

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

Seleção de um painel de antígenos
biomarcadores de *Schistosoma mansoni*
através de análises do proteoma sorológico

por

Fernanda Ludolf Ribeiro

Belo Horizonte
Maio/2012

TESE DBCM-CPqRR F.L. RIBEIRO 2012

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

Seleção de um painel de antígenos
biomarcadores de *Schistosoma mansoni*
através de análises do proteoma sorológico

por

Fernanda Ludolf Ribeiro

Tese apresentada com
vistas à obtenção do Título de Doutor
em Ciências na área de concentração
Biologia Celular e Molecular
Orientação: Dr. Guilherme Corrêa de Oliveira
Co-orientação: Dra. Rosiane Aparecida da Silva Pereira

Belo Horizonte
Maio/2012

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

R484s 2012	Ribeiro, Fernanda Ludolf. Seleção de um painel de antígenos biomarcadores de <i>Schistosoma mansoni</i> através de análises do proteoma sorológico / Fernanda Ludolf Ribeiro. – Belo Horizonte, 2012. XXI, 112 f.: il.; 210 x 297mm. Bibliografia: 119 – 133 Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular. 1. Esquistossomose mansoni/genética 2. <i>Schistosoma mansoni</i> /patogenicidade 3. Proteoma/uso terapêutico 4. Biomarcadores Farmacológicos/análise I. Título. II. Oliveira, Guilherme Corrêa (Orientação) III. Pereira, Rosiane Aparecida da Silva CDD – 22. ed. – 616.963
---------------	--

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

Seleção de um painel de antígenos
biomarcadores de *Schistosoma mansoni*
através de análises do proteoma sorológico

por

Fernanda Ludolf Ribeiro

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Guilherme Corrêa de Oliveira (Presidente)
Prof. Dra. Cristiana Ferreira Alves Brito
Prof. Dr. Élio Hideo Babá
Prof. Dr. William de Castro Borges
Prof. Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira
Suplente: Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Tese defendida e aprovada em: 31/05/2012

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

Seleção de um painel de antígenos biomarcadores de *Schistosoma mansoni* através de análises do proteoma sorológico

por

Fernanda Ludolf Ribeiro

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ sob a orientação do Dr. Guilherme Corrêa de Oliveira^{1,2} e co-orientação da Dra. Rosiane A. da Silva Pereira¹. O projeto contou com o suporte financeiro da FIOCRUZ, FAPEMIG, Capes, PDTIS, INCT-DT, Boehringer Foundation e ISID/ESCMID. Parte deste projeto foi realizado em colaboração com o Dr. Franco Falcone³ na Universidade de Nottingham.

1 – Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ, Belo Horizonte, MG, Brasil.

2 – Centro de Excelência em Bioinformática, FIOCRUZ, Belo Horizonte, MG, Brasil.

3 – Departamento de Farmácia, Universidade de Nottingham, Nottingham, Inglaterra.

*A calma e a serenidade
são elementos fundamentais
para a conclusão feliz e duradoura
(autor desconhecido)*

*Dedico esse trabalho à minha Mãe,
minha melhor amiga,
minha maior companheira,
minha maior incentivadora,
meu exemplo,
minha vida.
Já nasci com sorte!*

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço ao Dr. Guilherme Oliveira pela oportunidade e formação ao longo de anos de iniciação científica, mestrado e doutorado, e também pelo exemplo de sabedoria e determinação;

À Dra. Rosiane pela presença constante durante a elaboração, elucidação e conclusão do projeto, pelo exemplo de seriedade, dedicação e cuidado, e especialmente pela agradável convivência e amizade;

Ao CPqRR pela oportunidade de crescimento científico;

À Pós-graduação em Ciências da Saúde do CPqRR por me receber como aluna de doutorado e por estar sempre pronta a ajudar;

À Biblioteca do CPqRR em promover acesso gratuito local e remoto a informação técnico científica em saúde e pela catalogação desta tese;

Ao grupo do Dr. Guilherme pela amizade e trabalho em equipe;

Ao grupo envolvido na Proteômica, principalmente a Maíra e Ramon;

Às amigas de doutorado de longa data: Luíza, Lívia, Larissa, Dra. Mariana e Dra. Regina, pela troca de experiências ao longo de anos de convivência e pela amizade;

À Paola que esteve ao meu lado ao longo de sua iniciação científica, me ajudando na elucidação do projeto e me ensinando a ensinar;

Ao Dr. Fabiano por ter me auxiliado nas análises de clusterização;

À Dra. Angela e Dr. Flávio pela disponibilidade em ajudar;

A todos os demais do LPCM pela convivência;

Ao grupo do Laboratório de Malacologia pelo fornecimento dos parasitos;

Ao grupo do Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira e da Dra. Andrea Gazzinelli por cederem os soros de área endêmica em uso neste projeto e especialmente ao Leonardo Matoso pela ajuda durante a aquisição das amostras de soro;

Ao Dr. Helton Santiago por ceder as amostras de soro negativo para a esquistossomose;

A todas as pessoas que voluntariamente disponibilizaram seu material biológico para essa pesquisa, confiando na ciência e especialmente em nosso grupo;

Ao grupo do Laboratório de Toxicologia da FIOCRUZ-RJ, especialmente ao Dr. Jonas Perales e Dr. André Teixeira, por estarem sempre disponíveis para realizar as análises de espectrometria de massas e pela agradável recepção no laboratório;

Ao grupo da Universidade da Georgia: Dr. Rick Tarleton, Dr. Ron Orlando, Dr. James Atwood e demais colegas de laboratório, pelo grande aprendizado e pelos momentos inesquecíveis;

Ao grupo da Universidade de Nottingham: Dr. Franco Falcone, Dr. Marcos Alcocer e colegas Owen, Mark, Daniel, Zeesha, Walla e Summer, por toda a atenção e pelos momentos inesquecíveis;

À minha família pelo apoio, incentivo e paciência. Em especial minha mãe pela amizade e exemplo de garra. À minha avó e mãe Di pelos cuidados. Ao meu pai, Vuru, Plínia, Hick e Sofia pela torcida, mesmo à distância;

Ao Vitinho pela compreensão e incentivo e principalmente por estar presente mais uma vez em minha vida,

À Pi pelo conforto e alegria;

Às amigas bolhas pelas horas de descontração em meio a tantas responsabilidades;

Aos meus demais amigos que vibram por ter uma amiga “cientista”;

E a todas as demais pessoas que cruzaram meu caminho e de alguma forma me trouxeram até aqui.

Apoio Financeiro

Agradadeço à FAPEMIG, por me contemplar com um bolsa de doutorado;

Ao Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde PDTIS – FIOCRUZ, pelo uso de sua rede de plataformas tecnológicas;

Às agências financiadoras, que apoiaram este trabalho através dos programas: CNPq/PAPES V-FIOCRUZ, CNPq/PROEP-RIPAg/CPqRR/FIOCRUZ, CNPq/INCT-DT;

À *Sanofi Pasteur, ISID/ESCMID, Boehringer Ingelheim, National Foundation for Infectious Diseases* e *Bill and Melinda Gates Foundation*, pelas oportunidades de participação em congressos e treinamentos no exterior através da premiação de *travel award*.

Sumário

Lista de Figuras	xiv
Lista de Tabelas e Quadros.....	xvi
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	xvii
Resumo	xx
Abstract.....	xxi
1 Introdução.....	22
1.1 Aspectos gerais da esquistossomose.....	23
1.2 Ciclo de desenvolvimento do <i>Schistosoma mansoni</i>	25
1.3 Patologia da esquistossomose mansônica.....	27
1.4 Imunologia da esquistossomose.....	28
1.5 Suscetibilidade versus resistência à infecção.....	29
1.5.1 Mecanismos de evasão do parasito ao sistema imunológico do hospedeiro	29
1.5.2 Resistência induzida do hospedeiro à infecção	30
1.5.3 Resistência natural do hospedeiro à infecção	31
1.5.4 Autocura da esquistossomose pelo hospedeiro	31
1.6 Controle da esquistossomose	32
1.7 Diagnóstico da esquistossomose.....	32
1.8 Vacina para esquistossomose.....	33
1.9 Proteoma	37
1.9.1 Proteoma de schistosomas	38
1.10 Imunoproteoma	41
1.10.1 Imunoproteoma de schistosomas.....	43
2 Justificativas	45
3 Objetivos.....	47
3.1 Objetivo Geral.....	48
3.2 Objetivos Específicos	48
4 Material e Métodos.....	49
4.1 Obtenção de material biológico	50
4.2 Preparação de extratos proteicos.....	51
4.3 Seleção dos soros dos indivíduos de área endêmica.....	52
4.4 Eletroforese bidimensional (2-DE).....	55
4.4.1 Primeira dimensão - Focalização isoeletrica	55
4.4.2 Equilíbrio das fitas de IPG.....	55

4.4.3	Segunda dimensão - SDS-PAGE.....	56
4.4.4	Coloração de géis de poliacrilamida por Azul de Coomassie Colloidal	56
4.5	<i>Western-blotting</i> bidimensional (2D-WB).....	57
4.6	Detecção de glicoproteínas por <i>Pro-Q Emerald</i>	57
4.7	Ensaio de lectina- <i>blotting</i>	58
4.8	Deglicosilação - tratamento com periodato/borohidreto.....	60
4.9	Identificação de proteínas por espectrometria de massas	60
4.9.1	Digestão trípica.....	60
4.9.2	Espectrometria de massas	61
4.9.3	Identificação das proteínas	61
4.10	Clusterização das proteínas imunogênicas	62
4.11	Expressão <i>in vitro</i> e análise de <i>Western-blotting</i> das proteínas recombinantes <i>Major Egg Antigen</i> e Hemoglobinase de <i>Schistosoma mansoni</i>	62
4.11.1	Amplificação por PCR	62
4.11.2	Obtenção do DNA circular molde contendo a região codificadora dos genes <i>Major Egg Antigen</i> e Hemoglobinase	64
4.11.2.1	Inserção dos produtos purificados em plasmídeo <i>pF3A WG (BYDV) Flexi Vectors</i>	64
4.11.2.2	Transformação do DNA circular em <i>Escherichia coli</i>	65
4.11.3	Transcrição-Tradução <i>in vitro</i> da <i>Major Egg Antigen</i> e da Hemoglobinase de <i>Schistosoma mansoni</i>	65
4.11.4	<i>Western-blotting</i> para identificação da <i>Major Egg Antigen</i> em fusão com 6xHis	66
4.11.5	<i>Western-blotting</i> com <i>pool</i> de soro de indivíduos de área endêmica para a esquistossomose	66
4.12	Expressão das demais proteínas selecionadas através dos experimentos de 2D-WB	67
4.13	Purificação das proteínas recombinantes	67
5	Resultados.....	68
5.1	Análise de extrato proteico total de diferentes fases de desenvolvimento do <i>Schistosoma mansoni</i> por 2D-PAGE.....	69
5.2	Identificação de antígenos de verme adulto de <i>Schistosoma mansoni</i> reconhecidos pelo <i>pool</i> de soro de indivíduos infectados	69
5.3	Comparação do perfil antigênico de proteínas de verme adulto de <i>Schistosoma mansoni</i> utilizando <i>pool</i> de soro de indivíduos infectados e não infectados de área endêmica	74

5.4	Identificação de glicoproteínas no extrato proteico total de verme adulto de <i>Schistosoma mansoni</i>	83
5.5	Identificação de diferentes subclasses de carboidratos de glicoproteínas presentes no extrato proteico total de verme adulto de <i>Schistosoma mansoni</i>	83
5.6	Reatividade das glicoproteínas de verme adulto de <i>Schistosoma mansoni</i> tratadas com periodato/borohidreto ao <i>pool</i> de soro de indivíduos infectados para a esquistossomose	89
5.7	Otimização da técnica de expressão de proteínas recombinantes <i>in vitro</i> em sistema livre de células	91
5.8	Perfil de imunogenicidade das proteínas recombinantes <i>Major Egg Antigen</i> e Hemoglobinase	96
5.9	Expressão <i>in vitro</i> das demais proteínas selecionadas nos experimentos de 2D-WB	99
6	Discussão	102
7	Conclusões.....	113
8	Anexo	115
8.1	Anexo 1	116
9	Referências Bibliográficas.....	118

Lista de Figuras

Figura 1: Mapa de prevalência da esquistossomose mansônica no estado de Minas Gerais-Brasil.....	24
Figura 2: Ciclo biológico representativo do <i>Schistosoma mansoni</i>	26
Figura 3: Esquema representativo da área de estudo Virgem das Graças e seus vilarejos (Vila Central de Virgem das Graças, Suçuarana, Cardoso 1/2/3).	53
Figura 4: Perfil eletroforético bidimensional de extrato proteico total de diferentes fases de desenvolvimento do <i>Schistosoma mansoni</i>	70
Figura 5: 2D-PAGEs de extratos proteicos de verme adulto de <i>Schistosoma mansoni</i> utilizando fitas de IPG de diferentes faixas de pH e respectivos 2D-WBs utilizando <i>pool</i> de soro de indivíduos infectados.	71
Figura 6: 2D-WB de extrato proteico total e de tegumento de verme adulto de <i>Schistosoma mansoni</i> utilizando <i>pool</i> de soro de indivíduos infectados e não infectados de área endêmica para a esquistossomose mansônica e não infectados de área não endêmica.	75
Figura 7: Indicação no 2D-PAGE dos <i>spots</i> imunogênicos identificados nos experimentos de 2D-WB.	77
Figura 8: 2D-WB de extrato proteico total de verme adulto de <i>Schistosoma mansoni</i> utilizando <i>pool</i> de soro de indivíduos infectados e anticorpos secundários anti-Ig total, anti-IgG1 e anti-IgG3.....	79
Figura 9: Representação por <i>Heat Map</i> de proteínas de verme adulto de <i>Schistosoma mansoni</i> imunogênicas aos diferentes <i>pools</i> de soro utilizados.	81
Figura 10: 2D-WB de extrato proteico total de verme adulto de <i>Schistosoma mansoni</i> utilizando <i>pools</i> de soro de indivíduos infectados, não infectados de área endêmica e não infectados para a esquistossomose reconhecidos por anti-IgG1 e anti-IgG3.	82
Figura 11: 2D-WB de extrato proteico total de verme adulto de <i>Schistosoma mansoni</i> utilizando soro individual de indivíduos infectados para a esquistossomose.....	84
Figura 12: Identificação de glicoproteínas no extrato proteico total de verme adulto de <i>Schistosoma mansoni</i>	85
Figura 13: Lectina- <i>blots</i> de extrato proteico total de verme adulto de <i>Schistosoma mansoni</i>	88
Figura 14: Efeito da oxidação por periodato sobre 2D-WB de extrato proteico total de verme adulto de <i>Schistosoma mansoni</i> utilizando <i>pool</i> de soro de indivíduos infectados para a esquistossomose.	90

Figura 15: Amplificação da região codificadora dos genes de <i>Major Egg Antigen</i> e Hemoglobinase.	92
Figura 16: Expressão <i>in vitro</i> em sistema livre de células com lisado de germe de trigo das proteínas de <i>Schistosoma mansoni Major Egg Antigen</i> e Hemoglobinase.	94
Figura 17: <i>Western-blot</i> da proteína recombinante de <i>Schistosoma mansoni Major Egg Antigen</i> utilizando anticorpo anti-Histidina.....	95
Figura 18: Purificação da proteína recombinante de <i>Schistosoma mansoni Major Egg Antigen</i> em fusão com 6xHis	97
Figura 19: <i>Western-blot</i> das proteínas recombinantes de <i>Schistosoma mansoni Major Egg Antigen</i> e Hemoglobinase expressas <i>in vitro</i>	98
Figura 20: Expressão no sistema <i>in vitro</i> livre de células das proteínas recombinantes identificadas pelo 2D-WB.	101

Lista de Tabelas e Quadros

Tabela 1: Estudos proteômicos desenvolvidos com schistosomas.....	40
Tabela 2: Amostras de soro de indivíduos da área endêmica para a esquistossomose mansônica, Virgem das Graças, selecionadas para o estudo.....	54
Tabela 3: Especificidade do reconhecimento de carboidratos pelas diferentes Lectinas em estudo.....	59
Tabela 4: Iniciadores utilizados para a amplificação da região codificadora dos genes de <i>Major Egg Antigen</i> e Hemoglobinase de <i>Schistosoma mansoni</i>	63
Tabela 5: Proteínas imunogênicas aos <i>pools</i> de soro de indivíduos de área endêmica para a esquistossomose identificadas nos experimentos de 2D-WB.	72
Tabela 6: <i>Spots</i> imunogênicos ao <i>pool</i> de soro de indivíduos infectados e não infectados de área endêmica e não infectados de área não endêmica para a esquistossomose identificados nos experimentos de 2D-WB utilizando extrato proteico total e de tegumento de verme adulto de <i>Schistosoma mansoni</i>	78
Tabela 7: Resumo experimental das proteínas identificadas pelo 2D-WB expressas <i>in vitro</i> em sistema <i>TNT® SP6 High-Yield Wheat Germ Protein Expression System</i>	100
Quadro 1: Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação da região codificadora dos genes correspondentes as proteínas selecionadas nos experimentos de 2D-WB.	116

Lista de Abreviaturas e Símbolos

µg - micrograma
µL - microlitro
µm² - micrômetro cúbico
2-DE - eletroforese bidimensional
2D-PAGE - *two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis*
2D-WB - *Western-blotting* bidimensional
AB - bicarbonato de amônio
ACN - acetronitrila
Amp - ampicilina
ASP - *Ancylostoma Secreted Protein*
AW-TEG - extrato proteico de tegumento de verme adulto de *Schistosoma mansoni*
AW-TOT - extrato proteico total de verme adulto de *Schistosoma mansoni*
BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*
CAA - antígeno anódico circulante
CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCA - antígeno catódico circulante
cDNA - DNA complementar
CHAPS - 3-[(3-Colamidopropil)-dimetil amônio]-propano-sulfonato
CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CPqRR - Centro de Pesquisas René Rachou
DAF - *Decay Accelerating Factor*
DALYs - *Disability Adjusted Life Years*
DHPC - *1,2-dihep- tanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*
DNA - ácido desoxirribonucléico
dNTP - desoxirribonucleotídeo trifosfato
DSA - *Datura stramonium agglutinin*
DTT - dithiothreitol
EDTA - etileno diamino tetra-acetato.
ELISA - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
FABP – *Fatty-acid-binding protein*
FAPEMG - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz
FISH - *Fluorescence In Situ Hybridization*
FUNASA - Fundação Nacional de Saúde
GNA - *Galanthus nivalis* agglutinin
GPI - glicosilfosfatidilinositol
GST - glutationa-S-transferase
HIS – histidina
hr - hora
HRP - *Horseradish Peroxidase*
Hz - hertz
IEF - focalização isoeletrica

Ig - imunoglobulina
IL - interleucina
INCT-DT - Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Doenças Tropicais
INF - indivíduos infectados com *Schistosoma mansoni*
INF- - interferon
IPG - gradiente de pH imobilizado
IrV-5 - antígeno 5 da vacina irradiada
ISID/ESCMID - *International Society for Infectious Disease/European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*
kDa - kilodalton
L - litro
LB - meio de cultura Luria Bertani
LC-MS/MS – cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
LE - cepa de *Schistosoma mansoni* Luiz Evangelista
LPCM - Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular
M - molar
MAA - *Maackia amurensis agglutinin*
MAC - complexo de ataque a membrana
Maldi-ToF MS - *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry*
min - minuto
mL - mililitro
mM - milimolar
MS - espectro de massas de peptídeos
MS/MS - espectro de massas de fragmentação dos peptídeos
MudPit - *Multidimensional Protein Identification Technology*
NBT/BCIP - *4-nitro blue tetrazolium chloride/5-bromo-4chloro-3-indolyl-phosphate*
NCBI - *National Center of Biotechnology Information*
Nd: YAG - *neodymium-doped tytrium*
NE - indivíduos não infectados de área endêmica para a esquistossomose
NI - indivíduos não infectados de área não endêmica para a esquistossomose
NIT - Núcleo de Inovação Tecnológica
NL - não linear
Mb - megabases
°C - grau centígrado
OMS - Organização Mundial de Saúde
PAS - *periodate/Schiff's base*
pb - pares de base
PBMC - células mononucleadas do sangue periférico
PBS - solução salina tamponada com fosfato
PCR - reação em cadeia da polimerase
PDTIS - Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde
PiPLC - fosfatidil-inositol fosfolipase C
PMT - *photomultiplier tube*
PNA - *Peanut agglutinin*
PVDF - *polyvinylidene fluoride*

PZQ - Praziquantel
q.s.p - quantidade suficiente para
r.p.m - rotação por minuto
RA - cercária atenuada por raio-X ou radiação gama
RNA - ácido ribonucleico
RPMI - *Roswell Park Memorial Institute medium*
SDS - sódio dodecil sulfato
SDS-PAGE - *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*
SEA - antígenos solúveis de ovo
seg - segundo
SNA - *Sambucus nigra agglutinin*
SWAP - antígenos solúveis de verme adulto
T CD4 - célula T auxiliar
TBE - tris borato EDTA
TBM - *Total Body Minutes*
TBS – tampão Tris salina
TEMED - N, N, N', N'-tetra metiletilenodiamina
TGF - fator de crescimento tumoral
Th - linfócitos T auxiliares
TNF - fator de necrose tumoral
Tris - trishidroximetilaminometano
U - unidade
UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais
UK - Inglaterra
US - Estados Unidos
UV - ultravioleta
V - voltz

Resumo

Apesar do grande esforço na tentativa de controlar a esquistossomose, esta doença continua sendo uma das mais prevalentes no mundo. Novas intervenções são uma prioridade importante para a eliminação da esquistossomose, uma vez que o controle da doença tem sido baseado essencialmente na quimioterapia, a qual não previne a reinfeção. O desenvolvimento de uma vacina para a esquistossomose para proteção a longo prazo, bem como de um novo teste de diagnóstico, constituirá um grande avanço para o controle da doença. A compreensão da resposta imunológica associada com os estados de infecção/proteção pode constituir a base da descoberta de novos antígenos biomarcadores para vacina e diagnóstico para a esquistossomose. Recentes avanços na área pós-genômica têm permitido uma busca mais racional por biomarcadores. Inicialmente, eletroforese bidimensional (2-DE) de extrato proteico total de diferentes fases de desenvolvimento do *Schistosoma mansoni* foi realizada, obtendo-se um perfil de separação de *spots* proteicos com boa resolução com os extratos de todas as fases, mas com um perfil distinto entre eles. Posteriormente, proteínas do extrato proteico de verme adulto, total e de tegumento, foram separadas por 2-DE e, então, incubadas com amostras de soro de indivíduos infectados (INF) e não infectados de área endêmica (NE) e de indivíduos não infectados de área não endêmica (NI) para esquistossomose em experimento de *Western-blotting* bidimensional (2D-WB). No total, 47 proteínas imunogênicas foram identificadas por espectrometria de massas. Embora a maioria dos *spots* proteicos sejam imunogênicos aos diferentes *pools* de soro, nove *spots* proteicos reagiram exclusivamente com o *pool* de soro INF e um com o *pool* de soro NE. Algumas glicoproteínas foram identificadas no extrato proteico total de verme adulto de *S. mansoni* usando o método *Periodic Acid-Schiff* e *lectina-blotting*. No entanto, o tratamento com periodato/borohidreto indicou que a porção glicídica não tem influência sobre a reatividade das proteínas aos diferentes *pools* de soro utilizados nos experimentos de 2D-WB. *Western-blotting* de duas proteínas recombinantes, selecionadas dos experimentos de 2D-WB, mostrou um perfil de reconhecimento pelos diferentes *pools* de soro semelhante ao das proteínas nativas. Dentre as proteínas imunogênicas identificadas nos experimentos de 2D-WB, 27 foram expressas *in vitro* com sucesso, as quais serão utilizadas em experimentos futuros em um microarranjo de proteínas. A associação de eletroforese bidimensional e *Western-blotting* permitiu a seleção de um painel de antígenos proteicos capazes de distinguir os estados de suscetibilidade e resistência à esquistossomose mansônica. Estes antígenos poderão ser utilizados como biomarcadores no desenvolvimento de uma vacina e/ou de um novo teste diagnóstico para a doença.

Abstract

Despite intensive efforts towards schistosomiasis control, the disease is still one of the most prevalent in the world. New interventions are a high priority for the elimination of schistosomiasis, since the disease control has been essentially based on the use of chemotherapy, which does not prevent re-infection. The development of a long term protection and an effective diagnostic assay would be a major breakthrough for schistosomiasis control. Understanding which aspects of the immune responses are associated with infection/protection status may constitute the basis for the understanding of a successful vaccine and could also indicate new diagnostic candidates. Progress on post-genomic technologies resulted in the development of rational and global approaches for the discovery of new biomarkers. Initially, two-dimensional electrophoresis (2-DE) of different developmental stages protein extracts of *Schistosoma mansoni* were conducted. It was obtained a good separation pattern of the spots that was distinguishable in all the stages evaluated. Subsequently, two-dimensional electrophoresed *S. mansoni* adult worm protein extracts, total and tegumental, were probed with pooled sera of infected (INF), non-infected individuals from endemic area (NE) and non-infected individuals from non-endemic schistosomiasis area (NI) in a two-dimensional Western-blotting experiment (2D-WB). A total of 47 immunoreactive proteins were identified by mass spectrometry. Although most of the protein spots were immunoreactive to all of the serum pools, nine reacted exclusively with the INF serum pool, and one with the NE serum pool. Glycoproteins were identified in the *S. mansoni* adult worm total protein extract using Periodic Acid–Schiff base method and lectin-blotting. However, periodate/borohydride treatment indicated that the glycoprotein glycan portion had no influence on the immunoreaction obtained in the 2D-WB experiments using different serum pools. Western-blotting of two 2D-WB selected recombinant proteins showed a similar serum recognition profile of the native protein. A total of 27 immunoreactive proteins identified by 2D-WB approach were successfully *in vitro* expressed and will be used in future experiments of protein microarray. The association of two-dimensional electrophoresis and Western-blotting assays allowed the selection of a protein antigens panel capable to diagnose the schistosomiasis mansoni susceptibility/resistance status. These antigens may be used as biomarkers for the development of a vaccine and/or a new diagnostic test for the disease.

1 Introdução

1.1 Aspectos gerais da esquistossomose

A esquistossomose é considerada uma das doenças mais relevantes em saúde pública no mundo. Estima-se que existam 779 milhões de pessoas sob risco de infecção e 210 milhões infectadas em 76 países (Steinmann *et al.*, 2006). A morbidade associada à esquistossomose tem impacto significativo nas atividades diárias dos indivíduos infectados. O comprometimento da doença no desenvolvimento dos jovens e na produtividade dos adultos tem reflexo negativo na economia doméstica e da coletividade. O elevado número de pessoas infectadas e os efeitos negativos da morbidade têm um impacto significativo no número de anos de vida produtiva perdidos devido à esquistossomose, que apresenta um índice de DALYs (*Disability Adjusted Life Years*) estimado em 6 - 13,5 milhões. Este índice é ainda mais relevante para comunidades com nível sócio-econômico baixo, o que justifica os esforços para o melhor entendimento da doença e para a busca de soluções adequadas (King *et al.*, 2006).

A doença tem como agente causador parasitos pertencentes ao filo Platyhelminthes, classe Trematoda, ordem Digenea, subordem Strigeidida, superfamília Schistosomatoidea, família Schistosomatidae, e gênero *Schistosoma*. Os schistosomas são metazoários acelomados, de simetria bilateral e dimorfismo sexual durante a fase adulta. As três espécies mais importantes para a saúde humana, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium* e *Schistosoma japonicum*, apresentam características morfológicas e fisiológicas particulares, diferentes hospedeiros intermediários e distintas localizações no hospedeiro definitivo, além de distribuições geográficas diferentes (Rollinson & Simpson, 1987).

A esquistossomose tem uma prevalência heterogênea quanto ao clima, vegetação e topografia, e está associada à presença do hospedeiro intermediário e a alguns fatores de risco relacionados ao uso da água (Guimarães *et al.*, 2006). Na América do Sul, o Brasil é o país com maior prevalência de esquistossomose. A transmissão da doença ocorre em uma vasta área e a espécie causadora é o *S. mansoni* (Steinmann *et al.*, 2006). Segundo o Guia de Vigilância Epidemiológica e Controle da Esquistossomose, no Brasil, as áreas endêmicas importantes abrangem os estados do Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Espírito Santo e Minas Gerais. Os índices de prevalência mais elevados ocorrem em municípios dos estados de Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Minas Gerais. Os estados com distribuição focal são Pará, Maranhão, Ceará, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2007). A distribuição da esquistossomose no estado de Minas Gerais é irregular, intercalando áreas de alta prevalência com outras de transmissão baixa ou nula (Guimarães *et al.*, 2006) (Fig. 1).

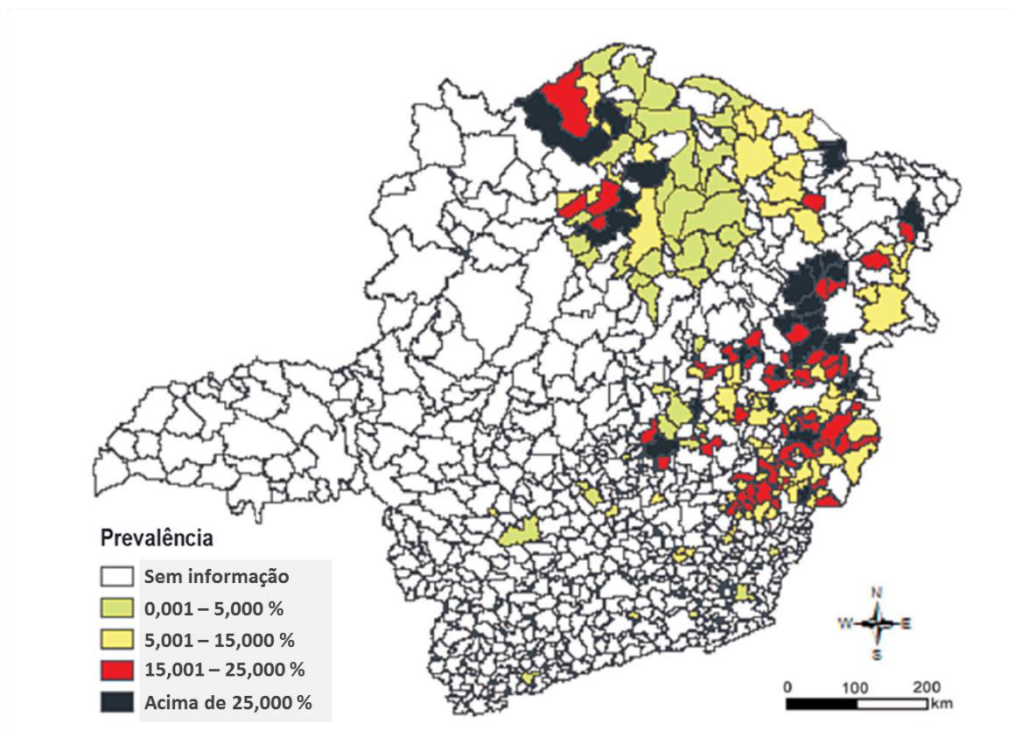


Figura 1: Mapa de prevalência da esquistossomose mansônica no estado de Minas Gerais-Brasil. Distribuição da prevalência da esquistossomose nos municípios de Minas Gerais em porcentagem. Adaptada de Guimarães e colaboradores (2006).

1.2 Ciclo de desenvolvimento do *Schistosoma mansoni*

O agente causador da esquistossomose foi descoberto em 1851. Em 1913 o hospedeiro intermediário foi identificado e o ciclo de vida do parasito descrito e reproduzido em laboratório (Foster, 1965 e Katz, 2008).

O ciclo de vida do *S. mansoni*, espécie causadora da esquistossomose no Brasil, envolve duas gerações: a primeira no hospedeiro definitivo vertebrado, onde ocorre a maturação dos vermes e reprodução sexuada; e a segunda no hospedeiro intermediário invertebrado, onde ocorre a reprodução assexuada (Fig. 2).

Os hospedeiros intermediários do *S. mansoni* são os caramujos do gênero *Biomphalaria* (Davis, 1985 e Gryseels *et al.*, 2006). Milhares de cercárias são produzidas por um único esporocisto no hospedeiro intermediário, que as liberam de forma intermitente na água. Quando encontram um hospedeiro definitivo apropriado, as cercárias liberam as secreções da glândula acetabular, facilitando a sua penetração pela epiderme e iniciando o processo de transformação em esquistossômulos (Stirewalt *et al.*, 1983 e Wilson & Coulson, 2009). Os esquistossômulos permanecem na epiderme por 53 horas, na derme por 18 horas e levam cerca de 8 horas para penetrar em uma vênula (Wilson & Lawson, 1980). Através da circulação, os esquistossômulos chegam aos pulmões em 2 a 7 dias (Wilson & Coulson, 1986). Do pulmão, os esquistossômulos são enviados ao coração e, de lá, pela circulação geral a todas as partes do corpo do hospedeiro definitivo. Somente quando alcançam o sistema porta intra-hepático podem completar seu desenvolvimento (Miller & Wilson, 1980). Quatro semanas após a infecção, a maioria dos vermes encontram-se maduros e prontos para se acasalarem. Os vermes acasalados deslocam-se ativamente contra a corrente circulatória do sistema porta e migram para as veias mesentéricas pélvicas (Bloch, 1980). O casal está em constante associação, encontrando-se a fêmea no canal ginecóforo do macho. A fêmea depende do contato com o macho para completar a sua maturação (LoVerde & Chen, 1991). A produção de ovos começa 30 a 40 dias após a infecção e os mesmos são movidos ativamente para o lúmen do intestino, sendo eliminados para o ambiente através das fezes do hospedeiro definitivo infectado (Rollinson & Simpson, 1987). Muitos ovos não ultrapassam a parede intestinal e são levados pela corrente sanguínea a órgãos e tecidos do hospedeiro definitivo. Uma resposta imunológica é gerada contra antígenos liberados pelos ovos presentes no tecido do hospedeiro definitivo, resultando na formação do granuloma (Katz *et al.*, 1986). Os ovos eliminados pelo hospedeiro definitivo através das fezes eclodirão liberando os miracídios se encontrarem condições apropriadas, como água limpa com temperatura e iluminação adequadas e baixa hipotonicidade. Uma vez que o ovo é rompido,

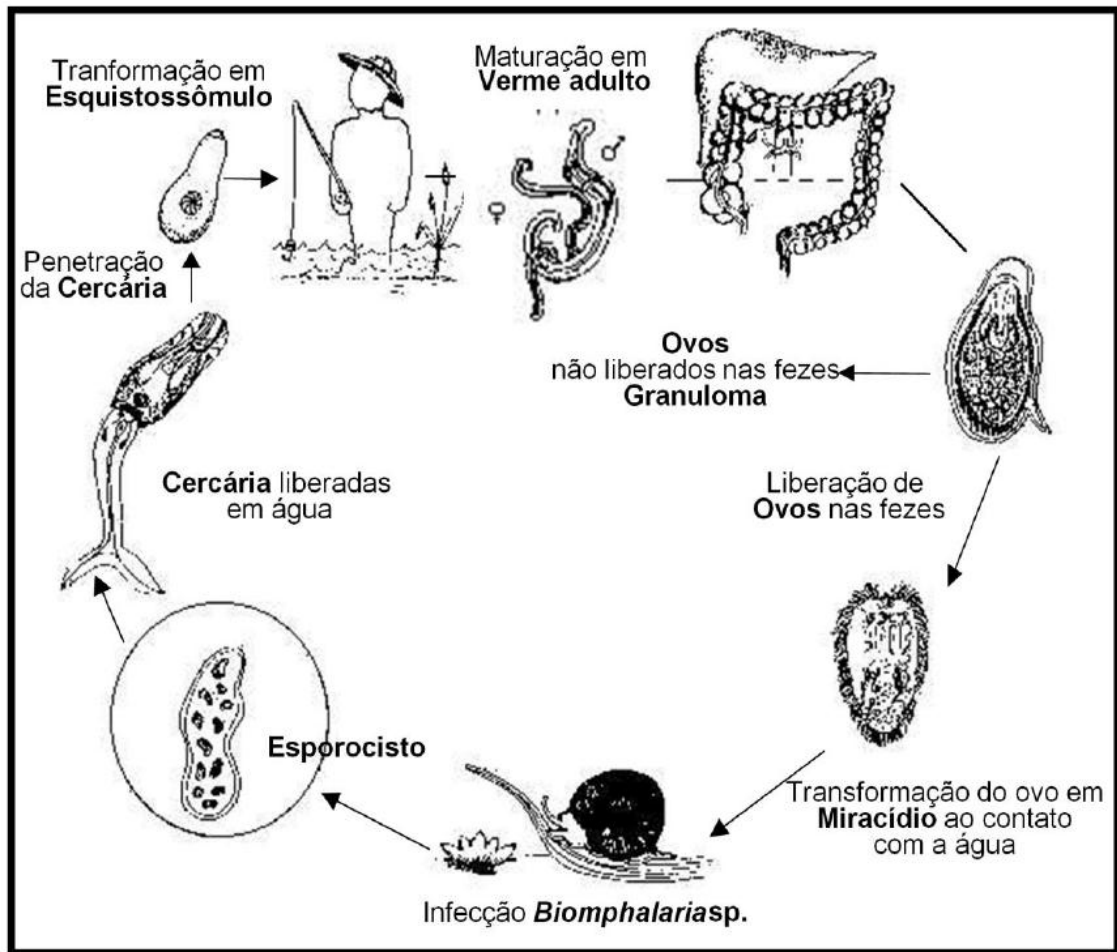


Figura 2: Ciclo biológico representativo do *Schistosoma mansoni*. As cercárias, ao saírem do caramujo, nadam em busca de um hospedeiro. Ao penetrarem pela pele do hospedeiro definitivo perdem sua cauda, iniciando-se o processo de transformação em esquistossômulos. Os esquistossômulos migram através da pele até as veias, seguindo para os pulmões de onde são enviados pela corrente sanguínea a todos os órgãos do hospedeiro. Ao alcançarem o sistema porta intra-hepático podem completar seu desenvolvimento. Vermes adultos de *S. mansoni* residem mais frequentemente nas veias mesentéricas superiores que drenam o intestino grosso. As fêmeas depositam seus ovos nas pequenas vênulas dos sistemas porta e perivesical, de onde são ativamente movidos para o lúmen do intestino sendo eliminados com as fezes. Os ovos que não ultrapassarem a parede do intestino são levados pela corrente sanguínea a alguns órgãos do hospedeiro, principalmente para o fígado e baço. Uma resposta imune é gerada contra estes ovos levando a formação de granulomas. Os ovos eliminados com as fezes ao caírem em água fresca eclodem e liberam os miracídeos que nadam e penetram no hospedeiro intermediário, o caramujo do gênero *Biomphalaria*. Os estágios no caramujo incluem duas gerações de esporocistos e a produção e liberação de cercárias.

os miracídios emergem e começam a nadar ativamente. O encontro com o hospedeiro intermediário deve ocorrer em um período de 24 horas, caso contrário o miracídio irá esgotar suas reservas energéticas. Por volta do oitavo dia após a penetração do miracídio no caramujo, este se apresenta como um tubo enovelado, imóvel, repleto de células germinativas em multiplicação, se transformando em esporocisto primário. Por volta da segunda semana, o esporocisto primário rompe-se para liberar esporocistos secundários, em número de 20 a 40. Os esporocistos secundários apresentam também células germinativas em constante multiplicação. Pouco a pouco, aglomerados celulares se diferenciam para formar cercárias. Os esporocistos podem formar várias gerações de cercárias. As cercárias deixam o hospedeiro através da formação de vesículas no epitélio do manto e da pseudobrânquia do molusco caindo em água limpa, e fechando o ciclo de vida do parasito (Rollinson & Simpson, 1987).

1.3 Patologia da esquistossomose mansônica

A esquistossomose mansônica tem o quadro clínico dividido em fases, aguda e crônica. A fase aguda é caracterizada por sintomas como dermatite cercariana e síndrome de Katayama, caracterizada por febre, dor de cabeça, fadiga, tosse. As manifestações da esquistossomose aguda não são comuns em indivíduos que vivem em área endêmica, sendo mais frequentes em indivíduos que se infectam pela primeira vez (Burke *et al.*, 2009; Gryseels *et al.*, 2006 e Caldas *et al.*, 2008). A esquistossomose crônica está associada ao aprisionamento de um grande número de ovos nos tecidos do hospedeiro e à formação de granulomas. O granuloma é uma consequência da reação inflamatória aos ovos que não foram excretados nas fezes e ficaram retidos no tecido do hospedeiro, levando a um quadro de fibrose (Andrade, 2009). Os antígenos solúveis de ovo (SEA) induzem essa reação granulomatosa por meio do desencadeamento de uma resposta imunológica de hipersensibilidade mediada por células T CD4⁺ (Mathew & Boros, 1986). Posteriormente, os linfócitos T CD4⁺ ativados secretam citocinas que promovem a formação e regulação do granuloma (Weinstock & Blum, 1987). A esquistossomose crônica tem seu quadro clínico dividido nas formas intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica (Andrade, 2004). Os sintomas mais comuns da forma intestinal são dores abdominais crônicas ou intermitentes, perda de apetite e diarreia. As formas hepáticas estão associadas a uma infecção duradoura, de alta intensidade, com fibrose severa e com consequente oclusão de veias portas, hipertensão-portal, esplenomegalia, circulação venosa colateral e varizes gastro-intestinais (Gryssels *et al.*, 2006). Muitos dos indivíduos de áreas endêmicas em fase crônica são assintomáticos e a sua resposta imunológica a antígenos de ovos é modulada (Gryseels *et al.*, 2006 e Caldas *et al.*, 2008). Embora a maioria das pessoas com esquistossomose não apresentem as formas graves

da doença, elas sofrem de lesões mais brandas, mas não menos significativas, com problemas de crescimento, anemia, dor abdominal, intolerância a exercícios, baixo desempenho escolar e reduzida capacidade de trabalhar (King *et al.*, 2006). As lesões do sistema nervoso central e de diferentes órgãos são devidas à localização ectópica dos ovos (Andrade, 2004).

1.4 Imunologia da esquistossomose

Logo no início da fase aguda há um aumento na proliferação celular estimulada por antígenos do parasito, que é modulada ao longo da fase aguda. Durante as primeiras 4-6 semanas da infecção em camundongos é gerada uma resposta moderada do tipo Th-1 desencadeada por esquistossômulos migrantes e vermes adultos imaturos. Essa resposta é caracterizada pelo aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias circulantes, incluindo TNF-alpha, IL-1, IL-6 e IFN-gama. O alto nível destas citocinas tem sido associado ao desenvolvimento da síndrome de Katayama. Ao iniciar a postura dos ovos, a resposta imune passa a ser do tipo Th-2 dominante, caracterizada por uma expressão aumentada de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. A resposta Th-2 atinge o seu pico na oitava semana após a infecção e, então, é modulada com a progressão da infecção crônica (Burke *et al.*, 2009). A manutenção prolongada da resposta Th-2 está associada à fibrose hepática e morbidade crônica, sendo IL-13 a principal citocina envolvida neste processo de fibrose (Pearce & MacDonald, 2002).

Enquanto uma resposta altamente polarizada para Th-1 leva a uma condição letal aguda de hepatotoxicidade, uma resposta polarizada para Th-2 leva a morbidade associada à doença crônica com aumento do granuloma e fibrose. A resposta Th-2 está implicada com a patologia durante a infecção helmíntica. No entanto, ela também permite a sobrevivência do hospedeiro protegendo-o contra uma resposta imunológica exacerbada. Uma importante consequência da resposta Th-2 é a produção de citocinas que previnem a produção de mediadores inflamatórios (Pearce & MacDonald, 2002). Camundongos sem células T CD4, quando infectados, são incapazes de formar granuloma e morrem devido ao efeito tóxico nos hepatócitos provocado por proteínas do ovo (Dunne & Doenhoff, 1983). A manutenção da doença parece envolver um equilíbrio entre as respostas Th-1 e Th-2, e a citocina IL-10 parece estar relacionada à prevenção de uma resposta excessiva Th-1 ou Th-2, atuando como uma citocina moduladora da infecção (Pearce & MacDonald, 2002).

A resposta imunológica contra a infecção por *S. mansoni* parece estar diretamente correlacionada à intensidade da infecção, existindo uma clara associação entre os níveis de IgE e a menor prevalência/intensidade da infecção, e uma associação oposta entre os níveis de IgG4, possivelmente por competir com IgE (Pereira *et al.*, 2010 e Hagan *et al.*, 1991).

1.5 Suscetibilidade versus resistência à infecção

A transmissão da esquistossomose e a subsequente infecção do hospedeiro definitivo são influenciadas por uma série de variáveis como fatores ambientais, particularmente a distribuição da água e presença do hospedeiro intermediário, associados a fatores do hospedeiro definitivo, como idade, sexo, genética, resposta fisiológica e imunológica (Pereira *et al.*, 2010).

1.5.1 Mecanismos de evasão do parasito ao sistema imunológico do hospedeiro

Os schistosomas desenvolveram mecanismos de escape ao ataque do sistema imunológico do hospedeiro, sendo capazes de parasitá-lo por anos e, assim, estabelecer uma infecção crônica. Para isto o parasito utiliza várias estratégias de escape, como: barreiras físicas, mimetismo de antígenos do hospedeiro, captação de moléculas do hospedeiro para o tegumento, modulação do sistema imunológico do hospedeiro ou bloqueio da ação de proteínas e enzimas (Dzik, 2006). Por exemplo, a membrana plasmática externa do tegumento dos schistosomas é sobreposta por um membranocálice de composição predominantemente lipídica, que atua como uma primeira barreira física para o acesso de anticorpos e fixação do complemento (Skelly & Wilson, 2006). Estudos de genoma, transcriptoma e proteoma de *Schistosoma* spp. indicam a presença de diversas proteínas antioxidantes, sendo o alto nível de expressão destas proteínas no tegumento uma forma de defesa do parasito aos danos oxidativos causados por fagócitos do hospedeiro (Wilson & Coulson, 2009). A penetração da cercária parece promover uma resposta inflamatória regulada a favor do parasito, induzindo dilatação das veias periféricas sem levar a uma resposta protetora (Mountford & Trottein, 2004). Algumas proteínas pertencentes à família de homólogos Wasp foram identificadas na secreção liberada pela cercária ao penetrar na pele. Em *Necator* sp., proteínas desta família demonstraram ter estrutura tridimensional similar a quimiocinas do hospedeiro, podendo assim interferir na resposta imunológica do hospedeiro (Wilson & Coulson, 2009).

Alguns estudos indicam que os schistosomas não apenas adotam uma postura defensiva, mas têm a capacidade de atacar diretamente o sistema imunológico do hospedeiro (Wilson & Coulson, 2009). Por exemplo, a proteína Sm16, secretada pelo parasito durante a sua penetração na pele do hospedeiro, é capaz de inibir *in vitro* a sinalização de receptores *Toll-like* em leucócitos humanos (Brannstrom *et al.*, 2009). Enquanto que a proteína SmKK7, identificada na secreção liberada pelas cercárias ao transformarem-se em esquistossômulos, apresentou similaridade a uma proteína encontrada em veneno de escorpião, a qual bloqueia o influxo de potássio para a célula. Uma vez que a ativação de células T é regulada por canais

de potássio, sugere-se que os schistosomas possam modular a resposta imunológica também através desta proteína (Curwen *et al.*, 2006). Existem ainda algumas evidências de que o mecanismo de defesa pelo sistema do complemento do hospedeiro é modificado para proteção do parasito (Wilson & Coulson, 2009). Por exemplo, a identificação da proteína DAF (*Decay Accelerating Factor*) no tegumento dos parasitos, a qual bloqueia a formação de MAC (Complexo de Ataque à Membrana) (Pearce *et al.*, 1990). E ainda a presença no genoma do parasito de seis genes homólogos ao gene que codifica a proteína CD59, um potente inibidor de MAC, com expressão de quatro variantes da proteínas CD59 no tegumento (Wilson & Coulson, 2009).

1.5.2 Resistência induzida do hospedeiro à infecção

Estudos de resistência induzida após tratamento utilizam a diminuição ou ausência do número de ovos nas fezes como indicador de resistência. Indivíduos resistentes à reinfecção têm resposta celular linfoproliferativa maior para antígenos de verme adulto e esquistossômulo (de Jesus *et al.*, 1993). As respostas imunológicas que foram associadas à resistência induzida são todas do tipo Th-2, caracterizada pela secreção aumentada de IL-4, IL-5 e IgE, além de um alto número de eosinófilos (Correa-Oliveira *et al.*, 2000a e Correa-Oliveira *et al.*, 2000b). Um estudo recente demonstrou que o bloqueio de IL-10 combinado ao tratamento quimioterápico por Praziquantel (PZQ) reduz o estabelecimento de nova infecção, indicando que IL-10 possa impedir o desenvolvimento de resistência induzida (Wilson *et al.*, 2011). Alguns estudos sugerem que indivíduos adultos são fisiologicamente e imunologicamente mais resistentes à reinfecção após tratamento quando comparados com crianças (Pereira *et al.*, 2010). Existem evidências de que a resistência induzida está associada a repetidos ciclos de exposições e tratamento por PZQ, combinado a mudanças imunológicas do hospedeiro (Black *et al.*, 2010). A influência de IgE na resistência após quimioterapia tem sido relatada tanto para *S. haematobium* quanto para *S. mansoni* (Correa-Oliveira *et al.*, 2000a), sendo observado um alto nível de IgE em indivíduos adultos que vivem em área endêmica provavelmente associado a contínuas exposições aos antígenos do parasito, gerando resistência à reinfecção em indivíduos de maior idade (Pereira *et al.*, 2010).

Estudos imuno-epidemiológicos com ASP-2 (*Ancylostoma Secreted Protein-2*), uma proteína selecionada para testes vacinais contra a ancilostomose, associaram a redução do risco de adquirir um alto nível de infecção a altos níveis de IgE (Loukas *et al.*, 2006). No entanto, testes clínicos com esta proteína em seres humanos geraram alguns efeitos adversos, como eritema, inchaço, calor, coceira e dor (Bethony *et al.*, 2008). Portanto, a resistência induzida por IgE pode não ser a resposta desejada quando utilizada para proteção vacinal.

1.5.3 Resistência natural do hospedeiro à infecção

O grupo de Correa-Oliveira foi o primeiro a descrever a presença de indivíduos chamados “normais endêmicos”, os quais tendem a ser naturalmente resistentes à infecção por *S. mansoni*. Estes indivíduos apresentam uma forte resposta imunológica contra antígenos do parasito e ausência de infecção, determinada pela ausência de ovos do parasito nas fezes ao longo de 5 anos, apesar de estarem continuamente em contato com água contaminada por cercárias em área endêmica. Além disso, estes indivíduos também não possuem uma história prévia de tratamento contra esquistossomose (Viana *et al.*, 1995 e Bethony *et al.*, 2011). É sugerido que a sensibilização imunológica dos indivíduos naturalmente resistentes possa ser consequência da interação materno-fetal, infecção unissexual, aborto da infecção antes da maturação dos vermes, baixa infecção, não fecundidade ou autocura. Imunologicamente, os indivíduos normais endêmicos apresentam uma alta resposta proliferativa a antígenos solúveis de verme adulto (SWAP) e ovo (SEA), produzem altos níveis de INF-gama e IgE e baixos níveis de IgG4, distinguindo parcialmente dos indivíduos resistentes após tratamento e infectados. Em indivíduos “normais endêmicos” não é observada uma clara associação com o perfil de citocinas Th-2, diferentemente daqueles indivíduos resistentes à reinfecção (Correa-Oliveira *et al.*, 2000a).

1.5.4 Autocura da esquistossomose pelo hospedeiro

A autocura da esquistossomose foi relatada em macacos Rhesus, ocorrendo uma diminuição espontânea no número de ovos excretados nas fezes rapidamente após a infecção ter sido estabelecida. Os vermes adultos perfundidos destes animais apresentaram mudanças degenerativas, envolvendo a suspensão na captação de nutrientes, inanição e falha dos órgãos. Uma diminuição na captação de nutrientes dos vermes foi também observada em cultura quando suplementada com soro de Rhesus que desenvolveram a cura mais rapidamente. Nestes animais foi observado que o título de IgM reativo a SWAP declina gradativamente até o momento da deterioração dos vermes, enquanto a produção intensa de IgG no início da infecção e sua manutenção foi correlacionada a um menor número de vermes perfundidos. O baixo nível de IgE total observado nestes animais contrasta com o alto nível comumente encontrado nas infecções por helmintos. No entanto, acredita-se ser um reflexo da diminuição de estímulos imunológicos gerados pela diminuição no número de ovos (Wilson *et al.*, 2008). A autocura relatada em *Rattus norvegicus* difere da observada em macacos Rhesus, onde foi descrito um aumento no título de IgE e recrutamento de mastócitos no tecido hepático periportal destes ratos. É sugerido, então, que a presença de histamina e serotonina gerada por

estas células possam estimular os receptores destas substâncias presentes nos vermes, levando a sua exaustão e morte (Wilson & Coulson, 2009).

1.6 Controle da esquistossomose

O controle da doença é realizado através de métodos químicos e/ou biológicos de eliminação do hospedeiro intermediário, de implementação do saneamento básico, de educação da população, evitando o contato das pessoas com águas contaminadas e, principalmente, através da quimioterapia com PZQ (OMS, 2007).

O desenvolvimento da droga anti-helmíntica PZQ (Davis & Wegner, 1979) fez da quimioterapia a principal forma de controle da esquistossomose (Cioli & Pica-Mattoccia, 2003 e Abdul-Ghani *et al.*, 2009). As tentativas de controle da esquistossomose no Brasil através da quimioterapia em massa trouxeram como resultado mais evidente a redução da forma grave da doença. No entanto, uma alta taxa de reinfecção permanece nas áreas endêmicas, mesmo após o tratamento em massa, somada à notificação de novos casos de infecção. Por estas razões, o sucesso da estratégia baseada apenas na quimioterapia é limitado (King, 2009 e King *et al.*, 2006).

A eficácia do PZQ está relacionada ao tempo de infecção e a parâmetros correspondentes a infecções bissexuais e unissexuais. Em camundongos, foi determinado que a dose efetiva da droga é trinta vezes mais eficaz contra vermes adultos de 28 dias do que contra vermes jovens de 7 dias, indicando uma relativa ineficiência do PZQ contra infecções recentes, um fator que pode ocasionar um baixo índice de cura em áreas hiperendêmicas. Fêmeas de 7 semanas provenientes de infecção unissexual demonstraram ser menos sensíveis ao tratamento por PZQ que machos de 7 semanas provenientes de infecção unissexual que, por sua vez, demonstraram ser menos sensíveis em comparação a vermes provenientes de infecção bissexual, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Pica-Mattoccia & Cioli, 2004). Além disto, relatos de aumento da resistência a drogas em helmintos indicam a necessidade de precaução quanto ao uso do PZQ (Doenhoff *et al.*, 2008 e Rogers & Bueding, 1971).

1.7 Diagnóstico da esquistossomose

O teste padrão ouro para a esquistossomose mansônica continua sendo a detecção direta de ovos viáveis nas fezes ou em amostras histológicas (Gray *et al.*, 2011). Os ovos de *S. mansoni* são facilmente identificados ao microscópio devido a características peculiares, como tamanho e forma com uma espícula lateral. A realização do teste de ovos nas fezes deve ocorrer em um período de dois meses após o contato com a água suspeita de contaminação. Este período corresponde ao tempo em que os vermes iniciam a ovoposição (Gray *et al.*, 2011

e Gryssels *et al.*, 2006). O teste recomendado pela OMS para o diagnóstico da esquistossomose intestinal de alta intensidade é o Kato-Katz, sendo este o teste utilizado em estudos de campo. O Kato-Katz é um teste diagnóstico parasitológico direto que consiste na sedimentação espontânea de fezes. Embora a especificidade do teste de Kato-Katz seja de 100%, a sensibilidade varia quanto à prevalência e intensidade da infecção e quanto ao número de amostras coletadas e lâminas preparadas (Katz *et al.*, 1972 e Gray *et al.*, 2011). As técnicas de diagnóstico parasitológico direto são laboriosas, consomem um grande tempo e têm se tornado relativamente insensíveis devido à difusão da quimioterapia com PZQ, que resultou na diminuição da carga parasitária no hospedeiro (Hamilton *et al.*, 1998).

Testes imunodiagnósticos para a esquistossomose já estão disponíveis, porém, são menos sensíveis e específicos que o exame parasitológico direto realizado pela análise de diversas lâminas fecais (Gray *et al.*, 2011). Os testes imunodiagnósticos baseiam-se preferencialmente na detecção por ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), hemaglutinação indireta ou imunofluorescência, através da detecção de IgG, IgM ou IgE contra antígenos solúveis de verme adulto ou ovo (Gryssels *et al.*, 2006 e Gray *et al.*, 2011). A detecção dos antígenos circulantes, CCA ou CAA, de verme adulto ou ovo também tem sido utilizada para o diagnóstico da esquistossomose, no entanto, não apresenta sensibilidade e especificidade para um diagnóstico definitivo (Midzi *et al.*, 2009; Shane *et al.*, 2011 e Gray *et al.*, 2011). Testes baseados em PCR (*Polymerase Chain Reaction*) vêm sendo desenvolvidos com alta sensibilidade e especificidade (Oliveira *et al.*, 2010 e Gomes *et al.*, 2010).

A busca por novos biomarcadores de diagnóstico é uma área que merece atenção, uma vez que a deficiência de testes de diagnóstico efetivos tem sido relacionada como um dos fatores que contribuem para a transmissão da doença. O diagnóstico eficaz para a esquistossomose torna-se essencial também em estudos epidemiológicos e para uma avaliação adequada dos programas de controle (Hamilton *et al.*, 1998), ressaltando que o mesmo deve ser adequado de acordo com o estágio de controle da doença (Bergquist *et al.*, 2009). Desta forma, ainda é necessário o desenvolvimento de um novo teste diagnóstico simples, rápido, de custo reduzido, sensível, específico, capaz de diagnosticar baixas infecções e diferenciar infecções prévias (Gray *et al.*, 2011).

1.8 Vacina para esquistossomose

O desenvolvimento de uma vacina contra esquistossomose é extremamente importante para o controle efetivo da transmissão do parasito, uma vez que a imunização resulta em proteção a longo prazo, enquanto a quimioterapia resulta em uma redução a curto prazo da

carga parasitária (Bergquist *et al.*, 2002). Apesar do grande esforço realizado pela comunidade científica, ainda não há uma vacina eficaz disponível contra a esquistossomose. A falta de compreensão dos mecanismos imunológicos de proteção e a dificuldade na identificação de antígenos que estimulem uma resposta imunológica efetiva são barreiras para o desenvolvimento da vacina contra a esquistossomose (Wilson *et al.*, 2004). Muitos potenciais antígenos vacinais têm sido propostos, no entanto, demonstraram resultados desapontadores, mesmo com diferentes esquemas de imunização e modelos experimentais (DeMarco & Verjovski-Almeida, 2009 e McManus & Loukas, 2008). O alto nível de proteção obtido pela vacinação com cercárias irradiadas (Wilson & Coulson, 1999), a existência de indivíduos não infectados em áreas endêmicas (Correa-Oliveira *et al.*, 1989 e Gazzinelli *et al.*, 1992), o fato de indivíduos jovens serem mais propícios a reinfecção que indivíduos adultos (Wilson & Coulson, 2009), a autocura relatada em macacos Rhesus (Wilson *et al.*, 2008) e o uso de vacinas recombinantes veterinárias para helmintos como *Taenia ovis* e *Echinochoccus granulosus* (Dalton & Mulcahy, 2001; Johnson *et al.*, 1989 e Hotez *et al.*, 2010) sugerem que é possível o desenvolvimento de uma vacina contra esquistossomose.

A vacinação de camundongos com cercárias de *S. mansoni* atenuadas por raios-X ou radiação gama (RA) foi o modelo de vacinação capaz de induzir em laboratório os níveis mais altos de proteção, variando entre 50-80% (Dean *et al.*, 1983). A vacinação com cercária RA não foi testada em seres humanos. No entanto, em chimpanzés foi obtido um nível de 40% de proteção após 3 exposições a 27 mil cercárias RA (Eberl *et al.*, 2001). Já em babuínos, obteve-se 80% de proteção com 5 exposições a 9 mil cercárias RA (Kariuki *et al.*, 2006). Quando aumentado o intervalo entre vacinação e desafio ocorreu uma diminuição no nível de proteção, indicando uma necessidade de reimunização para a manutenção de altos níveis de anticorpos. Estudos extensivos da vacina com cercária RA demonstraram que a proteção não depende apenas de um único mecanismo imunológico, mas é multifatorial. Além disso, os níveis de proteção alcançados também estão associados a fatores genéticos do hospedeiro e ao protocolo de vacinação aplicado (Hoffmann *et al.*, 1999; Jankovic *et al.*, 1999 e Mountford, 2005). A vacinação por RA é mais efetiva em animais previamente infectados. Este é um dado importante visto que a população-alvo deve ser de áreas endêmicas para a esquistossomose (Mountford, 2005). O mecanismo que faz da vacina com cercária RA um sucesso ainda não é totalmente compreendido, mas parece estar associado ao retardo na migração e desenvolvimento do esquistossômulo RA, permitindo que o sistema imune reconheça moléculas importantes do parasito para montar uma resposta imune protetora (Jones *et al.*, 2008).

Apesar dos altos níveis de proteção induzidos pela vacinação com cercária RA, o uso deste modelo de vacinação em seres humanos não é seguro e nem ético (Kariuki *et al.*, 2006), tornando-se apenas uma prova de conceito. Sendo assim, a busca por vacinas constituídas por antígenos do parasito ainda continua. Grande parte dos estudos que visam o desenvolvimento de uma vacina contra esquistossomose têm se concentrado em vacinas de subunidades, compostas por antígenos nativos purificados e por antígenos recombinantes, e em vacinas de DNA.

Seis antígenos foram selecionados pela OMS, em meados dos anos 90, para serem testados em laboratórios independentes como potenciais antígenos imunoprotetores, sendo estes: IrV-5 (Soisson *et al.*, 1992), Sm97/ Paramiosina (Pearce *et al.*, 1988), MAP-4/ TPI (Reynolds *et al.*, 1994), 28-GST (Capron *et al.*, 1994 e 2005), Sm14/ FABP (Tendler *et al.*, 1996) e MAP-3/ Sm23 (Reynolds *et al.*, 1992). No entanto, nenhum destes antígenos foi capaz de induzir mais do que uma redução parcial na carga parasitária em camundongos após o desafio, em relação ao grupo controle não imunizado. Nenhum antígeno induziu o mesmo nível de proteção obtido utilizando cercária RA. Apenas o antígeno GST recombinante de *S. haematobium* (rSh28GST), que está associado à inibição da fecundidade do parasito, progrediu até a triagem clínica nas fases I e II. Nestes ensaios clínicos não foram observados efeitos adversos. Altos níveis de anticorpos que neutralizam a atividade de GST foram encontrados nos testes de fase I e II, associados principalmente a resposta por IgA e IgG3. Informações sobre a eficiência, a duração da proteção e seu progresso para licenciamento não estão disponíveis na literatura (Capron *et al.*, 2002; Capron *et al.*, 2005; Wilson & Coulson, 2006 e Hotez *et al.*, 2010). A proteína recombinante GST de *S. mansoni* (rSm28GST) foi também capaz de induzir elevado nível de proteção em diferentes animais de laboratório (Ballouol *et al.*, 1987), assim como a GST de *S. japonicum* (Sj28GST), quando utilizada como vacina de DNA (Shi *et al.*, 2001). O antígeno Sm14, uma proteína ligante de ácido graxo, alcançou até 67,9% de proteção em camundongo. No entanto, a estabilidade da proteína recombinante foi questionada. Sendo assim vários outros estudos foram conduzidos obtendo níveis de proteção inferiores ao inicialmente observado (Oliveira *et al.*, 2008). Estudos de estabilização da proteína Sm14 foram realizados pelo grupo (Ramos *et al.*, 2009).

Outros antígenos de *Schistosoma* spp. vêm demonstrando um significativo potencial para a progressão até a fase de ensaios clínicos. Sm-p80, uma proteína candidata a vacina de DNA, mostrou nível de proteção obtidos em babuínos compatível ao obtido pela cercária irradiada. Sm-p80 corresponde a uma subunidade da proteína Calpaina, a qual parece estar relacionada à biogênese da membrana dos schistosomas (Zhang *et al.*, 2010). O antígeno Sm29, uma proteína localizada no tegumento do parasito, conferiu 51% de proteção (Oliveira

et al., 2008 e Cardoso *et al.*, 2006). A proteína Sm29 foi preferencialmente reconhecida por anticorpos da classe IgG1 e IgG3 quando utilizado soro de indivíduos naturalmente resistentes de área endêmica, sugerindo que anticorpos IgG1 e IgG3 estariam envolvidos nos mecanismos de proteção imune e morte do parasito (Cardoso *et al.*, 2006). A vacinação de camundongos com a proteína recombinante SmTSP-2 (Tetraspanina 2), correspondente ao segundo domínio extracelular da proteína Tetraspanina de *S. mansoni*, obteve uma redução do número de vermes adultos de 57% após desafio. A proteína SmTSP-2 foi fortemente reconhecida por anticorpos da classe IgG3 e IgG4 quando soro de indivíduos naturalmente resistentes de área endêmica foi utilizado e não foi reconhecida pelo soro de indivíduos infectados ou não expostos a infecção (Tran *et al.*, 2006). Embora não se saiba a função das Tetraspaninas, elas têm sido localizadas através de estudos proteômicos no tegumento do parasito (McManus & Loukas, 2008). O antígeno CT-SOD induziu 60% de proteção em camundongo. CT-SOD corresponde a uma Superóxido Dismutase Citosólica, que pode atuar como uma importante defesa antioxidante (Shalaby *et al.*, 2003). Além destes antígenos, vários outros também foram testados e apresentaram resultados menos promissores até então, como a proteína rSm22.6 que em modelo murino conferiu proteção de 36,6% (Pacífico *et al.*, 2006) ou a proteína de tegumento rSmStoLP-2 (proteína *Stomatin Like-2*) que conferiu 32% de proteção em camundongos (Farias *et al.*, 2010).

Vários estudos de proteção realizados em helmintos demonstram que um mesmo antígeno candidato a vacina pode ter variação nos níveis de proteção alcançados e na resposta imunológica dependendo da forma em que é apresentado (proteína recombinante ou DNA), do tipo de vetor utilizado, da forma de administração (intravenosa, intradérmica, *gene gun*), da presença de adjuvante/estimulante, do protocolo de imunização (dose única, *prime-boost* e diferentes intervalos entre imunização) e do hospedeiro no qual a vacina foi testada. Sj28GST e Sm23 induziram os mesmos níveis de proteção quando utilizados em vacina recombinante ou de DNA. Sj97 demonstrou melhor desempenho quando utilizado como vacina recombinante (27-86%) comparada à vacina de DNA (35-40%). Em contraste, SjTPI apresentou melhor resultado quando utilizada como vacina de DNA (30-33%) do que quando utilizada como vacina recombinante (21-24%) (McManus & Loukas, 2008). Imunização com o antígeno Sm22.6 induziu proteção parcial como proteína recombinante e falhou como vacina de DNA (Pacífico *et al.*, 2006). O nível de proteção de Sj28GST variou entre diferentes hospedeiros vertebrados, obtendo proteção indicada por morte de vermes de 30-65% em ovelhas, nenhuma proteção em búfalos de cativeiro, 39% em búfalos de campo, 44% em bovinos; e uma proteção indicada pela diminuição no número de ovos de 43-72% em ovelhas, 30-60% em búfalo de cativeiro, 19% em búfalo de campo e 19% em bovinos (Shi *et*

al., 2001). Pelo fato do parasito induzir uma resposta imunológica distinta nos diversos hospedeiros definitivos, o uso de animais experimentais torna-se um obstáculo na identificação de antígenos imunoprotetores humanos, não sendo a melhor forma de investigá-los. O uso de soro animal na identificação e caracterização de antígenos pode ter dificultado os esforços na busca pela vacina, uma vez que não existe uma transferência direta dos resultados obtidos para os seres humanos (Driguez *et al.*, 2010). Este fato reforça a importância dos estudos com soros humanos na busca pela vacina contra esquistossomose.

Nem toda resposta imunológica é protetora, apenas respostas de efetores direcionados a antígenos específicos geram proteção contra infecção. Os principais obstáculos para o desenvolvimento de uma vacina para a esquistossomose consistem na falta de compreensão sobre o tipo de resposta imune que deve ser induzida e na dificuldade de identificar antígenos que desencadeiem mecanismos de proteção (Wilson *et al.*, 2004). Os mecanismos imunológicos que limitam ou previnem o estabelecimento da infecção, desenvolvidos por indivíduos com resistência natural ou induzida, podem constituir a base para o entendimento de uma vacina bem sucedida contra a esquistossomose humana (Bergquist *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2008 e Driguez *et al.*, 2010).

1.9 Proteoma

A vacinologia tem sido uma ciência empírica, tendo como consequência o desenvolvimento de poucas vacinas realmente efetivas ao longo de quase dois séculos (Doytchinova *et al.*, 2003). Recentes avanços em diversas áreas como imunologia, biologia molecular, genômica, proteômica, físico-química e em ciências da computação prometem um brilhante futuro para a prevenção, revelando antígenos potenciais para o desenvolvimento de vacinas, não apenas para doenças infecciosas agudas, mas também para infecções crônicas, alergias, doenças autoimunes e câncer (Andre, 2003). A era “omics” permitiu o surgimento da vacinologia reversa, técnica que consiste na predição *in silico* de epitopos presentes em todo o proteoma do patógeno. Desta maneira, torna-se possível a identificação de antígenos com potencial de interação com o sistema imunológico do hospedeiro sem a necessidade de realizar análises *in vitro* e *in vivo* (Sette & Rappuoli, 2010).

Atualmente, uma abordagem amplamente utilizada para a identificação de novos biomarcadores como alvos de drogas, marcadores de diagnóstico e prognóstico e candidatos para vacina contra doenças infecciosas, bem como para a compreensão de mecanismos que induzem resistência a drogas, diversidade antigênica, infectividade e patologia, consiste na utilização de ferramentas proteômicas. Estas ajudam a compreender e decifrar as informações codificadas nos genomas dos parasitos (Seliger & Kellner, 2002).

O sequenciamento do genoma de diferentes organismos forneceu um grande número de dados e o atual desafio é desvendar o seu significado. Em contraste com a natureza estática do genoma, que possui a mesma sequência de DNA em todas as células de um mesmo organismo, o proteoma possui uma natureza dinâmica, sendo constantemente alterado em resposta a diferentes estímulos. Um único genoma pode dar origem a diversos proteomas, podendo variar de acordo com o estágio de desenvolvimento, diferenciação e com os diferentes estímulos internos e externos aos quais as células estão expostas (Yarmush & Jayaraman, 2002 e Lane, 2005).

De acordo com o tipo de análise realizada, as abordagens proteômicas podem ser classificadas em: proteoma para estudos de expressão proteica, que analisa as diferenças no perfil de proteínas expressas entre amostras que se diferem por alguma variável; proteoma estrutural, que mapeia o complexo de proteínas presentes nas diferentes organelas celulares e caracteriza as interações proteína-proteína; e proteoma funcional, que se baseia em alguma propriedade específica de um grupo de proteínas, como sua afinidade por algum ligante ou presença de um motivo protéico específico (Ex. kinomas) (Graves & Haystead, 2002).

Diferentes estratégias proteômicas são utilizadas na busca de novos biomarcadores, tais como: perfil proteico, que analisa apenas o espectro de massas MS sem identificar as proteínas; *shotgun*, que baseia na análise de uma mistura complexa de peptídeos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS); e eletroforese bidimensional (2-DE), que permite a separação de uma mistura complexa de proteínas de acordo com o seu ponto isoeletrico e massa molecular em um mesmo gel, podendo ser acompanhada de excisão dos *spots* proteicos para subsequente identificação por espectrometria de massas (Ducan & Hunsucker, 2005).

1.9.1 Proteoma de schistosomas

Os estudos pós-genômicos tornaram-se mais avançados não apenas com o advento de novas tecnologias em proteômica, mas também com o sequenciamento do genoma completo do *S. mansoni* (Berriman *et al.*, 2009), do *S. japonicum* (Schistosoma japonicum Genome Sequencing and Functional Analysis Consortium, 2009) e, mais recentemente, do *S. haematobium* (Young *et al.*, 2012). O sequenciamento por RNA-seq do transcriptoma do *S. mansoni* em quatro fases distintas do ciclo de vida possibilitou uma melhora recente e significativa na anotação do genoma do parasito (Protassio *et al.*, 2012). Na primeira versão do genoma de *S. mansoni*, o genoma nuclear apresentou um tamanho total de 363 Mb, onde foi possível mapear 43% do genoma montado em um dos sete pares de cromossomos autossômicos ou nos cromossomos sexuais de *S. mansoni* através da técnica de FISH

(*Fluorescence In Situ Hybridization*) (Berriman *et al.*, 2009). Na nova versão, o genoma nuclear apresentou um tamanho total de 381 Mb, onde foi possível mapear 81% das sequências em seus cromossomos. Além disso, o número de genes preditos passou de 13.184 para 10.852 (Protassio *et al.*, 2012). Uma vez que um grande número de proteínas do *S. mansoni* não possui similaridade com nenhuma proteína ortóloga nos bancos de dados existentes, a geração de bancos de dados de proteínas preditas a partir do genoma do parasito permitiu um progresso na identificação de proteínas a partir de dados gerados por espectrometria de massas (DeMarco & Verjovski-Almeida, 2009).

Diferentes estudos proteômicos vêm sendo realizados com as diferentes espécies de schistosomas, concentrando principalmente na descrição de proteínas diferencialmente expressas entre as formas de desenvolvimento do parasito (Curwen *et al.*, 2004 e Liu *et al.*, 2006), entre vermes machos e fêmeas (Cheng *et al.*, 2005), entre cercária RA e normal (Yang *et al.*, 2009) e entre ovos imaturos e maduros (Mathieson & Wilson, 2010). Outros estudos têm se concentrado nas proteínas expostas na interfase hospedeiro-parasito, principalmente pela identificação de proteínas do tegumento (Braschi & Wilson, 2006; Braschi *et al.*, 2006; Perez-Sanchez *et al.*, 2008; Perez-Sanchez *et al.*, 2006; van Balkom *et al.*, 2005; Castro-Borges *et al.*, 2011a e Castro-Borges *et al.*, 2011b), proteínas secretadas/excretadas pelo parasito (Cass *et al.*, 2007; Curwen *et al.*, 2006; Guillou *et al.*, 2007; Hansell *et al.*, 2008; Knudsen *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2009; Perez-Sanchez *et al.*, 2006 e Wu *et al.*, 2009) e do proteossoma 20S de *S. mansoni* (Castro-Borges *et al.*, 2006) (Tabela 1).

Os estudos proteômicos comparativos entre as formas de desenvolvimento podem indicar funções essenciais no desenvolvimento do parasito e a existência de mecanismos adaptativos que, se interrompidos, impediriam o desenvolvimento da doença, sendo então potenciais alvos vacinais. Já os estudos de proteínas que são expostas na superfície do parasito, provável sítio de interação com o hospedeiro, indicam alvos que poderiam ser mais acessíveis a drogas e a anticorpos (Verjovski-Almeida & DeMarco, 2008).

A comparação das proteínas solúveis de quatro formas de desenvolvimento do *S. mansoni* (cercárias, esquistossômulos, vermes adultos e ovos) demonstrou que 70% das proteínas detectadas neste experimento estão presentes nas quatro formas analisadas, o que sugere que essas proteínas participam de vias elementares e essenciais no parasito (Curwen *et al.*, 2004). Um perfil de 2-DE similar foi obtido também para vermes machos e fêmeas, com poucas proteínas expressas exclusivamente em cada sexo (Cheng *et al.*, 2005).

Utilizando diferentes técnicas aplicadas em estudos proteômicos como, 2-DE e LC-MS/MS, foram analisadas proteínas secretadas de ovo, cercárias e vermes adultos. Em ovos, foram identificadas por MudPit (*Multidimensional Protein Identification Technology*) 188

Tabela 1: Estudos proteômicos desenvolvidos com schistosomas.

Proteoma em estudo	Metodologia	Fase de desenvolvimento*	Espécie	Referência bibliográfica
Proteínas solúveis expressas nos diferentes estágios de desenvolvimento	2-DE comparativo	c, e, a, o	<i>S. mansoni</i>	Curwen <i>et al.</i> (2004)
Proteínas solúveis e hidrofóbicas diferentemente expressas entre macho e fêmea	2-DE comparativo	am, af, e, o	<i>S. japonicum</i>	Cheng <i>et al.</i> (2005)
Proteínas expressas no tegumento de verme adulto	LC-MS/MS	a	<i>S. mansoni</i>	van Balkom <i>et al.</i> (2005)
Proteínas expressas nos diferentes estágios de desenvolvimento	Análise de proteoma predito	c,e,a,o,m	<i>S. japonicum</i>	Liu <i>et al.</i> (2006)
Proteínas presentes em diferentes frações do tegumento do verme adulto	2-DE	a	<i>S. mansoni</i>	Braschi <i>et al.</i> (2006)
Proteínas expostas na superfície do verme adulto reveladas por biotinição	2-DE LC/MS Biotinição/captura/ GeLC/MS	a	<i>S. mansoni</i>	Braschi & Wilson (2006)
Proteassomo 20S	2-DE	a	<i>S. mansoni</i>	Castro-Borges <i>et al.</i> (2006)
Proteínas secretadas pelo ovo	MudPit	o	<i>S. mansoni</i>	Cass <i>et al.</i> (2007)
Proteínas secretadas/excretadas pelo miracídio	2-DE com <i>spots</i> analisados por LC-MS/MS	m	<i>S. mansoni</i>	Guillou <i>et al.</i> (2007)
Proteínas do hospedeiro presentes no tecido do parasito	InGel-LC-MS/MS e RP-LC-MS/MS	c, e, a, o, m	<i>S. japonicum</i>	Liu <i>et al.</i> (2007)
Proteína do tegumento de verme adulto macho e fêmea	LC-MS/MS	af, am	<i>S. bovis</i>	Perez-Sanchez <i>et al.</i> (2008)
Proteases secretadas pela cercária	InGel-LC-MS/MS	c	<i>S. japonicum</i>	Dvorak <i>et al.</i> (2008)
Proteínas secretadas pela cercária	LC-MS/MS	c	<i>S. mansoni</i>	Hansell <i>et al.</i> (2008); Knudsen <i>et al.</i> (2005); Curwen, <i>et al.</i> (2006)
Proteínas diferencialmente expressas entre cercária atenuada e normal	Cromatografia líquida bidimensional e <i>blot</i>	c	<i>S. japonicum</i>	Yang <i>et al.</i> (2009)
Proteínas secretadas/excretadas de verme adulto	LC-MS/MS	a	<i>S. japonicum</i>	Liu <i>et al.</i> (2009)
Proteínas expressas durante a transformação de miracídio em esporocisto	LC-MS/MS	m, p	<i>S. mansoni</i>	Wu <i>et al.</i> (2009)
Proteínas totais e secretadas de ovos maduros e imaturos	2-DE comparativo	m, o	<i>S. mansoni</i>	Mathieson <i>et al.</i> (2010)
Proteínas do tegumento de verme adulto extraídas por <i>shaving</i> enzimático	2-DE LC/MS	a	<i>S. mansoni</i>	Castro-Borges <i>et al.</i> (2011a)
Quantificação de algumas proteínas do tegumento usando a técnica de QconCAT	QconCAT Maldi-ToF MS	a		Castro-Borges <i>et al.</i> (2011b)
Proteínas comumente expressas entre <i>S. mansoni</i> e <i>F. hepatica</i>	2-DE comparativo	a	<i>S. mansoni</i> e <i>F. hepatica</i>	Boukli <i>et al.</i> (2011)
Proteínas candidatas a vacina	2D-WB e <i>dot-blot</i>	a, o	<i>S. japonicum</i>	Abdel-Hafeez <i>et al.</i> (2009)
Proteínas secretadas/excretadas e do tegumento, e proteoma sorológico	2-DE e 2D-WB com soro de cabra infectada	a	<i>S. bovis</i>	Perez-Sanchez <i>et al.</i> (2006)
Proteoma sorológico	Imunoprecipitação com soro de rato seguido de 2-DE	a	<i>S. mansoni</i>	Mark <i>et al.</i> (1991)
Proteoma sorológico	2D-WB com soro de coelho infectado	a	<i>S. mansoni</i>	Losada <i>et al.</i> (2011)
Proteoma sorológico	2D-WB com soro de coelho infectado	a	<i>S. japonicum</i>	Zhong <i>et al.</i> (2010)
Proteoma sorológico comparativo entre helmintos	2D-WB com soro de hamster infectado por <i>S. haematobium</i> , ou <i>E. caproni</i>	a	<i>S. haematobium</i> , <i>S. bovis</i> e <i>E. caproni</i>	Higon <i>et al.</i> (2011)
Proteoma- sorológico	2D-WB com soro humano infectado	a	<i>S. haematobium</i>	Mutapi <i>et al.</i> (2005), (2008) e (2011)

*c: cercária; e: esquistossômulo; a: verme adulto; am: verme adulto macho; af: verme adulto fêmea; o: ovo; m, miracídio; p: esporocisto.

proteínas relacionadas ao desenvolvimento e sinalização, vias metabólicas, modulação da resposta imunológica, manutenção do equilíbrio de oxi-redução, conformação proteica e outras ainda não caracterizadas em *Schistosoma* spp. (Cass *et al.*, 2007). Os produtos de secreção de cercárias de *S. mansoni* contêm proteases e algumas proteínas imuno-reguladoras, as quais correlacionam-se, respectivamente, com a função de penetração do parasito na pele e a subsequente sobrevivência no hospedeiro (Curwen *et al.*, 2006 e Knudsen *et al.*, 2005).

Van Balkon e colaboradores (2005) utilizando a técnica proteômica por *shotgun* identificaram 429 proteínas de verme adulto de *S. mansoni*, das quais apenas 43 proteínas foram específicas do tegumento. Poucas proteínas de membrana foram identificadas neste experimento. Um maior número de proteínas de membrana foram identificadas no tegumento quando foi utilizado um gradiente de centrifugação e extração diferencial com agentes caotrópicos (Braschi *et al.*, 2006). Proteínas da superfície do verme foram identificadas após marcação destas por biotilação e recuperação por afinidade a estreptavidina (Braschi & Wilson, 2006) e através da digestão direta dos vermes com tripsina ou PiPLC (Fosfatidilinositol Fosfolipase C), uma enzima que cliva âncoras de GPI (GlicosilFosfatidilInositol), liberando as proteínas assim ancoradas na superfície do parasito (Castro-Borges *et al.*, 2011a). A detecção de proteínas do hospedeiro no tegumento e no fluido dos ovos de *S. mansoni*, quando utilizado banco de dados de mamíferos para a interpretação dos dados de MS, indica que o parasito provavelmente tem algum mecanismo para capturar ativamente proteínas do seu hospedeiro. Foi proposto que a presença dessas proteínas nos tecidos dos schistosomas reflete um mecanismo de escape do parasito contra o ataque do sistema imune do hospedeiro (Braschi & Wilson, 2006 e Liu *et al.*, 2007). A quantificação absoluta e relativa de algumas proteínas, previamente identificadas no tegumento, foi realizada em duas preparações distintas de extrato proteico de tegumento. Para isto foram comparados os pares de picos cromatográficos gerados pelo Maldi-ToF MS de peptídeos leves e pesados provenientes da amostra biológica e da construção SmQconCAT, respectivamente (Castro-Borges *et al.*, 2011b).

1.10 Imunoproteoma

A combinação de análises proteômicas convencionais e análises sorológicas tem sido aplicada como uma nova abordagem experimental na descoberta de marcadores sorológicos de diferentes doenças. Esta metodologia tem sido utilizada com sucesso na identificação de autoantígenos específicos de tumor, na detecção de fatores de virulência, antígenos candidatos a vacinas para doenças infecciosas, bem como na identificação de marcadores de prognóstico e diagnóstico (Seliger & Kellner, 2002). Análises de proteoma sorológico são realizadas

através de experimentos de *Western-blotting* bidimensionais (2D-WB), que consiste basicamente em três etapas: separação do extrato proteico por eletroforese bidimensional (2-DE), detecção dos *spots* imunogênicos ao soro por *Western-blotting* e identificação das proteínas imunogênicas por espectrometria de massas.

O proteoma sorológico obtido do extrato de proteínas citoplasmáticas de protoplastos separado por gel bidimensional e incubado com soro de camundongos infectados por *Candida albicans* resultou na detecção de uma série de proteínas imunogênicas, tais como: enzimas da via glicolítica, enzimas metabólicas e proteínas de choque térmico. Muitas destas proteínas imunogênicas também foram reconhecidas pelo soro de pacientes humanos com candidíase (Pitarch *et al.*, 2001). Proteínas diferencialmente expressas por *Staphylococcus aureus* na colonização nasal e em infecções de mamas tiveram o proteoma sorológico analisado e foram identificadas 49 proteínas imunogênicas (Seyffert *et al.*, 2012). Proteoma sorológico aplicado na busca por marcadores específicos para o diagnóstico da tuberculose identificou a proteína Mtb81 de *Mycobacterium tuberculosis* como um possível alvo (Hendrickson *et al.*, 2000). Nesta mesma linha, foram identificados marcadores específicos de diagnóstico de outras doenças causadas por microorganismos patogênicos, tais como para borreliose causada por *Borrelia burgdorferi*, para toxoplasmose causada por *Toxoplasma gondii* (Jungblut *et al.*, 1999), para pneumonia de hipersensibilidade causada por *Mycobacterium immunogenum* (Roussel *et al.*, 2011) e para infecções causadas por *Helicobacter pylori* (Haas *et al.*, 2002 e Lock *et al.*, 2002). Esta mesma abordagem foi ainda utilizada para a busca de antígenos indicativos de proteção natural para *Neisseria meningitidis*, comparando o perfil de reatividade obtido pelo soro de indivíduos com sintomas agudos e convalescentes (Mendum *et al.*, 2009).

O proteoma sorológico foi também utilizado para identificação de antígenos biomarcadores de diferentes helmintos. Proteínas solúveis de *Taenia solium* foram incubadas com soro humano de indivíduos positivos para neurocisticercose em experimento de 2D-WB, sendo identificadas seis proteínas antigênicas. Duas das quais foram expressas na forma recombinante para validação sorológica, indicando um possível candidato a teste diagnóstico (Salazar-Anton & Lindh, 2011). Os produtos secretados/excretados de vermes adultos de *Clonorchis sinensis* foram utilizados em experimentos de 2D-WB com soro de indivíduos infectados por este parasito, sendo identificadas algumas Cisteíno-Proteases e *Legumains* como proteínas imunogênicas. De um total de 28 amostras de soro de indivíduos infectados, 20 reagiram com a proteína recombinante *Legumain* de *C. sinensis*, não sendo esta proteína reconhecida pelo soro de indivíduos infectados por outras helmintoses (Jun *et al.*, 2009). Soro de ovelhas resistentes e suscetíveis à infecção por *Trichostrongylus colubriformis* foi utilizado

em experimento de 2D-WB, identificando um total de 28 diferentes proteínas antigênicas do extrato proteico solúvel. Embora a maioria dos antígenos tenha sido reconhecida por ambos os tipos de soro, algumas proteínas tiveram o grau de imunogenicidade aumentado quando foi utilizado o soro dos animais resistentes (Kiel *et al.*, 2007). Proteínas extraídas do protoescólex de cistos hidáticos provenientes da infecção por *E. granulosus* do hospedeiro bovino intermediário foram também utilizadas em experimentos de 2D-WB com *pool* de soro de indivíduos com hidatidose cística, sendo identificadas 14 diferentes proteínas imunogênicas (Monteiro *et al.*, 2010). Também através de experimentos de 2D-WB, a proteína *Heat Shock Protein 20* foi identificada como um potencial marcador de infecção ativa por *E. granulosus* por ter sido diferencialmente reconhecida pelo soro de indivíduos com equinococose cística ativa e inativa (Vacirca *et al.*, 2011).

1.10.1 Imunoproteoma de schistosomas

Poucos estudos de proteoma sorológico foram desenvolvidos em schistosomas (Tab. 1). Soro de coelhos infectados foi utilizado na identificação de antígenos de *S. japonicum* na busca por novos candidatos a diagnósticos, identificando 4 proteínas de um total de 30 *spots* imunogênicos (Zhong *et al.*, 2010). Soro de cabra infectada por *S. bovis* foi utilizado na identificação de proteínas imunogênicas, do tegumento ou secretadas/excretadas, identificando 8 proteínas (Perez-Sanchez *et al.*, 2006). Enquanto soro de hamster foi utilizado na comparação de proteínas reativas entre *S. haematobium*, *S. bovis* e *Echinostoma caproni*, revelando alguns antígenos específicos e comuns entre as espécies (Higon *et al.*, 2011). Proteínas de *S. mansoni* imunoprecipitadas com soro de ratos suscetíveis e resistentes a infecção foram analisadas por eletroforese bidimensional, sendo 4 *spots* identificados exclusivamente pelo soro protetor (Mark *et al.*, 1991). Quando soro de macacos Rhesus com alta e baixa infecção foram usados em *Western-blotting* de proteínas secretadas e do tegumento de *S. mansoni* separadas em 2D-PAGE, hidrolases da superfície do tegumento, enzimas digestivas e antioxidantes foram identificados como alvos de IgG nos animais altamente responsivos (Wilson *et al.*, 2008).

O uso de soro humano infectado foi realizado até o momento apenas para *S. haematobium*. Um total de 71 *spots* foram imunogênicos ao *pool* de soro de indivíduos positivos altamente reativos após tratamento, correspondendo a 26 diferentes proteínas caracterizadas. Quando o perfil de proteínas reativas ao soro de indivíduos antes e após tratamento com PZQ foi comparado, foram encontradas 21 proteínas reativas ao soro pré-tratado e 8 proteínas adicionais ao pós-tratado (Mutapi *et al.*, 2005). Correlacionando a idade do hospedeiro e a intensidade de infecção ao perfil de reconhecimento por anticorpos do soro

de indivíduos expostos a esquistossomose, foi observado que o repertório antigênico e a intensidade de reconhecimento aumentaram com a idade, embora o repertório antigênico tenha atingido o pico nos indivíduos mais velhos com intensidade de infecção média ou nula e a intensidade de reconhecimento do antígeno com altos índices de infecção (Mutapi *et al.*, 2008). Em outro estudo do mesmo grupo, foi realizada uma comparação entre os perfis de reconhecimento por isotipos das imunoglobulinas humanas IgA, IgE, IgG1 e IgG4, demonstrando que embora a maioria dos mesmos 71 *spots* previamente identificados tenham sido reconhecidos pelos 4 isotipos, houve claras restrições no reconhecimento de alguns antígenos. Neste estudo, IgG1 reagiu com um maior número de antígenos, seguido por IgE e IgA que reagiram com o mesmo número de antígenos, e IgG4 (Mutapi *et al.*, 2011).

No presente trabalho, procuramos explorar através de experimentos de 2D-WB, o proteoma sorológico do parasito *S. mansoni* utilizando soro de indivíduos de área endêmica para a esquistossomose na busca de antígenos do verme adulto de *S. mansoni* que induzem uma resposta de anticorpos em seres humanos. A utilização de soro de indivíduos infectados e não infectados da área endêmica nos forneceu, pela primeira vez, um painel de proteínas com potencial para distinguir o estado de suscetibilidade/resistência à doença, apontando possíveis proteínas candidatas a vacina ou para novos testes de diagnóstico.

2 Justificativas

Apesar do grande esforço na tentativa de controlar a esquistossomose, esta doença continua sendo uma das mais prevalentes no mundo. O controle da esquistossomose é baseado essencialmente na quimioterapia por PZQ, a única droga disponível para a quimioterapia em massa. Novas intervenções são uma prioridade para a eliminação da doença, uma vez que a quimioterapia não previne a reinfeção. Existem ainda relatos de resistência à droga. O desenvolvimento de uma vacina para a esquistossomose para proteção a longo prazo, bem como de um novo teste de diagnóstico constituirá um grande avanço para o controle da doença. Apesar do esforço da comunidade científica e da existência de um antígeno em fase de triagem clínica, ainda não há uma vacina eficaz disponível contra a esquistossomose. Embora testes diagnósticos estejam disponíveis, estes não apresentam sensibilidade e especificidade suficientes que permitam a correta detecção e avaliação do estágio da doença pelos programas de controle.

O parasito *Schistosoma mansoni* é capaz de persistir por anos no hospedeiro humano em um ambiente potencialmente hostil, estando em constante contato com o seu sistema imunológico, o qual produz anticorpos contra antígenos específicos do parasito. Por outro lado, a existência de indivíduos que, apesar de terem contato com a forma infectante do parasito permanecem não infectados, indica que o hospedeiro pode ser capaz de vencer a infecção, possivelmente através de mecanismos imunológicos específicos ainda não muito bem esclarecidos. A combinação de análises proteômicas e sorológicas tem sido aplicada como uma abordagem experimental mais racional na descoberta de biomarcadores de doenças. Conhecer os antígenos proteicos que induzem uma resposta imunológica no hospedeiro perante a presença do parasito e apontar os antígenos que distingam os estados de suscetibilidade/resistência à infecção, torna-se um importante passo para o desenvolvimento de uma vacina e de um novo método de diagnóstico para a esquistossomose. Os antígenos do *S. mansoni* que reagem especificamente ao soro de indivíduos infectados podem indicar possíveis candidatos para um novo método de diagnóstico, enquanto os antígenos reativos especificamente ao soro de indivíduos resistentes à infecção podem indicar possíveis antígenos protetores, constituindo novos alvos vacinais.

Desta forma, o atual projeto focou na utilização de ferramentas proteômicas para a identificação de antígenos do *S. mansoni*, principalmente daqueles que caracterizam o perfil antigênico gerado pelo reconhecimento de anticorpos presentes no soro de indivíduos naturalmente resistentes ou suscetíveis à infecção.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

O objetivo principal desta proposta é a seleção de antígenos biomarcadores de *Schistosoma mansoni* como potenciais candidatos a vacina e/ou a um novo teste de diagnóstico para esquistossomose através de análises do proteoma sorológico.

3.2 Objetivos Específicos

- Obter extrato proteico total das diferentes fases do ciclo de vida do parasito que entram em contato com o hospedeiro humano;
- Selecionar e identificar as proteínas de verme adulto de *S. mansoni* que são reconhecidas por anticorpos presentes no soro dos indivíduos de área endêmica para esquistossomose;
- Comparar o perfil de reconhecimento das proteínas de verme adulto de *S. mansoni* pelo soro de indivíduos infectados e não infectados de área endêmica e pelo soro de indivíduos não infectados de área não endêmica para esquistossomose;
- Verificar a influência da porção glicídica das glicoproteínas presentes no extrato proteico total de verme adulto de *S. mansoni* no padrão de imunogenicidade das proteínas ao soro de indivíduos de área endêmica;
- Avaliar o padrão de imunogenicidade das proteínas identificadas nos experimentos de *Western-blotting* bidimensional produzidas na forma de proteína recombinante.

4 Material e Métodos

4.1 Obtenção de material biológico

Neste trabalho foram utilizados parasitos da cepa LE de *Schistosoma mansoni*, provenientes de infecções rotineiras realizadas pelo Moluscário do CPqRR/FIOCRUZ. O ciclo de vida do parasito é mantido em caramujos *Biomphalaria glabata* e em camundongos BALB/c.

Camundongos BALB/c foram infectados por via subcutânea com aproximadamente 100 cercárias. A perfusão do sistema porta para recuperação dos vermes adultos foi realizada após 45 dias da infecção, segundo Pellegrino e Siqueira (1956). Os vermes foram, então, lavados três vezes em meio RPMI (Sigma) suplementado com o coquetel de inibidores de proteases *Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets* (Roche). O excesso de meio de cultura foi retirado, os vermes adultos foram congelados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados a -70°C até serem utilizados.

Os ovos foram obtidos através do tritamento do fígado de camundongos infectados em solução salina 1,7%, até alcançar uma consistência líquida, que foi então filtrada em peneiras de 190, 120 e $19\ \mu\text{m}^2$, sucessivamente. Após filtragem os ovos foram lavados três vezes em solução salina 1,7%, centrifugados a 2.000 r.p.m por 1 min e o sobrenadante removido. Os ovos foram lavados uma última vez em PBS suplementado com o coquetel de inibidores de proteases *Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets*. O sobrenadante foi descartado, os ovos sedimentados foram congelados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados a -70°C até serem utilizados.

As cercárias liberadas em água pelo hospedeiro intermediário foram mantidas no gelo por 2 hr e, em seguida, centrifugadas em tubos de 50 mL a 2.000 r.p.m a 4°C por 5 min. As cercárias foram lavadas três vezes em água destilada, centrifugadas a 2.000 r.p.m por 1 min e o sobrenadante removido. As cercárias foram lavadas uma última vez em meio PBS suplementado com o coquetel de inibidores de proteases *Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets*. O sobrenadante foi descartado, as cercárias sedimentadas foram congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e armazenadas a -70°C até serem utilizadas.

Os esquistossômulos foram obtidos através da transformação mecânica de cercárias de acordo com o protocolo descrito por Ramalho-Pinto (1974). Resumidamente, as cercárias foram centrifugadas 2.000 r.p.m a 4°C por 5 min e, então, ressuspensas em 5 mL de meio RPMI e agitadas a velocidade máxima em vórtex por 3 min para o rompimento da cauda. Em capela de fluxo laminar, cada 1 mL da suspensão de parasitos foi transferido para novo tubo. As caudas foram separadas através da lavagem dos parasitos em outros 15 mL de meio RPMI estéril, e após 15 min em repouso o sobrenadante foi descartado. Este procedimento foi

repetido por 6 vezes, sendo dois tubos agrupados a cada lavagem. Ao término das lavagens, os parasitos recuperados por deposição foram ressuspensos em 12 mL de meio 169 modificado (0,1% hidrolisado de lactalbumina, 0,1% glicose, 5×10^{-7} M hipoxantina, 2×10^{-7} M triiodotironina, 1×10^{-6} M hidrocortisona, 0,5% meio mínimo vitamina, 5% meio Schneider, 20mM Hepes, 5% soro fetal bovino inativado, 1% penicilina/estreptomicina q.s.p RPMI). Cada 1 mL de parasito foi distribuído em placas de cultura de 6 poços, acrescentando-se mais 5 mL de meio 169 a cada poço, sendo mantidas a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade por 24 horas. No momento da coleta, o sobrenadante foi descartado, os esquistossômulos sedimentados foram congelados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados a -70° até serem utilizados.

4.2 Preparação de extratos proteicos

Extrato proteico total de verme adulto de *S. mansoni* (AW-TOT) foi obtido pela lise direta dos parasitos em tampão de lise (8M uréia, 2M tiouréia, 4% CHAPS, 50mM DTT, 20mM Tris e ½ comprimido de *Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets* para cada 10 mL de solução). Após homogeneização sob agitação constante por 2 hr à temperatura ambiente, a amostra foi passada em seringa tipo insulina por 10 vezes e, em seguida, centrifugada a 20.000 x g por 30 min a 25°C. O sobrenadante obtido foi aliquoteado e, então, armazenado a -70°C para posterior uso. Extratos proteicos totais de ovo, cercária e esquistossômulo foram obtidos através do mesmo protocolo utilizado para a extração de proteínas totais de verme adulto.

Extrato proteico do tegumento de verme adulto de *S. mansoni* (AW-TEG) foi obtido pelo método de congelamento/descongelamento/vórtex em TBS (*Tris Buffered Saline*) suplementado com *Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets*, de acordo com Roberts e colaboradores (1983), com algumas modificações. Resumidamente, após descongelamento no gelo, o tegumento foi removido com 10 pulsos de 1 seg, em vórtex na velocidade máxima. O sobrenadante foi passado em seringa tipo insulina por 10 vezes e concentrado em filtros *Amicon* de 3 kDa (Millipore, Watford, UK), seguido de precipitação por acetona. O *pellet* foi ressuspendido em tampão SBI [7M uréia, 15mM *1,2-diheptanoyl-sn-glycero-3-phosphatdiyl choline* (DHPC), 0.5% Triton X-100, 20mM DTT e ½ comprimido de *Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets* para cada 10 mL de solução], de acordo com Babu e colaboradores (2004). A amostra foi aliquoteada e, então, armazenada a -70°C para posterior uso.

A concentração de proteínas dos extratos proteicos foi determinada pelo método de

Bradford (1976) e a qualidade dos extratos proteicos obtidos foi avaliada em SDS-PAGE 12%, como descrito por Laemmli (1970).

4.3 Seleção dos soros dos indivíduos de área endêmica

As amostras dos soros humanos utilizadas neste trabalho foram obtidas de indivíduos moradores de Virgem das Graças, na vila central e em alguns vilarejos dispersos (Fig. 3). Esta é uma área rural de extrema pobreza, hiperendêmica para a esquistossomose, localizada no Vale Jequitinhonha, Norte do Estado de Minas Gerais (Pereira *et al.*, 2010). Não existe água tratada e nem saneamento básico na região e, segundo Pereira (2006), todos os indivíduos que participaram deste estudo tiveram contato com água contaminada, sendo este contato determinado pelo índice de TBM (*Total Body Minutes*), que corresponde ao tempo total de exposição do corpo à água em minutos. Até o ano de 2001, não havia história prévia de tratamento desta população para a esquistossomose, segundo a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA, 2002).

As amostras de soro foram obtidas durante o desenvolvimento do projeto *Host Genetic Correlates in Schistosomiasis*, realizado pelo grupo do Dr. Rodrigo Corrêa-Oliveira (CPqRR/FIOCRUZ) e da Dra. Andréa Gazzinelli (UFMG), que gentilmente cederam parte deste material para a realização deste projeto. As amostras de fezes dos indivíduos voluntários foram processadas pelo método de Kato-Katz para a detecção de ovos de *S. mansoni* e outros helmintos intestinais. O termo de consentimento livre e informado foi assinado no momento da coleta do material (Pereira, 2006). O atual projeto foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ (CAAE: 1.0.245.000-08).

Os soros utilizados no atual projeto foram selecionados obedecendo aos seguintes critérios: pertencer a indivíduos não infectados por outros helmintos (*Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e ancilóstomos), com idade entre 20-50 anos, homens ou mulheres não grávidas. Os indivíduos nos quais foram encontrados ovos de *S. mansoni* nas fezes durante a primeira coleta realizada em 2001 foram denominados infectados (INF) e aqueles nos quais não foram encontrados ovos nas fezes durante os três anos de coleta (2001, 2002 e 2006) foram denominados não infectados de área endêmica (NE). Todas as amostras de soro utilizadas neste estudo foram coletadas em janeiro de 2001, antes do tratamento em massa com PZQ. Um total de 13 amostras de soro INF e 9 NE foram obtidas (Tab. 2). Soro de indivíduos não infectados de área não endêmica para a esquistossomose foram também utilizados neste estudo, sendo 7 amostras de soro provenientes de voluntários dos Estados Unidos (NI) e 2 da Inglaterra (NI-UK).

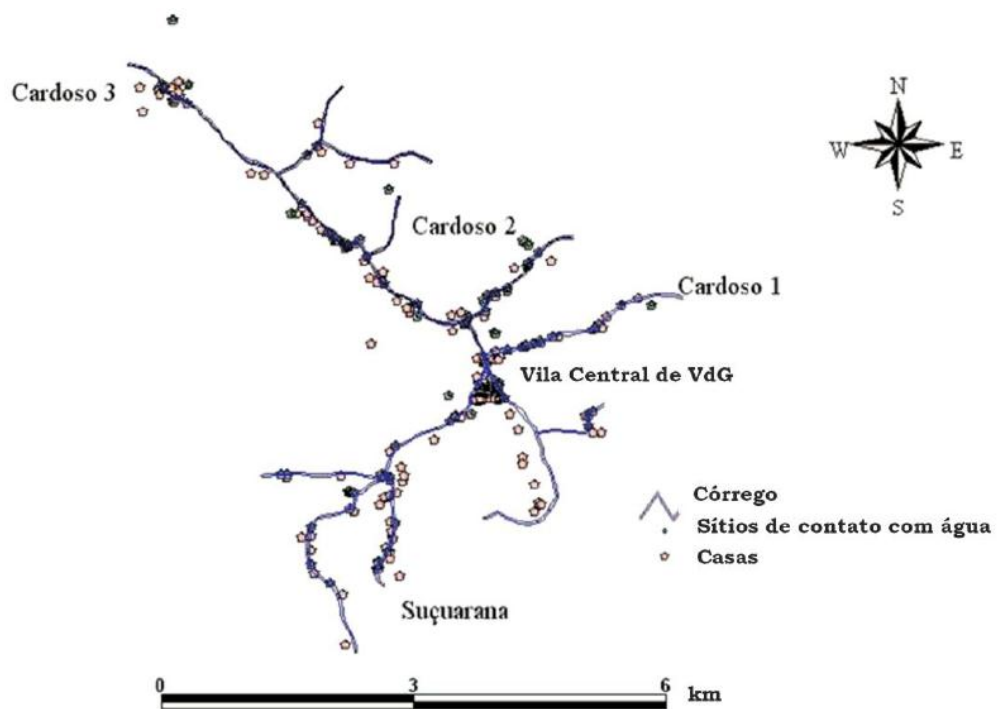


Figura 3: Esquema representativo da área de estudo Virgem das Graças e seus vilarejos (Vila Central de Virgem das Graças, Suçuarana, Cardoso 1/2/3). Os córregos da região, as casas em estudo e os sítios de contato com água estão representados na figura (adaptado de: Gazzinelli *et al.*, 2006).

Tabela 2: Amostras de soro de indivíduos da área endêmica para a esquistossomose mansônica, Virgem das Graças, selecionadas para o estudo.

Identificação	Localização	Gênero	Idade	OPG	TBM
<i>Infectados (n=13)</i>					
31	cVdG	F	25	88	229
58	cVdG	F	33	8	157
128	cVdG	M	28	200	91
129	cVdG	F	33	304	126
189	cVdG	F	31	48	117
214	cVdG	F	35	80	187
238	cVdG	F	34	20	284
329	Suss	F	38	8	126
356	Card1	M	37	48	184
371	Card1	F	26	160	163
403	Card2	M	36	152	118
493	Card3	F	49	43	143
514	Card3	F	43	212	89
<i>Não infectados (n=09)</i>					
62	cVdG/Card2	M	33	0	155
83	cVdG	M	27	0	107
115	cVdG	M	46	0	93
233	cVdG	F	40	0	156
294	Suss	F	24	0	-
312	Suss	M	37	0	88
366	Card1	M	37	0	-
445	Card2	F	49	0	124
609	cVdG	F	28	0	53

Identificação: número de identificação dos indivíduos selecionados. Localização: sítio de moradia dos indivíduos na vila de Virgem das Graças de acordo com a Figura 3 (cVdG: vila central de Virgem das Graças; Suss: Suçuarana; Card1/2/3: Cardoso 1, 2 ou 3). Gênero: M-masculino e F-feminino. Idade: idade dos indivíduos no momento da coleta do soro em 2001. OPG = ovos por grama de fezes de 3 amostras, sendo 2 lâminas de cada, determinado pelo método Kato-Katz. TBM = tempo total de exposição do corpo à água, em minutos. (-): dados não obtidos.

4.4 Eletroforese bidimensional (2-DE)

4.4.1 Primeira dimensão - Focalização isoeletrica

Na primeira dimensão foi realizada a separação das proteínas por focalização isoeletrica. Para cada 2D-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida bidimensional) foram utilizados 100 µg de proteínas de cada extrato proteico separadamente. As proteínas do extrato proteico AW-TOT e dos demais extratos proteicos totais (ovo, cercária e esquistossômulo) foram solubilizadas separadamente em tampão IEF de re-hidratação [8M ureia, 2M tiourea, 4% CHAPS, 65mM DTT, 0,0025% azul de bromofenol e 1% anfólito *BioLyte 3-10 buffer* (100X) (BioRad)], enquanto as proteínas do extrato proteico AW-TEG foram solubilizadas em tampão SBI/IEF [tampão SBI acrescido de 0,0025% azul de bromofenol e 0,4% anfólito *BioLyte 3-10 buffer* (100X)] (Babu *et al.*, 2004), ambos para um volume final de 125 µL. A amostra foi homogeneizada sob agitação constante por 1 hr a temperatura ambiente e centrifugada a 16.000 x g por 30 min também a temperatura ambiente para separação do material não solubilizado. O *pellet* foi descartado e o sobrenadante aplicado sobre as fitas de IPG de 7 cm com gradiente de pH 3-10 não linear (NL), 3-10 ou 5-8 (BioRad). As fitas de IPG foram submetidas a re-hidratação e focalização isoeletrica no equipamento Protean IEF Cell (BioRad) a 50 µA/fita e 20°C. Re-hidratação passiva foi conduzida por 4 hr, seguida de re-hidratação ativa a 50 V por 12 hr. A focalização isoeletrica foi conduzida a 500 V por 30 min, seguida por 1000 V por 30 min, 4000 V por 1 hr e 4000 V até 16.000 V/h. Após o término da focalização isoeletrica, as fitas foram retiradas do aparelho e congeladas a -70°C ou utilizadas imediatamente para separação das proteínas por SDS-PAGE.

4.4.2 Equilíbrio das fitas de IPG

Logo antes da separação das proteínas pela segunda dimensão, as fitas de IPG foram submetidas à etapa de equilíbrio (redução e alquilação das proteínas). As fitas foram incubadas por 10 min, a temperatura ambiente, sob agitação constante, em tampão de equilíbrio [6M uréia, 30% glicerol, 2% SDS, 50mM solução de Tris-HCl (pH 8,8) e 0,001% azul de bromofenol] contendo 130mM DTT e, em seguida, por mais 1 min no mesmo tampão contendo 135mM iodoacetamida.

4.4.3 Segunda dimensão - SDS-PAGE

Na segunda dimensão, as proteínas foram separadas por massa molecular em SDS-PAGE 12%. O padrão de massa molecular foi aplicado em um pedaço de papel filtro, colocado sobre o canto esquerdo do gel de poliacrilamida e selado com gel de agarose 0,5% contendo traços de azul de bromofenol. As fitas de IPG foram lavadas em tampão de corrida 1X antes de serem colocadas sobre os géis de poliacrilamida. Da mesma forma que o padrão de massa molecular, as fitas foram seladas com gel de agarose 0,5% contendo azul de bromofenol para facilitar o acompanhamento da corrida eletroforética no sistema Mini-Protean III (BioRad). A eletroforese foi realizada a 50 V por aproximadamente 10 min e a 100 V até o corante atingir a porção inferior do gel.

Para a realização dos experimentos de 2D-WB, pelo menos dois 2D-PAGEs foram realizados simultaneamente, um ou mais para serem usados nos experimentos de *Western-blotting* com as diferentes amostras de soro, e outro 2D-PAGE para ser corado por Azul de Coomassie Colloidal G-250 para possível excisão dos *spots* e identificação das proteínas. Os experimentos foram realizados em triplicata para cada extrato proteico e para cada faixa de pH utilizados.

Para a identificação de glicoproteínas presentes no extrato AW-TOT, 2D-PAGE foi corado com *Pro-Q Emerald 488* (Invitrogen) específico para coloração de glicoproteínas. O mesmo 2D-PAGE foi corado em seguida por Azul de Coomassie Colloidal G-250 para possível excisão dos *spots* e identificação das proteínas. Neste caso foi utilizado o marcador de massa molecular *Candy Cane* (Invitrogen), o qual contém uma mistura de proteínas glicosiladas e não glicosiladas. Os experimentos foram realizados no mínimo em triplicata.

Para a identificação de diferentes subclasses de carboidratos das glicoproteínas contidas no extrato AW-TOT, as proteínas separadas pelo 2D-PAGE foram transferidas para membranas de PVDF para subsequente realização dos experimentos de *lectina-blotting*. Os experimentos foram realizados em duplicata.

4.4.4 Coloração de géis de poliacrilamida por Azul de Coomassie Colloidal

Os géis de poliacrilamida uni e bidimensionais foram corados pelo protocolo compatível com a identificação de proteínas por espectrometria de massas que utiliza o Azul de Coomassie Colloidal G-250 (Neuhoff *et al.*, 1988). De acordo com este método, os géis foram fixados em três soluções: 2% ácido ortofosfórico e 30% etanol, seguida por 2% ácido ortofosfórico e finalmente com 2% ácido ortofosfórico, 18% etanol e 12% sulfato de amônio.

Em seguida, foi adicionado 0,02% Azul de Coomassie Colloidal G-250 a última solução de fixação.

4.5 Western-blotting bidimensional (2D-WB)

Logo após a separação das proteínas por 2D-PAGE, as proteínas foram transferidas para membranas *Immun-Blot* PVDF 0.2 µm (BioRad) em cuba de transferência mini *Trans-Blot Eletrophoretic Transfer Cell* (BioRad) usando tampão de transferência (25mM Tris, 192mM glicina, 20% metanol) por 2 hr a 100 V. As membranas foram lavadas em água e secas a temperatura ambiente. Antes de iniciar a incubação com as diferentes amostras de soro as membranas foram reativadas em 100% metanol e, então, bloqueadas por 16 hr sob constante agitação a temperatura ambiente em TBS (20mM Tris-HCl, 500mM NaCl, pH 7,5) contendo 0,05% Tween-20 e 3% BSA (TBS-T/BSA-3%). Cada membrana foi incubada separadamente por 2 hr com cada *pool* de soro INF, NE e NI, ou com os soros individuais, todos diluídos 1:500 em TBS-T/BSA-1%. Após duas lavagens de 30 min em TBS-T/BSA-1%, as membranas foram incubadas com anticorpo polivalente de cabra anti-Ig total humana conjugado a HRP (*Horseradish Peroxidase*) (Invitrogen), diluído 1:100.000 em TBS-T/BSA-1%. Após duas lavagens de 30 min em TBS-T e uma lavagem de 15 min em TBS, as proteínas imunogênicas foram reveladas utilizando *ECL plus Western-blotting Detection System* (GE Healthcare) e as membranas foram expostas por 16 hr a filmes de raio-X. Alternativamente, foram utilizados como anticorpos secundários anti-IgG3 humana (Zymed) ou anti-IgG1 humana (Invitrogen) de rato diluídos 1:5.000 e 1:25.000, respectivamente.

Os *spots* imunogênicos identificados nos experimentos de 2D-WB foram localizados sobrepondo o filme de raio-X ao respectivo 2D-PAGE corado por Azul de Coomassie Colloidal e, posteriormente, excisados para identificação por espectrometria de massas.

4.6 Detecção de glicoproteínas por *Pro-Q Emerald*

O corante *Pro-Q Emerald* é ligado a glicoproteínas através da técnica de PAS (*Periodic acid-Schiff*). Os carboidratos presentes nas glicoproteínas são inicialmente oxidados a aldeídos usando ácido periódico que reagem ao corante gerando um conjugado fluorescente (Hart, 2003). A identificação de glicoproteínas de *S. mansoni* foi realizada utilizando *Pro-Q Emerald 488 dye* (Invitrogen) de acordo com recomendações do fabricante. Resumidamente, 2D-PAGE contendo 100 µg de proteínas do extrato proteico AW-TOT foi fixado em solução 50% metanol e 5% ácido acético por 1 hr e, então, incubado novamente na mesma solução por mais 16 hr para completa remoção de resíduos de SDS. O gel foi lavado 3 X 10 min em solução 3% ácido acético e, em seguida, tratado em solução 1% ácido periódico e 3% ácido

acético por 20 min para oxidação dos carboidratos. O gel foi lavado novamente 4 X 10 min em solução 3% ácido acético para remover resíduos de periodato e incubado em solução corante *Pro-Q Emerald 488* diluída 1:50 em solução tampão *Pro-Q Emerald* por 2 hr, ao abrigo de luz. O gel foi lavado 3 X 30 min em solução 3% ácido acético e enxaguado em água. As proteínas coradas foram visualizadas no analisador de imagem *Typhoon*, sendo o espectro de emissão para o corante *Pro-Q Emerald 488* coletado usando excitação em 480 nm, emissão em 526nm e 750 PMT (*Photomultiplier Tube*). Após a visualização dos *spots* fluorescentes os géis foram corados por Azul de Coomassie Colloidal para visualização das proteínas totais presentes no gel. Os *spots* corados pelo *Pro-Q Emerald* foram excisados do gel para identificação por espectrometria de massas. As sequências proteicas referentes às glicoproteínas identificadas foram submetidas à análise com ferramentas de predição de sítios de glicosilação, NetOGly 3.1 e NetNGly 1.0 (www.cbs.dtu.dk).

4.7 Ensaios de lectina-*blotting*

Diferentes subclasses de carboidratos presentes em glicoproteínas de *S. mansoni* foram identificadas utilizando *Dig Glycan Differentiation kit* (Roche), seguindo as instruções do fabricante. Extrato proteico AW-TOT e as proteínas fornecidas pelo kit como controles positivo e negativo foram transferidas para membranas *Immun-Blot* PVDF 0,2 µm (BioRad) após a separação por SDS-PAGE. A membrana foi incubada por 16 hr em solução de bloqueio 10% fornecida pelo kit, seguido de lavagem e incubação por 1 hr em tampão 1 (TBS acrescido de 1mM MgCl₂, 1mM MnCl₂, 1mM CaCl₂, pH 7,5) contendo separadamente as diferentes lectinas conjugadas a digoxigenina (GNA – aglutinina de *Galanthus nivalis*, SNA – aglutinina de *Sambucus nigra* e DSA – aglutinina de *Datura stramonium* 10 µL cada; MAA – aglutinina de *Maackia amurensis* 50 µL e PNA - aglutinina de amendoim 100 µL). Estas lectinas são capazes de reconhecer especificamente diferentes carboidratos (Tab. 3). As membranas foram lavadas com TBS (0,05M Tris-HCl, 0,15M NaCl, pH 7,5) e, então, incubadas com anticorpo anti-digoxigenina conjugado a fosfatase alcalina (7,5 U) por 1 hr, seguida de outras 3 lavagens em TBS. A reação foi revelada em solução de *4-nitro blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate* (NBT/BCIP).

Lectina-*blotting* bidimensional foi realizado com 100 µg de proteínas do extrato proteico AW-TOT transferidas para membranas *Immun-Blot* PVDF 0,2 µm após a separação em 2D-PAGE utilizando-se fitas de IPG pH 3-10, e seguindo o protocolo descrito acima.

Tabela 3: Especificidade do reconhecimento de carboidratos pelas diferentes Lectinas em estudo.

Lectinas	Carboidratos reconhecidos
GNA (aglutinina de <i>Galanthus nivalis</i>)	- (1-3), (1-6), (1-2) Manose terminal ligada à Manose / Man-Man
SNA (aglutinina de <i>Sambucus nigra</i>)	- (2-6) Ácido Siálico terminal ligado à Galactose / NANA-Gal
MAA (aglutinina de <i>Maackia amurensis</i>)	- (2-3) Ácido Siálico terminal ligado à Galactose / NANA-Gal
PNA (aglutinina de amendoim)	- (1-3) Galactose β ligado à N-acetilgalactosamina / Gal-GalNAc
DSA (aglutinina de <i>Datura stramonium</i>)	- (1-4) Galactose β ligado à N-acetilglucosamina / Gal-GlcNAc - Acetilglucosamina individual / GlcNAc

4.8 Deglicosilação - tratamento com periodato/borohidreto

A deglicosilação de proteínas imobilizadas em membranas de PVDF foi conduzida pelo tratamento com periodato de sódio e borohidreto de sódio (Woodward *et al.*, 1985). Após a etapa de bloqueio dos experimentos de 2D-WB e lectina-*blotting*, as membranas foram incubadas com 10mM periodato de sódio em solução de 50mM acetato de sódio (pH 4,5) por 1h e ao abrigo de luz, seguida de incubação em 50mM borohidreto de sódio em TBS por 30 min. Os procedimentos de lectina-*blotting* e 2D-WB foram então prosseguidos como descritos anteriormente. O controle do tratamento foi realizado sem adicionar periodato e borohidreto nas respectivas soluções.

4.9 Identificação de proteínas por espectrometria de massas

4.9.1 Digestão trípica

Inicialmente, os *spots* excisados dos géis foram transferidos para tubos siliconados pré-lavados com metanol PA (Merck) e água Milli-Q. Os *spots* foram lavados em 1 mL de água Milli-Q seguido de 400 µL de solução de descoloração [50% acetronitrila (ACN) (Fisher Scientific)/ 25mM bicarbonato de amônio (AB) (Sigma) pH 8,0] por 2 X 15 min e sob agitação constante. Os pedaços de gel foram desidratados através da adição de 200 µL de ACN por 5 min. Os *spots* foram reidratados em 200 µL de 100mM AB por 5 min e foi acrescentado o mesmo volume de 100% ACN, mantendo por mais 5 min. A solução foi removida e, então, foram acrescentados 200 µL de 100% ACN, repetindo-se o procedimento. A solução de ACN foi removida e os *spots* completamente secos em concentrador *Speed Vac Concentrator Plus* (Eppendorf) por 20 min. Para a digestão das proteínas foram adicionados 10 µL de *Sequencing Grade Modified Trypsin* (Promega) (20 µg/mL em 25mM AB) por 10 min e mais 20 µL de solução AB 25mM pH 8,0 para evitar o ressecamento do *spot*. A reação foi conduzida a 37°C por 16 hr. O conteúdo de cerca de 30 µL de solução foi reservado em tubos novos. Aos tubos contendo os géis foram acrescentados 30 µL de solução de 5% ácido fórmico (Merck)/ 60% ACN para a extração dos peptídeos trípticos. Este procedimento foi realizado por 2 X 30 min sob agitação constante sendo que, após o término do tempo referido, a solução de extração contendo os peptídeos foi transferida ao tubo contendo os 30 µL iniciais. As amostras foram secas em concentrador *Speed Vac* e o *pellet* ressuspendido em 8 µL de 0,1% ácido fórmico. Os peptídeos foram purificados em micro-colunas de fase reversa Zip Tip C18 (Eppendorf), de acordo com as instruções do fabricante. Os peptídeos purificados foram secos em concentrador *Speed Vac* e ressuspendidos em 1 µL de solução 50% ACN/ 0,1% ácido trifluoroacético (TFA).

4.9.2 Espectrometria de massas

A identificação das proteínas por espectrometria de massas do tipo MALDI-ToF-ToF foi realizada em um espectrômetro de massas modelo *4700 Proteomics Analyzer* (Applied Biosystems). Esta etapa foi realizada no Laboratório de Toxicologia do Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica do Instituto Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ, em colaboração com o Dr. Jonas Perales e Dr. André Teixeira, responsáveis pela Plataforma de Espectrometria de Massas-RJ, PDTIS-FIOCRUZ.

Um volume de 0,5 µL das amostras de peptídeos purificados foi misturado a 0,2 µL de matriz ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (20 mg/mL em 30% ACN/ 0.3% TFA). As misturas de amostra e matriz foram aplicadas a placa de MALDI *ABI 192-target* por co-cristalização. Os dados de espectrometria de massas foram adquiridos em modo positivo e refletivo, a massa analisada entre 900-4000 Da, utilizando laser *neodymium-doped yttrium aluminum garget* (Nd: YAG) com 200-Hz de repetição. Os parâmetros estabelecidos foram: 2.000 tiros para a aquisição do espectro de MS e 4.000 tiros para MS/MS dos 10 íons mais abundantes. A calibração externa foi realizada utilizando uma mistura de quatro peptídeos do *Mass Standards kit for the 4700 Proteomics Analyzer: des-Arg1-bradykinin* ($m/z=904.47$), *angiotensin I* ($m/z=1296.69$), *Glu1-fibrinopeptideB* ($m/z=1570.68$) e *adrenocorticotropic hormone (18–39)* ($m/z=2465.20$).

4.9.3 Identificação das proteínas

O espectro de massas dos peptídeos gerados pela digestão com tripsina (MS) e os dados de fragmentação dos peptídeos (MS/MS) foram analisados utilizando o programa MASCOT (Matrix Science, Boston, MA). Os arquivos PPW gerados pelo espectrômetro de massas para cada *spot* foram submetidos a análise de *MS/MS ion search* no MASCOT utilizando o banco de dados de sequências de proteínas não redundantes do NCBI (NCBIInr). Os parâmetros usados foram: tolerância de peptídeo MS de ± 0.6 Da, tolerância de fragmento de massa MS/MS de ± 0.2 Da, duas falhas de clivagem permitidas, carga do peptídeo +1 e modificações variáveis em cisteína (carbamidometilação e adição de propionamida) e em metionina (oxidação). A fim de evitar identificações aleatórias, apenas íons com valor de *score* individual acima do indicado pelo MASCOT para identidade e homologia extensiva ($p < 0,05$) foram aceitos. Para as proteínas identificadas através da busca no banco de dados NCBIInr que não apresentaram um Smp correspondente foram conduzidas buscas no banco de dados SchistoDB versão 2.0 (www.schistodb.net) (Zerlotini *et al.*, 2009), utilizando Blastp.

4.10 Clusterização das proteínas imunogênicas

A clusterização hierárquica foi realizada a fim de agrupar as proteínas imunogênicas de acordo com a similaridade do perfil de reatividade encontrado para cada *pool* de soro usado neste estudo, em três experimentos de 2D-WB. A similaridade do perfil de reatividade foi medida por distância Euclidiana e pelo método de encadeamento completo (*Complete-linkage*) entre as proteínas, utilizando o algoritmo de clusterização hierárquica disponível na plataforma GenePattern (Broad Institute).

4.11 Expressão *in vitro* e análise de *Western-blotting* das proteínas recombinantes *Major Egg Antigen* e Hemoglobinase de *Schistosoma mansoni*

As proteínas de *S. mansoni* Hemoglobinase (Smp_075800) e *Major Egg Antigen* (Smp_049300.3), selecionadas por serem imunogênicas nos experimentos de 2D-WB, foram expressas utilizando o sistema de expressão *in vitro*, livre de células, *TNT® SP6 High-Yield Wheat Germ Protein Expression System* (Promega). Duas estratégias de expressão foram testadas neste sistema, utilizando DNA linear ou DNA circular como molde da transcrição-tradução.

4.11.1 Amplificação por PCR

A amplificação da região codificadora do gene de *Major Egg Antigen* por PCR foi realizada a partir do códon ATG correspondente à metionina inicial da sequência proteica, enquanto da Hemoglobinase foi realizada a partir do códon GTA, correspondente ao décimo aminoácido da sequência proteica, havendo assim a necessidade de incluir o códon ATG aos iniciadores *forward*, uma vez que a sequência correspondente à região N-terminal da proteína estava incompleta no banco de dados do SchistoDB. Os iniciadores utilizados para a amplificação da região codificadora de *Major Egg Antigen* e Hemoglobinase foram desenhados como sugeridos no manual do fabricante do kit de expressão *in vitro* utilizado (Tab. 4). Resumidamente, para o desenho dos iniciadores para a estratégia de expressão utilizando DNA linear como molde foram adicionadas anteriormente à sequência inicial do gene: uma sequência correspondente ao promotor SP6 e uma sequência consenso Kozak contendo o códon de iniciação de tradução ATG seguido do nucleotídeo G. O vetor selecionado para a estratégia de expressão utilizando DNA circular como molde foi o *pF3 WG (BYDV) Flexi Vector* (Promega). A ferramenta *Flexi Vector Primer Designer Tool*,

disponível no *site* do fabricante, foi utilizada para o desenho dos iniciadores. Os iniciadores *forward* foram desenhados contendo sítio para enzima de restrição *SgfI*, enquanto os iniciadores *reverse*, sítio para enzima de restrição *PmeI*. A adição da sequência que codifica a cauda de histidina (6xHis) C-terminal foi incluída ou não no desenho dos iniciadores *reverse* de ambas as estratégias, para uma subsequente possível análise ou purificação das proteínas expressas. Os parâmetros como dimerização e autocomplementaridade dos iniciadores foram conferidos usando o software Oligos 9.1 (*Institute of Biotechnology, University of Helsinki, Finland*).

Para as reações de PCR foram usados 25 µL de *JumpStart REDtaq ReadyMix* (Sigma), 2 µL da biblioteca de cDNA de verme adulto de *S. mansoni* (cedida pelo Dr. Franco Falcone) e 2,5 µL de cada iniciador *forward* e *reverse* correspondente (10µM) para um volume total de reação de 50 µL. A PCR foi realizada em termociclador *MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler* com etapa inicial de 94°C por 5 min, seguido por 35 ciclos com etapa de desnaturação a 94°C por 30 seg, anelamento a 58°C por 45 seg e extensão a 72°C por 90 seg. Após a PCR, os produtos de amplificação foram submetidos a análise em géis de agarose 1%. Para a extração da banda contendo o produto de interesse do gel de agarose foi utilizado *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN), de acordo com as orientações do fabricante. *NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific) foi utilizado para determinar a concentração dos produtos de amplificação purificados.

4.11.2 Obtenção do DNA circular molde contendo a região codificadora dos genes

Major Egg Antigen e Hemoglobinase

4.11.2.1 *Inserção dos produtos purificados em plasmídeo pF3A WG (BYDV) Flexi Vectors*

O produto de amplificação dos genes *Major Egg Antigen* e Hemoglobinase gerado para a estratégia de expressão por DNA circular como molde foi inserido no vetor *pF3A WG (BYDV) Flexi Vector* (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. Para isso, o produto de PCR e o vetor foram digeridos utilizando a mistura de enzimas *Flexi Enzyme Blend* (Promega). A reação de digestão do produto amplificado foi composta de 4 µL de tampão flexi de digestão 5X, 4 µL da mistura de enzimas flexi (*SgfI/ PmeI*) e até 500 ng de produto de amplificação para 20 µL de reação final. Enquanto que a reação de digestão do vetor *Flexi-vector* foi composta de 4 µL de tampão flexi de digestão 5X, 2 µL da mistura de enzimas flexi (*SgfI/ PmeI*) e 2 µL do plasmídeo *Flexi-vector* (200 ng) para 20 µL de reação final. Ambas as reações foram conduzidas a 37°C por 30 min, seguida de inativação a 65°C

por 20 min. A ligação do produto amplificado ao vetor foi realizada utilizando 10 µL de tampão de ligação flexi 2X, 1 µL de *T4 DNA ligase High Concentration* (20 U/µL), aproximadamente 50 ng do plasmídeo *Flexi-vector* e 100 ng do produto de amplificação previamente digeridos. A ligação foi conduzida a 25°C por 1 hr, seguida de um passo adicional de inativação da ligase a 65°C por 5 min, que resultou em um maior sucesso na transformação de bactérias.

4.11.2.2 *Transformação do DNA circular em Escherichia coli*

A transformação foi realizada por eletroporação em *Micropulser* (BioRad). Bactérias *Escherichia coli* DH5α eletrocompetentes foram cuidadosamente misturadas a 1 µL da reação de ligação e, então, transferidas para as cubetas *GenePulser (E.coli Pulser Cuvette, 0,1 cm electrode gap)*. A eletroporação foi conduzida utilizando o programa Ec1, para bactérias, pré-estabelecido pelo fabricante. As células eletroporadas foram então transferidas para 1 mL de meio SOC (0,5% extrato de levedura, 2% triptona, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄, 20mM glucose) e mantidas a 37°C por 2 hr antes de serem plaqueadas em meio LB-Ágar-Amp (100 µg/mL) e incubadas a 37°C por 16 hr. As colônias selecionadas foram inoculadas em meio LB-Amp (100 µg/mL) e crescidas sob agitação de 230 r.p.m e incubação a 37°C por 16 hr. Os plasmídeos foram purificados utilizando *QIAprep® Spin Miniprep Kit* (Qiagen) como descrito pelo fabricante e sequenciados pela empresa *Source Bioscience Lifescience*, utilizando os iniciadores SP6 e T7 *terminator*. Os cromatogramas das sequências foram visualizados no programa Chomas-2 lite (*Technelysium Pty Ltd*) e as sequências analisadas manualmente comparando-se as sequências obtidas às sequências depositadas nos banco de dados.

4.11.3 *Transcrição-Tradução in vitro da Major Egg Antigen e da Hemoglobina de Schistosoma mansoni*

A síntese *in vitro* da proteína foi iniciada pela adição do DNA molde (linear ou circular), de acordo com as instruções descritas no protocolo do sistema *TNT® SP6 High-Yield Wheat Germ Protein Expression System. FluoroTect™ Green_{Lys}* (Promega) foi incluído à reação para a visualização da proteína expressa pela incorporação de resíduos fluorescentes de lisinas. Resumidamente, o protocolo consistiu em incubar a 25°C por 2 hr a mistura de 30 µL de *TNT master mix*, 2 µL de *FluoroTect™ Green_{Lys}*, 2-3 µg do vetor *Flexi-vector* contendo a região codificadora dos genes ou 5-8 µL de DNA linear, para 50 µL de reação final. Como controle negativo da expressão foi realizada uma reação sem DNA molde e outra sem DNA molde e *FluoroTect™ Green_{Lys}*. A expressão da proteína recombinante foi analisada em SDS-

PAGE 4–20% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gel (BioRad) aplicando 5 µL da reação de síntese das proteínas. As proteínas sintetizadas foram visualizadas no *scanner* Fujifilm LAS-4000 no modo de fluorescência.

4.11.4 Western-blotting para identificação da Major Egg Antigen em fusão com 6xHis

Logo após a separação por SDS-PAGE de 3 µl da reação da síntese da proteína *Major Egg Antigen* as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose 0,2 µm (BioRad). A membrana foi bloqueada por 16 hr em TBS-T contendo 5% de leite em pó (TBS-T/leite-5%) a 4°C e, então, incubada por 1 hr com anticorpo anti-His de camundongo (Invitrogen) diluído 1:2.500 em TBS-T/leite-3%. Após duas lavagens de 30 min em TBS-T/leite-3%, a membrana foi incubada por 2 hr com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a HRP (*ECL Plus Western-blotting Reagent Pack*, GE Healthcare) diluído 1:10.000 em TBS-T/leite-3%. Após duas lavagens de 30 min em TBS-T e uma lavagem de 15 min em TBS, as bandas proteicas foram reveladas utilizando *ECL plus Western-blotting Detection System* (GE-Healthcare) e visualizadas no *scanner* Fujifilm LAS-4000 no modo de quimiofluorescência, sendo expostas por 7 min.

4.11.5 Western-blotting com pool de soro de indivíduos de área endêmica para a esquistossomose

A confirmação do caráter imunogênico das proteínas recombinantes foi realizada por *Western-blotting* utilizando os mesmos *pools* de soro dos indivíduos de área endêmica previamente utilizados nos experimentos de 2D-WB. Logo após a separação por SDS-PAGE de 3 µl das reações de síntese das proteínas, as mesmas foram transferidas para membranas de nitrocelulose 0,45 µm (BioRad). As membranas foram bloqueadas por 16 hr em TBS-T/leite-5% a 4°C e, então, incubadas separadamente por 2 hr com cada *pool* de soro INF, NE e NI-UK diluídos 1:500. Os *pools* de soro foram pré-adsorvidos por 16 hr em TBS-T/leite-3% acrescido de 5% de extrato total de germe de trigo (TBS-T/leite-5%/GT-5%). Após duas lavagens em TBS-T/leite-1%, as membranas foram incubadas por 1 hr com anticorpo de coelho anti-IgG humana (I-2011, Sigma) e por mais 1 hr com anticorpo anti-IgG de coelho conjugado a HRP (*ECL Plus Western-blotting Reagent Pack*, GE Healthcare) ambos diluídos 1:10.000 em TBS-T/leite-1%, com duas lavagens de 30 min em TBS-T/leite-1% entre cada incubação. Após duas lavagens de 30 min em TBS-T e uma lavagem de 15 min em TBS, as proteínas imunogênicas foram reveladas utilizando *ECL plus Western-blotting Detection*

System (GE Healthcare) e visualizadas no *scanner* Fujifilm LAS-4000 no modo de quimiofluorescência, sendo expostas por 7 min.

4.12 Expressão das demais proteínas selecionadas através dos experimentos de 2D-WB

Outras proteínas identificadas nos experimentos de 2D-WB também foram expressas *in vitro* pelo sistema *TNT® SP6 High-Yield Wheat Germ Protein Expression System* (Promega), utilizando DNA circular como molde para a expressão. Os iniciadores foram desenhados incluindo os 6 códons de histidina (6xHis) C-terminal aos iniciadores *reverse* (Anexo 1). As etapas de clonagem e expressão das proteínas foram realizadas segundo a metodologia descrita anteriormente, previamente otimizada com os genes de *Major Egg Antigen* e Hemoglobina. A expressão das proteínas recombinantes foi analisada em SDS-PAGE *Mini-Protean TGX 4-20% Precast Gel* e visualizadas no *scanner* Fujifilm LAS-4000 no modo de fluorescência.

4.13 Purificação das proteínas recombinantes

As proteínas recombinantes expressas *in vitro* foram submetidas à purificação em *batch* utilizando resina de níquel. Como sugerido pelo fabricante, 25 µL da resina *His Select Nickel Affinity Gel* (Sigma), previamente ressuspensa, foi adicionada a 800 µL de tampão de lavagem/equilíbrio (50mM NaPO₄ pH 8,0; 300mM NaCl). Um quarto do volume final foi transferido a um novo tubo e misturado a 15 µL da reação de síntese das proteínas recombinantes expressas *in vitro* agitando os tubos por 10 vezes, 10 seg e, então, centrifugada a 13.000 r.p.m. por 1 min, sendo o sobrenadante descartado. A resina foi lavada três vezes em 400 µL de tampão de lavagem/equilíbrio, seguida de centrifugação e descarte do sobrenadante. As proteínas foram eluídas em 100 µL de tampão de eluição (50mM NaPO₄ pH 8,0; 300mM NaCl; 250mM imidazole). As proteínas eluídas foram concentradas e purificadas em filtros *Amicon Ultra 0,5 Ym-30* (Millipore) para um volume final de 20 µL, segundo instruções do fabricante. As proteínas purificadas foram analisadas em SDS-PAGE pré-fabricados *Mini-Protean TGX 4-20% Precast Gel* e visualizados no *scanner* Fujifilm LAS-4000 no modo de fluorescência.

5 Resultados

5.1 Análise de extrato proteico total de diferentes fases de desenvolvimento do *Schistosoma mansoni* por 2D-PAGE

Este trabalho foi iniciado pela extração e separação de proteínas totais das diferentes fases de desenvolvimento do parasito *S. mansoni* que entram em contato com o hospedeiro vertebrado (cercária, esquistossômulo, verme adulto e ovo) através de eletroforese bidimensional (2-DE). Os resultados indicaram que, como já descrito na literatura (Curwen *et al.*, 2004), o perfil de separação dos extratos de proteína total em géis bidimensionais (2D-PAGE), utilizando fitas de IPG de 7 cm pH 3-10 e SDS-PAGE 12%, é diferente para cada forma do ciclo de vida do parasito. Obtivemos um perfil de 2-DE com boa resolução, poucos arrastes e muitos *spots* bem definidos em todas as fases analisadas (Fig. 4). As etapas seguintes deste trabalho foram realizadas com proteínas de verme adulto de *S. mansoni*.

5.2 Identificação de antígenos de verme adulto de *Schistosoma mansoni* reconhecidos pelo *pool* de soro de indivíduos infectados

2D-PAGEs corados por Azul de Coomassie Colloidal foram obtidos utilizando fitas de IPG de diferentes faixas de pH (3-10, 3-10NL e 5-8) a fim de visualizar o padrão de separação do extrato proteico AW-TOT de *S. mansoni*. Todas as diferentes faixas de pH das fitas de IPG utilizadas mostraram boa resolução dos *spots* e poucos arrastes no 2D-PAGE. Os *spots* proteicos foram resolvidos em uma ampla faixa de pH e de massa molecular (Fig. 5 A).

Uma vez otimizado o protocolo de separação de proteína total do parasito através de 2-DE, partimos para a realização dos experimentos de *Western-blotting* bidimensional (2D-WB). 2D-WB foi primeiramente realizado utilizando extrato proteico total de verme adulto de *S. mansoni* e um *pool* de soro de indivíduos infectados de área endêmica (INF).

Experimentos de 2D-WB correspondentes a cada uma das fitas de IPG de diferentes faixas de pH foram realizados a fim de determinar a faixa de pH onde uma melhor separação de *spots* imunogênicos seria alcançada quando utilizado *pool* de soro INF e extrato proteico AW-TOT (Fig. 5 B). A utilização de fitas de IPG de faixas de pH 3-10, 3-10NL e 5-8 mostrou que alguns *spots* antigênicos distintos foram evidenciados quando utilizada cada uma das fitas de IPG de faixas de pH diferentes. Embora a maioria das proteínas antigênicas tenham sido comumente identificadas nas diversas faixas de pH, algumas proteínas foram identificadas exclusivamente em uma faixa de pH específica, aumentando assim o número total de proteínas imunogênicas identificadas (Tab. 5). Uma vez que os *spots* imunogênicos apresentam padrões distintos de resolução e separação utilizando as fitas de diferentes faixas

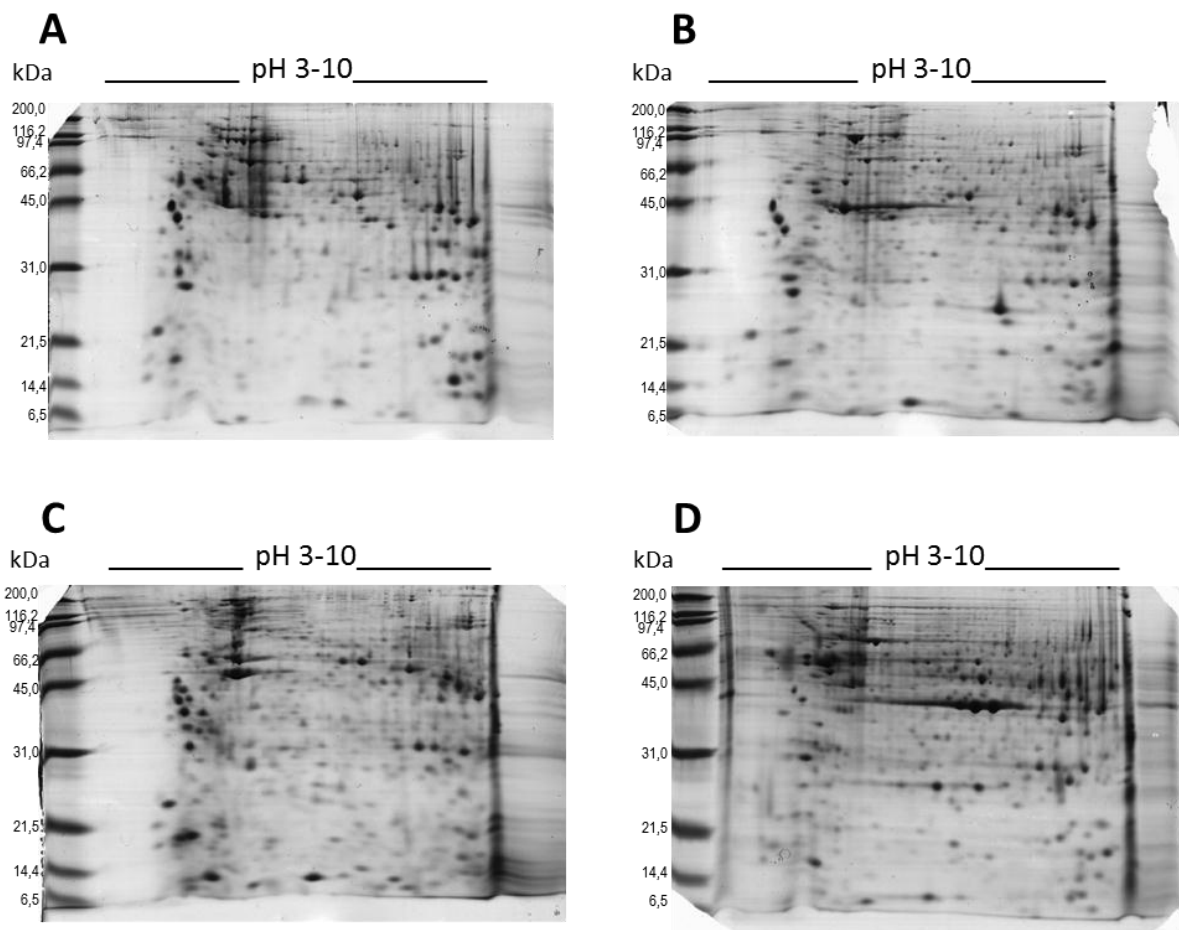


Figura 4: Perfil eletroforético bidimensional de extrato proteico total de diferentes fases de desenvolvimento do *Schistosoma mansoni*. 100 μ g de proteína total de verme adulto (A), esquistossômulo (B), cercária (C) ou ovo (D) foram separadas por eletroforese bidimensional utilizando fitas de IPG de 7 cm pH 3-10 e SDS-PAGE 12%. Os géis foram corados por Azul de Coomassie Colloidal.

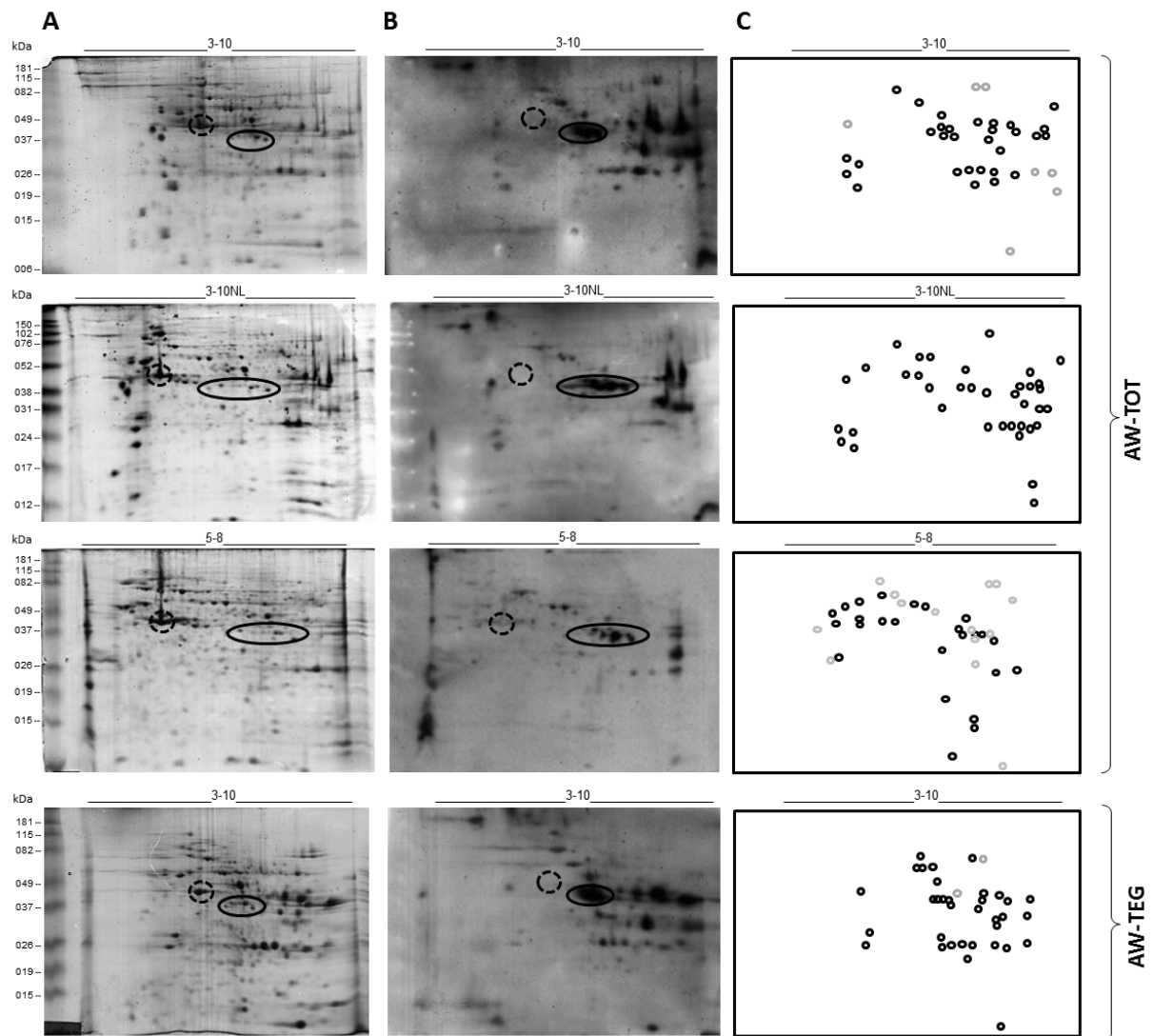


Figura 5: 2D-PAGEs de extratos proteicos de verme adulto de *Schistosoma mansoni* utilizando fitas de IPG de diferentes faixas de pH e respectivos 2D-WBs utilizando *pool* de soro de indivíduos infectados. A) 2D-PAGEs de extrato proteico total de verme adulto (AW-TOT) e de tegumento (AW-TEG) utilizando fitas de IPG de 7 cm pH 3-10, pH 3-10NL e pH 5-8 e SDS-PAGE 12%, corados por Azul de Coomassie Coloidal. B) 2D-WBs correspondentes utilizando *pool* de soro de indivíduos infectados com *S. mansoni* (INF) e anti-Ig total humana conjugada a HRP. Os círculos cheios indicam uma região de *spots* proteicos pouco visíveis no 2D-PAGE e altamente imunogênicos ao *pool* de soro INF no 2D-WB, enquanto os círculos pontilhados indicam uma região de *spots* proteicos fortemente corados no 2D-PAGE e fracamente ou não imunogênicos ao *pool* de soro INF. C) Esquema representativo dos *spots* imunogênicos ao *pool* de soro INF que foram excisados do respectivo 2D-PAGE para identificação por espectrometria de massas. Círculos pretos representam proteínas imunogênicas excisadas e identificadas por MS/MS, enquanto círculos cinzas indicam proteínas imunogênicas excisadas, mas não identificadas. Todas as proteínas identificadas estão listadas na Tabela 5. Este experimento é representativo de três réplicas.

Tabela 5: Proteínas imunogênicas aos pools de soro de indivíduos de área endêmica para a esquistossomose identificadas nos experimentos de 2D-WB.

Proteínas	Identidade dos genes	3-10 linear	3-10 NL	5-8 linear	3-10 linear
		AW-TOT	AW-TOT	AW-TOT	AW-TEG
14.3.3 [epsilon isoform]	Smp_034840.3	x	x	x	x
14.3.3 [zeta isoform]	Smp_009760	x	x		x
Actin-1 ¹	Smp_046600	x	x	x	x
Aldehyde dehydrogenase	Smp_050390	x	x	x	x
Antigen Sm 21.7	Smp_086480		x		x
Annexin ²	Smp_162170.2				x
Arginase	Smp_059980		x		
ATP synthase [alpha subunit mitochondrial]	Smp_002880.2	x	x		
ATP synthase [beta subunit]	Smp_038100		x	x	
ATP: guanidino kinase (Smc 74)	Smp_194770		x		
Cathepsin B1 [isotype 1]	Smp_103610		x		
Cathepsin B1 [isotype 2]	Smp_067060		x		
Cofilin actophorin	Smp_120700.1			x	
Dynein light chain	Smp_095520			x	
Enolase (Phosphopyruvate hydratase)	Smp_024110	x	x	x	x
Eukaryotic translation elongation factor	Smp_143140				x
Fatty acid-binding protein (Sm14)	Smp_095360.3				x
Filamin	Smp_000100				x
Four and A half lim domains ³	Smp_048560		x		x
Fructose 16-biphosphate aldolase	Smp_042160.2	x	x		x
Gelsolin	Smp_008660.2			x	
Glutathione S-transferase 28kDa (GST-28)	Smp_054160	x	x	x	x
Glutathione S-transferase 26kDa (GST-26)	Smp_102070	x	x		
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Smp_056970.1	x	x	x	x
Gynecophoral canal protein	Smp_177050		x		
Heat shock protein 70 (HSP70)	Smp_182190.2	x	x	x	
Hemoglobinase precursor (Antigen Sm32)*	Smp_075800	x	x		x
Hydroxyacylglutathione hydrolase (Glx II)	Smp_091010				x
Major egg antigen*	Smp_049300.3	x	x	x	x
Malate dehydrogenase [cytosolic]	Smp_035270.2	x			x
Malate dehydrogenase [mitochondrial]	Smp_047370		x		
Myosin regulatory light chain	Smp_132670	x	x	x	
Ng,ng- dimethylarginine dimethylaminohydrolase	Smp_052560		x	x	
Phosphoglycerate kinase	Smp_1172460	x	x		x
Phosphoglycerate mutase	Smp_096760	x	x	x	x
Protein disulfide-isomerase ER-60 precursor	Smp_079770				x
Reticulocalbin ¹	Smp_147680	x	x		x
<i>Schistosoma mansoni</i> , expressed protein	Smp_171780	x	x		
Short-chain dehydrogenase ³	Smp_081430				x
Superoxide dismutase [Cu-Zn]	Smp_176200.2			x	
Superoxide dismutase [Mn]	Smp_056440				x
Transketolase	Smp_059790.2				x
Trimeric G-protein alpha o subunit	Smp_016630.2			x	
Triose phosphate isomerase	Smp_003990	x	x		
Troponin I [<i>S. japonicum</i>] ⁴	gil226481381	x			
Troponin T	Smp_179810	x			
Tubulin alpha chain	Smp_016780			x	
Número total de proteínas identificadas:	47	22	29	18	25

Proteínas nomeadas segundo o banco de dados SchistoDB com algumas modificações. Todas as especificações das proteínas identificadas podem ser encontradas no site schistodb.net de acordo com seu Smp. AW-TOT: extrato proteico total de verme adulto, AW-TEG: extrato proteico de tegumento de verme adulto. ¹: Actina e Reticulocalbina foram co-extraídas do mesmo spot, exceto na fita de IPG de pH 5-8; ²: Anexina foi co-extraída do mesmo spot que uma das Major Egg Antigen; ³: Short-chain Dehydrogenase foi co-extraída do mesmo spot que Four and A Half Lim Domains; ⁴: Troponina I de *S. japonicum* sem Smp correspondente; *: proteínas selecionadas para a otimização da expressão de proteína recombinante *in vitro*, no sistema livre de células.

de pH, a correspondência de um mesmo *spot* proteico entre os diferentes 2D-PAGEs torna-se inviável.

Extrato proteico do tegumento de verme adulto (AW-TEG) foi também utilizado a fim de enriquecer a análise com proteínas do parasito imunologicamente expostas. O extrato proteico AW-TEG foi separado em fita de IPG pH 3-10 e foi observado um padrão de 2D-PAGE e 2D-WB similar ao encontrado para o extrato proteico AW-TOT, embora existam *spots* proteicos exclusivos de cada extrato (Fig. 5 e Tab. 5).

Sobrepondo o filme de raio-X do 2D-WB e o 2D-PAGE correspondente corado por Azul de Coomassie Colloidal observamos que não existe uma correlação direta entre a quantidade de proteína presente nos extratos proteicos AW-TOT e AW-TEG e o seu grau de antigenicidade. Embora a maioria dos *spots* imunogênicos reconhecidos pelo *pool* de soro INF tenham sido visualizados no 2D-PAGE correspondente, foram observados alguns *spots* proteicos fracamente ou não visíveis no 2D-PAGE que são altamente imunogênicos. Por outro lado, existem proteínas muito expressas, cujos *spots* foram fortemente corados no 2D-PAGE, mas que são fracamente ou não são imunogênicos. Os círculos na Figura 5 (A e B) indicam regiões no 2D-PAGE e 2D-WB correspondente onde estão localizados alguns exemplos destes *spots*. A maioria das proteínas imunogênicas possuem um pI acima de 6,5 e massa molecular acima de 25 kDa.

Os *spots* proteicos imunogênicos ao *pool* de soro INF detectados utilizando as fitas de IPG de diferentes faixas de pH foram excisados do 2D-PAGE correspondente corado por Azul de Coomassie Colloidal e submetidos à análises por espectrometria de massas para identificação das proteínas. A partir do 2D-PAGE usando extrato proteico AW-TOT e fita de IPG pH 3-10 foram excisados 37 *spots* imunogênicos. Outros 37 *spots* foram excisados a partir do 2D-PAGE com fita de IPG pH 3-10NL e 39 *spots* do 2D-PAGE com fita de IPG pH 5-8. A partir do 2D-PAGE usando extrato proteico AW-TEG e fita de IPG pH 3-10 foram excisados 36 *spots* imunogênicos. Estes *spots* estão representados na Figura 5 C. Círculos pretos na Figura 5 C representam *spots* que foram identificados com sucesso e círculos cinzas, *spots* que não foram identificados pela espectrometria de massas.

No total, 47 diferentes proteínas de *S. mansoni* imunogênicas aos *pools* de soro de indivíduos de área endêmica foram identificadas neste trabalho. Destas, 22 proteínas foram identificadas utilizando fita de IPG pH 3-10, 29 utilizando fita de IPG pH 3-10NL e 18 utilizando fita de IPG pH 5-8 com extrato proteico AW-TOT, enquanto 25 proteínas foram identificadas utilizando fita de IPG pH 3-10 com extrato proteico AW-TEG (Tab. 5). Algumas destas proteínas foram identificadas utilizando fitas de IPG com diferentes faixas de pH, e outras foram identificadas em apenas uma faixa de pH. Além disto, 9 proteínas

imunogênicas foram identificadas apenas quando extrato proteico AW-TEG foi utilizado. O *pool* de soro INF foi imunorreativo a 46 destas proteínas de *S. mansoni* identificadas, uma vez que não foi imunorreativo ao Fator Eucariótico de Elongamento da Tradução, a única proteína imunogênica exclusivamente ao *pool* de soro NE, como será descrito mais adiante. A lista de proteínas imunogênicas inclui o *Smp* (*Schistosoma mansoni* protein identification number) proveniente das proteínas identificadas em pelo menos um dos experimentos da triplicata realizada. Ocasionalmente, a mesma proteína foi identificada em mais de um *spot* no mesmo 2D-WB, indicando a existência de formas variantes da mesma proteína que mantêm o perfil imunogênico, provenientes, por exemplo, de modificações pós-transducionais, *splicing* alternativo, ou de duplicação gênica. Sendo assim, todos os *spots* antigênicos correspondentes a um mesmo *Smp* foram listados na Tabela 5 como provenientes de uma mesma proteína.

5.3 Comparação do perfil antigênico de proteínas de verme adulto de *Schistosoma mansoni* utilizando *pool* de soro de indivíduos infectados e não infectados de área endêmica

Com o objetivo de identificarmos antígenos reconhecidos diferencialmente pelo soro de indivíduos infectados com *S. mansoni* (INF) e não infectados (NE) de área endêmica, foram realizados experimentos de 2D-WB utilizando um *pool* de soro de cada um destes dois grupos separadamente. Um *pool* de soro de indivíduos não infectados e não residentes em área endêmica (NI) foi também utilizado. Extrato proteico AW-TOT e AW-TEG foram separados em fitas de IPG pH 3-10. Quatro 2D-PAGEs foram realizados simultaneamente e sob as mesmas condições. Um dos géis foi corado por Azul de Coomassie Colloidal para excisão de *spots* e identificação das proteínas por espectrometria de massas, enquanto os outros três géis foram utilizados para transferência das proteínas para membranas de PVDF e posterior incubação com os diferentes *pools* de soro INF, NE e NI, separadamente.

Variações no nível de intensidade da reação foram visualizadas nos 2D-WBs usando a mesma diluição dos três *pools* de soro. No geral, um padrão similar de *spots* imunogênicos foi observado, mas com maior intensidade do sinal de reação quando foi utilizado o *pool* de soro INF quando comparado ao de NE, que por sua vez apresentou um sinal de reação mais intenso que o de NI (Fig. 6). As diferenças encontradas no sinal da reação se devem exclusivamente à intensidade de reação com os diferentes *pools* de soro, uma vez que as membranas de um mesmo experimento de 2D-WB foram expostas ao mesmo filme de raio-X e, portanto, reveladas simultaneamente.

Variações qualitativas de *spots* imunogênicos também foram visualizadas nos experimentos de 2D-WB. Usando os extratos proteicos AW-TOT e AW-TEG foram

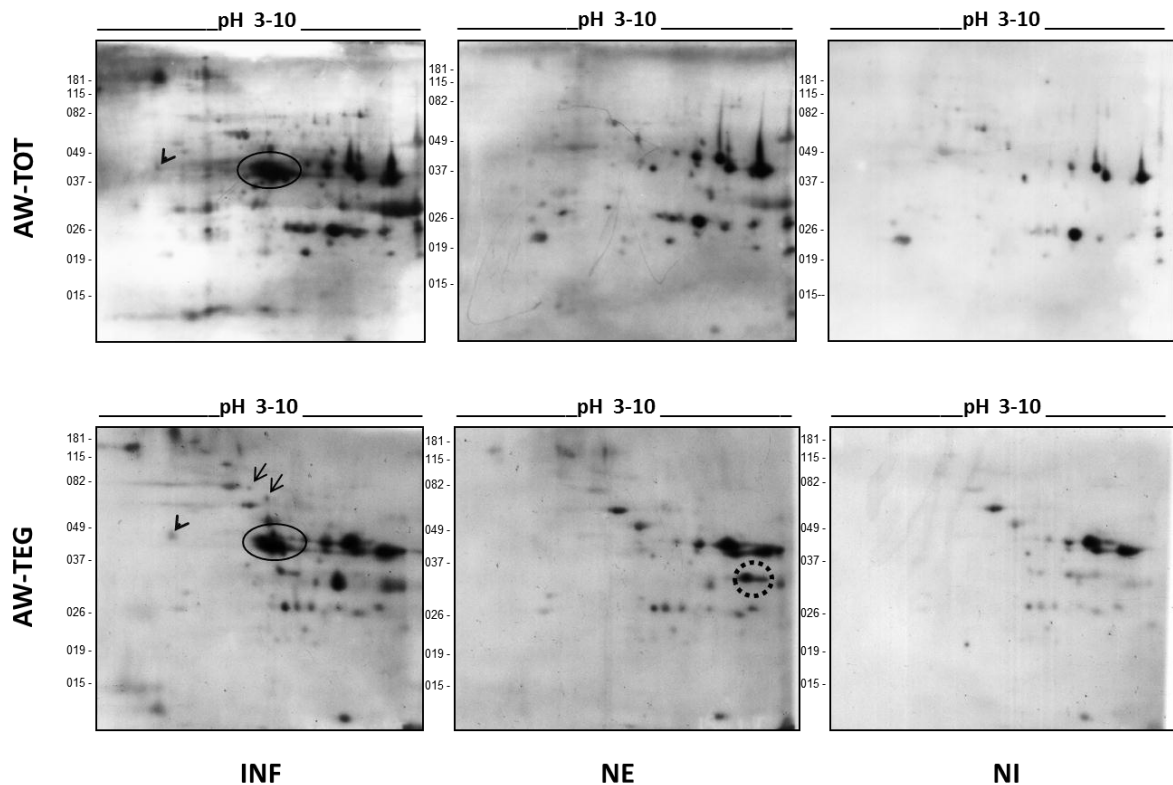


Figura 6: 2D-WB de extrato proteico total e de tegumento de verme adulto de *Schistosoma mansoni* utilizando *pool* de soro de indivíduos infectados e não infectados de área endêmica para a esquistossomose mansônica e não infectados de área não endêmica. Extrato protéico total (AW-TOT) e de tegumento (AW-TEG) de verme adulto foram separados por 2-DE utilizando fitas de IPG de 7 cm pH 3-10 e SDS-PAGE 12%. As proteínas foram transferidas para membranas de PVDF e incubadas com *pool* de soro de indivíduos infectados (INF) e não infectados (NE) de área endêmica para a esquistossomose e não infectados de área não endêmica (NI), seguido de incubação com anti-Ig total humana conjugada a HRP. Círculos, setas e cabeça de seta indicam *spots* proteicos imunogênicos visualizados exclusivamente com o *pool* de soro INF, enquanto o círculo pontilhado indica *spot* visualizado exclusivamente com o *pool* de soro NE. Este experimento é representativo de três réplicas.

observados 9 *spots* proteicos que reagiram exclusivamente com o *pool* de soro INF e um único *spot* proteico que reagiu apenas com o *pool* de soro NE.

Dos *spots* que reagiram exclusivamente com o *pool* de soro INF, alguns *spots* altamente imunogênicos foram visualizados no 2D-WB localizados em uma posição de aproximadamente 40 kDa e pH 7, como os indicados por círculos na Figura 6. Interessantemente, os *spots* correspondentes no 2D-PAGE foram fracamente corados pelo Azul de Coomassie Colloidal. Os *spots* excisados desta região do 2D-PAGE correspondente foram identificados por espectrometria de massas como *Major Egg Antigen*, Anexina e Troponina T. Dois *spots* correspondendo à proteína *Major Egg Antigen* foram identificados em todos os experimentos de 2D-WB da triplicata de ambos os extratos proteicos de verme adulto (*spots* 14 e 15, Figura 7 e Tabela 6). Um terceiro *spot* correspondente a *Major Egg Antigen* foi identificado em todos os experimentos de 2D-WB da triplicata do extrato proteico AW-TEG (*spot* 42, Figura 7 e Tabela 6). A presença de *spots* imunogênicos ao *pool* de soro INF identificados como *Major Egg Antigen* foi também verificada no extrato proteico AW-TOT utilizando fitas de IPG pH 3-10NL e 5-8, como já descrito anteriormente (Tab. 5). A proteína Anexina foi identificada em todos os experimentos de 2D-WB da triplicata utilizando extrato proteico AW-TEG, sendo co-extraída com a proteína *Major Egg Antigen* devido à localização muito próxima destes *spots* proteicos (*spot* 41, Figura 7 e Tabela 6). Dois *spots* correspondentes à proteína Troponina T foram identificados no extrato proteico AW-TOT (*spots* 31 e 32, Figura 7 e Tabela 6). No entanto, o *spot* 32 foi reativo em 2 experimentos de 2D-WB da triplicata e o *spot* 31 em apenas 1 experimento. Quando utilizado anti-IgG1 e anti-IgG3 como anticorpo secundário no 2D-WB, estes *spots* altamente imunogênicos não foram visualizados, mesmo usando o *pool* de soro INF (Fig. 8).

Dois outros *spots* localizados acima de 60 kDa e em uma faixa de pH entre 6 e 7 também imunorregiram exclusivamente ao *pool* de soro INF em todos os experimentos de 2D-WB da triplicata do extrato proteico AW-TEG, como indicados pelas setas na Figura 6. As proteínas correspondentes a estes *spots* foram identificadas como Precursor de Disulfeto Isomerase ER-60 (*spot* 44, Figura 7 e Tabela 6) e Filamina (*spot* 45, Figura 7 e Tabela 6).

Do *spot* 21 (Figura 7 e Tabela 6), posicionado na extremidade de pH ácido e em torno de 45 kDa no 2D-PAGE, foram co-extraídas duas proteínas: Actina e Reticulocalbina. Este *spot* foi visualizado em todos os experimentos de 2D-WB da triplicata do extrato proteico AW-TEG e em um experimento de 2D-WB da triplicata do extrato proteico AW-TOT, exclusivamente quando foi utilizado o *pool* de soro INF, como indicado pela cabeça de seta na Figura 6.

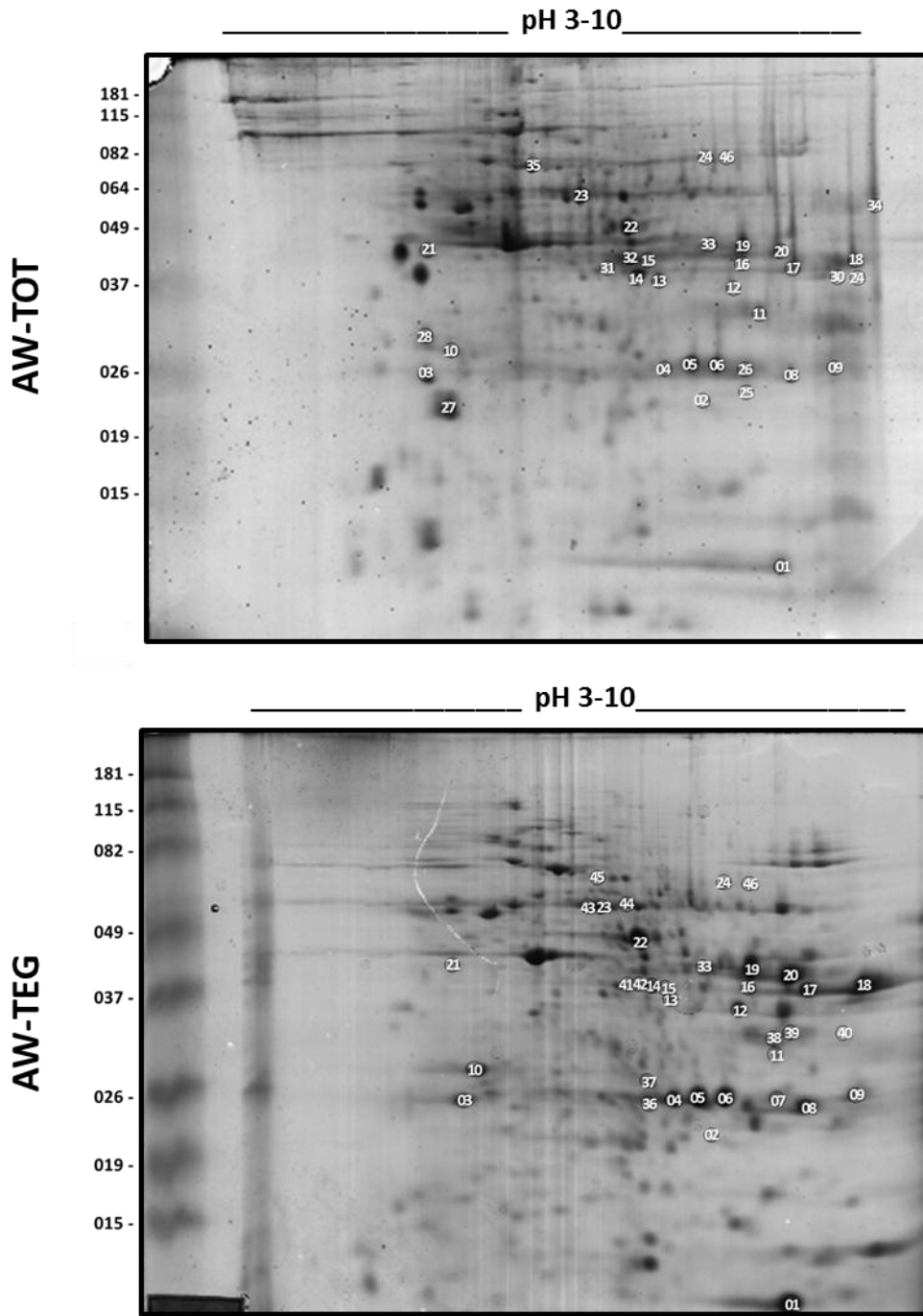


Figura 7: Indicação no 2D-PAGE dos spots imunogênicos identificados nos experimentos de 2D-WB. Extrato protéico total (AW-TOT) e de tegumento (AW-TEG) de verme adulto de *S. mansoni* foram separados por 2-DE utilizando fita de IPG de 7 cm pH 3-10 e SDS-PAGE 12%. Os géis foram corados por Azul de Coomassie Colloidal. Os spots proteicos imunogênicos ao pool de soro INF, NE e/ou NI nos experimentos de 2D-WB foram excisados do respectivo 2D-PAGE para identificação por espectrometria de massas. Os spots proteicos identificados estão indicados pelos números nesta figura e listados na Tabela 6. Este experimento é representativo de três réplicas.

Tabela 6: Spots imunogênicos ao pool de soro de indivíduos infectados e não infectados de área endêmica e não infectados de área não endêmica para a esquistossomose identificados nos experimentos de 2D-WB utilizando extrato proteico total e de tegumento de verme adulto de *Schistosoma mansoni*.

Número do spot	Proteína	AW-TOT			AW-TEG		
		INF	NE	NI	INF	NE	NI
1	Fatty acid-binding protein (Sm14)	1	1	1	1	1	1
2	Superoxide dismutase [Mn]	1	1	1	1	1	1
3	14.3.3 zeta isoform	2	2	1	2	2	1
4	Glutathione S-transferase 28kDa / Phosphoglycerate mutase	1	0	0	3	3	3
5	Glutathione S-transferase 28kDa	3	3	2	3	3	3
6	Glutathione S-transferase 28kDa	3	3	2	3	3	3
7	Phosphoglycerate mutase	-	-	-	3	3	3
8	Triose phosphate isomerase	2	2	1	3	3	3
9	Phosphoglycerate mutase	1	1	1	3	3	3
10	14.3.3 epsilon isoform	2	2	1	2	2	1
11	Hemoglobinase precursor	3	3	2	2	2	1
12	Malate dehydrogenase	1	1	0	3	3	1
13	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1	1	1	3	3	3
14	Major egg antigen	3	0	0	3	0	0
15	Major egg antigen	3	0	0	3	0	0
16	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2	2	2	3	3	3
17	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	3	3	3	3	3	3
18	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	3	3	3	3	3	3
19	Fructose 16-biphosphate aldolase / Phosphoglycerate kinase	3	3	2	3	3	3
20	Fructose 16-biphosphate aldolase	3	3	3	3	3	3
21	Reticulocalbin / Actin-1	1	0	0	3	0	0
22	Enolase (Phosphopyruvate hydratase)	3	3	2	3	3	3
23	Aldehyde dehydrogenase	2	2	1	3	3	3
24	Transketolase	1	0	0	2	2	0
25	Glutathione S-transferase 26kDa	2	2	1	-	-	-
26	Troponin I (<i>S. japonicum</i>)	3	3	2	-	-	-
27	Myosin regulatory light chain	2	2	1	-	-	-
28	<i>Schistosoma mansoni</i> , expressed protein	2	2	1	-	-	-
29	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1	1	1	-	-	-
30	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1	0	0	-	-	-
31	Troponin T	1	0	0	-	-	-
32	Troponin T	2	0	0	-	-	-
33	Fructose 16-biphosphate aldolase	3	2	2	3	3	3
34	ATP synthase alpha subunit mitochondrial	3	2	2	-	-	-
35	Heat shock protein 70 (HSP70)	2	0	1	-	-	-
36	Glutathione S-transferase 28kDa / Phosphoglycerate mutase	-	-	-	3	2	1
37	Hydroxyacylglutathione hydrolase (Glx II)	-	-	-	3	2	1
38	Four and A half lim domains	-	-	-	3	3	3
39	Short chain dehydrogenase / Four and A half lim domain	-	-	-	1	1	1
40	Eukaryotic translation elongation factor	-	-	-	0	2	0
41	Annexin / Major egg antigen	-	-	-	3	0	0
42	Major egg antigen	-	-	-	3	0	0
43	Aldehyde dehydrogenase	-	-	-	3	3	3
44	Protein disulfide-isomerase ER-60 precursor	-	-	-	3	0	0
45	Filamin	-	-	-	3	0	0
46	No hit	3	2	1	2	2	1

AW-TOT: extrato proteico total de verme adulto, AW-TEG: extrato proteico de tegumento de verme adulto. INF: 2D-WB realizado com pool de soro de indivíduos infectados; NE: 2D-WB realizado com pool de soro de indivíduos não infectados de área endêmica; NI: 2D-WB realizado com pool de soro de indivíduos não infectados de área não endêmica. Os números (0, 1, 2 e 3) indicam o número de experimentos nos quais cada spot foi detectado na triplicata. (-): spots não identificados em um dos extratos proteicos. Em negrito, proteínas imunogênicas exclusivamente ao pool de soro INF; e em realce, a proteína reconhecida exclusivamente pelo pool de soro NE. A numeração dos spots se correlaciona a Figura 7.

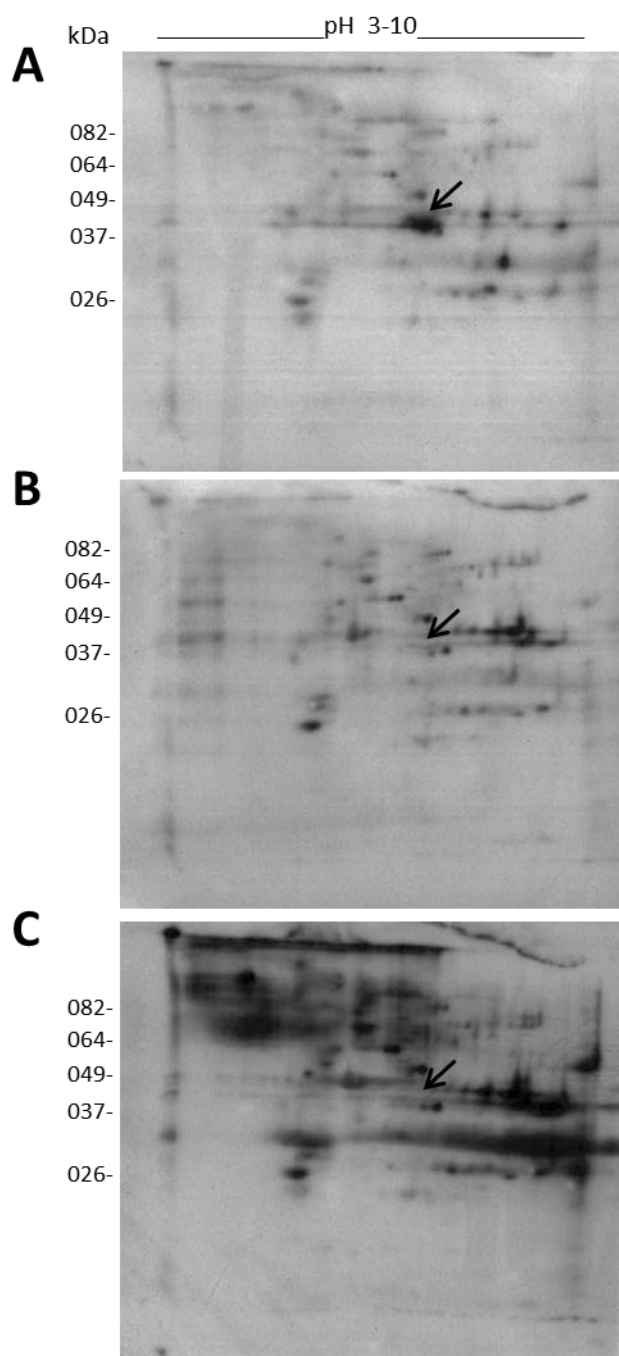


Figura 8: 2D-WB de extrato proteico total de verme adulto de *Schistosoma mansoni* utilizando *pool* de soro de indivíduos infectados e anticorpos secundários anti-Ig total, anti-IgG1 e anti-IgG3. Extrato proteico AW-TOT foi separado por 2-DE utilizando fita de IPG de 7 cm pH 3-10 e SDS-PAGE 12%. As proteínas foram transferidas para membranas de PVDF e incubadas com *pool* de soro INF seguido de incubação com anticorpos secundários anti-Ig total humana (A), anti-IgG1 humana (B) e anti-IgG3 humana (C) conjugados a HRP. A seta indica uma região de *spots* proteicos imunogênicos ao *pool* de soro INF visualizada apenas quando foi utilizado anti-Ig total humana.

A proteína Transcetolase (*spot* 24, Figura 7 e Tabela 6) foi identificada como um *spot* imunogênico exclusivo do *pool* de soro INF em um experimento de 2D-WB da triplicata do extrato proteico AW-TOT, embora esta proteína tenha sido imunogênica aos *pools* de soro INF e NE em dois experimentos de 2D-WB da triplicata do extrato proteico AW-TEG.

Apenas um *spot* reagiu exclusivamente com o *pool* de soro NE em dois experimentos de 2D-WB da triplicata do extrato proteico AW-TEG. Este *spot* corresponde ao Fator Eucariótico de Elongamento da Tradução (*spot* 40, Figura 7 e Tabela 6) e está posicionado em uma extremidade de pH básico e em torno de 33 kDa, como indicado pelo círculo pontilhado na Figura 6. Embora altamente imunogênico, esta proteína apresenta um baixo nível de expressão no extrato proteico AW-TEG, uma vez que o *spot* foi fracamente corado pelo Azul de Coomassie Coloidal.

Todas as proteínas imunogênicas foram agrupadas por distância Euclidiana utilizando o método *complete-linkage* de acordo com o padrão de reatividade aos *pools* de soro INF, NE e NI, obtido em três replicas dos experimentos de 2D-WB. Usando a representação de *heat map* foi possível observar que a clusterização separou grupos de proteínas com padrões distintos de reatividade. Além disso, através desta representação foi possível observar que o perfil antigênico de proteínas dos extratos AW-TOT e AW-TEG frente ao *pool* de soro NE se assemelha mais ao perfil encontrado para NI do que para o *pool* de soro INF (Fig. 9).

O perfil de reconhecimento antigênico obtido quando anticorpos secundários anti-IgG1 e anti-IgG3 foram utilizados para detectar proteínas do extrato AW-TOT imunogênicas aos diferentes *pools* de soro INF, NE e NI não indicou uma nítida diferença entre o padrão de *spots* imunogênicos aos diferentes soros. Sendo assim, não foi realizada a identificação dos *spots* imunogênicos nestes experimentos de 2D-WB (Fig. 10).

Experimentos de 2D-WB com extrato proteico total de verme adulto de *S. mansoni* foram realizados utilizando individualmente soro de 4 indivíduos infectados para a esquistossomose, que apresentam diferentes cargas parasitárias refletidas no número de ovos por grama de fezes (indivíduos com número de identificação: 128, 214, 329 e 514, Tabela 2) a fim de verificar se o perfil antigênico é similar entre as amostras de soro em estudo. Uma vez que a maioria dos *spots* reconhecidos pelo *pool* de soro INF está localizada em uma região de pH neutro, utilizamos fitas de IPG pH 5-8 para melhor separá-los. Uma desvantagem é que apesar de obter uma melhor separação das proteínas reconhecidas pelo soro INF, não é possível analisar as proteínas que apresentam pI mais extremos, como abaixo de 5 e acima de 8. O perfil antigênico de proteínas obtido para cada amostra de soro de INF demonstrou ser bastante similar entre eles e entre o *pool* de soro INF. Como mostrado anteriormente, alguns

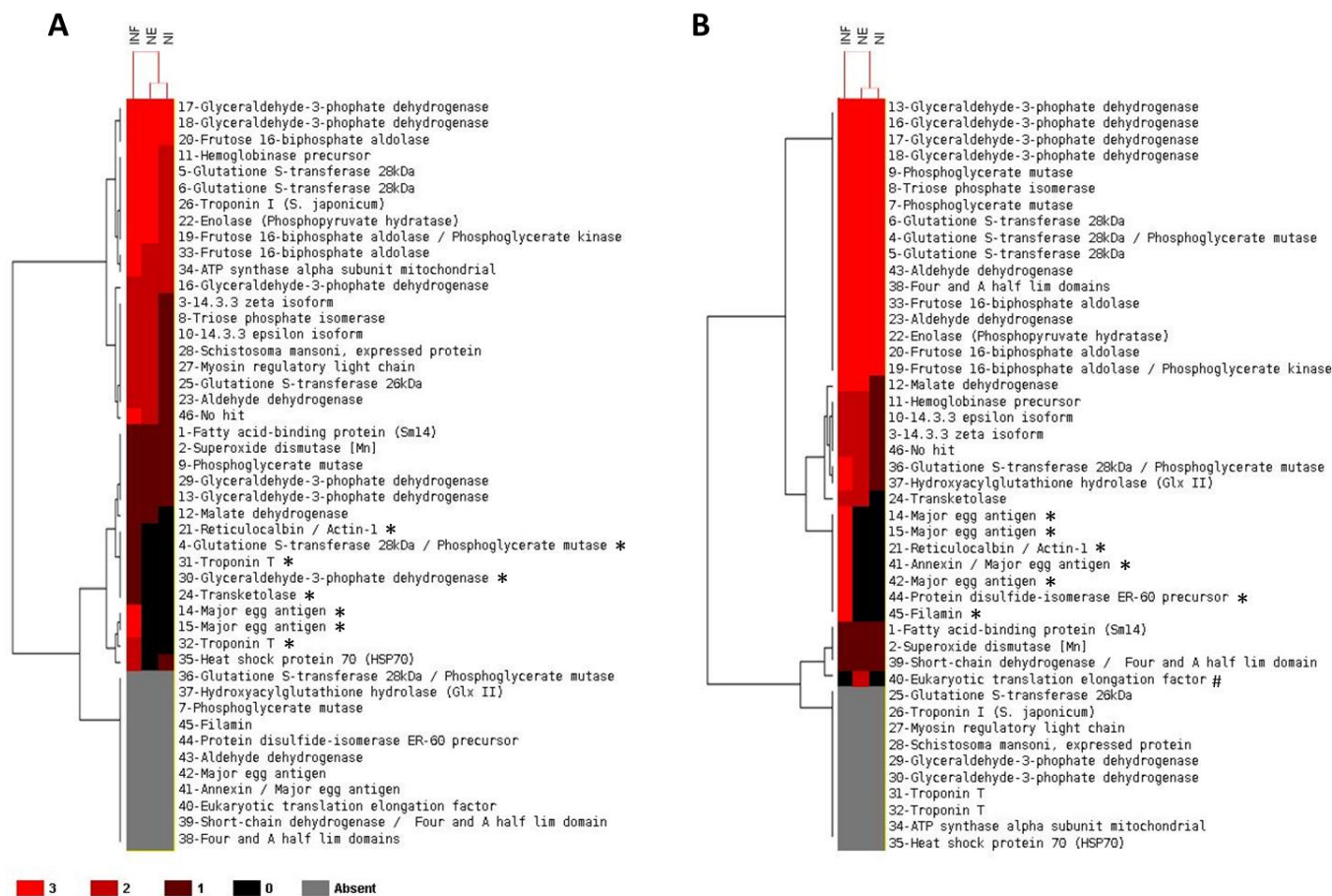


Figura 9: Representação por Heat Map de proteínas de verme adulto de *Schistosoma mansoni* imunogênicas aos diferentes pools de soro utilizados. Extrato proteico total (A) e de tegumento (B) de verme adulto de *S. mansoni* foram analisados por 2D-WB e as proteínas identificadas por espectrometria de massas foram agrupadas de acordo com o padrão de reatividade aos pools de soro de indivíduos infectados (INF), não infectados (NE) de área endêmica e não infectados de área não endêmica (NI), em três experimentos de 2D-WB. Um padrão de reatividade positiva em todos os três experimentos está representado pela cor vermelha e a ausência de reatividade pela cor preta. Proteínas que não foram identificadas em um dos extratos proteicos estão representadas pela cor cinza. Proteínas que reagiram exclusivamente ao pool de soro INF (*) e proteína que reagiu exclusivamente ao pool de soro NE (#).

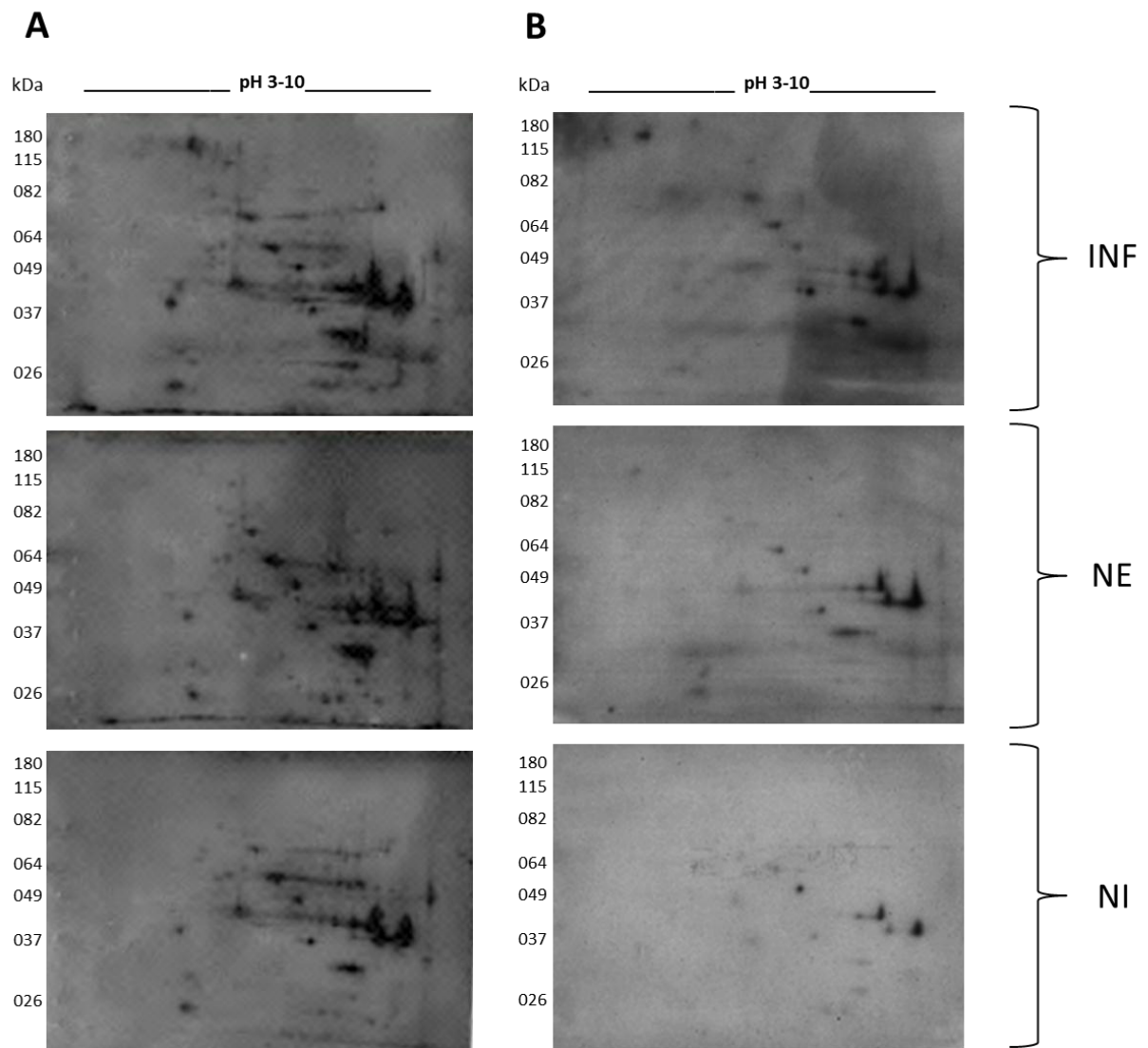


Figura 10: 2D-WB de extrato proteico total de verme adulto de *Schistosoma mansoni* utilizando pools de soro de indivíduos infectados, não infectados de área endêmica e não infectados para a esquistossomose reconhecidos por anti-IgG1 e anti-IgG3. Extrato proteico AW-TOT foi separado por 2-DE utilizando fita de IPG de 7 cm pH 3-10 e SDS-PAGE 12%. As proteínas foram transferidas para membranas de PVDF e incubadas com pool de soro de indivíduos infectados (INF) e não infectados (NE) de área endêmica para a esquistossomose e não infectados de área não endêmica (NI), seguido de incubação com anticorpo secundário anti-IgG1 (A) e anti-IgG3 (B) humana conjugada a HRP.

spots foram imunogênicos exclusivamente ao soro INF, em *pool* e individualmente, como os indicados pelos círculos na Figura 11. Sendo assim, verificamos que o reconhecimento destes *spots* é uniforme entre as amostras de soro INF analisadas.

Os resultados até aqui descritos foram compilados em forma de artigo científico intitulado *Serological screening of the Schistosoma mansoni adult worms proteome*, o qual será submetido para publicação, após definição do processo de depósito de patente.

5.4 Identificação de glicoproteínas no extrato proteico total de verme adulto de *Schistosoma mansoni*

O corante *Pro-Q Emerald 488* foi utilizado a fim de verificar a existência de glicoproteínas no extrato proteico AW-TOT de *S. mansoni*. O grupamento glicol presente na glicoproteína é inicialmente oxidado a aldeído pelo ácido periódico. O corante *Pro-Q Emerald* reage então com o aldeído formando um conjugado fluorescente (Hart, 2003). Quando o extrato proteico AW-TOT foi submetido à separação por 2-DE e à coloração por *Pro-Q Emerald*, alguns *spots* fluorescentes nítidos foram observados no 2D-PAGE provenientes da ligação do corante (Fig. 12 A e B). Foram extraídos 24 *spots* do 2D-PAGE para a identificação pela espectrometria de massas, no entanto, apenas 9 foram identificados. Todos os *spots* identificados estão localizados no 2D-PAGE na posição correspondente à massa teórica, com exceção do *spot* 9 correspondente a Calreticulina. O *spot* 7 provavelmente corresponde a proteína Hemoglobina madura de 32 kDa, que apresenta massa molecular menor do que o seu precursor aqui identificado por MS/MS (Fig. 12). As proteínas identificadas tiveram suas sequências submetidas a ferramentas de predição de sítios de glicosilação, sendo identificados alguns possíveis sítios de N- e/ou O-glicosilação para cada uma das proteínas (Fig. 12 C).

5.5 Identificação de diferentes subclasses de carboidratos de glicoproteínas presentes no extrato proteico total de verme adulto de *Schistosoma mansoni*

Diferentes lectinas, proteínas que se ligam a carboidratos específicos, marcadas com digoxigenina foram utilizadas para a detecção de proteínas glicosiladas por diferentes subclasses de carboidratos presentes no extrato proteico AW-TOT de *S. mansoni*. Além disto, as lectinas também foram utilizadas para verificar a ação do tratamento com periodato/borohidreto sobre estas glicoproteínas. O tratamento com periodato/borohidreto é efetivo quando a lectina torna-se incapaz de reconhecer o respectivo carboidrato, uma vez que

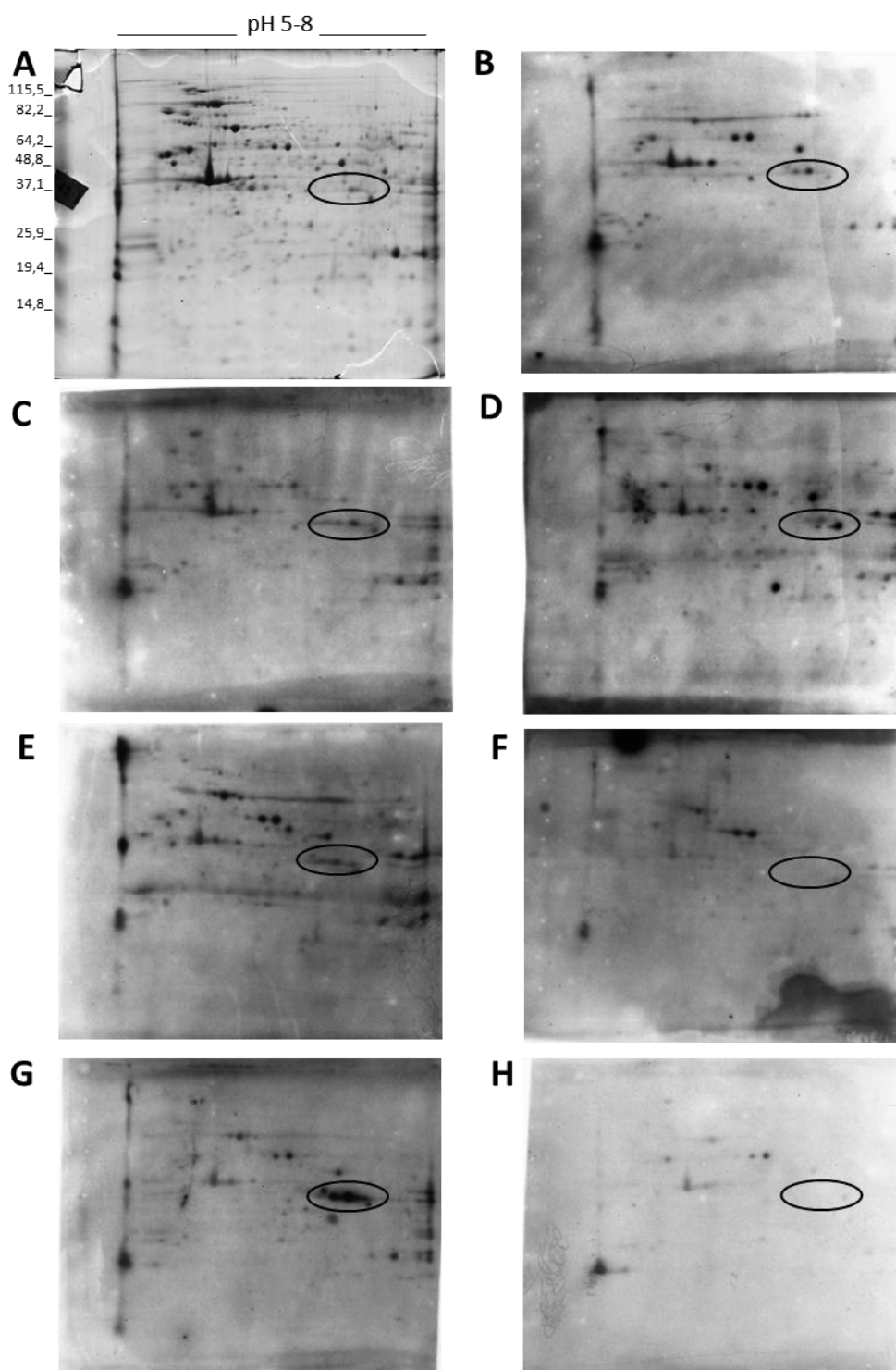


Figura 11: 2D-WB de extrato proteico total de verme adulto de *Schistosoma mansoni* utilizando soro individual de indivíduos infectados para a esquistossomose. A) 2D-PAGE de extrato proteico AW-TOT utilizando fitas de IPG de 7 cm pH 5-8 e SDS-PAGE 12%, corado por Azul de Coomassie Colloidal. B-E) 2D-WB utilizando soro individual de indivíduos infectados (B: indivíduo 128, C: indivíduo 214, D: indivíduo 329 e E: indivíduo 514). F) 2D-WB utilizando o *pool* de soro de indivíduos não infectados de área endêmica. G) 2D-WB utilizando o *pool* de soro de indivíduos infectados. H) 2D-WB utilizando o *pool* de soro de indivíduos não infectados de área não endêmica. Todos os 2D-WB foram realizados utilizando soro individual e *pool* de soro diluídos 1:500 e anticorpo secundário anti-Ig total humana conjugada a HRP diluído 1:100.000. Os círculos indicam uma região de *spots* imunogênicos apenas ao soro de indivíduos infectados, em *pool* e individualmente.

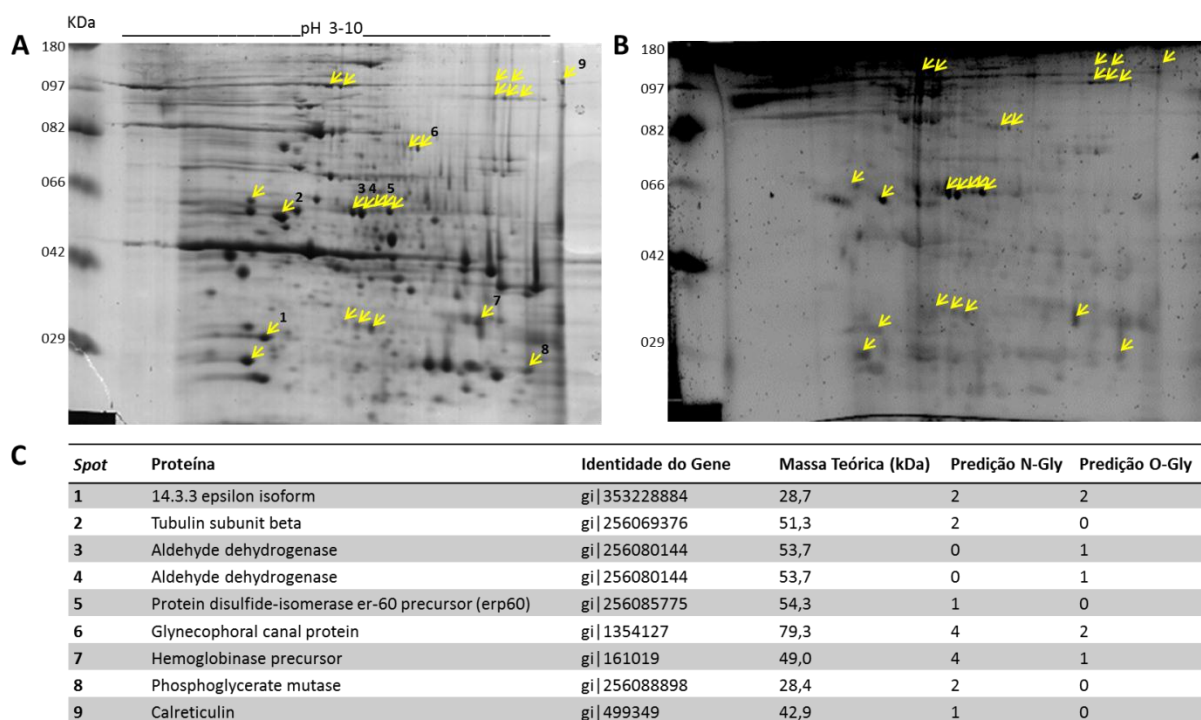


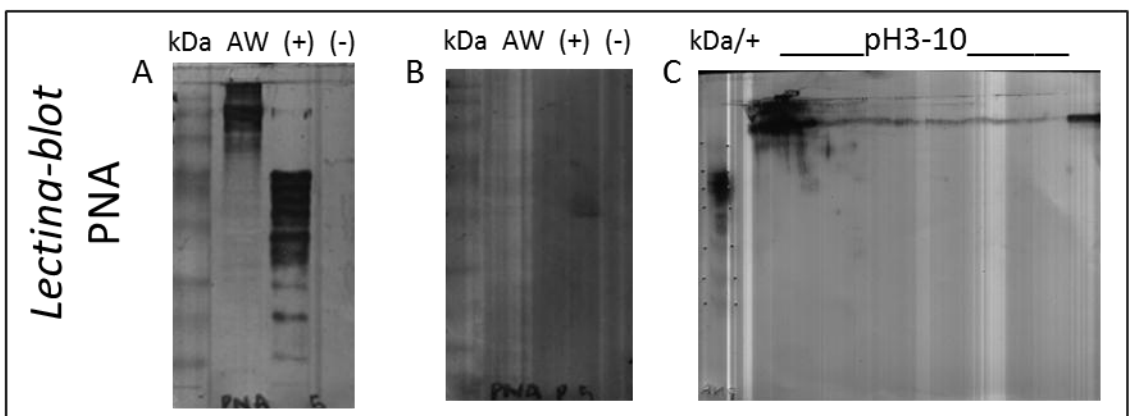
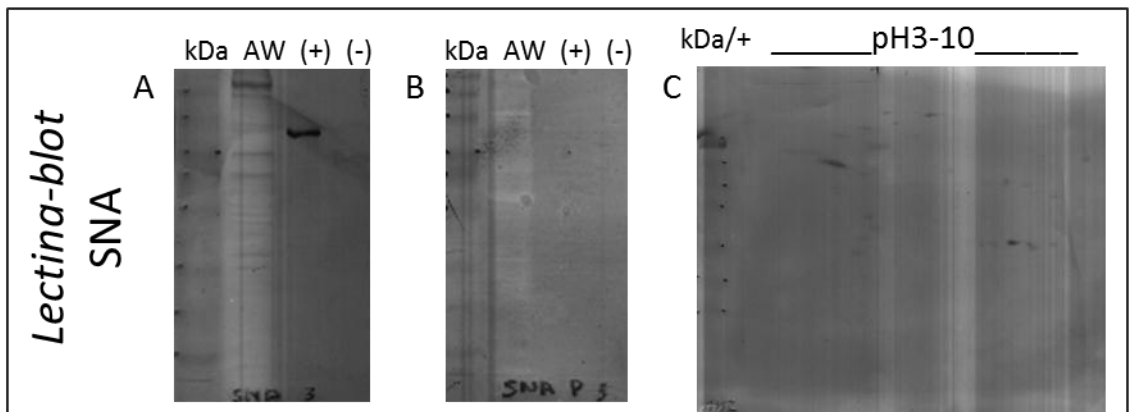
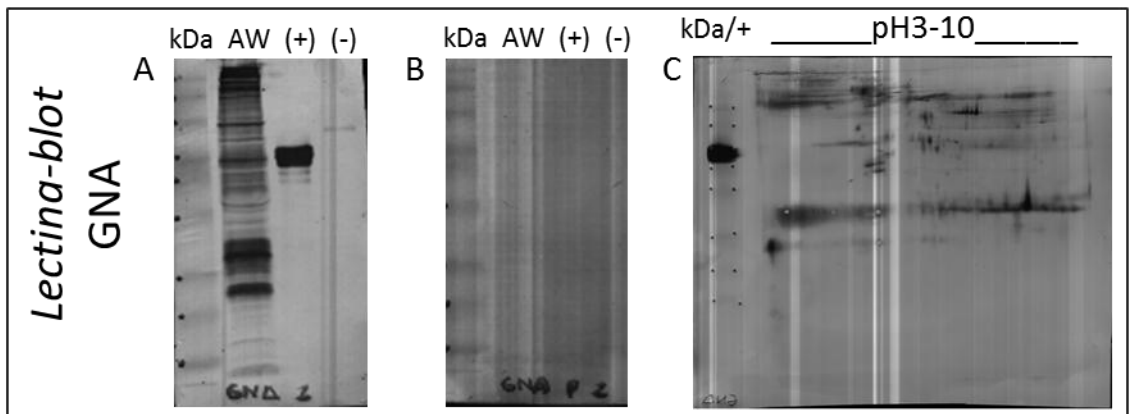
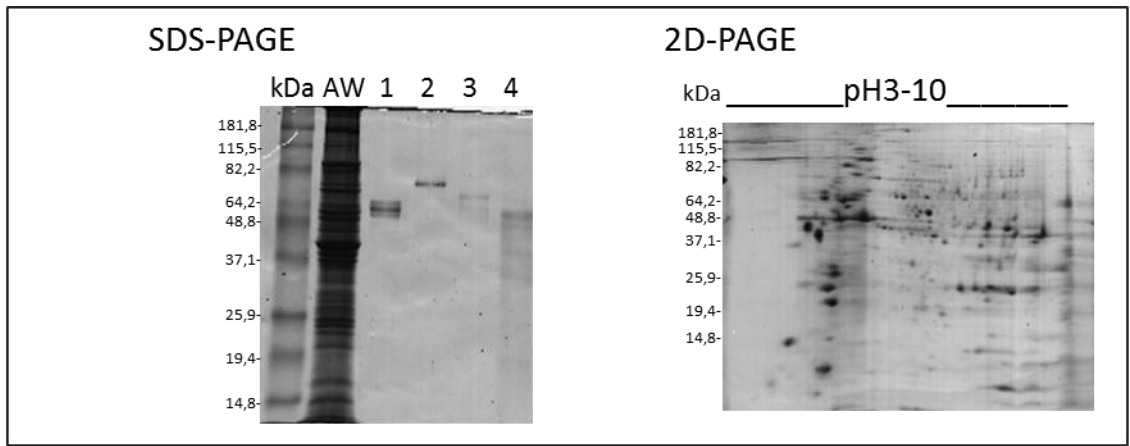
Figura 12: Identificação de glicoproteínas no extrato proteico total de verme adulto de *Schistosoma mansoni*. Extrato proteico AW-TOT foi separado por 2-DE utilizando fita de IPG de 7 cm pH 3-10 e SDS-PAGE 12%. Padrão de massa molecular *Candy Cane* em kDa. A) 2D-PAGE corado por Azul de Coomassie Colloidal. B) 2D-PAGE corado por *ProQ-Emerald*. As setas indicam *spots* corados por *ProQ-Emerald* e excisados após a coloração pelo Azul de Coomassie Colloidal para identificação por espectrometria de massas. Os números indicam os *spots* identificados listados em C. Em C estão os número de prováveis sítios de N-glicosilação (N-Gly) e O-glicosilação (O-Gly) preditos pelas ferramentas NetNGly 1.0 e NetOGly 3.1, respectivamente, para cada uma das proteínas identificadas. 2D-PAGE representativo de quatro réplicas.

este tratamento modifica a porção glicídica das glicoproteínas imobilizadas previamente nas membranas de PVDF.

Inicialmente extrato proteico AW-TOT e os respectivos controles positivo e negativo foram separados em SDS-PAGE unidimensional e os mesmos foram transferidos para membranas de PVDF. As membranas foram subsequentemente tratadas ou não tratadas com periodato/borohidreto. A presença de glicoproteínas contendo determinadas subclasses de carboidratos foi constatada no extrato proteico AW-TOT pelas membranas que não foram tratadas com periodato/borohidreto (Fig. 13 A). A lectina GNA reconheceu fortemente proteínas com glicosilação do tipo manose-manose terminal em uma ampla faixa de massa molecular, acima de 20 kDa aproximadamente. A lectina DSA que se liga a carboidratos do tipo Gal-GlcNAc e GlcNAc, também reconheceu proteínas em uma ampla faixa de pH. A lectina PNA que se liga a carboidratos do tipo Gal-GalNAc, reconheceu preferencialmente as proteínas de alta massa molecular do extrato AW-TOT. Por fim, as lectinas SNA e MAA reconheceram fracamente proteínas com glicosilação do tipo ácido siálico presentes no mesmo extrato proteico. Todas as lectinas reconheceram seus respectivos controles positivos, como esperado.

Quando as membranas foram tratadas por periodato/borohidreto, as lectinas não foram mais capazes de reconhecer as glicoproteínas do parasito presentes no extrato proteico AW-TOT, ou mesmo o controle positivo correspondente (Fig. 13 B). A exceção ocorreu para a lectina DSA que continuou reconhecendo as proteínas do extrato proteico e o seu respectivo controle positivo e para a lectina MAA que ainda reconheceu o seu controle positivo. Esta observação se deve ao fato de que o tratamento com periodato/borohidreto não afetou as configurações dos carboidratos do tipo Gal-GlcNAc e GlcNAc, e de um grupo de ácido siálico, respectivamente. Controles negativos e positivos específicos para cada uma das lectinas foram utilizados para comprovar a eficiência do tratamento com periodato/borohidreto. Este resultado mostra que o tratamento com periodato/borohidreto foi efetivo para alguns dos principais tipos de glicosilação.

As mesmas lectinas descritas acima foram utilizadas para detecção das glicoproteínas presentes no extrato proteico AW-TOT separado por 2-DE e imobilizado em membrana de PVDF (Fig. 13 C). Os *spots* reconhecidos pelas lectinas estão de acordo com o padrão de bandas observadas nos respectivos SDS-PAGE unidimensionais, tanto em relação à massa molecular quanto em relação à quantidade de bandas/*spots*. Um maior número de glicoproteínas foi reconhecido pela lectina GNA, onde foram observados *spots* em uma ampla faixa de pH com massa molecular acima de 25 kDa, seguida da lectina PNA, onde foram



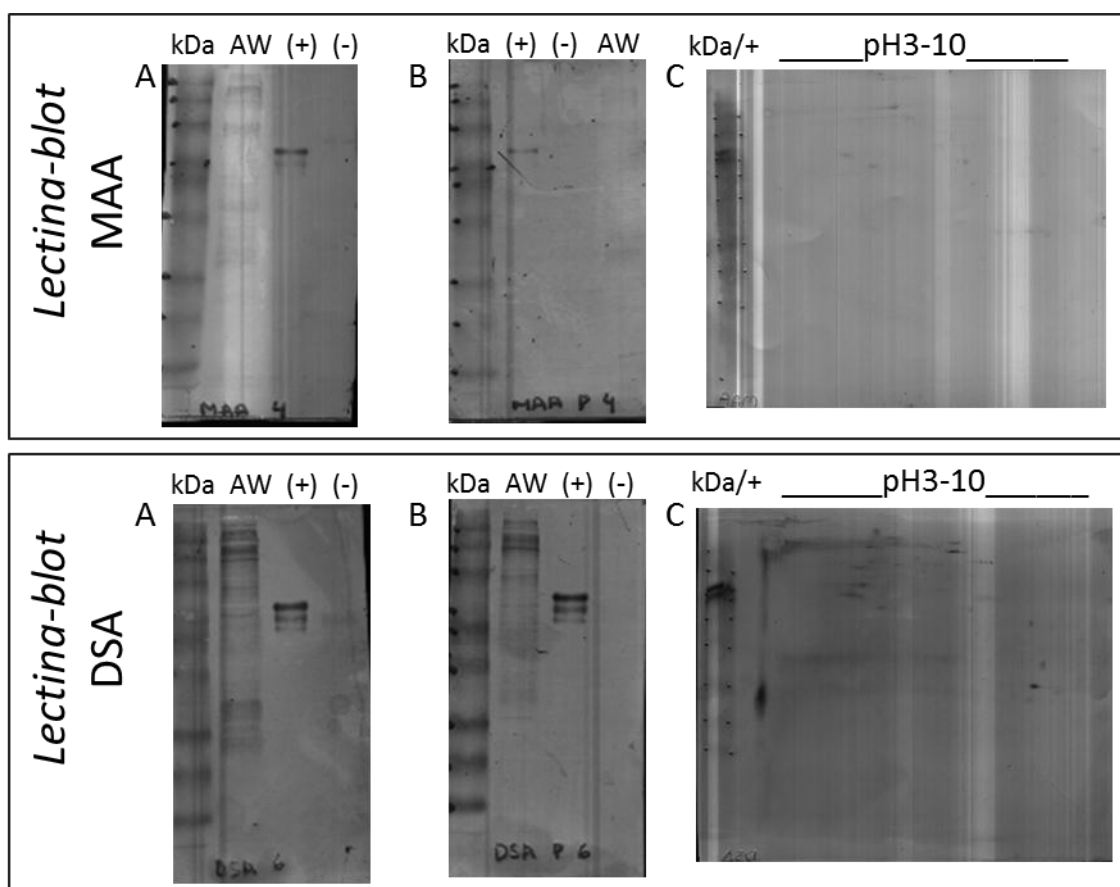


Figura 13: Lectina-blot de extrato proteico total de verme adulto de *Schistosoma mansoni*. Na primeira janela, SDS-PAGE 12% unidimensional de 50 μ g de extrato proteico AW-TOT (AW) e glicoproteínas controle: 1- carboxy-peptidase Y (controle positivo para GNA), 2- transferrina (controle positivo para SNA e DSA), 3- fetuína (controle positivo para SNA, MAA e DSA), 4- asiaslofetuína (controle positivo para DSA e PNA) e 2D-PAGE de 100 μ g de extrato proteico AW-TOT utilizando fitas de IPG de 7 cm pH 3-10 e SDS-PAGE 12%, ambos os géis foram corados por Azul de Coomassie Colloidal. Nas demais janelas, lectina-blot de proteínas imobilizadas em membranas de PVDF, a partir de SDS-PAGE e 2D-PAGE, utilizando as lectinas DSA, GNA, SNA, PNA e MAA do *Dig Glycan Differentiation kit*. A) Lectina-blot de SDS-PAGE, contendo 50 μ g de extrato proteico total de verme adulto (AW) e respectivos controles positivo (+) e negativo (-); B) Lectina-blot de SDS-PAGE contendo 50 μ g de extrato proteico total de verme adulto (AW) e respectivos controles positivo (+) e negativo (-), após tratamento das membranas com periodato/borohidreto; C) Lectina-blot de 2D-PAGE de 100 μ g de extrato proteico AW-TOT utilizando fitas de IPG de 7 cm pH 3-10 e SDS-PAGE 12%. O controle positivo correspondente de cada lectina foi acrescentado junto à canaleta onde foi aplicado o padrão de massa molecular (kDa/+). Este experimento é representativo de duas replicatas.

observados *spots* na extremidade de pH ácido e massa molecular acima de 150 kDa. As lectinas DSA, SNA e MAA reconheceram poucos *spots* de glicoproteínas.

A lectina GNA reconheceu um significativo número de *spots* na faixa de pH e massa molecular onde se encontram os *spots* imunogênicos aos soros INF, NE e NI nos experimentos de 2D-WB. Enquanto as lectinas SNA, DSA e MAA reconheceram poucos *spots* na mesma faixa de massa molecular e pH. A lectina PNA reconheceu *spots* em uma faixa de pH e massa molecular totalmente diferentes dos *spots* reconhecidos pelos soros nos experimentos de 2D-WB.

5.6 Reatividade das glicoproteínas de verme adulto de *Schistosoma mansoni* tratadas com periodato/borohidreto ao pool de soro de indivíduos infectados para a esquistossomose

O tratamento com periodato/borohidreto foi realizado nos experimentos de 2D-WB a fim de verificar se a imunogenicidade das proteínas do extrato proteico AW-TOT de *S. mansoni* aos *pools* de soro INF, NE e NI seria proveniente da porção protéica ou da porção glicídica de uma glicoproteína. Este tratamento modifica a porção glicídica das glicoproteínas imobilizadas nas membranas de PVDF eliminando a reatividade imunológica que um carboidrato possa apresentar, sem alterar a estrutura da cadeia polipeptídica (Woodward *et al.*, 1985).

O perfil de reconhecimento de proteínas imobilizadas em membranas tratadas pelo periodato/borohidreto conferido pelo *pool* de soro de indivíduos infectados de área endêmica para a esquistossomose manteve-se semelhante ao perfil de reconhecimento de proteínas imobilizadas em membranas não tratadas, como exemplificado pelos *spots* indicados pelas setas verdes na Figura 14. O mesmo resultado foi obtido quando os *pools* de soro NE e NI foram utilizados (resultados não mostrados). Isto indica que o reconhecimento da maioria dos *spots* imunogênicos pelos diferentes soros utilizados neste trabalho é específico contra proteínas ou contra a porção polipeptídica de glicoproteínas. Entretanto, alguns *spots*, como os apontados pelas setas vermelhas na Figura 14, apresentaram uma maior intensidade de reação na membrana tratada, enquanto os apontados pelas setas amarelas apresentaram uma menor intensidade de reação na membrana tratada, indicando uma influência na reatividade gerada pela porção glicídica de algumas glicoproteínas.

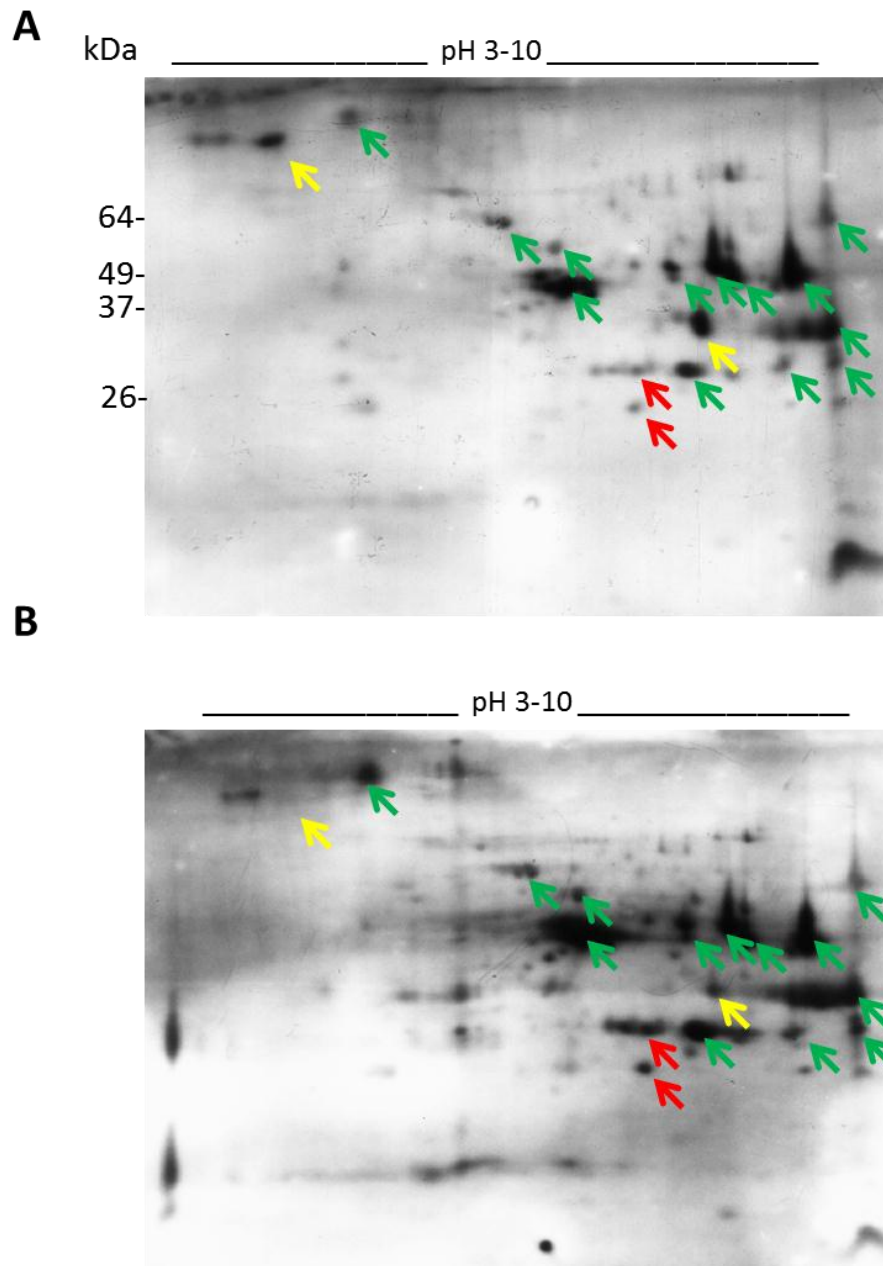


Figura 14: Efeito da oxidação por periodato sobre 2D-WB de extrato proteico total de verme adulto de *Schistosoma mansoni* utilizando *pool* de soro de indivíduos infectados para a esquistossomose. Extrato proteico AW-TOT foi separado por 2-DE utilizando fitas de IPG de 7 cm pH 3-10 e SDS-PAGE 12%. As proteínas foram transferidas para membranas de PVDF, em seguida tratadas ou não tratadas com periodato/borohidreto e incubadas com *pool* de soro INF e com anti-Ig total humana como anticorpo secundário. A) Membrana não tratada com periodato/borohidreto. B) Membrana tratada com periodato/borohidreto. As setas verdes indicam *spots* imunogênicos mesmo após o tratamento; as setas vermelhas, *spots* que apresentaram reação imunogênica mais intensa após o tratamento; as setas amarelas, *spots* não mais imunogênicos ou pouco imunogênicos após o tratamento com periodato/borohidreto. Este experimento é representativo de duas réplicas.

5.7 Otimização da técnica de expressão de proteínas recombinantes *in vitro* em sistema livre de células

O sistema de expressão *in vitro*, livre de células, é utilizado na produção de quantidades analíticas de proteínas, sendo capaz de sintetizar proteínas instáveis, insolúveis e tóxicas, difíceis de serem expressas *in vivo*. Este sistema permite uma redução no tempo necessário para a expressão de proteínas, o qual é muito importante na realização de ensaios em larga escala. Sendo assim, várias proteínas selecionadas nos experimentos de 2D-WB puderam ser sintetizadas de forma recombinante a fim de serem analisadas contra um painel maior de soros e diferentes classes de imunoglobulinas.

Duas das proteínas identificadas como imunogênicas nos experimentos de 2D-WB foram selecionadas para a otimização dos experimentos de expressão *in vitro*: Hemoglobina (Hem) e *Major Egg Antigen* (MjE).

O sistema de expressão utilizando lisado de germe de trigo *TNT® SP6 High-Yield Wheat Germ Protein Expression System* foi selecionado para expressão de proteínas recombinantes *in vitro*. Este sistema possibilita a expressão de proteínas por transcrição-tradução direta a partir de um molde de DNA: linear ou vetor circular. Uma cauda de Histidina (6xHis) foi adicionada ou não às proteínas a fim de permitir uma posterior purificação das proteínas expressas no extrato de germe de trigo.

Para a expressão a partir de molde de DNA em vetor circular, foram desenhados iniciadores contendo os sítios específicos para as enzimas de restrição utilizadas para a clonagem no vetor *Flexi-vector* de escolha. A região codificadora dos genes de ambas as proteínas foram amplificadas com sucesso usando uma biblioteca de cDNA de verme adulto como molde. As bandas correspondentes aos fragmentos de DNA amplificados foram observadas nos tamanhos esperados para cada um dos genes, correspondendo a 1258 pb para a Hemoglobina e 1087 pb para a *Major Egg Antigen*, com acréscimo de 18 pb quando adicionada a cauda de 6xHis (Fig. 15). Os fragmentos amplificados foram inseridos no vetor *pF3A WG (BYDV) Flexi-vector* previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição. Colônias provenientes da transformação das construções para MjE, contendo ou não 6xHis, e Hem contendo 6xHis foram obtidas. Não foram obtidas colônias da construção para Hem não contendo 6xHis. Por sequenciamento foi comprovado que os fragmentos de DNA foram corretamente inseridos no vetor *Flexi-vector* (resultado não mostrado). As sequências inseridas apresentaram diferenças pontuais em relação à sequência depositada no banco de dados do SchistoDB. No entanto, estas diferenças acarretavam apenas a troca de alguns nucleotídeos sem introdução de códon de parada ou mudança na janela aberta de leitura.

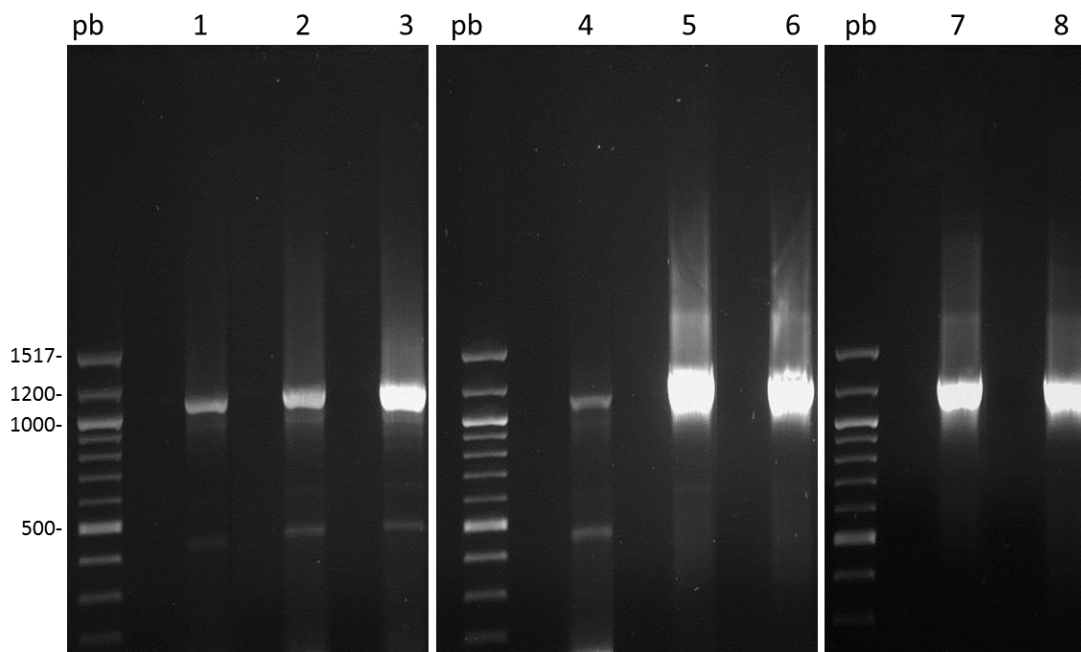


Figura 15: Amplificação da região codificadora dos genes de *Major Egg Antigen* e *Hemoglobinase*. Fragmentos provenientes da amplificação da região codificadora da *Major Egg Antigen* (MjE) e do precursor de Hemoglobinase (Hem) foram obtidos para serem utilizados no sistema de transcrição-tradução *in vitro* tendo como moldes DNA linear (linear) ou DNA circular (Flex), ambos contendo (His) ou não (noHis) a cauda de histidina. Produtos da amplificação utilizando como molde biblioteca de cDNA de verme adulto e iniciadores específicos foram separados em gel de agarose 1% corado por brometo de etídeo. 1- MjE/Flex/His; 2- MjE/Flex/noHis; 3- MjE/Linear/His; 4- MjE/Linear/noHis; 5- Hem/Flex/His; 6- Hem/Flex/noHis; 7- Hem/Linear/His; 8- Hem/Linear/noHis. Peso molecular *Tridye 100 bp DNA Ladder* (Biolabs) em pares de base (pb).

Para a expressão a partir de molde de DNA linear, iniciadores foram desenhados contendo as sequências correspondentes ao promotor SP6 e à sequência consenso de Kozak. A região codificadora dos genes de ambas as proteínas foram amplificadas com sucesso usando biblioteca de cDNA de verme adulto como molde. As bandas correspondentes aos fragmentos de DNA amplificados foram observadas nos tamanhos esperados para cada um dos genes, correspondendo a 1275 pb para a Hemoglobinase e 1104 pb para a *Major Egg Antigen*, com acréscimo de 18 pb quando adicionada a cauda de 6xHis (Fig. 15).

A utilização de DNA circular contendo ambos os genes como molde para a expressão *in vitro* mostrou ser a metodologia apropriada para a produção destas proteínas de *Schistosoma mansoni* no sistema livre de células utilizando lisado de germe de trigo. As proteínas expressas neste sistema foram visualizadas em SDS-PAGE através da incorporação de resíduos de lisina fluorescente. A proteína MjE foi expressa utilizando ambas as construções, contendo ou não a cauda de 6xHis, observando-se uma banda de massa molecular correspondente ao valor teórico esperado de 40,3 kDa. A proteína Hem foi expressa apenas utilizando a construção contendo a cauda de 6xHis, observando-se uma banda de massa molecular correspondente ao valor teórico esperado de 47,7 kDa (Fig. 16). Apesar de ser possível a expressão *in vitro* utilizando DNA linear como molde, eliminando-se assim todas as etapas de clonagem e encurtando o processo de expressão, não obtivemos sucesso nas tentativas de expressão com ambos os genes, contendo ou não a cauda de 6xHis, através desta metodologia (Fig. 16).

Duas bandas de massa molecular de aproximadamente 17 kDa foram observadas em todas as reações de transcrição-tradução com os diferentes moldes de DNA testados, inclusive quando não foi utilizado DNA molde na reação. Estas bandas correspondem a proteínas endógenas sintetizadas pelo *TNT® SP6 High-Yield Wheat Germ Protein Expression System* que incorporam os resíduos de lisina fluorescente durante a reação de transcrição-tradução. Não foram observadas bandas quando a reação foi realizada na ausência de DNA molde e *FluoroTect™ Green_{Lys}*, indicando não haver moléculas autofluorescentes no extrato de germe de trigo (Fig. 16).

A expressão *in vitro* da proteína recombinante MjE contendo a cauda de 6xHis foi verificada por *Western-blotting* utilizando anticorpo anti-Histidina. O reconhecimento da banda de massa molecular de 40,3 kDa correspondente ao valor teórico esperado para MjE em fusão com 6xHis demonstrou ser uma forma viável de verificação da correta expressão de proteínas recombinantes em fusão com 6xHis *in vitro* quando não for utilizada lisina marcada com fluorescência (Fig. 17).

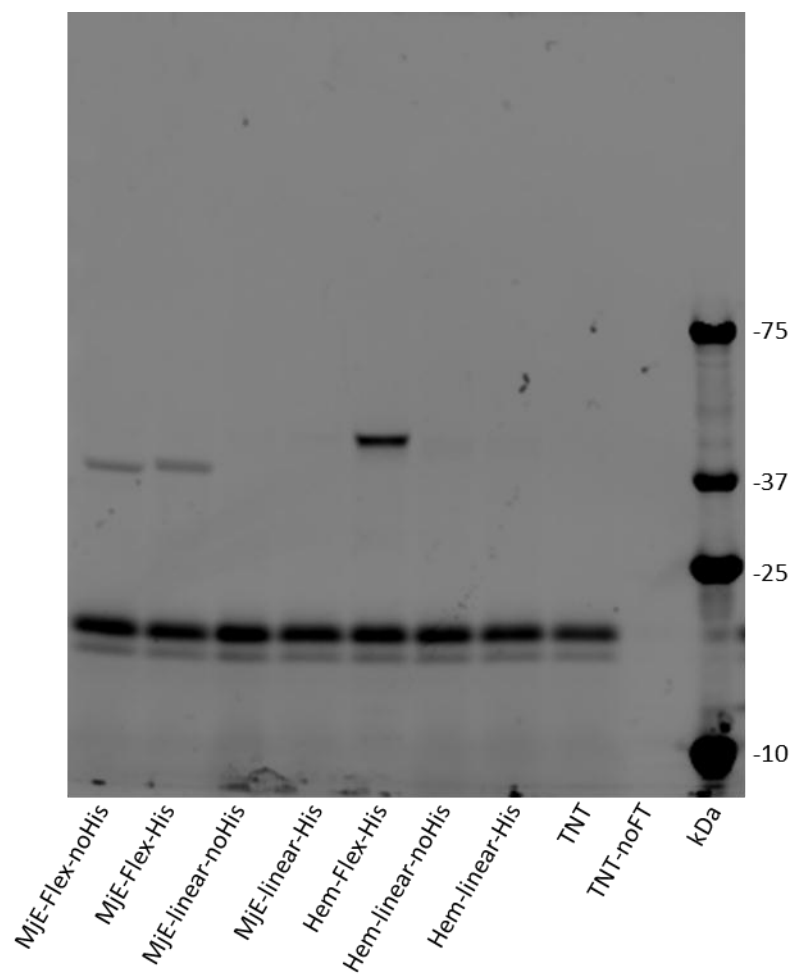


Figura 16: Expressão *in vitro* em sistema livre de células com lisado de germe de trigo das proteínas de *Schistosoma mansoni* Major Egg Antigen e Hemoglobinase. As proteínas Major Egg Antigen (MjE) e precursor de Hemoglobinase (Hem) foram expressas *in vitro* utilizando como molde: DNA linear (linear) ou DNA circular em vetor *Flexi-vector* (Flex), ambos contendo (His) ou não (noHis) cauda de 6xHis. As proteínas marcadas por *FluoroTectTM Green_{Lys}* foram analisadas em SDS-PAGE 4-20% e a imagem foi obtida por fluorescência em escaner LAS-4000. Controle negativo da expressão sem DNA contendo *FluoroTectTM Green_{Lys}* (TNT) e controle negativo da expressão sem DNA e sem *FluoroTectTM Green_{Lys}* (TNT-noFT). Padrão de massa molecular *Precision Plus Protein Kaleidoscope* em kDa.

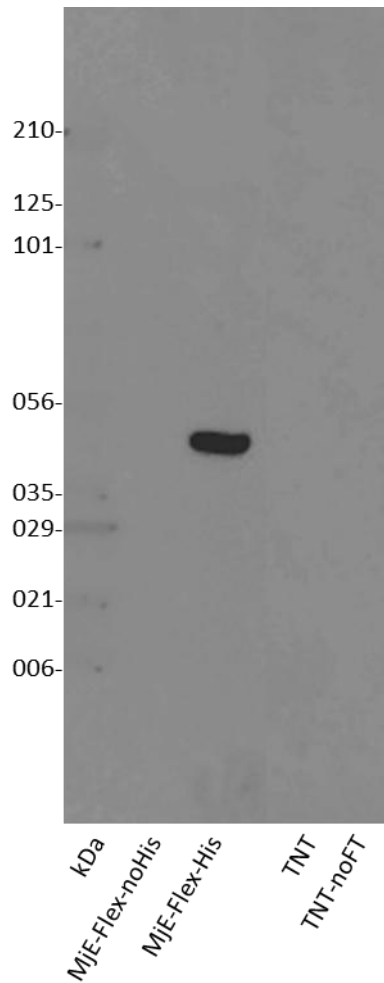


Figura 17: Western-blot da proteína recombinante de *Schistosoma mansoni* Major Egg Antigen utilizando anticorpo anti-Histidina. Produto da reação da expressão em TNT® SP6 High-Yield Wheat Germ Protein Expression System da proteína Major Egg Antigen (MjE) utilizando como molde a sequência codificadora de MjE inserida no vetor *Flexi-vector* (Flex), contendo (His) ou não (noHis) cauda de 6xHis, foi separado em SDS-PAGE 4-20% e as proteínas imobilizadas em membrana de nitrocelulose. A membrana foi incubada com anticorpo anti-His de camundongo seguida de incubação com anti-IgG de camundongo conjugado a HRP. Controle negativo da expressão sem DNA contendo *FluoroTect*TM *Green*_{Lys} (TNT) e controle negativo da expressão sem DNA e sem *FluoroTect*TM *Green*_{Lys} (TNT-noFT). Padrão de massa molecular *Prestained* (BioRad) em kDa.

A proteína recombinante MjE expressa *in vitro* contendo a cauda de 6xHis foi submetida à purificação em *batch* utilizando resina de níquel. A proteína foi eluída em uma solução contendo 250 mM Imidazole, eliminando a maior parte das proteínas do extrato proteico de germe de trigo no qual a proteína é expressa. Embora a proteína tenha sido purificada com sucesso, ocorreu uma perda significativa após a eluição. Devido ao seu baixo nível de expressão e o baixo rendimento da purificação, a banda correspondente a MjE não pôde ser visualizada no gel corado por Azul de Coomassie Colloidal, mas apenas pela fluorescência dos resíduos de lisina incorporados (Fig. 18).

5.8 Perfil de imunogenicidade das proteínas recombinantes *Major Egg Antigen* e Hemoglobinase

O caráter imunogênico das proteínas recombinantes Hem e MjE expressas *in vitro* frente aos *pools* de soro INF, NE e NI-UK foi analisado por *Western-blotting*. As proteínas expressas *in vitro* mantiveram-se reativas aos *pools* de soro INF e NE utilizados nos experimentos de 2D-WB, confirmando a correta identificação do *spot* imunogênico e que a proteína recombinante expressa *in vitro* manteve os epítomos imunogênicos presentes na proteína nativa (Fig. 19).

Nos experimentos de *Western-blotting* a proteína recombinante MjE continuou sendo reconhecida fortemente pelo *pool* de soro INF, embora fracamente pelo *pool* de soro NE. A proteína recombinante Hem foi fortemente reconhecida por ambos os *pools* de soro INF e NE. No entanto, uma maior intensidade de sinal foi observada com o *pool* de soro INF. Ambas as proteínas recombinantes não foram reconhecidas pelo *pool* de soro NI-UK (Fig. 19).

Interessantemente, o *pool* de soro NI-UK reconheceu uma banda correspondente a uma proteína de massa molecular mais alta, proveniente do extrato proteico do germe de trigo utilizado para a expressão *in vitro* das proteínas, uma vez que, mesmo na canaleta onde foi aplicado o produto da reação negativa, sem DNA molde, esta banda foi reconhecida. Este mesmo perfil de reconhecimento foi também observado quando o *pool* de soro dos indivíduos não infectados dos Estados Unidos (NI) foi utilizado (dado não mostrado). Esta mesma banda não foi reconhecida por nenhum dos *pools* de soro de indivíduos provenientes da área endêmica INF e NE (Fig. 19).

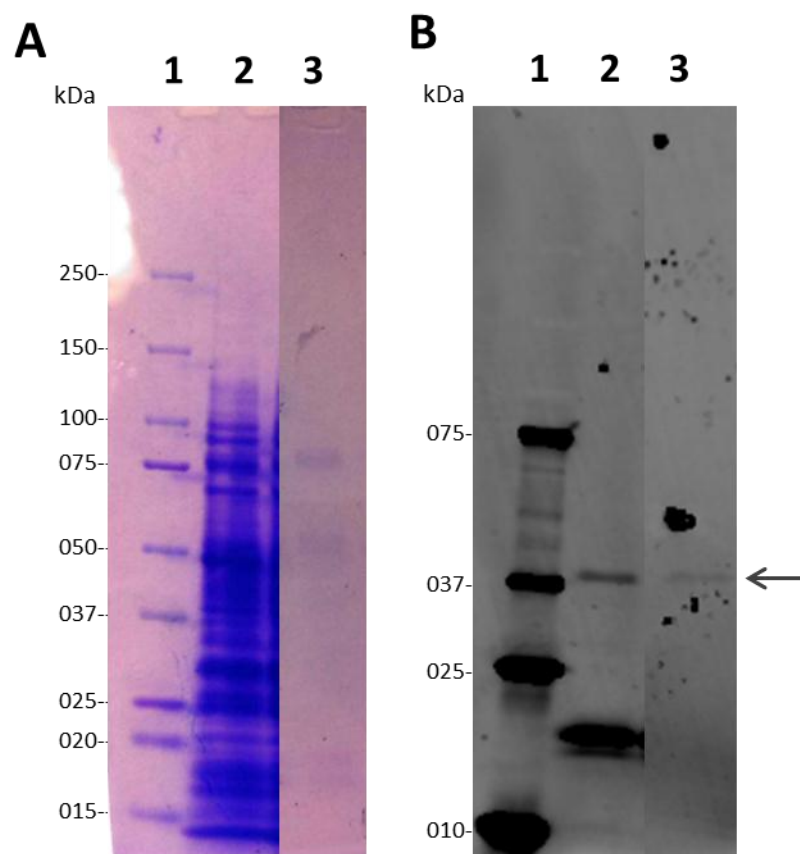


Figura 18: Purificação da proteína recombinante de *Schistosoma mansoni* Major Egg Antigen em fusão com 6xHis. O produto da reação da expressão *in vitro* da proteína Major Egg Antigen contendo cauda de 6xHis utilizando como molde a região codificadora de MjE inserida em vetor *Flexi-vector* no *TNT® SP6 High-Yield Wheat Germ Protein Expression System* foi submetido a purificação em resina de níquel. 1- Padrão de massa molecular *Precision Plus Protein Kaleidoscope* em kDa, 2- Produto da reação da expressão não purificado, 3- Produto da reação da expressão submetido a purificação em resina de níquel. As amostras foram separadas por SDS-PAGE 4-20% e o gel foi corado por Azul de Coomassie Colloidal (A) ou visualizado por fluorescência em escaner LAS-4000 (B). A banda correspondente a MjE purificada está indicada pela seta.

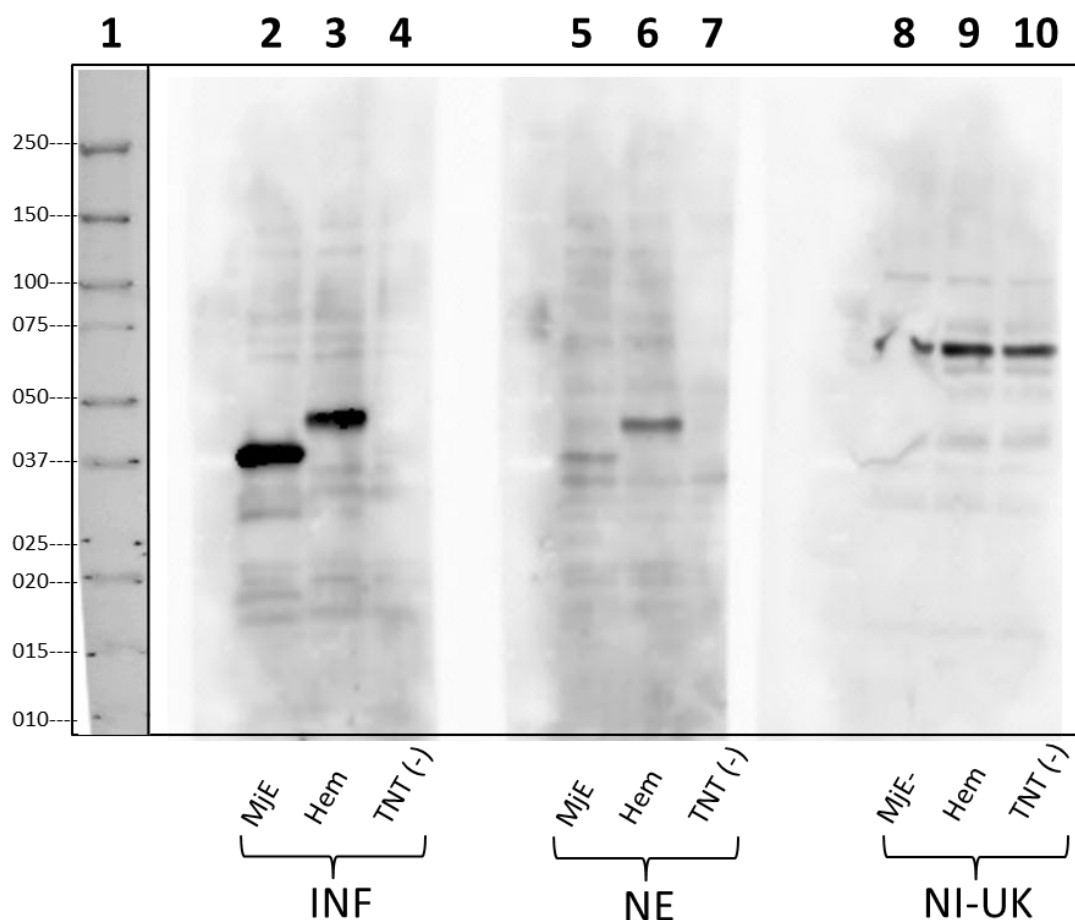


Figura 19: Western-blot das proteínas recombinantes de *Schistosoma mansoni* Major Egg Antigen e Hemoglobinase expressas *in vitro*. Os produtos da reação da expressão em TNT® SP6 High-Yield Wheat Germ Protein Expression System da proteína Major Egg Antigen (MjE) (2, 5, 8) e do precursor da Hemoglobinase (Hem) (3, 6, 9) foram separados em SDS-PAGE 4-20%, assim como o produto da reação negativa sem DNA molde (TNT (-)) (4, 7, 10). As proteínas foram imobilizadas em membrana de nitrocelulose as quais foram incubadas com *pool* de soro INF (2, 3, 4), NE (5, 6, 7) e NI-UK (8, 9, 10). Anti-IgG humana de coelho e anti-IgG de coelho conjugada a HRP foram utilizadas como anticorpos secundário e terciário, respectivamente. As membranas foram reveladas por modo de quimioluminescência e o sinal foi detectado em escaner LAS-4000. Padrão de massa molecular *Precision Plus Protein Kaleidoscope* em kDa na linha 1.

5.9 Expressão *in vitro* das demais proteínas selecionadas nos experimentos de 2D-WB

As demais proteínas identificadas nos experimentos de 2D-WB foram expressas *in vitro* pelo sistema *TNT® SP6 High-Yield Wheat Germ Protein Expression System*, utilizando a região codificadora dos respectivos genes inserida no vetor *Flexi-vector* como molde para a expressão, segundo a metodologia previamente otimizada. Outras 40 proteínas foram selecionadas para serem expressas, totalizando 42 proteínas quando incluídas as proteínas MjE e Hem já previamente expressas (Tab. 7).

A amplificação da região codificadora dos genes correspondentes às proteínas selecionadas pelo 2D-WB foi altamente eficiente correspondendo a 39 genes amplificados com sucesso do total de 42 proteínas selecionadas (93%). A etapa de transformação de bactérias com o vetor contendo as diferentes construções de DNA também alcançou altos índices de sucesso (90%) após a inclusão de uma etapa final de inativação da T4 DNA ligase a 65°C por 5 min, obtendo-se pelo menos um clone para 38 das 42 proteínas selecionadas. Após sequenciamento foi comprovado que 31 construções de DNA apresentaram-se sem introdução de códon de parada ou mudança de janela aberta de leitura até o final da região codificadora (73% de sucesso). Um total de 27 proteínas de *S. mansoni* foram expressas pelo sistema *in vitro* livre de células, como as indicadas pelas estrelas vermelhas e azuis na Figura 20, obtendo um sucesso na etapa de expressão de 64%. Mesmo com a confirmação da sequência das construções de DNA, 5 outras proteínas expressas apresentaram massa molecular diferente da massa molecular teórica, como as indicadas pelas estrelas verdes na Figura 20. Futuramente, as proteínas recombinantes serão utilizadas em experimentos de microarranjo de proteínas a fim de serem analisadas contra um painel maior de soros e diferentes classes de imunoglobulinas.

Tabela 7: Resumo experimental das proteínas identificadas pelo 2D-WB expressas *in vitro* em sistema TNT® SP6 High-Yield Wheat Germ Protein Expression System.

# Proteína	Proteína	Smp	DNA (pb)	Proteína (kDa)	PCR	Transformação	Sequenciamento	Expressão
3	14.3.3 zeta isoform	Smp_009760	759	28	+	+	+	+
4	14.3.3 epsilon isoform	Smp_034840.3	750	28	+	+	+	+
5	70,000 mol wt antigen	Smp_182190.2	1914	69	+	+		
6	Actin	Smp_046600	1131	41	+	+	+	+
7	Aldehyde dehydrogenase	Smp_050390	1476	53	+	+		+
8	Annexin	Smp_162170.2	1098	41	+	+	+	+
9	Arginase	Smp_059980	1995	39	+	+	+	
10	ATP synthase alpha subunit mitochondrial	Smp_002880.2	1644	59				
11	ATP synthase beta subunit	Smp_038100	1554	55	+	+	+	<
12	ATP: guanidino kinase (Smc74)	Smp_194770	2103	94	+	+		
13	Cathepsin B1 isotype 1	Smp_103610	1023	38	+	+		
15	Eukaryotic translation elongation factor	Smp_143140	591	21	>	+	contém o gene	2 bandas
17	Four and A half lim domains	Smp_048560	1631	64				
18	Fructose 16-biphosphate dehydrogenase	Smp_042160.2	1092	39	+	+		<
19	Gelsolin	Smp_008660.2	1002	38	+	+		
20	Glutathione S-transferase 28kDa	Smp_054160	636	23	+	+	+	+
21	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Smp_056970.1	1017	36	+			<
22	GST class mu; SM26/2 antigen	Smp_102070	657	93	+	+	+	+
26	Hydroxyacylglutathione hydrolase	Smp_091010	787	28	+	+	+	
34	L-lactate dehydrogenase	Smp_038960.1	999	35	+	+	+	+
37	Malate dehydrogenase	Smp_035270.2	990	31	+	+	+	>
38	Myosin regulatory light chain	Smp_132670	625	23	+	+	+	2 bandas
39	Ngng-dimethylarginine dimethylaminohydrolase	Smp_052560	448	16	+	+	+	+
40	Ornithine aminotransferase	gil156118907	1315	48	+	+	+	+
41	Phosphoglycerate kinase	Smp_018890 + Smp_187370	1270	44	+	+	+	+
43	Phosphoglycerate mutase	Smp_096760	753	28	+	+	+	+
44	Phosphopyruvate hydratase	Smp_024110	1327	46	+	+	+	<
45	Protein disulfide-isomerase er-60	Smp_079770	1477	54	+	+	+	+
46	Reticulocalbin (actin)	Smp_161920	1153	41	+	+	+	+
47	Reticulocalbin	Smp_147680	991	38	+	+	+	2 bandas
48	Short-chain dehydrogenase	Smp_081430	788	28				
49	Sm14 fatty acid-binding protein isoform T20	Smp_095360.3	424	14	+	+	+	+
50	Sm21.7	Smp_086480	577	21	+	+		
51	Superoxide dismutase [mn]	Smp_056440	676	24	+	+	+	+
52	Transketolase	Smp_059790.2	1897	67	+	+	+	+
54	Triosephosphate isomerase	Smp_003990	784	28	+	+	+	+
55	Troponin I (<i>S. japonicum</i>)	gil226481381	568	22	+	+	+	+
56	Troponin T	Smp_179810	970	37	+	+	+	+
57	Tubulin subunit alpha	Smp_016780	1378	50	+	+	+	+
58	<i>Schistosoma mansoni</i> , expressed protein	Smp_171780	769	28	+	+	+	+

PCR (>): Região codificadora amplificada com peso molecular maior que o teórico esperado. Sequenciamento (contém o gene): a região codificadora esperada estava contida dentro de uma sequência maior amplificada. Expressão (<): proteína expressa com massa molecular menor que a teórica esperada. Expressão (>): proteína expressa com massa molecular maior que a teórica esperada. Expressão (2 bandas): duas bandas proteicas foram visualizadas após a expressão.

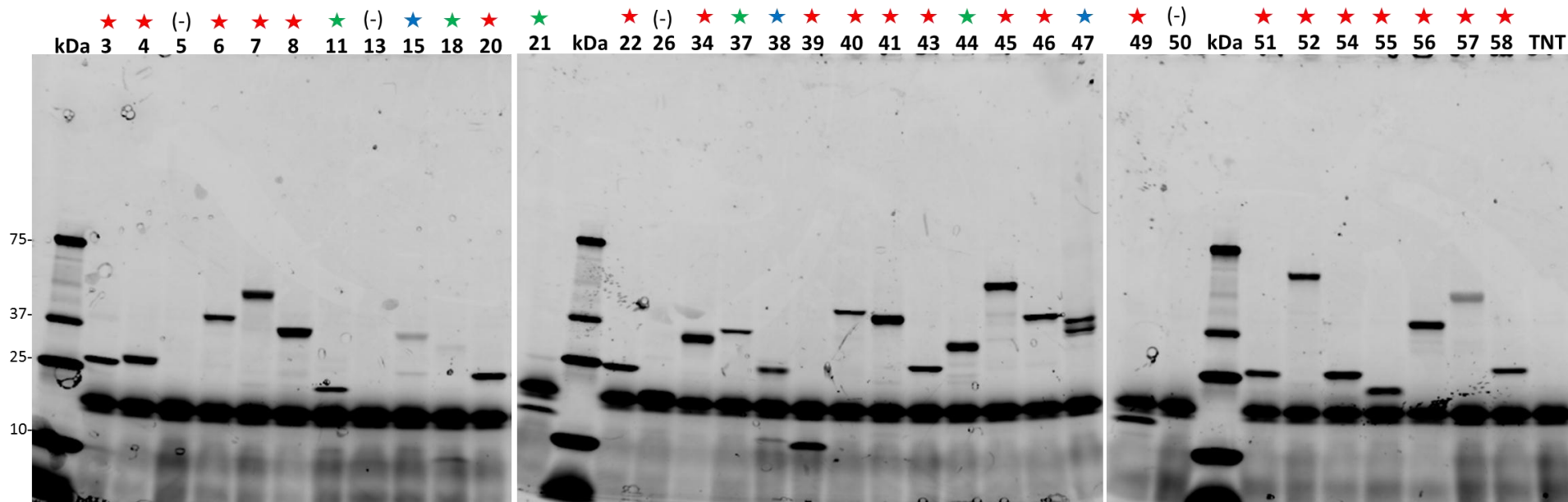


Figura 20: Expressão no sistema *in vitro* livre de células das proteínas recombinantes identificadas pelo 2D-WB. As proteínas expressas no TNT® SP6 High-Yield Wheat Germ Protein Expression System marcadas por FluoroTect™ Green_{Lys} foram analisadas em SDS-PAGE 4-20% e a imagem foi obtida por fluorescência em escaner LAS-4000. Os números na parte superior do gel correspondem às proteínas listadas na Tabela 7. TNT- controle negativo da reação sem DNA molde. As canaletas indicadas por estrelas vermelhas correspondem a proteínas expressas na sua massa molecular teórica aproximada. As canaletas indicadas por estrelas azuis correspondem a proteínas expressas na sua massa molecular aproximada, no entanto, foi observada mais de uma banda com massa molecular diferente à esperada. As canaletas indicadas por estrelas verdes correspondem a proteínas expressas com massa molecular diferente da esperada. As canaletas indicadas por (-) correspondem a proteínas não expressas. Padrão de massa molecular Precision Plus Protein Kaleidoscope em kDa.

6 Discussão

O *Schistosoma mansoni* pode sobreviver por décadas no sistema porta hepático do hospedeiro vertebrado, o que significa que os antígenos do parasito são constantemente expostos ao sistema imunológico do hospedeiro, o qual produz anticorpos contra alguns antígenos específicos. Neste estudo, buscamos explorar uma abordagem proteômica para a triagem de antígenos do parasito que são reconhecidos por anticorpos presentes no soro de indivíduos de área endêmica para a esquistossomose. Uma lista significativa de antígenos do parasito foi obtida, permitindo a identificação de antígenos associados ao perfil de infecção ou resistência a doença.

Alguns estudos de proteoma sorológico de schistossomas já foram realizados. No entanto, este é o primeiro estudo realizado com o parasito *S. mansoni* utilizando soros humanos, incluindo soro de indivíduos de área endêmica resistentes e suscetíveis à infecção, permitindo assim uma triagem mais racional para a descoberta de novos antígenos biomarcadores, seja para o desenvolvimento de uma vacina ou de uma novo teste de diagnóstico para a esquistossomose. Embora a utilização de soro de modelos animais tenha sido muito empregada na busca de candidatos à vacina contra a esquistossomose, esta metodologia pode ter mascarado os antígenos de interesse, uma vez que os resultados obtidos com soro de animais não são transponíveis diretamente para os seres humanos (Driguez *et al.*, 2010). Além disso, estudos semelhantes realizados com *S. haematobium* não podem ser correlacionados com *S. mansoni*, já que existe uma significativa variabilidade na resposta imune aos antígenos de extrato proteico bruto de ambos os parasitos (Mutapi, 2001 e Agnew *et al.*, 1993). Recente sequenciamento dos genomas de diferentes espécies de schistossomas mostrou haver 92% de identidade na sequência de nucleotídeos entre *S. haematobium* e *S. mansoni*, 86% entre *S. haematobium* e *S. japonicum* e 86% entre *S. mansoni* e *S. japonicum* (Young *et al.*, 2012), sendo a variabilidade genética inter e intra-específica relatada como um dos fatores responsáveis pela diferente infectividade, patologia e imunogenicidade induzida pelos diferentes schistossomas (McManus & Hope, 1993).

No presente estudo nós identificamos 47 diferentes proteínas antigênicas, um número ligeiramente maior comparado aos estudos de proteoma sorológico previamente realizados. Este resultado pode ser atribuído à utilização de diferentes extratos proteicos e de fitas de IPG de diferentes faixas de pH e à realização de triplicatas de cada experimento. Ainda que os estudos de proteoma sorológico tenham sido realizados utilizando extratos proteicos de outras espécies de schistossomas e outras fontes de soro, algumas proteínas bem conhecidas foram comumente identificadas neste trabalho: *Heat shock protein-70*, Enolase, Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase, Triose Fosfato Isomerase, Frutose-bifosfato Aldolase, Glutathiona S-transferase-28, proteína 14-3-3 (Mutapi *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2010 e Boukli *et al.*, 2011).

Visto que os mecanismos de imunidade em seres humanos contra a infecção por *S. mansoni* ainda não estão claramente definidos e a fim de detectarmos quaisquer proteínas imunogênicas aos anticorpos presentes nas amostras de soro utilizadas, independente do isotipo de imunoglobulina, nós utilizamos neste trabalho anticorpo anti-Ig total humana. Mutapi e colaboradores (2011) mostraram que existem diferenças qualitativas e quantitativas no perfil de reconhecimento de proteínas do *S. haematobium* pelos isotipos humanos IgA, IgE, IgG1 e IgG4, embora a maioria dos antígenos de verme adulto tenham sido reconhecidos por todos os isotipos avaliados. Uma vez que altos níveis de IgG1 e IgG3 foram correlacionados ao perfil de resistência em estudos com antígenos candidatos a vacina para a esquistossomose (Al-Sherbiny *et al.*, 1990 e Cardoso *et al.*, 2006), nós utilizamos também anti-IgG1 e anti-IgG3 humano na nossa triagem sorológica. No entanto, não foi possível observar qualquer diferença evidente entre o padrão de reconhecimento de proteínas do extrato proteico AW-TOT por estas subclasses de imunoglobulinas presentes nos *pools* de soro INF, NE e NI. Apenas as proteínas imunogênicas identificadas nas triplicatas experimentais utilizando anti-Ig total humana foram selecionadas para identificação por espectrometria de massas. O perfil de reconhecimento antigênico obtido por anti-Ig total, anti-IgG1 e anti-IgG3 do *pool* de soro INF foi também muito semelhante. No entanto, a caracterização detalhada e comparativa entre os perfis de reconhecimento encontrados utilizando anti-Ig total, anti-IgG1 e anti-IgG3 não foi realizada neste momento.

Extrato proteico de tegumento de verme adulto de *S. mansoni* foi usado para enriquecer nossa análise com proteínas expostas ao sistema imunológico do hospedeiro. Embora a maioria das proteínas tenha sido identificada em ambos os extratos proteicos, AW-TOT e AW-TEG, ainda assim foram identificadas algumas proteínas antigênicas diferentes entre os extratos. Van Balkon e colaboradores (2005), através de SDS-PAGE unidimensional seguido de LC-MS/MS, identificaram 429 proteínas, das quais apenas 43 proteínas foram identificadas especificamente no tegumento. Todas as proteínas do tegumento identificadas no nosso trabalho fazem parte da composição de proteínas do tegumento do *S. mansoni* descrita por Van Balkon e colaboradores (2005). Mesmo utilizando um tampão contendo detergente para solubilizar proteínas integrais de membrana do extrato proteico AW-TEG para serem analisadas por 2-DE, como indicado por Babu e colaboradores (2004), nós não identificamos nenhuma proteína com domínio transmembrana, de acordo com as informações contidas no banco de dados do SchistoDB (Zerlotini *et al.*, 2009). As proteínas de membrana, além de pouco abundantes, são altamente hidrofóbicas apresentando baixa solubilidade nas soluções utilizadas para a focalização isoeletrica contendo detergentes não iônicos ou *zwitterionic*. Uma vez solubilizadas e submetidas à focalização isoeletrica, as proteínas de membrana não

são facilmente transferidas das fitas de IPG para o SDS-PAGE, onde ocorre a sua separação pela segunda dimensão (Gorg *et al.*, 2009). Apesar de extensiva pesquisa, a análise de proteínas de membrana por 2-DE continua uma tarefa difícil (Rabilloud, 2009). No entanto, outras metodologias de identificação de proteínas de membrana poderão ainda ser empregadas, baseando-se principalmente na utilização de um extrato proteico enriquecido em proteínas de membrana de tegumento, a fim de tornar estas proteínas mais abundantes, e na utilização de outros detergentes que melhor solubilizem estas proteínas.

O pool de soro de voluntários não infectados provenientes de área não endêmica para a esquistossomose reagiu com alguns *spots* proteicos de AW-TOT e AW-TEG. Reação cruzada entre *S. mansoni* e outras espécies de schistossomas e outros trematódeos tem sido descrita na literatura (Higon *et al.*, 2011; Boukli *et al.*, 2011 e Zhong *et al.*, 2010). A exemplo, antígenos de *Fasciola hepatica* foram imunogênicos ao soro de pacientes infectados por esquistossomose crônica (Boukli *et al.*, 2011), e antígenos de *S. haematobium* e *E. caproni* foram imunogênicos ao soro de hamsters infectados por estes parasitos em *blots* heterólogos, nos quais proteínas de *S. haematobium* foram reativas ao soro de hamsters infectados por *E. caproni* e vice-versa (Higon *et al.*, 2011). Além disso, antígenos de *E. coli* e *Saccharomyces boulardii* também induzem reatividade cruzada com antígenos de *S. mansoni* (Bahgat *et al.*, 2009 e 2005). Ainda assim no presente trabalho, alguns *spots* proteicos específicos de *S. mansoni* foram detectados apenas quando os soros INF e NE foram utilizados. A diluição dos soros poderia ter sido otimizada, no entanto, alguns potenciais biomarcadores estariam abaixo do limite de detecção do ensaio de 2D-WB. Apesar da extensa reatividade cruzada entre antígenos de parasitos e microorganismos, alguns antígenos apresentam uma resposta imune específica, sendo estes de grande interesse para o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos e vacinas.

Embora a maioria dos *spots* imunogênicos tenham sido visualizados no 2D-PAGE correspondente, existem alguns *spots* fortemente imunogênicos, mas fracamente visíveis ou até mesmo não visíveis no 2D-PAGE corado por Azul de Coomassie Coloidal. A nossa análise foi conduzida utilizando apenas extratos proteicos de verme adulto. Entretanto, o perfil de expressão de proteínas varia durante as diferentes fases de desenvolvimento do parasito. A proteína *Major Egg Antigen* mostrou ser altamente imunogênica ao soro de indivíduos infectados no experimento de 2D-WB, apesar de ser pouco expressa nos extratos proteicos de verme adulto. Comparando o proteoma de *S. mansoni* entre os estágios do ciclo de vida, Curwen e colaboradores (2004) descreveram a proteína *Major Egg Antigen* como uma das 40 proteínas mais expressas em extrato solúvel de ovo (SEA). Portanto, a alta

imunogenicidade da proteína *Major Egg Antigen* é devida, provavelmente, à resposta do sistema imunológico do hospedeiro a esta proteína altamente expressa nos ovos do parasito.

Como mencionado por Wilson e Coulson (2009), existe um consenso de que uma única “proteína mágica” pode não ser um alvo suficientemente eficaz para o desenvolvimento de uma vacina para a esquistossomose. É então sugerido um coquetel de antígenos como meio de induzir proteção. No atual estudo propomos, pela primeira vez, um painel de proteínas imunogênicas potencialmente capazes de distinguir indivíduos infectados de não infectados. As proteínas foram clusterizadas segundo um perfil de imunogenicidade distinto encontrado para os soros de indivíduos infectados e não infectados de área endêmica e não infectados de área não endêmica em três experimentos de 2D-WB. Este painel foi obtido principalmente por termos sido capazes de separar grupos de proteínas com padrão distinto de imunogenicidade aos soros de indivíduos infectados ou de não infectados de área endêmica, as quais reagiram apenas a um dos soros. Estas proteínas poderiam ser usadas como um mistura de antígenos alvos para uma vacina eficaz ou para um novo teste diagnóstico para a esquistossomose.

As proteínas *Major Egg Antigen*, Anexina, Troponina T, Filamina, precursor da proteína Dissulfeto-Isomerase ER-60, Actina e Reticulocalbina reagiram exclusivamente com anticorpos séricos dos indivíduos infectados, podendo ser indicadas como possíveis candidatos para um novo método de diagnóstico.

A proteína *Major Egg Antigen*, ou Smp40, foi descrita como altamente antigênica em seres humanos (Cao *et al.*, 1993). O perfil de citocinas obtidos de PBMC (células mononucleadas do sangue periférico) de pacientes infectados por *S. mansoni* e estimuladas com Smp40 purificada foi associado à redução da formação do granuloma e a uma vacina anti-patológica (Abouel-Nour *et al.*, 2006). No entanto, a Smp40 não foi ainda associada ao diagnóstico para a esquistossomose.

A proteína Filamina atua como um conector de dois filamentos de actina e está também envolvida nos processos de transdução de sinal e transcrição (Stossel *et al.*, 2001 e Feng & Walsh, 2004). A fim de selecionar candidatos a vacina para *S. mansoni*, a Filamina foi identificada através de uma triagem imunológica de biblioteca de cDNA de cercária utilizando IgG de coelho infectado por vermes fêmeas imaturas. Um anticorpo policlonal específico para a proteína recombinante Filamina de *S. mansoni* detectou uma fluorescência associada ao tegumento em vermes adultos e reconheceu principalmente uma banda de 84 kDa, diferentemente da massa molecular de 280 kDa esperada com base na sequência de mRNA correspondente (Mohamed *et al.*, 2008). O *spot* proteico correspondente à proteína Filamina, identificado no atual trabalho, foi localizado em uma região correspondente a uma massa molecular aproximada de 80 kDa utilizando o extrato proteico do tegumento de verme

adulto de *S. mansoni*, portanto esta deve corresponder à proteína Filamina madura. IgG específica para a Filamina recombinante resultou em 36,6% de morte de esquistossômulos em um ensaio de mortalidade *in vitro*, enquanto experimento de imunização por vacina de DNA com o respectivo gene induziu uma média de 50% de proteção em camundongos após desafio com vermes adultos transferidos cirurgicamente (Mohamed *et al.*, 2008 e Cook *et al.*, 2004).

A proteína Troponina T é uma das três subunidades proteicas do complexo Troponina. Juntamente com as Troponinas C e I, medeiam a regulação dos íons Ca^{2+} no processo de contração do músculo estriado (Wei & Jin, 2011). A Troponina T já foi indicada como uma possível proteína candidata ao teste diagnóstico para *Taenia solium*. No entanto, ensaios de ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*) utilizando *pools* de soro de pacientes positivos e negativos para cisticercose demonstraram resultados desapontadores (Mayta *et al.*, 2009). Troponina T foi também identificada por análises proteômicas em uma fração de proteínas de verme adulto de *S. mansoni* livre de proteínas do tegumento (van Balkon *et al.*, 2005), apoiando o nosso resultado no qual a proteína foi identificada apenas no extrato proteico total e não no extrato proteico de tegumento.

A proteína Reticulocalbina é um dos membros da família das proteínas ligadoras de Ca^{2+} . Está localizada no lúmen no retículo endoplasmático, fazendo parte da via secretória de células de mamíferos. Reticulocalbina pode desempenhar um papel no comportamento normal das células, no entanto, a sua função detalhada permanece desconhecida. A superexpressão de Reticulocalbina pode exercer um papel na tumorigênese, na invasão tumoral e na resistência a drogas (Fukuda *et al.*, 2007). Não existem estudos que envolvam esta proteína em schistosomas.

A resposta inflamatória é controlada pela ação de mediadores anti-inflamatórios que atuam para manter a homeostasia da resposta imunológica e prevenir uma lesão tecidual. Entre esses mediadores destaca-se a proteína Anexina 1, o primeiro membro descrito de uma família de proteínas ligantes de fosfolipídios de membrana dependentes de cálcio (Gil *et al.*, 2006). Experimentos de imunolocalização e análise de proteoma utilizando preparações de extrato proteico de membranas do tegumento confirmaram a presença de Anexina no tegumento do esquistossômulo e de verme adulto de *S. mansoni* (Tararam *et al.*, 2010 e Braschi *et al.*, 2006). No atual estudo, a anexina foi novamente identificada exclusivamente no extrato proteico de tegumento. A proteína Anexina recombinante de *S. bovis* mostrou-se biologicamente ativa *in vitro*, com propriedades fibrinolíticas e anticoagulantes (Escudeiro *et al.*, 2011).

O sistema excretório dos schistosomas tem recebido grande atenção uma vez que existem evidências sobre o seu importante papel na interação parasito-hospedeiro. A cisteína

protease ER-60 de *S. mansoni* é um dos quatro membros da família de proteínas Dissulfeto Isomerase, cuja expressão foi demonstrada nos órgãos excretórios de vermes adultos e larvas, sugerindo uma função para ER-60 na interação parasito-hospedeiro (Wippersteg *et al.*, 2002 e 2003). No atual estudo, o precursor da proteína Dissulfeto isomerase ER-60 foi reconhecido pelo soro INF no extrato proteico de tegumento.

A proteína Fator Eucariótico de Elongamento da Tradução foi identificada neste estudo como um *spot* do extrato proteico de tegumento, AW-TEG, o qual reagiu exclusivamente ao *pool* de soro de indivíduos não infectados de área endêmica, podendo ser indicada como possível alvo vacinal. No 2D-PAGE corado por Azul de Coomassie Colloidal a região correspondente a este *spot* foi fracamente corada, indicando portanto, que esta é uma proteína pouco expressa no tegumento de verme adulto. Sendo assim, o *spot* foi excisado do gel baseado na sobreposição com o filme de raios-X. A fim de contornar este problema inerente à técnica e para confirmar seu potencial uso como antígeno vacinal, estudos adicionais devem ser realizados. Uma proteína na forma recombinante poderá ser expressa a fim de confirmar o seu perfil de reconhecimento aos diferentes soros utilizados, assim como foi realizado para a proteína *Major Egg Antigen*, cujo *spot* foi também fracamente corado no 2D-PAGE. Nos experimentos de 2D-WB, o *spot* correspondente a proteína *Major Egg Antigen* foi fortemente reconhecido pelo *pool* de soro INF e não foi visualizado quando utilizado *pool* de soro NE, enquanto a proteína recombinante *Major Egg Antigen* de *S. mansoni* expressa *in vitro* continuou sendo fortemente reconhecida pelo *pool* de soro INF, mas fracamente reconhecida pelo *pool* de soro NE, mantendo assim um perfil semelhante de reconhecimento ao da proteína nativa e indicando a excisão correta do *spot*. Anti-IgG humana foi utilizada nos experimentos de *Western-blotting*, indicando que a *Major Egg Antigen* é reconhecida por alguma subclasse de IgG. Entretanto, no experimento de 2D-WB utilizando anticorpo secundário anti-IgG1 e anti-IgG3 humanos, os *spots* correspondentes a *Major Egg Antigen* não reagiram com o *pool* de soro dos indivíduos INF, indicando que a sua reatividade não é mediada por IgG1 ou IgG3. A imunogenicidade da proteína *Major Egg Antigen* contra amostras de soro coletadas após tratamento também poderá ser futuramente avaliada com o objetivo de utilizar esta proteína no monitoramento da cura da esquistosomose, especialmente na população da área endêmica. A alta taxa de infecção permanece nas áreas endêmicas, mesmo após tratamento, sendo o acompanhamento de cura um problema que pode ser solucionado através de um diagnóstico adequado capaz de acompanhar o estágio da doença.

A proteína Hemoglobina de *S. mansoni* também foi expressa *in vitro* no sistema de expressão livre de células em lisado de germe de trigo para verificar o perfil de reconhecimento da proteína recombinante pelos diferentes soros utilizados. No presente

trabalho, enquanto a Hemoglobina foi imunogênica a todos os *pools* de soro no 2D-WB inclusive ao soro NI, a proteína recombinante foi reconhecida apenas pelos *pools* de soro de indivíduos de área endêmica, INF e NE, mas não ao *pool* de soro NI. Isto pode ser devido à utilização de anti-IgG humana no *Western-blotting*, e não de anti-Ig total humana que foi utilizada nos experimentos de 2D-WB, indicando uma reação específica de alguma outra classe de imunoglobulina presente nas amostras de soro NI utilizadas nos experimentos de 2D-WB. Portanto, a continuação deste estudo poderá ser realizada futuramente através de experimentos de microarranjo de proteínas.

Alguns estudos indicam que a resposta imune de animais e seres humanos infectados por parasitos pode ser diretamente contra epítomos de carboidratos de glicoconjugados (Nyame *et al.*, 2004 e Hokker & Deldeer, 2001). Embora a estrutura e função de carboidratos dos schistosomas venham sendo bem estudadas, existe uma carência de informação sobre em quais proteínas estes carboidratos estariam sendo carregados (Hokke & Yazdanbakhsh, 2005). No presente trabalho, a identificação de proteínas presentes no extrato proteico AW-TOT contendo uma porção de carboidrato foi realizada utilizando o corante *Pro-Q Emerald*, que se baseia no um método *periodate/Schiff's base* (PAS), e por *lectina-blotting* bidimensional utilizando diversas lectinas específicas (GNA, DSA, PNA, SNA e MAA) para a identificação das subclasses de carboidratos presentes nas proteínas do extrato proteico total de verme adulto de *S. mansoni*. A presença de glicoproteínas neste extrato proteico foi confirmada. Embora tenhamos identificado proteínas contendo algumas subclasses de carboidratos, ainda existem outros carboidratos previamente descritos para schistosomas que não foram analisados nesta abordagem. *Pro-Q Emerald* foi capaz de reconhecer vários *spots* proteicos. No entanto, apenas 9 das proteínas foram identificadas por MS/MS. A predição *in silico* por sítios de glicosilação do tipo N-glicosilação e O-glicosilação foi realizada, indicando a existência de potenciais sítios em cada uma das proteínas identificadas. As proteínas 14.3.3 (isoforma épsilon), Aldeído Desidrogenase, precursor da proteína Dissulfeto Isomerase ER-60, precursor da Hemoglobina e Fosfoglicerato Mutase foram comumente identificadas nos experimentos de *Pro-Q Emerald* e 2D-WB. Nenhuma das proteínas identificadas no atual estudo correspondeu às proteínas identificadas por Ramajo-Hernandez e colaboradores (2007). No seu trabalho foram caracterizadas glicoproteínas de vermes adultos de *S. bovis*, excretadas/secretadas e do tegumento, fazendo-se uso de diversas lectinas. Dentre as mesmas lectinas estudadas em seu trabalho, apenas GNA foi capaz de reconhecer proteínas contendo carboidratos, enquanto em nosso estudo as lectinas GNA, DSA e PNA reconheceram glicoproteínas presentes no extrato proteico AW-TOT, indicando também a presença de carboidratos do tipo Gal-GlcNAc, GlcNAc e Gal-GalNAc. Estes resultados podem ser

explicados devido a diferenças do conteúdo proteico presente nos extratos utilizados dos dois trabalhos. A lectina SNA e MAA foram também capazes de reconhecer, mesmo que fracamente, algumas glicoproteínas contendo ácido siálico, o que contradiz alguns relatos da literatura, que indicam a ausência de ácido siálico em schistosomas (Cumming & Nyame *et al.*, 1996). Os *spots* proteicos reconhecidos pelas lectinas não foram identificados por MS/MS devido a dificuldade em correlacioná-los aos *spots* do 2D-PAGE correspondente corado por Azul de Coomassie Colloidal.

Carboidratos de schistosomas podem ter um importante papel na indução e modulação do sistema imune do hospedeiro. A fim de determinar se a imunorreatividade dos soros utilizados nos experimentos de 2D-WB ao extrato proteico total de vermes adultos de *S. mansoni* era proveniente de epitopos proteicos ou de carboidratos, foi realizado um tratamento das proteínas do extrato AW-TOT, previamente separadas por 2-DE e imobilizadas em membranas de PVDF, com periodato/borohidreto. O tratamento com periodato é empregado para determinar a participação da porção glicídica na reatividade sorológica de glicoproteínas. A reação com o periodato elimina a reatividade imunológica do carboidrato sem alterar a estrutura da cadeia polipeptídica (Woodward *et al.*, 1985). Tratamento com periodato de antígenos de schistosomas foi capaz de abolir grande parte da resposta imunológica obtida pela vacinação com cercária irradiada (Hokke & Deldeer, 2001). No atual estudo, o perfil de reconhecimento de proteínas imobilizadas em membranas tratadas pelo periodato/borohidreto conferido pelo *pool* de soro de indivíduos infectados manteve-se semelhante ao perfil de reconhecimento de proteínas imobilizadas em membranas não tratadas. No entanto, nem todos os carboidratos são sensíveis ao tratamento com periodato (Woodward *et al.*, 1985), como observamos com as lectinas MAA e DSA que tiveram o reconhecimento mantido mesmo após o tratamento das membranas com periodato/borohidreto. Embora a lectina GNA tenha reconhecido *spots* na mesma faixa de pH e massa molecular nos experimentos de 2D-lectina-*blotting* e 2D-WB, sugere-se que os carboidratos reconhecidos por GNA não têm um importante papel no reconhecimento dos antígenos do extrato proteico AW-TOT pelos soros utilizados, uma vez que o tratamento com periodato/borohidreto foi eficiente para esta lectina e que nos experimentos de 2D-WB utilizando membranas tratadas e não tratadas o perfil de *spots* reconhecidos permaneceu similar. Embora o tratamento por periodato/borohidreto tenha mostrado não ser eficiente para as lectinas MAA e DSA, poucos *spots* na mesma faixa de pH e massa molecular foram reconhecidos nos experimentos de 2D-lectina-*blotting* e 2D-WB, sugerindo mais uma vez que carboidratos reconhecidos por MAA e DSA não têm um importante papel no reconhecimento dos antígenos do extrato proteico AW-TOT pelos soros utilizados.

Proteoma sorológico é uma metodologia complexa que apresenta várias etapas sujeitas a variações. Consequentemente, estas podem comprometer a reprodutibilidade dos experimentos de 2D-WB (Krah & Junblunt, 2004), fazendo com que alguns *spots* imunogênicos fossem perdidos nas triplicatas dos experimentos e entre os *immunoblots* com os diferentes soros. Além disto, comparar o padrão de *spots* imunogênicos encontrado no 2D-WB com o padrão de *spots* corados no 2D-PAGE usado para a excisão do *spots* para a análises de MS/MS, não é uma tarefa simples. Para encontrar o *spot* correspondente de forma inequívoca, levamos em conta a distribuição dos *spots* vizinhos ao *spot* de interesse. O mesmo procedimento foi também adotado ao fazer a correspondência entre os *spots* de diferentes *immunoblots*. Também deve ser considerado que os *spots* não representam proteínas, mas sim variantes de proteínas com modificações pós-traducionais, parcialmente degradadas ou variantes de *splicing*. Além disto, um único *spot* pode conter diferentes proteínas ou espécies proteicas (Krah & Junblunt, 2004). Apesar destas dificuldades, proteoma sorológico parece ser uma boa abordagem para analisar o perfil da resposta imune do hospedeiro aos antígenos do parasito em larga escala, indicando antígenos promissores para o desenvolvimento de novo método diagnóstico e vacina para a esquistossomose.

Microarranjo proteico é outra metodologia que tem sido recentemente empregada na identificação de biomarcadores de doenças, permitindo a análise simultânea da reatividade de centenas de proteínas às diferentes classes/subclasses de imunoglobulinas para cada um dos antígenos impressos no *chip* de microarranjo (Felgner *et al.*, 2009 e Gulmann *et al.*, 2006). As proteínas identificadas nos experimentos de 2D-WB conduzidos neste trabalho poderão, através da confecção de um microarranjo proteico, ter o seu perfil de imunogenicidade testado contra um maior painel de amostras de soro, analisando as diversas classes/subclasses de imunoglobulinas e, assim, refinando a lista de potenciais candidatos a vacina ou teste de diagnóstico. Um painel mais amplo de amostras de soro, contendo soros individuais de voluntários infectados e não infectados pela esquistossomose, de voluntários infectados por outras parasitoses e de voluntários tratados para a esquistossomose poderão fornecer informações importantes sobre o desenvolvimento da doença. Conhecer a resposta imune associada à proteção ou à infecção para a esquistossomose representará um grande passo no desenvolvimento de um teste diagnóstico funcional e de uma vacina efetiva, focando assim em um complexo de candidatos frente a uma resposta imunológica específica. O sistema de expressão *in vitro* livre de células permite uma redução significativa no tempo necessário para a expressão de proteínas recombinantes, sendo importante em experimentos em larga escala como os experimentos de microarranjo proteico. Grande parte das proteínas de *S. mansoni* identificadas nos experimentos de 2D-WB foram expressas *in vitro* com sucesso no sistema

livre de células utilizando lisado de germe de trigo e serão utilizadas nos experimentos de microarranjo. Uma vez refinado o perfil de imunogenicidade das proteínas identificadas nos experimentos de 2D-WB, serão então realizados ensaios de vacinação e ensaios de ELISA das proteínas selecionadas com potencial para o desenvolvimento de vacina ou teste diagnóstico, respectivamente. Ensaios de vacinação serão realizados utilizando proteína recombinante ou vacinação por DNA com a construção genética correspondente à proteína selecionada.

Uma vez que os estudos com a proteína recombinante *Major Egg Antigen*, correspondente a uma das proteínas identificadas nos experimentos de 2D-WB exclusivamente ao *pool* de soro INF, encontram-se em estágio mais avançado, já tendo sido realizado experimento confirmatório do perfil de imunogenicidade da proteína recombinante em ensaios de *Western-blotting*, daremos início aos ensaios de ELISA. Nestes experimentos será utilizado um painel mais amplo de amostras de soro, contendo soros individuais de voluntários infectados e não infectados pela esquistossomose, de voluntários infectados por outras parasitoses e de voluntários tratados para a esquistossomose.

7 Conclusões

- O protocolo empregado neste trabalho para extração de proteínas de diferentes fases de desenvolvimento do *S. mansoni* permitiu a obtenção de um perfil satisfatório de separação destas proteínas por eletroforese bidimensional;
- Um painel de proteínas capaz de distinguir o estado de suscetibilidade e resistência à esquistossomose foi determinado através da combinação de análises proteômicas e sorológicas:
 - as proteínas *Major Egg Antigen*, Anexina, Troponina T, Filamina, precursor da proteína Dissulfeto-Isomerase ER-60, Actina e Reticulocalbina podem ser indicadas como possíveis candidatos para um novo método de diagnóstico, uma vez que reagiram exclusivamente com anticorpos presentes nos soros dos indivíduos infectados;
 - a proteína Fator Eucariótico de Elongamento da Tradução pode constituir um novo alvo vacinal, uma vez que reagiu exclusivamente ao *pool* de soro de indivíduos não infectados de área endêmica;
- A porção glicídica de glicoproteínas do extrato proteico de verme adulto separadas por 2-DE parece não ter influência no reconhecimento obtido pelos soros INF, NE e NI;
- O sistema de expressão *in vitro*, livre de células, mostrou ser uma metodologia eficiente para a expressão de proteínas recombinantes de *S. mansoni*. As proteínas recombinantes, *Major Egg Antigen* e Hemoglobinase, mantiveram um perfil de reconhecimento pelos soros utilizados semelhante ao da proteína nativa.

8 Anexo

9 Referências Bibliográficas

Abdul-Ghani RA, Loutfy N & Hassan, A. Experimentally promising antischistosomal drugs: a review of some drug candidates not reaching the clinical use. *Parasitol. Res.* 2009; 105, 899-906.

Abouel-Nour M F, Lotfy M, Attallah AM & Doughty BL. Schistosoma mansoni major egg antigen Smp40: molecular modeling and potential immunoreactivity for anti-pathology vaccine development. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2006; 101:365-372.

Agnew A M, Murare HM & Doenhoff MJ. Immune Attrition of Adult Schistosomes. *Parasite Immunology.* 1993; 15:261-271.

Al-Sherbiny M, Osman A, Barakat R, El Morshedy H, Bergquist R & Olds R. In vitro cellular and humoral responses to Schistosoma mansoni vaccine candidate antigens. *Acta Trop.* 2003; 88(2):117-30.

Andrade ZA. Schistosomal hepatopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004; 99, 51-57.

Andrade ZA. Schistosomiasis and liver fibrosis. *Parasite Immunol.* 2009; 31, 656-663.

Andre FE. Vaccinology: past achievements, present roadblocks and future promises. *Vaccine.* 2003; 21, 593-595.

Babu GJ, Wheeler D, Alzate O & Periasamy M. Solubilization of membrane proteins for two-dimensional gel electrophoresis: identification of sarcoplasmic reticulum membrane proteins. *Anal Biochem.* 2004; 1;325(1).121-5.

Bahgat MM, Gaber HM & Maghraby AS (2009). Escherichia coli shares T- and B-lymphocyte epitopes with Schistosoma mansoni. *Journal of Infection in Developing Countries.* 2009; 3:206-217.

Bahgat M, Maghraby AS, Abdel-Fattah OM & Elshafei AM. Immunization of mice with crude extract of *Saccharomyces boulardii* yeast induces cross-reactive immune responses with antigenic preparations from different developmental stages of the *Schistosoma mansoni* and reduces the parasite worm burden. *J Egypt Soc Parasitol.* 2005; 35: 563-580.

Balloul JM, Grzych JM, Pierce RJ & Capron A. A purified 28,000 dalton protein from Schistosoma mansoni adult worms protects rats and mice against experimental schistosomiasis. *J Immunol.* 1987; 138(10):3448-53.

Bergquist R, Al-Sherbiny M, Barakat R & Olds R. Blueprint for schistosomiasis vaccine development. *Acta Trop.* 2002; 82, 183-192.

Bergquist R, Johansen MV & Utzinger J. Diagnostic dilemmas in helminthology: what tools to use and when?. *Trends Parasitol.* 2009; 25(4):151-6.

Berriman M, Haas BJ, LoVerde PT, Wilson RA, Dillon GP, Cerqueira GC, Mashiyama S T, Al-Lazikani B, Andrade LF, Ashton PD, Aslett MA, Bartholomeu DC, Blandin G, Caffrey CR, Coghlan A, Coulson R, Day TA, Delcher A, DeMarco R, Djikeng A, Eyre T, Gamble JA, Ghedin E, Gu Y, Hertz-Fowler C, Hirai H, Hirai Y, Houston R, Ivens A, Johnston DA, Lacerda D, Macedo CD, McVeigh P, Ning Z, Oliveira G, Overington JP, Parkhill J, Perteau M,

- Pierce RJ, Protasio AV, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Sajid M, Salzberg SL, Stanke M, Tivey AR, White O, Williams DL, Wortman J, Wu W, Zamanian M, Zerlotini A, Fraser-Liggett CM, Barrell BG & El-Sayed NM. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature*. 2009; 460, 352-358.
- Bethony JM, Simon G, Diemert DJ, Parenti D, Desrosiers A, Schuck S, Fujiwara R, Santiago H & Hotez PJ. Randomized, placebo-controlled, double-blind trial of the Na-ASP-2 hookworm vaccine in unexposed adults. *Vaccine*. 2008; 26, 2408-2417.
- Black CL, Mwinzi PN, Muok EM, Abudho B, Fitzsimmons CM, Dunne DW, Karanja DM, Secor WE & Colley DG. Influence of exposure history on the immunology and development of resistance to human Schistosomiasis mansoni. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010; 4(3).e637.
- Bloch EH. In vivo microscopy of schistosomiasis. II. Migration of *Schistosoma mansoni* in the lungs, liver, and intestine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1980; 29, 62-70.
- Boukli NM, Delgado B, Ricaurte M & Espino AM. Fasciola Hepatica and Schistosoma Mansoni: Identification of Common Proteins by Comparative Proteomic Analysis. *Journal of Parasitology*. 2011; 97:852-861.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 1976; 72, 248-254.
- Brännström K, Sellin ME, Holmfeldt P, Brattsand M & Gullberg M. The *Schistosoma mansoni* protein Sm16/SmSLP/SmSPO-1 assembles into a nine-subunit oligomer with potential To inhibit Toll-like receptor signaling. *Infect Immun*. 2009; 77(3).1144-54.
- Braschi S & Wilson RA. Proteins exposed at the adult schistosome surface revealed by biotinylation. *Mol. Cell Proteomics*. 2006; 5, 347-356.
- Braschi S, Curwen RS, Ashton PD, Verjovski-Almeida S & Wilson A. The tegument surface membranes of the human blood parasite *Schistosoma mansoni*: a proteomic analysis after differential extraction. *Proteomics*. 2006; 6, 1471-1482.
- Burke ML, Jones MK, Gobert GN, Li YS, Ellis MK & McManus DP. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite Immunol*. 2009; 31, 163-176.
- Caldas IR, Campi-Azevedo AC, Oliveira LF, Silveira AM, Oliveira RC & Gazzinelli G. Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection. *Acta Trop*. 2008; 108(2-3).109-17.
- Cao M, Chao H & Doughty BL. Cloning of A Cdna-Encoding An Egg Antigen Homolog from *Schistosoma-Mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1993; 58:169-171.
- Capron A, Capron M & Riveau G. Vaccine development against schistosomiasis from concepts to clinical trials. *Br. Med. Bull*. 2002; 62, 139-148.
- Capron A, Riveau G, Capron M & Trottein F. Schistosomes: the road from host-parasite interactions to vaccines in clinical trials. *Trends Parasitol*. 2005; 21, 143-149.

- Capron A, Riveau G, Grzych JM, Boulanger D, Capron M & Pierce R. Development of a vaccine strategy against human and bovine schistosomiasis. Background and update. *Trop. Geogr. Med.* 1994; 46, 242-246.
- Cardoso FC, Pacifico RN, Mortara RA & Oliveira SC. Human antibody responses of patients living in endemic areas for schistosomiasis to the tegumental protein Sm29 identified through genomic studies. *Clin. Exp. Immunol.* 2006; 144, 382-391.
- Cass CL, Johnson JR, Califf LL, Xu T, Hernandez HJ, Stadecker MJ, Yates JR III & Williams DL. Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* egg secretions. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2007; 155, 84-93.
- Castro-Borges W, Cartwright J, Ashton PD, Braschi S, Guerra SR, Rodrigues V, Wilson RA & Curwen RS. The 20S proteasome of *Schistosoma mansoni*: a proteomic analysis. *Proteomics.* 2006; 7(7).1065-75.
- Castro-Borges W, Dowle A, Curwen RS, Thomas-Oates J & Wilson RA. Enzymatic shaving of the tegument surface of live schistosomes for proteomic analysis: a rational approach to select vaccine candidates. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011a; 29;5(3).e993.
- Castro-Borges W, Simpson DM, Dowle A, Curwen RS, Thomas-Oates J, Beynon RJ & Wilson RA. Abundance of tegument surface proteins in the human blood fluke *Schistosoma mansoni* determined by QconCAT proteomics. *J Proteomics.* 2011b; 24;74(9):1519-33.
- Cheng GF, Lin JJ, Feng XG, Fu ZQ, Jin YM, Yuan CX, Zhou YC & Cai YM. Proteomic analysis of differentially expressed proteins between the male and female worm of *Schistosoma japonicum* after pairing. *Proteomics.* 2005; 5, 511-521.
- Cioli D & Pica-Mattoccia L. Praziquantel. *Parasitol. Res.* 2003; 90 Supp 1, S3-S9.
- Cook RM, Carvalho-Queiroz C, Wilding G & LoVerde PT. Nucleic acid vaccination with *Schistosoma mansoni* antioxidant enzyme cytosolic superoxide dismutase and the structural protein filamin confers protection against the adult worm stage. *Infection and Immunity.* 2004; 72:6112-6124.
- Correa-Oliveira R, Caldas IR & Gazzinelli G. Natural versus drug-induced resistance in *Schistosoma mansoni* infection. *Parasitol. Today.* 2000a; 16, 397-399.
- Correa-Oliveira R, Pearce EJ, Oliveira GC, Golgher DB, Katz N, Bahia LG, Carvalho OS, Gazzinelli G & Sher A. The human immune response to defined immunogens of *Schistosoma mansoni*: elevated antibody levels to paramyosin in stool-negative individuals from two endemic areas in Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1989; 83, 798-804.
- Correa-Oliveira R, Rodrigues CI, Martins-Filho OA, Carvalho QC, Lambertucci JR, Renan Cunha-Melo J, Soares SA, Prata A, Wilson A & Gazzinelli G. Analysis of the effects of treatment of human *Schistosoma mansoni* infection on the immune response of patients from endemic areas. *Acta Trop.* 2000b; 77, 141-146.
- Cummings RD & Nyame AK. Glycobiology of schistosomiasis. *Faseb Journal.* 1996; 10:838-848.

- Curwen RS, Ashton PD, Johnston DA & Wilson RA. The *Schistosoma mansoni* soluble proteome: a comparison across four life-cycle stages. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2004; 138, 57-66.
- Curwen RS, Ashton PD, Sundaralingam S & Wilson RA. Identification of novel proteases and immunomodulators in the secretions of schistosome cercariae that facilitate host entry. *Mol. Cell Proteomics.* 2006; 5, 835-844.
- Dalton JP & Mulcahy G. Parasite vaccines--a reality? *Vet. Parasitol.* 2001; 98, 149-167.
- Davis A & Wegner DH. Multicentre trials of praziquantel in human schistosomiasis: design and techniques. *Bull. World Health Organ.* 1979; 57, 767-771.
- Davis AH. *Epidemiology and Community Control of Disease in Warm Climate Countries.* 1985; pp. 389-412. London: Churchill Livingstone.
- de Jesus AM, Almeida RP, Bacellar O, Araujo MI, Demeure C, Bina JC, Dessen AJ & Carvalho EM. Correlation between cell-mediated immunity and degree of infection in subjects living in an endemic area of schistosomiasis. *Eur. J. Immunol.* 1993; 23, 152-158.
- Dean DA, Murrell KD, Xu ST & Mangold BL. Immunization of mice with ultraviolet-irradiated *Schistosoma mansoni* cercariae: a re-evaluation. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1983; 32, 790-793.
- DeMarco R & Verjovski-Almeida S. Schistosomes--proteomics studies for potential novel vaccines and drug targets. *Drug Discov. Today.* 2009; 14, 472-478.
- Doenhoff MJ, Cioli D & Utzinger J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2008; 21, 659-667.
- Doytchinova IA, Taylor P & Flower DR. Proteomics in Vaccinology and Immunobiology: An Informatics Perspective of the Immunone. *J. Biomed. Biotechnol.* 2003; 267-290.
- Driguez P, Doolan DL, Loukas A, Felgner PL & McManus DP. Schistosomiasis vaccine discovery using immunomics. *Parasites & Vectors.* 2010; 3:4.
- Ducan MW & Hunsucker SW. Proteomics as a tool for clinically relevant biomarker discovery and validation. *Exp. Biol. Med.* 2005; 230, 808-817.
- Dunne DW & Doenhoff MJ. *Schistosoma mansoni* egg antigens and hepatocyte damage in infected T cell-deprived mice. *Contrib. Microbiol. Immunol.* 1983; 7, 22-29.
- Dzik JM. Molecules released by helminth parasites involved in host colonization. *Acta Biochim. Pol.* 2006; 53, 33-64.
- Eberl M, Langermans JA, Frost PA, Vervenne RA, van Dam GJ, Deelder AM, Thomas AW, Coulson PS & Wilson RA. Cellular and humoral immune responses and protection against schistosomes induced by a radiation-attenuated vaccine in chimpanzees. *Infect. Immun.* 2001; 69, 5352-5362.

- Escudero ED, Manzano-Roman R, Valero L, Oleaga A, Perez-Sanchez R, Hernandez-Gonzalez A & Siles-Lucas M. Comparative proteomic analysis of *Fasciola hepatica* juveniles and *Schistosoma bovis schistosomula*. *Journal of Proteomics*. 2011; 74:1534-1544.
- Farias LP, Cardoso FC, Miyasato PA, Montoya BO, Tararam CA, Roffato HK, Kawano T, Gazzinelli A, Correa-Oliveira R, Coulson PS, Wilson RA, Oliveira SC, Leite LC. *Schistosoma mansoni* Stomatin like protein-2 is located in the tegument and induces partial protection against challenge infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010; 9;4(2):e597.
- Felgner PL, Kayala MA, Vigil A, Burk C, Nakajima-Sasaki R, Pablo J, Molina DM, Hirst S, Chew JS, Wang D, Tan G, Duffield M, Yang R, Neel J, Chantratita N, Bancroft G, Lertmemongkolchai G, Davies DH, Baldi P, Peacock S & Titball RW. A *Burkholderia pseudomallei* protein microarray reveals serodiagnostic and cross-reactive antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106(32):13499-504.
- Feng YY & Walsh CA. The many faces of filamin: A versatile molecular scaffold for cell motility and signalling. *Nature Cell Biology*. 2004; 6:1034-1038.
- Foster WD. History of Parasitology. *E. & S. Livingstone Ltd*. 1965; pp. 58-67.
- FUNASA - Ministério da Saúde. *Guia de Vigilância Epidemiológica*. 2002; 5 ed. I:275-286.
- Fukuda T, Oyamada H, Isshiki T, Maeda M, Kusakabe T, Hozumi A, Yamaguchi T, Igarashi T, Hasegawa H, Seidoh T & Suzuki T. Distribution and variable expression of secretory pathway protein reticulocalbin in normal human organs and non-neoplastic pathological conditions. *J Histochem Cytochem*. 2007; 55(4):335-45.
- Gazzinelli A, Bethony J, Fraga LA, LoVerde PT, Correa-Oliveira R & Kloos H. Exposure to *Schistosoma mansoni* infection in a rural area of Brazil. I: water contact. *Trop. Med. Int. Health*. 2001; 6, 126-135.
- Gazzinelli G, Viana IR, Bahia-Oliveira LM, Silveira AM, Queiroz CC, Carvalho OS, Massara CL, Fraga LA, Colley DG & Correa-Oliveira R. Immunological profiles of patients from endemic areas infected with *Schistosoma mansoni*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1992; 87 Suppl 4, 139-142.
- Gil CD, La M, Perretti M & Oliani SM. Interaction of human neutrophils with endothelial cells regulates the expression of endogenous proteins annexin 1, galectin-1 and galectin-3. *Cell Biol Int*. 2006; 30(4):338-44.
- Gomes LI, dos Santos Marques LH, Enk MJ, de Oliveira MC, Coelho PM & Rabello A. Development and evaluation of a sensitive PCR-ELISA system for detection of schistosoma infection in feces. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010; 20;4(4):e664.
- Gorg A, Drews O, Luck C, Weiland F & Weiss W. 2-DE with IPGs. *Electrophoresis*. 2009; 30 Suppl 1 S122-S132.
- Graves PR & Haystead TA. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 2002; 66, 39-63.

Gray DJ, Ross AG, Li YS & McManus DP. Diagnosis and management of schistosomiasis. *BMJ*. 2011; 342:d2651.

Gryseels B, Polman K, Clerinx J & Kestens L. Human schistosomiasis. *Lancet*. 2006; 368, 1106-1118.

Guillou F, Roger E, Mone Y, Rognon A, Grunau C, Theron A, Mitta G, Coustau C, & Gourbal BE. Excretory-secretory proteome of larval *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma caproni*, two parasites of *Biomphalaria glabrata*. *Mol. Biochem. Parasitol*. 2007; 155, 45-56.

Guimarães RJ, Freitas CC, Dwarki VJ, Drummond SC, Amaral RS, Muller EC, Guerra M, Scholte RGC, Freitas RC & Carvalho OS. Analysis and estimative of schistosomiasis prevalence for the state of Minas Gerais, Brazil, using multiples regression with social and enviromental spatial data. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006; 101, 91-96.

Gulmann C, Sheehan KM, Kay EW, Liotta LA & Petricoin III EF. Array-based proteomics: mapping of protein circuitries for diagnostics, prognostics, and therapy guidance in cancer. *J Pathol*. 2006; 208: 595–606

Haas G, Karaali G, Ebermayer K, Metzger WG, Lamer S, Zimny-Arndt U, Diescher S, Goebel UB, Vogt K, Roznowski AB, Wiedenmann BJ, Meyer TF, Aebischer T & Jungblut PR. Immunoproteomics of *Helicobacter pylori* infection and relation to gastric disease. *Proteomics*. 2002; 2, 313-324.

Hagan P, Blumenthal UJ, Dunn D, Simpson AJ & Wilkins HA. Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*. *Nature*. 1991; 349, 243–245.

Hamilton JV, Klinkert M & Doenhoff MJ. Diagnosis of schistosomiasis: antibody detection, with notes on parasitological and antigen detection methods. *Parasitology*. 1998; 117 Suppl:S41-57.

Hansell E, Braschi S, Medzihradzky KF, Sajid M, Debnath M, Ingram J, Lim KC & McKerrow JH. Proteomic analysis of skin invasion by blood fluke larvae. *PLoS. Negl. Trop. Dis*. 2008; 2, e262.

Hart C, Schulenberg B, Steinberg TH, Leung WY & Patton WF. Detection of glycoproteins in polyacrylamide gels and on electroblots using Pro-Q Emerald 488 dye, a fluorescent periodate Schiff-base stain. *Electrophoresis*. 2003; 24(4):588-98.

Hendrickson RC, Douglass JF, Reynolds, LD, McNeill PD, Carter D, Reed SG & Houghton RL. Mass spectrometric identification of mtb81, a novel serological marker for tuberculosis. *J. Clin. Microbiol*. 2000; 38, 2354-2361.

Higón M, Cowan G, Nausch N, Cavanagh D, Oleaga A, Toledo R, Stothard JR, Antúnez O, Marcilla A, Burchmore R & Mutapi F. Screening trematodes for novel intervention targets: a proteomic and immunological comparison of *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma bovis* and *Echinostoma caproni*. *Parasitology*. 2011; 138(12).1607-19.

Hoffmann KF, James SL, Cheever AW & Wynn TA. Studies with double cytokine-deficient mice reveal that highly polarized Th1- and Th2-type cytokine and antibody responses

- contribute equally to vaccine-induced immunity to *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* 1999; 163, 927-938.
- Hokke CH & Deelder AM. Schistosome glycoconjugates in host-parasite interplay. *Glycoconjugate Journal.* 2001; 18:573-587.
- Hokke CH & Yazdanbakhsh M. Schistosome glycans and innate immunity. *Parasite Immunology.* 2005; 27:257-264.
- Hotez PJ, Bethony JM, Diemert DJ, Pearson M & Loukas A. Developing vaccines to combat hookworm infection and intestinal schistosomiasis. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8(11):814-26.
- Jankovic D, Wynn TA, Kullberg MC, Hieny S, Caspar P, James S, Cheever AW & Sher A. Optimal vaccination against *Schistosoma mansoni* requires the induction of both B cell- and IFN-gamma-dependent effector mechanisms. *J. Immunol.* 1999; 162, 345-351.
- Johnson KS, Harrison GB, Lightowers MW, O'Hoy KL, Cogle WG, Dempster RP, Lawrence SB, Vinton JG, Heath DD & Rickard MD. Vaccination against ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen. *Nature.* 1989; 338, 585-587.
- Jones MK, Lustigman S & Loukas A. Tracking the odysseys of juvenile schistosomes to understand host interactions. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 2008; 2, e257.
- Ju JW, Joo HN, Lee MR, Cho SH, Cheun HI, Kim JY, Lee YH, Lee KJ, Sohn WM, Kim DM, Kim IC, Park BC & Kim TS. Identification of a serodiagnostic antigen, legumain, by immunoproteomic analysis of excretory-secretory products of *Clonorchis sinensis* adult worms. *Proteomics.* 2009; 9(11):3066-78.
- Jungblut PR, Zimny-Arndt U, Zeindl-Eberhart E, Stulik J, Koupilova K, Pleissner KP, Otto A, Muller EC, Sokolowska-Kohler W, Grabher G & Stoffler G. Proteomics in human disease: cancer, heart and infectious diseases. *Electrophoresis.* 1999; 20, 2100-2110.
- Kariuki TM, van Dam GJ, Deelder AM, Farah IO, Yole DS, Wilson RA & Coulson PS. Previous or ongoing schistosome infections do not compromise the efficacy of the attenuated cercaria vaccine. *Infect. Immun.* 2006; 74, 3979-3986.
- Katz N. The discovery of Schistosomiasis mansoni in Brazil. *Acta Trop.* 2008; 108, 69-71.
- Katz N, Chaves A & Pellegrino J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in Schistosomiasis mansoni. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1972; 14(6).397-400.
- Katz N, Faria I & Reis FA. Modernos conhecimentos sobre esquistossomose mansônica. *ed. Academia Mineira de Medicina.* 1986.
- Kiel M, Josh P, Jones A, Windon R, Hunt P & Kongsuwan K. Identification of immuno-reactive proteins from a sheep gastrointestinal nematode, *Trichostrongylus colubriformis*, using two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Int J Parasitol.* 2007; 37(13):1419-29.
- King CH. Toward the elimination of schistosomiasis. *N. Engl. J. Med.* 2009; 360, 106-109.

- King CH, Sturrock RF, Kariuki HC & Hamburger J. Transmission control for schistosomiasis - why it matters now. *Trends Parasitol.* 2006; 22, 575-582.
- Knudsen GM, Medzihradzky KF, Lim KC, Hansell, E & McKerrow JH. Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* cercarial secretions. *Mol. Cell Proteomics.* 2005; 4, 1862-1875.
- Krah A & Jungblut P. Immunoproteomics. *Methods Mol Med.* 2004; 94, 19-32.
- Lane CS. Mass spectrometry-based proteomics in the life sciences. *Cell. Mol. Life Sci.* 2005; 62, 848-869.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227:680-685.
- Liu F, Cui SJ, Hu W, Feng Z, Wang ZQ & Han ZG. Excretory/secretory proteome of the adult developmental stage of human blood fluke, *Schistosoma japonicum*. *Mol. Cell Proteomics.* 2009; 8, 1236-1251.
- Liu F, Hu W, Cui SJ, Chi M, Fang CY, Wang ZQ, Yang PY & Han ZG. Insight into the host-parasite interplay by proteomic study of host proteins copurified with the human parasite, *Schistosoma japonicum*. *Proteomics.* 2007; 7, 450-462.
- Liu F, Lu J, Hu W, Wang SY, Cui SJ, Chi M, Yan Q, Wang XR, Song HD, Xu XN, Wang JJ, Zhang XL, Zhang X, Wang ZQ, Xue CL, Brindley PJ, McManus DP, Yang PY, Feng Z, Chen Z & Han ZG. New perspectives on host-parasite interplay by comparative transcriptomic and proteomic analyses of *Schistosoma japonicum*. *PLoS. Pathog.* 2006; 2, e29.
- Lock RA, Coombs GW, McWilliams TM, Pearman JW, Grubb WB, Melrose GJ & Forbes G. M. Proteome analysis of highly immunoreactive proteins of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter.* 2002; 7, 175-182.
- Loukas A, Bethony J, Brooker S & Hotez P. Hookworm vaccines: past, present, and future. *Lancet Infect. Dis.* 2006; 6, 733-741.
- LoVerde PT & Chen L. Schistosome female reproductive development. *Parasitol. Today.* 1991; 7, 303-308.
- McManus DP & Hope M. Molecular variation in the human Schistosomes. *Acta Trop.* 1993; 53(3-4):255-76.
- Mark HF, el-Sherbeini M, Goldberg M, Suri PK, Sturley SL, Bostian KA & Knopf PM. *Schistosoma mansoni*: two-dimensional gel electrophoretic analysis of antigens uniquely immunoreactive with protective rat serum. *Exp Parasitol.* 1991; 72(3):294-305.
- Mathew RC & Boros DL. Anti-L3T4 antibody treatment suppresses hepatic granuloma formation and abrogates antigen-induced interleukin-2 production in *Schistosoma mansoni* infection. *Infect. Immun.* 1986; 54, 820-826.

- Mathieson W & Wilson RA. A comparative proteomic study of the undeveloped and developed *Schistosoma mansoni* egg and its contents: the miracidium, hatch fluid and secretions. *Int. J. Parasitol.* 2010; 40, 617-628.
- Mayta H, Hancock K, Gilman RH, Zamudio R, Castillo JP, Levine MZ, Garcia HH, Gonzalez AE & Tsang VCW. A Novel *Taenia Solium* Protein that Resembles Troponin T Proteins. *Journal of Parasitology.* 2009; 95:591-597.
- McManus DP & Loukas A. Current status of vaccines for schistosomiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2008; 21, 225-242.
- Mendum TA, Newcombe J, McNeilly CL & McFadden J. Towards the immunoproteome of *Neisseria meningitidis*. *PLoS. One.* 2009; 4, e5940.
- Midzi N, Butterworth AE, Mduluza T, Munyati S, Deelder AM & van Dam GJ. Use of circulating cathodic antigen strips for the diagnosis of urinary schistosomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009; 103(1):45-51.
- Miller P & Wilson RA. Migration of the schistosomula of *Schistosoma mansoni* from the lungs to the hepatic portal system. *Parasitology.* 1980; 80, 267-288.
- Mohamed MR, Shalaby KA, LoVerde PT, Allah NMA & Karim AM. Cloning and characterization of a cDNA fragment encoding a *Schistosoma mansoni* actin-binding protein (Smfilamin). *Parasitology Research.* 2008; 102:1035-1042.
- Monteiro KM, de Carvalho, MO, Zaha A, & Ferreira HB. Proteomic analysis of the *Echinococcus granulosus* metacestode during infection of its intermediate host. *Proteomics.* 2010; 10(10):1985-99.
- Mountford AP. Immunological aspects of schistosomiasis. *Parasite Immunol.* 2005; 27, 243-246.
- Mountford AP & Trottein F. Schistosomes in the skin: a balance between immune priming and regulation. *Trends Parasitol.* 2004; 20(5):221-6.
- Mutapi F. Heterogeneities in anti-schistosome humoral responses following chemotherapy. *Trends in Parasitology.* 2001; 17:518-524.
- Mutapi F, Bourke C, Harcus Y, Midzi N, Mduluza T, Turner CM, Burchmore R & Maizels RM. Differential recognition patterns of *Schistosoma haematobium* adult worm antigens by the human antibodies IgA, IgE, IgG1 and IgG4. *Parasite Immunol.* 2011; 33(3):181-92
- Mutapi F, Burchmore R, Mduluza T, Foucher A, Harcus Y, Nicoll G, Midzi N, Turner CM & Maizels RM. Praziquantel treatment of individuals exposed to *Schistosoma haematobium* enhances serological recognition of defined parasite antigens. *J Infect Dis.* 2005; 15;192(6):1108-18.
- Mutapi F, Burchmore R, Mduluza T, Midzi N, Turner CM & Maizels RM. Age-related and infection intensity-related shifts in antibody recognition of defined protein antigens in a schistosome-exposed population. *J. Infect. Dis.* 2008; 198, 167-175.

- Neuhoff V, Arold N, Taube D & Ehrhardt W. Improved staining of proteins in polyacrilamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*. 1988; 9, 255-262.
- Nyame AK, Kwar ZS & Cummings RD. Antigenic glycans in parasitic infections: implications for vaccines and diagnostics. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2004; 426:182-200.
- Oliveira LM, Santos HL, Gonçalves MM, Barreto MG & Peralta JM. Evaluation of polymerase chain reaction as an additional tool for the diagnosis of low-intensity *Schistosoma mansoni* infection. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010; 68(4):416-21.
- Oliveira SC, Fonseca CT, Cardoso FC, Farias LP & Leite LC. Recent advances in vaccine research against schistosomiasis in Brazil. *Acta Trop*. 2008; 108, 256-262.
- OMS. Report of the Scientific Working group on Schistosomiasis - TDR/SWG/07. 2007.
- Pacifico LG, Fonseca CT, Chiari L & Oliveira SC. Immunization with *Schistosoma mansoni* 22.6 kDa antigen induces partial protection against experimental infection in a recombinant protein form but not as DNA vaccine. *Immunobiology*. 2006; 211, 97-104.
- Pearce EJ & MacDonald AS. The immunobiology of schistosomiasis. *Nat. Rev. Immunol*. 2002; 2, 499-511.
- Pearce EJ, Hall BF & Sher A. Host-specific evasion of the alternative complement pathway by schistosomes correlates with the presence of a phospholipase C-sensitive surface molecule resembling human decay accelerating factor. *J Immunol*. 1990; 144(7):2751-6.
- Pearce EJ, James SL, Hieny S, Lanar DE & Sher A. Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by vaccination with schistosome paramyosin (Sm97), a nonsurface parasite antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 1988; 85, 5678-5682.
- Pellegrino J & Siqueira AF. A perfusion technic for recovery of *Schistosoma mansoni* from experimentally infected guinea pigs. *Rev. Bras. Malariol. Doencas. Trop*. 1956; 8, 589-597.
- Pereira WR. Fatores de risco associados à infecção pelo *Schistosoma mansoni*. Dissertação. Pós-graduação do Centro de Pesquisas René Rachou. 2006.
- Pereira WR, Kloos H, Crawford SB, Velasquez-Melendez JG, Matoso LF, Fujiwara RT, Cancado GG, LoVerde PT, Correa-Oliveira R & Gazzinelli A. *Schistosoma mansoni* infection in a rural area of the Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil: analysis of exposure risk. *Acta Trop*. 2010; 113, 34-41.
- Perez-Sanchez R, Ramajo-Hernandez A, Ramajo-Martin V & Oleaga A. Proteomic analysis of the tegument and excretory-secretory products of adult *Schistosoma bovis* worms. *Proteomics*. 2006; 6 Suppl 1, S226-S236.
- Perez-Sanchez R, Valero ML, Ramajo-Hernandez A, Siles-Lucas M, Ramajo-Martin V & Oleaga A. A proteomic approach to the identification of tegumental proteins of male and female *Schistosoma bovis* worms. *Mol. Biochem. Parasitol*. 2008; 161, 112-123.

- Pica-Mattoccia L & Cioli D. Sex- and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to in vivo and in vitro praziquantel treatment. *Int. J. Parasitol.* 2004; 34, 527-533.
- Pitarch A, Diez-Orejas R, Molero G, Pardo M, Sanchez M, Gil C & Nombela C. Analysis of the serologic response to systemic *Candida albicans* infection in a murine model. *Proteomics.* 2001; 1, 550-559
- Protasio AV, Tsai IJ, Babbage A, Nichol S, Hunt M, Aslett MA, de Silva N, Velarde GS, Anderson TJ, Clark RC, Davidson C, Dillon GP, Holroyd NE, LoVerde PT, Lloyd C, McQuillan J, Oliveira G, Otto TD, Parker-Manuel SJ, Quail MA, Wilson RA, Zerlotini A, Dunne DW & Berriman M. A systematically improved high quality genome and transcriptome of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6(1).e1455.
- Rabilloud T. Membrane proteins and proteomics: Love is possible, but so difficult. *Electrophoresis.* 2009; 30:S174-S180.
- Ramajo-Hernandez A, Oleaga A, Ramajo-Martin V & Perez-Sanchez R. Carbohydrate profiling and protein identification of tegumental and excreted/secreted glycoproteins of adult *Schistosoma bovis* worms. *Veterinary Parasitology.* 2007 144:45-60.
- Ramalho-Pinto FJ, Gazzinelli G, Howells RE, Mota-Santos TA, Figueiredo EA & Pellegrino J. *Schistosoma mansoni*: defined system for stepwise transformation of cercaria to schistosomule in vitro. *Exp. Parasitol.* 1974; 36, 360-372.
- Ramos CR, Spisni A, Oyama S Jr, Sforça ML, Ramos HR, Vilar MM, Alves AC, Figueredo RC, Tendler M, Zanchin NI, Pertinhez TA & Ho PL. Stability improvement of the fatty acid binding protein Sm14 from *S. mansoni* by Cys replacement: structural and functional characterization of a vaccine candidate. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1794(4).655-62.
- Reynolds SR, Shoemaker CB & Harn DA. T and B cell epitope mapping of SM23, an integral membrane protein of *Schistosoma mansoni*. *J Immunol.* 1992; 149(12):3995-4001.
- Reynolds SR, Dahl CE & Harn DA. T and B epitope determination and analysis of multiple antigenic peptides for the *Schistosoma mansoni* experimental vaccine triose-phosphate isomerase. *J. Immunol.* 1994; 152, 193-200.
- Roberts SM, MacGregor AN, Vojvodic M, Wells E, Crabtree JE & Wilson RA. Tegument surface membranes of adult *Schistosoma mansoni*: development of a method for their isolation. *Mol Biochem Parasitol.* 1983; (2):105-27.
- Rogers S H & Bueding E. Hycanthon resistance: development in *Schistosoma mansoni*. *Science.* 1971; 172, 1057-1058.
- Rollinson D & Simpson A. The Biology of Schistosomes - From genes to Latrines. *Academic Press.* 1987.
- Roussel S, Rognon B, Barrera C, Reboux G, Salamin K, Grenouillet F, Thaon I, Dalphin JC, Tillie-Leblond I, Quadroni M, Monod M & Millon L. Immuno-reactive proteins from

Mycobacterium immunogenum useful for serodiagnosis of metalworking fluid hypersensitivity pneumonitis. 2011; 301(2).150-6.

Salazar-Anton F & Lindh J. Taenia solium: a two-dimensional Western blotting method combined with the use of an EST-library for the identification of immunogenic proteins recognized by sera from neurocysticercosis patients. *Exp Parasitol*. 2011; 128(4):371-6.

Schistosoma japonicum Genome Sequencing and Functional Analysis Consortium. The Schistosoma japonicum genome reveals features of host-parasite interplay. *Nature*. 2009; 16;460(7253).345-51.

Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. *Vigilância Epidemiológica e Controle da Esquistossomose*. ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/doc/manu_esqui.pdf. 2007.

Seliger B & Kellner R. Design of proteome-based studies in combination with serology for the identification of biomarkers and novel targets. *Proteomics*. 2002; 2, 1641-1651.

Sette A & Rappuoli R. (2010). Reverse vaccinology: developing vaccines in the era of genomics. *Immunity*. 29;33(4).530-41.

Seyffert N, Le Maréchal C, Jardin J, McCulloch J A, Rosado F R, Miyoshi A, Even S, Jan G, Berkova N, Vautor E, Thiéry R, Azevedo V & Le Loir Y. Staphylococcus aureus proteins differentially recognized by the ovine immune response in mastitis or nasal carriage. *Vet Microbiol*. 2012.

Shalaby KA, Yin L, Thakur A, Christen L, Niles EG, LoVerde PT. Protection against Schistosoma mansoni utilizing DNA vaccination with genes encoding Cu/Zn cytosolic superoxide dismutase, signal peptide-containing superoxide dismutase and glutathione peroxidase enzymes. *Vaccine*. 2003; 8;22(1):130-6.

Shane HL, Verani JR, Abudho B, Montgomery SP, Blackstock AJ, Mwinzi PN, Butler SE, Karanja DM & Secor WE. Evaluation of urine CCA assays for detection of Schistosoma mansoni infection in Western Kenya. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011; 25;5(1).e951.

Shi F, Zhang Y, Ye P, Lin J, Cai Y, Shen W, Bickle QD & Taylor MG. Laboratory and field evaluation of Schistosoma japonicum DNA vaccines in sheep and water buffalo in China. *Vaccine*. 2001; 20, 462-467.

Skelly P J & Wilson RA. Making sense of the schistosome surface. *Adv Parasitol*. 2006; 63, 185-284.

Soisson LM, Masterson CP, Tom TD, McNally MT, Lowell GH & Strand M. Induction of protective immunity in mice using a 62-kDa recombinant fragment of a Schistosoma mansoni surface antigen. *J. Immunol*. 1992; 149, 3612-3620.

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; 6(7).411-25.

Stirewalt MA, Cousin CE & Dorsey CH. *Schistosoma mansoni*: stimulus and transformation of cercariae into schistosomules. *Exp. Parasitol.* 1983; 56, 358-368.

Stossel TP, Condeelis J, Cooley L, Hartwig JH, Noegel A, Schleicher M & Shapiro SS. Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2001; 2:138-145.

Tararam CA, Farias LP, Wilson RA & Leite LCD. *Schistosoma mansoni* Annexin 2: Molecular characterization and immunolocalization. *Experimental Parasitology.* 2010; 126:146-155.

Tendler M, Brito CA, Vilar MM, Serra-Freire N, Diogo CM, Almeida MS, Delbem AC, Da Silva JF, Savino W, Garratt RC, Katz N & Simpson AS. A *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996. 93, 269-273.

Tran MH, Pearson MS, Bethony JM, Smyth DJ, Jones MK, Duke M, Don TA, McManus D P, Correa-Oliveira R & Loukas A. Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis. *Nat Med.* 2006; 12(7).835-40.

van Balkom BW, van Gestel RA, Brouwers JF, Krijgsveld J, Tielens AG, Heck AJ & van Hellemond JJ. Mass spectrometric analysis of the *Schistosoma mansoni* tegumental subproteome. *J. Proteome. Res.* 2005; 4, 958-966.

Vacirca D, Perdicchio M, Campisi E, Delunardo F, Ortona E, Margutti P, Teggi A, Gottstein B & Siracusano A. Favourable prognostic value of antibodies anti-HSP20 in patients with cystic echinococcosis: a differential immunoproteomic approach. *Parasite Immunol.* 2011; 33(3):193-8.

Verjovski-Almeida S & DeMarco R. Current developments on *Schistosoma* proteomics. *Acta Trop.* 2008; 108, 183-185.

Viana IR, Correa-Oliveira R, Carvalho Odos S, Massara CL, Colosimo E, Colley DG & Gazzinelli G. Comparison of antibody isotype responses to *Schistosoma mansoni* antigens by infected and putative resistant individuals living in an endemic area. *Parasite Immunol.* 1995; 17(6).297-304.

Wei B & Jin JP. Troponin T isoforms and posttranscriptional modifications: Evolution, regulation and function. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2011; 505:144-154.

Weinstock JV & Blum AM. Modulation of granulomatous inflammation in murine schistosomiasis mansoni by enteric exposure to schistosome ova: in vitro characterization of a regulatory mechanism within the granuloma. *Cell Immunol.* 1987; 108, 452-459.

Wilson MS, Cheever AW, White SD, Thompson RW & Wynn TA. IL-10 blocks the development of resistance to re-infection with *Schistosoma mansoni*. *PLoS Pathog.* 2011; 7(8).e1002171.

Wilson RA & Coulson PS. *Schistosoma mansoni*: dynamics of migration through the vascular system of the mouse. *Parasitology.* 1986; 92 (Pt 1), 83-100.

- Wilson RA & Coulson PS. Strategies for a schistosome vaccine: can we manipulate the immune response effectively? *Microbes. Infect.* 1999; 1, 535-543.
- Wilson RA & Coulson PS. Schistosome vaccines: a critical appraisal. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006; 101 Suppl 1, 13-20.
- Wilson RA & Coulson PS. Immune effector mechanisms against schistosomiasis: looking for a chink in the parasite's armour. *Trends Parasitol.* 2009; 25, 423-431.
- Wilson RA & Lawson JR. An examination of the skin phase of schistosome migration using a hamster cheek pouch preparation. *Parasitology.* 1980; 80, 257-266.
- Wilson RA, Curwen RS, Braschi S, Hall SL, Coulson PS & Ashton PD. From genomes to vaccines via the proteome. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004; 99(5 Suppl 1).45-50.
- Wilson RA., Langermans JA, van Dam GJ, Vervenne RA, Hall SL, Borges WC, Dillon GP, Thomas AW & Coulson PS. Elimination of *Schistosoma mansoni* Adult Worms by Rhesus Macaques: Basis for a Therapeutic Vaccine? *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 2008; 2, e290.
- Wippersteg V, Kapp K, Kunz W & Grevelding, CG. Characterization of the cysteine protease ER60 in transgenic *Schistosoma mansoni* larvae. *International Journal for Parasitology.* 2002; 32:1219-1224.
- Wippersteg V, Ribeiro F, Liedtke S, Kusel J R & Grevelding CG. The uptake of Texas Red-BSA in the excretory system of schistosomes and its colocalisation with ER60 promoter-induced GFP in transiently transformed adult males. *International Journal for Parasitology.* 2003; 33:1139-1143.
- Woodward MP, Young WW Jr & Bloodgood RA. Detection of monoclonal antibodies specific for carbohydrate epitopes using periodate oxidation. *J. Immunol. Methods.* 1985; 78, 143-153.
- Wu XJ, Sabat G, Brown JF, Zhang M, Taft A, Peterson N, Harms A & Yoshino TP. Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* proteins released during in vitro miracidium-to-sporocyst transformation. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2009; 164, 32-44.
- Yang LL, Lv ZY, Hu SM, He SJ, Li ZY, Zhang SM, Zheng HQ, Li MT, Yu XB, Fung M & Wu ZD. *Schistosoma japonicum*: proteomics analysis of differentially expressed proteins from ultraviolet-attenuated cercariae compared to normal cercariae. *Parasitol. Res.* 2009; 105, 237-248.
- Yarmush ML & Jayaraman A. Advances in proteomic technologies. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2002; 4, 349-373.
- Young ND, Jex AR, Li B, Liu S, Yang L, Xiong Z, Li Y, Cantacessi C, Hall RS, Xu X, Chen F, Wu X, Zerlotini A, Oliveira G, Hofmann A, Zhang G, Fang X, Kang Y, Campbell BE, Loukas A, Ranganathan S, Rollinson D, Rinaldi G, Brindley PJ, Yang H, Wang J, Wang J & Gasser RB. Whole-genome sequence of *Schistosoma haematobium*. *Nat Genet.* 2012; 15;44(2).221-5.

Zerlotini, A, Heiges M, Wang H, Moraes RL, Dominitini AJ, Ruiz JC, Kissinger J C & Oliveira G. SchistoDB: a Schistosoma mansoni genome resource. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37, D579-D582.

Zhang W, Ahmad G, Torben W & Siddiqui AA. Sm-p80-based DNA vaccine made in a human use approved vector VR1020 protects against challenge infection with Schistosoma mansoni in mouse. *Parasite Immunol.* 2010; 32(4).252-8.

Zhong ZR, Zhou HB, Li XY, Luo QL, Song XR, Wang W, Wen HQ, Yu L, Wei W & Shen JL. Serological proteome-oriented screening and application of antigens for the diagnosis of Schistosomiasis japonica. *Acta Tropica.* 2010; 116:1-8.