

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

***Aspectos adaptativos de Schistosoma mansoni na fase esquistossômulo:
abordagem in vivo e in vitro***

por

Wander de Jesus Jeremias

Belo Horizonte

Maio/2015

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

***Aspectos adaptativos de Schistosoma mansoni na fase esquistossômulo:
abordagem in vivo e in vitro***

por

Wander de Jesus Jeremias

**Tese apresentada com vistas à obtenção
do Título de Doutor em Ciências, na área
de concentração: Doenças Infecciosas e
Parasitárias.**

Orientação: Dr Paulo Marcos Zech Coelho

Co-orientação: Dr Élio Hideo Baba

Belo Horizonte

Maio/2015

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

J55a

2015 Jeremias, Wander de Jesus.

Aspectos adaptativos de *Schistosoma mansoni* na fase esquistossômulo: abordagem in vivo e in vitro / Wander de Jesus Jeremias. – Belo Horizonte, 2015.

XXI, 148 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 135 - 156

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: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Esquistossomose mansoni/genética 2. *Schistosoma mansoni*/parasitologia 3. Análise de Sequência de RNA/métodos I. Título. II. Coelho, Paulo Marcos Zech (Orientação). III. Baba, Élio Hideo (Co-orientação).

CDD – 22. ed. – 616.963

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

Aspectos adaptativos de *Schistosoma mansoni* na fase esquistossômulo:
abordagem in vivo e in vitro

por

Wander de Jesus Jeremias

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Paulo Marcos Zech Coelho (Presidente)

Prof. Dra. Laila Alves Nahum

Prof. Dr. Flávio Marcos Gomes de Araújo

Prof. Dra. Élide Mara Leite Rabelo

Prof. Dr. Matheus de Souza Gomes

Suplente: Anna Christina de Matos Salim

Tese defendida e aprovada em: 20/05/2015

Dedico esse trabalho a memória do meu pai, José Jeremias e meus avós, Maria Cecília Jeremias e Noé Jeremias, discretos, mas constantes incentivadores. A minha filha, Marina, amor maior. A minha amada esposa Marilza, compreensiva parceira, incentivadora, fonte de fé e inspiração. A minha mãe Efigênia Jeremias, minha irmã Vanessa e minha madrinha, Tia Nena, e toda família, que sempre me apoiaram em minhas escolhas.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por sempre me guiar e iluminar o meu caminho, me dando forças e perseverança para superar os desafios enfrentados.

Agradeço ao meu orientador, Dr Paulo Marcos Zech Coelho, quem me oportunizou desenvolver esse trabalho, dando-me todo apoio, atenção e norteamto em todas as etapas, compartilhando ainda seu vasto conhecimento, o que contribuiu em muito para meu aprimoramento técnico e pessoal. Ao senhor minha profunda admiração.

Agradeço ao meu co-orientador, Dr Élio Hideo Babá, mentor científico, a quem devo todo meu aprimoramento nesse caminho acadêmico, que escolhi seguir, muito, por mérito de seus exemplos. Obrigado mestre, por sempre acreditar e confiar em mim. A você minha eterna gratidão, meu respeito e admiração.

Ao Dr Guilherme Corrêa de Oliveira pelo apoio e incentivo para encarar o desafio de iniciar esse trabalho envolvendo transcriptomas e por disponibilizar a estrutura do sequenciador e do cebio para viabilizar esse trabalho.

Ao Dr John Robert Kusel por todos os ensinamentos compartilhados e toda atenção dedicada ao trabalho. A sua amável esposa, Marion Kusel, pelo carinho e atenção.

Ao Dr Michael Doenhoff pela acolhida, pela atenção e por compartilhar seu conhecimento, me orientando no período que estive em Nottingham, UK.

Ao Dr. Naftale Katz e Dra Cristina Toscano pelas sugestões e conselhos, que sempre enriquecem o trabalho.

A Dra Neusa Araújo, sempre disposta a ajudar e compartilhar seus conhecimentos e experiência com as perfusões.

Ao Dr Fabiano Paes por toda atenção, paciência e por todos os ensinamentos em bioinformática transmitidos. Obrigado pela amizade e consideração.

Ao Dr Roney Coimbra por suas contribuições e ensinamentos de bioinformática, que me deram condições de dar os primeiros passos na análise dos dados de transcriptoma.

A Dra Renata Guerra-Sá por todo apoio e pelo constante incentivo.

Ao grande Áureo pela amizade e consideração sempre manifestas.

A Vandinha, Sueleny, Jussara, Ana Karine e D. Vera pela atenção e carinho, sempre.

Ao Wagner (Feneis), pela dedicação e amizade. Seu valoroso trabalho ajuda muito a todos do laboratório.

A Marcela e Eduardo por terem compartilhado seu tempo e terem realizado parte desse trabalho comigo.

A Ana Carolina por compartilhar seu conhecimento e ter me ensinado muitas das técnicas de parasitologia. Pela amizade e companheirismo nos projetos que compartilhamos, além dos valiosos conselhos, vindos das boas conversas de sempre. Minha admiração e respeito.

A Flávia pelo carinho, atenção e disposição constante para ajudar e por todos os bons conselhos.

A Rafaella pelo carinho e atenção e pela confiança e suporte nas últimas etapas do trabalho.

A Gardênia pela ajuda e pelas palavras de carinho e apoio, que sempre vem, principalmente nos momentos mais difíceis.

A Clarice pelo apoio, pelos bons conselhos compartilhados e saudável convivência.

A Liliane pelo carinho, atenção e amistosa convivência.

Ao meu grande parceiro Fábio, que, incondicionalmente, se colocou a disposição e compartilhou de seu tempo para me ajudar nos experimentos finais.

A Vanessa por toda ajuda, pelo carinho e pela confiança e incentivo, sempre.

A Tais pela cordial convivência, pela atenção e carinho.

A Nathalie e Mariana pela amistosa convivência e apoio.

A todos os amigos do Laboratório de Esquistossomose por todo apoio, pela saudável convivência, as sugestões e conselhos. É um privilégio muito grande conviver com vocês e compartilhar de sua amizade.

Aos funcionários do biotério: Fernanda, Ana Carolina, Wanderley, Vera, Nevilton, José pelo apoio e atenção de todos.

Aos funcionários do moluscário pelo apoio constante.

A todos os funcionários de demais setores do CPqRR, direta ou indiretamente relacionados ao desenvolvimento do trabalho, pelo respeito e pela atenção sempre dispensados.

Aos colegas e aos professores do curso de Pós-graduação do CPqRR com quem cursei disciplinas e compartilhei o aprendizado.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ e plataformas PDTIS pelo suporte técnico-científico e financeiro.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

A Biblioteca do CPqRR por prover acesso gratuito local e remoto a informação técnico-científica, que compôs as referências desta tese, custeando com recursos públicos federais, e também pela catalogação e normalização da mesma.

A minha tia “Nena”, quem sempre acreditou e apostou em meus sonhos. A minha tia “Nem”, primos, demais familiares e familiares da Marilza, que sempre me acolheram com carinho e apoio em todos os momentos do desenvolvimento desse trabalho.

A todos os meus verdadeiros amigos/irmãos pela paciência e incentivo constantes.

Agradeço a todos que com seu jeito peculiar me apoiaram e contribuíram nesse trabalho. Nele há um pedacinho de cada um de vocês, com quem tenho o privilégio de compartilhar minha vida. Obrigado por fazerem parte dela.

Agradeço ao Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ e plataformas PDTIS pelo suporte técnico-científico e financeiro.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro, concedido na linha 2 do programa Pesquisador Visitante Especial Ciências sem Fronteiras, número de processo 402549/2012-0.

(...) “Não há nada como regressar a um lugar que está igual para descobrir o quanto você mudou”.

Nelson Mandela

Sumário

LISTA DE FIGURAS.....	XIII
LISTA DE GRÁFICOS.....	XVI
LISTA DE TABELAS.....	XVII
LISTA DE ABREVIATURAS	XVIII
RESUMO	XX
ABSTRACT	XXI
1 INTRODUÇÃO.....	22
1.1 Esquistossomose	23
1.2 Passagem de <i>S. mansoni</i> através da pele do hospedeiro definitivo – o estágio de “esquistossômulo de pele”	30
1.3 Desenvolvimento de <i>S. mansoni</i> no sistema porta hepático do hospedeiro definitivo	34
1.4 Estudos de genômica e de transcriptomas de <i>S. mansoni</i>	35
1.5 Contribuições de métodos de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) ...	38
2 OBJETIVOS	46
2.1 Objetivo Geral	46
2.2 Objetivos Específicos – Primeira Parte (Comparação de esquistossômulos mecânicos e de pele).....	47
2.3 Objetivos Específicos – Segunda Parte (Comparação de esquistossômulos mecânicos cultivados em presença de soro portal e periférico)	47
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
3.1 Parasitos.....	53
3.2 Hamsters e camundongos	55
3.3 Obtenção do soro periférico e portal de hamster	55
3.4 Obtenção de pele de camundongo.....	56
3.5 Estudo da permeabilidade de membrana usando sondas fluorescentes	57
3.6 Transformação <i>in vivo</i>	58
3.7 Controles para as incubações com pele de camundongo	59
3.8 Exame e registro dos parasitos ao microscópio de fluorescência.....	59
3.9 Eletroforese em gel de poliacrilamida de extratos de proteínas solúveis de esquistossômulos.....	60
3.10 Western blot.....	60
3.11 Eluição ácida de anticorpos	61
3.12 Imunofluorescencia.....	61
3.13 Cultivo de esquistossômulos em meio mínimo suplementado com soro portal e periférico de hamster	63
3.14 Determinação da Viabilidade de Esquistossômulos	64
3.15 Extração do RNA total e isolamento de mRNA.....	64
3.15.1 Extração do RNA total com TRIzol [®] Reagente	65
3.15.2 Purificação do RNA total (<i>Cleanup</i>) com sistema RNeasy	66
3.15.3 Tratamento com DNase	66

3.15.4	Eliminação do rRNA com o sistema RiboMinus™ for RNA-Seq	67
3.15.4.1	Hibridização	67
3.15.4.2	Preparação das Partículas Magnéticas	67
3.15.4.3	Remoção do rRNA	68
3.15.4.4	Precipitação do mRNA	69
3.15.5	Análise do RNA purificado	69
3.16	Construção de Bibliotecas de cDNA e Sequenciamento em SOLiD™ RNA-Seq	70
3.17	Mapeamento e quantificação das <i>reads</i>	70
3.18	Análise da Expressão Gênica	71
3.19	Validação do perfil de expressão gênica por Reação da Polimerase em Cadeia Quantitativa (RT-qPCR)	72
4	RESULTADOS	76
4.1	Estudo comparativo entre esquistossômulos mecanicamente transformados e esquistossômulos obtidos de pele de camundongo	77
4.1.1	Marcações de esquistossômulos <i>in vitro</i>	77
4.1.1.1	Detecção de organelas intracelulares e de membranas em esquistossômulos	77
4.1.1.2	Análise da integridade e permeabilidade da membrana de esquistossômulos	86
4.1.1.3	Reconhecimento imunológico de proteínas/glicoproteínas de superfície em esquistossômulos Mec e Pel	88
4.1.1.3.1	Eletroforese em gel de poliacrilamida dos extratos solúveis do parasito	88
4.1.1.3.2	Imunoblots (<i>western blot</i>) de extratos solúveis de esquistossômulos Mec e Pel	89
4.1.2	Marcações de esquistossômulos <i>in vivo</i>	94
4.1.2.1	Análise da integridade e permeabilidade da membrana de esquistossômulos	94
4.1.3	Controle das incubações de esquistossômulos <i>in vivo</i>	97
4.2	Estudo comparativo entre esquistossômulos cultivados em soro portal e soro periférico de hamster	99
4.2.1	Obtenção de soros	99
4.2.2	Viabilidade dos parasitos	100
4.2.3	Purificação de RNA	103
4.2.4	RNA-Seq	105
4.2.4.1	Expressão diferencial de genes entre esquistossômulos SPO e SPE	107
4.2.4.2	Expressão diferencial de genes entre esquistossômulos SPO3h e SPO12h	108
5	DISCUSSÃO	113
6	CONCLUSÕES	131
7	REFERÊNCIAS	135
8	ANEXOS	158
8.1	ANEXO I - TABELA DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM ESQUISTOSSÔMULOS CULTIVADOS POR 12HORAS EM PRESENÇA DE SORO PORTAL DE HAMSTER	159

8.2 ANEXO II - ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO REFERENTES AOS DADOS DA COMPARAÇÃO ENTRE ESQUISTOSSÔMULOS MEC *VERSUS* PEL E MIG....161

Lista de figuras

FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DA ESTIMATIVA DA PREVALÊNCIA DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI NO BRASIL.24

FIGURA 2 - CICLO DE VIDA DO <i>SCHISTOSOMA MANSONI</i>. ADAPTADO DE.....	26
FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ETAPAS DO DESENVOLVIMENTO DOS ESQUISTOSSÔMULOS.....	27
FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SEQUENCIAMENTO NA PLATAFORMA SOLID.	41
FIGURA 5 - DELINEAMENTO PARA ESTUDO DE ESQUISTOSSÔMULOS DE PELE E MECÂNICOS.....	51
FIGURA 6 - DELINEAMENTO PARA ESQUISTOSSÔMULOS EM SORO PORTAL E PERIFÉRICO.	52
FIGURA 7 - MONTAGEM EM DISPOSITIVO DE VIDRO (MÉTODO DE CLEGG) PARA TRANSFORMAÇÃO DE CERCÁRIAS E OBTENÇÃO DE ESQUISTOSSÔMULOS DE PELE (PEL).....	54
FIGURA 8 - LOCALIZAÇÃO DE AUTO-FAGOSSOMAS EM ESQUISTOSSÔMULOS POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.	78
FIGURA 9 - LOCALIZAÇÃO DE LISSOSOMOS EM ESQUISTOSSÔMULOS POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.	79
FIGURA 10 - LOCALIZAÇÃO DE GLUTATIONA EM ESQUISTOSSÔMULOS POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.	81
FIGURA 11 - MARCAÇÃO DE MITOCÔNDRIAS EM ESQUISTOSSÔMULOS MEC E PEL.	83
FIGURA 12 - MARCAÇÃO DA MEMBRANA CITOPLASMÁTICA DE ESQUISTOSSÔMULOS MEC E PEL.	85
FIGURA 13 - ESQUISTOSSÔMULOS PEL CORADOS COM SONDAS PARA AVALIAR INTEGRIDADE E PERMEABILIDADE DA MEMBRANA.....	87
FIGURA 14 - GEL DE POLIACRILAMIDA A 12% CORADO COM NITRATO DE PRATA DE EXTRATOS DE ESQUISTOSSÔMULOS MEC E PEL.	89
FIGURA 15 - <i>WESTERN BLOT</i> DE EXTRATOS DE ESQUISTOSSÔMULOS MEC E PEL USANDO DIFERENTES SOROS.	90
FIGURA 16 - <i>WESTERN BLOT</i> DE EXTRATO DE ESQUISTOSSÔMULO PEL COM ANTICORPOS ELUÍDOS.....	92
FIGURA 17 - IMUNOFLUORESCÊNCIA DE ESQUISTOSSÔMULO PEL COM ANTICORPOS ELUÍDOS.....	93
FIGURA 18 - ESQUISTOSSÔMULOS MIG CORADOS COM SONDA LUCIFER YELLOW PARA PERMEABILIDADE DA MEMBRANA.	95
FIGURA 19 - ESQUISTOSSÔMULOS MIG CORADOS COM SONDA FI (DEXTRAN 10KDA, 20KDA E 40KDA ACOPLADOS A FITC) PARA PERMEABILIDADE DA MEMBRANA.	96
FIGURA 20 - ESQUISTOSSÔMULOS MIG CORADOS COM SONDA FM1-43 INJETADA NA PELE DURANTE A INFECÇÃO TRANSCUTÂNEA..	97

FIGURA 21 - ESQUISTOSSÔMULOS CULTIVADOS EM PRESENÇA DE PELE DE CAMUNDONGO E CORADOS COM SONDA LUCIFER YELLOW (CONTROLE)..	98
FIGURA 22 - ESQUISTOSSÔMULOS CULTIVADOS EM PRESENÇA DE PELE DE CAMUNDONGO E CORADOS COM SONDA FM1-43 (CONTROLE).....	98
FIGURA 23 - VIABILIDADE DE ESQUISTOSSÔMULOS CULTIVADOS POR 12HORAS EM PRESENÇA DE SORO DE HAMSTER.	103
FIGURA 24 - ELETROFOREGRAMAS DE MRNAS PURIFICADOS DE ESQUISTOSSÔMULOS DE <i>S. MANSONI</i> RECÉM-TRANSFORMADOS A PARTIR DE CERCARIAS DA CEPA LE OU CULTIVADOS EM SORO DE HAMSTER..	105
FIGURA 25 - CORRELAÇÃO ENTRE BIBLIOTECAS SPO3H E SPO12H.....	109

Lista de gráficos

GRÁFICO 1 - GRÁFICO REPRESENTATIVO DAS CONTAGENS DE ESQUISTOSSÔMULOS VIVOS (VIÁVEIS) NAS DIFERENTES CONDIÇÕES	101
GRÁFICO 2 - GRÁFICO REPRESENTATIVO DAS CONTAGENS DE CONTAMINANTES (CERCÁRIAS E CAUDAS) EM PREPARAÇÕES DE ESQUISTOSSÔMULOS NAS DIFERENTES CONDIÇÕES.....	102
GRÁFICO 3 - EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES ENTRE ESQUISTOSSÔMULOS SPO3H E SPO12H.....	110
GRÁFICO 4 - EXPRESSÃO GÊNICA RELATIVA DE UM SUBCONJUNTO DE GENES DETERMINADA POR DOIS MÉTODOS, RNASEQ E QPCR, ENTRE BIBLIOTECAS SPO3H E SPO12H.	112

Lista de tabelas

TABELA 1 - LISTA DE SONDAS PARA INVESTIGAR PERMEABILIDADE EM ORGANELAS E MEMBRANA.....	58
TABELA 2 - LISTA DE SOROS EMPREGADOS EM IMMUNOBLOTS DE EXTRATOS DE ESQUISTOSSÔMULOS MECANICAMENTE OU POR MIGRAÇÃO ATRAVÉS DA PELE DE CAMUNDONGOS.....	60
TABELA 3 - LISTA DE OLIGONUCLEOTÍDEOS EMPREGADOS EM RT-QPCR DE CDNA DE AMOSTRAS DE ESQUISTOSSÔMULOS SPO3H E SPO12H.....	73
TABELA 4 - COMPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS DE MRNAS DE ESQUISTOSSÔMULOS PARA CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECAS E SEQUENCIAMENTO.....	104
TABELA 5 - RESUMO DOS DADOS DE ALINHAMENTO DE <i>READS</i>.....	106
TABELA 6 - SUB-CONJUNTO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS ENTRE ESQUISTOSSÔMULOS SPO3H E SPO12H.....	111

Lista de Abreviaturas

ATPase – adenosilpirofosfatase

BrdU – bromodesoxiuridina

CaspC – caspase C

cDNA – ácido desoxirribonucleico complementar

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais de Experimentação

COX1 – ciclooxigenase 1

Ct – *cycle threshold*

DAF – *decay-accelerating fator*

DED – death effector domain

DEPC – dietil-pirocarbonato

ERAD – degradação proteica associada a retículo endoplasmático

EST – etiqueta de sequência expressa

FHA – domínio proteico Domínio Associado a Forkhead

FITC – isotiocianato de fluoresceína

GO – gene ontology

HEPES – ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanossulfônico

HGPRT – hipoxantina fosforribosil transferase

HSP – *heatshock proteins*

kDa – kilo Dalton

LDN – domínio glicano LacdiNAc - GalNAc β 1-4GlcNAc

LDN-F – domínio glicano LacdiNAc fucosilado - GalNAc β 1-4GlcNAc-fucose

Le^x – N-glicano Lewis x poliédrico

Log2FoldChange – logaritmo na base 2 da expressão gênica

MA plot – gráfico Log da expressão gênica *versus* média normalizada das contagens de *reads*

mAbs – anticorpo monoclonal

mAChR – receptor colinérgico muscarínico

Mbp – mega pares de bases (1.000.000bp)

Mec – esquistossômulos obtidos *in vitro* por método mecânico

MEGs – genes de Micro-éxons

MEM – meio essencial mínimo
Mex3 – proteína 3 de excesso muscular
MIG – esquistossômulos obtidos *in vivo* da pele de camundongo 24 horas após infecção transcutânea
NGS – sequenciamento de nova geração
NIPP1 – inibidor nuclear da proteína fosfatase 1
nt – nucleotídeos
ORESTES – janela aberta de EST
pb – pares de base
PBS – tampão fosfato-salina
Pel – esquistossômulos obtidos *in vitro* por penetração em pele de camundongo
PP1 – proteína fosfatase 1
RISC – complexo de silenciamento induzido por RNA
RNA – ácido ribonucleico
RNASeq – sequenciamento de ácido ribonucleico
RNAses – ribonucleases
ROS – espécies reativas de oxigênio
RPKM – *reads* por kilobase por milhão de *reads* mapeadas
RT-qPCR – reação da polimerase em cadeia quantitativa em tempo real
RTK – receptor tirosina quinase
SAGE – análise seriada de expressão gênica
SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida em condição desnaturante com duodecil-sulfato de sódio
SEA – antígenos solúveis de ovos
SOCE – entrada de cálcio operada por estoques
SPE – esquistossômulos obtidos *in vitro* cultivados em soro periférico de hamster
SPO – esquistossômulos obtidos *in vitro* cultivados em soro portal de hamster
SRP – complexo de reconhecimento de sinal
TRAP – complexo proteico associado a translocon
TZ – esquistossômulos recém transformados *in vitro*
UV-Vis – ultra-violeta-visível
VEGF – fator de crescimento endotelial vascular

Resumo

Dentre as formas evolutivas do *Schistosoma mansoni*, o esquistossômulo é uma das mais estudadas para desenvolvimento de novos fármacos e sistemas diagnósticos. Embora a transformação *in vitro* seja vantajosa, é importante discutir as limitações do uso de resultados obtidos a partir de parasitos cultivados *in vitro* em relação aos obtidos no processo natural de infecção. No presente trabalho, esquistossômulos obtidos *in vivo* e *in vitro* foram comparados em relação a capacidade de captar sondas fluorescentes, específicas para estruturas internas celulares ou membranas superficiais do parasito. As sondas empregadas para membranas e estruturas internas mostraram marcação similar entre parasitos obtidos *in vitro*, por transformação mecânica (Mec) e por penetração em pele (Pel). No entanto, diferenças foram observadas quando estes parasitos foram comparados a outros obtidos *in vivo* pelo método de Clegg (Clegg et al, 1965), sendo detectado um aumento da permeabilidade de membranas. Os dados sugerem que nos esquistossômulos cultivados *in vivo* o metabolismo é mais ativo nas células superficiais e que durante sua permanência por até 72 horas na pele há um extenso *turnover* da superfície do parasito, envolvendo moléculas internas e um aumento da liberação de imunógenos. A aumentada permeabilidade pode permitir ainda a captação de moléculas, capazes de estimular o crescimento do parasito. Além disso, bibliotecas de esquistossômulos Mec cultivados em soro portal (SPO3h e SPO12h) e soro periférico de hamster (SPE3h, SPE12h) foram comparadas utilizando sequenciamento de nova geração (NGS) e análise da expressão de genes específicos. Após o sequenciamento e análise dos genes expressos uma alta similaridade entre as réplicas foi encontrada. Comparando as amostras SPO3h *versus* SPO12h 58 transcritos se mostraram diferencialmente expressos. De acordo com as anotações de termos de ontologia gênica (GO) os genes diferencialmente expressos após 12 horas de contato com o soro portal de hamster, estão ligados a processos importantes ao desenvolvimento até vermes adultos. Assim, este estudo viabilizou um maior entendimento de mecanismos de controle sobre a internalização de moléculas pelo parasito no estágio larvário intravascular, bem como da regulação de sua expressão de genes quando o mesmo se encontra no sistema porta hepático do hospedeiro, onde as formas adultas são essenciais para desenvolvimento da doença.

Abstract

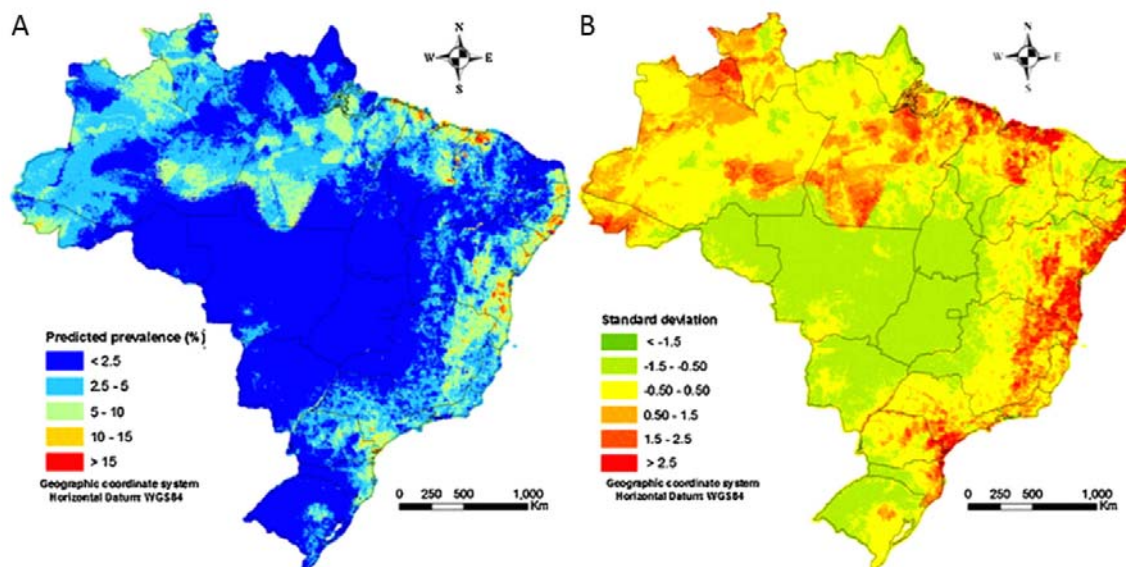
Among the different forms of the *Schistosoma mansoni*, the schistosomulum is widely explored in a broad range of survey, aiming to the development of new drugs and diagnostic methods. In spite of the advantages inherent to *in vitro* transformation, it is important to discuss the limitations in take the results achieved from parasites cultured *in vitro* as representative of those obtained from the natural infection. In present work, schistosomula obtained *in vivo* and *in vitro* were compared in their ability to capture fluorescent probes for specific internal structures or surface membranes. The probes showed similar staining in parasite obtained by both methods, mechanical transformation (Mec) and by active skin penetration (Pel). However, differences were observed when those parasites were compared to other obtained *in vivo*, through the Clegg's method (Clegg et al., 1965). The membrane permeability was shown to be increased. The data suggest that in schistosomula obtained *in vivo* and kept inside the skin for a period of time up to 72 hours the metabolism is more active in cells of the surface and, further there is a huge turnover in the surface of the parasite, involving internal molecules and increasing in immunogens release. The increased permeability can also allow it to capture molecules, capable of stimulate the parasite growing. Furthermore, replicates of cDNA libraries obtained from mechanical schistosomula cultured in presence of serum from portal blood (SPO3h, SPO12h) and serum from peripheral blood (SPE3h, SPE12h) of hamster were also compared by using next generation sequencing (NGS) and gene expression analysis of specific genes. After sequencing and statistical analysis of gene expression, it was observed a high similarity among the libraries. When comparing the samples from SPO3h *versus* SPO12h libraries, 58 genes were found differentially expressed. According to the annotation data of the gene ontology (GO), the differentially expressed genes in schistosomula, after 12 hours of the contact with serum from hamster portal blood, are related to processes important to its development to adult worm. Thereby, this work improved the knowledge of mechanisms evolved in internalization of molecules by the parasite of the intravascular stage, as well as highlighted the regulation of the gene expression when it is within portal venous system of the host, where adult forms are essential for the disease development.

1.1 Esquistossomose

A esquistossomose é uma doença endêmica, parasitária, causada por trematódeos do gênero *Schistosoma* sp. (Classe: *Trematoda*, Família: *Schistosomatidae*), sendo cinco as espécies de interesse médico, dada sua capacidade de infectar o homem: *Schistosoma haematobium* (Bilharz, 1852), *Schistosoma japonicum* (Katsurada, 1904), *Schistosoma mekongi* (Voge, Brickner e Bruce, 1978), *Schistosoma intercalatum* (Fischer, 1934) e *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907).

Pelo menos 240 milhões de pessoas são infectadas pela doença e necessitam de tratamento todos os anos. A transmissão da doença já foi documentada em 77 países ao redor do mundo, mas, dentre esses, há 52 países com maior risco de transmissão. A doença é prevalente em regiões tropicais e subtropicais, especialmente em comunidades pobres, sem acesso a água potável e sem condições sanitárias adequadas. Estima-se que pelo menos 90% das pessoas com esquistossomose no mundo vivam na África, onde a doença permanece como sério problema de saúde pública. No Brasil, *S. mansoni* é a espécie prevalente, causadora da forma intestinal crônica da doença (WHO, 2015).

No Brasil, estimativas do ano de 2009, ainda válidas, apontam para um número superior a 25 milhões de pessoas vivendo em áreas endêmicas, sendo destas 4 a 6 milhões infectadas com a doença (Lambertucci, 2010). A situação atual do país em relação à esquistossomose será em breve revelada, com a publicação dos dados gerados no Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose Mansonii e Geo-Helminthoses, que está em fase de conclusão, e visa evidenciar qual é a situação epidemiológica da doença no país, 30 anos depois da implementação do Programa de Controle da Esquistossomose. A figura 1 representa a estimativa da prevalência da doença no Brasil. Nela, a alta prevalência em alguns locais das regiões norte e nordeste provavelmente se relacionam a distribuição de áreas mais propícias ao desenvolvimento dos caramujos hospedeiros intermediários. As menores prevalências ocorrem nas regiões sul, centro-oeste e sudeste (a exceção do estado de Minas Gerais). Nota-se que a distribuição da doença no país tem um padrão focal (Lengeler et al., 2002)



Fonte: Scholte et al, 2014.

Figura 1: Distribuição espacial da estimativa da prevalência da esquistossomose mansoni no Brasil. Em 1A observa-se o mapa da prevalência estimada e em 1B os desvios padrão das medidas estimadas de prevalência.

Embora movimentos migratórios de orientais e asiáticos, bem como de escravos africanos para as Américas tenham trazido as espécies do gênero *Schistosoma*, para o novo mundo, apenas o *S. mansoni* encontrou condições favoráveis ao seu desenvolvimento, incluindo disponibilidade de hospedeiros intermediários susceptíveis, representados por moluscos do gênero *Biomphalaria sp.* O parasito apresenta notável variação de morfologia ao longo de seu ciclo de vida heteroxênico, compreendendo estádios de ovo, miracídio, esporocisto, cercária, esquistossômulo e verme adulto (Mavárez et al, 2002); Lenzi et al, 2008).

O *S. mansoni* desenvolve em seu ciclo de vida complexas relações com o ambiente e com ambos hospedeiros, intermediário (caramujos do gênero *Biomphalaria*) e definitivo (o homem e outros mamíferos). No Brasil já foram identificadas dez espécies do hospedeiro intermediário, pertencentes ao gênero *Biomphalaria*, sendo apenas *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila* encontradas eliminando cercárias na natureza (Coelho and Bezerra, 2006).

O ciclo de vida do parasito se inicia quando ovos de *S. mansoni* atingem coleções de água com condições favoráveis, e sob estímulo por calor e luminosidade solar o miracídio eclode, sendo a forma livre, que ativamente infecta os caramujos. Nos seus hospedeiros invertebrados o *S. mansoni* desenvolve a fase assexuada de seu ciclo de vida, que compreende complexos processos de multiplicação celular e mecanismos adaptativos. Tais divisões celulares e modificações morfológicas levam a formação de cercárias que são também liberadas em coleções de água. O parasito neste estágio larvário é o agente penetrante na pele ou mucosa dos hospedeiros definitivos. Após penetração, a cercária sofre transformações bioquímicas e morfológicas e se torna esquistossômulo, que atravessa a epiderme, atinge a derme, invadindo vasos preferencialmente venosos; os parasitos são carregados passivamente para o coração, de onde são bombeados para os pulmões, retornando ao coração e sendo então bombeados para circulação sistêmica. Os esquistossômulos perfazem dois ou três ciclos sistêmicos até ficarem retidos nos sinusóides hepáticos, onde se desenvolvem devido aos estímulos do soro portal, e amadurecem sexualmente, a partir de complexas interações moleculares entre os sexos. No sistema porta-hepático intestinal, as fêmeas maduras passam a liberar ovos, que amadurecem nos tecidos do hospedeiro vertebrado, sendo elementos importantes na patogênese da esquistossomose e, uma vez eliminados nas fezes, dão continuidade ao ciclo biológico do parasito (Andrade & Azevedo, 2008). A figura 2 é representativa dos principais eventos ocorridos ao longo do ciclo de vida do parasito.

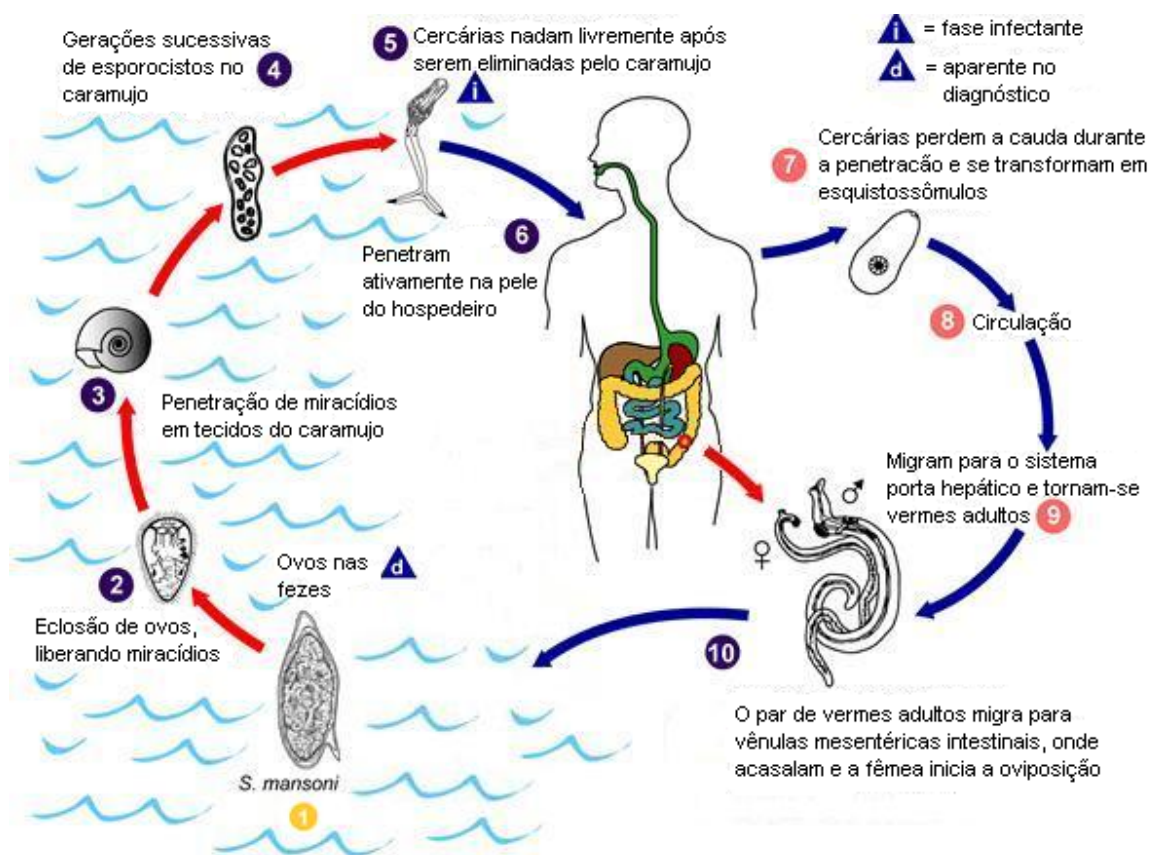
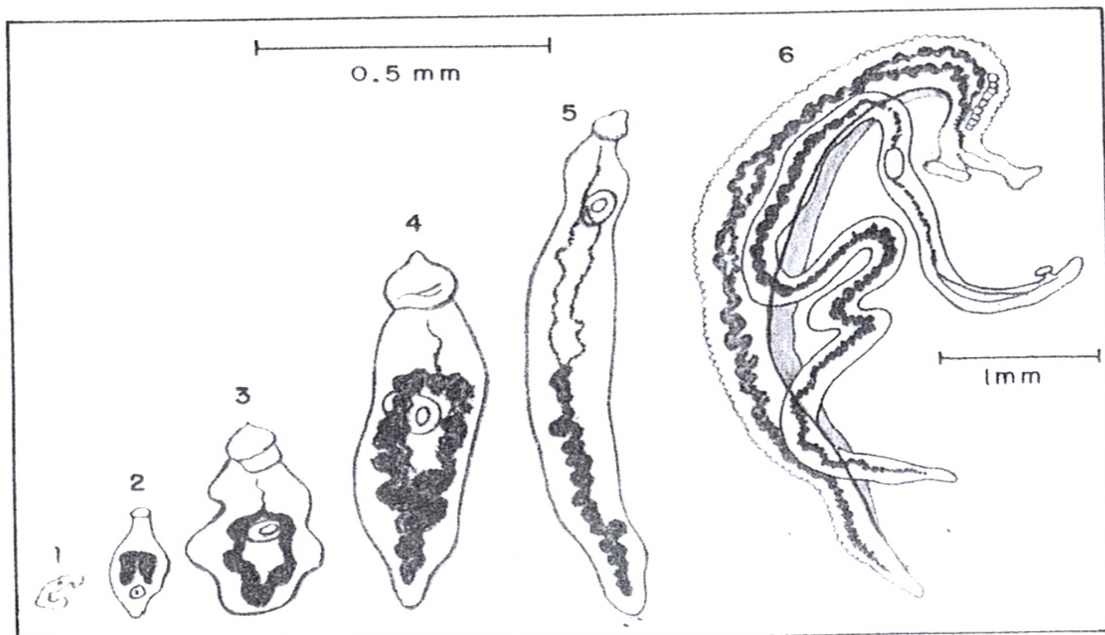


Figura 2: ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*. Adaptado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Schistosomiasis.htm>

Durante o desenvolvimento no hospedeiro definitivo, o *S. mansoni* passa por seis estádios evolutivos, quando são observadas alterações morfológicas e grande crescimento corporal. A realização de infecção experimental de ratos, coelhos e macacos *Rhesus* mostrou que o desenvolvimento ocorre de forma assincrônica (Faust *et al*, 1934).

Barbosa e colaboradores, 1978 estabeleceram critérios morfológicos que permitiram classificar o parasito do 1º ao 6º estágio (Figura 3), a saber: Esquistossômulos de estágio 1 - recém-chegados dos pulmões apresentando formação inicial do ceco, visualizada com pigmentação escura devido a presença de sangue semi-digerido do hospedeiro. Somente uma pequena área escura (sangue semi-digerido), que representa o início do ceco. Este estágio tem uma curta duração. Estádio 2 - ceco bifurca, não ultrapassando o acetábulo. Estádio 3 - mancha escura bifurcada ultrapassa o acetábulo e se religa depois dele. Estádio 4 - mancha escura na porção reconectada

começa crescer para extremidade do parasito, mas não é maior que sua parte bifurcada. Estádio 5 – parasito possui o final ligado do ceco maior que a parte bifurcada, mas ainda menor que três vezes seu tamanho final. Estádio 6 - adultos jovens e maduros com ceco completamente desenvolvido, sendo três vezes maior que no 5º estágio.



Fonte: Barbosa et al 1978

Figura 3: Representação esquemática das etapas do desenvolvimento dos esquistossômulos.

A esquistossomose mansoni é decorrente da resposta inflamatória granulomatosa que ocorre ao redor dos ovos vivos do parasito (Bogliolo, 1959; Warren, 1968).

A doença se apresenta no homem sob uma fase aguda e fase crônica. A fase aguda se caracteriza por manifestações clínicas que incluem febre, prostração, diarreia e eosinofilia, sendo associada a uma imunopatologia exacerbada, com granulomas maiores do tipo necrótico exudativo. Surge, geralmente, com o início do aparecimento de ovos nas fezes e dura até 120 dias após infecção (Diaz-Rivera et al, 1956; Ferreira et al, 1966).

A fase crônica da doença pode se manifestar sob formas diferentes entre intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica. A forma intestinal, na maioria dos casos é benigna,

com predomínio de granulomas nodulares, queixas por parte do paciente de dores abdominais, com diarreia mucossanguinolenta, ou mesmo constipação em períodos intercalados e longos. As manifestações hepáticas surgem com início da oviposição e formação de granulomas, dependendo, portanto, o número de ovos que chegam ao órgão, bem como da intensidade da resposta granulomatosa. O fígado apresenta-se inicialmente aumentado e doloroso a palpação. Em fase mais adiantada, o órgão pode estar menor e fibrosado e nessa fase há um quadro de fibrose, com neo-formação conjuntivo-vascular ao redor de vasos portais, e consequente manutenção do parênquima hepático. A endoflebite e fibrose periportal causadas pelos granulomas provocam obstrução de ramos intra-hepáticos da veia portal, e consequente hipertensão portal. Nas formas hepatoesplênicas mais graves observa-se ascite e consequente esplenomegalia, causada por alterações hemodinâmicas, principalmente a hipertensão. A hiperplasia inicial do tecido reticular e do sistema monocítico fagocitário tem como causa um fenômeno imunoalérgico, com proliferação basofílica, coincidente com elevação de imunoglobulinas, causados principalmente pela congestão passiva da veia esplênica do sistema porta e distensão de sinusóides. O desenvolvimento de circulação colateral intra-hepática (*shunts*) e anastomoses no plexo hemorroidiano, umbigo, região inguinal e esôfago representam alternativas para compensar a hipertensão portal, sendo que a formação de “varizes esofagianas”, que podem se romper, causa uma hemorragia, muitas vezes fatal (Andrade & Azevedo, 2008; Melo & Coelho, 2005).

Na maioria dos indivíduos infectados que vivem em áreas endêmicas a forma habitual da doença é leve, sendo os mesmos assintomáticos ou apresentando queixas vagas, contudo, eliminando ovos viáveis nas fezes. A forma grave ou avançada da esquistossomose é caracterizada morfológicamente pela fibrose hepática periportal e em muitos casos há sinal de hipertensão porta: esplenomegalia e circulação colateral, a forma hepatoesplênica (Andrade & Azevedo, 2008).

Os métodos diretos para diagnóstico da esquistossomose detectam o parasito ou suas fases evolutivas ou moléculas, neste grupo incluem-se exames parasitológicos de fezes e biópsia retal, pesquisa de antígenos circulantes e reação da polimerase em cadeia (PCR). Já os métodos indiretos identificam evidências indiretas da presença do parasito, podendo ser por meio de aspectos clínicos, propedêutica clínica, reação

intradérmica e métodos sorológicos (Rabello et al 2008). O exame de amostras de fezes para detecção de ovos, como estabelecido na técnica de Kato-Katz (Katz et al, 1972) é o método mais utilizado mundialmente para diagnóstico da esquistossomose intestinal (Bergquist, 2008).

O tratamento específico da esquistossomose causada pelo *S. mansoni* só é estabelecido quando é comprovada a infecção pela presença de ovos viáveis de parasitos nas fezes e/ou eventualmente nos tecidos (Enk et al, 2008).

O Praziquantel (produzido por Farmanguinhos - Fundação Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ) é o fármaco atualmente disponível para tratamento da esquistossomose no Brasil. Além de possuir custo mais acessível recomendado pela organização mundial da saúde para o tratamento da doença (WHO, 2006).

Diferentemente de outros helmintos e de organismos mais primitivos, o *S. mansoni* consegue atingir notáveis índices de longevidade, vivendo no sistema sanguíneo porta hepático do hospedeiro definitivo por períodos até superiores a 38 anos (Harris et al., 1984). Este fato reflete bem a notável capacidade adaptativa do parasito às atividades de defesa, inerentes ao sistema imunológico do hospedeiro, com o desenvolvimento de estratégias de escape e sobrevivência (Clegg et al, 1971b; Rocha & Coelho, 1980; Smithers & Terry, 1969). A dependência de células do sistema imunológico do hospedeiro, do tipo T CD4+, para desenvolvimento do parasito é um bom exemplo da complexa e sofisticada estratégia adaptativa desenvolvida pelo parasito (Davies et al, 2001; Lamb et al, 2010).

Ao longo de milhares de anos de desenvolvimento, por influências de diferentes pressões seletivas e em função da co-evolução parasito-hospedeiro, o *S. mansoni* adquiriu outros notáveis processos adaptativos, como a capacidade de produzir ATPases, produzir substâncias com ação inibitória da agregação plaquetária (Faria-Pinto et al, 2004) e outras substâncias com ação inibitória da coagulação sanguínea, principalmente relacionadas a fatores de coagulação dependentes de vitamina K (Carvalho et al, 2005), bem como a produção de substâncias vasodilatadoras por machos (Vasconcelos et al, 1993).

A incorporação de proteínas do hospedeiro para mascarar epítopos do verme adulto contra a resposta imunoprotetora do hospedeiro é também um mecanismo previamente investigado e que constitui parte da adaptação do parasito, permitindo-o sobreviver por longos períodos infectando o hospedeiro definitivo (Clegg et al, 1971a). Neste contexto, a aquisição de um fator eritrocitário humano, inibidor da lise celular mediada pelo complemento (DAF – *Decay-accelerating factor*), é um mecanismo adicional, adotado pelo parasito para evitar danos extensivos em suas membranas, que poderiam leva-los rapidamente à morte, interrompendo a cadeia de eventos da infecção (Hoffman, 1969; Hoffmann, 1969; Ramalho-Pinto, 1987; Ramalho-Pinto et al, 1992).

Estudos para explorar a importância de diferentes proteínas, determinantes do desenvolvimento do parasito, são regularmente delineados e cada vez mais são incorporadas novas tecnologias, que aumentam consideravelmente a quantidade de dados gerados e o número de moléculas analisadas por estudo. Tais tecnologias envolvem o conhecimento e aprimoramento de dados do genoma do parasito, bem como estudos de transcriptomas e proteomas deste em condições que busquem simular o que acontece nas diferentes fases de seu ciclo evolutivo.

1.2 Passagem de *S. mansoni* através da pele do hospedeiro definitivo – o estágio de “esquistossômulo de pele”

As pesquisas cujo objetivo central é a procura de antígenos ou esquemas imunizantes, que poderiam resultar em vacina, partem do pressuposto que os vermes ainda imaturos, principalmente nas fases de pele e pulmão, seriam os alvos preferenciais da resposta imune adquirida. Nessas pesquisas, que visam o desenvolvimento de novos fármacos e a busca por antígenos como candidatos à vacina, se tem usado como matéria prima esquistossômulos transformados *in vitro* e cultivados artificialmente, tentando simular o que ocorreria no ambiente do hospedeiro definitivo (LoVerde, 1998; Wilson & Coulson, 2009; Mansour & Bickle, 2010). Evidentemente, os estudos com parasitos transformados e cultivados *in vitro* possuem enormes vantagens logísticas no que diz respeito a relativa facilidade em se obter biomassa, em boas condições de esterilidade do material, tanto nas fases mais desenvolvidas quanto nas fases iniciais de desenvolvimento do *S. mansoni*. Entretanto, é muito importante que se discuta e

mostre as limitações de extrapolar resultados obtidos a partir de parasitos artificialmente transformados e cultivados com aqueles realizados utilizando parasitos obtidos pela via natural de infecção, isto é, através da penetração através da pele, o que representa um grande desafio para a produção desses organismos em massa, em condições estéreis.

Diferenças marcantes já foram descritas entre os esquistossômulos transformados *in vitro* e os obtidos da pele do hospedeiro. Barbosa e colaboradores (1978) demonstraram que os esquistossômulos permanecem até 3 dias no local da penetração da cercária na pele, antes da migração para os pulmões. Provaram esse fato por remoção cirúrgica da pele do camundongo no local da infecção. Até 3 dias após a infecção, a remoção da pele do local da infecção resultou na ausência absoluta de vermes adultos no sistema porta hepático 40 dias após. Assim, concluiu-se que o parasito necessita de aproximadamente 3 dias para se adaptar às condições do novo ambiente no hospedeiro vertebrado para prosseguir sua migração.

Trabalhos publicados, principalmente a partir da década de 70, mostraram várias diferenças entre esquistossômulos transformados *in vitro* e obtidos da pele (Kusel et al., 1984; Samuelson et al, 1980; Smith & Kusel, 1979; Brink et al, 1977). Grande percentual dos esquistossômulos transformados *in vitro* é morto pela via alternativa do sistema do complemento (Machado et al, 1975). O esquistossômulo obtido *in vitro* é resistente em meio isotônico e mantém o conteúdo das glândulas pré e pós acetabulares, ao contrário de quase todos os obtidos da pele, excreta o conteúdo glandular (Gazzinelli et al, 1972). A resistência dos esquistossômulos *in vitro* ao meio isotônico e a suscetibilidade ao sistema do complemento se deve à permanência, em parte dos organismos, do glicocálix da cercária, que é perdido no processo de penetração da pele e que é alvo do sistema imune e ainda impermeabiliza os organismos evitando a morte por endosmose na água (Samuelson & Caufield, 1985). Também após a transformação mudanças metabólicas marcantes acontecem, uma vez que o metabolismo da cercária que é anaeróbico se torna aeróbico nos esquistossômulos (De Oliveira et al, 1975).

A comparação da evolução, morfogênese e ganho de massa dos parasitos em condições *in vitro* e *in vivo* mostra diferenças dramáticas entre estas duas condições. Os esquistossômulos transformados e cultivados *in vitro* apresentam um desenvolvimento e ganho de tamanho muito mais acentuado até a 1ª semana de

cultivo, enquanto os parasitos da infecção natural que estão que na pele e pulmão praticamente não ganham biomassa, entretanto, os esquistossômulos, após atingirem o sistema porta-hepático, apresentam um crescimento exponencial e uma morfogênese muito mais acelerada, ultrapassando rapidamente aquele observado nos organismos cultivados *in vitro* (Michalick et al, 1979).

Já foi descrito em dois protozoários que a atividade *in vitro* de transportadores de purina é diferente do verificado *in vivo* (Koning et al, 2000). Estudo com *Plasmodium* (parasito causador da malária) demonstrou que a atividade de mitocôndrias *in vivo* depende do estágio de desenvolvimento e da localização do eritrócito infectado no hospedeiro, um resultado que é diferente do observado *in vitro* (Daily et al, 2007). Estudos realizados por nosso grupo de pesquisas permitiram verificar que a absorção de macromoléculas por cercárias, durante o processo de penetração, ocorre dentro de minutos e continua por pelo menos três horas. Existem fortes evidências de que essa absorção ocorre através do nefridioporo (poro de saída do sistema excretor) e a partir desse ponto se difunde ao longo do parasito. Essa difusão pode ocorrer devido ao aumento da permeabilidade das células do tecido, especialmente *in vivo* e por meio de junções Gap. Ainda não se sabe se é possível ocorrer entrada de moléculas através de poros presentes na superfície da membrana (Thornhill et al, 2010). A existência desses poros tem sido sugerida por outros autores (Braschi et al, 2006), podendo esses aparecer durante a migração do parasito pelo tecido do hospedeiro. Suas propriedades poderão ser estudadas utilizando métodos sugeridos por Kusel e colaboradores (2007). Em trabalho não publicado, realizado por Kusel (comunicação pessoal), demonstrou-se que cercarias adquirem, durante a penetração na pele, macromoléculas de <20 kDa por meio de um mecanismo que envolve o chamado poro excretor e, possivelmente, os poros da membrana de superfície. Assim, acredita-se que durante a penetração do parasito na pele, uma interface parasito/hospedeiro se estabeleça e que por estimulação causada tanto por moléculas do hospedeiro quanto outras do parasito possa induzir novas vias de sinalização.

Evidências de que glicanos são moléculas importantes para a interação parasito/hospedeiro sugerida acima tem sido mostradas em diferentes trabalhos (Nyame et al, 2003; Hokke et al, 2007a,b; Wuhler et al, 2000; 2006). Tais glicanos podem estar ligados a proteínas ou lipídios, expostos na superfície de diferentes estádios do ciclo de vida do *Schistosoma* - cercárias, esquistossômulos, vermes

adultos, ovos e miracídios - (Van Diepen et al, 2012). A maior parte da resposta de anticorpos do hospedeiro frente à infecção é direcionada contra carboidratos ou antígenos glicanos do *Schistosoma* (Cummings & Nyame, 1999; Nyame et al, 2000; Wuhrer et al, 2000). Assim, as glicoproteínas do parasito constituem alvos potenciais da resposta imune contra a infecção. A estrutura da porção glicídica de vários glicoconjugados do *Schistosoma* tem sido elucidada utilizando espectrometria de massa (MS), anticorpos monoclonais (mAbs), em associação com estudos de transcriptoma e proteoma, permitindo a identificação direta desses antígenos do *Schistosoma* (Nyame et al, 1999; 2000). O processo de transformação das cercárias em esquistossômulos também gera alterações nos glicanos que são expostos na superfície do parasito e, por isso, estas moléculas devem ser investigadas nos estudos que visam o desenvolvimento de novos fármacos e a descoberta de vacinas contra a esquistossomose. Nyame e colaboradores (2003), utilizando mAbs contra N-glicanos complexos (LDN e LDN-F) e um N-glicano Lewis x poliédrico (Le^x) demonstraram que os antígenos de glicano ocorrem em várias glicoproteínas de cercárias, esquistossômulo de 3h, 48h, e de pulmão, vermes adultos e ovos de *S. mansoni*, ou seja, são expressos na superfície do tegumento do parasito em todas as fases de desenvolvimento no hospedeiro vertebrado. Esta localização na superfície do tegumento interfere no reconhecimento e na interação parasito/hospedeiro (Hokke & Yazdanbakhsh, 2005).

Considerando que praticamente todos os trabalhos recentes utilizando biologia molecular, genômica, expressão gênica, proteômica, imunologia e bioquímica tem utilizado esquistossômulos transformados e cultivados *in vitro* é evidente a necessidade de estudos que melhor caracterizem as semelhanças e diferenças entre os parasitos obtidos por métodos mecânicos e os obtidos pela penetração ativa de cercárias em pele de hospedeiro, o que mais se assemelha ao processo que ocorre na infecção natural. Além disso, a dificuldade no desenvolvimento de vacinas contra doenças parasitárias e na produção de medicamentos eficazes podem ser parcialmente explicados pela falta de conhecimento da estrutura e função de organelas do parasito, de suas moléculas e do seu metabolismo *in vivo*. Neste contexto, o esquistossômulo de pele, bem como, o esquistossômulo transformado *in vitro*, expostos a diferentes condições, se mostram importantes para a compreensão do desenvolvimento do parasito.

1.3 Desenvolvimento de *S. mansoni* no sistema porta hepático do hospedeiro definitivo

O achado de que, em seu ciclo de vida, o *S. mansoni* inicia o crescimento expressivo e ganho de biomassa apenas quando atinge vasos do sistema porta hepático do hospedeiro foi anteriormente reforçado por Barbosa e colaboradores em 1978, que mostraram que vermes presos em vasos sanguíneos do sistema pulmonar de camundongos permaneciam imaturos por meses após a infecção, enquanto aqueles que atingiam vasos do sistema porta hepático apresentavam crescimento exponencial (Barbosa et al, 1978). Posteriormente Rocha et al, em 1980, corroboraram este achado, mostrando que esquistossômulos transformados *in vitro*, quando diretamente inoculados na veia portal de camundongos, em procedimento cirúrgico, iniciavam a eliminação de ovos cerca de 7 dias antes de vermes derivados da infecção transcutânea natural (Rocha & Coelho, 1980). Este período de 7 dias corresponde ao tempo necessário para que esquistossômulos migrem da pele aos pulmões e, de lá, atinjam os vasos do sistema portal na infecção natural pelo parasito. Um estudo posterior mostrou um aumento significativo na taxa de proliferação celular de esquistossômulos derivados de camundongos, cultivados em presença de soro humano portal quando comparado a parasitos do mesmo estágio, cultivados em presença de soro periférico humano (Shaker et al, 1998). O efeito estimulante foi atribuído a frações proteicas do soro portal humano com pesos moleculares na faixa de 1kDa e 50kDa. Este achado foi confirmado em um estudo mais recente, empregando soros portal e periférico de outro hospedeiro definitivo altamente susceptível, o hamster, e empregando um método sensível de determinação da taxa de proliferação celular por incorporação de nucleotídeo modificado (bromodesoxiuridina – BrdU) (Draz et al, 2008). Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisas empregou metodologia idêntica e mostrou que na presença de soro portal do hospedeiro susceptível, Hamster, a taxa de proliferação celular em esquistossômulos de *S. mansoni* é também mais elevada, quando comparado a presença de soro periférico desse hospedeiro, e que a fração proteica com peso molecular de 20 kDa preserva esse efeito estimulante (Shaker et al, 2011).

O processo de proliferação celular do parasito no soro portal do hospedeiro definitivo pode estar relacionado à abundância de algum constituinte neste soro em relação à sua baixa concentração ou ausência no soro periférico. Também, a grande disponibilidade de nutrientes já processados e prontos para utilização metabólica, como parte da condição típica do sistema porta hepático. Embora os principais estudos supracitados reiterem a presença de um fator estimulante, nenhum deles evidencia a importância de algum gene, ou família de genes, diretamente ligados ao processo, que possa então determinar a evolução do parasito de seu estágio de verme imaturo até verme adulto. Estes, macho e fêmea, se acasalam e inicia-se a postura de ovos, elementos estes determinantes da patogenia da esquistossomose.

A alta taxa de proliferação ao nível celular e de crescimento que o parasito atinge neste estágio de desenvolvimento apontam para esta fase do ciclo evolutivo do parasito como de elevado potencial para exploração em estratégias de busca de novos fármacos, que atuem nas fases iniciais da infecção, evitando a patogenia da doença, representada pela deposição de ovos no fígado do hospedeiro (Fitzpatrick et al, 2009).

Além das iniciativas voltadas ao estudo do genoma e determinação de transcriptomas do parasito, estudos ao nível de proteomas permitiram a identificação de receptores e proteínas intracelulares que atuam como transdutores de sinal e induzem mudanças morfológicas e funcionais importantes ao processo de adaptação, desenvolvimento e diferenciação celular, como atividade mitótica, motilidade, atividade fagocítica, bem como liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em diferentes estágios do ciclo evolutivo do parasito (Bahia et al, 2006; Zahoor et al, 2009). A identificação e caracterização de moléculas diretamente envolvidas em processos, como os citados, é importante não apenas para o estudo do desenvolvimento do parasito, como também para elucidar aspectos essenciais da interação parasito/hospedeiro durante a infecção por *S. mansoni*.

1.4 Estudos de genômica e de transcriptomas de *S. mansoni*

O genoma do *S. mansoni* contém 363 milhões de pares de bases, distribuídos em sete pares de cromossomos autossômicos e um par sexual, sendo fêmeas heterogaméticas (ZW) e machos homogaméticos (ZZ) para este par. Aproximadamente 40% do genoma é constituído de sequências repetitivas, e foram identificadas 72 famílias de transposons, compreendendo aproximadamente 20% do genoma (Berriman et al, 2009).

O genoma codifica 11.800 genes em 13.100 transcritos, possuindo grandes íntrons, com tamanho médio de 4,7Mbp e éxons muito menores, com extensão média de 217pb. Os íntrons de regiões 5' são menores que íntrons de regiões 3', o que sugere um controle transcricional atípico quando comparado a outros eucariotas (Berriman et al, 2009).

Embora a qualidade e curadoria dos dados anotados no genoma sejam sempre controladas nas versões publicadas, combinações de novas tecnologias de sequenciamento tem sido utilizadas para melhorar a confiabilidade das montagens do genoma, bem como levantar informações importantes acerca da organização estrutural e funcional dos genes. Nesse sentido, uma versão mais atualizada do genoma foi obtida de clones de vermes de *S. mansoni*, empregando sequenciamento de nova geração (NGS) de bibliotecas para obter transcriptomas de parasitos de 4 estádios diferentes do parasito (Protasio et al, 2012). Nesta versão o número de genes encontrados foi de 10.852, uma vez que foram identificados eventos de *trans-splicing* em pelo menos 11% dos genes já anotados da versão anterior, o que resultou em melhoria na resolução da estrutura de transcritos policistrônicos. Ainda nessa nova versão foi construído um mapa de alta resolução de mudanças temporais no perfil de expressão de 9.535 dos genes.

Acessar as informações do genoma é imprescindível para os avanços em relação a diversos aspectos da esquistossomose, tanto no âmbito das possibilidades de tratamento medicamentoso, quanto do diagnóstico, principalmente das formas pré-patentes do parasito, bem como na busca de novos candidatos vacinais, embora este seja um objetivo que para ser atingido demande ainda superação de maiores desafios. Assim, diferentes trabalhos se apoiam nas informações do genoma para definir sítios

genéticos relacionados a especificidade e virulência, bem como resistência aos fármacos disponíveis para o tratamento (Valentim et al, 2009).

O estabelecimento de bancos de dados de genoma do *S. mansoni*, integrando dados sobre o metabolismo do parasito e oferecendo ainda ferramentas para diversas análises de bioinformática, como os bancos de dados SchistoDb (Zerlotini et al, 2009) e GeneDB (<http://genedb.org>), foi de fundamental importância para estudos sobre potenciais para o desenvolvimento de novos fármacos e candidatos vacinais para tratamento da doença. A versão do SchistoDb, recentemente disponibilizada (Zerlotini et al, 2013), além de permitir acesso aos dados mais recentes da anotação do *S. mansoni*, permite também acesso aos dados de anotação dos genomas de outras duas espécies do gênero *Schistosoma* de importância médica, *S. haematobium* (Young et al, 2012) e *S. japonicum* (Consortium, 2009). Essa implementação permite, assim, realizar análise integrada de dados para o gênero *Schistosoma* e oferece novas ferramentas para estudar e analisar domínios proteicos, realizar associações entre termos de ontologias gênicas, predição de peptídeo sinal, de domínios trans-membrana e de janelas abertas de leitura, bem como realizar BLAST contra os bancos de dados além de predição de ortólogos.

Dada a notável complexidade das interações que o parasito estabelece com seus hospedeiros, buscando adaptação e escape dos mecanismos de defesa destes, a regulação da expressão de genes em momentos diferentes dos variados estádios do ciclo de vida de *S. mansoni* é tarefa vital. Diversos estudos de transcriptomas, realizados em diferentes condições temporais, tem gerado informações quantitativas importantes sobre os níveis de expressões de genes, facilitando a compreensão científica desses mecanismos adaptativos do parasito. Para construir os transcriptomas de *S. Mansoni*, diferentes metodologias vêm sendo historicamente exploradas em um considerável número de estudos, envolvendo as etiquetas de sequências expressas (ESTs) (Franco et al, 2000); etiquetas de sequências expressas em janelas abertas de leitura (ORESTES) (Verjovski-Almeida et al, 2003), análise seriada da expressão gênica (SAGE) (Ojopi et al., 2007; Williams et al, 2007) e microarranjos de DNA (Fitzpatrick et al, 2009; Parker-Manuel et al, 2011; Simões et al, 2011).

O estudo de genes diferencialmente expressos nas formas intravasculares do parasito no hospedeiro definitivo tem sido explorado em pesquisas, especialmente por estas formas serem consideradas as que possuem maior potencial para desenvolvimento de candidatos vacinais. Assim, diversas abordagens têm explorado a expressão gênica nos estádios de esquistossômulos e vermes adultos em condições variadas. Gobert e colaboradores estudaram o padrão de expressão gênica em esquistossômulos cultivados por 3 horas e por 5 dias em presença de eritrócitos (Gobert et al, 2010). O grupo usou um microarranjo de DNA, contendo sequências de 12,166 *contigs* únicos de *S. mansoni* e avaliaram os genes diferencialmente expressos entre esquistossômulos simulando a forma de pele (3 horas) e a forma pulmonar (5 dias) do parasito. A principal modificação transcricional foi observada em relação as ontologias gênicas atividade catalítica e a capacidade de ligação de proteínas, maiores no parasito de 5 dias.

1.5 Contribuições de métodos de Sequenciamento de Nova Geração (NGS)

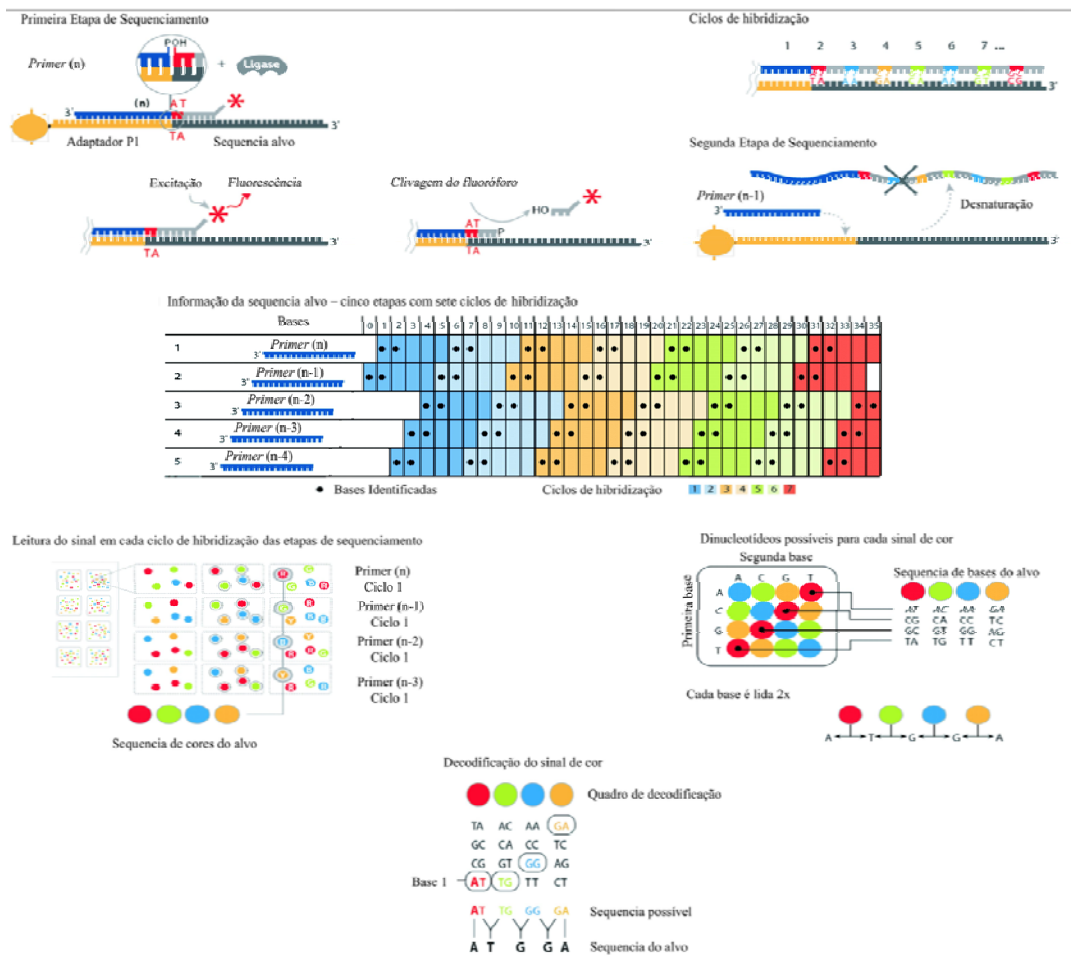
Os métodos NGS têm sido empregados em estudos atuais de transcriptomas integrais, sendo estas abordagens de alto rendimento (*high-throughput*) e quantitativas, com vantagens adicionais como: alta resolução de bases para os dados de anotação; acesso ao perfil de expressão gênica em escala genômica; e viabilidade financeira dos estudos que apresentam menor custo quando comparado a tecnologias como microarranjos ou método de Sanger para sequenciamento de larga escala (Wang et al., 2009). Os equipamentos se tornaram comercialmente disponíveis a partir de 2005 e causaram grandes impactos na pesquisa envolvendo genomas, uma vez que passaram a ser aplicados com objetivo de sequenciar novos genomas, re-sequenciar genomas, bem como em novas aplicações não exploradas pelos aparelhos baseados em sequenciamento Sanger (Morozova et al, 2008). As plataformas inicialmente disponíveis, Roche 454 FLX, Illumina Solexa Genome Analyzer, Applied Biosystems SOLiD[™] e Helicos Heliscope[™] incorporaram, cada uma, complexa interligação da química, enzimologia, ótica de alta resolução, software e hardware e tem facilitado largamente o trabalho de sequenciamento em todas as etapas quando comparado a metodologias automatizadas e multi-etapas empregadas nos métodos baseados em clonagem para sequenciamento de alto rendimento (Mardis et al, 2008).

A partir de 2008 centenas de publicações foram produzidas, objetivando identificar e refinar estrutura de genes, montar transcriptomas *de novo* ou mesmo obter transcriptomas completos, em escala genômica (Marioni et al, 2008; Mortazavi et al, 2008; Otto et al, 2010; Chaudhuri et al, 2011; Xia et al, 2011).

A plataforma SOLiD (*Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection*) emprega uma biblioteca de fragmentos ligados a adaptadores semelhante a outras plataformas NGS, além de uma etapa de PCR em emulsão, com partículas magnéticas para amplificar os fragmentos antes do sequenciamento. Diferente das demais plataformas, é a única que emprega uma DNA ligase na metodologia de sequenciamento (MkKernan et al, 2006; Mardis et al, 2008). Resumidamente, o processo se inicia pela fragmentação mecânica do DNA, sendo selecionados fragmentos entre 60 e 90pb, para as bibliotecas de *tag* única, ou fragmentos de 1-10Kb, para as bibliotecas de *tags* duplas (*mate-pair*). Os fragmentos são diretamente ligados a adaptadores universais em ambas as extremidades e, nas bibliotecas *mate-pair*, são circularizados e clivados por uma enzima de restrição que cliva o adaptador, liberando fragmentos formados por: 27 bases de uma região, mais a sequência dos adaptadores e mais 27 bases adicionais de outra região que está separada da primeira pela distância utilizada no intervalo de seleção dos fragmentos. O adaptador 1 é utilizado para anelamento do *primer* na PCR em emulsão. A amplificação da biblioteca permite a ligação dos fragmentos, por hibridização com sequências complementares aos adaptadores fixas a microesferas metálicas (*beads*), que são capturadas nas micelas da PCR em emulsão. As bibliotecas resultantes contêm milhões de moléculas contendo sequência alvo única, inteira. As microesferas são então ligadas a uma lâmina de vidro (*chip*) e em cada corrida são utilizadas duas lâminas (capacidade de acordo com a versão). O *chip* pode ser dividido em até oito áreas, permitindo a análise de oito bibliotecas diferentes e, alternativamente pode ser utilizado o sistema de código de barras, que possibilita a identificação das diferentes amostras distribuídas aleatoriamente sobre um mesmo *chip* não dividido. No analisador, as fitas molde ligadas às esferas são combinadas aos *primers* universais de sequenciamento, a enzima ligase e a um conjunto de sondas (1024 sondas). O sequenciamento é dividido em etapas, de acordo com o uso do *primer* universal que tem n bases na primeira etapa, $n-1$ bases na segunda etapa, e assim sucessivamente até a quinta etapa em que o *primer* possui $n-4$ bases. São também utilizadas, nas

reações de sequenciamento, sondas curtas randômicas, de oito nucleotídeos, marcadas com um dos quatro fluoróforos possíveis e em função do tipo de dinucleotídeo que apresentam na sua extremidade 3'. As únicas bases seletivas da sonda são a primeira e a segunda; a terceira, a quarta e a quinta base são degeneradas em todas as combinações possíveis. As bases 6, 7 e 8 são inosinas que carregam o fluoróforo marcador. Na primeira etapa, é adicionado o *primer* universal completo que se anela exatamente na extremidade do primeiro adaptador. A sonda que for complementar à sequência alvo dentro da mistura de sondas se hibridizará com a sequência molde e será ligada ao *primer* universal, pela ação da ligase. A fluorescência da sonda ligada é detectada, e o fluoróforo é clivado, deixando um grupo 5' fosfato disponível para reações adicionais. No próximo ciclo, adicionam-se novamente as sondas e a ligase para a leitura das próximas bases seletivas. Esses ciclos se repetem até que toda a sequência seja coberta. Na etapa seguinte, o fragmento é desnaturado e adiciona-se o segundo *primer* universal com n-1 bases, liberando desde a última base do adaptador para o sequenciamento. Novamente todos os ciclos com as sondas são realizados e esse processo é repetido produzindo uma leitura de 35 pb nas bibliotecas de *tag* única ou de 50pb nas bibliotecas *mate-pair*. As cinco etapas de sequenciamento são necessárias porque a cada ciclo de hibridização da sonda apenas a sequência do *primer* universal mais os grupos de dinucleotídeos marcadores das sondas que hibridizaram são conhecidos. Para descobrir o restante da sequência alvo, são necessárias, portanto, outras quatro etapas de sequenciamento usando o *primer* universal para o adaptador com uma base a menos no seu terminal 5' a cada etapa (n-1, n-2, n-3 e n-4). Assim, quando o *primer* n-1 for usado, por exemplo, a primeira sonda a se hibridizar fornecerá informação sobre a última base da sequência do adaptador e uma segunda informação da primeira base da amostra e assim por diante. Esse complexo processo ocorre sucessivamente, proporcionando dupla leitura para cada base e, como consequência, reduzindo muito a chance de erros de sequenciamento. Como cada sinal de fluorescência especifica um dinucleotídeo e não uma única base, a decodificação dos sinais de leitura é feita combinando-se os dados.

Essa complexa sequência de eventos pode ser visualizada na figura 4, que esquematiza as etapas dessa metodologia.



Fonte: Carvalho et al, 2010

Figura 4: Representação esquemática do sequenciamento na plataforma SOLiD.

Fragmentos de DNA são gerados e ligados ao primeiro adaptador (P1) que se liga a uma *bead*. Sequenciamento por hibridização de sondas fluorescentes com o alvo, em 5 etapas. 1) primer (n) é utilizado, liberando as primeiras bases da sequência alvo para hibridização com a sonda; 2) Uma das sondas encontrará sequência complementar no alvo ligando-se a ele; 3) Sinal de fluorescência é lido e; 4) As três últimas bases da sonda, incluindo o fluoróforo, são removidas; 5) A sequência fita dupla é desnaturada, e uma nova etapa de sequenciamento é iniciada com o primer (n-1), seguida de um segundo ciclo de hibridização e assim sucessivamente, até que o alvo seja todo coberto (35pb ou 50pb). Todas as combinações possíveis de dinucleotídeos são marcadas nas sondas com apenas 4 fluoróforos. Assim, duas leituras são necessárias de cada base para que a sequência do dinucleotídeo da sonda seja resolvida. O processo inicia-se com a identificação da 1ª base do alvo na 2ª etapa (primer n-1), que libera para hibridização com a sonda uma base já conhecida, a última base do adaptador.

A elevada eficiência e sensibilidade dessa plataforma, associada a possibilidade de análise de várias bibliotecas no mesmo chip, a tornam atraente para realização de estudos de transcriptomas em diferentes tipos de organismos (CLOONAN et al, 2008; PASSALACQUA et al, 2009; TANG et al, 2009).

Uma vez estabelecidas, as tecnologias NGS enfrentam desafios em bioinformática, especialmente no sentido de desenvolvimento de métodos de armazenamento, busca e processamento de grandes quantidades de dados, que precisam ser superados com vistas a reduzir erros de análise e *base-calling*, além de remover as *reads* de baixa qualidade (Wang et al, 2009).

Para análise dos dados de RNA-Seq, vários pacotes de programas foram introduzidos, incluindo métodos baseados em modelos estatísticos binomiais negativos como o edgeR (Robinson et al, 2010), DESeq (Anders & Hubers, 2010) e DESeq2 (Love et al, 2014), baySeq (Hardcastle et al, 2010), bem como abordagens baseadas em modelos não-paramétricos como NOIseq (Tarazona et al, 2011) e SAMseq (Li & Tibshirani, 2013), além de transformações das contagens de *reads* para modelos lineares, como no programa limma (Smyth, 2004) e também métodos baseados na detecção direta de transcritos, como nos programas Cuffdiff2 (Trapnell et al, 2013) e EBSeq (Leng et al, 2013). Contudo, atualmente não há ainda consenso sobre quais são as melhores práticas nesse sentido, e novas aplicações, bem como associações desses métodos estão em constante avaliação em relação a sua aplicabilidade.

O programa edgeR, bem como o baySeq, emprega método de Bayes, baseando-se em testes exatos no modelo estatístico binomial negativo para estimar as diferenças de expressão gênica. Uma diferença importante entre eles é que o segundo gera as probabilidades de diferenças em função da taxa de falso positivos - FDR (*False Discovery Rate*) e não em função de valores de significância.

O programa DESeq e sua versão mais recente, DESeq2, também usam modelo binomial negativo, semelhante ao edgeR, mas modelam a relação entre a média e a variância para estimar a dispersão dos dados. Os desenvolvedores mostraram que os programas DESeq e DESeq2 fornecem um bom parâmetro de estimativa direcionado pelos dados, levando a uma seleção balanceada dos genes diferencialmente expressos

dentro de toda a faixa da dinâmica de variações dos dados globais. Afirmam ainda que o método permite análise com alto grau de confiabilidade para experimentos com pequeno número de réplicas.

O programa NOseq modela a distribuição dos dados comparando as diferenças em *fold change* as diferenças absolutas entre amostras de mesma condição. O pacote SAMseq emprega uma abordagem baseada em permutações para estimar FDR, usando método estatístico não paramétrico (Wilcoxon). O Limma baseia-se em um modelo estatístico linear e foi originalmente desenvolvido para análise de microarranjos de DNA, sendo posteriormente adaptado para dados de RNAsseq. Cuffdiff 2 é uma adaptação do pacote Cufflinks, desenvolvido para identificar genes e transcritos diferencialmente expressos, revelando *splicing* diferencial e mudanças relacionadas a controle da expressão por promotores diferentes. EBSeq foi desenvolvido principalmente para identificar expressão diferencial de isoformas de genes, mas tem se demonstrado confiável para análises de expressão gênica, empregando também modelo binomial negativo.

Em trabalho recente, Seyednasrollah e colaboradores (2013) compararam o desempenho destes programas para análise de expressão diferencial de genes pelo emprego de bancos de dados reais, manualmente curados e corroboraram os resultados prévios obtidos a partir de dados sintéticos (Soneson & Delorenzi, 2013). Dentre as principais observações, DESeq mostrou desempenho relativamente conservador, ao passo que edgeR e EBSeq foram mais liberais. Limma rendeu geralmente bem em circunstâncias diversas e computacionalmente foi o mais rápido. A performance do baySeq foi altamente variável de acordo com variações dos bancos de dados. O pacote SAMseq só mostrou bom desempenho quando o número de réplicas era relativamente grande e NOseq e Cuffdiff 2, que não haviam sido testados no estudo com bancos de dados sintéticos, mostraram os piores desempenhos frente aos demais numa visão global.

Almeida e colaboradores (2011), empregando uma plataforma NGS, construiu transcriptomas de vermes adultos machos de *S. mansoni* e promoveu considerável incremento nos dados de anotação do genoma disponíveis até momento da publicação dos dados. Os resultados incluem uma cobertura 26% maior de bases do genoma

comparado as ESTs disponibilizadas no banco de dados do Centro Nacional de Informação em Biotecnologia (NCBI), além de confirmar pela primeira vez predições sem evidências transcricionais; corrigir predições com erros de anotação; descobrir *contigs* que mapearam em regiões intergênicas e intrônicas do genoma; e ainda descobrir 11 novos genes de Micro-éxons (MEGs).

Protasio e colaboradores (2013), em estudo recente, empregou também tecnologia NGS, a plataforma Illumina Genome Analyzer Iix, para acessar genes diferencialmente expressos entre esquistossômulos recém transformados por dois métodos diferentes: transformação mecânica, com melhorias sobre o método original (Brink et al, 1977) e transformação usando pele de camundongo a partir de adaptações do método descrito inicialmente por Clegg (Clegg & Smithers, 1972). Após análise, os dados apontaram apenas 38 genes, dentre os aproximadamente 11.800, diferencialmente expressos entre os esquistossômulos obtidos pelos dois métodos diferentes. Assim, os autores mostraram que, no nível da transcrição gênica, os esquistossômulos mecanicamente obtidos para estudo em várias pesquisas são idênticos aos esquistossômulos de pele, obtidos por um processo mais próximo do que ocorre na infecção natural do hospedeiro definitivo.

Assim, a facilidade de se obter amostras representativas dos estádios intravasculares do parasito é fator determinante para delineamento de estudos que visem elucidar a importância de eventos bem estabelecidos ao longo de seu ciclo vida, bem como de processos ao nível celular que justifiquem a longevidade do parasito no organismo do hospedeiro.

A simulação de diferentes condições do organismo do hospedeiro no curso da infecção por *S. mansoni* vem sendo empregada para estudos *in vitro* sobre importância de diferentes genes na relação parasito-hospedeiro. Nesse sentido, esquistossômulos de pele (equivalente à recente penetração transcutânea no hospedeiro) e pulmonar (equivalente ao parasito por ocasião de sua passagem pelos pulmões), bem como vermes adultos do parasito são estádios amplamente explorados para estudos de caracterização estrutural e funcional de genes em *S. mansoni*.

O conteúdo exposto acima justifica, portanto, o emprego de uma metodologia disponível no Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ MG para estudo de

transcriptomas do *S. mansoni* em condições semelhantes a algumas encontradas pelo parasito no organismo do hospedeiro definitivo. O acesso ainda a diferentes ferramentas *in silico* que permitem estimar com confiabilidade os níveis de expressão de genes também fomenta esta iniciativa, da qual os resultados podem contribuir sobremaneira para a compreensão de processos decisivos na adaptação do parasito ao organismo do hospedeiro, bem como servir de informação de suporte em outras pesquisas em busca de novos fármacos mais efetivos para estádios imaturos de vermes.

2.1 Objetivo Geral

Estudar as diferenças moleculares em esquistossômulos obtidos por transformação mecânica e por penetração de cercárias em pele de hospedeiro definitivo e submetidos a diferentes condições de cultura, visando simular momentos específicos do ciclo de vida do parasito e compreender melhor a importância das moléculas estudadas em processos determinantes da relação parasito/hospedeiro definitivo.

2.2 Objetivos Específicos – Primeira Parte (Comparação de esquistossômulos mecânicos e de pele)

2.2.1. Comparar a permeabilidade da membrana nas superfícies corporais de esquistossômulos de *S. mansoni* mecanicamente transformados aos obtidos da pele de camundongo (*Mus musculus*), empregando sondas fluorescentes;

2.2.2. Comparar a permeabilidade da membrana de organelas intracelulares de esquistossômulos de *S. mansoni* mecanicamente transformados aos obtidos da pele de camundongo (*M. musculus*), empregando sondas fluorescentes;

2.2.3. Comparar a imuno localização de glicanos na superfície corporal de esquistossômulos de *S. mansoni* empregando anticorpos obtidos por eluição ácida de diferentes soros;

2.3 Objetivos Específicos – Segunda Parte (Comparação de esquistossômulos mecânicos cultivados em presença de soro portal e periférico)

2.3.1. Sequenciar e comparar os transcritos de bibliotecas de cDNA de esquistossômulos de *S. mansoni* obtidos de culturas de 3 horas e 12 horas na presença de soro portal e periférico de hamster (*Mesocricetus auratus*), sem adição de soro fetal bovino, utilizando uma plataforma NGS SOLiD™ (*Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection*) - Applied Biosystems;

2.3.2. Determinar e analisar os transcritos diferencialmente expressos entre as bibliotecas de esquistossômulos cultivados em soro portal e as bibliotecas de esquistossômulos cultivados em soro periférico de hamster, pelo emprego de

ferramentas de bioinformática e bioestatística, bem como informações de banco de dados do genoma do *S. mansoni* (GeneDB e SchistoDb);

2.3.3. Validar as diferenças no padrão de expressão dos transcritos entre esquistossômulos cultivados em soro portal e periférico de hamster, por meio da análise quantitativa da expressão de genes usando a técnica da Reação da Polimerase em Cadeia Quantitativa - PCR em tempo real (qPCR).

3 Materiais e Métodos

Para contemplar os objetivos, o delineamento foi dividido em duas partes, sendo que na primeira foram relacionados os experimentos de comparação de esquistossômulos mecanicamente transformados aos transformados usando pele de camundongo. Na segunda, foram relacionados os experimentos relativos a comparação entre esquistossômulos mecanicamente transformados e cultivados em presença de soro portal e soro periférico de hamsters.

Nas figuras 5 e 6 a seguir pode-se observar uma representação esquemática das etapas experimentais, em que são diferenciados os procedimentos realizados nas duas partes mencionadas.

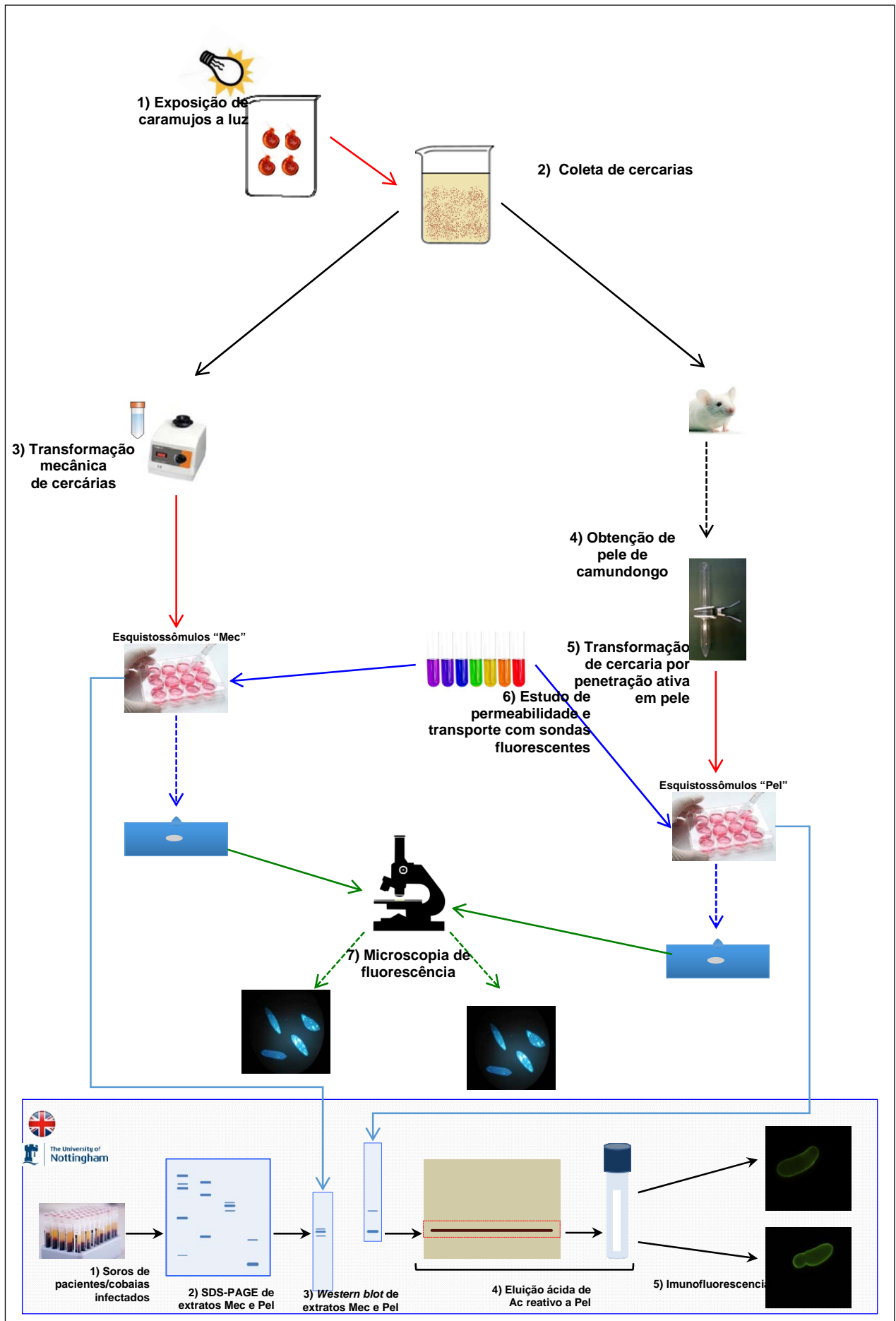


Figura 5: Delineamento para estudo de esquistossômulos de pele e mecânicos

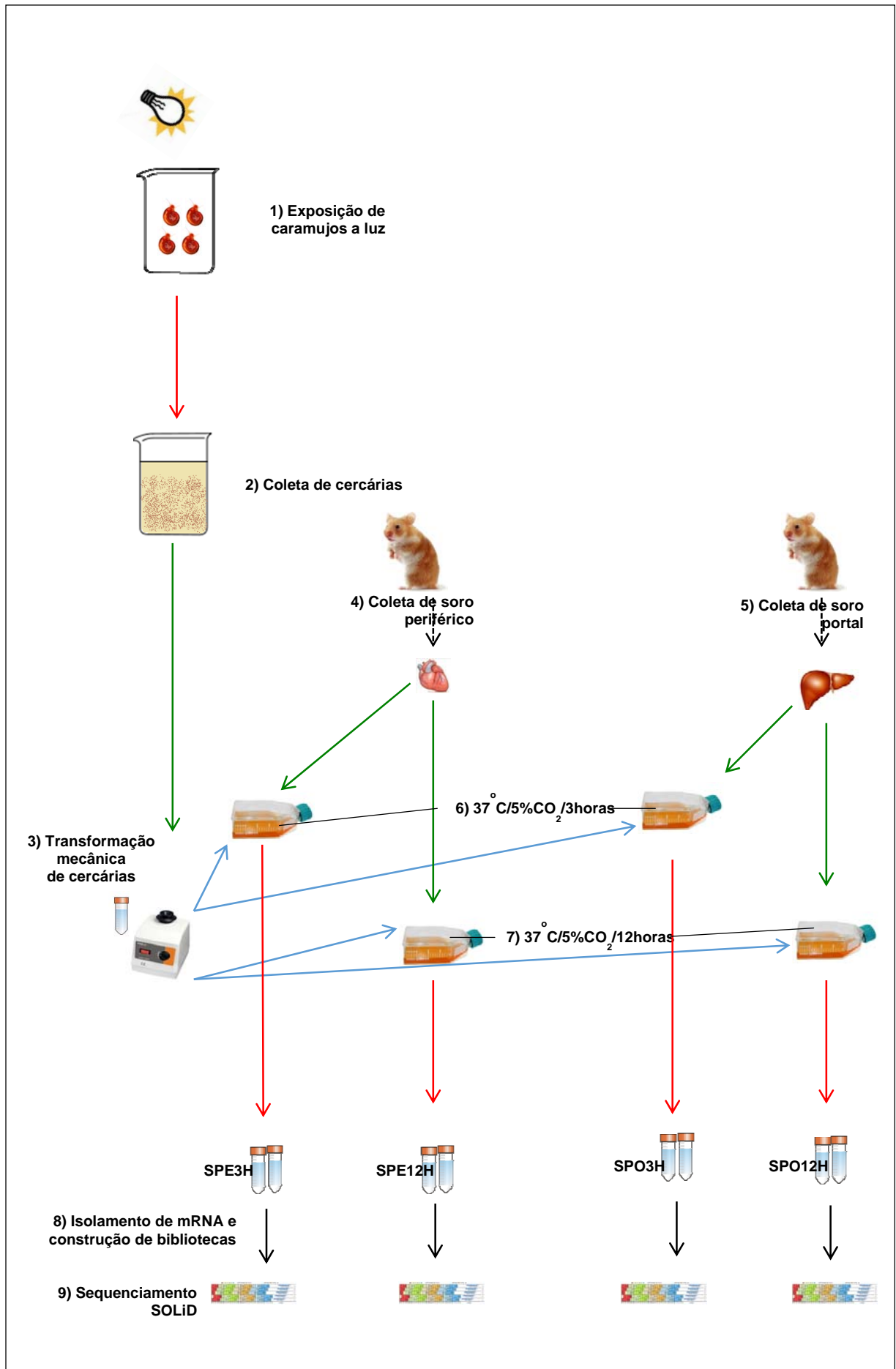


Figura 6: Delineamento para esquistossômulos em soro portal e periférico.

3.1 Parasitos

Os esquistossômulos foram obtidos por meio de transformação mecânica, *in vitro* a partir de cercárias de *S. mansoni* da cepa LE (Belo Horizonte), cujo ciclo é mantido rotineiramente em caramujos da espécie *B. glabrata*, e camundongos albinos no Centro de Pesquisa René Rachou/ FIOCRUZ MG. O ciclo evolutivo desta linhagem está sendo mantido a mais de 35 anos no Centro de Pesquisas René Rachou.

Para a obtenção de esquistossômulos por método mecânico (Mec) foi utilizada a técnica de separação descrita por Ramalho-Pinto e colaboradores, 1974, com adaptações. Os frascos contendo cercárias recolhidas em água livre de cloro foram mantidos em banho de gelo por 30 minutos para decantação, sendo o conteúdo distribuído em tubos do tipo Falcon de 50 ml, que foram submetidos a centrifugação a 1.500 RPM (Rotações Por Minuto) por 3 minutos a 4 °C. O *pellet* de parasitos foi suspenso em 5 ml do meio mínimo, adicionado de tampão HEPES (N-(2-hidroxi-etil) piperazina-N'-(2-ácido etanossulfônico)) com pH de 7,4 (meio MEM-HEPES). Os *pellets* de 4 tubos foram agrupados e novamente submetidos à centrifugação, sendo o conteúdo novamente suspenso em 5,0 ml do meio MEM-HEPES. A suspensão foi submetida a 2 ciclos de agitação em vortex, na velocidade máxima, durante 1 minuto, seguido de 1 minuto de descanso em banho de gelo entre agitações. O volume do tubo foi então transferido para uma garrafa de cultura estéril de 50 ml e a ele foram acrescentados outros 15 ml de meio MEM-HEPES, adicionado de mistura de antibióticos penicilina/estreptomicina (1 %). Para completar a transformação, os parasitos foram então submetidos a cultura em estufa com atmosfera de 5 % de CO₂ a 37 °C por 3 horas. Em capela de fluxo laminar previamente desinfetada com etanol a 70 % e irradiada com luz ultravioleta por 20 minutos, os volumes das garrafas foram recolhidos e agrupados em dois tubos tipo Falcon de 50 ml, e foram realizadas lavagens dos parasitos para retirada das caudas de cercárias, pela sedimentação diferencial dos esquistossômulos durante 4 minutos, seguida de remoção do sobrenadante e nova suspensão em 4 ml de meio MEM-HEPES, adicionado de antibióticos. Esta operação foi repetida de 8 a 12 vezes. Três alíquotas de 10 µL das suspensões contendo parasitos foram diluídas 10 X e aplicadas sobre lâmina microscópica para observação do aspecto geral destes, incluindo motilidade, formato corporal, presença de granulação, estado de integridade, bem como contaminação com

caudas de cercárias, cercárias não transformadas, além de contagem de esquistossômulos. Preparações com contaminações por caudas e cercárias com contagens superiores a 5 % não foram utilizadas em etapas posteriores.

Os esquistossômulos de pele (Pel) foram obtidos pela passagem ativa de cercárias através de pele de camundongos da linhagem *BalbC*, empregando-se um aparato de vidro desenvolvido para este fim (Método de Clegg), como pode ser visualizado na figura 7. Ao atravessar a pele, o parasito migra, sendo recolhido em meio de cultura RPMI 1640 a 37 °C (Thornhill et al., 2010).

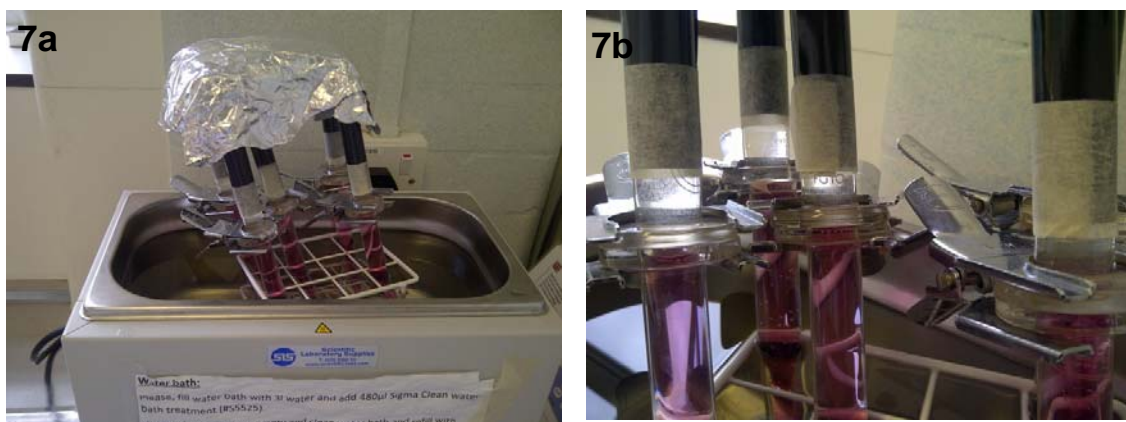


Figura 7: Montagem em dispositivo de vidro (Método de Clegg) para transformação de cercárias e obtenção de esquistossômulos de pele (Pel). Um fragmento de pele de camundongo, com área aproximada de 2 cm² é posicionado entre dois tubos de vidro. No tubo superior é adicionado volume de suspensão de cercárias (detalhe em 7b) e no tubo inferior, os esquistossômulos que atravessam a pele são recolhidos em meio de cultura RPMI 1640 a 37 °C, em banho maria, como mostrado em 7a.

Após recolher os esquistossômulos, a porção da pele que esteve em contato com as cercárias foi retirada, fragmentada em pequenos pedaços, que foram então mantidos nas condições de cultura em meio RPMI 1640, suplementado com 10 % de soro fetal bovino e mistura antibiótica penicilina/estreptomicina, *overnight*, para obtenção de esquistossômulos de migração tardia da pele. Estes parasitos foram então designados “Mig” e também tiveram a permeabilidade de membranas estudada.

3.2 Hamsters e camundongos

Foram utilizados hamster, *Mesocricetus auratus*, da linhagem *golden*, fêmeas não prenhes, com aproximadamente dois meses de idade, pesando cerca de 150g, nascidas e criadas no Biotério de Produção do Centro de Pesquisa René Rachou/FIOCRUZ.

Foram também utilizados camundongos suíços machos (*Mus musculus*), linhagem Balb/C pesando entre 30g e 40g, nascidos e criados no mesmo biotério já citado. Os animais utilizados em todos os experimentos foram transferidos para Biotério de Experimentação, em gaiolas devidamente identificadas, alimentados com ração comercial “autoclavada” e água *ad libitum*.

Os procedimentos realizados com os animais foram submetidos a avaliação por Comitê de Ética no Uso de Animais de Experimentação da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/FIOCRUZ), e aprovados com licença de nº LW42/10.

3.3 Obtenção do soro periférico e portal de hamster

Os hamsters foram anestesiados pela administração intraperitoneal de 0,5 ml de uma solução de 50 mg/ml de tiopental em solução fisiológica 0,9 % estéril, usando seringa insulínica com agulha hipodérmica, sendo aguardados 3 a 5 minutos para completo efeito. Animais que, por ventura, não tinham sido anestesiados com esta dose receberam acréscimos de 0,1 ml da mesma solução anestésica, com observação durante 5 minutos, até que fosse atingido estado completo de anestesia. Após anestesia, com o animal em decúbito ventral centralmente posicionado sobre uma placa de cortiça o reflexo de retirada da pata após pressão com pinça foi testado, para assegurar a completa supressão de resposta aos estímulos dolorosos. Para retirada do soro portal, o abdome do animal foi umedecido com etanol 70 %, como medida de assepsia e em seguida, utilizando pinça anatômica e tesoura de ponta romba, foi feita incisão ascendente, iniciando-se na extremidade abdominal inferior e estendendo-se até o início da cavidade torácica, abrangendo as camadas de pele, muscular e peritônio. As vísceras abdominais foram deslocadas lateralmente, com auxílio de pinças anatômicas, de forma a se expor os vasos mais calibrosos do sistema porta-hepático e permitir a identificação da veia porta. Com auxílio de uma seringa de 3,0 ml, acoplada a

uma agulha hipodérmica, a veia porta foi então puncionada, sendo retirado volume de 1,0 ml de sangue portal (máximo de 1,5 ml para animais de maior porte). Para retirada do soro periférico, o tórax do hamster foi umedecido com etanol 70 %, como medida de assepsia e em seguida, utilizando pinça anatômica e tesoura de ponta romba, foi feita incisão ascendente, iniciando-se na extremidade torácica inferior, imediatamente abaixo do osso esterno e estendendo-se até as primeiras costelas. Este corte abrangeu pele, músculos torácicos, pleura, esterno e o músculo diafragma do animal, sendo, portanto, aberta a cavidade de forma a se expor o coração. Com auxílio de uma seringa de 3,0 ml, acoplada a uma agulha 21 G, foi realizada punção próxima ao ramo interventricular descendente anterior da artéria coronária esquerda, sendo então retirado volume de 3,0 ml de sangue periférico (máximo de 5,0 ml para animais de maior porte).

Tanto para obtenção de soro portal, quanto de periférico, o sangue foi transferido, imediatamente após a coleta, para tubos novos, estéreis, do tipo Falcon de 15,0 ml, sem adição de anticoagulantes, os quais foram mantidos em temperatura ambiente por pelo menos 30 minutos para coagulação e separação do soro. Em seguida, os tubos foram submetidos a centrifugação a 5.000 RPM por 3 minutos, sendo o soro recolhido para novo tubo. Os soros, devidamente identificados, foram submetidos a inativação do sistema de complemento, pela incubação dos tubos em estufa a 56°C durante 30 minutos, sendo finalmente esterilizado em capela de fluxo laminar por filtração em filtro Milipore® de 0,22 µm de abertura.

Os soros foram mantidos em geladeira a 4°C até sua utilização, que ocorreu sempre em prazo máximo de 24 horas após coleta.

3.4 Obtenção de pele de camundongo

Os camundongos foram eutanasiados por fratura cervical, e uma vez atestada a morte tiveram a pele seccionada na região cervi cal e em seguida cuidadosamente retirada no máximo possível de sua extensão corporal. A pele assim retirada foi mantida em tubo tipo Falcon® de 50 ml. Os pelos foram retirados por depilação manual e a pele glabra resultante foi friccionalada com auxílio de gaze, umedecida em meio de cultura RPMI 1640 estéril, o que permitiu a limpeza e retirada dos pelos remanescentes. A face interna da pele retirada foi igualmente tratada para remoção do excesso de tecido

adiposo, o que compromete a passagem das cercárias no procedimento de transformação. A pele assim tratada foi recortada em fragmentos de aproximadamente 2 cm² e devidamente posicionada no topo do tubo inferior do aparato de Clegg, já contendo meio de cultura RPMI 1640 a temperatura aproximada de 37 °C.

3.5 Estudo da permeabilidade de membrana usando sondas fluorescentes

Substâncias as quais a membrana celular é impermeável, comercialmente disponíveis, acopladas a fluorocromos (sondas), foram empregadas para avaliar a permeabilidade da membrana de esquistossômulos mecanicamente transformados, transformados pela passagem ativa através de pele de camundongo e esquistossômulos tardiamente migrantes da pele após incubação no período da noite (*overnight*). As sondas empregadas foram: Lucifer Yellow CH sal de lítio e potássio, peso molecular 457 Da (cat: L-453 - Invitrogen® - Life Technologies do Brasil Ltda); Dextran-FITC de pesos moleculares 10 KDa (Sigma-Aldrich – cat: FD10S), 20 kDa (Sigma-Aldrich cat: FD20S) e 40 kDa (Molecular Probe/Life Technologies cat: D-1844). Todas essas sondas são solúveis em água e foram dissolvidas em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco/Life Technologies cat: 31800-022), para a concentração final de 1 mg/ml. A partir das soluções estoque assim preparadas, foram devidamente diluídas para se obter as concentrações finais de uso de acordo com as recomendações dos fabricantes.

Os parasitos foram incubados na presença das sondas, nas concentrações finais recomendadas pelo fabricante, dissolvidas em meio RPMI 1640 em estufa a 37°C, com atmosfera de 5% de CO₂ durante 30 minutos. Após incubação, os parasitos foram lavados 3 vezes pela substituição do meio de cultura RPMI 1640 sobrenadante, após homogeneizar a suspensão com parasitos e aguardar 5 minutos para decantação.

A permeabilidade da membrana interna de organelas nos esquistossômulos foi também estudada pelo emprego das sondas listadas na tabela 1.

TABELA 1: LISTA DE SONDAS PARA INVESTIGAR PERMEABILIDADE EM ORGANELAS E MEMBRANA

Sonda Fluorescente	Especificidade	Concentração
Lysotracker red (cat # L7528)	Lisossomo	40 ng/ml
Mitotracker red (cat # M7512)	Mitocôndria	50 ng/ml
Monochlorobimane (cat # M1381MP)	Glutationa	100 ng/ml
Monodansylcadaverine (cat #30432)	Autofagossoma	20 ng/ml
FM 143 (cat # F35355)	Membrana	5 ng/ml

Referências: Lysotracker red (Al-Adhami et al 2005); Mitotracker red(Poot et al 1997) ; Monochlorobimane(Ribeiro et al 1998); Monodansylcadaverine(Al Adhami et al(2005); FM 143 (Ribeiro et al (1998)

3.6 Transformação *in vivo*

Camundongos foram anestesiados pela injeção intraperitoneal de pentobarbital (Hypnol[®]) a 40 mg/ml. Em decúbito ventral, foi retirado pelo de uma pequena região do abdome do animal e sobre essa área foi adicionado determinado volume de suspensão de cercárias, contidas por um anel acrílico. A infecção foi realizada com 1000 cercárias durante um período de 30 minutos.

Após recuperação da anestesia, os camundongos foram mantidos por 24 horas ou 48 horas. O animal foi então eutanasiado por fratura cervical e a pele da região onde houve penetração de cercárias foi injetada com sondas (injeção intradérmica) Lucifer Yellow e Dextran-FITC e após 15 minutos um pedaço da pele quadrado de aproximadamente 4 cm², que foi então cortado em pequenos fragmentos com auxílio de lâmina de bisturi, sendo então transferidos para placas de 6 poços dentro de um elemento filtrante (peneira) *cell strainer* (BD Falcon), com malha de 0,75 µm, que permitia a passagem dos esquistossômulos recém saídos da pele para o meio de cultura RPMI 1640 que preenchia o poço. Esse sistema foi mantido em estufa a 37 °C por duas horas para migração dos esquistossômulos. Esses foram finalmente observados ao microscópio de fluorescência, ajustado com os filtros adequados a cada sonda

3.7 Controles para as incubações com pele de camundongo

Para avaliar se a simples presença de fragmentos de pele de camundongos representou um fator interferente sobre a permeabilidade em esquistossômulos de pele, foram realizadas, como controles, incubações de esquistossômulos mecanicamente transformados na presença de fragmentos de pele de camundongos, e então avaliada a captação das sondas Lucifer Yellow e FM1-43 por esses parasitos. Pele de camundongo foi cortada de maneira idêntica ao que foi realizado na recuperação de esquistossômulos migrantes da pele na transformação *in vivo*, sendo os fragmentos de adicionados a um tubo de fundo cônico, tipo Falcon de 15 ml na presença de meio de cultura RPMI 1640 e as sondas de interesse, Dextrans-FITC e Lucifer Yellow (100 µg/ml) e FM1-43 (5 µg/ml). Após incubação por 1 hora a 37 °C a suspensão foi transferida para uma placa de cultura de 6 poços, contendo *cell strainer* (BD Falcon), em 5 ml de RPMI 1640 por poço. Os esquistossômulos separados dos fragmentos de pele foram recuperados em um volume menor de meio de cultura e observados ao microscópio de fluorescência empregando os filtros adequados a cada sonda.

3.8 Exame e registro dos parasitos ao microscópio de fluorescência

Os parasitos marcados pelas sondas fluorescentes empregadas foram fotografados usando microscópio Carl Zeiss, o que permitiu observar a variabilidade das populações de parasitos. Fotografias foram obtidas após observação sob lentes objetivas com aumentos de 10 X e 40 X empregando uma câmera digital Cannon. Para redução dos movimentos dos parasitos foi adicionado as lâminas pentobarbital sódico (10 µl de uma solução a 1 mg/ml) imediatamente antes da observação.

Para registro das inferências sobre localização e intensidade de fluorescência cada experimento foi realizado em duplicata e em cada lâmina as observações foram feitas sobre 10 campos aleatórios. As imagens finais capturadas foram tratadas no programa editor de imagens científicas ImageJ disponibilizado gratuitamente pelo *National Institute of Health* (NIH), US no endereço eletrônico: imagej.nih.gov/ij/download/.

3.9 Eletroforese em gel de poliacrilamida de extratos de proteínas solúveis de esquistossômulos

Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12 % foi feita usando sistema Mini Protean III (Biorad), principalmente para testar a qualidade e ajustar a quantidade de proteínas a ser aplicada dos extratos solúveis de esquistossômulos mecanicamente transformados e transformados por migração através de pele de camundongo, para transferências de proteínas para membrana de *immunoblot*. Os extratos foram preparados por ciclos de congelamento/descongelamento a -80 °C dos esquistossômulos em tampão fosfato 0,1M pH 7,5 (PBS), seguida de agitação mecânica em *roller* durante 2 horas e, ao final, centrifugação a 10.000 RPM, a 4 °C, por 10 minutos. Os géis foram corados por Azul de Coomassie ou nitrato de prata, especialmente para visualização de extratos com menores concentrações de proteínas. Foram aplicados volumes equivalentes a 5 µg de proteínas de cada extrato para fins de comparação dos perfis de bandas.

3.10 Western blot

Extratos brutos fracionados por SDS-PAGE foram eletro-transferidos para membrana de nitrocelulose, sendo esta incubada na presença de diferentes tipos de anticorpos primários (anti-soros de camundongo ou humano infectados, anticorpos purificados, anticorpos policlonais). Após lavagem, a membrana foi submetida a incubação com anticorpo secundário, contendo anticorpo secundário anti-IgG acoplado a enzima peroxidase. A membrana foi então submetida a revelação do perfil de bandas reativas pela detecção da atividade da enzima peroxidase (Towbin et al, 1979). Na tabela 2 são listados os soros empregados nos diferentes immunoblots:

TABELA 2: LISTA DE SOROS EMPREGADOS EM IMMUNOBLOTS DE EXTRATOS DE ESQUISTOSSÔMULOS MECANICAMENTE OU POR MIGRAÇÃO ATRAVÉS DA PELE DE CAMUNDONGOS

Identificação	Especificação
1025-O	Anti-cercária (controle positivo)
993-P	Anti-cercária
942-G	Anti-cercária
942-M	Anti-cercária
14K	IgG anti-cercária (eluição ácida de banda 14kDa de 1025-O)
1056-R	Anti-verme adulto
942-T	Soro de coelho infectado
993-R	Soro de coelho infectado
1142-P	Soro de coelho infectado
BR47	Soro de coelho infectado
BR101	IgG de Coelho anti-camundongo

Soroteca do Laboratory of Experimental Parasitology – University of Nottingham United Kingdom

3.11 Eluição ácida de anticorpos

Após SDS-PAGE em gel a 12 %, usando pente largo para gerar única canaleta, o extrato de proteínas de esquistossômulos então fracionado foi eletro-transferido para membrana de nitrocelulose, sendo cortadas tiras das duas extremidades da membrana, a serem usadas como guia para extração de bandas, além de tira contendo padrão de peso molecular. As tiras das extremidades foram coradas e montadas junto com as demais partes da membrana para retirada das bandas de interesse. Essas bandas foram recortadas e transferidas para tubos plásticos contendo 1 ml de tampão glicina 0,1 M pH 2,4. O tubo foi agitado (*roller*) durante 10 minutos, em temperatura ambiente. O pH foi neutralizado pela adição de 100 µl de tampão Tris-HCl 0,5 M pH 8,8. O sobrenadante contendo os anticorpos eluidos foram recolhidos em novos tubos e mantidos em geladeira até o uso. As tiras foram novamente incubadas na presença do soro por duas horas e novamente submetidas a eluição ácida e neutralização repetidas vezes (6 a 7 vezes).

3.12 Imunofluorescencia

Anticorpos eluídos foram utilizados como anticorpos primários, sendo incubados com esquistossomulos fixados, com posteriores lavagens, incubação com anticorpo secundário e observação microscópica. O procedimento inclui as seguintes etapas:

- Fixação dos esquistossômulos em solução de formamida a 4 % em PBS, por uma hora, em temperatura ambiente;
- Lavagem do *pellet* 3 vezes com 1 ml de PBS;
- Bloqueio de ligações inespecíficas de anticorpos pela adição de 2 ml de solução de bloqueio (1 % de soroalbumina bovina - BSA, em PBS adicionado de 0,2 % de tween), seguida de incubação por 1 hora em temperatura ambiente; □
- Lavagem do *pellet* de parasito bloqueados 3 vezes com 1 ml de PBS + 0,2 % tween;
- Incubação na presença do anticorpo primário (eluído) pela adição e 1 ml de suspensão diluída 1:40 em PBS + 0,2 % tween. Os parasitos foram mantidos na suspensão por 8 horas (*overnight*), a 8 °C, sob agitação constante. □
- Lavagem do *pellet* 3 vezes com 1 ml de PBS; □
- Incubação em 1 ml de solução do anticorpo secundário anti-IgG acoplado ao FITC, □ diluído 1:80 em PBS + 0,2 % tween; □
- Lavagem do *pellet* 3 vezes com 1 ml de PBS; □
- A suspensão foi então mantida em geladeira ate a observação microscópica de laminas contendo 100 µl da suspensão, coberta com lamínula.

3.13 Cultivo de esquistossômulos em meio mínimo suplementado com soro portal e periférico de hamster

Após testes preliminares (dados não mostrados) optou-se por realizar culturas de esquistossômulos recém transformados durante 3 horas e 12 horas em meio MEM-HEPES, suplementado: *Glasgow Minimum Essential Medium* (12,5 g/L); 20 mM HEPES; 0,1 % hidrolisado de lactoalbumina (Vetec[®]); 0,1 % glicose (Merck[®]); 0,5 µM hipoxantina (Sigma Aldrich[®]); 1 µM hidro cortisona (Sigma Aldrich[®]); 0,5 % mistura de vitaminas (Sigma Aldrich[®]); 1 % mistura penicilina/estreptomicina. Foram então estabelecidas 5 condições experimentais, sendo uma controle e outras quatro culturas, a saber:

TZ – esquistossômulos recém transformados;

SPO3h – esquistossômulos cultivados por 3 horas em meio MEM-HEPES suplementado, adicionado de 10% de soro portal de hamster;

SPO12h – esquistossômulos cultivados por 12 horas em meio MEM-HEPES suplementado, adicionado de 10% de soro portal de hamster;

SPE3h – esquistossômulos cultivados por 3 horas em meio MEM-HEPES suplementado, adicionado de 10% de soro periférico de hamster;

SPE12h – esquistossômulos cultivados por 12 horas em meio MEM-HEPES suplementado, adicionado de 10% de soro periférico de hamster.

Considerando os rendimentos obtidos nas transformações de cercárias, nas obtenções de soros de hamster e nas extrações de RNA total, em cada repetição do cultivo dos esquistossômulos, optou-se por utilizar aproximadamente 1×10^5 parasitos para 70 ml de meio, por condição de cultura em cada repetição.

Ao final de cada cultivo, os parasitos foram imediatamente recolhidos por centrifugação a 4000 RPM por 10 minutos a 4 °C e o *pellet* submetido aos procedimentos para extração de RNA total e isolamento do mRNA.

3.14 Determinação da Viabilidade de Esquistossômulos

Acridine orange (AO) e brometo de etídio (EB) foram os dois fluoróforos empregados para avaliar a viabilidade celular. O AO permeia células vivas e cora os núcleos com fluorescência verde, ao passo que o EB só é captado por células quando a integridade da membrana citoplasmática é perdida, corando assim os núcleos com fluorescência vermelha. Considerando que a fluorescência do EB sempre se sobrepõe a do AO quando associados os dois fluoróforos, células vivas apresentam-se com fluorescência verde e células mortas são visualizadas com fluorescências que variam de alaranjado a vermelho intenso (Renvoize et al, 1998). Alíquotas de 2.000 esquistossômulos, após culturas nas condições pré-estabelecidas, foram transferidas para poços de uma placa de ELISA de fundo chato, aos quais foram adicionados 5 µL da solução de uso de brometo de etídio (1 mg/ml) e 5 µL da solução de uso de *acridine orange* (0.3mg/mL), sendo o volume finalmente completo para 100 µl usando o mesmo meio de cultura, MEM-HEPES suplementado. Os parasitos foram assim incubados em estufa à 37 °C com atmosfera de 5 % CO₂ por 20 minutos. Finda a incubação, a placa foi centrifugada a 1.000 RPM por 2 minutos, tendo sido retirados e desprezados 50 µl do sobrenadante e imediatamente adicionados outros 50 µL do meio de cultura, com os quais os esquistossômulos foram suspensos. Esta lavagem com 50 µl de meio de cultura foi repetida outra duas vezes antes da preparação de lâminas com alíquotas de 10 µl da suspensão de parasitos marcados e observação ao microscópio de fluorescência. A contagem de parasitos mortos e vivos foi realizada em microscópio ótico Olympus BX53[®], usando filtro de excitação entre 470 nm e 495 nm e emissão entre 510 nm e 550 nm. (Parks et al., 1979).

3.15 Extração do RNA total e isolamento de mRNA

Para extração do RNA total e posterior isolamento do mRNA dos parasitos optou-se pelo emprego sequencial dos reagentes: TRIzol[®] Reagent Invitrogen[®] (#15596-026); RNeasy[®] Qiagen (#74106); Turbo[™] DNase Ambion[®] (#AM2238); RiboMinus[™] Eukaryote Kit for RNA-Seq Invitrogen[®], realizando modificações necessárias sobre os protocolos sugeridos por cada fabricante. É importante evidenciar que durante todas as etapas da extração e purificação de RNA os utensílios e superfícies empregados eram

regularmente aspergidos com solução preservadora, inibidora da ação de RNAses (RNaseZAP[®] RNase Decontamination Solution Ambion # AM9780).

3.15.1 Extração do RNA total com TRIzol[®] Reagente

Após cultura nas condições pré-estabelecidas, aproximadamente 100.000 esquistossômulos foram recuperados por centrifugação, sendo o *pellet* de parasitos suspenso em 1 ml do reagente TRIzol e homogeneizado imediatamente por pipetagens sucessivas do volume obtido, seguido de agitação mecânica vigorosa em aparelho Virtis[®], usando tubos de vidro de parede espessa adequados e repetindo-se 3 ciclos de agitação em velocidade 25 (X100 RPM) por 15 segundos, seguida de descanso em banho de gelo por 1 minuto. O conteúdo foi transferido de volta a um microtubo de 2,0 ml e mantido por 20 minutos à temperatura ambiente para permitir a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas. A este conteúdo foram adicionados 0,2 ml de clorofórmio (Merck[®] - #1024421000), e o tubo foi vigorosamente agitado em Vortex por 10 segundos. O tubo foi novamente mantido em temperatura ambiente por 20 minutos e após este tempo, foi realizada centrifugação a 12.000 RPM 4 °C por 10 minutos. A fase aquosa superior foi cuidadosamente recolhida com pipetador e transferida para novo microtubo de 2,0ml. Foi adicionado igual volume (aproximadamente 0,5 ml) de isopropanol (Merck[®] - #100995), seguido de suave homogeneização por inversão do tubo, que foi então incubado a -20 °C por 1 hora para precipitação do RNA total. Transcorrido o tempo, foi realizada centrifugação a 12.000 RPM 4 °C por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado por inversão do tubo. O precipitado foi lavado pela adição cuidadosa de 0,5ml de etanol (Merck[®] - #1009861000) 75 % preparado em H₂O tratada com dietil pirocarbonato - DEPC (Merck[®] - #750023), sendo o tubo novamente centrifugado a 12.000 RPM 4 °C por 5 minutos e o sobrenadante desprezado por inversão do tubo. Esta lavagem foi repetida uma vez e ao final o tubo é mantido invertido sobre lenço de papel para secagem do precipitado e completa evaporação do etanol durante 10 minutos. O precipitado seco é então dissolvido em 100 µL de H₂O tratada com DEPC, sendo o tubo incubado em banho maria à 50 °C por 30 minutos para completar a dissolução. Uma vez completamente dissolvido o RNA, o tubo foi submetido a uma breve centrifugação (*spin down*), sendo separadas duas alíquotas de 1 µL, uma para quantificação e análise

prévia de pureza em NanoDrop 2000[®] UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific[®]) e outra para análise da qualidade do RNA extraído, por observação da integridade do rRNA em 2100 Bioanalyser[®] Agilent Technologies.

3.15.2 Purificação do RNA total (*Cleanup*) com sistema RNeasy

Ao RNA total previamente extraído (aproximadamente 100 µL) foram adicionados 350 µL do tampão RLT, seguida de homogeneização com pipetador. Foram também adicionados 250 µL de etanol (Merck[®] Millipore - #1009861000), sendo o volume final (700 µL) homogeneizado e transferido para a coluna RNase Mini Spin[®] já apoiado sobre um tubo de microcentrífuga de 2 ml (tubo coletor). A coluna é então fechada e o conjunto (coluna + tubo) submetido a centrifugação a 10.000 RPM 4 °C por 15 segundos, descartando-se em seguida o filtrado e tomando cuidado de não deixar líquido no tubo coletor. A coluna foi então lavada pela adição de 500 µL do tampão RPE, sendo então fechada a tampa e o conjunto novamente centrifugado a 10.000 RPM 4 °C por 15 segundos, descartando-se o filtrado. A lavagem com tampão RPE foi repetida uma vez e a centrifugação ao final foi realizada por 2 minutos, para garantir a eliminação do etanol da coluna. A coluna foi então transferida para um novo microtubo livre de nucleases, sendo a ela adicionados 30 µL de H₂O DEPC. Com a tampa fechada, o conjunto foi submetido a centrifugação a 10.000 RPM 4 °C por 1 minuto para eluição do RNA total purificado, livre principalmente de solventes orgânicos, em especial de fenol.

3.15.3 Tratamento com DNase

Para eliminação de traços de DNA genômico o RNA total purificado foi tratado com a enzima Turbo[™] DNase Ambion[®] (#AM2238).

Ao tubo contendo o RNA total purificado foram adicionados: 0,35 µL do tampão da enzima 10X concentrado; 0,5 µL da enzima Turbo DNase[®]; 1,15 µL H₂O DEPC. A mistura foi homogeneizada suavemente com auxílio de pipetador e o tubo é incubado por 60 minutos à 37 °C em bloco de aquecimento. A enzima foi finalmente inativada pela adição de 3µL de tampão *STOP Buffer*, seguida de homogeneização com auxílio de pipetador, incubação a temperatura ambiente por 2 minutos e centrifugação a

10.000 RPM 4 °C por 90 segundos. O sobrenadante foi cuidadosamente coletado em um novo microtubo livre de nucleases, evitando-se ao máximo pipetar o precipitado branco formado. O tubo foi submetido a uma breve centrifugação (*spin down*), e foram separadas duas alíquotas de 1 µL, uma para quantificação e análise em NanoDrop 2000® e outra para análise da qualidade em 2100 Bioanalyser®. Os tubos foram então imediatamente identificados e armazenados a -70 °C até a utilização para eliminação do rRNA daquelas amostras que tiveram sua qualidade atestada.

3.15.4 Eliminação do rRNA com o sistema RiboMinus™ for RNA-Seq

O sistema RiboMinus™ para RNA-Seq permite a separação do rRNA independente do estado de poliadenilação dos mRNAs, uma vez que baseia-se na hibridização do rRNA e posterior retirada destes por partículas magnéticas.

3.15.4.1 Hibridização

Em um novo microtubo de 1,5 mL estéril, livre de nucleases, foram adicionados os seguintes: 10 µg de RNA Total em 10 µl de água tratada com DEPC; 10 µl da sonda RiboMinus™ Probe (15 pmol/uL); 100 µl do tampão de hibridização. Os reagentes são misturados por pipetagem leve e o tubo é incubado em bloco de aquecimento a 70 °C por 5 minutos, para desnaturação do RNA. Em seguida, o tubo é vagarosamente resfriado para 37°C, e mantido nesta temperatura por 30 minutos.

3.15.4.2 Preparação das Partículas Magnéticas

O conteúdo do frasco original de partículas magnéticas (*RiboMinus™ Magnetic Beads*) foi suspenso pela agitação em vortex por 10 segundos em velocidade máxima. Em dois microtubos novos de 1,5 ml, estéreis e livres de nucleases foram pipetadas duas alíquotas de 750 µl da suspensão de partículas, sendo ambos, em seguida, posicionados no separador magnético por 1 minuto. Com as partículas alojadas na face lateral dos tubos os sobrenadantes foram cuidadosamente retirados por pipetagem e aos tubos foram adicionadas alíquotas de 750µl de água-DEPC estéril, sendo as partículas magnéticas suspensas por agitação em vortex, na velocidade máxima por 10

segundos. Os tubos foram novamente posicionados no separador magnético por 1 minuto e com as partículas alojadas na face lateral dos tubos os sobrenadantes foram cuidadosamente retirados por pipetagem. Esta lavagem das partículas magnéticas com água-DEPC foi repetida mais uma vez e ao final as partículas magnéticas foram suspensas em 750 μ l do tampão de hibridização. Deste volume foi reservada uma alíquota de 250 μ l em um novo microtubo, que foi mantido a 37 °C até a utilização em etapa posterior. Os tubos contendo os 500 μ l restantes da suspensão de partículas magnéticas foram novamente posicionados no separador magnético por 1 minuto, sendo o sobrenadante cuidadosamente retirado e as partículas suspensas em menor volume, 200 μ l de tampão de hibridização e mantidos a 37 °C até o momento da utilização.

3.15.4.3 Remoção do rRNA

Finalizada a hibridização do rRNA, o conteúdo do tubo foi concentrado no fundo do tubo, por meio de uma breve centrifugação (*Spin Down*). O volume total do tubo (~120 μ l) foi transferido para o tubo contendo as partículas magnéticas previamente preparadas. A mistura foi homogeneizada cuidadosamente por pipetagens repetidas sucessivas e o tubo incubado em bloco de temperatura a 37 °C por 15 minutos, com agitações ocasionais durante este período. O conteúdo foi concentrado no fundo do tubo por leve centrifugação (*spin down*) e o tubo foi posicionado no separador magnético por 1 minuto para separação do complexo rRNA-sonda-partículas magnéticas, que ficou retido na parede lateral do tubo. Paralelamente, o tubo previamente reservado, contendo 250 μ l da suspensão de partículas magnéticas foi colocado no separador magnético por 1 minutos, sendo o sobrenadante aspirado e descartado. Assim, o sobrenadante contendo o mRNA (~320 μ l) foi então transferido para o outro tubo contendo as partículas magnéticas previamente reservadas, sendo o conteúdo suspenso por pipetagens repetidas. O conteúdo do tubo foi incubado a 37 °C por 15 minutos, com agitação ocasional durante este tempo. Após concentração do conteúdo no fundo do tubo por breve centrifugação (*spin down*), o tubo foi finalmente posicionado no separador magnético por 1 minuto para retirada dos complexos rRNA-sonda-partículas magnéticas remanescentes. O sobrenadante (aproximadamente 320

μl), contendo o mRNA isolado foi então transferido para um novo microtubo estéril, livre de nucleases.

3.15.4.4 Precipitação do mRNA

Para assegurar a recuperação de pequenos RNAs (<200 nt), optou-se por concentrar o RNA então purificado por meio de precipitação com Etanol, usando glicogênio como moléculas carreadoras.

Ao conteúdo do microtubo contendo o mRNA purificado foram adicionados 1μl da solução de glicogênio (Merck Millipore® #1042020010) a 20 μg/μl; 30 μl da solução de acetato de sódio 3 M (Sigma Aldrich # 241245); 750 μl de etanol absoluto (Merck® Millipore - #1009861000). O conteúdo foi homogeneizado cuidadosamente por pipetagens repetidas e o tubo mantido a -80 °C por 1 hora para precipitação e ao final o tubo foi submetido a centrifugação a 12.000 x g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado por pipetagem e o precipitado foi lavado duas vezes pela adição de etanol a 70 % (em água-DEPC) ao fundo do tubo, que sem ser agitado é submetido a centrifugação a 12.000g por 5 minutos a 4 °C. Ao final, o tubo contendo o precipitado de mRNA purificado deve ser mantido aberto ao ar para secagem e o precipitado dissolvido em 30 μl de água-DEPC e armazenado a -80 °C até utilização.

3.15.5 Análise do RNA purificado

Os RNAs purificados, tanto RNA total, quanto mRNA foram quantificados por leituras espectrofotométricas de absorvância em 260 nm em aparelho NanoDrop 2000® UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific®). Além da quantificação, foram também avaliados neste aparelho o grau de pureza do RNA, pela análise das relações entre as absorvâncias a 280 nm e 260 nm, que reflete a relação RNA/Proteínas nas amostras, e pela relação entre absorvâncias 230 nm e 260 nm, que reflete a quantidade de solventes orgânicos, principalmente fenol, remanescentes dos procedimentos de extração. Só foram utilizados os RNAs com relações OD260/OD280 e OD260/OD230 superiores 1,9 foram utilizados para nas etapas sequenciais.

A eficiência da eliminação do rRNA e o nível de degradação do RNA foram analisadas por eletroforese capilar realizada no aparelho Bioanalyser® Agilent 2100, empregando o

kit Agilent PicoRNA6000. O perfil eletroforético de um RNA total foi comparado com o do mRNA dele extraído, observou-se o desaparecimento da banda (ou pico) relativa ao rRNA.

3.16 Construção de Bibliotecas de cDNA e Sequenciamento em SOLiD™ RNA-Seq

O sequenciador de nova geração, SOLiD™ *sequence system*, versão 4, foi utilizado para analisar os fragmentos curtos de 50 nucleotídeos (50 nt) e todos os procedimentos foram realizados usando o kit SOLiD™ Total RNA-seq Kit de acordo com o protocolo recomendado por seu fabricante (Applied Biosystems (SOLiD™ Total RNA-seq Kit Protocol, Applied Biosystems, CA).

O volume contendo 1 µg de mRNA extraído de esquistossômulos em cada uma das condições pré-estabelecidas foram fragmentados empregando-se a enzima RNase II fornecida no kit e diretamente hibridizados e ligados a adaptadores contendo sequências para iniciadores empregados em amplificação por PCR e reações de sequenciamento. Em seguida, foi realizada transcrição reversa dos RNAs ligados e os fragmentos de cDNA resultantes com tamanho entre 150 pb e 250 pb foram selecionados e quantificados por leitura espectrofotométrica em aparelho Qubit v1.0 (Invitrogen®). Os RNAs selecionados foram diluídos para concentração ideal para realização de amplificação monoclonal por PCR em emulsão, durante a qual cópias da molécula molde (*template*) foram ligadas a partículas (*beads*). As partículas contendo os fragmentos amplificados foram então depositadas sobre um *chip* e este foi submetido a reações sequenciais e lavagens automáticas feitas pelo próprio aparelho. Os DNAs ligados às partículas foram sequenciados com 50 rodadas de anelamento e ligação de oligonucleotídeos, usando 4 diferentes iniciadores (*primers*), com 10 ligações sequenciais por iniciador. Durante cada rodada, um oligonucleotídeo marcado com um fluoróforo foi hibridizado e ligado à extremidade 3' do iniciador ou oligonucleotídeo ligado na rodada anterior. Os dois próximos nucleotídeos não pareados na fita ligada à partícula determina qual é o oligonucleotídeo ligado (pela fluorescência/cor).

3.17 Mapeamento e quantificação das *reads*

As *reads* representadas em formato *color space* foram mapeadas contra a versão atualizada do genoma de referência do *S. mansoni* (Protasio et al., 2012) disponível no

banco de dados ShistoDb (www.shistodb.com) usando o programa Bowtie2 (Langmead et al, 2009) usando seus parâmetros padrões (*default*) e o arquivo em formato “bam” (*bam file*) gerado após o sequenciamento. As *reads* mapeadas em sequencias ribossomais e de globulinas foram excluídas das análises subsequentes. Apenas *reads* com único mapeamento no genoma de referência foram consideradas válidas pelo programa. Foi então gerada uma lista de genes expressos em cada uma das 4 condições propostas, de acordo com as *reads* neles mapeadas e seus valores de contagens brutas. Os genes anotados no genoma de referência contra os quais não foram observadas *reads* mapeadas foram excluídos desta avaliação.

3.18 Análise da Expressão Gênica

Uma lista contendo os identificadores (ID) dos genes em cada linha, contendo as contagens brutas de reads para cada uma das 4 condições propostas no estudo, foi utilizada como *input* na implementação DESeq2 (Love et al, 2014) no programa R (R Development Core Team, 2008). O programa primeiramente realiza um “*count normalization*” que gera uma matriz com uma contagem normalizada das *reads* baseada em um fator escalar de cada amostra, ou de cada coluna, ou cada biblioteca. Calcula-se então um fator de tamanho estimado para cada amostra calculando a mediana da relação, para cada gene, da sua contagem de *reads* na amostra específica sobre a sua média geométrica nas amostras. Ele assume então a suposição de que a maioria dos genes não são diferencialmente expressos e utiliza esta mediana de taxas para obter o fator escalar.

Em um segundo momento o programa visualiza o quanto é esperado de dispersão da variabilidade da expressão dentro da análise, ou seja, é estimada a dispersão para cada gene. E, por fim, emprega-se uma distribuição binomial negativa entre valores de diferentes amostras para estimar a expressão diferencial dos genes. Como mencionado acima, a maioria das ferramentas *in silico* para determinação da expressão diferencial de genes emprega métodos baseados no modelo estatístico binomial negativo, que tem gerado mais especificidade e mais sensibilidade nas análises realizadas.

Os valores *baseMeanA* (média normalizada de A - média das *reads* de um gene dividido pelo fator de tamanho da amostra) e *baseMeanB* (média normalizada de B - média das *reads* de um gene dividido pelo fator de tamanho da amostra) representando

diferentes condições são comparados através do *foldchange* (razão $meanB/meanA$), \log_2 FoldChange (log na base “2” do *foldchange*), *pval* (valor de p para rejeitarmos a hipótese nula ' $meanA==meanB$ '). Para significância estatística desta mudança entre as condições analisadas) e *padj* (valor de p ajustado – $BH==TRUE$; para múltiplos testes empregando o procedimento de Benjamini Hochberg – controla a taxa de falso positivos). Estes valores são usados, baseados em testes estatísticos, para avaliar se a expressão da amostra A é igual ou diferente da expressão da amostra B, gerando-se assim o perfil de expressão gênica de diferentes amostras, comparando diferentes genes.

As comparações foram realizadas entre réplicas das bibliotecas de esquistossômulos cultivados por 3 horas e réplicas das bibliotecas e esquistossômulos cultivados por 12 horas no mesmo tipo de soro de hamster, periférico ou portal (comparação temporal 3 horas X 12 horas no mesmo soro). Comparações diretas entre réplicas de bibliotecas de esquistossômulos cultivados em soros diferentes também foram realizadas (SPE x SPO). Transcritos com valor de *P-ajustado* < 0,05 foram considerados diferencialmente expressos. Na lista final, foram considerados positivamente regulados (*suprarregulado*) apenas os transcritos que apresentaram valor de \log_2 FoldChange > 1, ao passo que negativamente regulados (*infrarregulado*) foram considerados apenas os transcritos com valor de \log_2 FoldChange < 1, parâmetro idêntico ao empregado por Sturn e colaboradores (2002) em estudo de expressão gênica de alta produtividade (*high throughput*).

3.19 Validação do perfil de expressão gênica por Reação da Polimerase em Cadeia Quantitativa (RT-qPCR)

O nível de expressão relativa de um sub-conjunto de genes diferencialmente expressos entre SPO3H e SPO12H foi determinado empregando-se RT-qPCR. O programa Primer 3 (Untergasser et al., 2012) foi usado para desenhar os oligonucleotídeos *primers* direto e reverso, bem como sonda para cada gene alvo. Os oligonucleotídeos foram então adquiridos como ensaios quantitativos “customizados” da Life Technologies Brazil (Custom TaqMan Gene Expression Assay) e as sequências podem ser visualizadas na tabela 3 a seguir.

TABELA 3: LISTA DE OLIGONUCLEOTÍDEOS EMPREGADOS EM RT-QPCR DE CDNA DE AMOSTRAS DE ESQUISTOSSÔMULOS SPO3H E SPO12H

Descrição	Nome do oligonucleotídeo	Sequência
Smp_157070.1 cysteine rich with egf domains protein	F1570	aaacaaacctggttcttacg
	R1570	tcctctttggatccacttg
	O1570	ccgactgcaaacgattgtga
Smp_027990.1 homeobox protein nk 2 ; neural gene activation	F0279	cttcttcatggtagcggtgtt
	R0279	tttgttacacccattaaacg
	O0279	agccgctgttgctaatagacc
	F1770	tcgctccctttcttattg
Smp_177040.1 gpi mannosyltransferase 2	R1770	aaggcgaactggatttga
	O1770	cgcgatcgtttcacaccata
	F0190	atcctctgcgctcatcaaa
Smp_019060.1 sec61 beta subunit	R0190	cgactggctgcttagctg
	O0190	tgctactgcctcaccaaggg
Smp_089000.1 translocon associated protein subunit delta; translocon associated protein delta subunit	F0890	ttaggcgggttacctatt
	R0890	acgagcaactgggtgaag
	O0890	caagcgaagcagttctttcca
Smp_042790.1 dolichol phosphate mannosyltransferase	F0427	gcccacctacaatgagaa
	R0427	tgccatctggactgttgt
	O0427	aaagtggctttccctacgaact
Smp_172110.1 protein disulfide isomerase A6	F1721	tggaaactattcgccact
	R1721	tggaaagcccttaacaga
	O1721	tgctgcggttgattcagaaa
Smp_083080.1 Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase	F0830	atactgccgatggaatca
	R0830	ggcctcagatcggtgaaa
	O0830	ttcttctgtactccggatgacctt
Smp_134570.1 hypothetical protein	F1345	ggtgcaacaaacagtcga
	R1345	ttgtccattccattgagg
	O1345	tgatcaattcaacaatttcaccattc
Smp_130260.1 hypothetical protein	F1302	tctacaagtcacgatcaaa
	R1302	ctagagccggaattcaaa
	O1302	aagcctcaatatcaacagcacca
Smp_103560.1 hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase	F1035	gogacatcgatcacactt
	R1035	caacggacattggtagga
	O1035	atgggcttgaacgcactgtc
Smp_024390.1 microsomal signal peptidase 25 kDa subunit	F0243	acggtgtgtgacggtatt
	R0243	aaccgctcgatttgactt
	O0243	agtcaggacgctttccgcttg
Smp_079230.1 immunophilin FK506 binding protein FKBP12, putative	F0792	acgaattccaagaaagg
	R0792	acaccttcatcccaacct
	O0792	tcccatccatgagggtacca
Smp_079420.1 ankyrin repeat domain containing protein 42	F0794	cgatgccttgaatgaact
	R0794	gtagcaacttcgcttctt
	O0794	cgttcacattccaatggtgcttt

(continuação) TABELA 3: LISTA DE OLIGONUCLEOTÍDEOS EMPREGADOS EM RT-QPCR DE CDNA DE AMOSTRAS DE ESQUISTOSSÔMULOS SPO3H E SPO12H

Descrição	Nome do oligonucleotídeo	Sequência
-----------	--------------------------	-----------

Smp_145540.1 muscarinic acetylcholine receptor	R1455	ctcatcaggtgcttgctt
	O1455	caatccattagagcaatcttcgg
Smp_175790.1 phospholipid translocating ATPase	F1757	atgtgaacaaccaaatgaaa
	R1757	aacatgtttcgtcaccatc
	O1757	tgctcctgttgctcctgatga
Smp_136310.1 sodium bile acid cotransporter	F1363	catctacggtcggttctt
	R1363	ccaatttcggtttccata
	O1363	cctgcattaatgggcttaggtc
Smp_053420.1 fermitin family 1	F0534	ccaogtagcaacaataagaa
	R0534	caccggaatcttcatcag
	O0534	ccttctgtcaatgaagatttcgc
Smp_007270.1 smoothelin	F0072	tgactggaaatgcgtctt
	R0072	gagcagcttttaggaagga
	O0072	attaccggcggtttccatttg
Smp_900000 - cicloxygenase 1 COX1	FC01	tacggttgggtgtgcacag
	RC01	acggccatcaccatactagc
	OC01	tttcatgatacttggtttgtgtgc

Fxxx – primer direto; Rxxx – primer reverso; Oxxx – sonda FAM/ROX

O cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA total de amostras de esquistossômulos das condições do estudo (SPO3H e SPO12H) pelo emprego do sistema High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, Brazil – cat4368814), sendo cada reação montadas de acordo com as recomendações do fabricante.

As reações foram realizadas no termociclador ViiA™ 7 Real-Time PCR System equipado com bloco de aquecimento para placa de 384 poços e a mistura de reagentes TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem) foi empregada. A eficiência dos primers foi calculada usando dados obtidos de curvas de calibração construídas a partir de 5 concentrações de cDNA de esquistossômulos recém transformados e concentração fixa do primer. O gene da cicloxygenase 1 (COX1) foi utilizado como controle endógeno do nível de expressão relative aos demais genes de interesse no estudo. O método “delta-delta Ct” (*cycle threshold* - Ct) foi utilizado para cálculo da expressão relativa dos genes, uma vez que as eficiências dos *primers* tinham valores compreendidos no interval entre 90% e 110%. Os valores de Expressão relativa (*fold change*) obtidos representam a média entre triplicatas de 3 amostras de cada uma das condições do estudo.

4 Resultados

4.1 Estudo comparativo entre esquistossômulos mecanicamente transformados e esquistossômulos obtidos de pele de camundongo

4.1.1 Marcações de esquistossômulos *in vitro*

4.1.1.1 Detecção de organelas intracelulares e de membranas em esquistossômulos

Auto-fagossomos e lisossomos – as figuras 8A e 8B mostra esquistossômulos Mec e Pel, fortemente corados com fluorescência verde, em vesículas de auto-fagossomas dispersas ao longo de todo o corpo do parasito pela sonda monodansyl cadaverin. As figuras 9A e 9B são fotos dos mesmos parasitos, Mec e Pel, fortemente corados por fluorescência vermelha, dispersa em todo o corpo do parasito, devida ao transporte em membrana de lisossomos, marcadas pela sonda LysoTracker. Pela inspeção das figuras observa-se que a distribuição das duas organelas é semelhante em ambos os tipos de esquistossômulos.

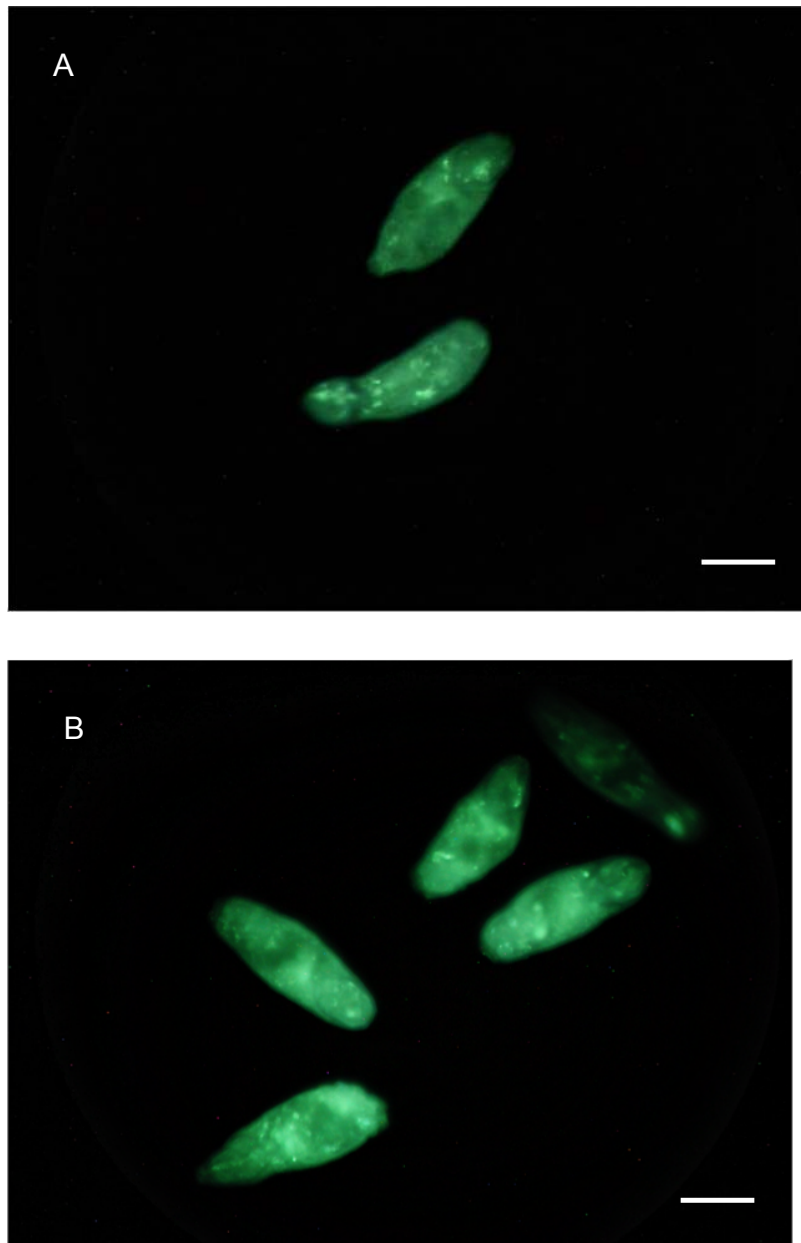


Figura 8: Localização de auto-fagossomas em esquistossômulos por microscopia de fluorescência. Esquistossômulos mecanicamente transformados (A) marcados com sonda monodansyl cadaverin, que evidencia a localização de auto-fagossomos marcados com fluorescência verde dispersa ao em todo o corpo do parasito, com alguns pontos de maior intensidade. Em B observam-se esquistossômulos obtidos após penetração de cercárias em pele de camundongo. A barra de escala nas figuras mede 25 μ m.

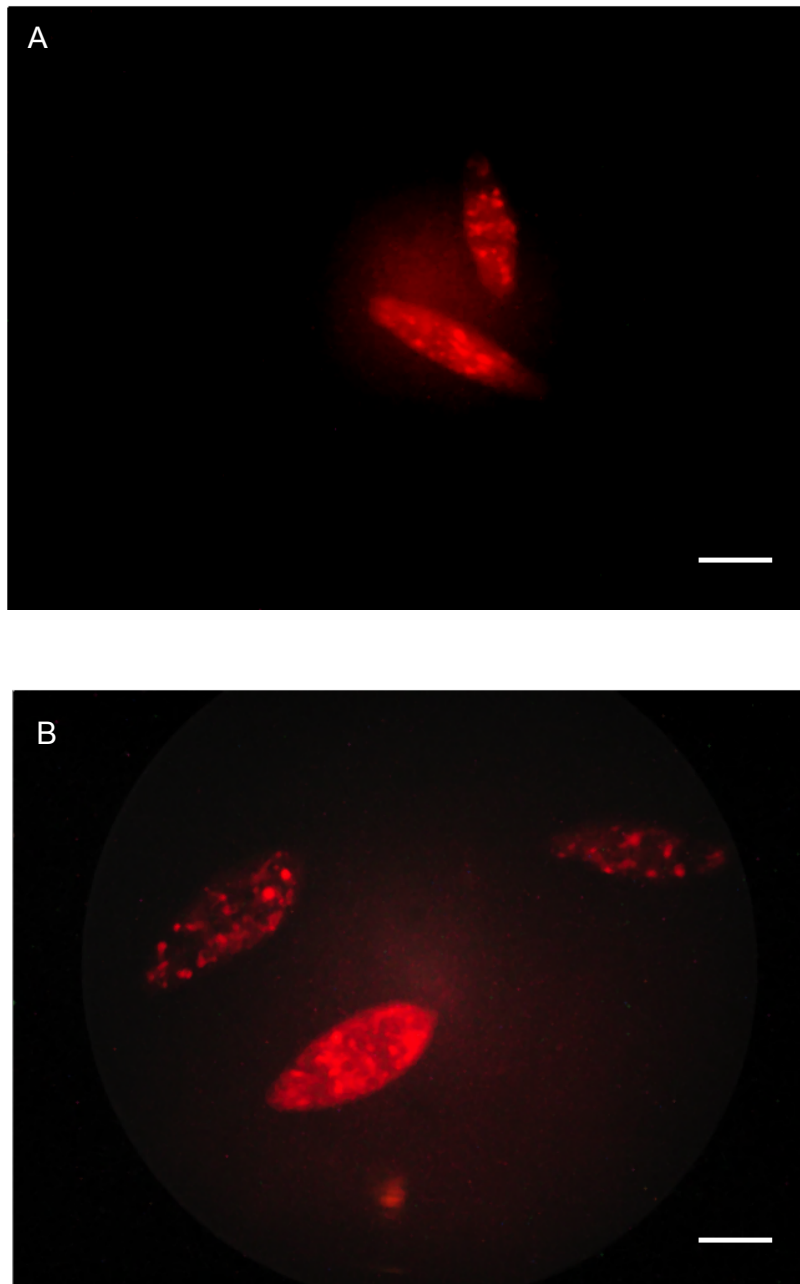


Figura 9: Localização de lisossomos em esquistossômulos por microscopia de fluorescência. Esquistossômulos mecanicamente transformados (A) marcados com sonda lysotracker, que evidencia a localização de lisossomos marcados com fluorescência vermelha dispersa ao em todo o corpo do parasito, com pontos de maior intensidade. Em B observam-se esquistossômulos obtidos após penetração de cercárias em pele de camundongo, com o mesmo padrão de coloração. A barra de escala nas figuras mede 50 μ m.

Glutathione – A figura 10 mostra esquistossômulos marcados com a sonda *monochlorobimane*, que evidencia a presença de glutathione nas glândulas acetabulares do parasito, como já foi previamente evidenciado por Ribeiro e colaboradores (1998) ser esta uma região de elevada concentração dessa molécula. As regiões aparecem como estruturas vesiculares e foram claramente evidentes em esquistossômulos Mec (A) e também se mostraram com forte fluorescência em esquistossômulos Pel (B). Este último achado mostra que embora já tenha sido previamente evidenciado que o conteúdo das glândulas seja completamente liberado durante a penetração ativa de cercárias (Stirewalt, 1974), fragmentos glandulares ainda restam nos esquistossômulos algum tempo após a penetração.

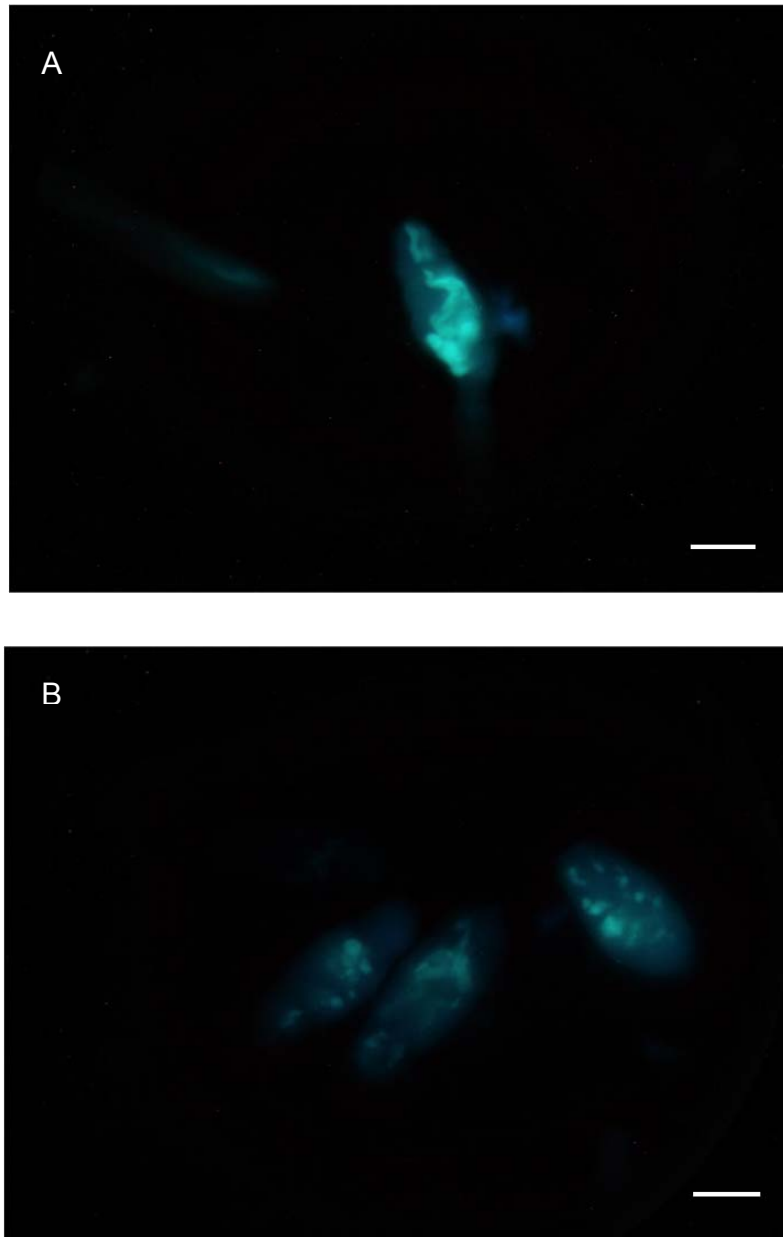


Figura 10: Localização de glutathione em esquistossômulos por microscopia de fluorescência. Esquistossômulos mecanicamente transformados (A) marcados com sonda monochorobimane, mostrando a localização de remanescentes de glândulas acetabulares e pré-acetabulares fortemente marcadas com fluorescência azul. Em B percebe-se a coloração menos intensa de remanescentes glandulares, sob a forma de fragmentos em esquistossômulos obtidos após penetração de cercárias em pele de camundongo. A barra de escala nas figuras mede 25 μ m.

Mitocôndria – a figura 11 mostra marcação de esquistossômulos pelo corante *mitotracker*, específico para mitocôndrias, sob pequeno aumento ao microscópio de fluorescência. Os esquistossômulos Mec foram observados com forte fluorescência vermelha dispersa em toda sua extensão (A). Percebe-se nesse parasito uma leve distorção na nitidez das imagens devido a forte coloração de glândulas pré-acetabulares remanescentes da transformação, que ao microscópio ótico de campo claro apareceram como corpos densamente escuros (não mostrado). Os esquistossômulos Pel quando submetidos a mesma coloração, como visto na figura B também se mostraram com distribuição similar do fluoróforo ao longo de toda a extensão corporal, mas não sendo observado excesso da fluorescência como em Mec.

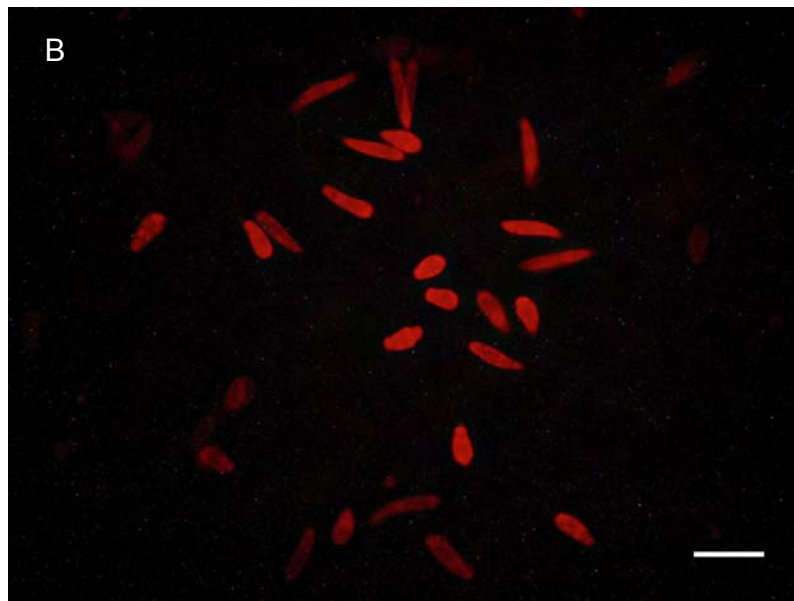
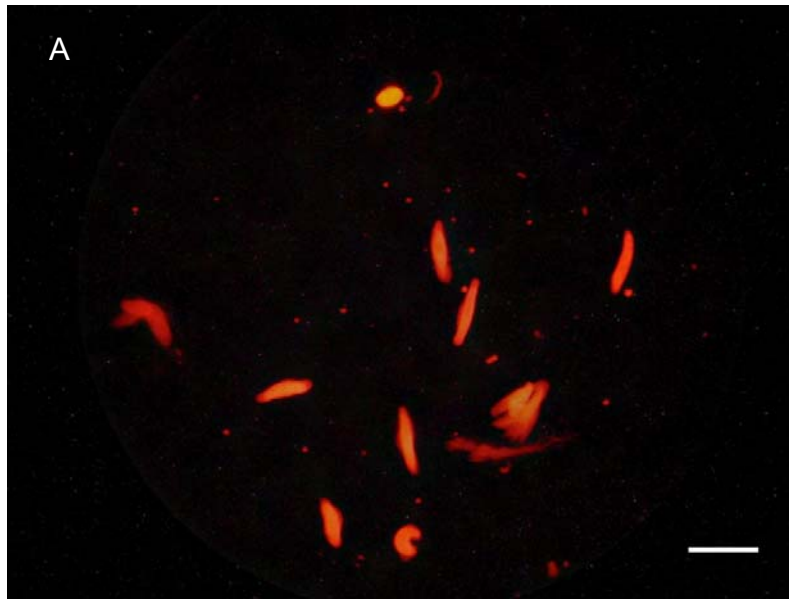


Figura 11: Marcação de mitocôndrias em esquistossômulos Mec e Pel. Na figura A observam-se esquistossômulos Mec marcados com a sonda fluorescente mitotracker, com intensa fluorescência vermelha e leve distorção do foco dada a elevada captação do fluoróforo. A figura B mostra esquistossômulos Pel corados pela mesma sonda e apresentando distribuição similar desta, mas com menor intensidade de fluorescência quando comparado aos esquistossômulos Mec. A barra de escala nas figuras mede 100 μ m.

Membrana citoplasmática – quando os esquistossômulos foram incubados em presença do fluoróforo FM1-43 as membranas que recobriam sua superfície corporal mostraram-se uniformemente coradas, bem como seu trato digestivo e acetábulo (figuras 12A e 12B). Poucas vesículas foram observadas em ambas as preparações, sugerindo baixa internalização da membrana da superfície corporal nessas condições. A intensidade da marcação é idêntica em ambos os tipos de preparações de esquistossômulos, Mec e Pel.

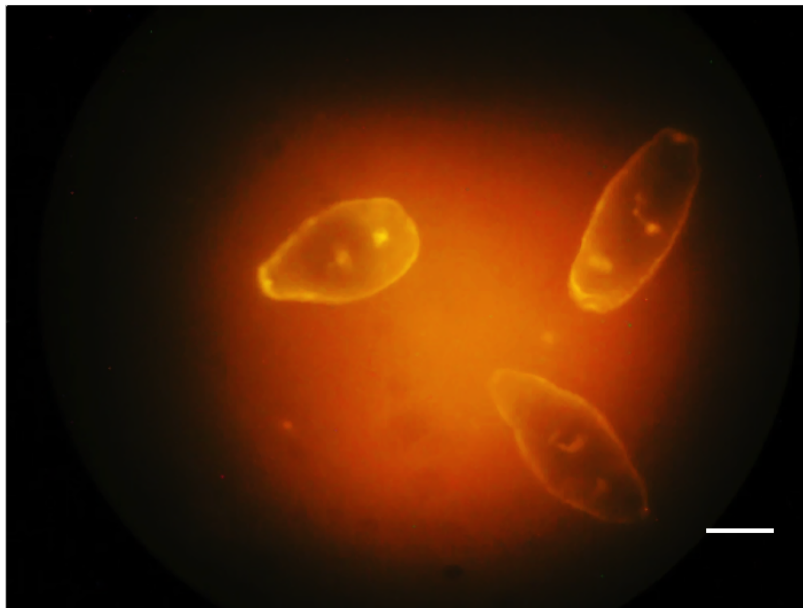
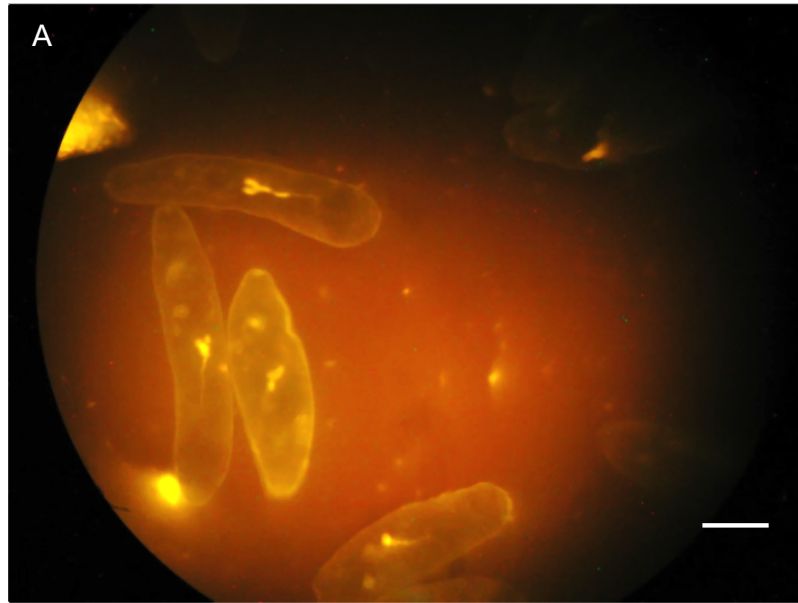


Figura 12: Marcação da membrana citoplasmática de esquistossômulos Mec e Pel. Na figura A se observam esquistossômulos Mec fracamente corados em suas membranas da superfície, bem como do trato digestivo e de glândulas pré-acetabulares pela sonda FM1-43. Em B observam-se esquistossômulos Pel também corados pela mesma sonda, e com o mesmo padrão de distribuição da fluorescência. Poucas vesículas derivadas de membrana superficial foram observadas. A barra de escala nas figuras mede 25 μ m.

4.1.1.2 Análise da integridade e permeabilidade da membrana de esquistossômulos

O tratamento de esquistossômulos Mec e Pel com sondas *lucifer yellow* e Dextrans 10kDa, 20kDa e 40kDa acoplados ao fluoróforo FITC e associados em mistura então denominada “FI-Dextrans” mostrou que entre Mec e Pel as diferenças de distribuição dessas sondas não é significativa, sendo as membranas da superfície do verme coradas, além do trato digestivo, com baixa internalização dos fluoróforos, e, portanto, permeabilidades comparáveis.

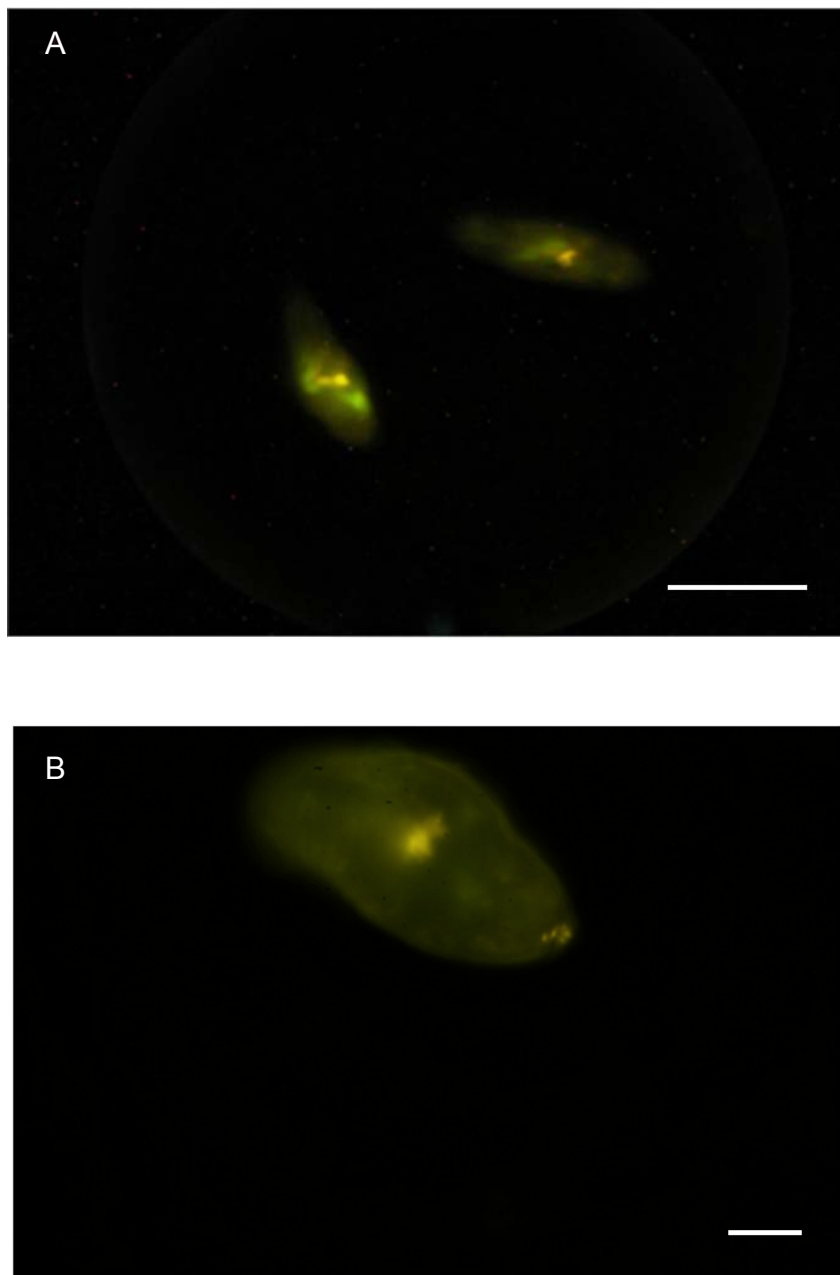


Figura 13: Esquistossômulo Pel corados com sondas para avaliar integridade e permeabilidade da membrana. Na figura A os esquistossômulo Pel são vistos com fluorescência verde relativa a sonda lucifer yellow, em áreas da superfície corporal e do trato digestivo. Em B o esquistossômulo é visto com o padrão idêntico de coloração, mas empregando-se a sonda FI-Dextran. Esse padrão não foi observado em esquistossômulo Mec. A barra de escala em A mede 100 μm e em B mede 25 μm .

4.1.1.3 Reconhecimento imunológico de proteínas/glicoproteínas de superfície em esquistossômulos Mec e Pel

Além do emprego de sondas fluorescentes sob a orientação do pesquisador visitante, prof Dr John Robert Kusel (Glasgow, Scotland), para explorar possíveis diferenças de moléculas entre esquistossômulos Mec e Pel o grupo de pesquisa buscou também parceria para desenvolver estudos de reconhecimento imunológico diferencial entre as duas formas do parasito. Os experimentos delineados para contemplar esse objetivo foram desenvolvidos por mim, como bolsista de doutorado sanduíche (SWE), financiado pelo Programa Ciências Sem Fronteiras (CsF) do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), no Laboratory of Experimental Parasitology da University of Nottingham (Nottingham, (United Kingdom) no período entre abril e agosto de 2014.

Os resultados apresentados nessa seção foram obtidos por ocasião desse estágio, desenvolvido sob a orientação direta do pesquisador professor Dr Michael Doenhoff.

4.1.1.3.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida dos extratos solúveis do parasito

A figura 14 é uma foto de um gel de poliacrilamida a 12% corado por prata, em que foi feito o fracionamento eletroforético de extratos solúveis de esquistossômulos Mec e Pel. A Eletroforese foi realizada com intuito de definir condições para utilização de quantidades comparáveis de proteínas nos immunoblots (*western blots*) com diferentes soros visando identificar diferenças na composição de proteínas/glicoproteínas na superfície dos esquistossômulos Mec e Pel. De acordo com o perfil e a intensidade de cor das bandas, optou-se por empregar os extratos “Mecânico 2” (canaleta 2) e “Pele 2” (canaleta 3) nos immunoblots, e as concentrações de proteínas foram ajustadas de maneira a se aplicar 10µl de cada extrato por canaleta, contendo 5µg de proteínas.

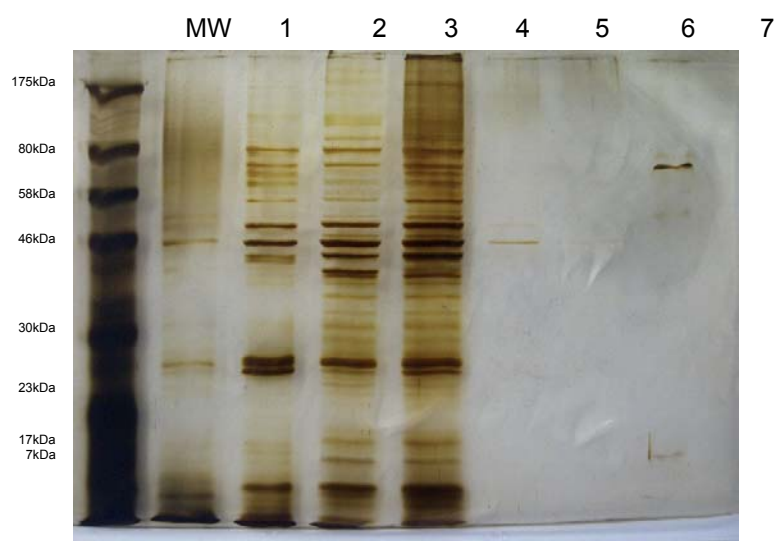


Figura 14: Gel de poliacrilamida a 12% corado com nitrato de prata de extratos de esquistossômulos Mec e Pel. MW – Padrão de Peso molecular; 1 - Extrato Mecanico 1 / Tampao redutor; 2 - Extrato Mecanico 2 / Tampao redutor; 3 - Extrato Pele 2 / Tampao redutor; 4 - Extrato Pele Overnight 2 / Tampao redutor; 5 - Re-extração do pellet Pele 1 / Tampao redutor – 20µl; 6 - Re-extração do pellet Pele overnight 1 / Tampao redutor– 20µl; 7 - Extrato Pele camundongo / Tampao redutor.

Assim, tendo evidenciado que os extratos de esquistossômulos possuem quantidades comparáveis de proteínas, estes foram então empregados em imunoblots, em que se buscou evidenciar padrão de bandas reativas diferente entre esquistossômulos Mec e Pel, quando do emprego de vários tipos de soros diferentes.

4.1.1.3.2 Imunoblots (*western blot*) de extratos solúveis de esquistossômulos Mec e Pel

A figura 15 a seguir mostra fotos de tiras de imunoblots dos extratos de esquistossômulos Mec e Pel contra vários anti-soros (relacionados na tabela 2) de origens diferentes e produzidos contra proteínas do parasito em estádios de cercária ou verme adulto, além de soros de humanos ou animais infectados. Note que cada soro foi usado contra os dois extratos e as tiras estão dispostas de maneira a remontar as membranas originais, estando alinhadas de forma a se comparar o perfil de bandas reativas entre os dois extratos quando reagentes com o mesmo soro. Os soros de

números 7, 8 e 11 mostraram bandas claramente reativas no extrato de esquistossômulos Pel, sem a banda reativa equivalente em esquistossômulos Mec. Por outro lado, os soros 9 e 10 revelaram bandas reativas contra o extrato de esquistossômulos Mec, não visualizadas contra o soro de esquistossômulos Pel.

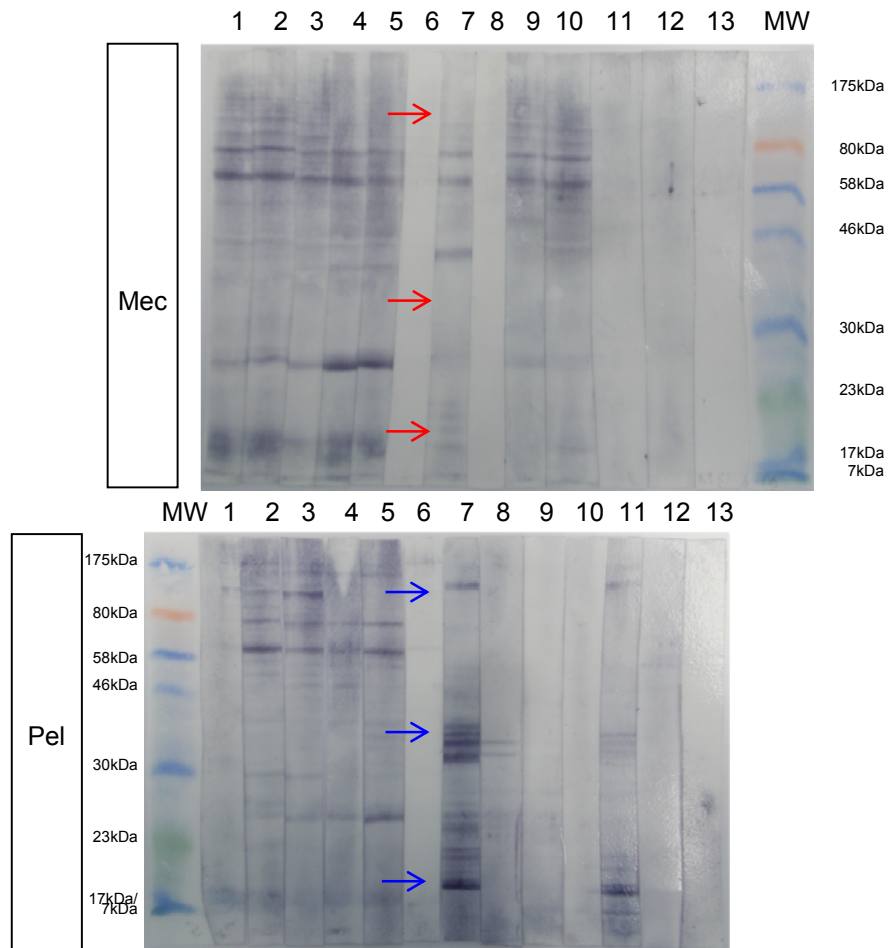


Figura 15: Western blot de extratos de esquistossômulos Mec e Pel usando diferentes soros. MW – Padrão de Peso molecular; 1 - Anti-cercária 1025-0 (usado como controle positivo); 2 - Anti-cercária 1025-0; 3 - Anti-cercária 993 P; 4 - Anti-cercária 942 G; 5 - Anti-cercária 942 M; 6 - IgG anti-cercária de eluição ácida de banda 14kDa 1025-0; 7 - Anti-verme adulto 1056 R; 8 - Soro de coelho infectado - 942 T; 9 - Soro de coelho infectado - 993 R; 10 - Soro de coelho infectado -1142 P; 11 - Soro de coelho infectado - BR47; 12 - Soro de coelho anti-camundongo - BR101; 13 - Anti IgG de coelho (controle negativo). As setas vermelhas apontam para regiões da tira do

extrato Mec em que não houve reação contra o soro de número 7, e as setas azuis destacam as respectivas bandas reativas observadas do soro 7 contra o extrato Pel.

Dentre os soros reativos especificamente contra proteínas do extrato de esquistossômulos Pel, o de número 7 foi selecionado para ser empregado na eluição ácida de anticorpos reativos. Foram retiradas 4 tiras de onde foram eluídos anticorpos reativos contra proteínas com pesos moleculares que variam de aproximadamente 17kDa até outros maiores superiores a 80kDa no extrato de esquistossômulos Pel. Os anticorpos eluídos foram utilizados posteriormente em imunofluorescência para determinação da localização celular das proteínas as quais eles reagem, bem como para testar se são direcionados contra determinantes glicídicos (glicanos).

Antes de empregar os anticorpos eluídos em imunofluorescência os mesmos foram testados em *western blot* contra o extrato de esquistossômulos Pel. Na figura 16 observam-se as bandas reativas com maior intensidade de coloração de acordo com cada anticorpo eluído. Pela inspeção visual dos perfis de bandas reveladas no imunoblot, nota-se que a banda reativa a proteínas de elevado peso molecular (acima de 80kDa) foi revelada por anticorpos de todas as faixas de pesos moleculares.

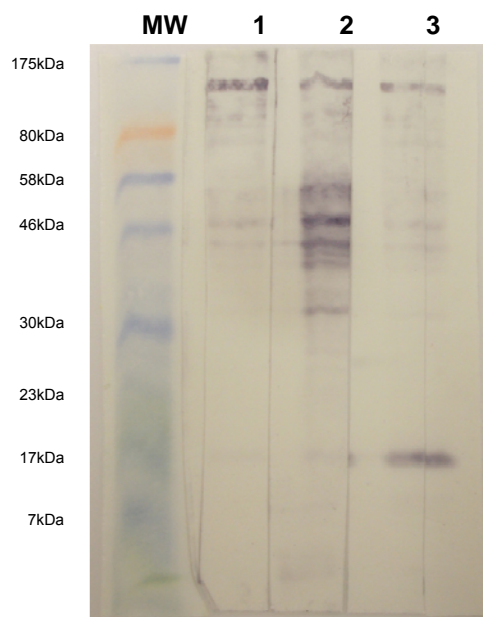


Figura 16: *Western blot* de extrato de esquistossômulo Pel com anticorpos eluídos. MW - Padrao de Peso Molecular; □1 - Anticorpos eluidos da banda de ~80kDa do soro 1056-R anti-verme adulto □2 - Anticorpos eluidos das bandas da faixa de 30kDa a 46kDa do soro 1056-R anti-verme adulto □3 - Anticorpos eluidos da banda de 20kDa do soro 1056-R anti-verme adulto.

Os anticorpos obtidos da eluição ácida nas 4 regiões da membrana, como previamente descrito, foram empregados em experimentos de imunofluorescência como anticorpos primários sob lâminas contendo esquistossômulos Pel fixados em formaldeído 4%. Na figura 17 abaixo são vistas fotos de microscopia de fluorescência dos esquistossômulos tratados com os diferentes anticorpos eluídos, sendo que não foram observadas diferenças marcantes na distribuição da ligação na superfície do parasito. Os anticorpos eluídos da banda de peso molecular próximo a 17kDa ligaram-se em maior quantidade na superfície dos parasitos, o que pode ser observado pela maior intensidade de fluorescência dos esquistossômulos das figuras 17A e 17B quando comparada as dos esquistossômulos reagentes com os outros anticorpos eluídos.

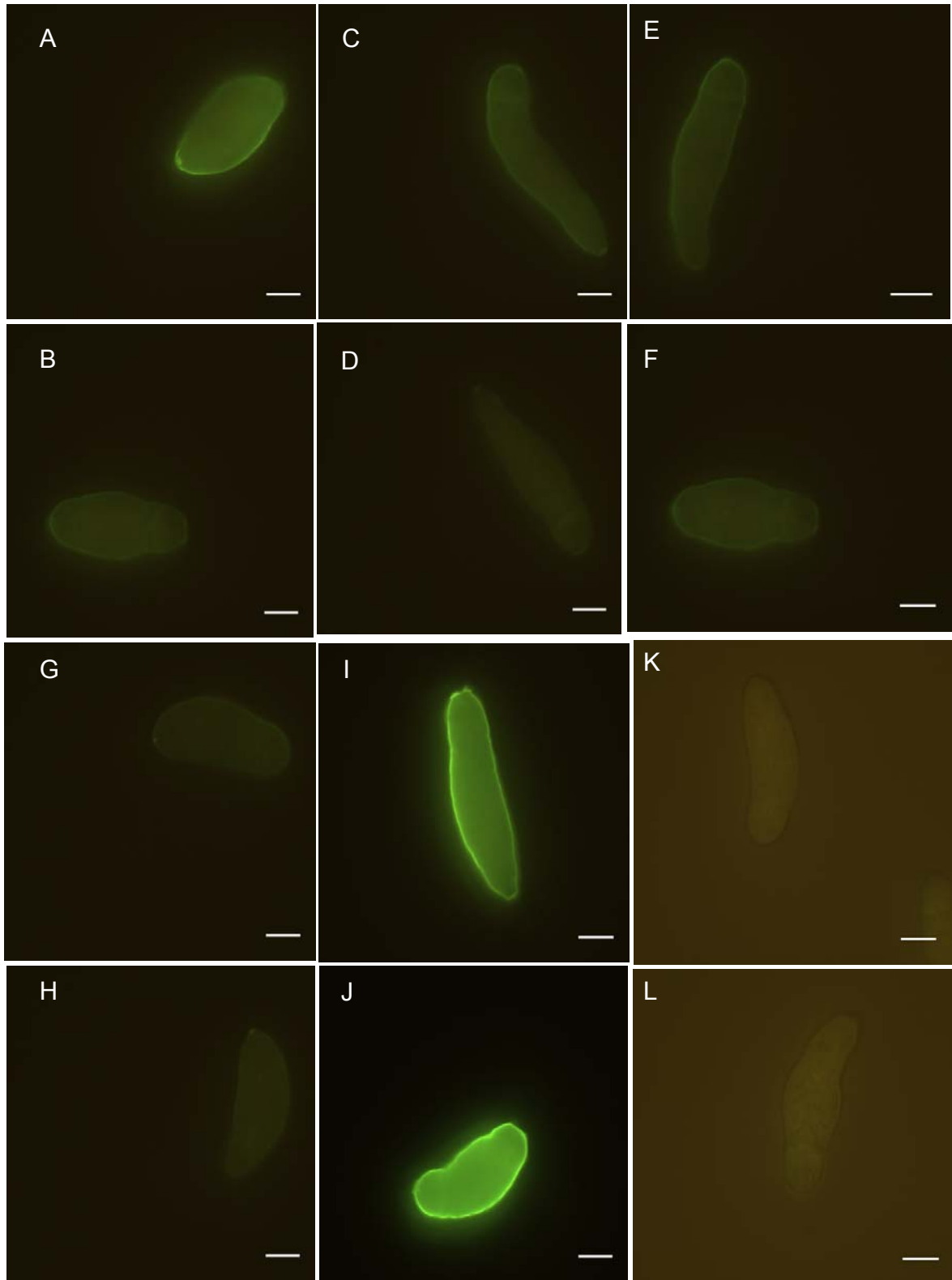


Figura 17: Imunofluorescência de esquistossômulo Pel com anticorpos eluídos. – A e B - Anticorpos eluidos da banda de ~20kDa do soro 1056-R anti-verme adulto; C e D - Anticorpos eluidos das 2 bandas menores da faixa de 30kDa a 46kDa do soro

1056-R anti-verme adulto; □ E e F - Anticorpos eluidos das 3 bandas maiores da faixa de 30kDa a 46kDa do soro 1056-R anti-verme adulto; G e H - Anticorpos eluidos da banda de ~80kDa do soro 1056-R anti-verme adulto. I e J - soro anti-verme adulto 1056-R (Controle positivo); K e L - Anti-IgG de coelho (Controle negativo). A barra de escala em A mede 100µm e em B mede 25 µm.

Como os resultados de marcações usando sondas fluorescentes não evidenciaram claras diferenças entre as duas formas de esquistossômulos, Mec e Pel, corroborando achados prévios (Brink et al, 1978; Protasio et al, 2013), optou-se por compará-los a outros esquistossômulos (Mig), obtidos por migração a partir de fragmentos de pele de camundongos após infecção transcutânea ativa por cercárias (*in vivo*) em relação a capacidade de serem marcados com algumas das sondas previamente usadas.

Marcações de esquistossômulos *in vivo*

4.1.1.4 Análise da integridade e permeabilidade da membrana de esquistossômulos

A sonda Lucifer yellow foi injetada diretamente no local da pele do camundongo exposto as cercárias nas 24 horas anteriores. Os esquistossômulos Mig migraram de fragmentos dessa pele por um período de três horas e foram recolhidos em meio de cultura. A maioria dos parasitos mostraram forte internalização da sonda, que corou homogeneamente estruturas corporais e alguns mostraram mínima captura da sonda ao longo da superfície, além de captação no trato gastrointestinal (Figura 17). Quando comparado a figura 12A percebe-se claramente a diferença na intensidade da fluorescência nas membranas devido a captação da sonda.

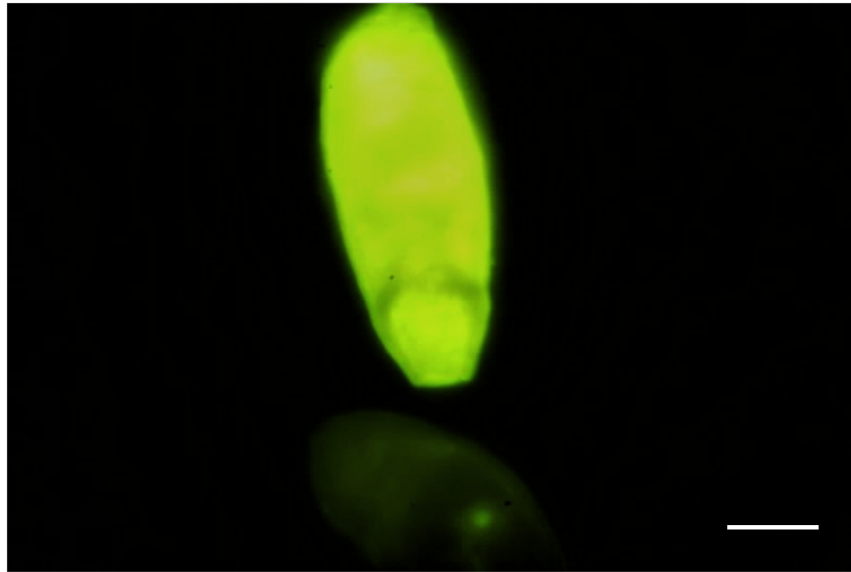


Figura 18: Esquistossômulos Mig corados com sonda Lucifer yellow para permeabilidade da membrana. O esquistossômulo Mig é visto com forte fluorescência verde de membranas relativa a sonda lucifer yellow, em toda a superfície corporal e em estruturas internas. Na parte inferior da figura pode-se observar uma porção da superfície de outro esquistossômulo com um padrão menos frequente de marcação, em que as membranas superficiais são fracamente coradas, mas uma porção do trato digestivo mostra-se com intensa fluorescência. A barra de escala na figura mede 25 μm .

A sonda FI (misturas de Dextran-FITC) foi também injetada na pele de camundongos infectados 24 horas antes com cercárias. Os esquistossômulos Mig foram também obtidos por migração a partir de fragmentos da pele por um período de três horas e foram então recolhidos em meio de cultura. A maioria dos parasitos mostrou extensiva captação de moléculas de Dextran em tecidos internos corporais, o que caracteriza aumento da permeabilidade em membranas dos esquistossômulos obtidos após a infecção percutânea. A figura 19, quando comparada as figuras 13B, mostra claramente a maior intensidade de fluorescência por maior captação da sonda FI pelos esquistossômulos Mig.

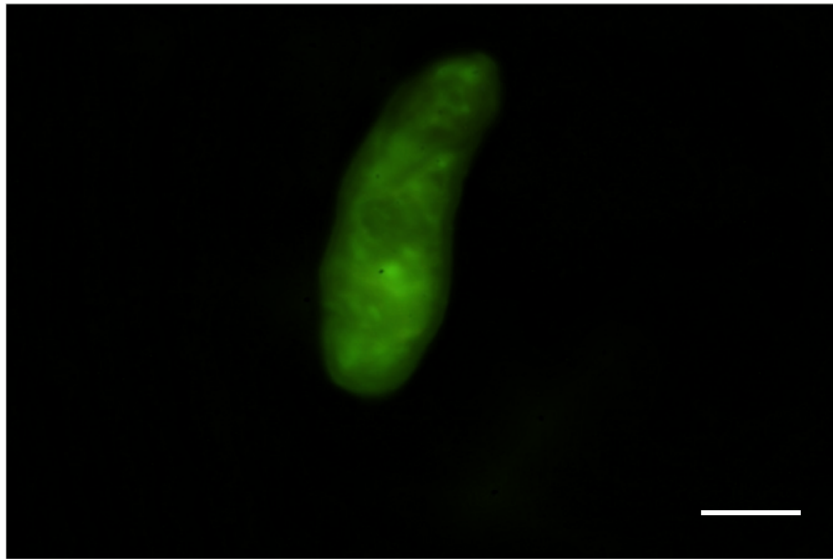


Figura 19: Esquistossômulos Mig corados com sonda FI (Dextran 10kDa, 20kDa e 40kDa acoplados a FITC) para permeabilidade da membrana. O esquistossômulo MIG é visto com forte fluorescência verde de membranas relativa a sonda FI, amplamente distribuída em toda a superfície corporal e em estruturas internas. A barra de escala na figura mede 25 μ m.

Quando a sonda FM1-43 foi injetada na pele de camundongos infectados 24 horas antes, foi percebida massiva captação em estruturas corporais internas, como visto na figura 20. Essa captação da sonda foi também observada quando a mesma foi injetada na pele retirada do aparato de Clegg após a exposição a cercárias e os esquistossômulos então migraram de fragmentos da pele. Os esquistossômulos obtidos dessa maneira e marcados apresentaram o mesmo aspecto do observado na figura 19. Além da marcação em membrana, a internalização da sonda foi também pronunciada.

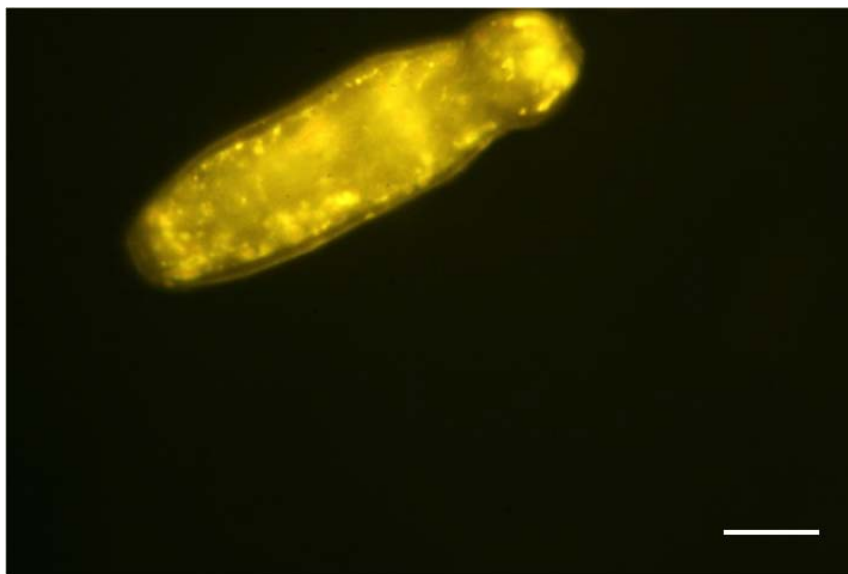


Figura 20: Esquistossômulo Mig corados com sonda FM1-43 injetada na pele durante a infecção transcutânea. Esquistossômulo MIG fortemente marcada pela sonda FM1-43 após a mesma ser injetada na pele de camundongos infectados 24 horas antes. Forte captura da sonda em membranas da superfície e em estruturas internas. A barra de escala na figura mede 25 μm .

4.1.2 Controle das incubações de esquistossômulos *in vivo*

Para investigar se a simples presença de fragmentos de pele de camundongo, ao invés da migração através da pele, é responsável por causar as alterações de permeabilidade e endocitose em esquistossômulos, a captura das sondas Lucifer yellow e FM1-43 foi medida em esquistossômulos Mec na presença de pele de camundongo, como descrito em Materiais e Métodos (3.7 Controle para as incubações com pele de camundongo). Os esquistossômulos, após incubados na presença de pele e das sondas foram recolhidos após sua passagem através de uma peneira (*cell strainer* - BD Falcon) e examinados em microscópio de fluorescência após lavagem com meio de cultura do excesso de sondas. Não foi observado aumento na intensidade de fluorescência nesses esquistossômulos quando comparado aos usados como controle, incubados nas mesmas condições, na presença de Lucifer yellow (Figuras 21A, 21B e 21C) e FM1-43 (Figuras 22A, 22B e 22C), na ausência de pele de camundongo. Assim, pode-se inferir que a presença de pele apenas, sem infecção ou migração não afeta a

permeabilidade e nem processos de internalização de moléculas de maneira visível, sendo para tanto necessária a migração ativa.

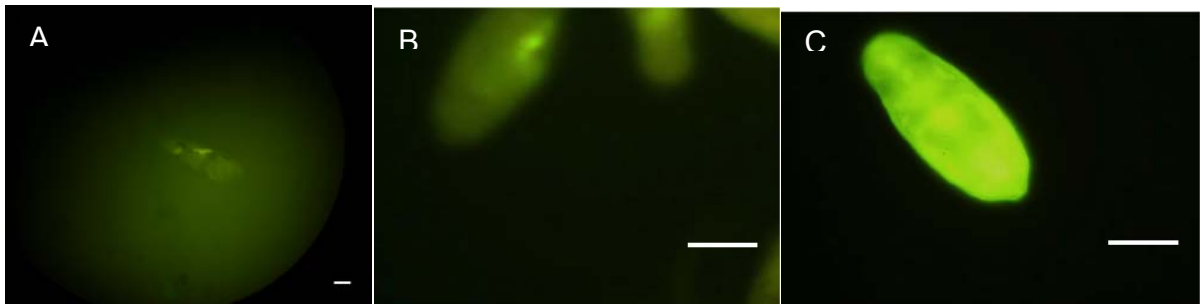


Figura 21: Esquistossômulos cultivados em presença de pele de camundongo e corados com sonda Lucifer yellow (Controle). Esquistossômulo Mec cultivado na ausência (A) e na presença (B) de fragmentos de pele de camundongo e marcados pela sonda Lucifer yellow, com fraca fluorescência distribuída na superfície corporal e marcação mais intensa no trato digestivo. Na figura C observa-se esquistossômulo Mig com elevada intensidade de fluorescência distribuída em toda sua superfície corporal e em estruturas internalizadas. A barra de escala nas figuras mede 25 μm .

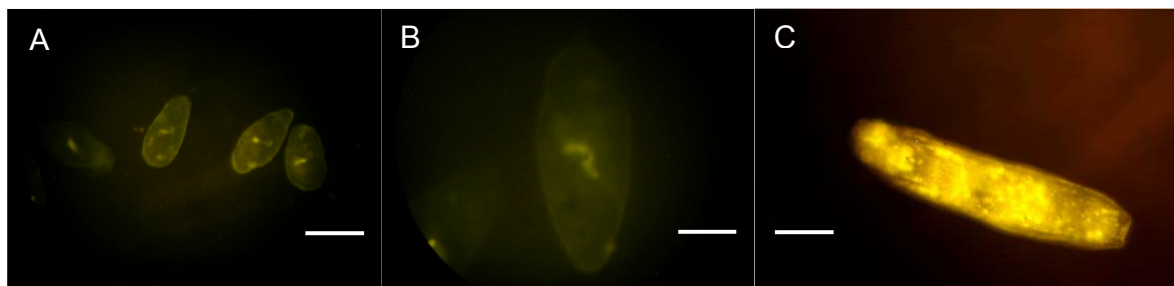


Figura 22: Esquistossômulos cultivados em presença de pele de camundongo e corados com sonda FM1-43 (Controle). Esquistossômulo Mec cultivado na ausência (A) e na presença (B) de fragmentos de pele de camundongo e marcados pela sonda FM1-43, com fraca fluorescência distribuída na superfície corporal e marcação mais intensa no trato digestivo. Na figura C observa-se esquistossômulo Mig com elevada intensidade de fluorescência distribuída em toda sua superfície corporal, além de forte sinal de estruturas corporais internas. A barra de escala na figura A mede 100 μm e nas figuras B e C as barras medem 25 μm .

4.2 Estudo comparativo entre esquistossômulos cultivados em soro portal e soro periférico de hamster

Embora haja considerável número de transcriptomas de *S. mansoni* para o estágio de esquistossômulos e, a partir destes, vários dados de expressão gênica tenham sido obtidos com sucesso, ainda não foi estudado transcriptoma do parasito quando submetido a uma condição que mimetize com grande proximidade a fase portal da infecção. Algumas características do nosso estudo foram delineadas com vistas a atingir este propósito, de simular com grande fidelidade o ambiente do sistema vascular porta hepático do hospedeiro definitivo, dentre elas: 1) adição de soro de hamster em cultura, visando estabelecer uma condição similar a encontrada pelo parasito tão logo este acesse o local no organismo do hospedeiro onde sua maturação a verme adulto acontece; 2) escolha de tempos curtos de cultura, (3 horas e 12 horas), representando o contato inicial do parasito com fatores presentes no soro portal; 3) emprego de um meio mínimo, suplementado apenas com os soros de hamster e sem a adição de fatores comumente utilizados, que possam interferir diretamente com a expressão gênica, como soro fetal bovino e insulina; 4) expressão dos resultados de perfis de expressão gênica em comparação ao parasito no mesmo estágio evolutivo, esquistossômulo, em duas condições diferentes: recém transformado e cultivado em presença de soro periférico de hamster, ambos simulando momentos iniciais da infecção, ainda na pele do hospedeiro definitivo; 5) emprego de metodologia de sequenciamento de nova geração (NGS), o que permite gerar quantidade expressiva de dados de expressão gênica.

4.2.1 Obtenção de soros

Nas repetições do procedimento para obtenção dos soros periférico e portal de hamster foram utilizados 50 animais, sendo estes divididos na proporção de 10 animais para obtenção de soro periférico e 40 animais para obtenção de soro portal. Uma vez estabelecida a proporção, em cada repetição foram obtidos aproximadamente 15ml dos soros periférico e portal inativados e estéreis a cada vez que o procedimento foi realizado.

4.2.2 Viabilidade dos parasitos

No estudo de viabilidade dos parasitos, além da contagem diferencial de esquistossômulos vivos e mortos, foi também avaliada a contaminação por caudas e por cercarias nas preparações.

A viabilidade média, expressa como a porcentagem média de parasitos vivos foi de 78,6%, sendo a maior obtida nos parasitos recém transformados (TZ=82,8%) e a menor nos parasitos cultivados em soro portal por 12 horas (SPO=76,3%). Pela análise estatística por ANOVA ao nível de significância de 95% não houve diferença significativa entre os valores obtidos (Gráfico 1), tendo as amostras representatividades semelhantes para os parasitos nas diferentes condições propostas no estudo.

O gráfico 2 mostra as contagens somadas de caudas e cercárias, principais contaminantes das preparações. Não foram utilizados materiais biológicos advindos de preparações em que a contaminação conjunta, por caudas e cercarias, fosse superior a 5%.

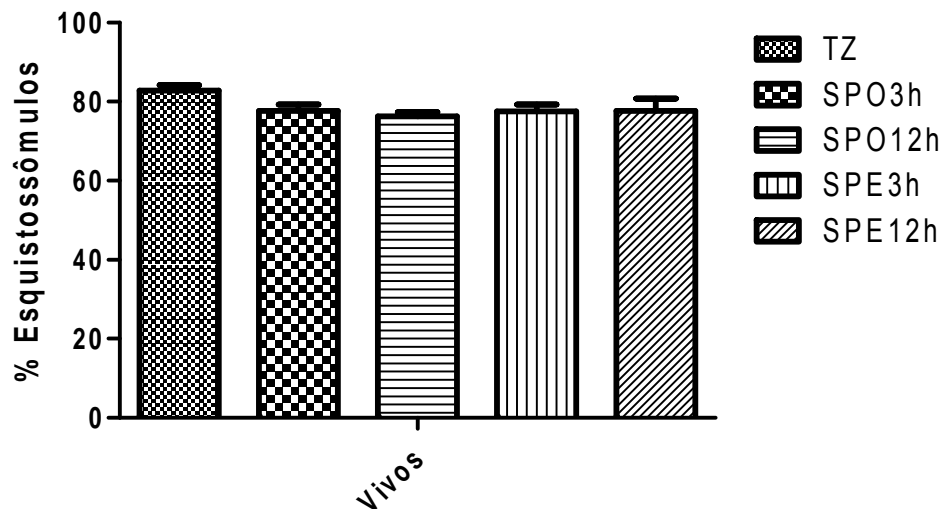


Gráfico 1: Gráfico representativo das contagens de esquistossômulos vivos (viáveis) nas diferentes condições: TZ – esquistossômulos “tempo zero”, recém preparados; SPO3h – esquistossômulos cultivados por 3 horas em presença de soro portal de hamster; SPO12h – esquistossômulos cultivados por 12 horas em presença de soro portal de hamster; SPE3h – esquistossômulos cultivados por 3 horas em presença de soro periférico de hamster; SPE12h – esquistossômulos cultivados por 12 horas em presença de soro periférico de hamster. Esquistossômulos foram considerados vivos quando apresentaram fluorescência verde após coloração com Acridine orange/Brometo de etídio. A quantidade de esquistossômulos vivos foi expressa em porcentagem de esquistossômulos contados. N = 2 repetições de cada experimento e as contagens foram realizadas em 10 campos de lâminas contendo esquistossômulos de cada preparação, ao microscópio de fluorescência, com aumento de 100X. Não houve diferença estatisticamente significativa para valor de $p < 0,05$ para nenhuma das amostras em relação aos esquistossômulos TZ.

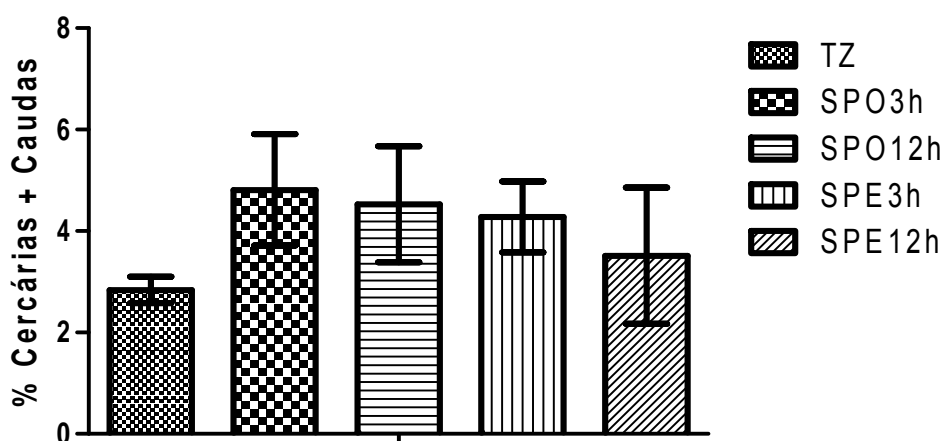


Gráfico 2: Gráfico representativo das contagens de contaminantes (cercárias e caudas) em preparações de esquistossômulos nas diferentes condições. TZ – esquistossômulos “tempo zero”, recém preparados; SPO3h – esquistossômulos cultivados por 3 horas em presença de soro portal de hamster; SPO12h – esquistossômulos cultivados por 12 horas em presença de soro portal de hamster; SPE3h – esquistossômulos cultivados por 3 horas em presença de soro periférico de hamster; SPE12h – esquistossômulos cultivados por 12 horas em presença de soro periférico de hamster. A quantidade de contaminantes foi expressa em porcentagem de espécimens contados por campo. N = 2 repetições de cada experimento e as contagens foram realizadas em 10 campos de lâminas contendo esquistossômulos de cada preparação, ao microscópio de fluorescência, com aumento de 100X. Não houve diferença estatisticamente significativa para valor de $p < 0,05$ para nenhuma das amostras em relação a preparação de esquistossômulos TZ.

A figura 23 mostra esquistossômulos marcados com as fluorescências de *acridine orange* e brometo de etídio e observados ao microscópio de fluorescência com filtro de 515 nm. As células vivas apresentam-se marcadas com fluorescência verde, ao passo que células mortas se apresentam com fluorescência vermelha, devido a permeabilidade ao brometo de etídio aumentada apenas nesta condição.

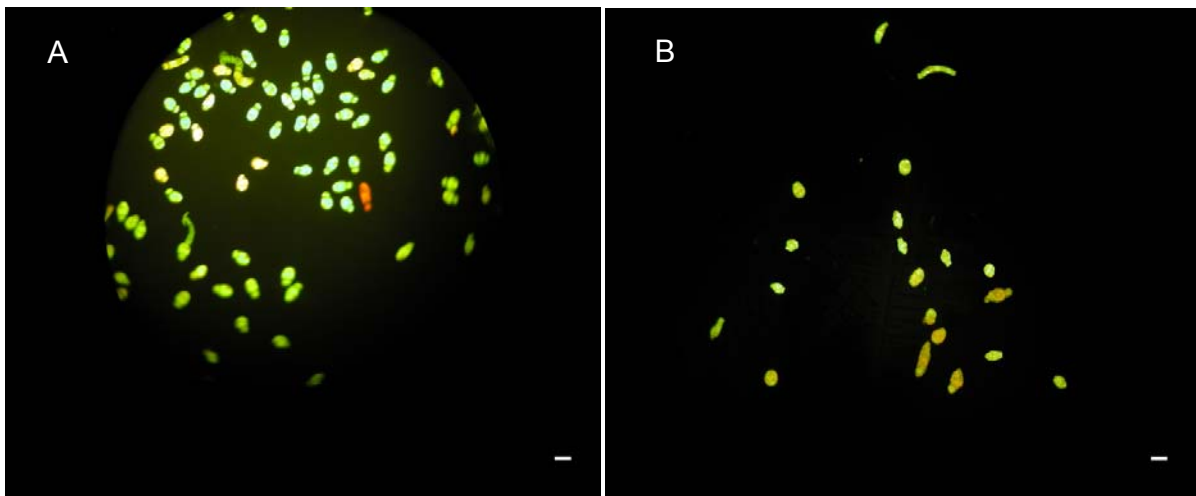


Figura 23: Viabilidade de esquistossômulos cultivados por 12 horas em presença de soro de hamster. Na figura A notam-se os esquistossômulos após cultivo por 12 horas na presença de soro portal de hamster, corados predominantemente com fluorescência verde, além de coloração laranja e vermelha. Na figura B esquistossômulos após cultivo por 12 horas na presença de soro periférico de hamster são observados com aspecto idêntico. Em ambas as figuras, esquistossômulos com fluorescência fortemente alaranjada a vermelha são mortos e esquistossômulos com fluorescência verde são vivos. A barra de escala nas figuras medem 50 μ m.

4.2.3 Purificação de RNA

Considerando-se a quantidade de material para a construção das bibliotecas e construção de transcriptomas e o fato de que o rendimento do material obtido após a eliminação do rRNA é menor do que 10%, foram realizadas várias repetições do experimento para extração e isolamento do mRNA. Em cada repetição obteve-se rendimento aproximado de 8 a 9 μ g de RNA total a partir de $1,0 \times 10^5$ parasitos. O RNA extraído teve sua qualidade atestada e foi quantificado por leitura espectrofotométrica em $\lambda = 260\text{nm}$. A integridade do RNA foi atestada por cromatografia capilar antes e depois da etapa de eliminação do rRNA. Apenas os RNAs totais cujas preparações apresentaram relações $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} > 2,0$ e $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230} > 1,9$ foram utilizados para eliminação do rRNA e obtenção de mRNA.

A tabela 4 relaciona a composição de cada réplica de amostra de mRNAs de esquistossômulos das condições do estudo. Algumas amostras foram compostas por material advindo de única preparação e outras foram compostas pela união de alíquotas de mRNAs advindos de repetições diferentes.

TABELA 4: COMPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS DE MRNAS DE ESQUISTOSSÔMULOS PARA CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECAS E SEQUENCIAMENTO

SPE 3h		SPE 12h		SPO 3h		SPO 12h	
Amostra	Quantidade (µg)	Amostra	Quantidade (µg)	Amostra	Quantidade (µg)	Amostra	Quantidade (µg)
130712	0.3	130712	0.6	130712	0.4	130712	0.5
310812	0.5	310812	2.5	031012_01	4	031012-01	1.5
031012_01	3	031012_01	3	031012_02	2	031012-02	0.1
031012_02	2.5	031012_02	0.3	020413_	9	020413_	7
020413_	4	020413_	5	160413	14	160413	7
160413	8	160413	6				
Total	18.3		17.4		29.4		16.1

Em cada condição, amostras obtidas de preparações diferentes são identificadas com códigos separados.

Na figura 24 são observados perfis cromatográficos de mRNAs, em que se nota ausência de pico com elevada intensidade de fluorescência próximo ao tempo de retenção de 40s (equivalente ao rRNA), e observa-se o evidente enriquecimento de mRNAs, dada presença do pico com tempo de retenção de 25s. A eletroforese capilar foi realizada em aparelho Bioanalyser 2100[®] (Agilent), lotado no laboratório de Parasitologia Celular e Molecular (LPCM/CPqRR-FIOCRUZ).

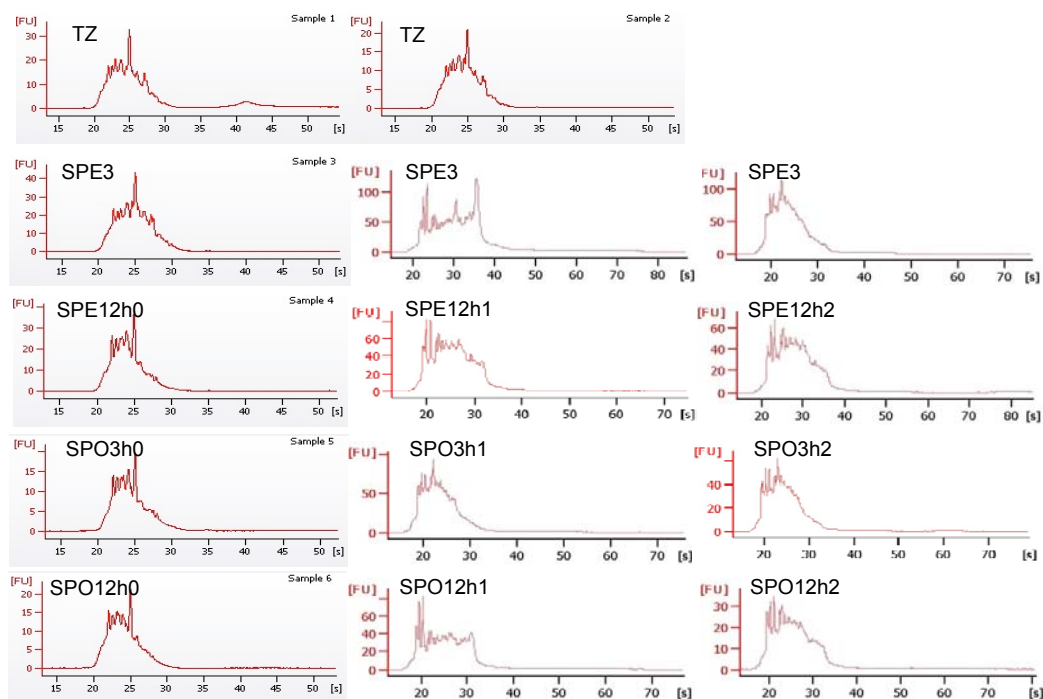


Figura 24: Eletroforegramas de mRNAs purificados de esquistossômulos de *S. mansoni* recém-transformados a partir de cercarias da cepa LE ou cultivados em soro de hamster. Na figura observam-se perfis de eletroforese capilar de mRNA purificados de esquistossômulos recém transformado (TZ); esquistossômulos cultivados por 3 horas em soro periférico (SPE3h0; SPE3h1; SPE3h2); esquistossômulos cultivados por 12 horas em soro periférico (SPE12h0; SPE12h1; SPE12h2); esquistossômulos cultivados por 3 horas em soro portal (SPO3h0; SPO3h1; SPO3h2); esquistossômulos cultivados por 12 horas em soro portal (SPO12h0; SPO12h1; SPO12h2). É notável a semelhança entre os perfis, o que reflete homogeneidade entre as réplicas das bibliotecas a serem construídas a partir das respectivas amostras.

4.2.4 RNA-Seq

Aproximadamente 15 milhões de *reads* com 50 nt foram produzidas no sequenciador SOLiD™ para cada uma das amostras representativas das condições experimentais. Foram descartadas aquelas *reads* com baixa qualidade das sequências, ou seja, não mapeadas, com número de bases não alinhadas superior ao máximo permitido –

mismatches, além aquelas com alinhamentos em regiões de junção de éxons. Foram ainda descartadas *reads* que se alinharam a sequências de rRNAs e tRNAs. Foram consideradas válidas apenas as *reads* mapeadas em única localização contra o genoma de referência. Todas as demais foram excluídas do estudo de expressão relativa de genes. A tabela 5 apresenta os dados gerais dos sequenciamentos e alinhamentos de *reads* das 5 bibliotecas de cDNAs construídas.

TABELA 5: RESUMO DOS DADOS DE ALINHAMENTO DE *READS*

Amostra	Réplica	SOLID ID	<i>Reads</i> Processadas	<i>Reads</i> Mapeadas
TZ	1	1711 TZ	22.259.187	17.072.843 *
SPO3H	1	SPO_3H0	22,593,851	12,862,079 (56.93%)
	2	SPO_3H1	44,195,718	16,449,088 (37.22%)
	3	SPO_3H2	39,039,144	14,601,483 (37.40%)
SPO12H	1	SPO12_12H0	21,124,149	12,570,187 (59.51%)
	2	SPO12_2H1	40,505,621	14,860,486 (36.69%)
	3	SPO12_12H2	36,698,989	13,448,911 (36.65%)
SPE3H	1	SPE_3H0	23,249,600	13,588,324 (58.45%)
	2	SPE_3H1	45,458,544	17,539,615 (38.58%)
	3	SPE_3H2	43,185,497	16,955,168 (39.26%)
SPE12H	1	SPE12_12H0	23,509,190	13,667,938 (58.14%)
	2	SPE12_2H1	40,341,711	16,303,097 (40.41%)
	3	SPE12_12H2	44,680,174	17,471,587 (39.10%)
			Média	15,026,496.9(44.86%)

TZ - esquistossômulo recém transformados; * Dados não expressos em porcentagem por ter sido obtido usando programa diferente dos demais (BioScope Life Technologies); **SPO3H** - esquistossômulo cultivado por 3 horas em soro portal de hamster; **SPO12H** - esquistossômulo cultivado por 12 horas em soro portal de hamster; **SPE3H** - esquistossômulo cultivado por 3 horas em soro periférico de hamster; **SPE12H** - esquistossômulo cultivado por 12 horas em soro periférico de hamster;

Após a análise dos alinhamentos das *reads* contra o genoma de referência, empilhamento destas nas diferentes posições dos genes anotados, obteve-se uma lista de 11.844 identificadores de genes com as respectivas contagens brutas de *reads* alinhadas contra o genoma nas cinco condições propostas no estudo.

A estimativa da cobertura do transcriptoma predito de *S. mansoni* relativa a contagem total das *reads* válidas em cada condição do estudo foi de 45,5 vezes. Esse valor foi obtido considerando no cálculo a média da contagem de *reads* válidas em cada condição, 15 milhões, além do tamanho das *reads*, 50nt, o que representou o sequenciamento de 750MB. Considerando ainda o tamanho do transcriptoma predito de *S. mansoni* em 16,5MB, o total de bases sequenciadas representa uma cobertura de 45,5 vezes.

4.2.4.1 Expressão diferencial de genes entre esquistossômulos SPO e SPE

Da tabela gerada no alinhamento das *reads* contra o genoma de *S. mansoni* (Zerlotini et al, 2011) em cada uma das bibliotecas sequenciadas, foi gerada uma nova tabela, com 11.103 transcritos apresentando valores de contagens detectáveis e superiores a 1 em todas as bibliotecas.

Esta lista de transcritos foi utilizada como arquivo de entrada na implementação DESeq2 em ambiente R, utilizando a função `estimateSizeFactor` para verificar o fator de tamanho de cada biblioteca, relacionar com cada gene e então evidenciar as diferenças de expressão. Inicialmente, buscou-se estudar a expressão diferencial de genes quando as bibliotecas geradas pelo cultivo dos esquistossômulos em soros diferentes foram diretamente comparadas, ou seja, comparação SPE3h x SPO3h e SPE12h X SPO12h. O programa não gerou uma lista de transcritos diferencialmente expressos nessas comparações com valores de $P < 0,05$.

Optou-se, portanto, por realizar a análise da expressão diferencial de genes quando as bibliotecas geradas pelo cultivo dos esquistossômulo em um mesmo soro, mas em tempos diferentes foram diretamente comparadas, ou seja, SPE3h x SPE12h e SPO3h x SPO12h. Em ambas as comparações, o programa DESeq2 gerou lista de genes diferencialmente expressos. Considerando então o objetivo principal de estudar genes

diferencialmente expressos na presença do soro portal do hospedeiro definitivo, optou-se por seguir com o estudo dos genes diferencialmente exclusivamente na comparação SPO3h x SPO12h. Para tanto, os genes que foram também reportados como diferencialmente expressos na lista gerada da comparação SPE3h x SPE12h foram excluídos da análise.

Portanto, os resultados apresentados a seguir se referem a esse racional.

4.2.4.2 Expressão diferencial de genes entre esquistossômulos SPO3h e SPO12h

Para avaliar a similaridade entre as bibliotecas, os valores de coeficientes de correlação de Pearson e de Spearman foram calculados a partir das contagens de *reads* alinhadas, para todas as possibilidades de análise em pares entre elas. Os valores elevados para ambos os coeficientes evidenciam alta similaridade entre as bibliotecas geradas a partir de esquistossômulos cultivados em soro portal (SPO3h e SPO12h).

A figura 25 mostra gráficos de pontos de correlação para cada comparação das contagens de *reads* alinhadas entre as amostras de bibliotecas em pares, com os respectivos valores para coeficiente de correlação de Pearson. Os valores para coeficiente de Spearman mostraram-se similarmente elevados (dados não mostrados) para todas as comparações de bibliotecas em pares.

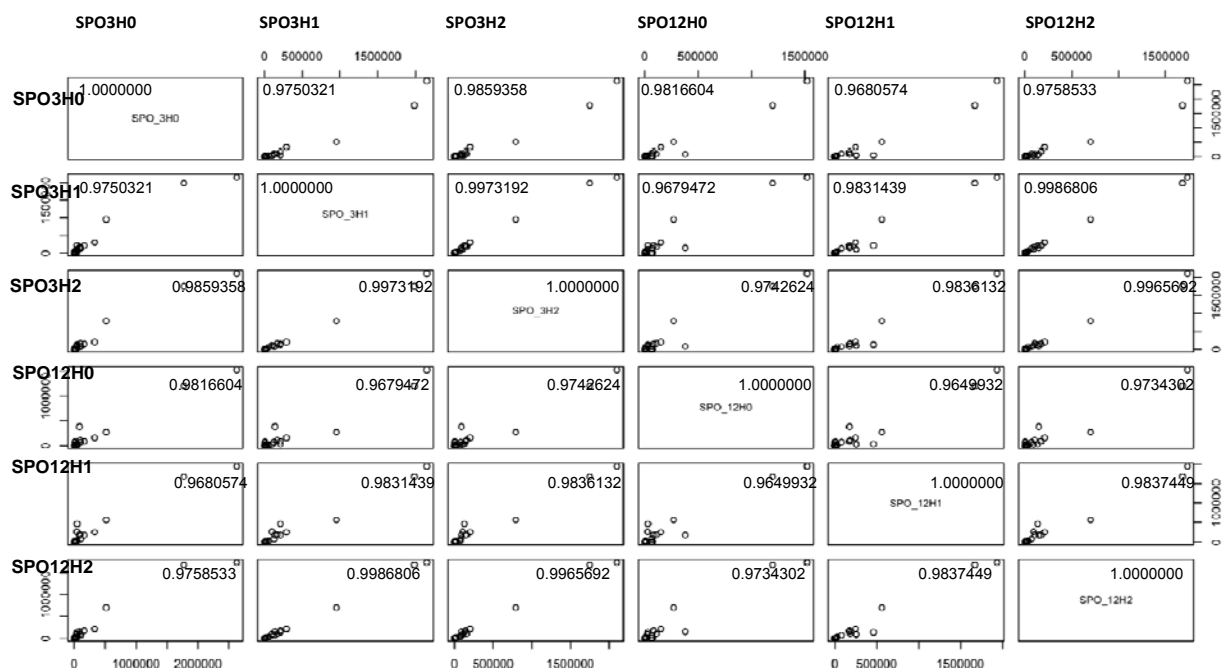


Figura 25: Correlação entre bibliotecas SPO3h e SPO12h. Gráficos de correlação entre contagens de reads de bibliotecas SPO3h e SPO12h analisadas par a par. No canto superior esquerdo de cada gráfico encontra-se o coeficiente de correlação de Pearson para a comparação. Os altos valores observados mostram que as bibliotecas apresentam elevada similaridade. SPO3H0; SPO3H1; SPO3H2 – bibliotecas de esquistossômulos cultivados por 3 horas em soro portal de hamster; SPO12H0; SPO12H1; SPO12H2 – bibliotecas de esquistossômulos cultivados por 12 horas em soro portal.

Usando o pacote DESeq2 no programa R foram identificados 103 transcritos diferencialmente expressos entre as triplicatas de bibliotecas SPO3h e SPO12h, com valor de P-ajustado < 0,05. Assim, após 12 horas de estímulo por soro portal, 65 transcritos estavam regulados acima (*up regulados*) por apresentarem valores de expressão (fold change) > 1 e 38 estavam regulados abaixo (*down regulados*), possuindo valores de expressão $0 > 1$.

Uma representação gráfica da expressão gênica global (*MA plot*) é mostrada a seguir (gráfico 3).

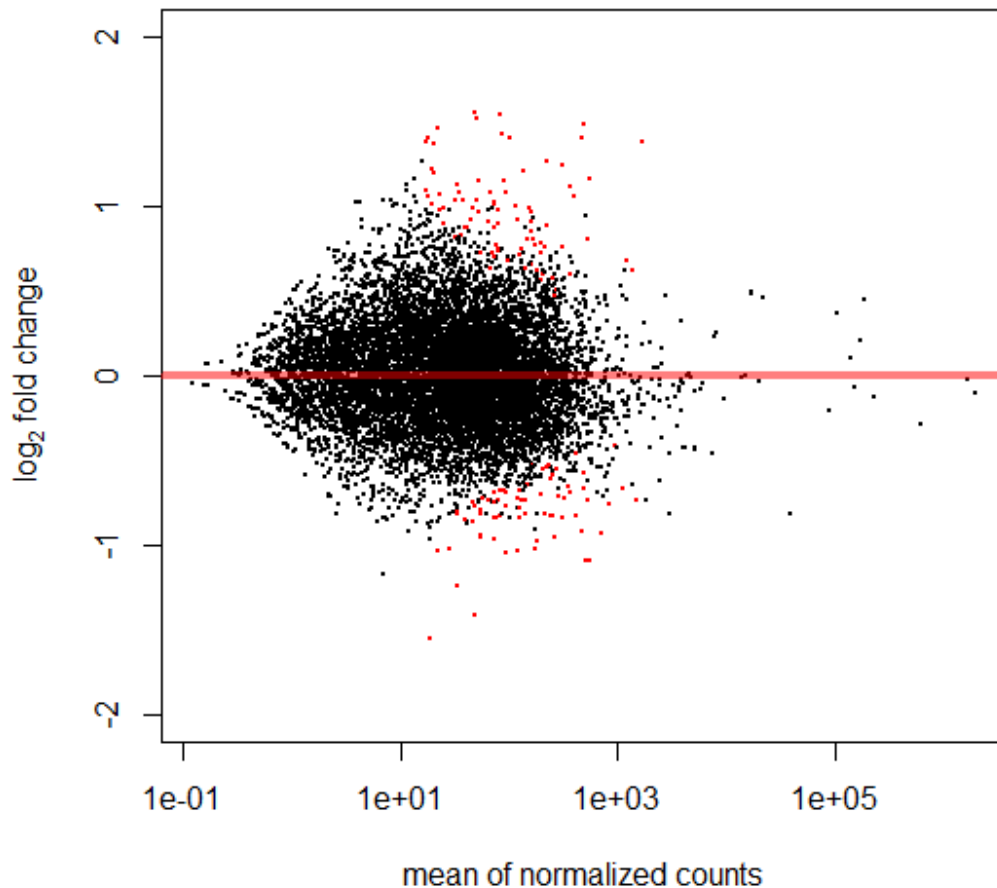


Gráfico 3: Expressão diferencial de genes entre esquistossômulos SPO3h e SPO12h. Gráfico tipo MA (M =Log das proporções; A=média das médias) entre esquistossômulos SPO3h e SPO12h relacionando LogFoldChange (eixo y) e média das contagens normalizadas (eixo x) para valor de P-ajustado<0,05. Transcritos com Log2FoldChange maiores do que 1 são aqueles com maiores níveis de expressão nos esquistossômulos cultivados por 12horas na presença do soro portal (SPO12h) e aqueles com Log2FoldChange menores do que 1 foram mais expressos nos esquistossômulos cultivados por 3 horas na presença de soro portal. Os pontos vermelhos representam os transcritos diferencialmente expressos para um valor de P<0,05.

Da lista dos 103 genes diferencialmente expressos entre os esquistossômulos cultivados por 3horas e 12horas em presença de soro portal foram excluídos aqueles que também foram relacionados como diferencialmente expressos na comparação entre esquistossômulos cultivados por 3horas e 12horas na presença de soro periférico

de hamster, SPE3h x SPE12h (dados não mostrados). Assim, foi gerada uma nova lista contendo 58 genes com expressão diferencial exclusivamente entre os dois tempos de cultura dos esquistossômulos em soro portal (ANEXO I).

Um sub-conjunto de 19 genes, dentre aqueles 58 citados acima, com valores de expressão (fold change) >2 para aqueles supra regulados em 12 horas ou <1 para os supra regulados em 3 horas (Tabela 6), foi também avaliado em sua expressão gênica relativa entre SPO3h e SPO12h pelo emprego da técnica de PCR em tempo real (qPCR), com vistas a validar o perfil de expressão obtido no RNA-seq.

TABELA 6: SUB-CONJUNTO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS ENTRE ESQUISTOSSÔMULOS SPO3H E SPO12H.

Identificador do gene	Descrição	Valor P-ajust	Fold Change
Smp_157070	cysteine rich with egf domains protein	1.67E-03	2.76
Smp_134570	hypothetical protein	2.10E-05	2.7
Smp_024390	microsomal signal peptidase 25 kDa subunit	4.02E-03	2.64
Smp_130260	hypothetical protein	6.41E-03	2.6
Smp_024390	microsomal signal peptidase 25 kDa subunit	3.99E-03	2.58
Smp_172110	protein disulfide isomerase A6	2.09E-06	2.4
Smp_177040	gpi mannosyltransferase 2	9.39E-04	2.16
Smp_083080	Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase	1.10E-04	2.12
Smp_027990	homeobox protein nk 2	5.74E-03	2.11
Smp_089000	translocon associated protein subunit delta	2.73E-02	2.05
Smp_103560	hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase	4.27E-02	2.05
Smp_079230	immunophilin FK506 binding protein FKBP12	4.68E-02	2.03
Smp_079420	ankyrin repeat domain containing protein 42	5E-02	2.02
Smp_042790	dolichol phosphate mannosyltransferase	5E-02	2.02
Smp_019060	sec61 beta subunit	1.67E-03	2.01
Smp_136310	sodium bile acid cotransporter	2.85E-02	0.49
Smp_053420	fermitin family 1	7.16E-04	0.49
Smp_007270	Smoothelin	4.34E-03	0.49
Smp_175790	phospholipid translocating ATPase	7.63E-04	0.42
Smp_145540	muscarinic acetylcholine receptor	7.16E-04	0.34

Genes diferencialmente expressos entre SPO3h e SPO12h com valor de P-ajustado <0,05.

De acordo com as características descritas nas anotações desses genes eles estão envolvidos principalmente em mecanismos de transporte de membrana, resposta a stress, sinalização celular, citoesqueleto e síntese de nucleotídeos e proteínas. Os níveis de expressão obtidos por ambos os métodos apresentaram a mesma tendência para 16 dos genes, (Smp024390.1, Smp157070.1, Smp134570.1, Smp130260.1, Smp177040.1, Smp083080.2, Smp089000.1, Smp103560.1, Smp079230.1, Smp019060.1, smp042790.1, Smp079420.1, Smp007070.1, Smp136310.1, Smp145540.1, Smp175790.1) e apenas dois deles (Smp027990.1, Smp172110.1)

apresentaram valores de expressão em discordância entre os dois métodos. Para um dos genes (Smp_053420) não foi possível determinar o nível de expressão por qPCR, e novos oligonucleotídeos (*primers* e sonda) deverão ser sintetizados para esta finalidade. O gráfico 4 abaixo evidencia a correlação entre os níveis de expressão para os diferentes genes entre os dois métodos, RNASeq e qPCR. O coeficiente de correlação de Pearson para os valores de expressão obtidos nos dois métodos, para valor de $P < 0,05$, foi de 0,879, mostrando elevada correlação entre eles, o que valida, portanto, o perfil de expressão obtido no RNASeq.

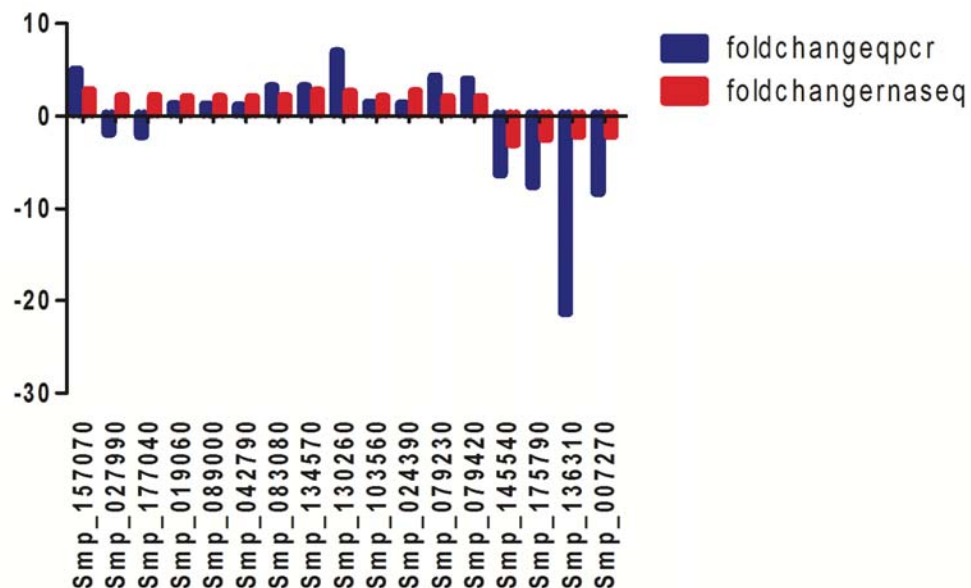


Gráfico 4: Expressão gênica relativa de um subconjunto de genes determinada por dois métodos, RNASeq e qPCR, entre bibliotecas SPO3h e SPO12h. Gráfico de barras dos valores de *fold change* para um subconjunto de 17 genes. As barras vermelhas representam a expressão gênica obtida por RNASeq e as barras azuis a expressão gênica obtida por qPCR. O coeficiente de correlação de Pearson para os valores de expressão pelos dois métodos ($P < 0,05$) pode ser visto na área do gráfico, evidenciando que estes valores são altamente relacionados. No gráfico é possível observar que 15 dos 17 genes tem a mesma tendência para a expressão obtida pelos dois métodos.

5 Discussão

No complexo ciclo evolutivo do *Schistosoma mansoni* ocorre uma dramática mudança, quando a forma evolutiva cercária, então adaptada ao meio aquático, penetra na pele e se instala no complexo ambiente do organismo do seu hospedeiro mamífero. Em pouco espaço de tempo, a forma evolutiva denominada esquistossômulo precisa sofrer profundas modificações adaptativas para sobreviver e continuar seu ciclo evolutivo no novo habitat.

Assim é de fundamental importância estudar os fenômenos adaptativos que ocorrem logo após a penetração da cercária. Esta fase evolutiva de esquistossômulo é a mais afetada não só pela imunidade inata como pela adquirida. Por outro lado, nesta fase inicial o tratamento quimioterápico eficaz abortaria a infecção, reduzindo sobremaneira a patologia da doença nos seus hospedeiros definitivos. O *S. mansoni* adulto pode sobreviver por dezenas de anos no sistema vascular visceral do hospedeiro definitivo (Harris et al., 1984) o que reflete uma sofisticada capacidade adaptativa destes organismos. Este fato permite inferir que existe uma co-evolução parasito-hospedeiro, que remonta a eras primevas, bastando lembrar que o ambiente sanguíneo no qual o parasito vive é um dos locais que promovem uma das mais exacerbadas respostas imunológicas. Estes fatos também mostram que o parasito, quando em sua fase adulta, está perfeitamente adaptado ao sistema vascular do seu hospedeiro vertebrado o que reforça que na fase inicial do desenvolvimento, principalmente nos primeiros momentos de contato com o ambiente do organismo do mamífero, seria a etapa de sua maior fragilidade para intervenções imunológicas e quimioterápicas. Assim o conhecimento mais aprofundado do que ocorre neste curto período adaptativo nesta fase evolutiva será de fundamental importância para o desenvolvimento de vacinas e novos fármacos. No presente trabalho, o estudo foi direcionado as observações dos eventos que ocorreriam, não só nos primeiros momentos da infecção transcutânea, como também no início da fase portal, em que o parasito tem a sua maior explosão de crescimento.

A discussão dos resultados será dividida em dois blocos, sendo que o primeiro trata da comparação entre os esquistossômulos mecanicamente transformados *versus* transformados por passagem ativa através de pele de camundongo, e o segundo bloco tratando da comparação temporal entre esquistossômulos cultivados por 3 horas e 12 horas na presença de soro de sangue portal de hamster.

Em estudo recente, empregando metodologia NGS, a expressão gênica de esquistossômulos obtidos por transformação mecânica (Mec) foi comparada a de esquistossômulos obtidos por penetração ativa em pele de camundongo (Pel). Segundo os autores, entre as duas formas do parasito a expressão gênica foi muito similar para todos os genes, com exceção dos genes mitocondriais, que se mostraram mais expressos nos esquistossômulos de pele (Pel). Esses parasitos mostraram-se ainda metabolicamente mais ativos 24 horas após transformação, quando comparado com os esquistossômulos mecanicamente obtidos (Mec) em ensaio colorimétrico para atividade de oxidase (Protasio et al, 2013).

No presente trabalho, esses mesmos tipos de esquistossômulos foram comparados em relação a várias propriedades, pelo emprego de sondas fluorescentes, específicas para marcação de estruturas internas celulares, bem como membranas. A maioria das sondas empregadas mostraram padrão de marcação similar entre as duas formas do parasito, Mec e Pel. A marcação pela sonda específica para mitocôndrias, *mitotracker*, não mostrou diferenças no padrão de coloração, a não ser o fato de demonstrar a presença de glândulas pré-acetabulares remanescentes nos esquistossômulos Mec e evidenciar espaços não preenchidos por mitocôndrias. As diferenças na quantidade e atividade, recém caracterizada por Protásio e colaboradores (2013), deverá ser testada com emprego de método de quantificação da atividade em mitocôndrias, semelhante ao utilizado originalmente, além de microscopia confocal, em trabalho posterior. Para as demais sondas o padrão de coloração entre esquistossômulos Mec e Pel foi similar.

Ao lidar com a pele usada na transformação de cercárias, usando o método de Clegg (Clegg et al, 1965), percebeu-se que quantidade apreciável de esquistossômulos permanecia retida na pele, mesmo quando a pele era incubada *overnight* por período maior de tempo. Assim sendo, optou-se por investigar a interatividade e permeabilidade de membranas de esquistossômulos (sondas foram injetadas na pele), então designados “migrantes” (Mig), uma vez que essa forma do parasito pode permanecer retida na pele de um camundongo infectado por até 72 horas (Barbosa, Pellegrino, Coelho, e Sampaio, 1978; Crabtree & Wilson 1985). Esses esquistossômulos foram comparados com aqueles obtidos logo após penetração direta em pele (Pel), pelo método de Clegg.

Thornhill e colaboradores (2010) sugeriram que esquistossômulos obtidos por penetração ativa em pele tem permeabilidade aumentada quando comparado aos obtidos pelo método mecânico de transformação. Neste trabalho sondas fluorescentes para avaliação da permeabilidade de membranas foram injetadas diretamente na pele de camundongos recém-eutanasiados (injeção intradérmica), sobre a qual as cercárias haviam sido adicionadas.

No presente trabalho, os esquistossômulos recuperados da pele de camundongo apresentaram elevado influxo da sonda Lucifer Yellow, além de moléculas de dextran com diferentes pesos moleculares, o que sugere que o parasito apresenta elevada permeabilidade após penetração.

Quando os esquistossômulos Mig foram tratados da maneira descrita por Thornhill e colaboradores (2010), eles foram marcados de forma distinta em relação aos esquistossômulos Pel. Portanto, o aumento da permeabilidade é uma característica fortemente presente apenas nos esquistossômulos que migraram através da pele em 24 horas. O aumento foi ainda registrado em esquistossômulos recuperados da pele 48 horas depois da infecção (resultados não mostrados). Isto significa que durante a permanência prolongada de esquistossômulos na pele, por períodos superiores a 48 horas ou mesmo a 72 horas, são estabelecidas alterações adaptativas, que permitem trocas de moléculas entre parasito e hospedeiro definitivo, o que deve representar uma nova visão sobre interface parasito-hospedeiro, corroborando o que foi sugerido anteriormente (Barbosa, Pellegrino, Coelho e Sampaio, 1978; Crabtree & Wilson, 1985).

A atividade de endocitose já foi testada em esquistossômulos por meio da utilização da sonda FM1-43 (Ribeiro et al, 1998). No presente trabalho, quando a sonda foi injetada diretamente na pele de camundongo previamente infectado com cercária, os esquistossômulos recuperados pelo método de Clegg apresentaram intensa marcação em toda as partes de seu corpo, o que sugere que durante a permanência na pele do hospedeiro, ocorre aumento da endocitose e renovação de membrana (*turnover*) no esquistossômulo. Assim, a rápida internalização e *turnover* podem explicar a elevada permeabilidade das membranas superficiais a sonda *Lucifer yellow* e FI-Dextrans observada nos parasitos que permaneceram em contato com a pele do hospedeiro por período de tempo mais prolongado.

Os efeitos do ambiente da pele do hospedeiro sob a permeabilidade e *turnover* da membrana do parasito são evidentes nos experimentos reportados nesse trabalho, contudo ainda não foi possível determinar claramente mecanismos envolvidos nesse fenômeno. A presença de ácido linoleico na pele parece interferir tanto nas propriedades dos lipídeos da própria membrana (Haas, 1984; Haerberlein e Haas, 2008), quanto indiretamente, pela ativação da esfingomilieninase estimulada por ácidos graxos insaturados da pele (El Ridi e Tallima, 2006). Diversos fatores, tais como estímulos nervosos e a fisiologia do meio onde o parasito se encontra durante a permanência do parasito na pele, devem estar envolvidos em mecanismos complexos que determinem o aumento da permeabilidade da membrana e na taxa de endocitose.

Os dados gerados sugerem que nos esquistossômulos produzidos *in vivo* o metabolismo é mais ativo nas células superficiais quando comparado aos esquistossômulos produzidos *in vitro*. Sugere-se assim que, durante a permanência dos esquistossômulos ao longo de períodos de até 72 horas na pele, o aumento da atividade detectada pela sonda FM1-43 pode induzir um extenso *turnover* da superfície do parasito envolvendo moléculas internas e levando ao aumento da liberação de imunógenos (Fonseca et al 2012). Os processos de internalização rápida observado pela reação dessa sonda pode ser mantido pelo aumento da atividade metabólica mitocondrial nos esquistossômulos de pele (Pel) previamente reportado (Protasio et al, 2013). Adicionalmente, a aumentada permeabilidade do parasito a moléculas de pesos moleculares de até 40kDa pode permitir a captação de citocinas como IL7 (Wolowczuk et al, 1999), que estimula o crescimento do parasito, por sinalização celular e síntese proteica.

As atividades na superfície do parasito aqui reportadas podem agir aprimorando sua habilidade de evitar os efeitos danosos da resposta imunológica do hospedeiro, mas, paradoxalmente, podem também ter papel determinante na imunogenicidade, uma vez que há maior exposição de antígenos internos do parasito, que seriam alvo da resposta protetora do hospedeiro, o que já foi previamente observado quando cercárias irradiadas são usadas para infecção (Ganley-Leal et al, 2005; Kumate et al 2007).

A relevância dos marcantes efeitos do tempo de contato com a pele do hospedeiro sobre a permeabilidade e o processo de internalização nos esquistossômulos ressalta

que a ênfase atual, focada na superfície como uma interface parasito-hospedeiro pode ser um falso caminho para o desenvolvimento de vacinas. Grandes moléculas do hospedeiro ou do parasito podem estimular vias de sinalização internas no parasito, que podem ser melhor caracterizadas em estudos posteriores empregando métodos de exploração de “kinomas” (Walker et al, 2014) como anticorpos contra proteínas fosforiladas, imunofluorescência, microscopia confocal, bem como métodos NGS, como utilizado nesse trabalho. Estes métodos podem ser aplicados aos esquistossômulos Mig, para estudo de novas vias ativadas após aumento da permeabilidade e atividade na membrana durante o contato do parasito com pele do hospedeiro por períodos até 72 horas, que ainda não foram caracterizadas como ativas em outras formas de esquistossômulos.

O outro conjunto de dados gerado nesse trabalho refere-se a comparação entre esquistossômulos mecanicamente transformados e cultivados em presença de soro portal (SPO) e periférico (SPE) de hamster, visando, sobretudo evidenciar genes diferencialmente expressos na condição portal, e cujas funções se relacionem com o desenvolvimento do parasito.

Embora o contato do parasito com o soro portal de hospedeiros susceptíveis já tenha sido caracterizado como essencial para o desenvolvimento expressivo do parasito e curso da infecção (Rocha et al 1980; Shaker et al, 1998; Draz et al, 2008), nenhuma molécula do sangue portal foi identificada e caracterizada como determinante e diretamente envolvida no processo foi caracterizado, o que reforça a importância de estudos de genes diferencialmente expressos em parasitos expostos a esse estímulo.

Foram geradas três réplicas de cada biblioteca do estudo (SPE3h, SPE12h, SPO3h e SPO12h) e foram geradas, em média, aproximadamente 15 milhões de *reads* de 50nt após o sequenciamento em plataforma NGS (SOLiD™ versão 4). Após aplicação dos filtros estabelecidos, as *reads* alinhadas contra o genoma do parasito foram organizadas em uma lista de acordo com suas contagens, que foram então normalizadas em RPKM e analisadas por ferramentas estatísticas do pacote DESeq2 do programa estatístico R. Alta similaridade entre as bibliotecas foi observada e um pequeno número de genes diferencialmente expressos foi revelado (103 transcritos) em uma das condições do estudo, a comparação temporal SPO3h *versus* SPO12h. Dentre

os 103 transcritos, 58 mostraram perfil de expressão diferencial exclusivamente em soro portal, após serem excluídos da lista os genes que apresentaram também expressão diferencial na comparação temporal em soro periférico, SPE3h *versus* SPE12h. De acordo com as características observadas nas anotações do termos de ontologia gênica (GO) genes diferencialmente expressos após 12 horas de contato com o soro portal de hamster estão ligados a processos como transporte através de membrana, resposta a stress, sinalização celular, formação de citoesqueleto, síntese de nucleotídeos e proteínas dentre outros. Esses genes foram então estudados e discutidos em relação aos seus possíveis papéis no desenvolvimento do parasito no sistema portal.

Os esquistossômulos tem sido utilizados para estudos de transcriptomas pelo emprego de microarranjos de DNA (Fitzpatrick et al. 2009, Parker-Manuel et al. 2011, Simões et al. 2011), e mais recentemente por técnicas NGS ou RNASeq (Almeida et al. 2011, Protasio et al. 2013). Nestes trabalhos, os esquistossômulos foram submetidos a diferentes tempos de cultura e, em alguns, comparados a outros estádios evolutivos, mas em nenhum deles a condição intravascular do hospedeiro foi simulada. Gobert e colaboradores (2010) estudaram padrões de expressão gênica de esquistossômulos cultivados por 3 horas na presença de eritrócitos a outros mantidos em cultura durante 5 dias também em presença dessas células. Nesse trabalho, os autores usaram um micro-arranjo de DNA contendo 12.166 sequências de contigs de *S. mansoni*. Eles inferiram que as principais mudanças no perfil de expressão de genes nos esquistossômulos que consideraram semelhantes ao parasito, correspondentes aos parasitos encontrado nos pulmões do hospedeiro definitivo (5 dias na presença de eritrócitos) em relação ao estágio de pele (3 horas na presença de eritrócitos) foi em relação a atividades catalíticas e de ligação em biomoléculas.

No presente estudo a maioria dos genes suprarregulados após 12 horas de estímulo por soro portal são relacionados a atividade em membrana, principalmente ao transporte de substâncias seja na superfície ou em organelas internas, o que corrobora, em parte, nossos achados já descritos e discutidos no bloco anterior.

Em esquistossômulos recém transformados a capacidade de modificar a membrana no sentido de captar moléculas do hospedeiro durante a transformação já foi caracterizada

(Sher et al 1978; Simpson et al 1984; Ribeiro et al 1998; Thornhill et al 2009; Thornhill et al 2010). Esse processo é considerado como principal determinante da interface parasito-hospedeiro, em que fatores derivados das membranas superficiais estimulam receptores em membranas internas do parasito e direcionam a ocorrência de importantes ações essenciais ao desenvolvimento do parasito, bem favorecendo sua evasão dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Alguns dos transcritos suprarregulados no presente estudo tem atividades relacionadas a modificações de membranas superficiais do parasito.

O transcrito Smp_042790.1 - *dolichol phosphate mannosyltransferase* cujo produto gênico é uma enzima que está convencionalmente envolvida na biossíntese de N-glicanos em eucariotas e organismos superiores (Nyame et al., 1988) está suprarregulado. Evidência de que glicanos derivados do parasito são bioativos e imunogênicos sugerem que estes apresentam papéis importantes, tanto na imunomodulação quanto na evasão do sistema de defesa do hospedeiro (Van Die and Cummings, 2010), o que representa um modelo alternativo de evasão do sistema imunológico do hospedeiro ao modelo de mimetismo molecular proposto por Damian (1964).

Furlong e colaboradores (1995) mostraram, também em esquistossômulos recém transformados *in vitro*, que tanto as membranas superficiais, quanto ao longo do trato digestivo, e mesmo em estruturas específicas de localização sub-tegumentar há captação de fosfolípeos e análogos desses com menores pesos moleculares marcados com fluorescência. No mesmo trabalho observou-se que análogos maiores dos fosfolípeos localizam-se na superfície, trato digestivo e, ocasionalmente, no acetábulo, mas não em localizações sub-tegumentares em esquistossômulos. Considerando estes achados juntamente com a suprarregulação do gene Smp_175790.1 – *phospholipid translocating ATPase*, acredita-se que o soro portal represente um estímulo importante a aquisição de fosfolípeos do hospedeiro pelo parasito, tanto na superfície corporal, quanto em compartimentos sub-tegumentares, o que reforça a importância desse processo, no parasito e também nos mecanismos imunológicos de defesa do hospedeiro.

Alguns dos genes diferencialmente expressos na comparação SPO3h *versus* SPO12h, cujos produtos se relacionam a atividade em membrana, tem em suas anotações GO localização em membranas de organelas internas do parasito, evidenciando assim alterações transcricionais ligadas a processos de transporte interno de moléculas.

A localização de um conjunto de genes suprarregulados dentre os resultados obtidos, bem como suas ações, sugerem que a atividade em retículo endoplasmático está aumentada após 12 horas de contato com o soro portal. Estes genes mostram provável envolvimento com a via de Degradação Proteica Associada a Retículo Endoplasmático (ERAD).

Dados gerados de estudos com mamíferos sugerem que ortólogos dos genes do complexo sec61, onde se inclui a subunidade beta, codificada pelo transcrito Smp_019060.1, suprarregulado nesse estudo, recruta o Complexo Proteico Associado a Translocon (TRAP). O transcrito Smp_089000.1 codifica uma proteína idêntica a subunidade delta desse complexo, que forma um canal na membrana, associado a ribossomos durante a translocação co-transcricional de proteínas (Ménétret et al., 2005; Schäfer et al, 2009). Ortólogos do gene suprarregulado Smp_059350.1 - *der1 protein*, codificam proteínas da família “Derlin” de mamíferos, implicada na retro-translocação de proteínas do retículo endoplasmático para o citosol (Ye et al, 2004; Lilley et al, 2004; Oda et al, 2006). Proteínas que não passam pelo controle de qualidade do retículo endoplasmático após tradução são retro-transportadas para o citosol, onde serão finalmente degradadas pela maquinaria ubiquitina-proteassoma (Goder et al, 2008; Vembar et al, 2008). Tanto em leveduras quanto em mamíferos, ortólogos do gene Smp_157360.1 - *E3 - ubiquitin protein ligase synoviolin B*, também suprarregulado, estão entre as ubiquitina ligases requeridas para a atividade ERAD e são membros de grandes complexos proteicos, que compreendem componentes que realizam o reconhecimento de substratos e a retro-translocação (Kostova et al, 2007). Por essa razão, propõe-se que essa mesma enzima possua as duas atividades, a ubiquitinação e a retrotranslocação. Uma subunidade do complexo peptidase microssomal, envolvido na remoção de peptídeo sinal de proteínas recém-sintetizadas ou proteínas de membrana, Smp_024390.2 - *microsomal signal peptidase 25 kDa subunit*, estava também suprarregulada. Além da atividade de processamento citada, esta subunidade enzimática pode estar envolvida em outros eventos proteolíticos, como digestão

adicional do próprio peptídeo sinal (Lyko et al, 1995) ou degradação de proteínas de membrana (Mullins et al, 1995).

Outro gene com localização em retículo endoplasmático, também suprarregulado no estudo é o Smp_155510.1 - *transmembrane protein66*. Embora as funções da proteína trans-membrana 66 não sejam ainda bem caracterizadas, recentemente ela foi funcionalmente identificada como um regulador da homeostase de cálcio, por inibir a entrada de cálcio no estoque (SOCE), um processo de influxo de cálcio em resposta a depleção desse íon em estoque no retículo endoplasmático (Palty et al, 2012).

Além de retículo endoplasmático, dois transcritos suprarregulados são de localização em complexo de Golgi, Smp_167230.1 - *golgi resident protein gcp60* e Smp_072950.1 - *Transmembrane emp24 domain containing protein 4*. Este resultado sugere que a manutenção da estrutura da organela é alterada após 12 horas de contato com o soro portal de hamster, bem como o tráfego de proteínas entre o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi (Sodah et al, 2001). Alguns dados sugerem ainda que os produtos desses genes podem atuar no controle da apoptose, tanto em leveduras, quanto em humanos (Matsuda et al, 2003; Sbodio et al, 2006).

A presença do soro portal nas condições de cultura leva o parasito a ter contato com moléculas diversas, que podem representar causas de *stress* e leva-lo, a desenvolver respostas adaptativas. Alguns dos genes com perfil de expressão diferencial em esquistossômulos após 12 horas de estímulo por soro portal estão envolvidos em respostas a stress.

O gene Smp_176200.2 - *superoxide dismutase [Cu-Zn]* mostrou-se suprarregulado após 12 horas de estímulo por soro portal. O estudo feito por Fitzpatrick e colaboradores (2005) evidenciou que no estágio de verme adulto o gene da enzima superóxido dismutase está transcricionalmente ativado em fêmeas. Em outro trabalho, o gene mostrou padrão de expressão associado tanto ao sexo quanto a cepa (“isolado do parasito”), sendo suprarregulado em fêmeas de verme adulto de um isolado de origem chinesa de *Schistosoma japonicum*, mas sem o mesmo perfil em outro isolado de origem nas Filipinas dessa mesma espécie (Moertel et al, 2006). Considerados juntos, estes achados sugerem o envolvimento da enzima na eliminação de produtos

potencialmente tóxicos gerados na digestão de hemoglobina em fêmeas adultas de *Schistosoma sp* tão logo a oviposição se inicie. Além disso, o gene também se mostra suprarregulado em resposta ao *stress* oxidativo em vermes adultos (Aragon et al, 2008).

Um homólogo de *S. japonicum* para o gene suprarregulado no estudo, Smp_064860.1 - *stress induced phosphoprotein 1*, interage diretamente com proteínas do complexo *heat shock* (HSP) no tegumento de vermes adultos (Chen, et al, 2014). Considerando esse achado ao fato de um constituinte do complexo HSP também estar suprarregulado, o gene Smp_097380.1 - *heat shock 10 kDa protein 1*, e a reconhecida necessidade, em algumas circunstâncias, de aumento da atividade de proteínas HSP para ativação do processo de degradação proteica no processo ERAD, previamente discutido, sugere-se portanto que proteínas sem a estrutura funcional preservada sejam retro-transportadas para o citosol e degradadas pelo sistema proteassoma, em resposta ao *stress* oxidativo causado pelo contato com constituintes do soro portal de hamster por pelo menos 12 horas. A suprarregulação da isomerase Smp_040790.1 - *peptidyl prolyl cis trans isomerase B*, pode corroborar esta inferência, uma vez sua atividade foi caracterizada como importante para acelerar o dobramento/desdobramento de proteínas em sua etapa limitante de isomerização *cis-trans* de resíduos de prolina (Fischer & Bang, 1985; Lang et al, 1987). Essa peptidase tem similaridade com a ciclofilina, uma proteína que se liga a ciclosporina A, e esta promove imunossupressão em mamíferos, (Fischer et al, 1989), mas, paradoxalmente, tem comprovada capacidade de proteger camundongos e ratos da infecção por *Schistosoma sp* (Bout et al, 1984; Bout et al, 1986; Brannan et al, 1989; Munro et al, 1991). Sugere-se ainda importante papel para a ciclofilina no metabolismo de mamíferos, uma vez que sua produção se mostrou aumentada em esplenócitos de camundongos 72 horas após estímulo mitogênico (Koletsky et al, 1986).

Uma peptidase cuja atividade não está diretamente ligada a proteólise pelo processo ERAD supracitado também está suprarregulada em esquistossômulos, após 12 horas de estímulo por soro portal. O produto do gene Smp_194090.1 - *subfamily S1A unassigned peptidase - S01 family* ainda não tem função claramente definida e embora tenha em sua anotação no genoma atribuída a atividade de peptidase, recentemente foi caracterizada como proteoliticamente inativa por Horn e colaboradores (2014), uma vez

que não possui o resíduo de serina da tríade catalítica His-Asp-Ser típica da sub-família S1 de peptidases (Rawlings et al, 2012).

Alguns dos genes diferencialmente expressos após 12 horas de estímulo por soro portal de hamster tem seus produtos gênicos diretamente envolvidos em atividades reconhecidas em uma ampla gama de estudos como importantes ao desenvolvimento do parasito, dentre eles vias de sinalização, transcrição gênica e diferenciação celular. Dada a questão central aqui posta, de que o soro portal do hospedeiro possui fatores desencadeantes das mudanças morfo-funcionais determinantes do evidente desenvolvimento do parasito no organismo do hospedeiro, após atingir o sistema porta hepático.

Um dos genes suprarregulados após 12 horas de estímulo por soro portal tem seu produto gênico relacionado ao processo de sinalização que aumenta a atividade proliferativa, o receptor tirosina quinase (RTK) Smp_011700.1 - *proto oncogene tyrosine protein kinase ROS*, membro da família do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (Hanks et al, 1988; Manning et al 2002). Loeffler e colaboradores (2002) mostrou que o antígeno solúvel de ovos (SEA) causa a suprarregulação da expressão de VEGF *in vitro* e esse é um dos fatores determinantes do aumento da angiogênese ao redor do granuloma causado por *S. mansoni*. A suprarregulação do VEGF também foi evidenciada na veia portal de ratos após lesão hepática causada por hepatectomia, juntamente com outros fatores importantes a regeneração hepática (Yamamoto et al, 2010). Estes achados corroboram a possibilidade do VEGF ser um fator presente em maiores quantidades no soro portal em relação ao soro periférico capaz de desencadear atividade proliferativa nos esquistossômulos, tão logo eles alcancem a veia porta do hospedeiro definitivo durante a infecção natural por *S. mansoni*. Estudos funcionais empregando inibidores da atividade do receptor de VEGF (VEGFR), como bevacizumabe e SU5416 (Hempel et al, 2014), em culturas *in vitro* do parasito devem ser planejados para avaliar a real importância desse fator.

Dois dos genes suprarregulados em resposta ao soro portal parecem ter seus produtos requeridos nas células do parasito quando a atividade de transcrição está aumentada, Smp_027990.1 - *homeobox protein nk2, neural gene activation* e Smp_157940.1 - *Nuclear inhibitor of protein phosphatase 1*. O domínio NK2 é altamente conservado

(Harvey, 1996, Watada et al., 2009) e foi o primeiro identificado dentro da classe NK-2 dos fatores de transcrição de vertebrados e também como um fator de transcrição expresso durante o desenvolvimento do sistema nervoso central (Price et al, 1992) e em células ortólogas das ilhotas beta pancreáticas humanas (Rudnick et al, 1994). O inibidor nuclear da proteína fosfatase 1 (NIPP1) é um membro da família da proteína fosfatase 1 (PP1), que compreende proteínas reguladoras (Ceulemans et al, 2002, Daher et al, 2006). A atividade de NIPP1 se mostrou essencial na organização estrutural do complexo spliceossoma de processamento de mRNA (Beullens et al, 2002). Quando super-expresso em *Drosophila*, um ortólogo de mamífero do gene NIPP1 foi letal a vários tecidos e em estádios de desenvolvimento diferentes, provavelmente devido a sua interação a fatores envolvidos no *splicing* por meio de seu domínio FHA altamente conservado (Parker et al, 2002).

Um membro da família *Mex3* de proteínas - *proteína 3 de excesso muscular* (Draper et al, 1996), o gene Smp_032280.1 - *RNA binding protein MEX3B*, mostrou-se também suprarregulado em resposta ao soro portal. Em nematódeos, a atividade da proteína Mex3 como um regulador da tradução, que auxilia na manutenção do potencial morfogênico de células embrionárias de linhagem germinativa foi bem caracterizado por Ciosk e colaboradores (2006). Ortólogos humanos para esse gene apresentam atividade de ligação a fosfoproteínas ligantes ao RNA, presentes tanto no núcleo quanto no citoplasma, e de acordo com os possíveis destinos finais citoplasmáticos pode estar envolvido em armazenamento ou degradação de mRNA, bem como regulação da tradução. Devido a sua capacidade de interagir diretamente com a proteína Argonata, que catalisa a hidrólise do mRNA alvo e é uma das principais componentes do RISC (complexo de silenciamento induzido por RNA), acredita-se que em vertebrados essa proteína Mex3 esteja envolvida na regulação pós transcricional da expressão de proteínas por miRNAs (Takada et al, 2009). Outra proteína possivelmente envolvida no processamento e biogênese de miRNAs (Gomes et al, 2009) cujo gene se mostrou suprarregulado é similar a uma exportina, Smp_124820.1 - *chromosome region maintenance protein*. Esta proteína é uma proteína da membrana nuclear, essencial ao transporte de diferentes RNAs para o citosol. Considerada a importância de sua atividade junto com a atividade de Mex3, sugere-se que a regulação pós-transcricional da expressão de genes por miRNAs é estimulada pelo contato com o soro

portal por 12 horas e pode ser determinante no desenvolvimento do parasito, como já evidenciado por Abreu e colaboradores (2013).

Um transcrito suprarregulado em soro portal, cuja atividade possa estar ligada ao controle do desenvolvimento do parasito é Smp_079420.1 - *ankyrin repeat domain containing protein 42*. Essa proteína possui múltiplas cópias *en tandem* da repetição anquirina, um domínio de 33 aminoácidos que adota conformação hélice-volta-hélice (Lee et al, 2014), encontrada em várias proteínas com diversas funções envolvendo sinalização celular, integridade do citoesqueleto, transcrição, regulação do ciclo celular, resposta inflamatória, desenvolvimento e transporte de substâncias (Mosavi et al, 2004). Em *Schistosoma* a repetição do domínio anquirina foi atipicamente encontrada na proteína CaspC, homóloga da caspase 8 em humanos, substituindo o domínio canônico DED na porção N-terminal, e a possibilidade de ter um papel importante em uma via ainda desconhecida de ativação da apoptose foi evidenciada (Lee et al, 2014).

Um outro grupo de transcritos suprarregulados tem suas atividades relacionadas a síntese de proteínas, uma vez que seus produtos atuam tanto na organização estrutural de ribossomos quanto no complexo proteico de reconhecimento e início da tradução. Os genes Smp_119920.1 - *ribosomal protein S16*, Smp_032760.1 - *ribosomal protein S11* e Smp_031570.1 - *ribosomal protein L18* são anotados no genoma do parasito sob a GO “tradução” na categoria de Processo e na sub-categoria Função Molecular os três são anotados como “constituintes estruturais do ribossomo”, o que sugere que a estrutura conformacional dessa organela é arranjada para permitir a síntese proteica. Este achado é corroborado pela suprarregulação de genes anteriormente discutidos, envolvidos em processos como transporte através de membrana, resposta a stress, sinalização e diferenciação celular em resposta ao soro portal. A importância da síntese proteica após esse estímulo é também reiterada pela suprarregulação do gene Smp_207010.1 - *signal recognition particle 72 kDa subunit*, que tem a ação central no direcionamento de proteínas que serão secretadas para a membrana do retículo endoplasmático rugoso, onde serão associadas a subunidades do complexo de reconhecimento de sinal (SRP). Este complexo pode determinar uma lentidão na síntese proteica, em um processo conhecido como “*elongation arrest*”, que facilita o acoplamento entre a tradução e a translocação de proteínas (McNair et al, 1995).

O gene para a principal enzima da via *de salvação* de biossíntese de purinas, Smp_103560.1 - *hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT)*, mostrou-se também suprarregulado após estímulo por soro portal. A ausência de enzimas para biossíntese *de novo* de purinas em *S. mansoni* já foi bem caracterizada (Murray et al, 1970), e a reconhecida importância das enzimas HGPRT e guanina fosforribosiltransferase em fornecer guanina ao parasito (Dovey et al, 1986) representam boa evidência de que o soro portal age com um estímulo a atividade proliferativa no parasito, que se faz necessária quando esse acessa o sistema portal do hospedeiro e inicia seu desenvolvimento acelerado.

Alguns dos genes diferencialmente expressos após estímulo por soro portal possui poucas informações funcionais em seus dados de anotação no genoma do *S. mansoni*. Esse conjunto inclui os transcritos Smp_202980.1 *hypothetical protein*; Smp_063330.1 *hypothetical protein*; Smp_024370.1 *hypothetical protein*; Smp_095400 *hypothetical protein*; Smp_130260 *hypothetical protein*; Smp_134570 *hypothetical protein*. Embora o potencial imunogênico do ortólogo de *S. japonicum* do gene Smp_011270.1 - *sj ts4 protein* (Zhou et al, 2002), suas funções biológicas ainda não foram claramente definidas. O outro gene, Smp_092810.1 - *transmembrane protein 33, present on melanosome membrane 33* provavelmente atua no metabolismo de melanina, cuja a importância também não foi ainda definida com clareza para o parasito.

Dentre os genes diferencialmente expressos na comparação SPO3h *versus* SPO12h, cinco dos que se mostraram suprarregulados nos esquistossômulos cultivados por 3 horas na presença do soro portal (SPO3h) foram utilizados na validação por qPCR. Como o número de genes é pequeno, não é possível perceber com clareza processos celulares que possam estar claramente ativos por suas influências, e apenas suas funções individuais são evidenciadas e relacionadas a condição experimental proposta.

O gene Smp_136310.1 – *sodium bile acid cotransporter* codifica um simportador de sais biliares com sódio e mostrou-se suprarregulado nos esquistossômulos SPO3h. Esse transcrito está diretamente relacionado a condição proposta no estudo, e o fato de sua expressão já se elevar no menor tempo de cultura, 3 horas, evidencia que o parasito reconhece prontamente constituintes do ambiente bioquímico da condição portal e busca se adaptar a ela. Os sais biliares endógenos normalmente são compostos por

uma mistura de compostos com propriedades físico-químicas variáveis, e o conjunto inclui desde substâncias hidrofílicas a outras hidrofóbicas. A quantidade desses sais representa uma das maiores diferenças entre o soro portal e o soro periférico, estando eles aproximadamente 30 vezes mais concentrados no primeiro, uma vez que estão quase exclusivamente confinados a recirculação entero-hepática (Hofmann and Roda, 1984). O efeito estimulante sobre a oviposição em vermes adultos em culturas adicionadas de sais biliares diferentes já foi previamente caracterizado (Badr et al, 1999), o que reforça a importância de constituintes do soro portal não apenas para o desenvolvimento das formas larvárias precoces do parasito, mas também para a manutenção de pares de vermes adultos nos vasos mesentéricos, bem como das taxas de oviposição (Wu et al, 1985). Os efeitos dos sais biliares sobre o desenvolvimento dos esquistossômulos deve ser também estudado em maiores detalhes pelo emprego de suplementação em culturas do parasito e análise posterior de expressão de genes, bem como aspectos fenotípicos inerentes ao desenvolvimento.

O gene Smp_175790.1 - *phospholipid translocating ATPase*, codificante de uma enzima que pode estar envolvida no transporte de fosfolipídeos através de membranas para gerar ou manter assimetria na bicamada fosfolipídica (Daleke, 2007; Sharom, 2011). Diversas proteínas que compartilham o mesmo tipo de atividade (Transportadoras do tipo ABC) estão potencialmente envolvidas em mecanismos determinantes da susceptibilidade ou resistência a drogas esquistossomicidas (Greenberg, 2014).

O gene de uma proteína da família 1 de fermitinas, Smp_053420.1 – *fermitin family 1* estava suprarregulado em esquistossômulos SPO3h. As fermitinas tem sido reportadas como proteínas capazes de agir na sinalização celular mediada por integrina, em seus eventos terminais, por interação com sub-unidades beta dessa proteína (Harburger et al, 2009; Malinin et al, 2010). Embora uma ampla gama atividades sejam atribuídas as integrinas em vários organismos, em platelmintos havia um *gap* sobre o conhecimento acerca das ações desses receptores, até o trabalho pioneiro de Beckmann e colaboradores, (2012) que além da reconhecida atividade em adesão celular, mostrou, por reconstrução *in silico* e validação bioquímica que as integrinas podem atuar no controle da reorganização do citoesqueleto de oócitos em fêmeas de *S. mansoni* bem como na divisão celular. O grupo propôs um modelo de interação entre quinases com a

porção intracelular da sub-unidade beta da integrina, capaz de regular a reorganização do citoesqueleto durante a divisão mitótica, além do crescimento e polarização celular. A suprarregulação do gene da fermitina no presente estudo pode representar um possível aumento da atividade nessa via como consequência do estímulo pelo soro portal, que possa levar ao aumento da taxa de divisão celular, além de outros eventos de diferenciação celular para desenvolvimento do parasito, devendo ser melhor explorada em estudos posteriores.

O transcrito que codifica uma proteína presente em musculatura lisa, com sítio de ligação a actina (Jones et al, 2004), Smp_007270 – *Smoothelin* também foi reportado como suprarregulado, mas funções do produto desse transcrito no citoesqueleto ainda não foram bem definidas e o significado da expressão desse gene em resposta ao soro portal não é evidente, a não ser pelo possível envolvimento na contração muscular, seja de todo o organismo do parasito ou mesmo de seu trato digestivo.

O transcrito Smp_145540 - *muscarinic acetylcholine receptor*, foi também suprarregulado após 3 horas de estímulo pelo soro portal de hamster. Seu produto gênico é anotado no genoma como um receptor colinérgico muscarínico (mAChR), associado internamente na membrana a proteína G. Para *Schistosoma sp* as informações sobre os mAChR são escassas quando comparado aos receptores colinérgicos nicotínicos (nAChR). Embora estudos revelem que os mAChR tenham pouco ou nenhum envolvimento direto sobre a atividade motora em *Schistosoma sp* (Barker et al., 1966, Day et al., 1996), em outro trematoda, *Fasciola hepática*, esses receptores parecem modular a contração muscular. A expressão aumentada desse gene nos estádios evolutivos de cercária e esquistossômulos recém transformado (Berriman et al, 2009) sugere que esse gene seja importante tanto na penetração do parasito quanto em sua migração na pele do hospedeiro. A suprarregulação em resposta ao soro portal pode também se relacionar ao controle da atividade motora na migração intravascular no sistema porta do hospedeiro seja para facilitar a nutrição ou mesmo a fixação do parasito no endotélio vascular.

As possíveis ações isoladas dos produtos gênicos dos transcritos suprarregulados já ao contato por 3 horas com soro portal não caracterizam especificamente um processo que esteja consideravelmente ativo. Contudo, sugerem que o parasito inicia a ativação de

ações adaptativas ao reconhecer constituintes de um novo ambiente bioquímico que lhe favoreçam o desenvolvimento, merecendo estudos funcionais complementares para melhor conhecimento da importância desses genes.

6 Conclusões

Com o desenvolvimento do presente trabalho foi possível observar pequenas diferenças entre esquistossômulos de *S. mansoni* obtidos por métodos diferentes ou

submetidos a condições *in vitro*, semelhantes aquelas encontradas no organismo do hospedeiro definitivo infectado.

Da comparação entre esquistossômulos mecanicamente transformados com os transformados por penetração ativa de cercárias na pele de camundongos, observou-se elevada semelhança morfológica e bioquímica dos parasitos. Isto reitera os recentes achados de que os parasitos obtidos por esses dois métodos são transcricionalmente equivalentes, embora a transformação usando pele de camundongo forneça parasitos por um método semelhante a transformação da infecção natural.

Pela utilização das sondas fluorescentes não foi possível evidenciar diferenças na atividade em membranas superficiais, ou mesmo de localizações citoplasmáticas internas (mitocôndrias, lisossomos, autofagossomos), quando foram comparados esquistossômulos Mec aos Pel. Apenas a sonda *monochlorobimane* (glutathione) evidenciou uma diferença já reconhecida na literatura, que é a presença de maiores porções de conteúdo de glândulas acetabulares e pré-acetabulares remanescentes em esquistossômulos Mec se comparado aos esquistossômulos Pel. Essa alteração não se mostra diretamente relacionada as discretas alterações transcricionais reportadas anteriormente.

Embora tenham sido observadas diferenças de reconhecimento de bandas entre extratos proteicos de esquistossômulos Mec e Pel no experimento de imunoblot, empregando soro anti-verme adulto, na imunofluorescência não foram observadas diferenças de distribuição dos anticorpos mais reativos isolados do mesmo soro.

Quando os esquistossômulos Pel foram comparados a outros obtidos *in vivo*, por migração da pele de camundongos após 24 horas, a partir da infecção transcutânea por cercárias (Mig), observou-se claro aumento da permeabilidade em membranas no segundo tipo, em consequência do maior contato com membranas, além da presença de fatores biológicos do hospedeiro preservados na infecção.

Estudos complementares, empregando novas sondas fluorescentes e microscopia confocal deverão ser realizados para melhor explorar os achados até o momento.

O presente trabalho mostrou também que alterações na transcrição gênica de esquistossômulos de *S. mansoni* quando mantidos *in vitro*, em contato com o soro

portal de hamster, reiteram achados anteriores de que componentes do soro presente nos vasos do sistema porta hepático de hospedeiros definitivos, durante a infecção, são essenciais e capazes de alterar processos fundamentais a adaptação e desenvolvimento do parasito.

Da comparação entre esquistossômulos cultivados em presença soro portal de hamster (SPO) e os cultivados em presença de soro periférico (SPE), observou-se que, para os tempos de cultura estabelecidos no estudo, 3 horas e 12 horas, os parasitos são semelhantes em relação a expressão dos genes. Além da elevada similaridade observada na análise de correlação entre as réplicas de bibliotecas construídas, a análise estatística de expressão não evidenciou diferença nas comparações diretas entre parasitos cultivados nos soros diferentes (SPO3h *versus* SPE3h e SPO12h *versus* SPE12h).

Na comparação temporal entre esquistossômulos cultivados em soro portal (SPO3h *versus* SPO12h) foram encontrados 58 genes com padrão de expressão diferencial, exclusivamente em soro portal. O perfil de expressão observado no RNASeq foi validado, sendo que os níveis de expressão pelos dois métodos mostraram-se altamente correlacionados.

Considerando os genes suprarregulados após o estímulo por soro portal de hamster por 12 horas e seus possíveis efeitos na biologia do parasito, os dados sugerem que alguns processos podem estar ativos em membranas superficiais, como biossíntese de glicanos e o transporte de fosfolipídeos, alterando a composição dessas membranas e favorecendo a permanência do parasito no organismo do hospedeiro.

Aumento de atividade em membranas de organelas também parece ser importante ao parasito em contato com o soro portal por 12 horas, principalmente em retículo endoplasmático e complexo de Golgi. O processo de degradação proteica dependente de retículo endoplasmático parece ser ativado, em resposta ao stress que a presença do soro portal representa. O aumento da expressão de alguns genes de proteínas de resposta a *stress*, bem como outros genes determinantes da estrutura de ribossomos, dentre outros processos ligados a síntese proteica também se encontram suprarregulados, os dados sugerem a existência de elevada taxa de *turnover* de proteínas, que pode ser importante tanto para o desenvolvimento do parasito no

organismo do hospedeiro, bem como para seus mecanismos de evasão do sistema imunológico. Nessa renovação, a regulação pós transcricional parece ser também importante e ativa, uma vez que alguns dos genes transcritos são essenciais na biogênese de miRNAs.

Processos determinantes da proliferação e diferenciação celular parecem também estar ativos em resposta ao estímulo por soro portal de hamster por 12 horas. Genes envolvidos na transdução de sinal determinante da atividade proliferativa, bem como genes com atividades diferenciação celular ou mesmo outros envolvidos no processamento nuclear de mRNA foram encontrados suprarregulados e corroboram este achado. A expressão aumentada do principal gene envolvido na biossíntese de purinas no parasito é também considerada juntamente com os anteriormente citados.

Alguns dos genes com expressão aumentada em resposta ao estímulo por soro portal por 12 horas cujos dados de anotação no genoma são escassos e, portanto, não há funções biológicas claramente associadas deverão ser adicionalmente estudados, tanto com vistas a incrementar a anotação genômica para *S. mansoni*, quanto com o objetivo de relacionar suas atividades ao estímulo dado pelo soro portal.

Os genes suprarregulados em resposta ao estímulo durante 3 horas por soro portal evidenciam o aumento de atividades de adaptação do parasito, dentre elas transporte de fosfolípidos e sais biliares membrana, bem como alterações de citoesqueleto envolvendo adesão celular ou mesmo atividade motora. A sinalização celular desencadeada por acetilcolina, agindo sob receptor muscarínico também parece ser importante direcionadora de processos adaptativos consequentes do contato precoce com o soro portal.

Estudos adicionais empregando inibidores ou mesmo estratégias de silenciamento gênico, associado a cultura *in vitro* do parasito serão em breve realizados para melhor compreender a importância dos genes aqui reportados no desenvolvimento do parasito.

7 Referências

Abath FG, Hagan P, Jeffs SA, Schechter I, Meadows HM, Holder AA, Meadows HM, Holder AA, Simpson AJG. Structure of the gene encoding a putative *Schistosoma mansoni* tegumental antigen precursor. *Mol Biochem Parasitol*. 1993;60(1):81-91.

Abreu FC, Pereira RV, Oliveira VF, Gomes Mde S, Jannotti-Passos LK, Borges WC, Guerra-Sá R. Characterization of export receptor exportins (XPOs) in the parasite *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res*. 2013 Dec;112(12):4151-9. doi:10.1007/s00436-013-3606-x.

Al-Adhami BH, Noble C, Sharaf O, Thornhill J, Doenhoff MJ, Kusel R. The role of acidic organelles in the development of schistosomula of *Schistosoma mansoni* and their response to signalling molecules. *Parasitology*. 2005;130(Pt 3):309-22.

Almeida, GT., M. S. Amaral, FC. Beckedorff, JP. Kitajima, R. Demarco, and S. Verjovski-Almeida, 2011, Exploring the *Schistosoma mansoni* adult male transcriptome using RNA-seq.: *Exp Parasitol*.

Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* 2010;11:R106.

Andrade ZA, Azevedo TM. A patologia da esquistossomose humana. In: Omar AS, Coelho PMZ, Lenzi HL. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose uma visão multidisciplinária. 2008. Rio de Janeiro. p. 549-568.

Aragon AD, Imani RA, Blackburn VR, Cunningham C. Microarray based analysis of temperature and oxidative stress induced messenger RNA in *Schistosoma mansoni*. *Molecular and biochemical parasitology* 2008;162(2):134-141. doi:10.1016/j.molbiopara.2008.08.004.

Badr SG, Pica-Mattoccia L, Moroni R, Angelico M, Cioli D. Effect of bile salts on oviposition in vitro by *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res*. 1999 May;85(5):421-3.

Bahia D, Avelar L, Mortara RA, Khayath N, Yan Y, Noël C, Capron M, Dissous C, Pierce RJ, Oliveira G. SmPKC1, a new protein kinase C identified in the platyhelminth parasite *Schistosoma mansoni*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;345(3):1138-48.

Barbosa MA, Pellegrino J, Coelho PM, Sampaio IB. Quantitative aspects of the

migration and evolutive asynchronism of *Schistosoma mansoni* in mice. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1978;20(3):121-32.

Barker, LR, Bueding E, Timms AR (1966). The possible role of acetylcholine in *Schistosoma mansoni*. *Brit J Pharmacol* 26: 656-665.

Beckmann S, Quack T, Dissous C, Cailliau K, Lang G, Grevelding CG. Discovery of platyhelminth-specific α/β -integrin families and evidence for their role in reproduction in *Schistosoma mansoni*. *PLoS One*. 2012;7(12):e52519. doi: 10.1371/journal.pone.0052519. Epub 2012 Dec 27.

Bergquist R. A century of schistosomiasis research. *Acta tropica*. 2008 nov-dez;108(2-3):65-68.

Berriman M, Haas BJ, LoVerde PT, Wilson RA, Dillon GP, Cerqueira GC, Mashiyama ST, 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, Pertea 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(7253):352-8.

Beullens M, Bollen M. The protein phosphatase-1 regulator NIPP1 is also a splicing factor involved in a late step of spliceosome assembly. *J Biol Chem*. 2002 May 31;277(22):19855-60.

Bout DT, Deslee D, Capron AR. Protection against schistosomiasis produced by cyclosporin A. *Am J Trop Med Hyg*. 1984 Jan;33(1):185-6. PubMed PMID: 6696178.

Bout D, Deslèe D, Capron A. Antischistosomal effect of cyclosporin A: cure and prevention of mouse and rat schistosomiasis mansoni. *Infection and Immunity*. 1986;52(3):823-827.

Brannan LR, Chappell LH, Woo J, Thomson AW. Anti-schistosomal activity of cyclosporin A: studies on murine spleen cells and the influence of a cyclosporin

antagonist on resistance to infection. *Immunology*. 1989;67(3):382-387.

Braschi S, Wilson RA. Proteins exposed at the adult schistosome surface revealed by biotinylation. *Mol Cell Proteomics*. 2006;5(2):347-56.

Brink LH, McLaren DJ, Smithers SR. *Schistosoma mansoni*: a comparative study of artificially transformed schistosomula and schistosomula recovered after cercarial penetration of isolated skin. *Parasitology*. 1977;74(1):73-86.

Carvalho MG, Mello RT, Soares AL, Bicalho RS, Lima e Silva FC, Coelho PM. Murine schistosomiasis mansoni: process of blood coagulation at pre-patent, acute and chronic phases, and consequence of chemotherapeutic cure on the reversion of changes. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2005;16(7):469-75.

Carvalho, MCCG; SILVA, DCG. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. *Cienc. Rural*, Santa Maria, v. 40, n. 3, p. 735-744, Mar. 2010. *Cell Biol*. 1985 May;100(5):1423-34.

Ceulemans H, Stalmans W, Bollen M. Regulator-driven functional diversification of protein phosphatase-1 in eukaryotic evolution. *Bioessays*. 2002 Apr;24(4):371-81. Review.

Chaudhuri, RR, Yu L, Kanji A, Perkins TT, Gardner PP, Choudhary J, Grant AJ (2011). Quantitative RNA-seq analysis of the transcriptome of *Campylobacter jejuni*. *Microbiology*.

Chen JH, Zhang T, Ju C, Xu B, Lu Y, Mo XJ, Chen SB, Fan YT, Hu W, Zhou XN. An integrated immunoproteomics and bioinformatics approach for the analysis of *Schistosoma japonicum* tegument proteins. *J Proteomics*. 2014 Feb 26;98:289-99. doi: 10.1016/j.jprot.2014.01.010. Epub 2014 Jan 19.

Ciosk,R., DePalma,M. and Priess,J.R. (2006) Translational regulators maintain totipotency in the *Caenorhabditis elegans* germline. *Science*, 311, 851–853.

Clegg JA. IN VITRO CULTIVATION OF SCHISTOSOMA MANSONI. *Exp Parasitol*. 1965;16:133-47.

Clegg JA, Smithers SR, Terry RJ. Acquisition of human antigens by *Schistosoma*

mansoni during cultivation in vitro. *Nature*. 1971a;232(5313):653-4.

Clegg JA, Smithers SR, Terry RJ. Concomitant immunity and host antigens associated with schistosomiasis. *Int J Parasitol*. 1971b;1(1):43-9.

Clegg JA, Smithers SR. The effects of immune rhesus monkey serum on schistosomula of *Schistosoma mansoni* during cultivation in vitro. *Int J Parasitol*. 1972;2(1):79-98.

Cloonan N1, Forrest AR, Kolle G, Gardiner BB, Faulkner GJ, Brown MK, Taylor DF, Steptoe AL, Wani S, Bethel G, Robertson AJ, Perkins AC, Bruce SJ, Lee CC, Ranade SS, Peckham HE, Manning JM, McKernan KJ, Grimmond SM. Stem cell transcriptome profiling via massive-scale mRNA sequencing. *Nat Methods*. 2008;5(7):613-9.

Coelho JR, Bezerra FS. Compatibility of *Biomphalaria tenagophila* with *Schistosoma mansoni*: a study of homologous plasma transference. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101(1):111-2.

Consortium SjGSaFA. The *Schistosoma japonicum* genome reveals features of host-parasite interplay. *Nature*. 2009;460(7253):345-51.

Crabtree JE, Wilson RA. *Schistosoma mansoni*: an ultrastructural examination of skin migration in the hamster cheek pouch. *Parasitology*. 1985;91 (Pt 1):111-20.

Craig SP, McKerrow JH, Newport GR, Wang CC. Analysis of cDNA encoding the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRTase) of *Schistosoma mansoni*; a putative target for chemotherapy. *Nucleic Acids Research*. 1988;16(14B):7087-7101.

Cummings RD, Nyame AK. Schistosome glycoconjugates. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1455(2-3): 363-74.

Daher W1, Cailliau K, Takeda K, Pierrot C, Khayath N, Dissous C, Capron M, Yanagida M, Browaeys E, Khalife J. Characterization of *Schistosoma mansoni* Sds homologue, a leucine-rich repeat protein that interacts with protein phosphatase type 1 and interrupts a G2/M cell-cycle checkpoint. *Biochemical Journal*. 2006;395(Pt 2):433-441. doi:10.1042/BJ20051597.

Daily JP1, Scanfled D, Pochet N, Le Roch K, Plouffe D, Kamal M, Sarr O, Mboup S, Ndir O, Wypij D, Levasseur K, Thomas E, Tamayo P, Dong C, Zhou Y, Lander ES, Ndiaye D, Wirth D, Winzeler EA, Mesirov JP, Regev A. Distinct physiological states of

Plasmodium falciparum in malaria-infected patients. *Nature*. 2007;450(7172):1091-5.

Daleke D.L. Phospholipid flippases. *J. Biol. Chem.* 2007;282:821–825.

Damian, R. T. (1964). Molecular mimicry: antigen sharing by parasite and host and its consequences. *Am. Nat.* 98, 129–149. doi: 10.1086/282313

Davies SJ, Grogan JL, Blank RB, Lim KC, Locksley RM, McKerrow JH. Modulation of blood fluke development in the liver by hepatic CD4+ lymphocytes. *Science*. 2001;294(5545):1358-61.

Day TA, Chen GZ, Miller C, Tian M, Bennett JL, Pax RA (1996). Cholinergic inhibition of muscle fibers isolated from *Schistosoma mansoni* (Trematoda: Digenea). *Parasitology* 113(Pt. 1): 55-61.

de Koning HP, Watson CJ, Sutcliffe L, Jarvis SM. Differential regulation of nucleoside and nucleobase transporters in *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma brucei brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* 2000;106(1):93-107.

De Oliveira CC, Figueiredo EA, Gazzinelli G, Howells RE, Pellegrino J. Biochemical changes in the transformation of *Schistosoma mansoni* cercariae to schistosomules. *Comp Biochem Physiol B.* 1975; 51(4):417-20.

Diaz-Rivera AS, Ramos–Morales F, Kopisch E, Garcia-Palmieri MR, Cintron-Rivera AA, Marchand EJ et al. Acute manson's Schistosomiasis. *Am j Med.* 1956; 21: 918-943.

Dovey HF, McKerrow JH, Aldritt SM, Wang CC. Purification and characterization of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase from *Schistosoma mansoni*. A potential target for chemotherapy. *J Biol Chem.* 1986 Jan 15;261(2):944-8.

Draper, B.W., Mello, C.C., Bowerman, B., Hardin, J. and Priess, J.R. (1996) MEX-3 is a KH domain protein that regulates blastomere identity in early *C. elegans* embryos. *Cell*, 87, 205–216.

Draz HM, Ashour E, Shaker YM, Khattab HM, Wu CH, Wu GY. Host susceptibility to schistosomes: effect of host sera on cell proliferation of *Schistosoma mansoni* schistosomula. *J Parasitol.* 2008 Dec;94(6):1249-52. doi: 10.1645/GE-1607.1.

El Ridi, R. and Tallima, H. (2006). Equilibrium in lung stage schistosomula sphingomyelin synthesis and breakdown allows very small molecules but not antibody to access proteins at the surface of the host–parasite inter- face. *Journal of Parasitology*

92, 730–737.

Enk MJ, Katz N, Coelho PMZ. A case of *Schistosoma mansoni* infection treated during the prepatent period. *Natur Clin Prac*. 2008 fev; 5(2): 112-115

Faria-Pinto P, Meirelles MN, Lenzi HL, Mota EM, Penido ML, Coelho PM, Vasconcelos EG. ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni* egg: characterization and immunocytochemical localization of a new antigen. *Parasitology*. 2004;129(Pt 1):51-7.

Faust EC, Jones CA, Hoffmam WA. Studies on schistosomiasis mansoni in Puerto Rico. III- Biological studies. 2. The mammalian phase of the life cycle. *Puerto Rico Journ Publ Healt Trop Med*. 1934; 10: 133-196.

Ferreira H, Oliveira CA, Bittencourt, D, Katz N, Carneiro LFC, Grinbaum E, Veloso C, Dias RP, Alvarenga RJ, Dias CB. A fase aguda da esquistossomose mansoni. Considerações sobre 25 casos observados em Belo Horizonte. 1966. *J. Bras. Med*. 11: 54-67

Fischer G, Bang H. The refolding of urea-denatured ribonuclease A is catalyzed by peptidyl-prolyl cis-trans isomerase. *Biochim Biophys Acta*. 1985 Mar 22;828(1):39-42. PubMed PMID: 3882150.

Fischer G, Wittmann-Liebold B, Lang K, Kiefhaber T, Schmid FX. Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature*. 1989 Feb 2;337(6206):476-8. PubMed PMID: 2492638.

Fitzpatrick JM, Johnston DA, Williams GW, Williams DJ, Freeman TC, Dunne DW, Hoffmann KF. An oligonucleotide microarray for transcriptome analysis of *Schistosoma mansoni* and its application/use to investigate gender-associated gene expression. *Mol Biochem Parasitol* 2005;141:1–13.

Fitzpatrick JM, Peak E, Perally S, Chalmers IW, Barrett J, Yoshino TP, Ivens AC , Hoffmann KF. Anti-schistosomal intervention targets identified by lifecycle transcriptomic analyses. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009a;3(11):e543.

Fitzpatrick JM., Peak E, Perally S, Chalmers IW, Barrett J, Yoshino TP, Alasdair Ivens C, Hoffmann KF. 2009b. Anti-schistosomal Intervention Targets Identified by Lifecycle

Transcriptomic Analyses. PLOS November 3; 11

Fonseca CT, Carvalho GBF, Alves CC, deMelo TT (2012). Schistosoma tegument proteins in vaccine and diagnosis development: an update (2012). Journal of Parasitology Research 2012, Article ID 541268, 8 <http://dx.doi.org/10.1155/2012/541268>

Franco GR, Valadão AF, Azevedo V, Rabelo EM. The Schistosoma gene discovery program: state of the art. Int J Parasitol. 2000;30(4):453-63.

Furlong ST, Thibault KS, Morbelli LM, Quinn JJ, Rogers RA. Uptake and compartmentalization of fluorescent lipid analogs in larval Schistosoma mansoni. J Lipid Res. 1995 Jan;36(1):1-12.

Ganley Leal LL., Guarner J, Todd CW, Da'Dara AA, Freeman GL, Boyer AE, Harn DA, Secor WE (2005). Comparison of Schistosoma mansoni irradiated cercariae and Sm23 DNA vaccines. Parasite Immunology 27, 341–349.

Gazzinelli G, de Oliveira CC, Figueiredo EA, Pereira LH, Coelho PM, Pellegrino J. *Schistosoma mansoni*: biochemical evidence for morphogenetic change from cercaria to schistosomule. Exp Parasitol. 1973; 34(2):181-8.

Gobert GN, Tran MH, Moertel L, Mulvenna J, Jones MK, McManus DP, Loukas A (2010). Transcriptional Changes in *Schistosoma mansoni* during Early Schistosomula Development and in the Presence of Erythrocytes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(2), e600. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000600>

Transcriptional changes in *Schistosoma mansoni* during early schistosomula development and in the presence of erythrocytes. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4(2):e600.

Goder V, Carvalho P, Rapoport TA. The ER-associated degradation component Der1p and its homolog Dfm1p are contained in complexes with distinct cofactors of the ATPase Cdc48p. *FEBS letters* 2008;582(11):1575-1580. doi:10.1016/j.febslet.2008.03.056.

Gomes MS, Cabral FJ, Jannotti-Passos LK, Carvalho O, Rodrigues V, Baba EH, Sá RG. Preliminary analysis of miRNA pathway in *Schistosoma mansoni*. Parasitol Int. 2009;58(1):61-8.

Greenberg RM. Schistosome ABC multidrug transporters: From pharmacology to physiology. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* 2014;4(3):301-309. doi:10.1016/j.ijpddr.2014.09.007.

Haas W. (1984). *Schistosoma mansoni*: Cercaricidal effect of 2-tetradecenoic acid, a penetration stimulant. *Experimental Parasitology* 58, 215–222.

Haeberlein S and Haas W (2008). Chemical attractants of human skin for swimming *Schistosoma mansoni* cercariae. *Parasitology Research* 102, 657–662.

Hanks SK, Quinn AM, and Hunter T, The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains, *Science*, vol. 241, no. 4861, pp. 42–52, 1988.

Harburger DS, Bouaouina M, Calderwood DA. 2009. Kindlin-1 and -2 directly bind the C-terminal region of beta integrin cytoplasmic tails and exert integrin-specific activation effects. *J Biol Chem* 284:11485–11497.

Hardcastle TJ, Kelly KA. BaySeq: empirical Bayesian methods for identifying differential expression in sequence count data. *BMC Bioinformatics* 2010;11:422.

Harris AR, Russell RJ, Charters AD. A review of schistosomiasis in immigrants in Western Australia, demonstrating the unusual longevity of *Schistosoma mansoni*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1984;78(3):385-8.

Harvey RP. NK-2 homeobox genes and heart development. *Dev Biol.* 1996 Sep15;178(2):203-16. Review.

Hempel C, Hoyer N, Staalso T, Kurtzhals JA. Effects of the vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) inhibitor SU5416 on in vitro cultures of *Plasmodium falciparum*. *Malar J.* 2014 May 28;13:201. doi: 10.1186/1475-2875-13-201.

Hoffman EM. Inhibition of complement by a substance isolated from human erythrocytes. I. Extraction from human erythrocyte stromata. *Immunochemistry.* 1969a;6(3):391-403.

Hoffmann EM. Inhibition of complement by a substance isolated from human erythrocytes. II. Studies on the site and mechanism of action. *Immunochemistry.*

1969b;6(3):405-19.

Hofmann AF, Roda A. Physicochemical properties of bile acids and their relationship to biological properties: an overview of the problem. *J Lipid Res.* 1984 Dec 15;25(13):1477-89. Review.

Hokke CH and Yazdanbakhsh M. Schistosome glycans and innate immunity. *Parasite Immunol* 2005; 27, 257–264.

Hokke CH, Deelder AM, Hoffmann KF, Wuhrer M. Glycomics-driven discoveries in schistosome research. *Exp Parasitol.* 2007a; 117: 275–283.

Hokke CH, Fitzpatrick JM. and Hoffmann KF. Integrating transcriptome, proteome and glycome analyses of *Schistosoma* biology. *Trends Parasitol* 2007b; 23(4): 166-174.

Horn M, Fajtová P, Rojo Arreola L, Ulrychová L, Bartošová-Sojková P, Franta Z, Protasio AV, Opavský D, Vondrášek J, McKerrow JH, Mareš M, Caffrey CR, Dvořák J. (2014) Trypsin- and Chymotrypsin-Like Serine Proteases in *Schistosoma mansoni* – The Undiscovered Country. *PLoS Negl Trop Dis* 8(3): e2766. doi:10.1371/journal.pntd.0002766

Jones, M. K., Gobert, G. N., Zhang, L., Sunderland, P. and McManus, D. P. (2004), The cytoskeleton and motor proteins of human schistosomes and their roles in surface maintenance and host–parasite interactions. *Bioessays*, 26: 752–765. doi: 10.1002/bies.20058

Katz N, Chaves A, Pellegrino J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 1972; (14): 397-400.

Koletsky AJ, Harding MW, Handschumacher RE. Cyclophilin: distribution and variant properties in normal and neoplastic tissues. *J Immunol.* 1986 Aug 1;137(3):1054-9.

Kostova Z, Tsai YC, Weissman AM. Ubiquitin ligases, critical mediators of endoplasmic reticulum-associated degradation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2007;18:770–779.

Kumkate, S, Jenkins GR, Paveley RA, Hogg KG and Mountfor AP. (2007). CD207+ Langerhans cells constitute a minor population of skin-derived antigen-presenting cells

in the draining lymph node following exposure to *Schistosoma mansoni*. *International Journal of Parasitology* 37, 209–220.

Kusel JR, Gazzinelli G, Colley DG, de Souza CP, Cordeiro MN. The formation of surface membrane vesicles from schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*. 1984; 89 (Pt 3): 483-94.

Kusel JR, Al-Adhami BH, Doenhoff MJ. The schistosome in the mammalian host: understanding the mechanisms of adaptation. *Parasitology*. 2007;134(Pt 11):1477-526.

Lamb EW, Walls CD, Pesce JT, Riner DK, Maynard SK, Crow ET, Wynn TA, Schaefer BC, Davies SJ. Blood fluke exploitation of non-cognate CD4+ T cell help to facilitate parasite development. *PLoS Pathog*. 2010;6(4):e1000892.

Lang K, Schmid FX, Fischer G. Catalysis of protein folding by prolyl isomerase. *Nature*. 1987 Sep 17-23;329(6136):268-70.

Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M. and Salzberg, S.L. (2009) Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.*, 10, R25.

Lee EF, Young ND, Lim NT, Gasser RB, Fairlie WD. Apoptosis in schistosomes: toward novel targets for the treatment of schistosomiasis. *Trends Parasitol*. 2014 Feb;30(2):75-84. doi: 10.1016/j.pt.2013.12.005. Epub 2014 Jan 3.

Leng N, Dawson JA, Thomson JA, et al. EBSeq: an empirical Bayes hierarchical model for inference in RNA-seq experiments. *Bioinformatics* 2013;29:1035-1043.

Li J, Tibshirani R. Finding consistent patterns: a nonparametric approach for identifying differential expression in RNA-Seq data. *Stat Methods Med Res* 2013;22:519-523.

Lilley BN, Ploegh HL. A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature*. 2004;429:834–40.

Loeffler DA, Lundy SK, Singh KP, Gerard HC, Hudson AP, and Boros DL - Soluble Egg Antigens from *Schistosoma mansoni* Induce Angiogenesis-Related Processes by Up-Regulating Vascular Endothelial Growth Factor in Human Endothelial Cells *J Infect Dis*.

(2002) 185 (11): 1650-1656 doi:10.1086/340416

Love MI, Huber W and Anders S (2014). "Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-Seq data with DESeq2." *bioRxiv*.

Loverde PT (1998) Do antioxidants play a role in schistosome host-parasite interactions? *Parasitol Today* 14: 284–289.

Lyko F, Martoglio B, Jungnickel B, Rapoport TA, Dobberstein B. Signal sequence processing in rough microsomes. *J Biol Chem*. 1995 Aug 25;270(34):19873-8.

Machado AJ, Gazzinelli G, Pellegrino J, Dias de Silva W. *Schistosoma mansoni*: the role of the complement C3-activating system in the cercaricidal action of normal serum. *Exp Parasitol*. 1975;38(1):20-9.

Malinin NL, Plow EF, Byzova TV. 2010. Kindlins in FERM adhesion. *Blood* 115: 4011–4017.

Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S, The protein kinase complement of the human genome, *Science*, vol. 298, no. 5600, pp. 1912–1934, 2002.

Mansour NR, Bickle QD (2010) Comparison of microscopy and Alamar blue reduction in a larval based assay for schistosome drug screening. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e795.

Mardis ER. Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2008;9:387-402. doi: 10.1146/annurev.genom.9.081307.164359.

Marioni, JC., Mason CE, Mane SM, Stephens M and Gilad Y (2008). RNA-seq: An assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome Res* 18(9): 1509-1517.

Matsuda A, Suzuki Y, Honda G, Muramatsu S, Matsuzaki O, Nagano Y, Doi T, Shimotohno K, Harada T, Nishida E, Hayashi H, Sugano S (May 2003). Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-kappaB and MAPK signaling pathways. *Oncogene* 22 (21): 3307–3318.

Mavárez J, Steiner C, Pointier JP, Jarne P. Evolutionary history and phylogeography of the schistosome-vector freshwater snail *Biomphalaria glabrata* based on nuclear and

mitochondrial DNA sequences. *Heredity* (Edinb). 2002;89(4):266-72.

McKernan, K.; Blanchard, A.; Kotler, L.; Costa, G. Reagents, methods, and libraries for bead-based sequencing. US patent application 20080003571 2006.

McNair A, Zemzoumi K, Lütcke H, Guillerm C, Boitelle A, Capron A, Dissous C. Cloning of a signal-recognition-particle subunit of *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res*. 1995;81(2):175-7. PubMed PMID: 7731929. doi: 10.1242/dev.029165.

Melo AL, Coelho PMZ. *Schistosoma mansoni* e a doença. In: Neves DP. *Parasitologia Humana*. 11° ed. São Paulo: Atheneu, 2005.p. 193-212.

Ménétrét JF, Hegde RS, Heinrich S, Chandramouli P, Ludtke SJ, Rapoport TA, Akey CW. Architecture of the ribosome-channel complex derived from native membranes. *J. Mol. Biol*. 2005;348:445–457.

Michalick MS, Gazzinelli G, Pellegrino J. Cultivation of *Schistosoma mansoni* cercarial bodies to adult worms. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1979; 21(3):115-8.

Moertel L, McManus DP, Piva TJ, Young L, McInnes RL, Gobert GN. Oligonucleotide microarray analysis of strain- and gender-associated gene expression in the human blood fluke, *Schistosoma japonicum*. *Mol Cell Probes* 2006;20:280–9.

Mortazavi, A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L and Wold B (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods* 5(7): 621-628.

Olena Morozova, Marco A. Marra, Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics, *Genomics*, Volume 92, Issue 5, November 2008, Pages 255-264, ISSN 0888-7543

Mosavi LK, Cammett TJ, Desrosiers DC, Peng Z. The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*. 2004;13(6):1435-1448. doi:10.1110/ps.03554604.

Mullins C, Lu Y, Campbell A, Fang H, Green N. A mutation affecting signal peptidase inhibits degradation of an abnormal membrane protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 1995 Jul 21;270(29):17139-47.

Munro GH, Brannan LR, Chappell LH, Thomson AW, McLaren DJ. The larvicidal activity of cyclosporin A against *Schistosoma mansoni* in mice. *Parasitology*. 1991 Feb;102 Pt 1:57-63. PubMed PMID: 1903880

Murray AW, Elliott DC, Atkinson MR. Nucleotide biosynthesis from preformed purines in mammalian cells: regulatory mechanisms and biological significance. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1970;10:87-119. Review.

Nyame, K., Cummings, R. D., and Damian, R. T. (1988). Characterization of the high mannose asparagine-linked oligosaccharides synthesized by *Schistosoma mansoni* adult male worms. *Mol. Biochem. Parasitol.* 28, 265–274.

Nyame AK, Leppanen AM, DeBose-Boyd R, Cummings RD. Mice infected with *Schistosoma mansoni* generate antibodies to LacdiNAc (GalNAc beta 1->4GlcNAc) determinants. *Glycobiology*. 1999; 9(10):1029-35.

Nyame AK, Leppänen AM, Bogitsh BJ, Cummings RD. Antibody responses to the fucosylated LacdiNAc glycan antigen in *Schistosoma mansoni*-infected mice and expression of the glycan among schistosomes. *Exp Parasitol*. 2000; 96(4):202-12.

Nyame AK, Lewis FA, Doughty BL, Correa-Oliveira R, Cummings RD. Immunity to schistosomiasis: glycans are potential antigenic targets for immune intervention. *Exp Parasitol*. 2003.104: 1–13.

Oda Y, Okada T, Yoshida H, Kaufman RJ, Nagata K, Mori K. Derlin-2 and Derlin-3 are regulated by the mammalian unfolded protein response and are required for ER-associated degradation. *J Cell Biol*. 2006;172:383–93.

Ojopi EP, Oliveira PS, Nunes DN, Paquola A, DeMarco R, Gregório SP, Aires KA, Menck CF, Leite LC, Verjovski-Almeida S, Dias-Neto E. A quantitative view of the transcriptome of *Schistosoma mansoni* adult-worms using SAGE. *BMC Genomics*. 2007;8:186.

Otto, TD, Wilinski D, Assefa S, Keane TM, Sarry LR, Bohme U, Llinas M (2010). New insights into the blood-stage transcriptome of *Plasmodium falciparum* using RNA-Seq. *Mol Microbiol* 76(1): 12-24.

Palty R, Raveh A, Kaminsky I, Meller R, Reuveny E. SARAF inactivates the store operated calcium entry machinery to prevent excess calcium refilling. *Cell*. 2012 Apr 13;149(2):425-38. doi: 10.1016/j.cell.2012.01.055.

Parker L, Gross S, Beullens M, Bollen M, Bennett D, Alphey L. Functional interaction between nuclear inhibitor of protein phosphatase type 1 (NIPP1) and protein phosphatase type 1 (PP1) in *Drosophila*: consequences of over-expression of NIPP1 in flies and suppression by co-expression of PP1. *Biochemical Journal*. 2002;368(Pt 3):789-797. doi:10.1042/BJ20020582.

Parker-Manuel SJ, Ivens AC, Dillon GP, Wilson RA. Gene expression patterns in larval *Schistosoma mansoni* associated with infection of the mammalian host. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(8):e1274.

Parks DR, Bryan VM, Oi VT, Herzenberg LA. Antigen-specific identification and cloning of hybridomas with a fluorescence-activated cell sorter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(4):1962-6.

Passalacqua KD, Varadarajan A, Ondov BD, Okou DT, Zwick ME, Bergman NH. Structure and complexity of a bacterial transcriptome. *J Bacteriol*. 2009;191(10):3203-11.

Poot M, Gibson LL, Singer VL. Detection of apoptosis in live cells by MitoTracker red CMXRos and SYTO dye flow cytometry. *Cytometry*. 1997;27(4):358-64.

Price M, Lazzaro D, Pohl T, Mattei MG, Rütther U, Olivo JC, Duboule D, Di Lauro R. Regional expression of the homeobox gene *Nkx-2.2* in the developing mammalian forebrain. *Neuron*. 1992 Feb;8(2):241-55.

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.

Protasio AV, Dunne DW, Berriman M. Comparative study of transcriptome profiles of

mechanical- and skin-transformed *Schistosoma mansoni* schistosomula. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(3):e2091.

R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

Rabello A, Pontes LA, Enk MJ, Montenegro SML, Morais CNL. Diagnóstico Parasitológico, Imunológico e Molecular da Esquistossomose Mansoní. In: Omar AS, Coelho PMZ, Lenzi HL. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose uma visão multidisciplinária. Fiocruz, Rio de Janeiro. 2008. p. 895-925

Ramalho-Pinto FJ, Carvalho EM, Horta MF. Mechanisms of evasion of *Schistosoma mansoni* schistosomula to the lethal activity of complement. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1992;87 Suppl 4:111-6.

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(3):360-72.

Ramalho-Pinto FJ. Decay accelerating factor (DAF) as the host antigen with protective activity to complement killing of schistosomula. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1987;82 Suppl 4:213-6.

Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A (2012) MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res* 40: 343–350.

Renvoize C, Biola A, Pallardy M, Breard J: Apoptosis: identification of dying cells. *Cell Biol Toxicol* 1998, 14(2):111-120.

Ribeiro, F., Coelho, P. M. Z., Vieira, L. Q., Watson, D. G., Kusel, J. R. 1998, "The effect of praziquantel treatment on glutathione concentration in *Schistosoma mansoni*." *Parasitology*, vol. 116, no. Pt3, pp. 229-236.

Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 2010;26:139-140

Rocha MO, Coelho PM. The importance of skin and pulmonary phases to the

development of *Schistosoma mansoni* in albino mice. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1980;22(4):157-63.

Rudnick A, Ling TY, Odagiri H, Rutter WJ, German MS. Pancreatic beta cells express a diverse set of homeobox genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(25):12203-12207.

Samuelson JC, Caulfield JP, David JR. *Schistosoma mansoni*: post-transformational surface changes in schistosomula grown in vitro and in mice. *Exp Parasitol*. 1980; 50(3):369-83.

Seyednasrollah F, Laiho A, Elo LL. Comparison of software packages for detecting differential expression in RNA-seq studies. *Brief Bioinform*. 2015 Jan;16(1):59-70. doi: 10.1093/bib/bbt086. Epub 2013 Dec 2.

Samuelson JC, Caulfield JP. The cercarial glycocalyx of *Schistosoma mansoni*. *J Cell Biol*. 1985 May;100(5):1423-34. PubMed PMID: 2985622; PubMed Central PMCID: PMC2113874.

Sbodio JI, Hicks SW, Simon D, Machamer CE. GCP60 preferentially interacts with a caspase-generated golgin-160 fragment. *J Biol Chem*. 2006 Sep 22;281(38):27924-31. Epub 2006 Jul 26.

Schäfer A, Wolf DH. Sec61p is part of the endoplasmic reticulum-associated degradation machinery. *The EMBO Journal* 2009;28(19):2874-2884. doi:10.1038/emboj.2009.231.

Scholte RG, Gosoni L, Malone JB, Chammartin F, Utzinger J, Vounatsou P. Predictive risk mapping of schistosomiasis in Brazil using Bayesian geostatistical models. *Acta Trop*. 2014 Apr;132:57-63. doi:10.1016/j.actatropica.2013.12.007. Epub 2013 Dec 19. PubMed PMID: 24361640.

Shaker YM, Wu CH, el-Shobaki FA, Ashour E, Khattab HM, Draz HM, Kamel R, Wu GY. Human portal serum stimulates cell proliferation in immature *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*. 1998;117 (Pt 4):293-9.

Shaker YM1, Hamdy MA, Ismail M, Draz HM, Ashour E, Gouda W. Effect of host portal

and peripheral sera fractions on cell proliferation of *Schistosoma mansoni* schistosomules. *Trop Biomed*. 2011 Dec;28(3):630-7.

Sharom F.J. Flipping and flopping—lipids on the move. *IUBMB Life*. 2011;63:736–746.

Sher A, Hall BF, Vadas MA. Acquisition of murine major histocompatibility complex gene products by schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J Exp Med*. 1978;148(1):46-57.

Simões MC, Lee J, Djikeng A, Cerqueira GC, Zerlotini A, da Silva-Pereira RA, Dalby AR, LoVerde P, El-Sayed NM, Oliveira G. Identification of *Schistosoma mansoni* microRNAs. *BMC Genomics*. 2011;12:47.

Smith HV, Kusel JR. The acquisition of antigens in the intercellular substance of mouse Pel by schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Clin Exp Immunol*. 1979; 36(3):430-5.

Smithers SR, Terry RJ. The immunology of schistosomiasis. *Adv Parasitol*. 1969;7:41-93.

Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 2004;3.

Soneson C, Delorenzi M. A comparison of methods for differential expression analysis of RNA-seq data. *BMC Bioinformatics*. 2013 Mar 9;14:91. doi:10.1186/1471-2105-14-91.

Shoda M, Misumi Y, Yamamoto A, Yano A, Nakamura N, Ikehara Y. Identification and characterization of a novel Golgi protein, GCP60, that interacts with the integral membrane protein giantin. *J Biol Chem*. 2001 Nov 30;276(48):45298-306.

Stirewalt MA. *Schistosoma mansoni*: cercaria to schistosomule. *Adv Parasitol*. 1974;12:115-82.

Sturn A, Quackenbush J, Trajanoski Z. Genesis: Cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics*. 2002 Jan;18(1):207-8.

Takada H, Kawana T, Ito Y, Kikuno RF, Mamada H, Araki T, Koga H, Asashima M, Taira M. The RNA-binding protein Mex3b has a fine-tuning system for mRNA regulation

in early *Xenopus* development. *Development*. 2009 Jul;136(14):2413-22.

Tang F, Barbacioru C, Wang Y, Nordman E, Lee C, Xu N, Wang X, Bodeau J, Tuch BB, Siddiqui A, Lao K, Surani MA. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat Methods*. 2009;6(5):377-82.

Tarazona S, García-Alcalde F, Dopazo J, Ferrer A, Conesa A. Differential expression in RNA-seq: a matter of depth. *Genome Res* 2011;21:2213-2223.

Thornhill J, Coelho PM, McVeigh P, Maule A, Jurberg AD, Kusel JR. *Schistosoma mansoni* cercariae experience influx of macromolecules during skin penetration. *Parasitology*. 2009;136(11):1257-67.

Thornhill J, Coelho PM, McVeigh P, Maule A, Jurberg AD, Kusel JR. *Schistosoma mansoni* cercariae experience influx of macromolecules during Pel penetration. *Parasitol*. 2010a; 137(1):189.

Thornhill J, Kusel J, Oliveira FA, Ribeiro F, Lima SF, Coelho PM, McVeigh P, Mattos AC. Uptake of macromolecules by cercariae during skin penetration and transformation to schistosomula (*Schistosoma mansoni*). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010b;105(4):387-90.

Thornhill JA, McVeigh P, Jurberg AD, Kusel JR. Pathways for the influx of molecules into cercariae of *Schistosoma mansoni* during skin penetration. *Parasitology*. 2010c;137(7):1089-98.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(9):4350-4.

Trapnell C, Hendrickson DG, Sauvageau M, et al. Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nat Biotechnol* 2013;31:46-53.

Untergrasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012) Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40(15):e115

- Valentim CL, LoVerde PT, Anderson TJ, Criscione CD. Efficient genotyping of *Schistosoma mansoni* miracidia following whole genome amplification. *Mol Biochem Parasitol.* 2009;166(1):81-4.
- Van Die, I., and Cummings, R. D. (2010). Glycan gimmickry by parasitic helminths: a strategy for modulating the host immune response? *Glycobiology* 20, 2–12. doi: 10.1093/glycob/cwp140
- Van diepen A, Van der Velden NSJ, Smit CH, Meevissen MHJ, Hokke CH. Parasite glycans and antibody-mediated immune responses in *Schistosoma* infection *Parasitol* 2012; 139(9): 1219-1230.
- Vasconcelos EG, Nascimento PS, Meirelles MN, Verjovski-Almeida S, Ferreira ST. Characterization and localization of an ATP-diphosphohydrolase on the external surface of the tegument of *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol.* 1993;58(2):205-14.
- Vembar SS, Brodsky JL. One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2008;9(12):944-957. doi:10.1038/nrm2546.
- Verjovski-Almeida S, DeMarco R, Martins EA, Guimarães PE, Ojopi EP, Paquola AC, et al. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. *Nat Genet.* 2003;35(2):148-57.
- Walker, A. J., Ressurreição, M. and Rothermel, R. (2014). Exploring the function of protein kinases in schistosomes: perspectives from the laboratory and from comparative genomics. *Frontiers in Genetics* 5, 229.
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet.* 2009;10(1):57-63.
- Watada H, Mirmira RG, Kalamaras J, German MS. Intramolecular control of transcriptional activity by the NK2-specific domain in NK-2 homeodomain proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2000;97(17):9443-9448.
- WHO - World Health Organization 2006 – Preventive Chemotherapy in Human

Helminthiasis. Coordinated use of anthelmintic drugs in control interventions: a manual for health professionals and programme managers. Disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/preventive_chemotherapy/pct_manual/en/index.html acesso: fev. 2015

Williams DL, Sayed AA, Bernier J, Birkeland SR, Cipriano MJ, Papa AR, McArthur AG, Taft A, Vermeire JJ, Yoshino TP. Profiling *Schistosoma mansoni* development using serial analysis of gene expression (SAGE). *Exp Parasitol*. 2007;117(3):246-58.

Wilson RA, Coulson PS (2009) Immune effector Mechanisms against schistosomiasis: looking for a chink in the parasite's armour. *Trends Parasitol* 25: 423–431.

Wolowczuk I, Nutten S, Roye O, Delacre M, Capron M, Murray RM, Trottein F and Auriault C. (1999). Infection of mice lacking interleukin-7 (IL-7) reveals an unexpected role for IL-7 in the development of the parasite. *Schistosoma Mansoni Infection and Immunity* 67, 4183–4190.

Wu GY, Wu CH, Dunn MA, Kamel R. Stimulation of *Schistosoma mansoni* oviposition in vitro by animal and human portal serum. *Am J Trop Med Hyg*. 1985;34(4):750-3.

Wuhrer M, Dennis RD, Doenhoff MJ, Geyer R. A fucose-containing epitope is shared by keyhole limpet haemocyanin and *Schistosoma mansoni* glycosphingolipids. *Mol Biochem Parasitol*. 2000;110(2):237-46.

Wuhrer M, Koeleman CA, Fitzpatrick JM, Hoffmann KF, Deelder AM, Hokke CH. Gender-specific expression of complex-type N-glycans in schistosomes. *Glycobiology* 2006;16: 991.

Xia Z, Xu H, Zhai J, Li D, Luo H, He C and Huang X (2011). RNA-Seq analysis and de novo transcriptome assembly of *Hevea brasiliensis*. *Plant Mol Biol*.

Yamamoto C, Yagi S, Hori T, Iida T, Taniguchi K, Isaji S, Uemoto S. Significance of portal venous VEGF during liver regeneration after hepatectomy. *J Surg Res*. 2010 Apr;159(2):e37-43. doi: 10.1016/j.jss.2008.11.007.

Ye Y, Shibata Y, Yun C, Ron D, Rapoport TA. A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature*. 2004;429:841–7.

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;44(2):221-5.

Zahoor Z, Davies AJ, Kirk RS, Rollinson D, Walker AJ. Nitric oxide production by *Biomphalaria glabrata* haemocytes: effects of *Schistosoma mansoni* ESPs and regulation through the extracellular signal-regulated kinase pathway. *Parasit Vectors.* 2009;2(1):18.

Zerlotini A, Aguiar ER, Yu F, Xu H, Li Y, Young ND, Gasser RB, Protasio AV, Berriman M, Roos DS, Kissinger JC, Oliveira G. SchistoDB: an updated genome resource for the three key schistosomes of humans. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Database issue):D728-31.

Zerlotini A, Heiges M, Wang H, Moraes RL, Dominitini AJ, Ruiz JC, Kissinger JC, Oliveira G. SchistoDB: a *Schistosoma mansoni* genome resource. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(Database issue):D579-82.

Zhou Dong-Ming, Yi Xin-Yuan, Zeng Xian-Fang, Wang Min, Cai Chun, Wang Qing-Lin, Zhang Shun-Ke, McReynolds Larry - Cloning, Expression And Immunization Of The New Antigen Gene *Sj-Ts4* of *Schistosoma japonicum* ACTA BIOCHIMICA et BIOPHYSICA SINICA 2002, 34(2): 143-148

8.1 ANEXO I: Tabela de genes diferencialmente expressos em esquistossômulos cultivados por 12 horas em presença de soro portal de hamster

Gene identifier	Description	Adj. P-value	Fold Change
Smp_002150_1	trypsin-like serine protease Mastin	7.99E-04	2.92
Smp_070020_1	rhopty associated membrane antigen	1.47E-03	2.91
Smp_042400_1	arginine rich, mutated in early stage tumors	1.61E-03	2.86
Smp_030300_3	endoplasmic	3.17E-10	2.8
Smp_157070_1	cysteine rich with egf domains protein	1.67E-03	2.76
Smp_134570_1	hypothetical protein	2.10E-05	2.7
Smp_030300_4	endoplasmic	2.01E-08	2.64
Smp_024390_3	microsomal signal peptidase 25 kDa subunit	4.02E-03	2.64
Smp_088950_1	Hypoxia up regulated protein	5.87E-04	2.64
Smp_049550_1	78 kDa glucose regulated protein	1.57E-06	2.61
Smp_130260_1	hypothetical protein	6.41E-03	2.6
Smp_024390_1	microsomal signal peptidase 25 kDa subunit	3.99E-03	2.58
Smp_172110_1	protein disulfide isomerase A6	2.09E-06	2.4
Smp_095400_1	hypothetical protein	1.54E-02	2.36
Smp_024390_2	microsomal signal peptidase 25 kDa subunit	1.75E-02	2.33
Smp_059480_1	tryparedoxin peroxidase	4.47E-03	2.32
Smp_202980_1	hypothetical protein	2.85E-02	2.29
Smp_030370_1	calreticulin	5.01E-09	2.24
Smp_042140_1	tegument-allergen-like protein	4.34E-03	2.23
Smp_148790_1	laminin subunit beta 1	3.77E-02	2.21
Smp_007450_1	heat shock protein 67b2 protein disulfide-isomerase ER-60 precursor	6.41E-03	2.18
Smp_079770_2		2.85E-04	2.17
Smp_177040_1	gpi mannosyltransferase 2	9.39E-04	2.16
Smp_204760_1	Asparagine rich protein	4.85E-02	2.14
Smp_083080_2	Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase	1.10E-04	2.12
Smp_063330_1	hypothetical protein	2.92E-02	2.12
Smp_027990_1	homeobox protein nk 2 protein disulfide-isomerase ER-60 precursor	5.74E-03	2.11
Smp_079770_1		7.63E-04	2.09
Smp_089000_1	translocon associated protein subunit delta	2.73E-02	2.05
Smp_155510_1	transmembrane protein 66	2.87E-03	2.05
Smp_103560_1	hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase	4.27E-02	2.05
Smp_079230_1	immunophilin FK506 binding protein FKBP12	4.68E-02	2.03
Smp_079420_1	ankyrin repeat domain containing protein 42	5E-02	2.02
Smp_042790_1	dolichol phosphate mannosyltransferase	5E-02	2.02
Smp_019060_1	sec61 beta subunit	1.67E-03	2.01
Smp_097380_1	heat shock 10 kDa protein 1	2.03E-03	2
Smp_004780_3	immunophilin	2.85E-02	1.99
Smp_020800_1	cysteine and histidine rich domain containing protein	2.01E-02	1.99
Smp_024370_1	hypothetical protein	2.48E-02	1.97
Smp_004780_2	immunophilin	5.74E-03	1.96
Smp_011270_1	sj ts4 protein	3.27E-02	1.95
Smp_157360_1	E3 ubiquitin protein ligase synoviolin B	3.27E-02	1.9
Smp_079310_1	transmembrane emp24 domain containing protein	2.16E-02	1.89
Smp_176200_2	superoxide dismutase [Cu-Zn]	2.92E-02	1.88
Smp_083080_1	Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase	3.58E-03	1.88
Smp_004780_1	immunophilin	2.46E-02	1.87
Smp_011700_1	proto oncogene tyrosine protein kinase ROS	4.86E-04	1.84
Smp_059350_1	der1 protein derlin	5E-02	1.84
Smp_157940_1	Nuclear inhibitor of protein phosphatase 1	4.55E-02	1.83
Smp_011690_1	proto oncogene tyrosine protein kinase ROS	3.82E-02	1.83
Smp_032760_1	ribosomal protein S11	2.01E-02	1.74
Smp_119920_1	ribosomal protein S16	7.54E-03	1.74
Smp_210370_1	ormdl protein	2.23E-02	1.72
Smp_031570_1	ribosomal protein L18	2.46E-02	1.71

8.1 ANEXO I: Tabela de genes diferencialmente expressos em esquistossômulos cultivados por 12 horas em presença de soro portal de hamster

Gene identifier	Description	Adj. P-value	Fold Change
Smp_167230_1	golgi resident protein gcp60	2.85E-02	1.7
Smp_072950_1	Transmembrane emp24 domain containing protein 4	5.19E-03	1.69
Smp_064860_1	stress induced phosphoprotein 1	3.30E-02	1.69
Smp_092810_1	transmembrane protein 33	3.24E-02	1.68
Smp_194090_1	subfamily S1A unassigned peptidase	3.30E-02	1.65
Smp_124820_1	chromosome region maintenance protein	2.12E-02	1.65
Smp_171190_1	MEG-8 family	1.78E-02	1.64
Smp_090120_2	alpha tubulin	3.28E-02	1.61
Smp_207010_1	signal recognition particle 72 kDa subunit	1.31E-02	1.57
Smp_009310_1	plasminogen activator inhibitor 1 RNA binding peptidyl prolyl cis trans isomerase B	1.32E-02	1.51
Smp_040790_1		2.97E-02	1.49
Smp_210780_1	Loss of heterozygosity 11 chromosomal region 2	4.26E-02	0.73
Smp_078160_1	RB1 inducible coiled coil protein 1	4.68E-02	0.69
Smp_123320_1	chromodomain helicase DNA binding protein e3 ubiquitin protein ligase ubr2	9.25E-03	0.68
Smp_176060_1		4.98E-03	0.63
Smp_179660_1	hypothetical protein	2.85E-02	0.62
Smp_171720_1	lipid phosphate phosphohydrolase 1	4.27E-02	0.62
Smp_123260_1	AN1 type zinc finger and ubiquitin	7.99E-04	0.62
Smp_012720_1	hypothetical protein	3.58E-03	0.61
Smp_024900_1	retinoblastoma protein 1	2.46E-03	0.61
Smp_014400_6	enhancer of polycomb	2.86E-02	0.6
Smp_043030_1	hexokinase	2.48E-02	0.6
Smp_145080_1	hypothetical protein	2.86E-03	0.6
Smp_032280_1	RNA binding protein MEX3B	1.78E-03	0.6
Smp_081450_1	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase	2.39E-02	0.59
Smp_126510_1	hypothetical protein	4.06E-02	0.57
Smp_094890_1	hypothetical protein	2.58E-03	0.57
Smp_169040_1	lysophospholipid acyltransferase 5	1.42E-02	0.56
Smp_153290_1	cement protein 3B variant 3	2.85E-02	0.56
Smp_090890_1	proto oncogene serine:threonine protein kinase	8.74E-05	0.56
Smp_071380_2	zinc finger protein	3.21E-02	0.56
Smp_073340_1	cyclin dependent kinase 5	2.16E-02	0.56
Smp_150030_1	hypothetical protein	3.59E-02	0.55
Smp_133830_1	hypothetical protein	7.16E-04	0.53
Smp_159090_1	hypothetical protein	2.69E-02	0.52
Smp_052230_1	Papilin	4.02E-03	0.52
Smp_180810_1	Papilin	4.79E-07	0.51
Smp_180690_1	tiptop protein	3.45E-02	0.51
Smp_135710_1	forkhead box protein K1	1.31E-02	0.51
Smp_136310_1	sodium bile acid cotransporter	2.85E-02	0.49
Smp_053420_1	fermitin family 1	7.16E-04	0.49
Smp_007270_1	smoothelin	4.34E-03	0.49
Smp_037610_1	hypothetical protein	3.08E-02	0.49
Smp_121940_1	FERM domain containing protein 5	6.41E-03	0.49
Smp_159620_1	BTB:POZ domain containing protein KCTD20	5.20E-11	0.47
Smp_176110_1	hypothetical protein	4.40E-03	0.47
Smp_175790_1	phospholipid translocating ATPase	7.63E-04	0.42
Smp_004590_1	hypothetical protein	5.12E-05	0.37
Smp_145540_1	muscarinic acetylcholine receptor	7.16E-04	0.34

Genes diferencialmente expressos com valor de p-ajustado <0.05.

8.2 ANEXO II: Artigo aceito para publicação referentes aos dados da comparação entre esquistossômulos Mec versus Pel e MIG

The skin migratory stage of the schistosomulum of *Schistosoma mansoni* has a surface showing greater permeability and activity in membrane internalisation than other forms of skin or mechanical schistosomula

WANDER DE JESUS JEREMIAS¹, JOSE RENAN DA CUNHA MELO²,
ELIO HIDEO BABA¹, PAULO MARCOS ZECH COELHO¹
and JOHN ROBERT KUSEL^{3*}

¹ *Laboratory of schistosomiasis, Rene Rachou, Fiocruz, 1715 Augusto de Lima, Belo Horizonte, 30190-002 MG, Brazil*

² *Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil*

³ *Centre for Open Studies, Glasgow University, Glasgow, UK*

(Received 7 January 2015; revised 4 March 2015; accepted 5 March 2015)

SUMMARY

Skin schistosomula can be prepared by collecting them after isolated mouse skin have been penetrated by cercariae *in vitro*. The schistosomula can also migrate out of isolated mouse skin penetrated by cercariae *in vitro* and from mouse skin penetrated by cercariae *in vivo*. Schistosomula can also be produced from cercariae applied through a syringe or in a vortex. When certain surface properties of the different forms of schistosomula were compared, those migrating from mouse skin penetrated by cercariae *in vivo* or *in vitro* had greatly increased permeability to membrane impermeant molecules such as Lucifer yellow and high molecular weight dextrans. These migrating forms also possessed surfaces which showed greatly enhanced uptake into internal membrane vesicles of the dye FM 143, a marker for endocytosis. This greatly enhanced activity and permeability of the surfaces of tissue migrating schistosomula is likely to be of great importance in the adaptation to the new host.

Key words: Schistosomula, surface membrane, permeability, endocytosis.

INTRODUCTION

When the cercaria (*Schistosoma mansoni*) penetrates the skin of the host, transformations occur in the membrane (Hockley and McLaren, 1973) and the acetabular glands and their secretions (Stirewalt, 1974; Curwen *et al.* 2006). The schistosomulum which is produced during this process is the object of much research in vaccine preparation and drug development. For such research, large numbers of this stage of the parasite can be produced by mechanical methods rather than penetration through the skin, but it is not certain that the mechanical forms are equivalent in all properties to those from the skin. Brink *et al.* (1977) concluded that they were equivalent in most properties. Protasio *et al.* (2013) has carried out a precise documentation of the difference in the transcriptome between those parasites (schistosomula) that have been prepared artificially (mechanically transformed schistosomula, MECH) and those that have been formed by penetration through the skin held in an *in vitro* system (skin penetrated schistosomula, PEN). The major differences between the two forms are the presence in the skin penetrated forms of more active

mitochondria. In the work described here, we have compared these two forms of schistosomula, termed PEN and MECH for skin penetrated and mechanically transformed schistosomula respectively, with another stage, the schistosomula that remain in the skin, called the migratory stage (MIG). In a natural infection, such forms often reside in the skin for up to 3 days (Barbosa *et al.* 1978; Crabtree and Wilson, 1985). Such forms have been studied for parasite permeability and in membrane internalization processes. The considerable differences that have been found in the surface membrane may have important implications for host-parasite communication.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Swiss mice weighing between 30 and 40 g were used. All procedures involving animals were approved by the local Ethics Commission on Animal Use (CEUA) from Fiocruz (LW42/10).

Cercariae

Cercariae were obtained from *S. mansoni* infected *Biomphalaria glabrata* reared and maintained in the

* Corresponding author. Centre for Open Studies, Glasgow University, Glasgow, UK. E-mail: john.kusel@glasgow.ac.uk

Table 1. List of probes to investigate intracellular organelles and membranes

Fluorescent probe	Specificity	Final concentration with schistosomula
Lysotracker red (cat # L7528)	Lysosome	40 ng mL ⁻¹
Mitotracker red (cat # M7512)	Mitochondria	50 ng mL ⁻¹
Monochlorobimane (cat # M1381MP)	Glutathione	100 ng mL ⁻¹
Monodansylcadaverine (cat #30432)	Autophagosome	20 ng mL ⁻¹
FM 143 (cat # F35355)	Membrane internalization	5 µg mL ⁻¹

References: Lysotracker red (Al-Adhami *et al.* 2005); Mitotracker red (Poot *et al.* 1997); Monochlorobimane (Ribeiro *et al.* 1998a, b); Monodansylcadaverine (Al Adhami *et al.* 2005); FM 143 (Ribeiro *et al.* 1998a, b).

Mollusc room, Lobato Paraense, in Research Centre Rene Rachou/FIOCRUZ. The strain of *S. mansoni* used in these studies was the LE strain.

Production of schistosomula: In vitro

Apparatus designed by Clegg (1965) as recently described by Protasio *et al.* (2013) was used with skin samples derived from freshly sacrificed mice. Skin withdrawn from one mouse was used for four penetration chambers. Schistosomula were collected over a period of 2 h and designated penetrated forms (PEN).

Cercariae were placed on the skin and after 2 h the skin from the apparatus was removed and chopped into small pieces with scissors and incubated in RPMI medium for 2 h, during which time schistosomula trapped in the skin migrated out of the skin snips held in a cell strainer (BD Falcon). These were termed migratory forms (MIG). In some experiments the skin was retained after the exposure to cercariae and was given an intradermal injection of fluorescent dye before being chopped into small pieces as described above. Schistosomula were collected from the cell strainer as described above and examined, after washing, in the fluorescence microscope.

Schistosomula were produced mechanically by the method of Colley and Wikel (1974), and by the vortex procedure (Ramalho-Pinto *et al.* 1974) after concentrating the cercariae on ice. These have been termed mechanical forms (MECH).

Fluorescent dyes

Probes to investigate membrane permeability. We were investigating whether membrane-impermeant molecules could enter the parasite after skin penetration, skin residence and skin migration and we chose the following compounds to do this: Lucifer Yellow CH lithium and potassium salt, molecular weight 457 Da (cat number: L-453), purchased from Invitrogen (Life Technologies do Brasil Ltda, Sao Paulo); Fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled dextrans of molecular weights, 10 kDa (Sigma-Aldrich cat number: FD10S) 20 kDa (Sigma-Aldrich cat number: FD20S) and 40 kDa (Molecular Probe/Life Technologies cat number: D-1844). All fluorescent chemicals are water soluble and were

dissolved (1 mg mL⁻¹) in RPMI 1640 medium (Gibco/Life Technologies cat number: 31800-022). Lucifer Yellow CH is a membrane-impermeant compound (Peracchia, 1981), with a structure that enables it to be aldehyde fixed into tissues with which it comes into contact (Heinrichs, 1985).

Fluorescent dextrans (Fl dextrans) are often used to assess membrane integrity and to examine membranes for the sizes of membrane pores (Shimizu and Kawazoe, 1996).

Probes for intracellular organelles and membranes. The dyes used to stain specific organelles in the schistosomula are described in Table 1. These probes were incubated with schistosomula in 1 mL RPMI for 1 h at the concentrations shown. After incubation the schistosomula were washed three times in RPMI and examined under the fluorescence microscope.

Migrating schistosomula in living mice

Mice were anaesthetized with sodium pentobarbital (Hypnol) (40 mg kg⁻¹) and infected with 1000 cercariae over a period of 30 min.

After recovery the mice were housed for 24 and 48 h. Euthanasia was achieved by cervical dislocation, the region of skin penetrated by cercariae 24 or 48 h previously was injected (intradermal route) with Lucifer yellow or FITC-dextrans and the skin removed after 15 min and cut with scissors into small pieces about 4 mm square (snips). Schistosomula were recovered from the excised skin by incubating skin snips in RPMI in a cell strainer (BD Falcon) placed in a six-well plate. The schistosomula were washed with RPMI three times and observed by fluorescent microscopy.

Control incubations with skin

To investigate whether the presence of cut skin alone rather than the requirement to migrate in skin, was responsible for the alterations seen in the permeability and endocytosis of the schistosomula from skin, the uptake of fluorescent dextrans, Lucifer yellow or FM 143 was observed in MECH in the presence of mouse skin. The skin was cut into small pieces in the same manner as for the work with migrating

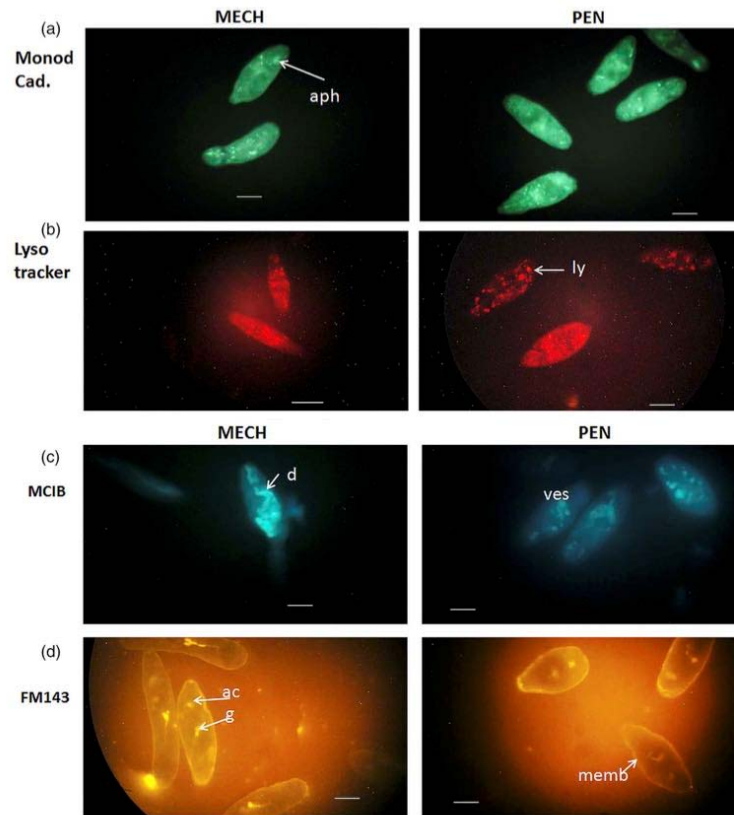


Fig. 1. Interaction of mechanical (MECH) and skin penetrated (PEN) schistosomula with fluorescent dyes of various specificities. Size bar: 50 μm . (a) Monodansylcadaverine (monodcad.). Schistosomula were incubated *in vitro* with monodansylcadaverine (20 ng mL^{-1}). Specific intense blue/green staining of autophagosomes: aph; (b) lysotracker red. Schistosomula incubated in lysotracker red (40 ng mL^{-1}). Lysosome vesicles containing red dye (ly); (c) monochlorobimane (MCIB) MECH. gl glutathione rich regions are remains of penetration glands (pre-acetabular gland duct(d) visible) PEN remains of penetration glands ves. glutathione rich vesicles; (d) FM 143 schistosomula incubated in FM 143 (5 mg mL^{-1}). There is some background fluorescence. Dye localized in surface membrane (memb) gut (g) and acetabulum (ac); (e, f) schistosomula incubated in mitotracker red (50 ng mL^{-1}) (e) low magnification to show whole bodies of all schistosomula labelled with dye. (f) General staining of schistosomula except some dark regions in MECH; (g, h) schistosomula incubated in FM143 (g) to show gut (g) and oesophagus (o) labelling and Fl dextrans (h) to show gut labelling. No differences between MECH and PEN are observed. Size bar 50 μm in (g) and 80 μm in (h).

schistosomula as the result of infection, and MECH added to the pieces in a 15 mL Falcon tube, in the presence of RPMI and the relevant dye, at 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Dextrans and Lucifer yellow) and 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (FM143). After incubation for 1 h at 37 $^{\circ}\text{C}$ the mixture was placed in a cell strainer in 5 mL RPMI in a Falcon six-well plate. The results from this experiment are described in the results section below (Fig. 2e and f).

Fixation of schistosomula

Labelled schistosomula were fixed at 4 $^{\circ}\text{C}$ for 4 h in 4% paraformaldehyde. The 4% paraformaldehyde

was prepared by dissolving the powder (Sigma) in RPMI 1640 at 60 $^{\circ}\text{C}$.

Examination of parasites by fluorescence microscopy

All labelled parasites were viewed and photographed using a Zeiss microscope. This allowed the variability of the labelling of the parasite population to be observed, counted and recorded. Photographs were taken after observation of the parasites under the 10 \times and 40 \times objectives with a Cannon digital camera. For photography movement of the parasite was slowed by the application to the slide of sodium pentobarbitol effected (10 mL of 1 mg mL^{-1})

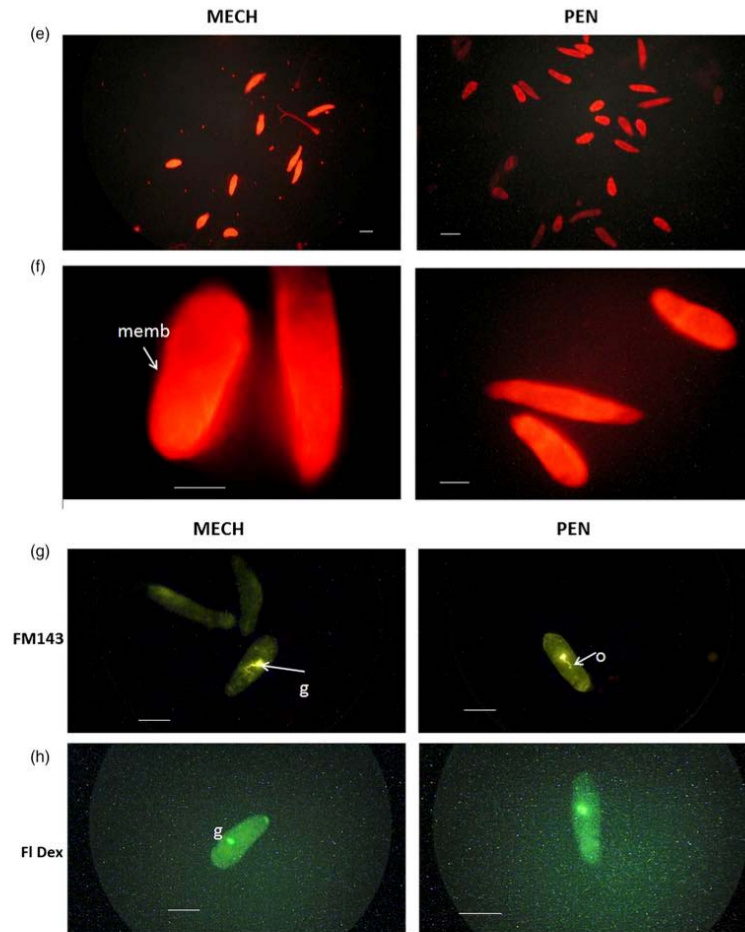


Fig. 1. (Continued)

RESULTS

Labelling of parasites in vitro

Detection of intracellular organelles in schistosomula. Examples of the staining of mechanically transformed (MECH) and skin transformed (PEN) schistosomula are shown in Fig. 1.

Auto-phagosomes and lysosomes. When skin PEN and MECH were compared, both forms showed strong labelling of autophagosomal vesicles (aph) by monodansylcadaverine (Fig. 1a) and of lysosomes (ly) by lysotracker red (Fig. 1b). The distribution of both kinds of organelle is very similar in MECH and PEN.

Glutathione rich regions. These were stained by monochlorobimane (Fig. 1c) and represent remnants of the penetration glands. These have been previously shown to be rich in glutathione (Ribeiro *et al.* 1998a, b). The regions appeared as vesicular structures and were strongly evident in MECH (Fig. 1c) and were still strongly evident in PEN (Fig. 1c). It is surprising to find these regions in PEN forms, since the penetration glands are evacuated during penetration (Stirewalt, 1974). Fragments forming vesicles persist for some time after penetration.

Surface membrane. When schistosomula were incubated with FM 143, the surface membrane (memb) was uniformly labelled and the gut (g) and

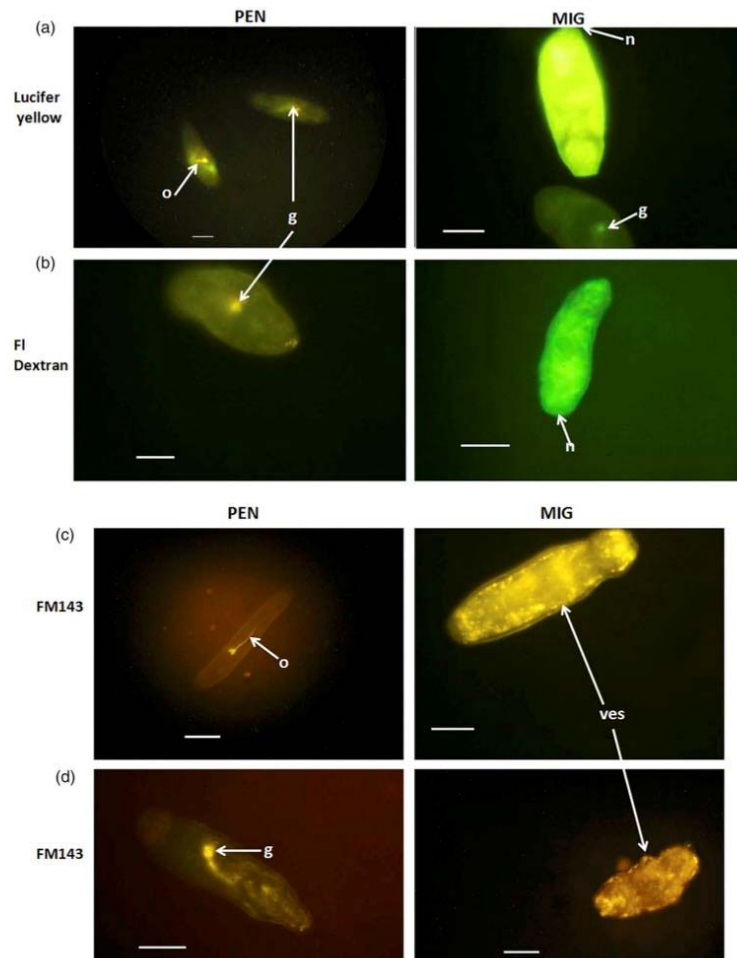


Fig. 2. Interaction of PEN and schistosomula which have resided in the skin of mice (MIG) for 24 h with membrane impermeant and membrane internalization dyes. Size bar 50 μm . (a) PEN Schistosomula were incubated with Lucifer yellow (100 mg mL^{-1}). The dye is found in the gut (g) and oesophagus (o) but not in the tissues of the parasite. MIG schistosomula migrated from skin exposed to Lucifer yellow. The dye has entered most of the tissues of the parasite; (b) PEN Schistosomula were incubated in fluorescent dextrans (FI dextrans) of mol. wt. 10–40 kDa. Only the results for 10 kDa are shown as representative of all these dextrans. The dye has entered the gut but not the tissues of the schistosomulum. MIG schistosomula migrated from skin exposed to FI dextrans. The schistosomulum is representative of all dextrans, and the dye has entered most of the tissues of the parasite. n, position of nephridiopore; (c, d) PEN schistosomula were incubated with FM 143 ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$). The dye has stained the surface membrane and entered the gut (g) and oesophagus (o), but little is found in the tissues of the parasite. (c, d) MIG schistosomula migrated from the skin exposed to FM 143. The schistosomulum shows numerous internal labelled vesicles (ves). In (d) MIG, the vesicles could withstand gentle crushing under the coverslip (ves); (e) schistosomula prepared mechanically (MECH), and MECH in the presence of skin (MECH skin). These were incubated in the presence of Lucifer yellow. No effect of skin on MECH forms was seen (g gut) The MIG forms show intense internal labelling Size bar is 50 μm ; (f) schistosomula prepared mechanically (MECH), and MECH in the presence of skin (MECH skin). These were incubated in the presence of FM 143. No effect of skin on MECH forms was seen. The MIG schistosomula show great surface membrane internalization and intense internal labelling (n, position of nephridiopore). Size bar is 50 μm ; (g) schistosomula to show internal organelles. Top left, 1 MECH monodansylcadaverine, aph autophagosome; top right, 2 MECH lysotracker, lys lysosomes; bottom right, 3 MECH Monchlorobimane, ves. glutathione rich vesicles; bottom right, 4 MIG FM 143, ves. endosomal vesicles.

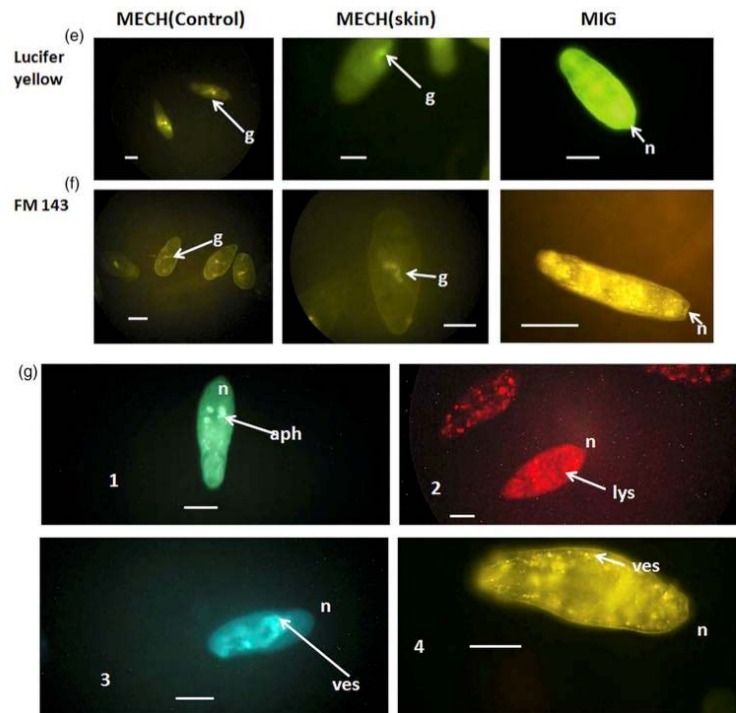


Fig. 2. (Continued)

mitochondria. These mitochondrial transcripts were elevated in the skin penetrated forms (PEN) and after 24 h in culture had increased oxidative activity (shown by a colorimetric assay) when compared with the MECH forms.

In the work described here, fluorescent dyes have been used to examine a variety of properties of PEN and MECH. The majority of dyes showed very similar staining patterns in both MECH and PEN (Fig. 1a–f). The staining by the mitochondria specific dye, mitotracker, showed no difference in staining pattern between the two forms, except that the presence of the pre-acetabular glands in MECH indicated a space unfilled with mitochondria. The differences in quantity or activity of mitochondria suggested by Protasio *et al.* (2013) might be detected by this dye using quantitative methods and confocal microscopy in further work. The staining patterns for the other dyes showed no clear differences between MECH and PEN.

While working on penetration of cercariae of human skin in the Clegg apparatus (Clegg, 1965; Protasio *et al.* 2013), (results not shown) we noticed that large numbers of schistosomula were retained in the skin. We decided to investigate the

interaction of certain membrane permeability and interactive dyes with what we called the migrating forms (MIG), since such forms can be retained in the skin of infected mice for up to 72 h (Barbosa *et al.* 1978; Crabtree and Wilson, 1985). We compared those schistosomula migrating from the skin (skin derived forms, MIG) with those collected after penetrating through the skin (PEN). The schistosomula that had resided in the skin of the living mouse for 24 h were treated in a manner similar to that described by Thornhill *et al.* (2010). These workers had injected fluorescent dyes measuring membrane permeability into the skin in the path of penetrating cercariae. The schistosomula emerging from excised skin were all very distinctively labelled within the body. Lucifer yellow uptake from *in vitro* and MIG is shown in Fig. 2a. Figure 2b shows uptake of fluorescent dextrans. Thus the permeability increase found in 24 h schistosomula is a feature of the schistosomula migrating in the skin. The increase in permeability was also seen after 48 h in the skin (results not shown). This means that during prolonged residence in the skin for up to 48 h and possibly up to 72 h (Barbosa *et al.* 1978; Crabtree and Wilson, 1985) there may be constant

access to host and parasite molecules. This may represent a novel host–parasite interface.

The dye FM 143 (Fig. 2c, d) has been used in studies with schistosomes by Ribeiro *et al.* (1998a, b). In the current work, when FM 143 was injected into the skin site after an infection of mice with cercariae 24 h previously, the schistosomula recovered were very heavily labelled in all parts of the body (Fig. 2c, d). This suggests that very active endocytosis and membrane turnover is occurring during the residence in and migration through the skin. This rapid internalization and turnover may explain the great permeability of the surface to Lucifer Yellow and fluorescent Dextran while the parasites are in the skin. The effects of the skin are very evident in the experiments reported here. Three days schistosomula *in vitro* culture (Parker-Manuel *et al.* 2011) have been shown to have a number of upregulated genes and it would be interesting to compare these results with schistosomula derived from skin at this time after infection.

It is unclear what is the specific influence of the skin on the parasite permeability and endocytosis. The presence of linoleic acid in the skin has been suggested to act either on the lipids of the membrane itself (Haas, 1984; Haeberlein and Haas, 2008) or indirectly on the neutral sphingomyelinase stimulated by the unsaturated fatty acids in the skin (El Ridi and Tallima, 2006). A number of other factors such as pressure on the surface membrane or nervous stimuli during migration could be involved. The complexity of the whole parasite is such that several factors may be involved in the increase in permeability and endocytosis.

In the work presented here, the schistosomulum appears to possess a surface metabolism much more active than when this is measured *in vitro*. We can suggest that during migration of the schistosomulum over a period of up to 72 h in the skin the very rapid activities detected by the dye FM 143 may lead to the very extensive turnover of surface and internal antigens leading to enhanced release of immunogens (Fonseca *et al.* 2012). The rapid internalization processes observed with FM 143 might be driven by the increase in mitochondrial activity reported by Protasio *et al.* (2013). Moreover, the increased permeability of the parasites to molecules up to 40 kDa molecular weight may allow uptake of cytokines, such as IL7 (Wolowczuk *et al.* 1999) which by its effect on cell signalling and protein synthesis, might enhance the growth of the parasite. All these activities of the surface may increase the ability of the parasite to evade immune responses but paradoxically may make it more immunogenic, as it deposits surface and internal antigens, particularly seen when the irradiated cercariae are used for infection (Ganley-Leal *et al.* 2005; Kumkate *et al.* 2007). Our observations may explain the results of Pearce *et al.*

(1986). These ideas can be tested (a) by examination of skin, in which schistosomula are migrating, for immunogens such as tetraspanin and SM 29 (Fonseca *et al.* 2012) or (b) by an adaptation of the methods used by Paveley *et al.* (2009) in which a fluorescent label might be attached to surface membrane molecules of living schistosomula prior to migration in skin.

The relevance of these profound effects of the skin tissue on permeability and internalization processes in the life of the parasite is that the emphasis on the surface as a host–parasite interface may be misleading. Such large molecules from host or parasite may stimulate signalling pathways within the parasite. The nature of such pathways might be elucidated in small numbers of parasites by the methods of Walker *et al.* (2014) using the confocal microscope and with larger numbers by the methods used by Protasio *et al.* (2013) using RNASeq methods. Both approaches might be extended to the MIG forms, since new pathways might be evident after the increase in membrane permeability and membrane activity while they are resident in the skin, which were not revealed in other forms of schistosomula.

ACKNOWLEDGEMENTS

Liana and the staff of the Lobato Paraense snail room for provision of cercariae. Roberta Caldeira for advice. Neveiton and Jose and Rosangela from Bioteria for support. Diana for preparing various solutions and culture media. Vera, Flavia, Ana-Carolina, Aureo, Neusa, Fabio, Clarice, and Kika for encouragement. We are very grateful to Mrs Alison Sage for advice and help during the submission of the manuscript.

FINANCIAL SUPPORT

The CAPES for financial support through the ‘Science without Borders’ programme. CAPES agency No: 402549/2012-0.

REFERENCES

- Al-Adhami, B. H., Noble, C., Sharaf, O., Thornhill, J., Doenhoff, M. J. and Kusel, J. R. (2005). The role of acidic organelles in the development of schistosomula of *Schistosoma mansoni* and their response to signalling molecules. *Parasitology* **130**, 309–322.
- Barbosa, M. A., Pellegrino, J., Coelho, P. M. Z. and Sampaio, I. B. M. (1978). Quantitative aspects of the migration and evolutive asynchronism of *Schistosoma mansoni* in mice. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* **20**, 121–132.
- Brink, L. H., McLaren, D. J. and Smithers, S. R. (1977). *Schistosoma mansoni*: a comparative study of artificially transformed schistosomula and schistosomula recovered after cercarial penetration of isolated skin. *Parasitology* **74**, 73–86.
- Clegg, J. A. (1965). *In vitro* cultivation of *Schistosoma mansoni*. *Experimental Parasitology* **16**, 133–147.
- Colley, D. G. and Wikel, S. K. (1974). *Schistosoma mansoni*: a simplified method for production of schistosomules. *Experimental Parasitology* **35**, 44–56.
- Crabtree, J. E. and Wilson, R. A. (1985). *Schistosoma mansoni*: an ultrastructural examination of skin migration in the hamster cheek pouch. *Parasitology* **91**, 111–128.

- Curwen, R. S., Ashton, P. D., Sundaralingam, S. and Wilson, R. A. (2006). Identification of novel proteases and immunomodulators of secretions of schistosome cercariae that facilitate host entry. *Molecular and Cell Proteomics* 5, 835–844.
- El Ridi, R. and Tallima, H. (2006). Equilibrium in lung stage schistosomula sphingomyelin synthesis and breakdown allows very small molecules but not antibody to access proteins at the surface of the host–parasite interface. *Journal of Parasitology* 92, 730–737.
- Fonseca, C. T., Carvalho, G. B. F., Alves, C. C. and deMelo, T. T. (2012). *Schistosoma* tegument proteins in vaccine and diagnosis development: an update (2012). *Journal of Parasitology Research* 2012, Article ID 541268, 8 <http://dx.doi.org/10.1155/2012/541268>
- Ganley Leal, L. L., Guarner, J., Todd, C. W., Da'Dara, A. A., Freeman, G. L., Boyer, A. E., Harn, D. A. and Secor, W. E. (2005). Comparison of *Schistosoma mansoni* irradiated cercariae and Sm23 DNA vaccines. *Parasite Immunology* 27, 341–349.
- Haas, W. (1984). *Schistosoma mansoni*: Cercaricidal effect of 2-tetradecenoic acid, a penetration stimulant. *Experimental Parasitology* 58, 215–222.
- Haberlein, S. and Haas, W. (2008). Chemical attractants of human skin for swimming *Schistosoma mansoni* cercariae. *Parasitology Research* 102, 657–662.
- Heinrichs, S. (1985). Differential retrograde labelling with horseradish peroxidase (HRP) and Lucifer yellow (LY) in an invertebrate nervous system – HRP fluorescence and LY preservation limit choice of fixative. *Journal of Neuroscience Methods* 15, 85–93.
- Hockley, D. J. and McLaren, D. J. (1973). *Schistosoma mansoni*: changes in the outer membrane of the tegument during development from cercaria to adult worm. *International Journal of Parasitology* 3, 13–25.
- Kumkate, S., Jenkins, G. R., Paveley, R. A., Hogg, K. G. and Mountfor, A. P. (2007). CD207+ Langerhans cells constitute a minor population of skin-derived antigen-presenting cells in the draining lymph node following exposure to *Schistosoma mansoni*. *International Journal of Parasitology* 37, 209–220.
- Parker-Manuel, S. J., Ivens, A. C., Dillon, G. P. and Wilson, R. A. (2011). Gene expression patterns in larval *Schistosoma mansoni* associated with infection of the mammalian host. *Plos Neglected Tropical Diseases* 5, e1274.
- Paveley, R. A., Aynsley, S. A., Cook, P. C., Turner, J. D. and Mountford, A. P. (2009). Fluorescent imaging of antigen released by a skin-invasive helminth reveals differential uptake and activation profiles by antigen presenting cells. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3, e528.
- Pearce, E. J., Basch, P. F. and Sher, A. (1986). Evidence that the reduced surface antigenicity of developing *Schistosoma mansoni* schistosomula is due to antigen shedding rather than host molecule acquisition. *Parasite Immunology* 8, 79–94.
- Peracchia, C. (1981). Direct communication between axons and sheath glial cells in crayfish. *Nature* 290, 597–598.
- Poot, M., Gibson, L. L. and Singer, V. L. (1997). Detection of apoptosis in live cells by MitoTracker red CMXRos and SYTO dye flow cytometry. *Cytometry* 27, 358–364.
- Protasio, A., Dunne, D. and Berriman, M. (2013). Comparative studies of transcriptome profiles of *in vitro* (mechanical) transformed and skin schistosomula. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7, e2091.
- Ramvalho-Pinto, F. J., Gazzinelli, G., Howells, R. E., Mota-Santos, T. A., Figueiredo, E. A. and Pellegrino, J. (1974). *Schistosoma mansoni*: defined system for stepwise transformation of cercaria to schistosomule *in vitro*. *Experimental Parasitology* 36, 360–372.
- Ribeiro, F., Coelho, P. M., Vieira, L. Q., Powell, K. and Kusel, J. R. (1998a). Membrane internalization processes in different stages of *Schistosoma mansoni* as shown by a styryl dye (Frei Mao 1–43). *Parasitology* 116, 51–59.
- Ribeiro, F., Coelho, P. M. Z., Vieira, L. Q., Watson, D. G. and Kusel, J. R. (1998b). The effect of praziquantel treatment on glutathione concentration in *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 116(Pt3), 229–236.
- Shimizu, N. and Kawazoe, Y. (1996). A new method for permeabilization of the plasma membrane of cultured mammalian cells. III. Internalization of fluorescent dextrans into cultured mammalian cells by vortex-stirring in the presence of high molecular weight polyacrylic acid. *Biological and Pharmacological Bulletin* 19, 1023–1025.
- Stirewalt, M. A. (1974). *Schistosoma mansoni*: cercaria to schistosomule. *Advances in Parasitology* 12, 115–182.
- Thornhill, J. A., McVeigh, P. A., Jurberg, A. D. and Kusel, J. R. (2010). Pathways of influx of molecules into cercariae of *Schistosoma mansoni* during skin penetration. *Parasitology* 137, 1089–1109.
- Walker, A. J., Ressurreição, M. and Rothermel, R. (2014). Exploring the function of protein kinases in schistosomes: perspectives from the laboratory and from comparative genomics. *Frontiers in Genetics* 5, 229.
- Wolowczuk, I., Nutten, S., Roye, O., Delacre, M., Capron, M., Murray, R. M., Trottein, F. and Auriault, C. (1999). Infection of mice lacking interleukin-7 (IL-7) reveals an unexpected role for IL-7 in the development of the parasite. *Schistosoma Mansoni Infection and Immunity* 67, 4183–4190.