology, Vol. 33, No. 11

Ridi, R. E., Tallima, H., Selim, S., Donnelly, S., Cotton, S., Santana, B. G., & Dalton, J. P. (2014). Cysteine Peptidases as Schistosomiasis Vaccines with Inbuilt Adjuvanticity. PLoS ONE, 9(1). doi:10.1371/journal.pone.0085401

Rollinson D, de Clercq D, Sacko M, Traoré M, Sene M, Southgate VR, Vercruyse J. Observations on compatibility between *Bulinus truncatus* and *Schistosoma haematobium* in the Senegal River Basin. Ann Trop Med Parasitol. 1997 Jun;91(4):371-8.

Rollinson, D., Stothard, J.R. & Southgate, V.R. Interactions between intermediate snail hosts of the genus *Bulinus* and schistosomes of the *Schistosoma haematobium* group. Parasitology, 2001; 123, 245 – 260.

Rosin MP, Saad el Din Zaki S, Ward a J, Anwar W a. Involvement of inflammatory reactions and elevated cell proliferation in the development of bladder cancer in schistosomiasis patients. Mutat Res [Internet]. 1994;305(2):283–92.

Salawu OT, Odaibo AB. Preliminary study on ecology of *Bulinus jousseaumei* in *Schistosoma haematobium* endemic rural community of Nigeria. Afr J Ecol. 2012; 51(3):441 6. □

Sarvel AK, Oliveira AA, Silva AR, Lima AC, Katz N (2011). Evaluation of a 25-year-program for the control of schistosomiasis mansoni in an endemic area in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.*;5(3):e990.

Sène M, Southgate VR, Vercruyse J: *Bulinus truncatus*, intermediate host of *Schistosoma haematobium* in the Senegal River Basin (SRB). *Bull Société Pathol Exot* 2003, 97:29–32.

Simões LF, Anunciato E, Camargo F, Bastos LD, Neves MF, Carvalho JF De, Magalhães LA, Zanotti-Magalhães EM. Case Report Article Susceptibility of Argentinean *Biomphalaria tenagophila* and *Biomphalaria straminea* to infection by *Schistosoma mansoni* and the possibility of geographic expansion of mansoni schistosomiasis. 2013; 46(September):611–6.

Southgate VR, de Clercq D, Sène M, Rollinson D, Ly A, Vercruyse J. Observations on the compatibility between *Bulinus* spp. and *Schistosoma haematobium* in the Senegal River basin. *Ann Trop Med Parasitol.* 2000 Mar;94(2):157-64.

Steinmann P, Keiser J, Bos R, Tanner M, Utzinger J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect Dis.* 2006 Jul;6(7):411-25.

Tebeje, B. M., Harvie, M., You, H., Loukas, A., & McManus, D. P. (2016). Schistosomiasis vaccines: where do we stand? *Parasites & Vectors*, 9(1), 528. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1799-4>

The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015.2. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>

Tuan R, Ohlweiler FP, Gardini R, Palasio S, Zanna RD, Cristina M. Pattern of genetic divergence of mitochondrial dna sequences in *biomphalaria tenagophila* complex species based on barcode and morphological analysis. 2012. INTECH Open Access Publisher

Tucker, M. S., Karunaratne, L. B., Lewis, F. A., Frietas, T. C., and Liang, Y-S. Schistosomiasis, in *Current Protocols in Immunology* 19.1.1-19.1.57, John Wiley and Sons, Inc., (R. Coico, Ed).

Tucker, M. S., Karunaratne, L. B., Lewis, F. A., Frietas, T. C., and Liang, Y-S. Schistosomiasis, in *Current Protocols in Immunology* 19.1.1-19.1.57, John Wiley and Sons, Inc., (R. Coico, Ed) doi: 10.1002/0471142735.im1901s103.

Van Der Werf MJ, De Vlas SJ, Brooker S, Looman CWN, Nagelkerke NJD, Habbema JDF, et al. Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. *Acta Trop.* 2003; 86(2-3):125–39.

Vercruyse, J., Southgate, V. R., Rollinson, D., De Clercq, D., Sacko, M., De Bont, J. & Mungomba, L. M. Studies on transmission and schistosome interactions in Senegal, Mali and Zambia. *Tropical and Geographical Medicine*, 1994; 46, 220-226.

Voge, M., Price, Z., & Bruckner, D. A. (1978). Changes in Tegumental Surface of *Schistosoma mekongi* Voge, Bruckner, and Bruce 1978, in the Mammalian Host. *The Journal of Parasitology*, 64(5), 944. doi:10.2307/3279545

Watson JM. Ecology and distribution of *Bulinus truncatus* in the Middle East; with comments on the effect of some human activities in their relationship to the snail host on

the incidence of bilharziasis haematobia in the Middle East and Africa. Bull World Health Organ. 1958;18(5-6):833-94.

World Health Organization WHO, 2016, website link: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>.

World Health Organization. (2017). World Health Statistics. ISBN 978 92 4 069267 1

### **Referências do Capítulo 1**

Adema, C.M. et al. (1992) A comparative study of hemocytes from six different snails: morphology and functional aspects. J. Invertebr. Pathol. 59, 24–32 □

Adema, C.M. et al. (2017) Whole genome analysis of a schistosomiasis-transmitting freshwater snail. Nat. Commun. Published online May 16, 2017. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms15451>

Ataev, G. et al. (2016) The influence of trematode infection on the hemocyte composition in *Planorbarius corneus* (Gastropoda, Pulmonata). Invertebr. Survival J. 13, 164–171 □

Azevedo, C. M., Borges, C. C., & Andrade, Z. A. (2006). Changes induced in *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) following trials for artificial stimulation of its internal defense system. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 101(Suppl 1), 199-203. doi:10.1590/s0074-02762006000900031

Basch PF, DiConza JJ 1976. The miracidium-sporocyst transition in *Schistosoma mansoni*: surface changes in vitro with ultrastructural correlation. J Parasitol 60: 935-941.

Bayne, C., 1983. Molluscan immunobiology. In: Saleuddin, A.S.M., Wilbur, K.M. (Eds.), The Mollusca. Academic Press, San Diego, pp. 408–486.

Bayne, C.J., Buckley, P.M., DeWan, P.C., 1980. Macrophagelike hemocytes of resistant *Biomphalaria glabrata* are cytotoxic for sporocysts of *Schistosoma mansoni* in vitro. J. Parasitol. 66, 413–419. □

Cheng, T.C. (1975) Functional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes. Ann. N. Y. Acad. Sci. 266, 343–379 □

Cooper EL, Rinkevich B, Uhlenbruck G, Valembois P (1992) Invertebrate immunity: another viewpoint. Scand J Immunol 35: 247–266. PMID: 1535984 □

Garcia, A. B., Pierce, R. J., Gourbal, B., Werkmeister, E., Colinet, D., Reichhart, J., . . . Coustau, C. (2010). Involvement of the Cytokine MIF in the Snail Host Immune Response to the Parasite *Schistosoma mansoni*. PLoS Pathogens, 6(9). doi:10.1371/journal.ppat.1001115

Hanington, P.C. et al. (2010) Role for a somatically diversified lectin in resistance of an invertebrate to parasite infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107, 21087–21092 □

Hauton C, Smith VJ (2007) Adaptive immunity in invertebrates: a straw house without a mechanistic foundation. Bioessays 29: 1138–1146. PMID: 17935208 □

- Huang, S., Cao, Y., Lu, M., Peng, W., Lin, J., Tang, C., & Tang, L. (2017). Identification and functional characterization of *Oncomelania hupensis* macrophage migration inhibitory factor involved in the snail host innate immune response to the parasite *Schistosoma japonicum*. *International Journal for Parasitology*, 47(8), 485-499. doi:10.1016/j.ijpara.2017.01.005
- Humphries, J.E. and Yoshino, T.P. (2008) Regulation of hydrogen peroxide release in circulating hemocytes of the pleurobiontic snail *Biomphalaria glabrata*. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 554–562
- Jeong KH, Lie KJ, Heyneman D (1983) The ultrastructure of the amebocyte-producing organ in *Biomphalaria glabrata*. *Dev Comp Immunol* 7(2):217–228 Kurtz & Franz, 2004; ;
- Kurtz J (2004) Memory in the innate and adaptive immune systems. *Microbes Infect* 6: 1410–1417. □ PMID: 15596128 □
- Kurtz J (2005) Specific memory within innate immune systems. *Trends Immunol* 26: 186–192. PMID: 15797508 □
- Kurtz J, Franz K (2003) Innate defence: evidence for memory in invertebrate immunity. *Nature* 425: □37–38. PMID: 12955131
- Larson, M. K., Bender, R. C., & Bayne, C. J. (2014). 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*, 44(6), 343-353. doi:10.1016/j.ijpara.2013.11.004
- Lie KJ, Heyneman D, Jeyarasasingam V, Mansour N, Lee HF, Lee HA, Kostanian N (1975) The life cycle of *Echinoparyphium ralphaudyi* sp. n. (Trematoda: Echinostomatidae). *J Parasitol* 61:59–65
- Lie KJ, Jeong KH, Heyneman D (1979) Immune Responses in Parasitic □ *Infections* (Soulsby, E. J. L., ed.), 211–270 CRC Press. □
- Lie, K. J., Heyneman, D. & Richards, C. S. (1977a). *Schistosoma mansoni*: temporary reduction of natural resistance in *Biomphalaria* induced by irradiated miracidia of *Echinostoma paraensei*. *Experimental Parasitology* 43, 54–62.
- Lie, K. J., Heyneman, D. & Richards, C. S. (1977b). Studies on resistance in snails: interference by nonirradiated echinostome larvae with natural resistance to *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. *Journal of Invertebrate Pathology* 29, 118–125.
- Lie, K., Heyneman, D., Lim, H., 1975. Studies on resistance in snails: specific resistance induced by irradiated miracidia of *Echinostoma lindoense* in *Biomphalaria glabrata* snails. *Int. J. Parasitol.* 5, 627–631.
- Lie, K., Heyneman, D., Lim, H., 1975. Studies on resistance in snails: specific resistance induced by irradiated miracidia of *Echinostoma lindoense* in *Biomphalaria glabrata* snails. *Int. J. Parasitol.* 5, 627–631.

- Lim, H. K & Heyneman, D. (1972) Intramolluscan inter-trematode antagonism: a review on factors influencing the host- parasite system and its possible role in biological control. *Adv. Parasitol.*, 10: 191-268.
- Little TJ, Kraaijeveld AR (2004) Ecological and evolutionary implications of immunological priming in invertebrates. *Trends Ecol Evol* 19: 58–60. PMID: 16701227 □
- Locker, A. E., Emery, A. M., Kane, R. A., Walker, A. J., Mayer, C. D., Mitta, G., . . . Jones, C. S. (2012). Early Differential Gene Expression in Haemocytes from Resistant and Susceptible *Biomphalaria glabrata* Strains in Response to *Schistosoma mansoni*. *PLoS ONE*, 7(12). doi:10.1371/journal.pone.0051102
- Lodes, M.J. and Yoshino, T.P. (1990) The effect of schistosome excretory-secretory products on *Biomphalaria glabrata* hemo- cyte motility. *J. Invertebr. Pathol.* 56, 75–85 □
- Lodes, M.J. et al. (1991) Isolation and functional characterization of snail hemocyte-modulating polypeptide from primary spor- ocysts of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 49, 1–10 □
- Loker, E. S., Bayne, C. J., Buckley, P. M., & Kruse, K. T. (1982). Ultrastructure of Encapsulation of *Schistosoma mansoni* Mother Sporocysts by Hemocytes of Juveniles of the 10-R2 Strain of *Biomphalaria glabrata*. *The Journal of Parasitology*, 68(1), 84. doi:10.2307/3281328
- Loker, E.S (1994). On being a parasite in an invertebrate host: a short survival course. *J Parasitol* 80: 728-747
- Martins-Souza RL, Negrão-Corrêa D, Bezerra FS, Coelho, PMZ 2001. Anesthesia of *Biomphalaria* spp (Mollusca-Gastropoda): sodium pentobarbital is the drug of choice. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 391-392.
- Mattos A.C.A., Pereira GC, Jannotti-Passos LK, Kusel JR, Coelho PMZ (2007). Evaluation of the effect of oxamniquine, praziquantel and a combination of both drugs on the intramolluscan phase of *Schistosoma mansoni*. *Acta Trop.*;102:84–91.
- Mattos ACA, Kusel JR, Pimenta PFP, Coelho PMZ (2006). Activity of praziquantel on in vitro transformed *Schistosoma mansoni* spor- ocysts. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101 (Suppl. I): 283-287.
- Miller JF, Mitchell GF (1967) The thymus and the precursors of antigen reactive cells. *Nature* 216: 659 – 663
- Mitchell GF, Miller JF (1968) Immunological activity of thymus and thoracic-duct lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 59: 296 – 303
- Mitta, G., Gourbal, B., Grunau, C., Knight, M., Bridger, J., & Théron, A. (2017). The Compatibility Between *Biomphalaria glabrata* Snails and *Schistosoma mansoni*. *Advances in Parasitology*, 111-145. doi:10.1016/bs.apar.2016.08.006
- Mueller SN, Gebhardt T, Carbone FR, Heath WR (2013) Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence. *Annu Rev Immunol* 31: 137 – 161



Nacif-Pimenta R, de Mattos ACA, da Orfanó AS, Barbosa L, Pimenta PFP, Coelho PMZ. *Schistosoma mansoni* in Susceptible and Resistant Snail Strains *Biomphalaria tenagophila*: In Vivo Tissue Response and In Vitro Hemocyte Interactions. *PLoS One*. 2012; 7(9):1–12.

Negrão-Corrêa, D., Pereira, C.A.J., Rosa, F.M., Martins-Souza RL, Andrade, Z., Coelho P.M.Z., Paulo. (2007). Molluscan response to parasite: *Biomphalaria* and *Schistosoma mansoni* interaction. *Invertebrate Survival Journal*. 4.

Netea MG, Quintin J, van der Meer JW (2011) Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell Host Microbe* 9: 355–361. doi: 10.1016/j.chom.2011.04.006 PMID: 21575907  
□

Noda, S., & Loker, E. S. (1989). Effects of infection with *Echinostoma paraensei* on the circulating haemocyte population of the host snail *Biomphalaria glabrata*. *Parasitology*,98(01), 35. doi:10.1017/s0031182000059667

Pereira CA, Martins-Souza RL, Corrêa A Jr, Coelho PM, Negrão-Corrêa D. (2008) Participation of cell-free haemolymph of *Biomphalaria tenagophila* in the defence mechanism against *Schistosoma mansoni* sporocysts *Parasite Immunol* (11-12):610-9. doi: 10.1111/j.1365-3024.2008.01062.x. Pham et al., 2007

Pila E.a, Li H., Hambrook J R, Wu X, and Hanington P. C. (2017) Schistosomiasis from a Snail's Perspective: Advances in Snail Immunity. *Trends in Parasitology*, Vol. 33, No. 11

Pila, E. A., Tarrabain, M., Kabore, A. L., & Hanington, P. C. (2016). A Novel Toll-Like Receptor (TLR) Influences Compatibility between the Gastropod *Biomphalaria glabrata*, and the Digenean Trematode *Schistosoma mansoni*. *PLOS Pathogens*, 12(3). doi:10.1371/journal.ppat.1005513

Pinaud, S., Portela, J., Duval, D., Nowacki, F. C., Olive, M., Allienne, J., . . . Gourbal, B. (2016). A Shift from Cellular to Humoral Responses Contributes to Innate Immune Memory in the Vector Snail *Biomphalaria glabrata*. *PLOS Pathogens*, 12(1). doi:10.1371/journal.ppat.1005361

Pope EC, Powell A, Roberts EC, Shields RJ, Wardle R, et al. (2011) Enhanced cellular immunity in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) after 'vaccination'. *PLoS One* 6: e20960. doi: 10.1371/journal.pone.0020960 PMID: 21698190 □

Portela, J., Duval, D., Rognon, A., Galinier, R., Boissier, J., Coustau, C., Mitta, G., Theron, A., Gourbal, B., (2013). Evidence for specific genotype-dependent immune priming in the lophotrochozoan *Biomphalaria glabrata* snail. *J. Innate Immun.* 5, 261e276.

Riedel S. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. (2005) *Proc Bayl Univ Med Cent*;18(1):21–5.

Rodrigues J, Brayner FA, Alves LC, Dixit R, Barillas-Mury C (2010) Hemocyte differentiation mediates innate immune memory in *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Science* 329: 1353–1355. doi: 10.1126/science.1190689 PMID: 20829487 Roth & Kurtz, 2009;

Roth O, Kurtz J (2009) Phagocytosis mediates specificity in the immune defence of an invertebrate, the woodlouse *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). *Dev Comp Immunol* 33: 1151–1155. doi: 10.1016/j.dci.2009.04.005 PMID: 19416736 □

Rowley AF, Powell A (2007) Invertebrate immune systems specific, quasi-specific, or nonspecific? *J Immunol* 179: 7209–7214. PMID: 18025161 Sadd & Schmid-Hempel,

Sadd BM & Schmid-Hempel P: (2006) Insect immunity shows specificity in protection upon secondary pathogen exposure. *Curr Biol*;16:1206–1210. □

Sire C, Rognon A, Théron A (1998) Failure of *Schistosoma mansoni* to reinfect *Biomphalaria glabrata* snails: acquired humoral resistance or intra-specific larval antagonism? *Parasitology* 117: 117–122. PMID: 9778633 □

Southgate, V.R., Brown, D.S., et al., (1989). The influence of *Calicophoron microbothrium* on the susceptibility of *Bulinus tropicus* to *Schistosoma bovis*. *Parasitol. Res.* 75, 381–391.

Souza CP. *Schistosoma mansoni*: aspectos quantitativos da interação hospedeiro-parasito e desenvolvimento em *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea*. Tese (Doutorado em Parasitologia). 1993. Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Souza SS, Andrade ZA. (2005) A origem da célula de defesa (hemócitos) na *Biomphalaria glabrata* quando infectada pelo *Schistosoma mansoni*. *Proceedings of the 10th International Symposium on Schistosomiasis*. September 25-28, Belo Horizonte, MG, p. 177.

Sun, J. C., Ugolini, S. & Vivier, E. (2014) Immunological memory within the innate immune system. *EMBO J.* 33, 1295–1303

Swain SL, McKinstry KK, Strutt TM (2012) Expanding roles for CD4(+) T cells in immunity to viruses. *Nat Rev Immunol* 12: 136 – 148

Tebeje, B. M., Harvie, M., You, H., Loukas, A., & McManus, D. P. (2016). Schistosomiasis vaccines: where do we stand? *Parasites & Vectors*, 9(1), 528. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1799-4>

Theron, A., Coustau, C., (2005). Are *Biomphalaria* snails resistant to *Schistosoma mansoni*? *J. Helminthol.* 79, 187e191.

Theron, A., Coustau, C., Rognon, A., Gourbiere, S., Blouin, M.S., (2008). Effects of laboratory culture on compatibility between snails and schistosomes. *Parasitology* 135, 1179e1188.

Van Der Knaap WP, Loker ES. Immune mechanisms in trematode–snail interactions. (1990) *Parasitol Today*; 6:175-82

Vazquez L, Alpuche J, Maldonado G, Agundis C, Pereyra-Morales A, Zenteno E: Review: immunity mechanisms in crustaceans. *Innate immunity* 2009;15:179–188. □

Wang J, Wang L, Yang C, Jiang Q, Zhang H, et al. (2013) The response of mRNA expression upon secondary challenge with *Vibrio anguillarum* suggests the involvement of C-lectins in the immune priming of scallop *Chlamys farreri*. *Dev Comp Immunol* 40: 142–147. doi: 10.1016/j.dci.2013.02.003 PMID: 23434464 Webster & Davies, 2001

Williams MA, Bevan MJ. (2007) Effector and memory CTL differentiation. *Annu Rev Immunol* 25: 171 – 192

Wu, X., Dinguirard, N., Sabat, G., Lui, H., Gonzalez, L., Gehring, M., Yoshino, T. P. (2017). Proteomic analysis of *Biomphalaria glabrata* plasma proteins with binding affinity to those expressed by early developing larval *Schistosoma mansoni*. *PLOS Pathogens*, 13(5). doi:10.1371/journal.ppat.1006081

Zahoor, Z. et al. (2009) Nitric oxide production by *Biomphalaria glabrata* haemocytes: effects of *Schistosoma mansoni* ESPs and regulation through the extracellular signal-regulated kinase pathway. *Parasit. Vectors* 2, 18

Zhang SM, Adema CM, Kepler TB, Loker ES (2004) Diversification of Ig  $\kappa$  superfamily genes in an invertebrate. *Science* 305: 251–254. □

## **Referencias do Capitulo 2**

Abd El-Aal AA, Bayoumy IR, Basyoni MMA, Abd El-Aal AA, Emran AM, Abd El- Tawab MS, Badawi MA, Zalat RM, Diab TM. 2015 Genomic instability in complicated and uncomplicated Egyptian schistosomiasis haematobium patients. *Mol Cytogenet*; 8(1):1.

Abraham R. T. (2004) PI3-kinase related kinases: ‘big’ players in stress-induced signaling pathways. *DNA Repair*. ;3:883–887

Al-Mashat F, Sibiany A, Radwi A, Bahadur Y, Al-Radi A, Meir H, et al. (2001) Rectal cancer associated with schistosomiasis: report of two cases and review of the literature. *Ann Saudi Med*; 21(1-2): 65-67.

Amorim AG, Pagio FAB, Ferreira RN, Chambô Filho A. (2014) Genital schistosomiasis: a report on two cases of ovarian carcinomas containing viable egg of *Schistosoma mansoni*. *Case Rep Obstet Gynecol* 2014:508-718

Ashton, P., HARROP, R., SHAH, B., & WILSON, R. (2001). The schistosome egg: Development and secretions. *Parasitology*, 122(3), 329-338. doi:10.1017/S0031182001007351

Badawi, A.F., M.H. Mostafa and P.J O'Connor (1992) In- volvement of alkylating agents in schistosome-associated bladder cancer: the possible basic mechanisms of induc- tion, *Cancer Lett.*, 63, 171-188.

Bahnsen RR. Squamous cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 1997; 157:2115. □

Beral V & Newton R (1998). Overview of the epidemiology of immunode ciency-associated cancers. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 23: 1–6. PMID:9709294 □

Berkers, C. R., Maddocks, O. D., Cheung, E. C., Mor, I. & Vousden, K. H. Metabolic regulation by p53 family members. *Cell. Metab.* 18, 617–633 (2013). □

Bernardi, R., & Pandolfi, P. P. (2007). Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(12), 1006-1016. doi:10.1038/nrm2277

Bernardi, R., Papa, A., & Pandolfi, P. P. (2008). Regulation of apoptosis by PML and the PML-NBs. *Oncogene*, 27(48), 6299-6312. doi:10.1038/onc.2008.305

Bertoli, C., Skotheim, J. M., & Bruin, R. A. (2013). Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(8), 518-528. doi:10.1038/nrm3629

Boloukhere M, Baldo-Correa E, Borojevic R. (1993) Experimental schistosomiasis mansoni: characterization of connective tissue cells in hepatic periovular granulomas. *J Submicrosc Cytol Pathol* 25:505-517.

Botelho M., Ferreira A.C., Oliveira M.J., Domingues A., Machado J.C., da Costa J.M., (2009) Schistosoma haematobium total antigen induces increased proliferation, migration and invasion, and decreases apoptosis of normal epithelial cells, *Int J Parasitol*, 39 1083-1091.

Botelho M., Oliveira P., Gomes J., Gartner F., Lopes C., da Costa J.M., Machado J.C. (2009) Tumorigenic effect of Schistosoma haematobium total antigen in mammalian cells, *Int J Exp Pathol*, 90 448-453. □

Botelho MC, Machado JC, Brindley PJ, Correia da Costa JM (2011) Targeting molecular signaling pathways of Schistosoma haematobium infection in bladder cancer. *Virulence* 2: 267–279. □

Botelho MC, Soares R, Vale N, Ribeiro R, Camilo V, Almeida R, Medeiros R, Gomes R, Machado JC and Correia da Costa JM. (2010) Schistosoma haematobium: identification of new estrogenic molecules with estradiol antagonistic activity and ability to inactivate estrogen receptor in mammalian cells. *exp parasitol* 126: 526-535, 2010.

Bouvard, V., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Freeman, C., Galichet, L., Coglianò, V., 2009. A review of human carcinogens – Part B: biological agents. *Lancet Oncol.* 10, 321–322.

Brenner, D.A., O'Hara, M., Angel, P., Chojiker, M. and Karin, M. (1989) Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Nature*, 337, 661–663.

Carneiro-Santos, P., O. Martins-Filho, L. F. Alves-Oliveira, A. M. Silveira, P. Coura-Filho, I. R. Viana, R. A. Wilson, and R. Correa-Oliveira. 2000. Apoptosis: a mechanism of immunoregulation during human schistosomiasis mansoni. *Parasite Immunol.* 22:267

Chang, Y., Bai, L., Liu, S., Yang, J. C., Kung, H., & Evans, C. P. (2008). Src family kinase oncogenic potential and pathways in prostate cancer as revealed by AZD0530. *Oncogene*, 27(49), 6365-6375. doi:10.1038/onc.2008.250

Chen, M. and K. Mott. Progress in assessment of morbidity due to Schistosoma haematobium infection: a review of the recent literature, *Trop. Dis. Bull.* 1989; 84, 1- 30.

Chugh KS, Harries AD, Dahniya MH, Nwosu AC, Gashau A, Thomas J, et al.. Urinary schistosomiasis in Maiduguri, north east Nigeria. *Ann Trop Med Parasitol* 1986;80(6):593–9

Cohen SM, Purtilo DT, Ellwein LB. Ideas in pathology. Pivotal role of increased cell proliferation in human carcinogenesis. *Mod Pathol* 1991; 4: 371±82.

Colomer C., Marruecos L., A. Vert, Bigas A., Espinosa L. (2017) NF-kappaB Members Left Home: NF- $\kappa$ B-Independent Roles in Cancer, *Biomedicines*, 5 (2017). □

Colussi, D., Brandi, G., Bazzoli, F., & Ricciardiello, L. (2013). Molecular Pathways Involved in Colorectal Cancer: Implications for Disease Behavior and Prevention. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(8), 16365-16385. doi:10.3390/ijms140816365

Dang, C.V. (2012) MYC on the path to cancer, *Cell*, 149 22-35.

Duan Y, Gu X, Zhu D, Sun W, Chen J, Feng J, Song K, Xu F, He X, He X. Schistosoma japonicum soluble egg antigens induce apoptosis and inhibit activation of hepatic stellate cells: a possible molecular mechanism. *Int J Parasitol*. 2014 Mar;44(3-4):217-24. doi: 10.1016/j.ijpara.2013.11.003. Epub 2014 Jan 31.

Eferl R., Ricci R., Kenner L., Zenz R., David J.P, Rath M., Wagner E.F. (2003) Liver tumor development. c-Jun antagonizes the proapoptotic activity of p53, *Cell*, 112 181-192. □

El-Awady, M. K., Gad, Y. Z., Wen, Y., Eassawi, M., Effat, L., Amr, K. S., . . . Christ, G. J. (2001). Schistosoma hematobium soluble egg antigens induce proliferation of urothelial and endothelial cells. *World Journal of Urology*, 19(4), 263-266. doi:10.1007/s003450100217

Engelmann D, Putzer BM (2012). The dark side of E2F1: in transit beyond apoptosis. *Cancer Res*; 72: 571–575.

Eshtiyag Abdalla Abdelkareem, Tan Gim Cheong, Abdalla Hassan Sharief, Lim Boon Huat, Khoo Boon Yin. 2014

Ewis, A. A., El-Samman, E., Ali, N., Kajimoto, K., Shinohara, Y., Ishikawa, M., . . . Baba, Y. (2007). Gene expression profile in squamous cell carcinoma of the urinary bladder using complementary deoxyribonucleic acid microarray. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 25(2), 120-127. doi:10.1016/j.urolonc.2006.03.006

Feldmeier, H., Krantz, I., & Poggensee, G. (1994). Female Genital Schistosomiasis as a Risk-Factor for the Transmission of HIV. *International Journal of STD & AIDS*, 5(5), 368-372. doi:10.1177/095646249400500517

Felix, A.S., Soliman, A.S., Khaled, H., Zaghoul, M.S., Banerjee, M., El-Baradie, M., El-Kalawy, M., Abd-Elsayed, A.A., Ismail, K., Hablas, A., Seifeldin, I.A., Ramadan, M., Wilson, M.L., 2008. The changing patterns of bladder cancer in Egypt over the past 26 years. *Cancer Causes Control* 19, 421–429.

Freed-Pastor W.A., Prives C. (2012) Mutant p53: one name, many proteins, *Genes Dev*, 26 1268- 1286. □

Fried B, Reddy A, Mayer D. Helminths in human carcinogenesis. *Cancer Lett* 2011;305(2):23949.

Golomb, L. Volarevic, S. and Oren, M. (2014). p53 and ribosome biogenesis stress: the essentials. *FEBS Lett*. 588, 2571–2579 □

Goulet B., Kennette W., Ablack A., Postenka C.O., Hague M.N., Mymryk J.S., A.B. Tuck, V. □ Giguere, A.F. Chambers, Lewis J.D. (2011) Nuclear localization of maspin is essential for its inhibition of □ tumor growth and metastasis, *Lab Invest*, 91 1181-1187. □

Gouveia, M.J. Santos, J. Brindley, P.J. Rinaldi, G. Lopes, C. Santos, L.L. da Costa J.M., Vale N. (2015) Estrogen-like metabolites and DNA-adducts in urogenital schistosomiasis-associated bladder cancer, *Cancer Lett*, 359 226-232.

Gryseels B., Polman K., Clerinx J., Kestens L. (2006) Human schistosomiasis, *Lancet*, 368 1106-1118. □

Hansel D.E., Amin M.B., Comperat E., Cote R.J., Knuchel R., Montironi R., V.E. Reuter, M.S. Soloway, S.A. Umar, T.H. Van der Kwast.(2013) A contemporary update on pathology standards for bladder cancer: transurethral resection and radical cystectomy specimens, *Eur Urol*, 63 321-332. □

Herrera LA, Ostrosky-Wegman P. Do helminths play a role in carcinogenesis? *Trends Parasitol.* 2001;17(4):172–5.

Herrera, L.A. Herrera LA, Santiago P, Rojas G, Salazar PM, Tato P, Molinari JL, Schiffmann D, Ostrosky-Wegman P.. Immune response impairment, genotoxicity and morphological transformation induced by *Taenia solium* metacestode. *Mutat. Res.* 1994 305, 223–228

Hodder, S. L., Ouma, J. H., Stein, R. L., Weinert, D. M., Sorenson, K., Mahmoud, A. A., . . . Koech, D. (2000). Predisposition to urinary tract epithelial metaplasia in *Schistosoma haematobium* infection. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 63(3), 133-138. doi:10.4269/ajtmh.2000.63.133

Hofmann TG, Will H. (2003). Body language: the function of PML nuclear bodies in apoptosis regulation. *Cell Death Differ* 10: 1290–1299.

Honeycutt J., Hammam O., Hsieh, M.H. (2015) *Schistosoma haematobium* egg-induced bladder urothelial abnormalities dependent on p53 are modulated by host sex, *Exp Parasitol*, 158 (2015) 55-60.

Honeycutt, J. Hammam O., Fu, C.L. Hsieh, M.H. (2014) Controversies and challenges in research on urogenital schistosomiasis-associated bladder cancer, *Trends Parasitol*, 30 (2014) 324-332.

Hotez PJ, Kamath A (2009) Neglected tropical diseases in sub-saharan Africa: review of their prevalence, distribution and disease burden. *PLoS Negl Trop Dis* 3: e412 .

Hu, S., Xu-Monette, Z. Y., Tzankov, A., Green, T., Wu, L., Balasubramanyam, A., . . . Young, K. H. (2013). MYC/BCL2 protein coexpression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. *Blood*, 121(20), 4021-4031. doi:10.1182/blood-2012-10-460063

Hwang, K., Kim, K., Chang, J., Oh, S., Kim, Y., & Lee, J. et al. (2017). BCL2 Regulation According to Molecular Subtype of Breast Cancer by Analysis of The Cancer Genome Atlas Database. *Cancer Research And Treatment*. <http://dx.doi.org/10.4143/crt.2017.134>

I.W.G.o.t.E.o.C.R.t. Humans, Biological agents. Volume 100 B. A review of human carcinogens, *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, 100 (2012) 1-441.

Identification of specific proteins in colorectal cancer patients with *Schistosoma mansoni* infection as a possible biomarker for the treatment of this infection. *Asian Pac J Trop Dis* 2014; 4(Suppl 2): S720-S724

Ishii, A. et al. (1989) Evaluation of the mutagenicity and the tumor-promoting activity of parasite extracts: *Schistosoma japonicum* and *Clonorchis sinensis*. *Mutat. Res.* 224, 229–233

Jourdan, P., Roald, B., Poggensee, G., Gundersen, S., & Kjetland, E. (2011). Increased Vascularity in Cervicovaginal Mucosa with *Schistosoma haematobium* Infection. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 5(6), e1170. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001170>

K.M. Madbouly, A.J. Senagore, A. Mukerjee, A.M. Hussien, M.A. Shehata, P. Navine, C.P. Delaney, V.W. Fazio, Colorectal cancer in a population with endemic *Schistosoma mansoni*: is this an at-risk population?, *Int J Colorectal Dis*, 22 (2007) 175-181.

Ke N., X. Wang, X. Xu, Y.A. Abassi (2011). The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability, *Methods Mol Biol*, 740 33-43.

Khanna K.K., M.F. Lavin, S.P. Jackson, T.D. Mulhern. (2001) ATM, a central controller of cellular responses to DNA damage, *Cell Death Differ*, 8 1052-1065.

Kim YJ, Choi MH, Hong ST, Bae YM (2009) Resistance of cholangiocarcinoma cells to parthenolide-induced apoptosis by the excretory-secretory products of *Clonorchis sinensis*. *Parasitol Res* 104: 1011–1016. □

King C.H. (2010) Parasites and poverty: the case of schistosomiasis, *Acta Trop*, 113 95-104.

King C.H., Dangerfield-Cha M., (2008) The unacknowledged impact of chronic schistosomiasis, *Chronic Illn*, 4 65-79.

Kjetland, E.F. P.D. Ndhlovu, E. Gomo, T. Mduluzza, N. Midzi, L. Gwanzura, P.R. Mason, L. Sandvik, H. Friis, S.G. Gundersen. (2006) Association between genital schistosomiasis and HIV in rural Zimbabwean women, *Aids*, 20 593-600.

Kuper HE, Tzonou A, Kaklamani E et al. (2000). Hepatitis B and C viruses in the etiology of hepato- cellular carcinoma; a study in Greece using third- generation assays. *Cancer Causes Control*, 11: 171–175.

Lagwinski N, Thomas A, Stephenson AJ, Campbell S, Hoschar AP, El-Gabry E, Dreicer R and Hansel DE. Squamous cell carcinoma of the bladder: a clinicopathologic analysis of 45 cases. *Am J Surg Pathol* 2007; 31: 1777-1787. □

Lane, D. Levine, A. (2010) p53 Research: the past thirty years and the next thirty years, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2 a000893.

Liu P, Wang M, Lu X, Zhang S, Tang X (2013) *Schistosoma japonicum* egg antigen up-regulates brogenesis and inhibits proliferation in primary hepatic stellate cells in a concentration-dependent manner. *World J Gastroenterol* 2013 February 28; 19(8): 1230-1238 ISSN 1007-9327

- Liu, P. (2013). *Schistosoma japonicum* egg antigen up-regulates fibrogenesis and inhibits proliferation in primary hepatic stellate cells in a concentration-dependent manner. *World Journal of Gastroenterology*, 19(8), 1230. doi:10.3748/wjg.v19.i8.1230
- Loeb, K. and Loeb, L. (2000) Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis* 21, 379–385 □
- Mann, V.H. M.E. Morales, G. Rinaldi, P.J. Brindley (2010) Culture for genetic manipulation of developmental stages of *Schistosoma mansoni*, *Parasitology*, 137 451-462.
- Martel C. de, J. Ferlay, S. Franceschi, J. Vignat, F. Bray, D. Forman, M. Plummer. (2012) Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis, *Lancet Oncol*, 13 607-615.
- Martel, de C, Ferlay J., Franceschi S. Vignat J., Bray F., Forman D., Plummer M. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. (2012) *Lancet Oncol*, 607-615.
- Masters J.R., P.J. Hepburn, L. Walker, W.J. Highman, L.K. Trejdosiewicz, S. Povey, M. Parkar, B.T. Hill, P.R. Riddle, L.M. Franks (1986) Tissue culture model of transitional cell carcinoma: characterization of twenty-two human urothelial cell lines, *Cancer Res*, 46 3630-3636.
- Matchimakul P., G. Rinaldi, S. Suttiaprapa, V.H. Mann, A. Popratiloff, T. Laha, R.N. Pimenta, C.J. Cochran, S. Kaewkes, B. Sripa, P.J. Brindley. (2015) Apoptosis of cholangiocytes modulated by thioredoxin of carcinogenic liver fluke, *Int J Biochem Cell Biol*, 65 72-80.
- Matchimakul P., G. Rinaldi, S. Suttiaprapa, V.H. Mann, A. Popratiloff, T. Laha, R.N. Pimenta, C.J. Cochran, S. Kaewkes, B. Sripa, P.J. Brindley (2015) Apoptosis of cholangiocytes modulated by thioredoxin of carcinogenic liver fluke, *Int J Biochem Cell Biol*, 65 72-80.
- Mostafa MH, Sheweita SA, O'Connor PJ (1999) Relationship between schistosomiasis and bladder cancer. *Clin Microbiol Rev* 12:97–111
- N. Cancer Genome Atlas Research, Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma, *Nature*, 507 (2014) 315-322.
- Nakatani, K., Kato, T., Okada, S., Matsumoto, R., Nishida, K., & Komuro, H. et al. (2016). Ascending colon cancer associated with deposited ova of *Schistosoma japonicum* in non-endemic area. *Idcases*, 6, 52-54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idcr.2016.09.007>
- Nesi G, Nobili S, Cai T, Caini S, Santi R. (2015) Chronic inflammation in urothelial bladder cancer. *Virchows Arch*.
- Oral fluids for the immunodiagnosis of *Schistosoma mansoni* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94:289–292. [http://dx.doi.org/10.1016/S0035-9203\(00\)90326-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0035-9203(00)90326-2).
- Oshima H, Bandaletova TY, Brouet I, Bartsch H, Kirby G, Ogunbiyi F, et al. Increased nitrosamine and nitrate biosynthesis mediated by nitric oxide synthase induced in hamsters infected with liver fluke (*Opisthorchis viverrini*). *Carcinogenesis* 1994;15:271-5.



Park J., G.J. Gores, T. Patel. (1999) Lipopolysaccharide induces cholangiocyte proliferation via an interleukin-6-mediated activation of p44/p42 mitogen-activated protein kinase, *Hepatology*, 29 (1999) 1037-1043.

Parkin D.M, (2006) The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002, *Int J Cancer*, □507 118. 3030-3044. □

Pisani P, Parkin DM, Munoz N, Ferlay J. Cancer and infection: Estimates of the attributable fraction in 1990. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997; 6:387-400.

Plank-Bazinet, J.L. Mundell N.A.. (2016) The paradox of Foxd3: how does it function in pluripotency and □ differentiation of embryonic stem cells?, *Stem Cell Investig*, 3 73. □

Qiu D.C., A.E. Hubbard, B. Zhong, Y. Zhang, R.C. Spear, A matched, case-control study of the association between *Schistosoma japonicum* and liver and colon cancers, in rural China, *Ann Trop Med Parasitol*, 99 (2005) 47-52.

Qiu, D., Hubbard, A., Zhong, B., Zhang, Y., & Spear, R. (2005). A matched, case-control study of the association between *Schistosoma japonicum* and liver and colon cancers, in rural China. *Annals Of Tropical Medicine & Parasitology*, 99(1), 47-52. <http://dx.doi.org/10.1179/136485905x19883>

Respuela P., M. Nikolic, M. Tan, P. Frommolt, Y. Zhao, J. Wysocka, A. Rada-Iglesias. (2016) Foxd3 Promotes Exit from Naive Pluripotency through Enhancer Decommissioning and Inhibits Germline Specification, *Cell Stem Cell*, 18 118-133.

Rinaldi G., T.I. Okatcha, A. Popratiloff, M.A. Ayuk, S. Suttiprapa, V.H. Mann, Y.S. Liang, F.A. Lewis, A. Loukas, P.J. Brindley. (2011) Genetic manipulation of *Schistosoma haematobium*, the neglected schistosome, *PLoS Negl Trop Dis*, 5 e1348.

Rumbley C.A., H. Sugaya, S.A. Zekavat, P.J. Perrin, S.M. Phillips. (2001) Elimination of lymphocytes, but not eosinophils, by Fas-mediated apoptosis in murine schistosomiasis, *Am J Trop Med Hyg*, 65 442-449.

Rutitzky, L.I., Mirkin, G.A., Stadecker, M.J., (2003). Apoptosis by neglect of CD4

Sahin, U., de Thé, H., & Lallemand-Breitenbach, V. (2014). PML nuclear bodies: Assembly and oxidative stress-sensitive sumoylation. *Nucleus*, 5(6), 499-507. <http://dx.doi.org/10.4161/19491034.2014.970104>

Santos MM, Garcia TC, Orsini M, Disch J, Katz N, Rabello A. (2000)

Santos, J., Fernandes, E., Ferreira, J. A., Lima, L., Tavares, A., Peixoto, A., . . . Santos, L. L. (2014). P53 and Cancer-Associated Sialylated Glycans Are Surrogate Markers of Cancerization of the Bladder Associated with *Schistosoma haematobium* Infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(12). doi:10.1371/journal.pntd.0003329

Shiff C, Naples JM, Isharwal S, Bosompem KM, Veltri RW. Non-invasive methods to detect schistosome-based bladder cancer: is the association sufficient for epidemiological use? *Trans R Soc Trop Med Hyg. Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*; 2010;104(1):3-5.

Shokeir AA. Squamous cell carcinoma of the bladder: pathology, diagnosis and treatment. *BJU Int* 2004;93:216–20. □

Smout, M., Laha, T., Mulvenna, J., Sripa, B., Suttiaprapa, S., & Jones, A. et al. (2009). A Granulin-Like Growth Factor Secreted by the Carcinogenic Liver Fluke, *Opisthorchis viverrini*, Promotes Proliferation of Host Cells. *Plos Pathogens*, 5(10), e1000611. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000611>

Sripa, B., Brindley, P.J., Mulvenna, J., Laha, T., Smout, M.J., Mairiang, E., Bethony, J.M., Loukas, A., 2012. The tumorigenic liver fluke *Opisthorchis viverrini* – multiple pathways to cancer. *Trends Parasitol.* 28, 395–407.

T.M. Bodenstine, R.E. Seftor, Z. Khalkhali-Ellis, E.A. Seftor, P.A. Pemberton, M.J. Hendrix, Maspin: molecular mechanisms and therapeutic implications, *Cancer Metastasis Rev*, 31 (2012) 529- 551. □

Tawfik H. N. 1988. Carcinoma of the urinary bladder associated with schistosomiasis in Egypt: the possible casual relationship. In *Unusual Occurrences as Clues to Cancer Etiology*. Edited by R. W. Miller et al. pp. 197 209. Japanese Science Society Press, Tokyo.

Th cells in granulomas: a novel effector mechanism involved in the control of egg-induced immunopathology in murine schistosomiasis. *J. Immunol.* 171, 1859–1867.

Thuwajit C, Thuwajit P, Kaewkes S, Sripa B, Uchida K, et al. (2004) Increased cell proliferation of mouse fibroblast NIH-3T3 in vitro induced by excretory/ □secretory product(s) from *Opisthorchis viverrini*. *Parasitology* 129: 455–464. □

Trosko, J.E. and Ruch, R.J. (1998) Cell–cell communication in carcinogenesis. *Front. Biosci.* 3, D208–D236 □

Vale N., Gouveia, M.J. Rinaldi, G. Santos, J. Santos, L.L. Brindley, P.J. da Costa J.M. (2017) The role of estradiol metabolism in urogenital schistosomiasis-induced bladder cancer, *Tumour Biol*, 39 1010428317692247.

Van der Werf, M.J., S.J. de Vlas, S. Brooker, C.W. Looman, N.J. Nagelkerke, J.D. Habbema, D. Engels, (2003) Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa, *Acta Trop*, 86125-139.

Vousden, K.H. Lane D.P. (20017) p53 in health and disease, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8 275-283.

Wang, J., Xu, F., Zhu, D., Duan, Y., Chen, J., Sun, X., . . . Feng, J. (2014). *Schistosoma japonicum* Soluble Egg Antigens Facilitate Hepatic Stellate Cell Apoptosis by Downregulating Akt Expression and Upregulating p53 and DR5 Expression. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(8). doi:10.1371/journal.pntd.0003106

Wink DA, Kasprzak KS, Maragos CM, Elespuru RK, Misra M, Dunams TM, et al. (1991) DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science* 1991;254:1001-3.

Wyler, D.J., Tracy, J.W., 1982. Direct and indirect effects of soluble extracts of *Schistosoma mansoni* eggs on fibroblast proliferation in vitro. *Infect. Immun.* 38, 103–108.

Xu Z., D.L. Su, Schistosoma japonicum and colorectal cancer: an epidemiological study in the People's Republic of China, *Int J Cancer*, 34 (1984) 315-318.

Xu, T., Wang, Y., Xiong, W., Ma, P., Wang, W., Chen, W., . . . Shu, Y. (2017). E2F1 induces TINCR transcriptional activity and accelerates gastric cancer progression via activation of TINCR/STAU1/CDKN2B signaling axis. *Cell Death and Disease*, 8(6). doi:10.1038/cddis.2017.205

Yang DQ and Kastan MB (2000) Participation of ATM in insulin signalling through phosphorylation of eIF-4E-binding protein 1. *Nature Cell. Biol.* 2: 893-898

Zhu L., D. Finkelstein, C. Gao, L. Shi, Y. Wang, D. Lopez-Terrada, K. Wang, S. Utley, S. Pounds, G. Neale, D. Ellison, A. Onar-Thomas, R.J. Gilbertson. (2016) Multi-organ Mapping of Cancer Risk, *Cell*, 166 1132-1146 e1137.