



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

NAIROMBERG CAVALCANTI PORTELA JUNIOR

ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA E PROTEÔMICA DA RESPOSTA IMUNE
PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA DE *Biomphalaria straminea* EXPOSTOS AO *Schistosoma*
mansoni

Recife

2021

NAIROMBERG CAVALCANTI PORTELA JUNIOR

**ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA E PROTEÔMICA DA RESPOSTA IMUNE
PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA DE *Biomphalaria straminea* EXPOSTOS AO *Schistosoma
mansoni***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Biologia Aplicada a Saúde, Universidade
Federal de Pernambuco como pré-requisito para a
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadores: Dr. Luiz Carlos Alves

Coorientadores: Dr. Fábio André Brayner dos
Santos e Dra. Ana Paula Sampaio Feitosa

Recife

2021

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Portela Junior, Nairomberg Cavalcanti

Análise transcriptômica e proteômica da resposta imune primária e secundária de *Biomphalaria straminea* expostos ao *Schistosoma mansoni* / Nairomberg Cavalcanti Portela Junior - 2021.

86 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Luiz Carlos Alves

Coorientadores: Fábio André Brayner dos Santos

Ana Paula Sampaio Feitosa

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada a Saúde. Recife, 2021.

Inclui referências.

1. *Biomphalaria straminea* 2. *Schistosoma mansoni* 3. Proteômica
I. Alves, Luiz Carlos (Orientador) II. Santos, Fábio André Brayner dos
(Coorientador) III. Feitosa, Ana Paula Sampaio (Coorientadora) IV. Título

594.3

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2022-032

NAIROMBERG CAVALCANTI PORTELA JUNIOR

**ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA E PROTEÔMICA DA RESPOSTA IMUNE
PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA DE *Biomphalaria straminea* EXPOSTOS AO *Schistosoma
mansoni***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Biologia Aplicada a Saúde, Universidade
Federal de Pernambuco como pré-requisito para a
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 30/08/2021

BANCA EXAMINADORA

Prof Dr. Luiz Carlos Alves (Orientador)
Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ)

Prof. Dra. Danyelly Bruneska Gondim Martins (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof Dra. Dra. Tatiany Patricia Romão Pompílio de Melo (Examinador Externo)
Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ)

Prof. Dra. Valéria Wanderley Teixeira (Examinador Externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

Prof. Dr. Tercilio Calsa Junior (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Aos meus pais, por tudo que fizeram e fazem por mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus ou qualquer outra força universal que me acompanhou e ainda me rege, principalmente nos tempos mais difíceis.

Agradeço aos meus pais e minha família, por todos os momentos que acreditaram e foram um porto seguro durante toda a vida.

Agradeço aos meus orientadores, Luiz, Fabio, por toda presença e confiança, pela paciência e ensinamentos em todos esses anos, pelo que sou hoje como pessoa e cientista.

Agradeço aos amigos de copa e corredores do Aggeu, que fizeram parte durante meu cotidiano em todos os anos, em especial Cris, Josué, Ró e Dona Fátima.

Agradeço também aos amigos do LIKA/UFPE, em geral todos os técnicos e colaboradores que de alguma forma contribuíram em alguma etapa desse progresso, em especial Maria Helena, Sr Ailton e Felipe.

Agradeço aos amigos/técnicos de laboratório do LIKA, em especial Jana, Rafael e Marina e todos os outros dos diferentes laboratórios que tive o prazer de recorrer em diversos momentos.

Agradeço pelo apoio de pessoas, sempre solícitas, como Cássia, Vivi e Karina do NPT/FIOCRUZ.

Agradeço a Verinha, por ser uma pessoa de luz em todos os momentos de trabalho no LIKA, nos agradando com seu bom humor diário.

Agradeço aos colaboradores tão solícitos do Serviço de Referência em Esquistossomose, em especial Fatinha, Dona Lúcia, Sr. Barnabé e Rodrigo.

Agradeço imensamente à Iasmin, dona do equilíbrio universal e um anjo que me orientou e ajudou em todas as etapas durante esses anos de doutorado.

Agradeço à Alberon, primeiro orientador e quem sempre teve paciência em todos meus momentos como estagiário.

Agradeço à Dyana, sempre tão calorosa e amorosa em todos os momentos durante os anos de LBCM.

Agradeço a Ana Paula (Paulinha), uma das pessoas que mais me ensinou durante a vida acadêmica e até hoje se faz presente, sempre preocupada e disposta a ajudar.

Agradeço à Carmelzinha, pessoa surreal que tenho o prazer de ter estado ao lado durante muitos anos de laboratório e que admiro como uma verdadeira mãe.

Agradeço aos amigos de quiosque e outros departamentos, Michele, Priscila, Larissa, Debora, Joana, Kamila e muitos outros que fizeram parte do dia a dia nos almoços.

Agradeço aos amigos do LBCM, em especial meu parceiro de IC Everton, a admirável Amanda Aliança, à querida Camila, a dupla Victor e Walter, à minha ídola Deivy, ao “nojentinho” Jorge, à musa Karla, à doidinha Cata.

Agradeço também à minha amiga Nanda, que me acolheu no primeiro dia de LBCM e sempre é tão amorosa.

Agradeço a Gabriel, que foi um verdadeiro irmão em diversos momentos dentro e fora do LBCM.

Agradeço a Amandinha, que o destino colocou esse anjo no LBCM para que me ajudasse em momentos tão complexos do meu crescimento como ser humano.

Agradeço ao amigo Rubens, companheiro de todas as horas, sempre tão solícito, presente e eficiente, desde troca de água de aquários, cafezinhos pós expedientes e chopps no final de semana.

Agradeço ao meu amigo Elverson, quem divido e dedico grande parte dos frutos desse protejo, quem sempre me orientou e me acompanhou nas diferentes etapas.

Agradeço a minha amiga Thaynara, sempre me ensinando que a fé pode estar em diferentes lugares e pessoas, sendo sempre um escape ao caos diário.

Agradeço ao amigo Anderson, um exemplo de foco e tranquilidade frente às adversidades e uma pessoa quem quero dividir vários drinks durante a vida.

Agradeço ao querido Olavo, com quem gostava de passar horas conversando sobre os assuntos mais aleatórios da vida, um verdadeiro ser de luz durante esses anos.

Agradeço à maravilhosa Aline, por nos agraciar no LIKA com seu sorriso sempre tão encantador.

Agradeço a querida Cida, que mostrou que “é luta na terra” e que a vitória é certa pra quem acredita.

Agradeço ao amado Ayug, que mesmo não estando diretamente ligado ao LIKA/Aggeu neste projeto, se fez presente em vários momentos felizes dentro e fora da universidade.

Às minhas meninas da graduação que até hoje dividem os anseios e as lutas da pós graduação, em especial Tatá, Lidi, Galega, Aninha, Jaybe e Dani.

Aos amigos extra Aggeu/LIKA que se fizeram presente e contribuíram de alguma forma com meu crescimento como ser humano e profissional, minha eterna gratidão.

RESUMO

No gênero *Biomphalaria* existem espécies hospedeiras intermediárias importante para o ciclo de vida do *Schistosoma mansoni* apresentando diferentes perfis de susceptibilidade. Os caramujos *Biomphalaria* são de extrema importância para a epidemiologia da Esquistossomose, contudo, o *Biomphalaria glabrata* é a espécie mais estudada por apresentar maior susceptibilidade a esta parasitose. Seu sistema imune, composto por componentes celulares e humorais, é o principal responsável pela variação de fenótipos deste gênero e sua resposta imune inata tradicional já é conhecida. Estudos relacionados a imunidade deste gênero, indicam uma mudança de resposta diante de uma exposição secundária ao parasita, sugerindo um perfil de resistência ao caramujo. A espécie *Biomphalaria straminea*, apesar de apresentar um perfil menos susceptível ao parasita, apresenta-se com grande importância na manutenção do ciclo de vida do parasita, devido sua ampla distribuição. A falta de estudos, principalmente moleculares levou o presente estudo a se empenhar na primeira análise proteômica do *B. straminea*, avaliando sua resposta após a exposição primária e secundária frente ao *S. mansoni*. Assim, foram identificadas 55 proteínas válidas, as quais, a maioria apresentou similaridade com componentes já presentes em *B. glabrata*, sendo identificadas, proteínas relacionadas ao metabolismo comum nos invertebrados, assim como fatores imunes sendo produzidos de forma constitutiva ou exclusiva durante a exposição. Observamos que durante a resposta primária ao parasita, proteínas de reconhecimento como lectinas tipo C e tipo H se mostram super expressas durante todos os tempos analisados. Além disso, outras proteínas relacionadas ao estresse oxidativo, adesão celular e transporte de oxigênio também se mostram super expressas. Em relação à resposta após uma segunda exposição ao parasita, encontramos super expressas proteínas relacionadas a adesão celular, fatores de reconhecimento, estresse oxidativo, alguns componentes altamente imunorelevantes como FREPs e uma proteína homóloga a biomphalisina, já descrita em *B. glabrata* e que se mostra como componente fundamental da resposta específica e de memória também em *B. straminea*. A partir das análises proteômica da resposta imune primária e secundária do *B. straminea* frente ao *S. mansoni*, podemos entender melhor o perfil da resposta proteica apresentada por esta espécie, abrindo assim possibilidades, para novos estudos com diferentes abordagens a respeito da relação parasita-hospedeiro, como também análises específicos com as moléculas relacionadas a memória detectadas neste estudo.

Palavras-chave: *Biomphalaria straminea*; *Schistosoma mansoni*; proteômica; resposta imune; resposta inata de memória.

ABSTRACT

In the *Biomphalaria* genus there is important intermediate hosts for the life cycle of *Schistosoma mansoni*, showing different susceptibility profiles. The *Biomphalaria* snails are extremely relevant to schistosomiasis epidemiology, but, *Biomphalaria glabrata* is the most studied specie because is the most susceptible to parasite. Your immune system, formed by cellular and humoral components, is the main responsible for that phenotypic variation and your traditional innate immune response already know. Related studies involving the immunity of this genus show a shift of response during a secondary challenge, conferring a resistance profile to parasite. *Biomphalaria straminea* specie, despite presenting a less susceptible profile, display high relevancy on *Schistosoma* life cycle manutention due your broad distribution. The lack of studies, mainly molecular approaches, led the present study to engage in the first proteomic analysis of *B. straminea*, evaluating its response after primary and secondary exposure to *S. mansoni*. Thus, was identified in *B. straminea* hemolymph, 55 valid proteins, which, most of them showed similarity with components already present in *B. glabrata*, being identified, proteins related to the common metabolism in invertebrates, as well as immune factors being produced constitutively or exclusively during the exposure. In addition, other proteins related to oxidative stress, cell adhesion and oxygen transport are also overexpressed. Regarding the response after a second exposure to the parasite, we found super expressed proteins related to cell adhesion, recognition factors, oxidative stress, some highly immunorelevant components like FREPs and a protein homologated to biomphalysin, already described in *B. glabrata* and which as a fundamental component of the specific and memory response also in *B. straminea*. From the proteomic analysis of the primary and secondary immune response of *B. straminea* against *S. mansoni*, we can better understand the profile of the protein response presented by this species, thus opening possibilities for new studies with different approaches regarding the parasite-host relationship, as well as specific analyzes with the memory-related molecules detected in this study.

Key words: *Biomphalaria straminea*; *Schistosoma mansoni*; proteomic; immune response; innate immune memory

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição global do <i>Schistosoma spp.</i>	15
Figura 2 - Distribuição da esquistossomose na área endêmica, por faixa de positividade, por município. Brasil, 2009 – 2017	16
Figura 3 - Distribuição geográfica de <i>B. glabrata</i> e <i>B. straminea</i> no Brasil.....	17
Figura 4 - Modelo de polimorfismo de compatibilidade entre hospedeiro e parasita.....	20
Figura 5 - Mapa experimental do protocolo de <i>Immune Priming</i> de caramujos <i>B. straminea</i>	30
Figura 6 - Classificação das famílias proteicas da hemolinfa de <i>B. straminea</i>	34
Figura 7 - Funções moleculares (GO Annotation) presentes na hemolinfa de <i>B. straminea</i> ..	34
Figura 8 - Processos biológicos (GO Annotation) presentes na hemolinfa de <i>B. straminea</i> ..	35
Figura 9 - Diagrama das proteínas identificadas na hemolinfa de <i>B. straminea</i> controle e nos tempos de 1 e 15 dias após a exposição ao <i>S. mansoni</i>	41
Figura 10 Principais termos <i>gene ontology</i> mapeados nas proteínas super expressas 1 dia pós exposição de <i>B. straminea</i> ao <i>S. mansoni</i>	51
Figura 11 Principais termos <i>gene ontology</i> mapeados nas proteínas super expressas 15 dias pós exposição de <i>B. straminea</i> ao <i>S. mansoni</i>	52
Figura 12 - Principais funções moleculares super expressas em <i>B. straminea</i> 1 dia pós exposição ao <i>S. mansoni</i>	52
Figura 13 - Principais funções moleculares super expressas em <i>B. straminea</i> 15 dias pós exposição ao <i>S. mansoni</i>	53
Figura 14 - Comparação da expressão proteica diferencial de <i>B. straminea</i> 1 dia após a reexposição ao <i>S. mansoni</i> (GA1)	62
Figura 15 – Comparação da expressão proteica diferencial de <i>B. straminea</i> 15 dpr ao <i>S. mansoni</i> (GA15)	67
Figura 16 - Resumo esquemático das proteínas diferencialmente expressas na resposta primária e secundária de <i>B. straminea</i> ao <i>S. mansoni</i>	74
Figura 17 – Alinhamento entre sequencias Bs-Biomphalysin de <i>B. straminea</i> e Biomphalysin de <i>B. glabrata</i> (AGG38744.1).....	75
Figura 18 – Disposição estrutural do domínio de aerolisinas em bs-Biomphalysin	76
Figura 19 - Predição estrutural tridimensional da proteína bs-Biomphalysin de <i>B. straminea</i>	77
Figura 20 – Alinhamento entre sequencias BsTEP de <i>B. straminea</i> e BgTEP1 (ADE45341.1) de <i>B. glabrata</i>	78

Figura 21 – Esquema estrutural dos domínios conservados identificados em BsTEP de <i>B. straminea</i>	78
Figura 22 - Esquema estrutural dos domínios conservados identificados em Lectina tipo H de <i>B. straminea</i>	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Proteínas identificadas na hemolinfa de <i>B. straminea</i>	36
Tabela 2 - Proteínas exclusivas identificadas na hemolinfa de <i>B. straminea</i> 1 dia após exposição ao <i>S. mansoni</i>	42
Tabela 3 - Proteínas exclusivas identificadas na hemolinfa de <i>B. straminea</i> 15 dias após exposição ao <i>S. mansoni</i>	43
Tabela 4 - Proteínas diferencialmente expressas em <i>B. straminea</i> 1 dpe ao <i>S. mansoni</i>	45
Tabela 5 - Proteínas diferencialmente expressas em <i>B. straminea</i> 15 dpe ao <i>S. mansoni</i>	48
Tabela 7 - Proteínas diferencialmente expressas 1 dia após a reexposição de <i>B. straminea</i> ao <i>S. mansoni</i> (GA1)	63
Tabela 8 – Proteínas identificadas exclusivamente em <i>B. straminea</i> um dia pós reexposição ao <i>S. mansoni</i> (GA1)	66
Tabela 9 - Proteínas diferencialmente expressas em <i>B. straminea</i> 15 dias pós reexposição ao <i>S. mansoni</i> (GA15)	68
Tabela 10 - Proteínas identificadas exclusivamente em <i>B. straminea</i> 15 dpr ao <i>S. mansoni</i> (GA15).....	72
Tabela 11 - Termos GO relacionados à estrutura predita de bs-Biomphalysin pelo I Tasser (COACH e COFACTOR)	76

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	Esquistossomose e o gênero <i>Biomphalaria</i>	15
2.2	Resposta Imune primária em <i>Biomphalaria</i>	18
2.3	Resposta Imune secundária em <i>Biomphalaria</i>	21
2.4	Análise proteômica e Bioinformática de proteínas.....	22
3	JUSTIFICATIVA.....	26
4	OBJETIVOS.....	27
4.1	Objetivo Geral	27
4.2	Objetivos específicos.....	27
5	METODOLOGIA	28
5.1	Obtenção dos caramujos e parasitas	28
5.2	Obtenção das amostras e Extração do RNA do <i>B. straminea</i>	28
5.3	Quantificação e Análise de qualidade do RNA	29
5.4	Sequenciamento do RNA e obtenção do database	29
5.5	Processo de exposição de <i>B. straminea</i> ao <i>S. mansoni</i>	29
5.6	Sensibilização dos caramujos pelo processo “ <i>Immune priming</i> ”.....	30
5.7	Extração das proteínas totais	31
5.8	Quantificação das proteínas totais	31
5.9	Digestão in gel e LC-MS/MS	31
5.10	Análise dos dados LC-MS/MS	32
5.11	Análise estatística diferencial das proteínas	32
5.12	Análises <i>downstream</i> de proteínas de <i>B. straminea</i>	32
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
6.1	Análise proteômica da hemolinfa de <i>Biomphalaria straminea</i>	33
6.2	Proteínas diferencialmente expressas na resposta primária de <i>B. straminea</i> exposto ao <i>S. mansoni</i>	41
6.3	Análise proteômica da resposta secundária de <i>B. straminea</i> frente ao <i>S. mansoni</i>	61
6.4	Análise <i>downstream</i> de proteínas imuno relevantes de <i>Biomphalaria straminea</i>	75
7	CONCLUSÃO	80
	REFERÊNCIAS	81

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose continua sendo um grande problema de saúde pública, com mais de 270 milhões de pessoas infectadas. É considerada uma das Doenças Negligenciadas Tropicais mais importante, perdendo apenas para a malária em número de casos ao redor do planeta (WHO, 2018).

A doença é causada por trematódeos do gênero *Schistosoma* e possui como hospedeiro intermediário caramujos do gênero *Biomphalaria*, que possuem grande importância na disseminação do parasita no ambiente. Mais especificamente, no Brasil, a esquistossomose é causada pelo *Schistosoma mansoni* e possui três principais espécies de hospedeiros intermediários, *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila* (COLLEY et al., 2014; GOMES CASAVECHIA et al., 2018; GRYSEELS et al., 2006). As espécies do gênero *Biomphalaria*, apresentam diferentes perfis de resistência e susceptibilidade ao parasita *S. mansoni*, onde já se sabe que essas diferenças se dão principalmente pela resposta imune composta por componentes celulares e humorais do próprio molusco. Tais componentes podem agir de forma individual e/ou sinérgica no combate a algum agente patogênico ao gastrópode (NEGRÃO-CORRÊA et al., 2012; PILA et al., 2016).

Existem uma vasta complexidade de moléculas que trabalham nessa interação entre parasita e hospedeiro. Muitas dessas interações já são descritas e bem estudadas, enquanto que outras ainda precisam ser bem elucidadas para o melhor entendimento do funcionamento do sistema de defesa desses organismos. Além da resposta imune inata, ou primária, a proposta da resposta imune secundária ou de memória vem sendo o principal alvo de investigações, onde a primeira exposição a um patógeno confere proteção à segunda exposição contra este mesmo patógeno através da alteração da predominância de resposta do tipo celular para um tipo de resposta mais humoral. Tal fato já é observado em alguns grupos de invertebrados e em *B. glabrata* já são encontrados estudos com indícios destas alterações no perfil de resposta imune secundária (CONTRERAS-GARDUÑO et al., 2016; MILUTINOVIĆ; KURTZ, 2016; MITTA et al., 2012; PINAUD et al., 2016; PORTELA et al., 2013).

Já se sabe que existe uma grande quantidade de estudos envolvendo a resposta imune de caramujos *B. glabrata*, espécie considerada mais susceptível ao *S. mansoni*, porém, a espécie *B. straminea*, bem conhecida como forte invasora biogeográfica de habitats e também envolvida na manutenção do ciclo do *S. mansoni*, encontra-se ainda fora das abordagens de estudos mais refinados. Essa escassez de trabalhos é ainda mais evidenciada quando avaliamos as abordagens moleculares de nova geração, como as *ômicas*, para essa espécie.

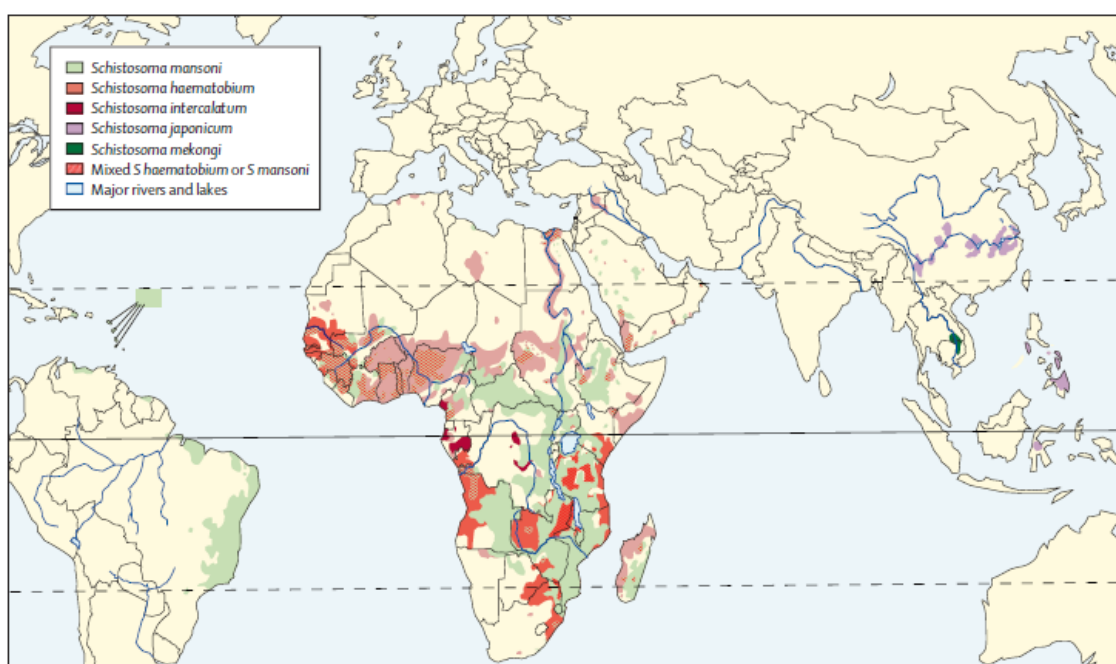
Estudos moleculares aprofundados propõem um melhor entendimento das interações parasita hospedeiro, na perspectiva de melhores estratégias para o desenvolvimento de estratégias de controle do parasita por meio do conhecimento molecular do hospedeiro intermediário (PILA et al., 2017; PINAUD et al., 2019; PORTET et al., 2017).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Esquistossomose e o gênero *Biomphalaria*

A esquistossomose é uma doença causada por vermes do gênero *Schistosoma* que acomete mais de 250 milhões de pessoas em todo o mundo (Figura 1). Apesar de antiga, é uma doença bastante relevante no âmbito da saúde pública mundial, estando dentro do grupo das doenças tropicais negligenciadas. Tal infecção está altamente relacionada com fatores socioeconômicos como más condições de saneamento básico e higiene, assim como fatores relacionados ao clima e presença dos hospedeiros intermediários do parasita (COLLEY et al., 2014; MCMANUS et al., 2018).

Figura 1 - Distribuição global do *Schistosoma* spp.



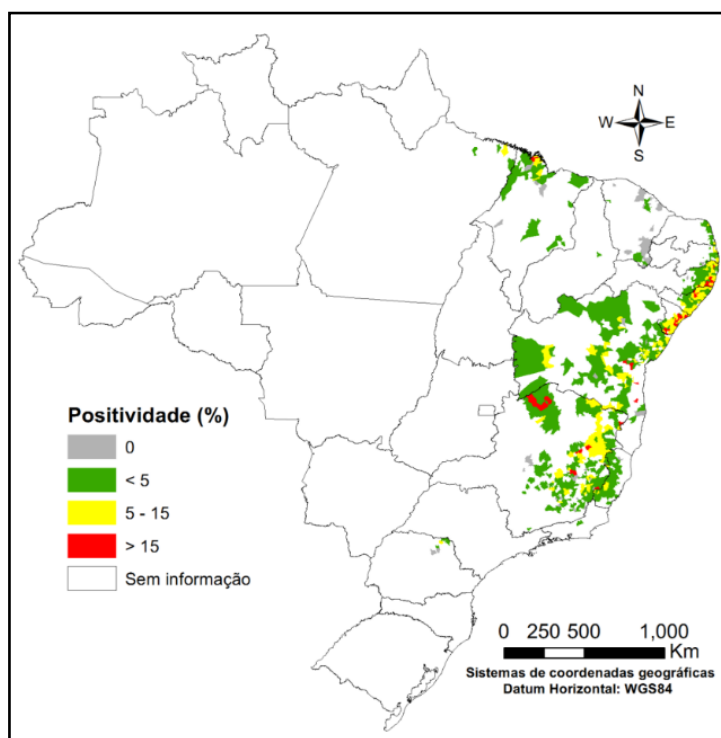
Fonte: Colley et al., 2014 (adaptado Gryseels et al., 2006)

Apesar dessa maior prevalência em países com situações socioeconômicas menos privilegiadas, hoje a esquistossomose já se encontra em locais antes não vista. O fluxo turístico, principalmente em áreas litorâneas e rurais, vem favorecendo o aparecimento da doença em locais não endêmicos, sendo encontrada em indivíduos oriundos da França, Alemanha e Itália, países não endêmicos, podendo aumentar o risco do parasita em ganhar novos ambientes (BOISSIER et al., 2015).

No Brasil, grande parte do país é endêmico (Figura 2) para o *Schistosoma mansoni*, possuindo não só os fatores socioeconômicos como também clima tropical ideal e presença de várias espécies do hospedeiro intermediário em todos os estados brasileiros, principalmente

Sergipe, Minas Gerais, Alagoas, Bahia e Pernambuco. Tal condição faz com que a esquistossomose seja a segunda doença tropical negligenciada que mais mata no país, perdendo apenas para a doença de Chagas. Os caramujos do gênero *Biomphalaria* são de grande importância na manutenção do ciclo do parasita (COLLEY et al., 2014; KATZ, 2018; MARTINS-MELO, 2016).

Figura 2 - Distribuição da esquistossomose na área endêmica, por faixa de positividade, por município. Brasil, 2009 – 2017



Fonte: Ministério da Saúde, 2018

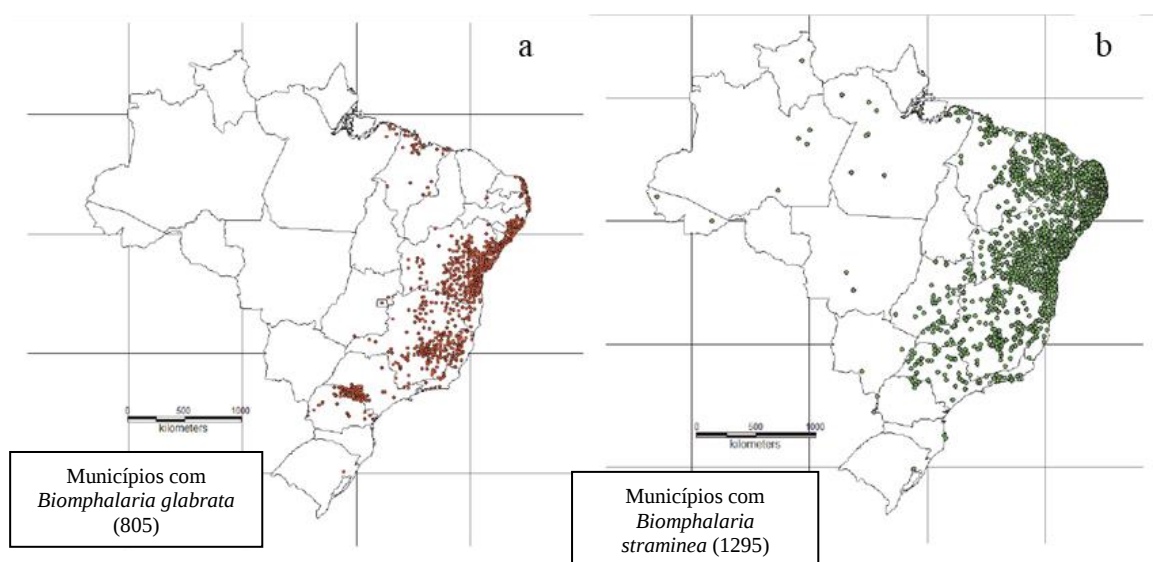
O gênero *Biomphalaria* age como hospedeiro intermediário carregando o parasita *Schistosoma mansoni*, causador da esquistossomose. Desse gênero, onze espécies são descritas no Brasil até o momento, as espécies *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila* são encontradas naturalmente infectadas com o parasita (SCHOLTE et al., 2012).

Os indivíduos desse gênero habitam ambientes aquáticos, lagos, poços e riachos. Podem colonizar grandes áreas e possuem boa tolerância a adversidades ambientais, como variações nas características físicas, químicas e biológicas. Além disso, esses moluscos possuem uma boa capacidade de ocupar novos nichos ecológicos, tornando-se assim, oportunistas ambientais (BARBOSA et al., 2015).

Entre as espécies que carregam o parasita, a principal sem dúvida é a *Biomphalaria glabrata*, que possui alta susceptibilidade, agindo como eficiente vetor do parasita, agravando ainda mais o quadro da doença no país e no mundo. Sua alta taxa de susceptibilidade, confere a espécie um potencial alvo de estudos de interação parasita-hospedeiro, auxiliando no desenvolvimento do conhecimento acerca desse importante tema. Essa espécie se encontra distribuída em 16 estados e Distrito federal (Figura 3a) (BRASIL, 2014).

Por sua vez a espécie *B. straminea*, apesar de não ser um hospedeiro intermediário de extrema susceptibilidade como o *B. glabrata*, possui uma alta dispersão geográfica estando presente em vários países da América Latina como Venezuela, Suriname, Guiana Francesa, Guiana, Peru, Paraguai, Argentina, Dominica, Granada, Guadalupe, Martinica, República Dominicana, Trinidad, Uruguai, Costa Rica. No Brasil, ocorre em 24 estados e o Distrito Federal, desta forma, mostrando-se como principal agente na manutenção do ciclo do parasita (Figura 3b) (BRASIL, 2014; CALDEIRA et al., 2016).

Figura 3 - Distribuição geográfica de *B. glabrata* e *B. straminea* no Brasil



Fonte: Brasil, 2014 (adaptado)

O *B. straminea* é considerado um importante invasor, nos termos de adaptação ambiental, relacionado à distribuição do parasita ao redor do mundo, é uma espécie altamente competitiva no nicho ecológico que invade. Além de carrear e manter o ciclo do parasita *S. mansoni*, o caramujo é responsável pela transmissão de outros agentes patogênicos humanos, em países como a China, o que torna maior a relevância do estudo do sistema imune dessa espécie (YANG et al., 2018).

Apesar de ser bastante importante para o ciclo do parasita *S. mansoni*, a espécie *B. straminea* é pouco estudada, sendo modelo de estudo apenas na caracterização do seu genoma mitocondrial para fins de análises filogenéticas de linhagens da espécie (ZHOU et al., 2019).

2.2 Resposta Imune primária em *Biomphalaria*

O sistema interno de defesa dos caramujos *Biomphalaria*, assim como grande parte dos invertebrados, é composto pelas frações celulares e humorais ou plasmáticas. O hemócito é a unidade competente que constitui a fração celular da hemolinfa, agindo como primeira linha de defesa fagocitando ou encapsulando agentes invasores, que posteriormente podem ser lesados por outros metabólitos secretados pelos próprios hemócitos, assim como por componentes solúveis na hemolinfa (CAVALCANTI et al., 2012; NEGRÃO-CORRÊA et al., 2012).

Durante o desafio contra parasitas, neste gênero mais precisamente helmintos, sabe-se que ocorre modificações na expressão de mais de trinta genes relacionados ao processo de defesa. As vias de atuação de tais genes vão desde fatores de migração celular semelhantes às citocinas até expressão de proteínas com função antimicrobiana (MITTA et al., 2005). É descrita também a capacidade de seleção de resposta frente a agentes patogênicos variados, sendo encontrado também, moléculas comuns aos diferentes tipos de respostas, confirmando a complexidade do sistema imune de tais organismos (ADEMA et al., 2010).

As espécies *B. glabrata* e *B. straminea* apresentam os mesmos tipos de hemócitos, sendo eles *blast-like cells*, granulócitos, hialinócitos tipo 1, 2 e 3. A caracterização realizada ultraestruturalmente mostra um padrão morfológico semelhante entre os tipos celulares em ambas espécies, porém sabe-se que o padrão de resposta imune é distinto em relação ao *S. mansoni* (CAVALCANTI et al., 2012).

Tem sido descrito na literatura que os gastrópodes possuem um conjunto de proteínas efetoras solúveis na hemolinfa que estão envolvidas no reconhecimento do patógeno e geração de respostas inflamatórias. Tais moléculas vêm sendo bastante estudadas ao longo dos anos e atuam em diferentes fases da resposta imune, sendo possível observar a produção de citocinas envolvidas na regulação da mitose dos hemócitos nas primeiras horas de infecção (GIANNELLI et al., 2016). Alguns estudos proteômicos descrevem tais proteínas quando comparam a resposta imune de diferentes linhagens de *B. glabrata* contra trematódeos. Sendo descrita a presença de proteínas reguladoras da atividade granulocítica e atividade mitótica em linhagens com maior resistência a helmintos como o *Echinostoma caproni* (BOUCHUT et al., 2006).

A análise comparativa do proteoma plasmático de linhagens resistentes e susceptíveis de *B. glabrata* expostas a trematódeos detecta também proteínas capazes combater inibidores imunológicos secretados pelos parasitas, assim como proteínas reguladoras de cálcio e peptídeos imunomoduladores da interação parasita-hospedeiro (VERGOTE et al., 2005). Também seguindo a mesma linha de estudo, é descrita a presença de proteínas que conseguem agir diretamente contra o parasita, nesse caso, *Schistosoma mansoni*. Uma dessas proteínas é bastante semelhante as aerolisinas presentes nas bactérias, com atividade citolítica (GALINIER et al., 2013).

Em estudos proteômicos de larga escala analisando o plasma de diferentes linhagens resistentes e susceptíveis de *B. glabrata*, foi encontrado um arsenal extremamente rico de proteínas imunorelevantes em contato com esporocistos do *S. mansoni*. Tal análise mostrou que a dinâmica de resposta entre as proteínas do hospedeiro e o parasita começa desde o primeiro contato. Categorizando tais proteínas, é encontrada predominância do grande grupo das lectinas, estando contidas as *fibrinogen related proteins* (FREPs) (WU et al., 2017).

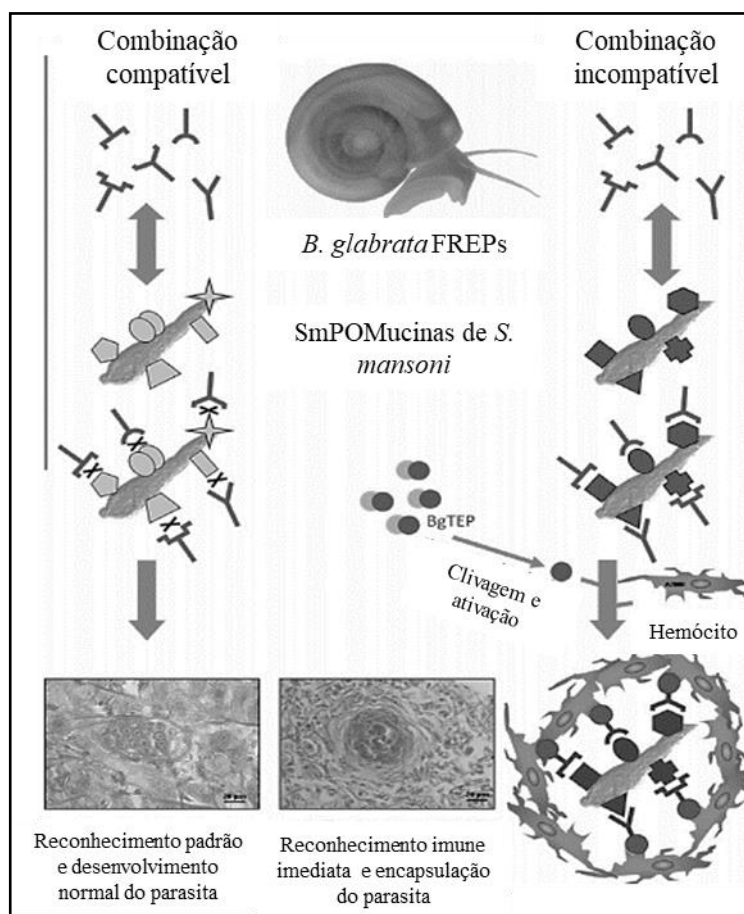
A descoberta das FREPs foi um marco no entendimento da interação no modelo *B. glabrata/Echinostoma caproni*, onde foi visto que linhagens resistentes possuíam uma maior expressão dessas proteínas com função de se ligar e precipitar moléculas secretadas por parasitas, retirando-os da circulação, sendo um importante componente de defesa desses organismos. Essas proteínas possuem papel fundamental durante a resposta inata e oferece também pistas sobre a seletividade da resposta, uma vez que possui um domínio de imunoglobulina altamente variável proveniente de mecanismos genéticos como *splicing* (GORDY; PILA; HANINGTON, 2015; ZHANG; LOKER, 2003).

Hoje, estudos com a genômica estrutural dessas moléculas já descrevem que os FREPs estão contidos dentro de um grupo ainda maior chamado de *fibrinogen related domain containing proteins* (FREDs). Suas estruturas podem variar de acordo com a presença de outros domínios funcionais além da usualmente conhecida, presença de domínio de fibrinogênio (FBG) com domínios de imunoglobulina (Ig) (FREPs), podendo estar presente apenas o domínio FBG (sFRED) e até conter domínio de fator de crescimento epidermal junto ao FBG (FReM) (LU et al., 2020).

Os FREPs são receptores imunes e junto com as mucinas polimórficas secretadas pelo *S. mansoni*, estão no centro da interação entre os caramujos e os trematódeos. Pela sua alta taxa de variabilidade, ambas moléculas são secretadas de forma diferente entre as populações e, de acordo com alguns autores, essa variabilidade pode chegar a nível de indivíduo de uma mesma linhagem ou cepa. Durante a infecção, as mucinas presentes na superfície dos parasitas podem

ou não serem reconhecidas pelas moléculas de FREPs dos moluscos. O modelo é considerado compatível quando há o reconhecimento entre as moléculas e o granuloma é formado, consequentemente a infecção é debelada antes do desenvolvimento completo do parasita. Mas quando o caramujo não possui moléculas FREP compatíveis com as mucinas expostas pelo parasita, o modelo é de incompatibilidade e o parasita consegue avançar no processo infeccioso (Figura 4) (MITTA et al., 2012; PORTET et al., 2017).

Figura 4 - Modelo de polimorfismo de compatibilidade entre hospedeiro e parasita



Fonte: Mitta et al., 2012 (adaptado)

A prova de que os FREPs participam ativamente na resposta imune de *Biomphalaria* é quando se consegue nocautear genes responsáveis pela produção de determinado tipo de FREP. O resultado de tal alteração é uma linhagem perdendo seu fenótipo de resistência, passando a ser susceptível ao *Schistosoma*. Tais alterações também, sugerem a hipótese desse fato, facilitar a invasão de novos parasitas, agindo de modo a despistar o sistema de defesa. (HANINGTON; FORYS; LOKER, 2012).

Além dos receptores com domínios relacionados ao fibrinogênio, podemos encontrar também receptores com domínios de lectinas tipo C e também domínios de galectinas, ainda

pouco estudadas, porém podendo estar relacionadas também com o reconhecimento de patógenos por seus domínios funcionais (DHEILLY et al., 2015).

A influência dos receptores na compatibilidade entre caramujo e parasita também pode ser vista nos altos níveis de expressão de receptores do tipo Toll em linhagens resistentes de *B. glabrata* expostos ao *S. mansoni*. Tais receptores, com grande importância na resposta imune de mamíferos, podem ser encontrados de forma similar em quase todos os hemócitos de linhagens de caramujos resistentes (PILA et al., 2016).

Estudando o momento de encapsulação entre hemócitos de linhagens susceptível e resistente de *B. glabrata* com esporocistos de *S. mansoni*, é possível confirmar a dinâmica citada anteriormente. Pode-se observar, na linhagem susceptível, a baixa expressão de proteínas relacionadas com resposta fagocitária. Por outro lado, na linhagem resistente, durante a encapsulação, o proteoma super expresso é composto por proteínas reguladoras da produção de espécies reativas de oxigênio e antioxidantes para conter danos intracelulares (DINGUIRARD et al., 2018).

Com o avanço dos estudos, foi possível observar uma mudança no perfil de resposta de *B. glabrata* exposto ao *S. mansoni*. Já se sabe que, a resposta celular atua como uma resposta primária, sendo predominante a ação dos hemócitos contra o parasita. Quando submetidos a uma segunda exposição, foi observado por alguns autores que a resposta plasmática se torna predominante (PINAUD et al., 2016).

2.3 Resposta Imune secundária em *Biomphalaria*

A resposta imune dos invertebrados acontece de forma heterogênea onde cada família, classe ou gênero se comporta de forma diferente quando se defende contra algum agente patogênico ou parasita. A questão sobre uma resposta imune mais específica vem sendo levantada ao longo dos anos nos mais diferentes modelos de invertebrados (ADEMA; LOKER, 2015).

A utilização de diversos modelos para encontrar provas de que os invertebrados possuem mecanismos mais elaborados de memória imune vem aumentando (KURTZ; FRANZ, 2003). Alguns autores observaram mudanças no mecanismo de resposta de insetos durante uma segunda exposição a um patógeno homólogo. Tais estudos primários também apontam que “doses ideais” de uma exposição prévia podem conferir proteção total ou parcial durante o segundo desafio (NETEA; QUINTIN; VAN DER MEER, 2011; PHAM et al., 2007; RODRIGUES et al., 2010).

Grande parte dos estudos empenham seus esforços baseados na conduta de uma forma de exposição seguida de reexposição a um determinado agente invasor (*immune priming*). Tal

metodologia faz com que o modelo de invertebrado a ser estudado responda de forma diferente ou aumentada durante o segundo desafio (SADD et al., 2005). Esse método é bastante utilizado na busca de entender uma possível memória imunológica ou resposta secundária, mais específica do que a primeira, sendo os insetos um dos grupos mais estudados (CONTRERAS-GARDUÑO et al., 2016).

Além de insetos, já é conhecida a presença do fenômeno de *immune priming* em *Biomphalaria* quando desafiados a uma segunda exposição ao *S. mansoni*. Outras metodologias para a verificação da eficácia desse fenômeno também já foram descritas como irradiação prévia de miracídeos e vacinação de caramujos com antígenos de *Schistosoma*, ambos oferecendo proteção menos eficiente do que a dupla exposição que o fenômeno de *immune priming* consiste (PORTELA et al., 2013).

Como já dito anteriormente, tal processo faz com que o sistema de defesa de *Biomphalaria* responda de forma diferente, onde no primeiro desafio é observada uma resposta primariamente celular, através de processos de encapsulação, enquanto que na segunda exposição, o caramujo utiliza de ferramentas humorais, como proteínas que atacam diretamente o *Schistosoma* durante a invasão (PINAUD et al., 2016).

Sabemos que um marco para determinação do que seria uma resposta imune de memória é a especificidade. Olhando por esse prisma, alguns estudos tentam determinar até que ponto os caramujos *Biomphalaria* responderiam de forma específica um segundo desafio. Nesse ponto devemos trazer de volta a questão dos FREPs, as maiores evidências de adaptação imune uma vez que tais moléculas parecem variar de acordo com o patógeno em questão (GOURBAL et al., 2018).

O advento de combinações de tecnologias para a determinação molecular dessa resposta secundária ou de memória nos traz ao conhecimento de alguns grupos principais de transcritos encontrados através do sequenciamento em larga escala de RNA de *B. glabrata*: receptores que se ligam a fatores dos patógenos, moléculas imune efetoras que podem causar efeitos diretos sobre os agentes invasores, assim como, imunomodular a resposta do hospedeiro e por fim agentes de maturação do sistema imune (CASTILLO et al., 2019; PINAUD et al., 2019).

2.4 Análise proteômica e Bioinformática de proteínas

A proteômica é uma abordagem que busca a identificação e caracterização das proteínas presentes em um organismo, assim como também é possível o estudo de suas modificações pós traducionais, de suas funções e possíveis interações com outras proteínas. Apesar de ser uma ciência consideravelmente recente, já apresenta muitas evoluções metodológicas e de análise (DREISEWERD, 2014).

Os estudos com proteínas conseguiram grande visibilidade a partir da criação de métodos de separação de proteínas com maior resolução, onde a eletroforese bidimensional ganhou seu espaço e até hoje é utilizada em alguns estudos comparativos de proteoma. A técnica consiste em duas etapas de separação, uma pela focalização isoeletrica e outra pela SDS-PAGE, nos dando o ponto isoeletrico e o tamanho de cada proteína respectivamente (BAGGERMAN et al., 2005).

Apesar de ser um marco na história do estudo das proteínas, a técnica de eletroforese bidimensional tem suas vantagens e desvantagens. Como limitações, as proteínas de baixa abundancia são difíceis de detecção, assim como proteínas de baixa expressão. Tais proteínas podem possuir função relevante no organismo o que passaria a ser uma perda em grande parte dos estudos (RABILLOUD et al., 2010). No caso de misturas complexas de proteínas, a técnica acaba por se tornar laboriosa uma vez que é necessária a análise individual de cada *spot* presente nos perfis proteicos, tornando a técnica inviável quando analisamos dezenas ou centenas de proteínas (RABILLOUD; LELONG, 2011).

A necessidade de identificação de proteínas em larga escala somada com o avanço tecnológico no âmbito da criação de espectrômetros de massas mais robustos, levou a proteômica a um novo campo de trabalho fazendo com que o enfoque da proteômica clássica, baseada em gel, fosse transferido para a chamada proteômica em larga escala, “*shotgun*” ou *high throughput*. Tal metodologia consiste na identificação em massa de todos os peptídeos presentes em uma amostra, uma vez que dispensa etapas prévias de fracionamento das proteínas como a eletroforese (ROEPSTORFF, 2012; VIDOVA; SPACIL, 2017).

A dispensa da separação prévia se deu principalmente na possibilidade de acoplamento entre cromatógrafos líquidos de alta afinidade junto aos espectrômetros de massa, chamados rotineiramente de LC-MS/MS. Essa tecnologia trouxe vantagens para a proteômica como aumento da sensibilidade, da velocidade e da resolução (DREISEWERD, 2014; THAKUR et al., 2011).

De forma rudimentar, esse tipo de abordagem se baseia na comparação de espectros gerados através da fragmentação dos peptídeos com espectros teóricos preditos e depositados nos diferentes bancos de dados disponíveis (LESUR; DOMON, 2015; ROEPSTORFF, 2012).

Nos dias atuais os espectrômetros de massa ainda são utilizados nos mais diversos estudos, analisando não só de proteínas, como também complexos formados a partir da interação entre macromoléculas presentes nos organismos. Essas abordagens fazem com que o universo das tecnologias ômicas se torne mais completo, podendo analisar o funcionamento

multidimensional dos sistemas biológicos (LARANCE; LAMOND, 2015; RUHAAK et al., 2018).

Apesar de promissora, a tecnologia de espectrometria de massas possui suas limitações em relação a espécies que não são modelos experimentais, como o caso de *B. straminea*. As vias de identificação dos peptídeos divergem para as metodologias de sequenciamento *de novo* de proteínas ou a análise proteômica baseada no genoma ou transcriptoma da espécie, chamada proteogenômica. Tais abordagens de sequenciamento *de novo*, contam com técnicas cada vez mais avançadas de bioinformática, como aprendizado de máquina, para determinar as sequências de aminoácidos de cada peptídeo do extrato proteico (DEVABHAKTUNI; ELIAS, 2016; TRAN et al., 2017).

Atualmente, na proteômica *de novo*, existem várias plataformas que oferecem *pipelines* capazes de unificar diversas ferramentas de busca para a grande quantidade de espectros gerados na proteômica em larga escala. Algumas plataformas oferecem resultados em até 24hrs de análise, tornando o trabalho de bioinformática mais ágil e eficiente. Cada ferramenta de busca baseado em diferentes algoritmos, auxilia de forma sinérgica na identificação dos espectros. A avaliação dos peptídeos identificados pode ser feita de forma manual, tornando mais precisa a análise e montagem do proteoma *de novo* (BARSNES; VAUDEL, 2018; KISELEVA et al., 2018; MUTH et al., 2018).

Outro método bastante promissor, proteômica baseada em informações prévias como o transcriptoma, oferece resultados poderosos em relação a análise dos peptídeos identificados. Um transcriptoma montado como *database* para as análises proteômicas pode servir de background, auxiliando na caracterização de novos genes em organismos que não possuem seu genoma determinado. Além disso, já é demonstrado que a integração do transcriptoma com o proteoma pode aumentar a eficiência da anotação de genes possibilitando dados mais precisos (LUGE; FISCHER; SAUER, 2016; MARINGER et al., 2017; PRASAD et al., 2017).

Além de identificar as proteínas, também são necessárias ferramentas para a caracterização destas sequências peptídicas. De forma mais simples a busca por similaridade com sequências, de espécies relacionadas, já depositadas em bases de dados pode auxiliar nessa caracterização (GROSSMANN et al., 2007; JUNQUEIRA et al., 2008). Porém, para organismos não modelos ou não sequenciados, muitas proteínas podem apresentar variações que enfraquece essa busca, necessitando de abordagens com ferramentas mais acuradas. Nesse caso, podemos utilizar análises mais profundas, como a identificação de sequências funcionais mais preservados entre as espécies, os domínios conservados.

Ferramentas como o Interproscan (EMBL-EBI), auxiliam esse processo de análise avaliando a sequência de aminoácidos, através de um conjunto de *databases*, utilizando diferentes métricas para gerar um sistema de classificação das proteínas, ajudando o usuário a interpretar os dados obtidos (FINN et al., 2017; JONES et al., 2014). Assim como fazer a predição ou identificação de domínios conservados, a predição do modelo estrutural proteico também pode auxiliar no maior conhecimento de suas funções, interações, comportamento no ambiente e etc. Há décadas foram criadas diversas formas de predição estrutural e hoje já é possível para usuários de diferentes níveis de conhecimento de bioinformática. Os modelos são criados a partir de comparação com modelos semelhantes já depositados em bancos de dados (*homology modelling*), através das sequencia proteica (*protein threading*) ou criados em forma *de novo* (*ab initio*) (KUHLMAN; BRADLEY, 2019; ZHANG, 2008).

3 JUSTIFICATIVA

A esquistossomose é altamente relevante para a saúde pública por acometer milhões de pessoas ao redor do mundo e outros milhões vivem em risco de contrair a infecção. Seus hospedeiros intermediários, caramujos *Biomphalaria*, desempenham papel fundamental na propagação do parasita nos mais diversos ambientes. Dentro desta ótica, se faz necessário entender melhor a dinâmica da relação parasita-hospedeiro e das moléculas envolvidas durante o processo de infecção do caramujo pelo *S. mansoni*. A espécie *B. straminea*, grande competidora ecológica, altamente invasora de nichos e muito dispersa geograficamente encontra-se completamente envolvida pela manutenção do ciclo em determinadas áreas. Apesar das evidências da sua importância, são escassos os estudos com estes caramujos, com foco na resposta imune primária e secundária nesta espécie frente ao *S. mansoni*, principalmente quando falamos de metodologias de estudos mais aprofundados. Dentro de uma visão epidemiológica, esse trabalho de maneira pioneiro na área, veio buscar conhecimento básico gerando suporte para novos estudos, assim como, abrindo portas para a possibilidade de desenvolvimento de novas metodologias de controle da doença por meio de um melhor entendimento da relação parasita-hospedeiro intermediário.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Analisar o proteoma expresso durante a resposta imune primária e secundária de caramujos *Biomphalaria straminea* sadios e expostos ao *Schistosoma mansoni*.

4.2 Objetivos específicos

- a) Construir um *database* transcriptômico de *B. straminea*;
- b) Determinar *in silico* os principais grupos proteicos presentes na hemolinfa de *B. straminea*;
- c) Analisar as proteínas diferencialmente expressas da resposta primária na hemolinfa de *B. straminea* expostos *S. mansoni*
- d) Analisar as proteínas diferencialmente expressas da hemolinfa de *B. straminea* expostos *S. mansoni* durante o fenômeno de *immune priming*.
- e) Caracterizar *in silico* proteínas importantes à imunidade primária e secundária de *B. straminea*

5 METODOLOGIA

5.1 Obtenção dos caramujos e parasitas

Os caramujos *B. straminea* é uma linhagem de São Lourenço da Mata-PE, cedidos pelo moluscário do laboratório de referência em Esquistossomose do Instituto Aggeu Magalhães FIOCRUZ/PE. Os caramujos foram criados e mantidos no biotério experimental do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-LIKA/UFPE em aquários com água livre de cloro a 24°C. Foram alimentados com alfaces previamente higienizadas em solução de hipoclorito de sódio em água destilada

Os miracídios destinados à infecção dos moluscos foram obtidos a partir de camundongos infectados cepa LE de *S. mansoni* segundo a aprovação do CEUA 104/2016 do IAM – FIOCRUZ/PE. Foi realizada a técnica de sedimentação espontânea das fezes dos camundongos. As fezes foram maceradas, diluídas em água destilada, filtradas em peneira em um cálice de sedimentação e lavadas com água destilada para a retirada dos sedimentos presentes no material. Passada essa etapa, o material foi deixado em repouso *overnight*, a uma temperatura média de 8°C, na ausência de luz. Os ovos, uma vez depositados no fundo do cálice, foram expostos à luz artificial pelo período de uma hora para a eclosão dos miracídios. Os miracídios recuperados foram contados em lupa e utilizados para as infecções dos caramujos.

5.2 Obtenção das amostras e Extração do RNA do *B. straminea*

Para o sequenciamento do RNA foram utilizados caramujos na fase embrionária e adulta. Para obtenção da fase embrionária, os embriões foram retirados de dentro de massas de ovos de *B. straminea* com auxílio de lupa. Os embriões foram acondicionados em água ultrapura até a extração. Os caramujos adultos foram limpos com álcool 70% e sua concha retirada. Foi cortada a porção cefalopodal de cada indivíduo e colocado em solução de extração.

No material coletado foi extraído o RNA total usando Trizol seguindo o protocolo do fabricante com modificações (Invitrogen Cat N° 10296-010) combinado com o protocolo do PureLink RNA MiniKit (Invitrogen Cat N° 12183018A) afim de garantir um RNA purificado de alta qualidade. Foi adicionado 500 µL de Trizol, logo em seguida, o material foi macerado utilizando pistilo estéril livre de DNases e RNases, agitado em vórtex e centrifugado em 12000g por 5 min. O sobrenadante foi transferido para outro tubo com 100µL de clorofórmio, agitado à mão por 15 segundos e incubado em temperatura ambiente por 3 min. O material foi centrifugado novamente a 12000g por 15 min à 4°C e retirada a fase aquosa superior. Foi adicionado um volume de etanol 70% igual ao volume da amostra. Adicionou-se 700µL da amostra na coluna *spin cartridge* com tubo de coleta e centrifugado a 12000g em temperatura

ambiente (Foi repetida a etapa anterior até utilização de todo conteúdo da amostra). Foi adicionado 700µL do tampão de lavagem I à coluna e centrifugado a 12000g por 15s. Foi descartado o que ficou no tubo de coleta, a coluna foi inserida em um novo tubo e adicionado 500µL o tampão de lavagem II com etanol à coluna. O material foi centrifugado a 12000g por 15s. Após as etapas do tampão de lavagem II o material foi centrifugado em 12000g por 1 min e a coluna foi inserida em um tubo de recuperação. Foi adicionado 30 µL de água ultrapura e incubado em temperatura ambiente. O tubo foi centrifugado em 12000g por 2 min em temperatura ambiente e o material recuperado no tubo foi armazenado em - 80°C até o uso.

5.3 Quantificação e Análise de qualidade do RNA

As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro Qubit 3 (Life Technologies) utilizando o kit Qubit RNA HS Assay. A qualidade do RNA foi determinada em Bioanalyzer 2100 (Agilent) seguindo o protocolo do próprio fabricante.

5.4 Sequenciamento do RNA e obtenção do database

As amostras de embrião e corpo dos caramujos foram enviadas para sequenciamento do RNA total (RNAseq). Para o preparo da biblioteca foi utilizado o TruSeq Stranded mRNA eucariótico (Illumina). O sequenciamento foi feito em modo *pair ended* de 150pb em aparelho NovaSeq 6000 (Illumina) com 100 milhões de *reads* por amostra.

Tanto o preparo da biblioteca quanto o sequenciamento foram realizados pela empresa GENONE Biotechnologies sob financiamento do Edital FIOCRUZ PROEP 1658-2.13/15.

Os reads foram montados utilizando o pacote Trinity e o conjunto de transcritos foram traduzidos através do Transdecoder.

5.5 Processo de exposição de *B. straminea* ao *S. mansoni*

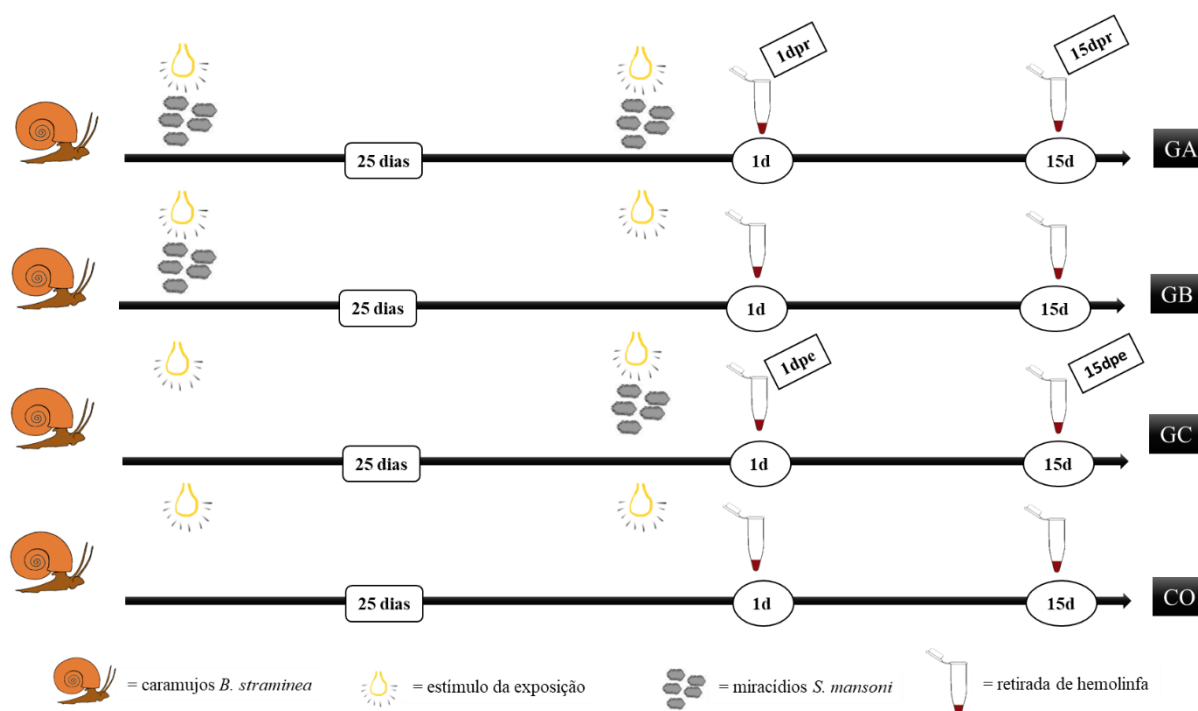
O processo de exposição ao parasita consistiu na colocação dos caramujos em placa de poços individuais onde ficaram em contato com 1mL de água destilada contendo cerca de 10 miracídios/poço. As placas com os moluscos foram expostas a luz artificial por um período de 1 hora e meia para a estímulo da penetração dos miracídios. Os grupos controle (estresse da exposição) foram expostos às mesmas condições da exposição, porém sem a presença de miracídios.

Depois de 1 e 15 dias após os procedimentos experimentais, a hemolinfa foi retirada por punção cefalopodal, utilizando ponteiras siliconizadas, e armazenada em microtubos com coquetel inibidor de protease (GE Healthcare) em freezer - 80°C até o uso.

5.6 Sensibilização dos caramujos pelo processo “*Immune priming*”

Para avaliação da resposta secundária, grupos de 10 indivíduos foram expostos individualmente a 10 miracídios e após 25 dias foi realizada uma reexposição seguindo os mesmos padrões da primeira (Grupo GA). Os controles experimentais estabelecidos foram: caramujos expostos a 10 miracídios e 25 dias após submetidos ao estresse controle (Grupo GB); caramujos submetidos ao estresse controle e 25 dias após expostos a 10 miracídios (Grupo GC); caramujos submetidos ao estresse da exposição e 25 dias após submetidos novamente ao estresse da exposição (Grupo CO). O desenho experimental pode ser resumido no quadro abaixo. Os experimentos foram realizados em triplicata em diferentes momentos.

Figura 5 - Mapa experimental do protocolo de *Immune Priming* de caramujos *B. straminea*



Legenda: GA, caramujos expostos individualmente a 10 miracídios e reexpostos 25 dias após a 10 miracídios; GB, caramujos expostos individualmente a 10 miracídios e 25 dias após submetidos ao estresse controle; GC, caramujos submetidos ao estresse controle e 25 dias após expostos a 10 miracídios; CO, caramujos submetidos ao estresse da exposição e 25 dias após submetidos novamente ao estresse da exposição sem miracídios; Estresse controle, caramujos submetidos às mesmas condições da exposição porém sem a presença de miracídios.

Para avaliação da resposta primária, foram utilizadas amostras do grupo GC, que consiste em caramujos expostos apenas uma vez ao parasita, correspondendo a 1 dia pós exposição (1dpe) e 15 dias pós exposição (15dpe).

As amostras do grupo GA, onde os caramujos foram expostos e reexpostos, correspondem à resposta secundária dos caramujos 1 e 15 dias pós reexposição, sendo nomeadas respectivamente 1 e 15dpr para as análises posteriores.

5.7 Extração das proteínas totais

A hemolinfa foi congelada e descongelada duas vezes em nitrogênio líquido e depois foi adicionado uma parte de tampão de extração de proteínas (SDS 12%; DTT 0,3 M; Tris-HCl 0,3M; pH 7,5) para duas partes de hemolinfa. As amostras foram aquecidas por 5 min a 95°C, misturadas em vortex e deixadas em banho sonicator por 1 hora. As proteínas foram centrifugadas a 14000g por 5 min e o sobrenadante foi armazenado em novos tubos.

5.8 Quantificação das proteínas totais

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

5.9 Digestão in gel e LC-MS/MS

Para espectrometria de massas em larga escala, o extrato proteico total da hemolinfa foi pré-fracionado por SDS PAGE utilizando gel de separação de poliacrilamida 12%. As bandas foram excisadas do gel, descoradas com 25mM de bicarbonato de amônio (ABC), etanol 50%, desidratado com etanol 100% e secos em concentrador a vacum. Proteínas foram reduzidas com 10mM DTT, 50mM ABC por uma hora a 56°C e alquiladas com 50mM de iodoacetamida, 50mM de ABC por uma hora em temperatura ambiente. As amostras foram lavadas em 50mM ABC e desidratados em 100% etanol por duas vezes. Depois, incubadas em tripsina 12.5ng/mL e ABC 50mM a 37°C por 18 horas. Após tripsinizados, os peptídeos foram extraídos da matriz de gel incubados duas vezes em 30% MeCN, 3% TFA e no final duas vezes em 100% MeCN. Os peptídeos foram concentrados em concentrador a vácuo através da evaporação do MeCN e dessalinização com colunas C18 feitas “*in house*”.

Os peptídeos foram analisados em cromatógrafo líquido Ultimate 3000 RSLCnano, acoplado a espectrômetro de massa Fusion Lumos (Thermo Scientific) (plataforma de espectrometria de massa RPT02H – Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ PARANA). A cromatografia inicial foi realizada em fluxo 250nL/min de 5 a 40% MeCN em ácido fórmico 1%, DMSO 5% em gradiente de 140 min. O espectrômetro operou em modo dado-dependente mudando da aquisição de MS para MS/MS. A varredura de espectros foi adquirida em analisador Orbitrap com resolução de 60.000 m/z. Os íons mais intensos foram isolados e fragmentados em armadilha linear (*Iontrap*) usando dissociação de colisão induzida com valor alvo de 30.000 m/z. Cada amostra foi analisada em triplicata.

5.10 Análise dos dados LC-MS/MS

Os dados brutos foram importados para o programa MaxQuant (versão 1.5.5.1) (COX; MANN, 2008) que utiliza algoritmo de busca em bancos de dados Andromeda (COX et al., 2011). Foram utilizados os parâmetros padrão do *software*. As proteínas foram procuradas contra o proteoma traduzido a partir do transcriptoma *de novo* montado (dados não publicados) contendo 130731 proteínas. A busca foi complementada com bancos de dados reverso para aumentar a confiabilidade da análise. Foram inseridas modificações padrão como Carbamidometilação da Cisteína e Oxidação da Metionina. No design experimental do MaxQuant, peptídeos de no mínimo sete aminoácidos foram aceitos. Em adicional, um *threshold* de *False Discovery Rate* (FDR) de 0.01 foi aplicado tanto para peptídeos quanto para proteínas. A quantificação foi realizada por meio da abordagem *label free*.

5.11 Análise estatística diferencial das proteínas

Os dados do MaxQuant foram inseridos e analisados no Perseus 1.6.0.7 (TYANOVA et al., 2016) para as devidas análises estatísticas dos grupos. As intensidades LQF foram transformadas para *log10* antes da obtenção da relação de cada proteína na comparação entre duas amostras. Foram consideradas proteínas com no mínimo 2 peptídeos únicos e detectadas em pelo menos três replicatas de cada grupo. A análise de expressão diferencial entre os devidos grupos expostos e sadios foram realizados através do teste t para resposta primária e teste ANOVA para secundária, e taxa de FDR baseado em permutação ($FDR < 0.05$) foi utilizado como método de correção dos p-values. Os dados obtidos foram exportados do Perseus e os gráficos foram gerados utilizando os softwares GraphPad Prism 8, Venny 2.1.0 (online server) e Microsoft Excel 2019.

5.12 Análises *downstream* de proteínas de *B. straminea*

Na determinação do proteoma geral dos caramujos, foram utilizadas as proteínas identificadas pelo MaxQuant (versão 1.5.5.1), obedecendo os critérios já mencionados anteriormente.

Na identificação das proteínas, foram feitas buscas através de ferramenta BLASTp (NCBI-NIH) sendo escolhidas as proteínas com maior percentual de identidade e menor e-value. As identificações com proteínas não caracterizadas foram identificadas posteriormente através das anotações e busca dos domínios conservados.

As proteínas foram anotadas utilizando o pacote de ferramentas INTERPROSCAN 5 (JONES et al., 2014), através de busca e análise de peptídeo sinal, domínios conservados,

domínios transmembranas, e BLAST2GO para predição de *gene ontology* e *pathways*. Foram aceitos todos os domínios identificados pelos programas em modo padrão.

Na predição tridimensional (3D) de estrutura foi utilizado o I-TASSER server (Yang; Zhang, 2015; Zhang et al., 2017) (disponível online) obedecendo os seguintes critérios de qualidade: C-score entre -5 e 2, sendo escolhido o modelo com maior score, consequentemente a predição mais confiante do I-TASSER; TM-score maior que 0.5, para indicar a relevância significativa do alinhamento com os *templates* usados do PDB. Foram utilizadas as ferramentas TM-align para alinhar o modelo predito com os modelos já depositados no banco de dados PDB. A predição de termos GO foi realizada pela ferramenta COACH e COFACTOR no I Tasser server. As estruturas preditas foram visualizadas, comparadas e exportadas no software Chimera 1.14.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Análise proteômica da hemolinfa de *Biomphalaria straminea*

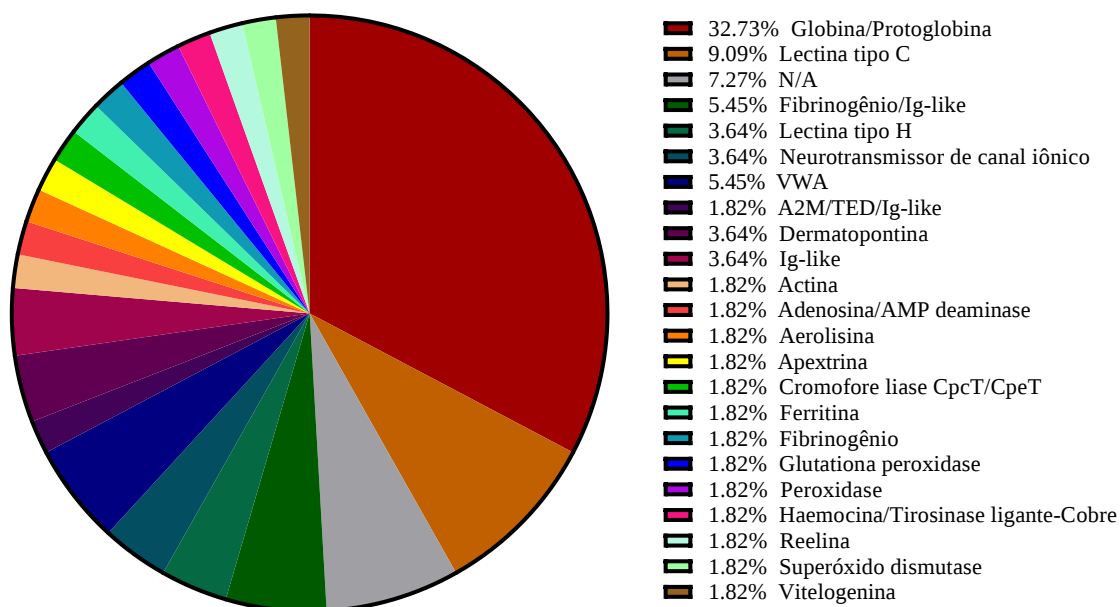
Estudos com *B. straminea* ainda são mais desafiadores, tendo em vista que, a espécie não possui bases para suporte de estudos moleculares como genoma e transcriptoma, além disso, as características morfológicas do caramujo dificultam de certa forma a obtenção de amostras para determinadas análises. Utilizando a abordagem proteômica baseada no transcriptoma *de novo* da própria espécie, pudemos obter resultados mais confiantes, uma vez que a busca e bases de dados de espécies diferentes, reduz o poder de identificação das proteínas.

Através do Maxquant e Perseus, foram identificadas 376 proteínas sendo 55 proteínas válidas (Tabela 1) após filtrados os potenciais contaminantes, proteínas reversas, proteínas presentes em no mínimo 3 replicatas de cada grupo e proteínas com no mínimo 2 peptídeos únicos identificados.

Pela ferramenta Interproscan, puderam ser identificados os domínios conservados das proteínas, agrupadas de acordo com suas famílias (Figura 6). Como já esperado, a maior prevalência é das famílias das globinas (Hemoglobinas tipo 1 e 2). Observamos também que os receptores de reconhecimento padrão (principalmente lectinas) compõem uma parcela relevante da hemolinfa desses caramujos. Uma variedade de outras moléculas imunorelevantes foram detectadas de forma constitutiva como: proteínas de ligação, moléculas de adesão celular, fatores de coagulação e moduladores do estresse oxidativo.

Interessante notar a identificação de uma proteína correspondente a *Biomphalysin* de *B. glabrata*, já descrita como altamente relacionada à resposta de *B. glabrata* contra diferentes agentes patógenos.

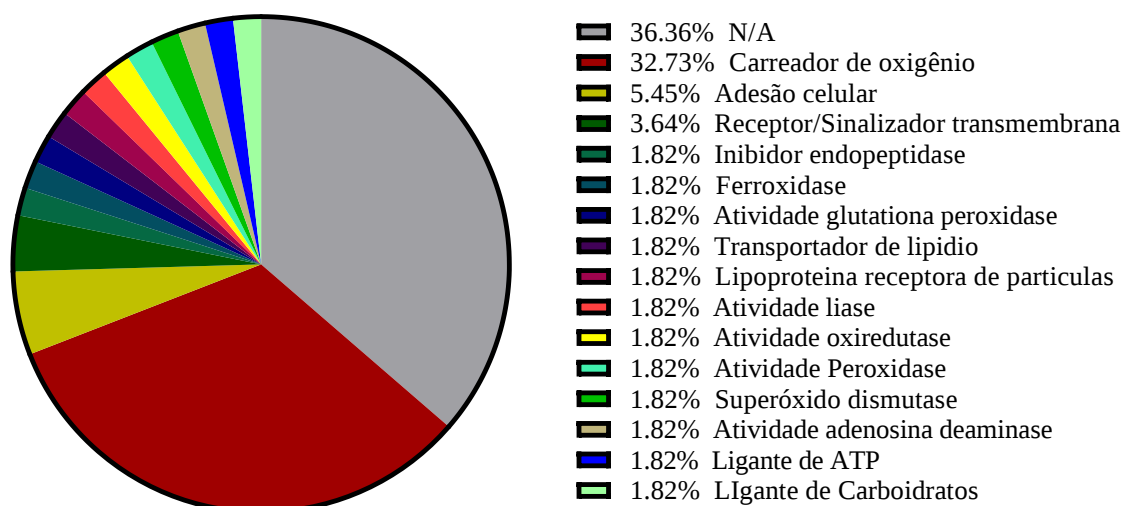
Figura 6 - Classificação das famílias proteicas da hemolinfa de *B. straminea*



Legenda: N/A, sem identificação; VWA, fator von Willebrand tipo A; A2M, alfa-2-macroglobulina; TED, tioéster domínio; Ig, imunoglobulina; AMP, monofosfato de adenosina.

Foram identificadas as principais funções moleculares das proteínas, sendo as mais representadas, proteínas relacionadas ao metabolismo de oxigênio, adesão celular, sinalização transmembrana e inibidores de atividade endopeptidase (Figura 7).

Figura 7 - Funções moleculares (GO Annotation) presentes na hemolinfa de *B. straminea*

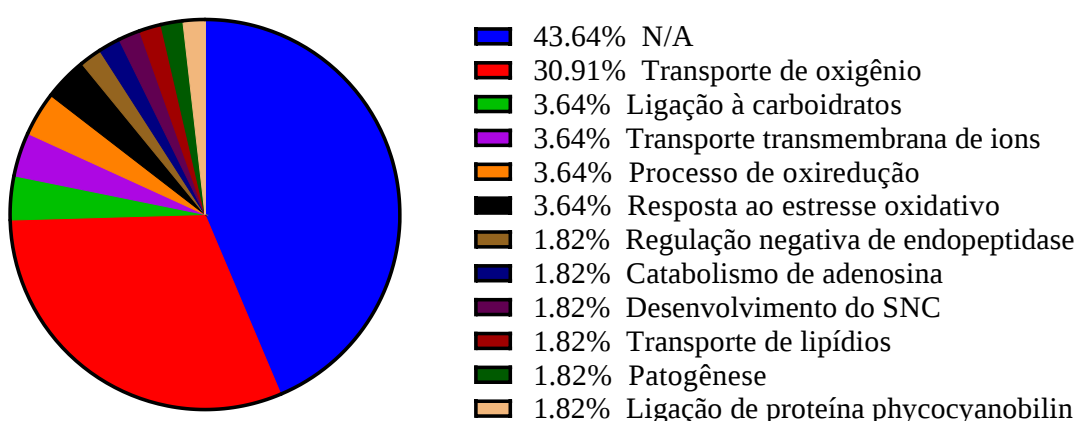


Legenda: N/A, sem identificação

Os principais processos biológicos, relacionados as proteínas encontradas, foram transporte de oxigênio, ligação à carboidratos, transporte iônico transmembrana e resposta ao estresse oxidativo (Figura 8). Algumas funções moleculares e processos biológicos representados como N/A (sem identificação) correspondem, em sua maioria, a proteínas cujos domínios conservados foram identificados, sendo principalmente, lectinas, FREPs, dermatopontina e fatores de coagulação (VWA).

Assim como sua baixa quantificação a nível de peptídeos, tal resultado indica que os *databases* ainda precisam de maior curadoria mesmo em espécies tão bem estudadas como *B. glabrata*, modelo mais próximo a ser comparado com *B. straminea*.

Figura 8 - Processos biológicos (GO Annotation) presentes na hemolinfa de *B. straminea*



Legenda: N/A, sem identificação; SNC, Sistema Nervoso Central

Tabela 1 - Proteínas identificadas na hemolinfa de *B. straminea*

Proteína ID	Descrição	<i>e</i> - Value	Função molecular	Processo biológico	Componente celular	Domínio conservado
BS_933_c0_g1_i1	Proteína contendo tioéster 1.4 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (ADE45341.1)	0	Atividade inibidora de endopeptidase	Regulação negativa de endopeptidase	Espaço extracelular	A2M/TED/Ig- like
BS_20736_c1_g1_i4	Actina [<i>Biomphalaria alexandrina</i>] (Q964E3.1)	0	Ligante ATP	N/A	Citoesqueleto/ citoplasma	Actina
BS_1183_c0_g2_i6	Proteína hipotética [<i>Elysia chlorotica</i>] (RUS86632.1)	2.8 ^{e-166}	Atividade deaminase de Adenosine	Processo catabólico de adenosine	Espaço extracelular	Adenosina/ amp deaminase
BS_GG54424_c0_g1_i1	Biomphalisina [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (AGG38744.1)	0	N/A	Patogênese	Espaço extracelular	Aerolisina
BS_1394_c0_g1_i5	Proteína não caracterizada LOC106074468 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013090709.1)	0	N/A	N/A	N/A	Apextrina
BS_15237_c0_g2_i3	Proteína não caracterizada LOC106067908 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013082633.1)	8.7 ^{e-89}	Atividade liase	Ligação à proteína phycocyanobilin	N/A	Cromóforo lyase cpct/cpet
BS_GG61688_c0_g1_i1	Proteína C ligante de manose-like [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013076984.1)	3.6 ^{e-106}	N/A	N/A	N/A	Lectina tipo C
BS_1552_c0_g1_i8	Perlucina-like [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013095831.1)	5.7 ^{e-61}	N/A	N/A	N/A	Lectina tipo C
BS_2738_c0_g3_i1	Precursor de proteína relacionada a lectina tipo C [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (AKS26831.1)	0	Ligante de carboidratos	N/A	N/A	Lectina tipo C
BS_1806_c1_g1_i2	Proteína não caracterizada LOC106077839 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013093994.1)	9.9 ^{e-160}	N/A	N/A	N/A	Lectina tipo C
BS_23811_c2_g1_i8	Perlucina-like isoformaa X1 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013093296.1)	8.4 ^{e-123}	N/A	N/A	N/A	Lectina tipo C

Proteína ID	Descrição	^{e-} Value	Função molecular	Processo biológico	Componente celular	Domínio conservado
BS_135331_c0_g1_i2	Dermatopontina-like [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013065369.1)	1.4 ^{e-94}	N/A	N/A	N/A	Dermatopontina
BS_3524_c0_g1_i4	Hemaglutinina N/Fator de agregação de amebócito-like [<i>Aplysia californica</i>] (XP_005099799.1)	3.4 ^{e-30}	N/A	N/A	N/A	Dermatopontina
BS_8929_c0_g1_i4	Ferritina [<i>Lymnaea stagnalis</i>] (AAB24080.1)	9.6 ^{e-130}	Atividade Ferroxidase	Processo de oxiredução	Região extracelular	Ferritina
BS_110_c0_g1_i1	Precursor de proteína relacionada ao fibrinogênio 12.1 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (AAO59918.1)	6.9 ^{e-103}	N/A	N/A	N/A	Fibrinogênio
BS_12630_c0_g1_i4	Proteína relacionada ao fibrinogênio 3.2 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (AEO50746.1)	0	N/A	N/A	N/A	Fibrinogênio /Ig-like
BS_1396_c0_g2_i1	Precursor de proteína relacionada ao fibrinogênio 7-1 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (AAK28657.1)	0	N/A	N/A	N/A	Fibrinogênio /Ig-like
BS_671_c1_g1_i2	Proteína não caracterizada LOC106057350 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013069968.1)	0	N/A	N/A	N/A	Fibrinogênio /Ig-like
BS_GG57353_c0_g1_i2	Hemoglobina tipo 1 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (CAJ44466.1)	0	Carreador de oxigênio	Transporte de oxigênio	N/A	Globina/ protoglobina
BS_GG57393_c5_g1_i1	Hemoglobina tipo 1 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (CAJ44466.1)]	1.7 ^{e-95}	Carreador de oxigênio	Transporte de oxigênio	N/A	Globina/ protoglobina
BS_GG94580_c0_g1_i1	Hemoglobina tipo 2 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (CAJ44467.1)	0	Carreador de oxigênio	Transporte de oxigênio	N/A	Globina/ protoglobina
BS_1826_c0_g1_i11	Hemoglobina tipo 1 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (CAJ44466.1)	0	Carreador de oxigênio	Transporte de oxigênio	N/A	Globina/ protoglobina
BS_2647_c0_g1_i2	Hemoglobina tipo 1 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (CAJ44466.1)	0	Carreador de oxigênio	Transporte de oxigênio	N/A	Globina/ protoglobina
BS_3437_c1_g1_i1	Hemoglobina tipo 1 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (CAJ44466.1)	0	Carreador de oxigênio	Transporte de oxigênio	N/A	Globina/ protoglobina
BS_10165_c1_g1_i9	Hemoglobina tipo 1 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (CAJ44466.1)	0	Carreador de oxigênio	Transporte de oxigênio	N/A	Globina/ protoglobina

Proteína ID	Descrição	<i>e</i> - Value	Função molecular	Processo biológico	Componente celular	Domínio conservado
BS_42769_c0_g2_i2	Hemoglobina, parcial [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (CAH23232.1)	3.4 ^{e-103}	Carreador de oxigênio	Transporte de oxigênio	N/A	Globina/ protoglobina
BS_1826_c0_g1_i4	Hemoglobina tipo 2, parcial [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (CAJ44467.1)	0	Carreador de oxigênio	Transporte de oxigênio	N/A	Globina/ protoglobina
BS_GG3742_c0_g1_i3	Hemoglobina tipo 1 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (CAJ44466.1)	0	Carreador de oxigênio	Transporte de oxigênio	N/A	Globina/ protoglobina
BS_GG34885_c0_g1_i4	(CAJ44467.1) Hemoglobina tipo 2, parcial [<i>Biomphalaria glabrata</i>]	0	Carreador de oxigênio	Transporte de oxigênio	N/A	Globina/ protoglobina
BS_GG71186_c1_g1_i1	Proteína não caracterizada LOC106077292 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013093514.1)	0	Ligante de oxigênio	N/A	N/A	Globina/ protoglobina
BS_1826_c0_g3_i1	Hemoglobina tipo 1 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (CAJ44466.1)	0	Carreador de oxigênio	Transporte de oxigênio	N/A	Globina/ protoglobina
BS_10165_c3_g2_i1	Hemoglobina tipo 2, parcial [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (CAJ44467.1)	0	Carreador de oxigênio	Transporte de oxigênio	N/A	Globina/ protoglobina
BS_14877_c0_g2_i3	Proteína não caracterizada LOC106051763 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013062423.1)	0	Carreador de oxigênio	Transporte de oxigênio	N/A	Globina/ protoglobina
BS_20810_c1_g1_i15	Hemoglobina tipo 1 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (CAJ44466.1)	0	Carreador de oxigênio	Transporte de oxigênio	N/A	Globina/ protoglobina
BS_GG17413_c1_g1_i1	Proteína não caracterizada LOC106077292 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013093514.1)	0	Carreador de oxigênio	Transporte de oxigênio	N/A	Globina/ protoglobina
BS_34478_c0_g1_i1	Proteína não caracterizada LOC106051916 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013062584.1)	4.8 ^{e-72}	Carreador de oxigênio	Transporte de oxigênio	N/A	Globina/ protoglobina
BS_68501_c4_g1_i1	Glutathione peroxidase-like isoforma X1 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013085877.1)	2.8 ^{e-51}	Atividade Glutathione peroxidase	Resposta ao estresse oxidativo	N/A	Glutathione peroxidase
BS_39386_c0_g1_i1	Peroxidasin-like, parcial [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013088968.1)	1 ^{e-134}	Atividade Peroxidase	Resposta ao estresse oxidativo	N/A	Peroxidase

Proteína ID	Descrição	e^- Value	Função molecular	Processo biológico	Componente celular	Domínio conservado
BS_5323_c0_g1_i 2	Hemocianina 1 [<i>Lymnaea stagnalis</i>] (AYO86691.1)	0	Atividade Oxidoreductase	N/A	N/A	Tirosinase ligante de cobre
BS_42594_c0_g2 _i1	Proteína não caracterizada LOC106073432 isoforma X2 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013089439.1)	5.5×10^{-100}	Adesão celular	Ligante de carboidratos	N/A	Lectina tipo H
BS_46313_c1_g2 _i1	Proteína não caracterizada LOC106080195 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013096977.1)	1.9×10^{-158}	Adesão celular	Ligante de carboidratos	N/A	Lectina tipo H
BS_22496_c0_g1 _i1	Proteína não caracterizada LOC106074953 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013091310.1)	0	N/A	N/A	N/A	Ig-like
BS_981_c0_g1_i1	Proteína não caracterizada LOC106057350 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013069968.1)	1.7×10^{-100}	N/A	N/A	N/A	Ig-like
BS_GG4875_c0_ g1_i1	Proteína não caracterizada LOC106080264 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013097064.1)	9×10^{-75}	N/A	N/A	N/A	N/A
BS_12630_c1_g1 _i3	Proteína relacionada ao fibrinogênio I1, parcial [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (AQX34544.1)	9×10^{-124}	N/A	N/A	N/A	N/A
BS_2731_c0_g1_i 7	Proteína não caracterizada LOC106073816 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013089916.1)	5.5×10^{-175}	N/A	N/A	N/A	N/A
BS_31689_c0_g1 _i1	Proteína não caracterizada LOC106080264 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013097064.1)	3.5×10^{-159}	Adesão celular	Ligante de carboidratos	N/A	N/A
BS_3582_c0_g1_i 6	Proteína ligante de acetilcolina-like [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013067425.1)	5.7×10^{-159}	Receptor/ Sinalizador transmembrana	Transporte íons transmembrana	Componente de membrana	Ligante de neurotransmisso r de canal iônico

Proteína ID	Descrição	<i>e</i> - Value	Função molecular	Processo biológico	Componente celular	Domínio conservado
BS_GG55479_c0_g1_i1	Proteína ligante de acetilcolina-like isoforma X2 (XP_013067425.1) [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013067427.1)	5.5 ^{e-156}	Receptor/sinalizador transmembrana	Transporte íons transmembrana	Componente de membrana	Ligante de neurotransmissor de canal iônico
BS_7642_c0_g1_i9	Reelina-like isoforma X2 [<i>Aplysia californica</i>] (XP_012938500.1)	0	Ligante/receptor de partículas de lipoproteínas	Desenvolvimento SNC	N/A	Reelina
BS_11914_c0_g1_i7	Proteína contendo domínio de dedo de Zn GATA 14-like isoforma X1 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013076718.1)	0	Atividade superóxido dismutase	Processo de oxirredução	N/A	Superóxido dismutase
BS_2683_c0_g1_i2	Apolipoproteína B-100-like [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013087403.1)	0	Transporte de lipídios	Transporte de lipídio	N/A	Vitelogenina
BS_29353_c0_g1_i1	Colágeno cadeia alfa-6(VI) like, parcial [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013064043.1)	0	N/A	N/A	N/A	VWA
BS_14097_c0_g2_i1	Colágeno cadeia alfa-1(XII) like [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013088320.1)	0	N/A	N/A	N/A	VWA
BS_38421_c0_g1_i4	Colágeno cadeia alfa-5(VI) like [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013079619.1)	6.8 ^{e-144}	N/A	N/A	N/A	VWA

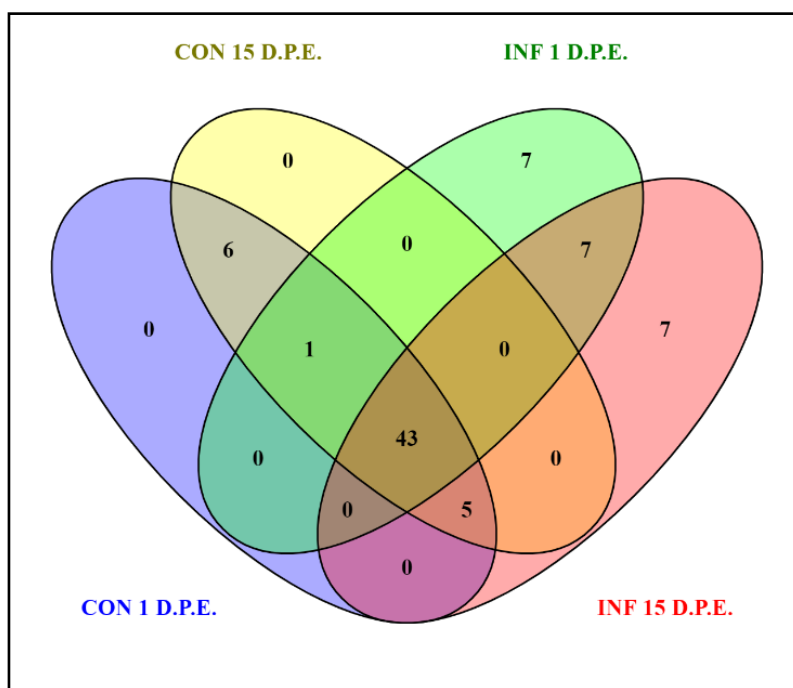
Legenda: N/A, sem identificação; A2M, alfa-2-macroglobulina; TED, domínio tioéster; Ig, Imunoglobulina, VWA, von Willebrand fator A

6.2 Proteínas diferencialmente expressas na resposta primária de *B. straminea* exposto ao *S. mansoni*

De forma qualitativa, no primeiro tempo de exposição (1dpe), identificamos 11 proteínas exclusivas no grupo controle e 14 no grupo exposto. Já no tempo 15 dias após a exposição, 7 proteínas exclusivas no controle e 14 do grupo exposto foram detectadas. O fato de uma proteína estar exclusivamente identificada apenas no grupo exposto, nos leva a pensar que essa proteína foi expressa apenas após a exposição enquanto que, quando identificada apenas no controle, nos indica que pode ter sido suprimida ou regulada a níveis muito baixos pós exposição, não sendo detectada nesse estudo. Nesse caso, essas proteínas exclusivas não foram utilizadas nos testes estatísticos de expressão diferencial, porém podem auxiliar enriquecendo ainda mais o conhecimento de funções relevantes da resposta imune do caramujo.

Analisando as proteínas identificadas em cada um dos grupos nos dois tempos de exposição (Figura 9), foram listadas 7 proteínas exclusivas do grupo exposto 1 dpe (INF 1DPE) (Tabela 2) e 7 exclusivas do grupo exposto 15 dpe (INF 15DPE) (Tabela 3).

Figura 9 - Diagrama das proteínas identificadas na hemolinfa de *B. straminea* controle e nos tempos de 1 e 15 dias após a exposição ao *S. mansoni*



Legenda: CON 1 D.P.E, controle 1 dia pós exposição; CON 15 D.P.E, controle 15 dias pós exposição, INF 1 D.P.E., 1 dia pós exposição; INF 15 D.P.E., 15 dias pós exposição

Tabela 2 - Proteínas exclusivas identificadas na hemolinfa de *B. straminea* 1 dia após exposição ao *S manson*

ID Proteína	Descrição (Número de Acesso)	^{e-} value	Domínios conservados	Função Molecular (Anotação GO)	Pep. Únicos
BS_14372_c0_g2_i1	Ferritina, subunidade-like [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013074559.1)	0.0	Ferritina/ Proteína DPS (IPR008331)	Atividade Ferroxidase	5
BS_9397_c0_g2_i1	Ferritina de gema-like [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013073968.1)	9.1 ^{e-} 153	Ferritina/ Proteína DPS (IPR008331)	Atividade Ferroxidase	6
BS_26314_c0_g3_i1	Fator de extensão 1-alfa [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013067348.1)	0.0	Fator de transcrição, domínio de ligação GTP (IPR000795)	Fator de tradução e extensão	6
BS_44943_c0_g2_i1	BgLBP/BPI1 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (AGG82435)	0.0	Glicoproteína de soro ligante de lipídio (IPR017942)	Ligação a lipídios	16
BS_4672_c0_g1_i6	Proteína ligante de acetilcolina-like isoforma X2 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013067427.1)	2.9 ^{e-} 144	Ligante de neurotransmissor de canal iônico (IPR006202)	Receptor/sinalizador transmembrana	3
BS_GG82383_c0_g1_i1	Proteína não caracterizada LOC106066172 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013080598.1)	0.0	Domínio tirosinase ligante de Cobre (IPR002227)	Resposta ao estresse oxidativo	7
BS_GG92484_c0_g1_i1	Proteína não caracterizada LOC106073842, parcial [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013089951.1)	2.9 ^{e-94}	N/A	N/A	2

Legenda: Pep. Únicos: peptídeos únicos; N/A: sem identificação.

Tabela 3 - Proteínas exclusivas identificadas na hemolinfa de *B. straminea* 15 dias após exposição ao *S. mansoni*.

ID Proteína	Descrição (Número de Acesso)	<i>e</i> - value	Domínios conservados	Função Molecular (Anotação GO)	Pep. Únicos
BS_1689_c0_g1_i4	Miosina heavy chain, striated muscle-like isoforma X12 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013069053.1)	0.0	Miosina	Atividade motora	24
BS_19624_c0_g1_i17	Para miosina-like isoforma X2 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013078396.1)	0.0	Miosina	Atividade motora	20
BS_20810_c1_g1_i12	Hemoglobina tipo 2, parcial [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (CAJ44467.1)	0.0	Globina	Ligante de oxigênio	3
BS_34913_c0_g2_i2	Precursor de proteína relacionada ao Fibrinogênio 12.1 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (AAO59918.1)	1 ^{e-91}	Fibrinogênio, cadeia alpha/beta/gamma	N/A	2
BS_49268_c0_g1_i1	Fibrinogênio cadeia beta-like [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013075689.1)	6.8 ^{e-72}	Imunoglobulina-like	N/A	3
BS_7049_c0_g2_i5	Proteína relacionada a galectina 1.1, parcial [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (APL98355.1)	0.0	Galectina; reconhecimento de carboidratos	Ligante de carboidratos	5
BS_94223_c0_g1_i1	Proteína contendo domínio putativo C1q MgC1q10 [<i>Mytilus galloprovincialis</i>] (CBX41659.1)	0.0	C1q (IPR001073)	Ligante de proteínas	4

Legenda: Pep. Únicos: peptídeos únicos; N/A: sem identificação.

Para análise estatística diferencial, foram selecionadas apenas as proteínas com valores de quantificação (LFQ) presentes nos grupos controle e exposto, em pelo menos três amostras de cada grupo e no mínimo 2 peptídeos únicos. Foram consideradas diferencialmente expressas proteínas com $FDR \leq 0.05$ e variação mínima de *fold change* (s0) igual a 0.5 nos testes estatísticos. No total, os grupos 1 dpe e 15 dpe apresentaram 43 e 48 proteínas válidas, respectivamente.

Na expressão diferencial no grupo 1 dpe foram identificadas 25 proteínas diferencialmente expressas, sendo 18 proteínas *up* reguladas e 7 *down* reguladas (Tabela 4). No grupo 15 dpe, 31 proteínas foram diferencialmente expressas, sendo 26 proteínas foram *up* reguladas e 5 *down* reguladas (Tabela 5).

Tabela 4 - Proteínas diferencialmente expressas em *B. straminea* 1 dpe ao *S. mansoni*

Proteína ID	Descrição (Numero de acesso)	<i>e</i> - <i>value</i>	Domínios conservados	Função Molecular (Anotação GO)	Pep. Únicos	FOLD CHANGE
BS_1552_c0_g1_i8	Perlucina-like [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013095831.1)	2.6 ^{e-57}	Lectina tipo C	N/A	15	2,57
BS_20736_c1_g1_i4	Actina [<i>Biomphalaria alexandrina</i>] (Q964E0.1)	0.0	Actina	Ligante de ATP	12	2,51
BS_46313_c1_g2_i1	H-type lectin domain-containing protein (XP_013096977.1)	1,7 ^{e-154}	Lectina tipo H	Ligante de carboidratos	12	2,31
BS_39386_c0_g1_i1	Peroxidase-like [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013088968.1)	1 ^{e-134}	Superfamília Peroxidase	Resposta ao estresse oxidativo	7	2,03
BS_GG99659_c0_g1_i1	Proteína não caracterizada LOC106080255 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013096977.1)	1.5 ^{e-77}	Lectina tipo H	Ligante de carboidratos	6	1,88
BS_38421_c0_g1_i4	Collagen alpha-5(VI) chain-like [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013079619.1)	1.8 ^{e-128}	VWA	N/A	2	1,41
BS_68501_c4_g1_i1	Glutathione peroxidase-like [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013085877.1)	1.3 ^{e-47}	Glutathione peroxidase	Resposta ao estresse oxidativo	6	1,32
BS_14097_c0_g2_i1	Collagen alpha-1(XII) chain- like [<i>Biomphalaria glabrata</i>]	0.0	VWA	N/A	18	1,26
BS_3582_c0_g1_i6	Proteína ligante de acetilcolina- like [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013067424.1)	2.7 ^{e-155}	Ligante de neurotransmissor de canal iônico	Receptor/sinalizador transmembrana	2	1,23
BS_3524_c0_g1_i4	Hemagglutinin/amebocyte aggregation factor [<i>Aplysia</i>	1.6 ^{e-26}	Dermatopontina	N/A	9	1,09

Proteína ID	Descrição (Numero de acesso)	e^- value	Domínios conservados	Função Molecular (Anotação GO)	Pep. Únicos	FOLD CHANGE
	californica] (XP_005099799.1)					
BS_34478_c0_g1_i1	Hemoglobina tipo 2 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (CAJ44467.1)	$2.2e^{-68}$	Globina	Carreador de oxigênio	4	0,90
BS_4672_c0_g1_i6	Proteína ligante de acetilcolina- like [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013067424.1)	$1.3e^{-140}$	Ligante de neurotransmissor de canal iônico	Receptor/sinalizador transmembrana	3	0,83
BS_5323_c0_g1_i2	Hemocianina 1 [<i>Lymnaea</i> <i>stagnalis</i>] (AYO86691.1)	0.0	Tirosinase ligante de cobre	Atividade oxidoreductase	75	0,79
BS_1826_c0_g1_i4	Hemoglobina tipo 2 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (CAJ44467.1)	0.0	Globina	Carreador de oxigênio	5	0,69
BS_29353_c0_g1_i1	Colágeno cadeia alfa-6(VI) like [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013064043.1)	0.0	VWA	N/A	20	0,65
BS_8929_c0_g1_i4	Ferritina da gema de caramujo [<i>Lymnaea stagnalis</i>] (P42578.1)	$4.5e^{-126}$	Ferritina/Proteína DPS	Ligante de íons Ferro	17	0,62
BS_GG3742_c0_g1_i3	Hemoglobina tipo 1 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (CAJ44466.1)	0.0	Globina	Carreador de oxigênio	8	0,61
BS_GG34885_c0_g1_i4	Hemoglobina tipo 2, parcial [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (CAJ44467.1)	0.0	Globina	Carreador de oxigênio	18	0,57
BS_GG55479_c0_g1_i1	Proteína ligante de acetilcolina- like isoforma X2 [<i>Biomphalaria</i>	$5.5e^{-156}$	Ligante de neurotransmissor de	Receptor/sinalizador transmembrana	6	-0,76

Proteína ID	Descrição (Numero de acesso)	e^- value	Domínios conservados	Função Molecular (Anotação GO)	Pep. Únicos	FOLD CHANGE
	<i>glabrata</i>] (XP_013067427.1)		canal iônico			
BS_20810_c1_g1_i15	Hemoglobina tipo 1 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (CAJ44466.1)	0.0	Globina	Carreador de oxigênio	20	-0,90
BS_10165_c1_g1_i1	Hemoglobina tipo 1 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (CAJ44466.1)	0.0	Globina	Carreador de oxigênio	53	-1,00
BS_GG57393_c5_g1_i1	Hemoglobina tipo 1 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (CAJ44466.1)	1.7^{e-95}	Globina	Carreador de oxigênio	6	-1,56
BS_3437_c1_g1_i1	Hemoglobina tipo 1 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (CAJ44466.1)	0.0	Globina	Carreador de oxigênio	11	-2,67
BS_14877_c0_g2_i3	Hemoglobina tipo 1 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (CAJ44466.1)	0.0	Globina	Carreador de oxigênio	44	-3,17
BS_GG17413_c1_g1_i1	Proteína não caracterizada LOC106077292 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013093514.1)	0.0	Globina	Carreador de oxigênio	17	-3,72

Legenda: Pep. Únicos: peptídeos únicos; N/A: sem identificação; VWA, fator de von Willebrand tipo A

Tabela 5 - Proteínas diferencialmente expressas em *B. straminea* 15 dpe ao *S. mansoni*

Proteína ID	Descrição (Numero de acesso)	<i>e</i> -value	Domínios conservados	Função Molecular (Anotação GO)	Pep. Únicos	FOLD CHANGE
BS_5323_c0_g1_i2	Hemocianina 1 [<i>Lymnaea stagnalis</i>] (AYO86691.1)	0.0	Tirosinase ligante de Cobre	Resposta ao estresse oxidativo	75	2,85
BS_20736_c1_g1_i4	Actina citoplasmática [<i>Biomphalaria alexandrina</i>] (Q964E0.1)	0.0	Actina	Ligante ATP	12	2,61
BS_GG71186_c1_g1_i1	Hemoglobina tipo 1 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (CAJ44466.1)	0.0	Globin	Carreador de oxigênio	7	2,06
BS_14097_c0_g2_i1	Colágeno cadeia alfa-1(XII) like [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013088320.1)	0.0	VWA	N/A	18	1,60
BS_46313_c1_g2_i1	Proteína não caracterizada LOC106080195 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013096977.1)	1,7 ^{e-154}	H-type lectin	Ligante de carboidratos	12	1,42
BS_38421_c0_g1_i4	Collagen alpha-5(VI) chain-like [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013079619.1)	1,8 ^{e-128}	VWA	N/A	2	1,34
BS_14877_c0_g2_i3	Proteína não caracterizada LOC106051763 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013062423.1)	0	Globin	Carreador de oxigênio	44	1,30
BS_1552_c0_g1_i8	Perlucin-like [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013095831.1)	2,6 ^{e-57}	C-type lectin-like	N/A	15	1,29
BS_GG57393_c5_g1_i1	Hemoglobina tipo 1 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (CAJ44466.1)	7,7 ^{e-92}	Globina	Carreador de oxigênio	6	1,22
BS_981_c0_g1_i1	Proteína não caracterizada LOC106057350 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013069968.1)	7,9 ^{e-97}	Ig-like	N/A	5	1,20
BS_42594_c0_g2_i1	Proteína não caracterizada LOC106073432 isoform X2 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013089439.1)	1,3 ^{e-90}	Lectina tipo H	Ligante de carboidratos	8	1,13
BS_GG55479_c0_g1_i1	Proteína ligante de Ach tipo 1	2,5 ^{e-152}	Ligante de	Receptor de sinalização	6	1,13

Proteína ID	Descrição (Numero de acesso)	<i>e</i> -value	Domínios conservados	Função Molecular (Anotação GO)	Pep. Únicos	FOLD CHANGE
	[<i>Biomphalaria glabrata</i>] (AFQ55390.1)		neurotransmissor de canal iônico	transmembrana		
BS_29353_c0_g1_i1	Colágeno alfa-6(VI) cadeia-like, partial [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013064043.1)	0	VWA	N/A	20	1,08
BS_GG94580_c0_g1_i1	Proteína não caracterizada LOC106050211, partial [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013060615.1)	0	Globina	Carreador de oxigênio	2	0,99
BS_GG17413_c1_g1_i1	Proteína não caracterizada LOC106077292 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013093514.1)	0	Globina	Carreador de oxigênio	17	0,90
BS_10165_c1_g1_i9	Hemoglobina tipo 1 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (CAJ44466.1)	0	Globina	Carreador de oxigênio	53	0,81
BS_3437_c1_g1_i1	Hemoglobina tipo 1 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (CAJ44466.1)	0	Globina	Carreador de oxigênio	11	0,77
BS_3582_c0_g1_i6	Proteína ligante de ACh [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013067424.1)	2,7 ^{e-155}	Ligante de neurotransmissor de canal iônico	Receptor de sinalização transmembrana	2	0,75
BS_1826_c0_g1_i4	Hemoglobina tipo 2, parcial [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (CAJ44467.1)	0	Globina	Carreador de oxigênio	5	0,67
BS_39386_c0_g1_i1	Peroxidasin-like, parcial [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013088968.1)	1 ^{e-134}	Peroxidase, tipo animal	Resposta ao estresse oxidativo	7	0.66
BS_GG61688_c0_g1_i1	Proteína ligante de manose C-like [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013076984.1)	2 ^{e-103}	Lectina tipo C	Ligante de carboidratos	3	0,65
BS_68501_c4_g1_i1	Glutathione peroxidase-like isoforma X1 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013085877.1)	2.8 ^{e-51}	Glutathione peroxidase	Resposta ao estresse oxidativo	6	0.64
BS_22496_c0_g1_i1	Angiopoietin-2-like [<i>Biomphalaria</i>	0.0	Ig-like	N/A	4	0,59

Proteína ID	Descrição (Numero de acesso)	<i>e</i> -value	Domínios conservados	Função Molecular (Anotação GO)	Pep. Únicos	FOLD CHANGE
BS_2731_c0_g1_i7	<i>glabrata</i>] (XP_013088362.1) Proteína não caracterizada LOC106073816 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013089916.1)	3 ^{e-172}	N/A	N/A	6	0,53
BS_42769_c0_g2_i2	Hemoglobina tipo 1 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (CAJ44466.1)	3,4 ^{e-103}	Globina	Carreador de oxigênio	5	0.47
BS_7642_c0_g1_i9	Reelin-like [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013064208.1)	0.0	Reelina; EGF-like; Ligante de Galactose	Desenvolvimento do SNC	44	0.46
BS_3524_c0_g1_i4	Hemaglutinina N/ Fator de agregação [<i>Aplysia californica</i>] (XP_005099799.1)	1,6 ^{e-26}	Dermatopontina	N/A	9	-0.50
BS_110_c0_g1_i11	Proteína relacionada ao fibrinogênio 12.1 precursor [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (AAO59918.1)	3,2 ^{e-99}	Fibrinogênio cadeia alfa/beta/gama	N/A	2	-0.52
BS_31689_c0_g1_i1	Proteína não caracterizada LOC106080264 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013097064.1)	9,4 ^{e-156}	N/A	Ligante de carboidratos	8	-0,76
BS_23811_c2_g1_i8	Perlucina-like isoforma X1 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013093296.1)	1,2 ^{e-109}	Lectina tipo C	N/A	3	-1,00
BS_933_c0_g1_i1	Proteína contendo tioéster 1.4 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (ADE45341.1)	0.0	AM; TED; A2M; Ig-like	Inibidor de Endopeptidase	2	-1,40

Legenda: Pep. Únicos: peptídeos únicos; N/A: sem identificação; SNC, sistema nervoso central; TED, domínio tio éster; AM, alfa-macroglobulina; A2M, alfa-2-macroglobulina; Ig, Imunoglobulina

Em relação ao mapeamento de termos GO podemos agrupar essas proteínas de acordo com suas funções moleculares, processos biológicos e/ou componente/localização celular. Foi realizada a quantificação do número de sequências por termos GO nas três divisões das proteínas super expressas em 1 (Figura 10) e 15 d.p.e (Figura 11). Tal análise nos mostra quais vias ou mecanismos possuem uma maior abundância de representantes durante a resposta imune ao parasita. Podemos observar com maior atenção que o metabolismo de oxigênio juntamente com mecanismos de adesão celular e estresse oxidativo estão mais representados dentro dos processos biológicos nos dois momentos pós exposição.

Figura 10 Principais termos *gene ontology* mapeados nas proteínas super expressas 1 dia pós exposição de *B. straminea* ao *S. mansoni*

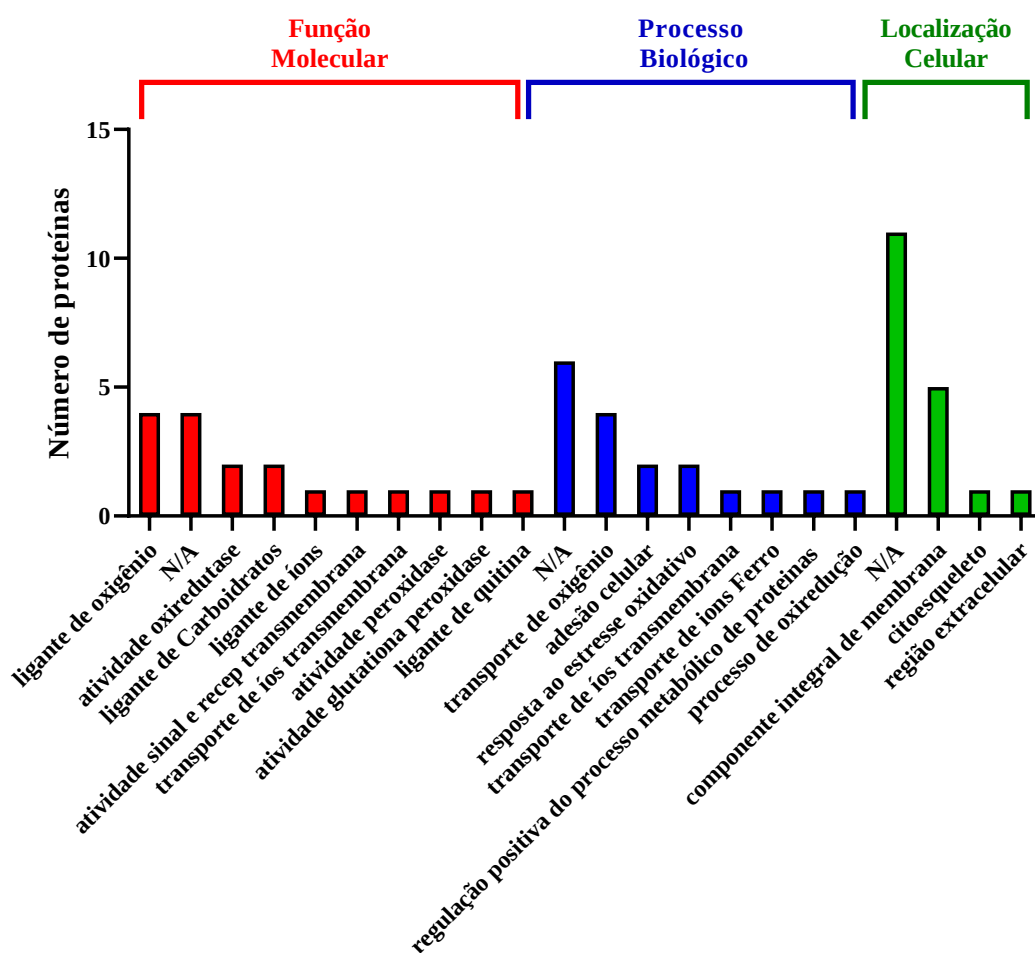
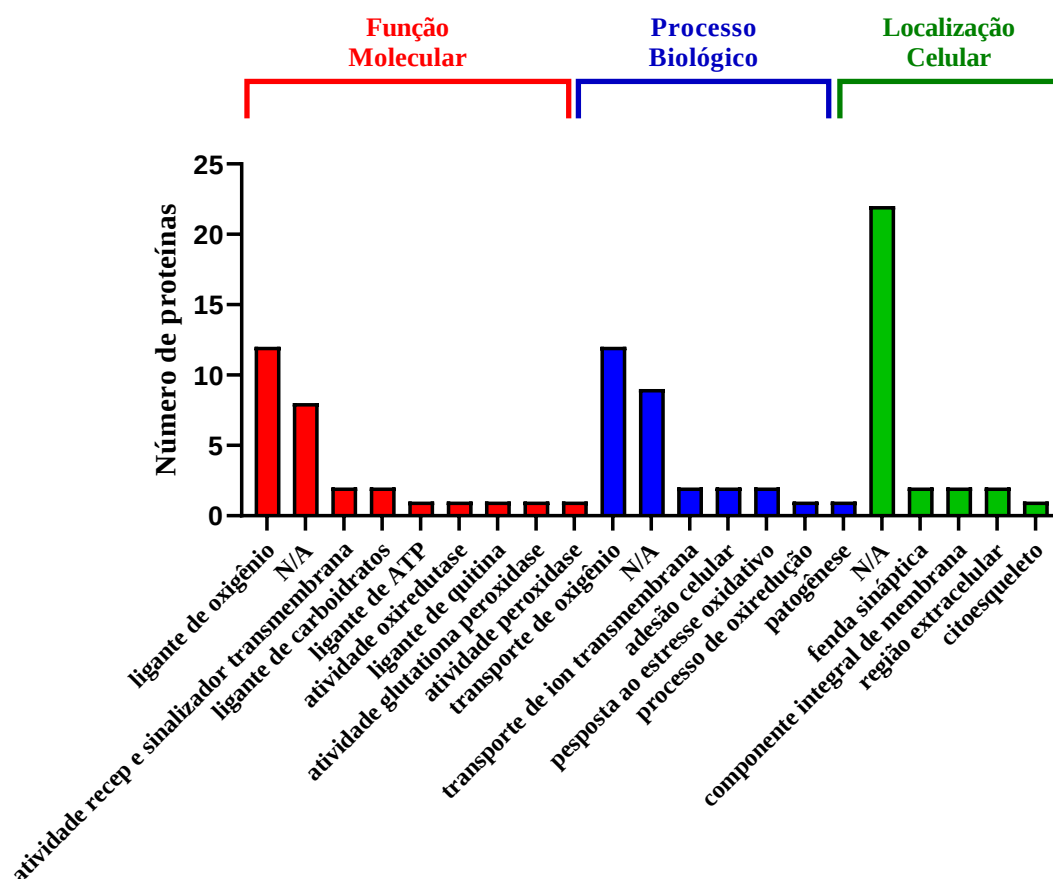
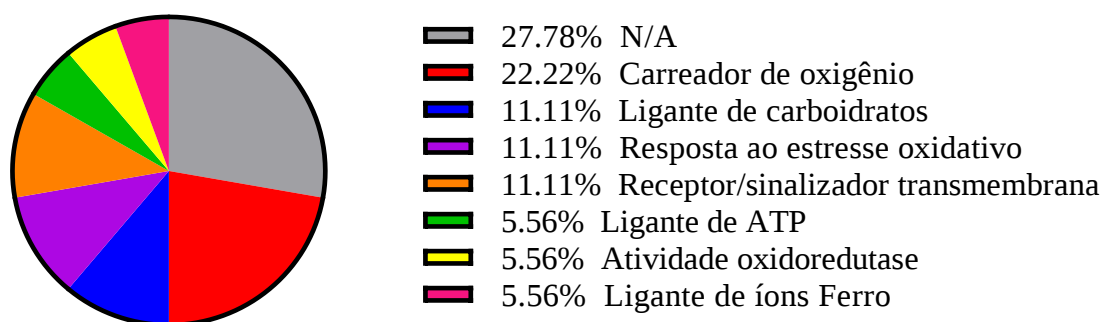


Figura 11 Principais termos gene ontology mapeados nas proteínas super expressas 15 dias pós exposição de *B. straminea* ao *S. mansoni*



Avaliando principais funções moleculares das proteínas exclusivas e *up* reguladas de 1dpe, pode-se observar o aumento das funções relacionadas ao metabolismo de oxigênio, stress oxidativo, atividade ferroxidase (ligantes de Fe^+) e ligantes de carboidratos (lectinas) (Figura 12).

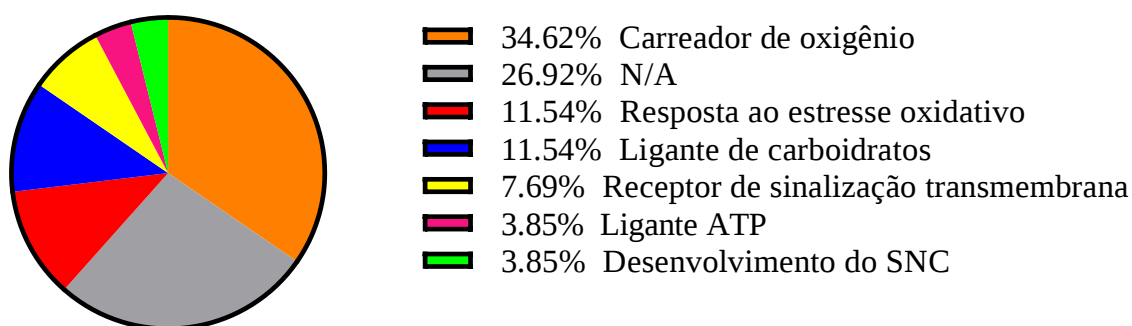
Figura 12 - Principais funções moleculares super expressas em *B. straminea* 1 dia pós exposição ao *S. mansoni*



A via de produção de ROS em linhagens resistentes de *B. glabrata* é superexpressa enquanto que a atividade da ferroxidase é importante para a proteção contra esse “*oxidative burst*” gerado durante a resposta oxidativa ao parasita, como relatado em estudos anteriores por Blouin et al., (2013) e Lockyer et al., (2007). Portanto, tais vias atuam de forma conjunta durante a resposta imune.

Já no tempo 15 dpe, podemos observar um aumento nas funções de mobilidade celular, juntamente com processos de adesão e reconhecimento (Figura 13). Nos dois momentos de exposição, algumas proteínas cujos termos GO não foram preditos possuem são de famílias relevantes para imunidade do caramujo como lectinas, FREPs, moléculas de adesão celular e aerolisina. Podemos inferir a partir disso que ainda é necessária uma maior curadoria dos bancos utilizados para a busca e anotação das proteínas.

Figura 13- Principais funções moleculares super expressas em *B. straminea* 15 dias pós exposição ao *S. mansoni*



Interessante notar que algumas proteínas não possuíram seu mapeamento GO devidamente completo, porém seus domínios conservados foram devidamente identificados. Tais proteínas pertencem principalmente às famílias de lectinas, FREPs, fatores de coagulação e aerolisinas, mostrando relevância imunológica.

Aprofundando-se nas proteínas diferencialmente expressas durante a resposta imune primária de *B. straminea*, é possível inferir diferentes processos e funções moleculares ativadas durante essa resposta.

Além de serem as mais abundantes da hemolinfa, as hemoglobinas são descritas com capacidade de se ligar ao tegumento do esporocisto durante o processo patogênico (WU et al., 2017). COATES e DECKER (2017) relatam a importância das hemoglobinas quando descrevem suas funções em diferentes grupos de vertebrados e invertebrados, citando o

possível envolvimento dessas proteínas na cascata de atividade da fenoloxidase durante a resposta imune inata. Muitos estudos negligenciam o papel das hemoglobinas, assim como, de outras proteínas constitutivas que não estão relacionadas diretamente ao sistema imune, utilizando metodologias que removem esses componentes mais abundantes por interferirem em certas abordagens proteômicas.

Proteínas da família das globinas (hemoglobina tipo 1 e 2) foram encontradas em sua maioria *up* reguladas nos grupos 1 e 15 dpe do *B. straminea* ao *S. mansoni* (Figura 10 e 11). No primeiro grupo (1dpe), podemos observar uma quantidade maior de isoformas super expressas correspondentes à hemoglobina tipo 2. Já no segundo momento pós exposição (15dpe) ocorre uma mudança da predominância do tipo de hemoglobina, sendo as hemoglobinas tipo 1 mais identificadas entre as proteínas super expressas nesse grupo.

No estudo realizado por TETREAU et al. (2017), foi identificada a super expressão de hemoglobinas tipo 2 em *B. glabrata* expostos ao *S. mansoni*. Os mesmos autores, também citam o papel importante não só das hemoglobinas completas como também de peptídeos liberados por essas grandes proteínas, chamados *cryptides*. As proteínas completas se clivam liberando esses peptídeos de diferentes pesos moleculares que estão envolvidos em funções intimamente semelhantes às suas proteínas progenitoras (COATES; DECKER, 2017). Esse fenômeno pode explicar o fato de encontrarmos proteínas diferencialmente expressas com sequências compatíveis com hemoglobina, porém com diferentes pesos moleculares em *B. straminea* exposto.

A hemocianina (Hc) é uma das maiores e mais abundantes proteínas presente na hemolinfa de *B. straminea*. Em *B. straminea*, a Hc se apresenta diferencialmente expressa nos dois momentos pós exposição. Ao longo do tempo foi constatada que, esta proteína não é apenas uma carreadora de oxigênio, ela também possui peculiaridades funcionais que estão relacionadas à imunidade inata em invertebrados. Essa função se dá pela presença de domínios funcionais, principalmente o domínio tirosinase ligante de cobre, que a faz ser inserida na superfamília de proteínas de cobre tipo 3 possuindo atividade enzimática importante, sendo de forma geral, ativadora de vias da fenoloxidase e melanização, altamente relacionadas à resposta imune inata, como foi visto por (COATES; DECKER, 2017; COATES; NAIRN, 2014; PEÑA; ADEMA, 2016).

Apesar desta proteína também poder estar envolvida com vias como a da fenoloxidase, em um trabalho realizado por DE MELO et al., (2019) não foi possível detectar atividade da fenoloxidase significativa em *B. straminea* frente ao *S. mansoni*, através da via da L-DOPA,

nos primeiros momentos da infecção, porém é relatado no mesmo subgrupo 24h pós exposição, um possível aumento na atividade enzimática em tempos posteriores, corroborando com nossos achados. Além disso, outros autores citam funções importantes da Hc como precursora de peptídeos antimicrobianos (QIN et al., 2018; QIU et al., 2014), antivirais (DOLASHKA; VOELTER, 2013) e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (JIANG et al., 2007; ZHENG et al., 2016).

Sabemos que além da hemocianina, outras proteínas relacionadas com o metabolismo de oxigênio estão envolvidas na resposta imune de invertebrados. Nossos resultados sugerem que são necessários estudos mais aprofundados acerca dessa via de defesa contra o parasita, assim como a importância dessas moléculas classificadas anteriormente como relacionadas apenas com o metabolismo de oxigênio em espécies próximas como *B. glabrata*.

Moléculas que também se comportaram com expressão diferencial são as enzimas peroxidase (PRx) e glutathione peroxidase (GPx), que apresentaram regulação positiva em ambos os tempos de exposição ao parasita. A via da resposta imune inata por meio de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo é descrita nos grupos de invertebrados, podendo ser ativada frente a fatores bióticos e abióticos, sendo também precedentes e/ou sinergistas de outras vias como adesão e encapsulação celular. Além de *B. glabrata*, é observada também em outros moluscos como *Lymnaea stagnalis*, um aumento da produção dessas moléculas quando expostos a cercarias de *Echinoparyphium aconiatum* (ABBAS; KAUSAR; CUI, 2019; BUCHMANN, 2014; MITTA et al., 2017; VORONTSOVA et al., 2019).

HAHN; BENDER; BAYNE, (2001) detectaram através da infecção de uma linhagem resistente de *B. glabrata*, a morte da maioria dos esporocistos em um tempo de 48h após a exposição. Além disso, os autores reportam que as espécies reativas de oxigênio produzidas por essas enzimas conseguem, por si só, destruir o esporocisto em plasma livre de células, evidenciando que tal via é bastante eficiente para trematódeos como o *S. mansoni* (BENDER et al., 2005). Seguindo a mesma temática, enzimas com características semelhantes à peroxidase e a glutathione peroxidase também foram descritas em linhagens mais resistentes de *B. glabrata*, fenótipo semelhante ao *B. straminea*, mostrando a similaridade de vias de resposta dessas duas espécies frente ao parasito (BLOUIN et al., 2013; FOGARTY et al., 2019).

Em nossos resultados, podemos observar que a ativação de vias de resposta ao estresse oxidativo se sustentam durante todo período de exposição, sendo uma via chave na defesa de *B. straminea* contra o *S. mansoni*.

Apesar de serem moléculas bastante efetivas, sabe-se que as ROS não atuam sozinhas na destruição do parasita. O sistema imune do caramujo é dotado de outros mecanismos que se complementam durante a resposta contra patógenos, além disso, algumas proteínas que não possuem papel principal na resposta imune, podem se mostrar diferencialmente expressas em certos momentos de exposição.

Representantes homologas da ferritina também foram encontradas exclusivamente em *B. straminea*. Estudo realizado em camarão *Macrobrachium nipponense*, descreveu o envolvimento dessas proteínas com a homeostase de ferro e sua atividade imuno moduladora durante os danos oxidativos causados pelas peroxidases na resposta imune inata (TANG et al., 2019).

A actina foi uma proteína que se manteve super expressa em ambos os grupos de caramujos expostos (1 e 15 dpe). Sabe-se que essa proteína pode estar envolvida na formação de complexos proteína-proteína, estruturação do citoesqueleto e adesão celular, porém, uma função imune especial, é a atuação na formação das fendas dos chamados *rhogocytes*. *Rhogocytes* são células descritas em diferentes grupos de invertebrados como células multifuncionais com grande potencial metabólico, responsáveis também pela produção de proteínas envolvidas no transporte de oxigênio, principalmente hemocianinas e hemoglobinas (KOKKINOPOULOU et al., 2014, 2015; MARTIN et al., 2011). Diante disto, podemos sugerir a possibilidade da mudança de expressão de moléculas de actina juntamente com moléculas de hemoglobina, estarem relacionadas com um dos mecanismos da resposta desses caramujos contra o trematódeo.

As vias de adesão e encapsulação também são cruciais para o processo de destruição de patógenos pelos caramujos *Biomphalaria*. Apesar de não possuir estudos a respeito dessas vias, em *B. straminea*, detectamos expressão de proteínas da família do fator de coagulação de von Willebrand tipo A (VWA). Em ambos os momentos de exposição, as mesmas proteínas se mantiveram com expressão aumentada em relação ao controle, sugerindo que os processos de adesão celular e coagulação são bem presentes nesses grupos.

Estudos relacionam o domínio VWA com a capacidade de participar de interações proteína-proteína, assim como, é um dos fatores presentes na coagulação relacionada ao sistema imune e homeostase do indivíduo durante o processo patogênico (BOUCHUT et al., 2006; TETREAU et al., 2017). Em nosso estudo, analisando a sequência destas proteínas em *B. straminea*, observamos que tal domínio VWA possui um motivo conservado bastante importante, o MIDAS (*metal ion dependent adhesion site*). Esse motivo encontra-se altamente

preservado em integrinas, responsáveis por interação célula-célula e célula-matriz extracelular, estando envolvido em vias de sinalização e recepção de algumas espécies de invertebrados como *Litopenaeus vannamei* (ZHANG et al., 2012) e *Fenneropenaeus chinensis* (TANG; WANG; ZHAN, 2012). Assim, a presença destas proteínas em *B. straminea* sugere funções relacionadas às descritas pelos estudos previamente citados.

Proteínas relacionadas a sinalização e recepção de neurotransmissores apresentaram comportamento diferentes entre as amostras 1dpe e 15dpe de *B. straminea*. Foi possível observar em ambos momentos, a predominância da regulação positiva de proteínas ligantes de Acetilcolina (AchBP), além da mudança de expressão de uma delas (BS_GG55479_c0_g1_i1, Tabela 4) de down regulada em 1dpe para up regulada em 15dpe. Tais moléculas foram encontradas em abundância no plasma de *B. glabrata* exposto ao *S. mansoni*, porém continuam desconhecidas em relação a função imunológica nesses caramujos, sendo descritas em vias fisiológicas em diferentes classes de invertebrados como regulador da transmissão pós sináptica (MCCORMACK et al., 2010; WU et al., 2017)

Seguindo a linha de proteínas relacionadas com o sistema nervoso, observamos a proteína homóloga a *reelin-like up* regulada em *B. straminea* 15pe. Em estudos com *B. glabrata*, essa proteína foi detectada com expressão aumentada, quando avaliaram o transcriptoma desses caramujos 12h pós exposição ao *S. mansoni* (ADEMA et al., 2010) e também quando determinarão o proteoma diferencial de hemócitos isolados de linhagem resistente e incubados com esporocistos do mesmo parasita por 18h, evidenciando que são moléculas que se mostram abundantes em diferentes momentos da exposição, porém com funções específicas ainda não descobertas na relação *Biomphalaria-Schistosoma* (DINGUIRARD et al., 2018).

Em nossas análises identificamos tanto como super expressas em 1dpe, quanto entre as exclusivas dessas amostras de caramujos expostos, proteínas com domínio de ferritina. Estudos anteriores mostram que tais moléculas são as principais responsáveis pelo metabolismo de ferro na maioria dos organismos, sabendo que, o ferro atua como catalisador para espécies reativas de oxigênio, esta molécula pode estar envolvida também nas reações de estresse oxidativo (COUSTAU et al., 2015; WATT, 2011). Em análise de transcriptômica da interação de *B. glabrata* e *S. mansoni*, a ferritina foi observada super expressa em linhagens resistentes, porém, os caramujos expostos a miracídios viáveis ou atenuados, mostram o mesmo comportamento transcripcional, relacionando a ferritina ao processo do dano tecidual causado pela infecção e não à resposta ao parasita propriamente dita (ARICAN-GOKTAS et al., 2014).

Nas nossas análises encontramos também mudança no perfil de expressão em um correspondente à família das dermatopontinas com expressão aumentada em 1dpe e suprimida em 15dpe. Estas moléculas são componentes importantes na formação da matriz extracelular onde sequências homólogas são descritas também, em outros tipos de moluscos (WANG et al., 2015)

Tais moléculas, especificamente na espécie modelo, *B. glabrata*, apresentaram expressão gênica diferencial em linhagem menos suscetível desafiada pelo trematódeo *Echinostoma caproni* (MITTA et al., 2005). Corroborando com nosso achado em *B. straminea*, em *B. glabrata*, a dermatopontina apresentou uma maior expressão 48 horas após a exposição ao *E. caproni*, quando avaliado perfil proteômico de hemócitos de linhagens suscetível e resistente do caramujo (BOUCHUT et al., 2006). Em outra abordagem metodológica, transcritos dessa proteína foram também mais expressos um dia após a exposição de *B. glabrata* ao *E. caproni* (HANINGTON et al., 2010). Ambos estudos mostram que esta molécula é ativa nos primeiros momentos da infecção de *B. glabrata*, atuando na formação de uma cápsula hemocítica e em *B. straminea*, podemos sugerir que a atividade siga o mesmo padrão da espécie modelo.

Foram identificadas proteínas com domínio *C-type lectin* (CTL) diferencialmente expressas nos dois momentos de exposição ao parasita. Através da análise das sequências, pudemos identificar similaridade com a *perlucin-like* de *B. glabrata*. Uma isoforma dessa proteína (BS_1552_c0_g1_i8) apresentou valor de fold change mais alto no grupo 1 dpe, sendo mantida sua super expressão em 15dpe, porém com nível de quantificação menor. Apesar de possuírem o domínio CTL conservado, não foi detectado nessas sequências, o domínio de imunoglobulina (Igsf2), que caracteriza a estrutura completa de CREPs, como descritas por Dheilly et al. (2015) em *B. glabrata*. Essa modificação pode ser explicada pela diferença filogenética das espécies estudadas, nos incentivando a estudos mais aprofundados sobre essas moléculas em *B. straminea*, com propósito de elucidar melhor tais variedades dessa família proteica.

Interessante notar que uma isoforma de CTL foi encontrada *down* regulada 15 dias após exposição ao parasita, podendo indício da tentativa do parasita de suprimir certas moléculas de defesa do hospedeiro ou que no momento avaliado tal proteína já estivesse ligada à superfície do parasita e por isso pouco quantificada.

Em linhagem susceptível de *B. glabrata*, transcritos correspondentes à lectina tipo C, foram encontrados com expressão gênica aumentada poucas horas após a exposição aos

miracídios de *S. mansoni* (ITTIPRASERT et al., 2010). Já WU et al. (2017) em análise proteômica, detectaram a presença de proteínas com domínio CTL no plasma livre de células de linhagens de modelo suscetível (NMRI) e resistente (BS-90) de *B. glabrata* quando incubadas com esporocistos de *S. mansoni*.

Um conjunto de moléculas incomuns que se apresentou com expressão diferencial aumentada nos caramujos *B. straminea* expostos ao *S. mansoni*, foram proteínas com domínio de lectina tipo H, alvo de alguns estudos por sua capacidade de ligação à carboidratos principalmente de células tumorais (PIETRZYK-BRZEZINSKA; BUJACZ, 2020). Esse domínio é bastante raro e em consequência, ainda pouco estudado principalmente nos invertebrados, sendo descrito primeiro em caramujos *Helix pomatia* como *Helix pomatia agglutinin* (HPA), estando relacionada segundo Sanchez et al., (2006), à aspectos imunoprotetores e reprodutivos nesta espécie.

As lectinas nos invertebrados aparecem como uma prova da complexidade da resposta imune inata diante dos desafios desses indivíduos e especialmente em *B. glabrata*, possuem papel fundamental na via de defesa contra trematódeos, como o *S. mansoni* (COUSTAU et al., 2015). Essas proteínas compartilham importantes domínios conservados de lectinas, e são classificadas em três principais grupos em *B. glabrata*: *fibrinogen related proteins* (FREPs), *galectin-related proteins* (GREPs) e *C-type lectin related protein* (CREPs) (DHEILLY et al., 2015; WU et al., 2017).

Em *B. straminea*, no grupo 15 dpe, foi identificado um correspondente ao FREP12 com expressão *down* regulada no tempo mais tardio de infecção. Esse resultado sugere que a ausência nos tempos precoces, pode ser pelo fato dos FREPs apresentarem uma maior complexidade de isoformas e estrutura, onde um conjunto de genes precisam ser transcritos para a montagem de tais proteínas, sendo necessário um tempo maior por meio dessa resposta. Interessante notar que nos grupos analisados na expressão diferencial, não foram encontrados muitos membros da família dos FREPs, em contrapartida, nas amostras apenas de caramujos expostos 15dpe foi possível identificar outras proteínas homologas as FREPs, mostrando que algumas famílias desses imune efetores são produzidas apenas mediante aos estímulos. PORTET et al. (2017), justificam a ausência de FREPs na abordagem proteômica *label free* pelo fato de que os FREPs se ligarem a antígenos do parasita e se precipitam, sendo perdidos durante o processo de obtenção das proteínas. Tal hipótese justifica o fato de encontrarmos vários componentes homólogos as FREPs apenas nas amostras de caramujos controle,

sugerindo que nos indivíduos expostos, essas proteínas poderiam já estar ligadas aos antígenos do parasita.

Além disso, sabe-se que o fato de as FREPs serem uma família, com várias subfamílias estruturais diferentes, criam lacunas de um melhor entendimento de como essas vias atuam.

No grupo 15dpe, foi observado o menor valor de quantificação em relação ao controle correspondente a uma molécula homóloga à *thioester-containing protein* 1.4 (ADE45341.1) de *B. glabrata*. Tal proteína foi encontrada fazendo parte dos imunocomplexos formados durante a resposta imune, conhecidas como BgTEPs de acordo com Mitta et al. (2012), onde através do domínio macroglobulina consegue interagir com receptores na superfície de hemócitos promovendo o recrutamento celular. Em outro estudo esta molécula foi descrita com alta capacidade de ligação aos miracídios de *S. mansoni* em poucas horas pós a exposição, assim como, contendo diversas subfamílias desta proteína onde funcionalmente pode agir tanto como opsonina como também com atividade antiprotease, na neutralização de fatores liberados pelo *S. mansoni* (DUVAL et al., 2020; PORTET et al., 2018).

6.3 Análise proteômica da resposta secundária de *B. straminea* frente ao *S. mansoni*

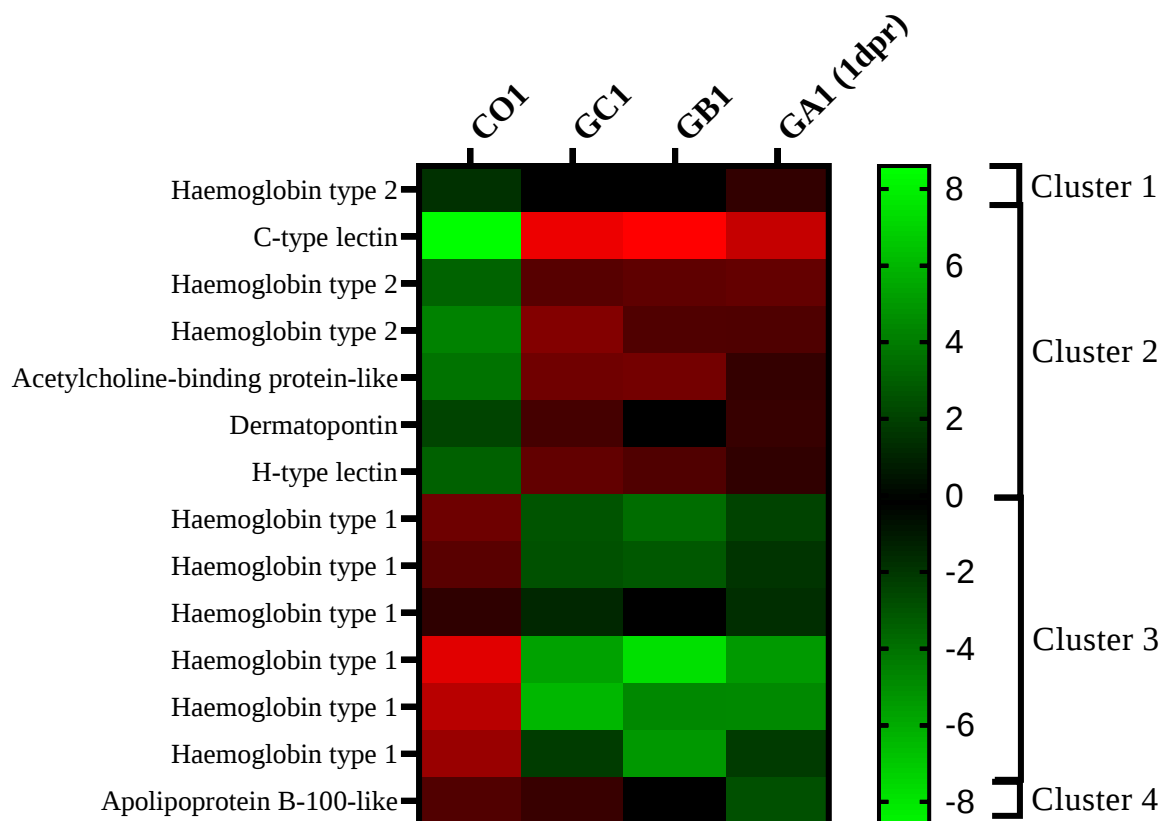
A capacidade de resposta secundária, podendo ser chamada também de resposta imune inata de memória ou fenômeno de *immune priming*, confere aos invertebrados sucesso durante o contato recorrente com diversos agentes patógenos. O fato de ser exposto de forma subletal e conseguir, de certa forma, se reorganizar frente a uma segunda exposição, torna o fenômeno *immune priming* um salto relevante no processo evolucionário desses organismos (SHEEHAN; FARRELL; KAVANAGH, 2020).

Existem diversos métodos de indução de resposta secundária em invertebrados, porém especificamente em *Biomphalaria*, o mais praticado e aceito na maioria dos estudos de resposta imune, é a indução do fenômeno de *immune priming*, proposto por PORTELA et al. (2013) e utilizado também neste estudo com *B. straminea*, consistindo na exposição e na reexposição do caramujo ao parasita.

Através da análise proteômica da hemolinfa total, conseguimos observar os principais grupos proteicos envolvidos na resposta imune inata de memória de *B. straminea* exposto e reexposto ao *S. mansoni*. Assim como na resposta primária, foram consideradas diferencialmente expressas proteínas com *q-value* <0.05; variação mínima de *fold change* (*s0*) igual a 0.5 e pós teste com $FDR \leq 0.05$ no teste estatístico ANOVA. Além disso, apenas as proteínas que se apresentaram estatisticamente significantes entre o grupo referente à reexposição (GA) e seus respectivos controles (CO, GC e GB) foram consideradas diferencialmente expressas na resposta secundária.

No grupo GA1, referente à resposta 1 dia pós reexposição (1dpr) foram identificadas 41 proteínas, dentre elas, 14 com expressão diferencial estatisticamente significativa. A expressão das proteínas se mostrou agrupadas nos seguintes clusters: *Cluster 1*, proteínas com regulação positiva apenas após a reexposição; *Cluster 2*, proteínas que se mostraram expressas positivamente durante a primeira exposição e durante a reexposição é aumentada, *Cluster 3* proteínas *down* reguladas na resposta primária e continuam *down* reguladas na secundária; *Cluster 4*: proteínas *down* reguladas exclusivas de caramujos reexpostos (Figura 14, Tabela 6).

Figura 14 - Comparação da expressão proteica diferencial de *B. straminea* 1 dia após a reexposição ao *S. mansoni* (GA1)



Legenda: GA (1dpr), caramujos expostos individualmente a 10 miracídeos e reexpostos 25 dias após a 10 miracídeos; GB, caramujos expostos individualmente a 10 miracídeos e 25 dias após submetidos ao estresse controle; GC, caramujos submetidos ao estresse controle e 25 dias após expostos a 10 miracídeos; CO, caramujos submetidos ao estresse da exposição e 25 dias após submetidos novamente ao estresse da exposição sem miracídeos.

Tabela 6 - Proteínas diferencialmente expressas 1 dia após a reexposição de *B. straminea* ao *S. mansoni* (GA1)

Proteína ID	Descrição (Número de acesso)	e-value	Domínio conservado	Pep. únicos	Anotação GO	FOLD CHANGE GA1
BS_10165_c3_g2_i1	Hemoglobina tipo 2 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (CAJ44467.1)	0.0	Globina	12	Ligante de oxigênio	1.6669
BS_1552_c0_g1_i8	Perlucina-like [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013095831.1)	2 ^{e-58}	Lectina tipo C	15	Ligante de carboidratos	6.63814
BS_1826_c0_g1_i4	Hemoglobina tipo 2 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (CAJ44467.1)	0.0	Globina	5	Ligante de oxigênio	3.36735
BS_3582_c0_g1_i6	Proteína ligante de acetilcolina-like [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013067424.1)	2 ^{e-156}	Neurotransmissor de canal iônico	2	Receptor/ sinalizador transmembrana	1.74817
BS_3524_c0_g1_i4	Hemagglutina N/ Fator de agregação-like [<i>Aplysia californica</i>] (XP_005099799.1)	1 ^{e-27}	Dermatopontina	9	N/A	1.84368
BS_46313_c1_g2_i1	Proteína não caracterizada [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013096977.1)	8 ^{e-156}	Lectina tipo H	12	Ligante de carboidratos	1.5976
BS_GG34885_c0_g1_i4	Hemoglobina tipo 2 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (CAJ44467.1)	0.0	Globina	18	Ligante de oxigênio	2.64429
BS_10165_c1_g1_i9	Hemoglobina tipo 1 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (CAJ44466.1)	0.0	Globina	12	Ligante de oxigênio	-2.26564
BS_3437_c1_g1_i1	Hemoglobina tipo 1 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (CAJ44466.1)	0.0	Globina	11	Ligante de oxigênio	-1.76042
BS_42769_c0_g2_i2	Hemoglobina tipo 1 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (CAJ44466.1)	1 ^{e-92}	Globin	5	Ligante de oxigênio	-1.55682
BS_20810_c1_g1_i15	Hemoglobina tipo 1 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (CAJ44466.1)	0.0	Globin	20	Ligante de oxigênio	-5.19961
BS_GG17413_c1_g1_i1	Hemoglobina tipo 1 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (CAJ44466.1)	5 ^{e-141}	Globin	17	Ligante de oxigênio	-4.6187
BS_GG57393_c5_g1_i1	Hemoglobina tipo 1 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (CAJ44466.1)	7 ^{e-93}	Globina	6	Ligante de oxigênio	-1.997
BS_2683_c0_g1_i2	Apolipoproteína B-100-like [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013087403.1)	0.0	Transporte de lipídio	49	Transporte de lipídios	-2.71839

Legenda: N/A, sem identificação

Na resposta primária foi observada a regulação negativa de hemoglobinas tipo 1 e regulação positiva predominantemente de hemoglobinas tipo 2 em 1dpe enquanto que em 15 dpe, ambos os tipos se mostraram super expressos. No primeiro tempo de análise da resposta secundária (1dpr) (Figura 14), foram observadas hemoglobinas tipo 2 com expressão aumentada e exclusiva no grupo GA1 (resposta secundária). Uma mudança no padrão do tipo de hemoglobina foi observada ao longo do tempo, uma vez que em 15 dias pós reexposição (15dpr) (Figura 15), hemoglobinas tipo 1 foram detectadas com regulação positiva (Figura 15, Cluster 1), enquanto as tipo 2 se mostraram suprimidas apenas durante a reexposição (Figura 13, Cluster 3). Em relação a essas moléculas, estudos complementares são necessários para entender melhor qual o papel das hemoglobinas especificamente na resposta imune secundária de *B. straminea*.

Dentro do cluster 2 podemos observar a expressão diferencial da resposta sustentada, proposta anteriormente por Pinaud et al., (2016) em *B. glabrata*, onde proteínas já expressas em grupos controles que representam a resposta primária (GC1 e GB1), se mostram mais expressas na segunda exposição ao parasita. Os componentes mais representativos são as lectinas e a dermatopontina, ligadas ao processo de reconhecimento e adesão celular respectivamente.

Em especial, as lectinas tipo C e tipo H são componentes que surgem com regulação positiva na resposta primária e aumentam sua expressão 1 dia após a reexposição em *B. straminea*. Exclusivamente, a lectina tipo H foi identificada em *B. straminea* durante a resposta primária e secundária em nosso estudo, porém nunca foi reportada nos estudos que utilizam *B. glabrata*. Nossos achados em relação as lectinas tipo C corroboram com o identificado por Pinaud et al., (2016) e Tetreau et al., (2017) quando encontraram estas proteínas super expressas em nível transcriptômico e proteômico de caramujos *B. glabrata* submetidos ao processo de *immune priming* para avaliação da resposta secundária. Outros trabalhos relatam também, transcritos relacionados a essa família de proteínas sendo encontrados *up* regulados em desafios heterólogos de parasitas, submetendo *B. glabrata* a exposição e reexposição com cepas diferentes de *S. mansoni* (PINAUD et al., 2019).

Diante das nossas observações neste estudo, a única proteína com expressão suprimida relacionada diretamente à resposta secundária foi a *Apolipoprotein B-100-like*. Esta proteína também, foi encontrada com expressão negativa em hemócitos de uma linhagem susceptível de *B. glabrata* em interação com esporocistos de *S. mansoni* como visto por Dingirard et al. (2018). Também foi observado que além de caramujos *Biomphalaria*, estudos descrevem a

participação de proteínas semelhantes, ou *apolipoprotein-like*, em outros invertebrados como insetos e moluscos durante a resposta imune primária e também a exposições secundárias a patógenos (CASTILLO et al., 2019; REY-CAMPOS et al., 2019; STĄCZEK et al., 2018; WU et al., 2017).

Observamos também que além das proteínas diferencialmente expressas, pudemos identificar proteínas que aparecem de forma exclusiva no grupo reexposto 1dpr (Tabela 7). Nota-se a presença de algumas proteínas importantes relacionadas a imunidade, como receptores de reconhecimento e imunomoduladores da resposta imune. Nos chama atenção à presença de lectinas exclusivas desta condição, sugerindo que esta família de proteínas pode não só estar relacionada com a resposta secundária, como também, ser um ponto chave neste fenótipo mais resistente de *B. straminea*.

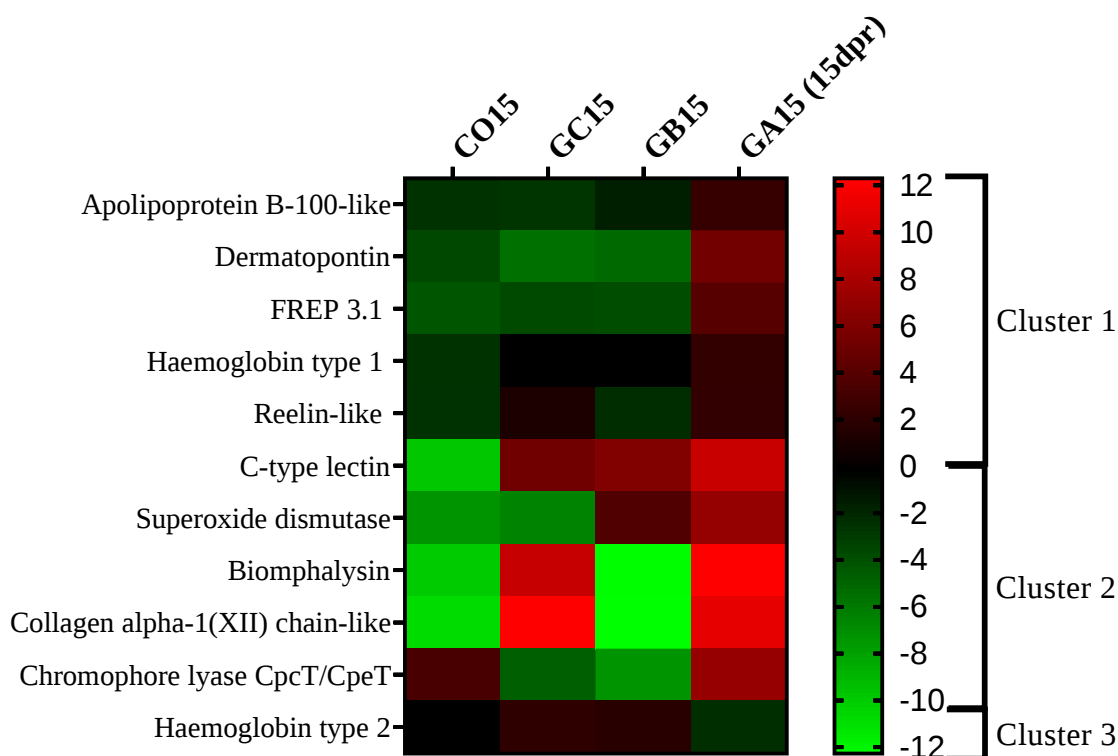
Tabela 7– Proteínas identificadas exclusivamente em *B. straminea* um dia pós reexposição ao *S. mansoni* (GA1)

Proteína ID	Descrição (Número de acesso)	<i>e</i> -value	Identidade	Domínios conservados	Pep. únicos	Anotação GO
BS_24581_c0_g1_i11	Inibidor de carboxipeptidase SmCI-like [Parasteatoda tepidariorum] (XP_015914294.1)	4 ^{e-16}	65.38%	Inibidor de tripsina pancerática Kunitz	2	Inibidor de endopeptidase tipo serina
BS_GG3912_c0_g1_i1	Proteína não caracterizada LOC106075958 isoforma X2 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013092284.1)	8 ^{e-99}	92.68%	Inibidor de tripsina pancerática Kunitz	2	Inibidor de endopeptidase tipo serina
BS_981_c0_g1_i1	Proteína relacionada ao fibrinogênio J4 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013069968.1)	5 ^{e-70}	48.00%	Imunoglobulina-like	5	N/A
BS_16351_c0_g1_i2	Anti tripsina-like isoforma X1 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013081322.1)	1 ^{e-162}	70.19%	Serpina	2	N/A
BS_34913_c0_g2_i2	Proteína fibrinogênio like A [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013074553.1)	1 ^{e-91}	76.97%	Fibrinogênio-like,	2	N/A
BS_259189_c0_g1_i1	Cerebelina-3-like [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013062292.1)	7 ^{e-53}	80.37%	Fator de necrose tumoral; C1q	4	Ligação de proteínas

Legenda: Pep. Únicos: peptídeos únicos; N/A: sem identificação

Analisando a resposta 15 dias pós reexposição (15 dpr), podemos observar uma menor quantidade de proteínas diferenciais, porém, uma maior variedade de componentes imuno relevantes diferencialmente expressos. Foram identificadas 41 proteínas sendo 11 com expressão significativa no grupo 15dpr (Tabela 8) e agrupadas nos seguintes padrões: *Cluster 1*: proteínas *up* reguladas exclusivas dos caramujos que sofreram exposição e reexposição; *Cluster 2*: proteínas que foram *up* ou *down* reguladas na primeira exposição ou controle e apresentaram um aumento da expressão na reexposição; *Cluster 3*: proteínas *down* reguladas exclusivamente nos caramujos reexpostos (Figura 15).

Figura 15 – Comparação da expressão proteica diferencial de *B. straminea* 15 dpr ao *S. mansoni* (GA15)



Legenda: GA, caramujos expostos individualmente a 10 miracídeos e reexpostos 25 dias após a 10 miracídeos; GB, caramujos expostos individualmente a 10 miracídeos e 25 dias após submetidos ao estresse controle; GC, caramujos submetidos ao estresse controle e 25 dias após expostos a 10 miracídeos; CO, caramujos submetidos ao estresse da exposição e 25 dias após submetidos novamente ao estresse da exposição sem miracídeos.

Tabela 8 - Proteínas diferencialmente expressas em *B. straminea* 15 dias pós reexposição ao *S. mansoni* (GA15)

Proteína ID	Descrição (Número de acesso)	<i>E</i> <i>value</i>	Identidade	Domínios conservados	Pep únicos	Anotação GO	<i>FOLD</i> <i>CHANGE</i> GA15
BS_2683_c0_g1_i2	Apolipoproteína B-100-like [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013087403.1)	0.0	94.50%	LTP; VWD	49	Transporte de lipídio	2.57822
BS_3524_c0_g1_i4	Hemaglutinina N/fator de agregação de amebócito-like [<i>Aplysia californica</i>] (XP_005099799.1)	1 ^{e-27}	32.78%	Dermatopontina	9	N/A	5.4678
BS_671_c1_g1_i2	Proteína relacionada ao fibrinogênio 3.1 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (AEO50745.1)	6 ^{e-159}	49.44%	Fibrinogênio; Imunoglobulina-like	3	N/A	4.16846
BS_7642_c0_g1_i9	Reelina-like [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013064208.1)	0.0	82.89%	EGF-like; Reelina	44	Lipoproteína receptora de partículas	2.4026
BS_1826_c0_g1_i11	Hemoglobina tipo 1 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (CAJ44466.1)	0.0	95.43%	Globina	4	Ligante de oxigênio	2.45535
BS_1552_c0_g1_i8	Perlucina-like [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013095831.1)	2 ^{e-58}	50.89%	Lectina tipo C	15	Ligante de carboidratos	9.62074
BS_11914_c0_g1_i7	Proteína contendo domínio de dedo de Zn GATA 14-like isoforma X1 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013076718.1)	0.0	85.28%	Superóxido dismutase-like	14	Superóxido dismutase	7.15296
BS_GG54424_c0_g1_i1	Biomphalisina [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (AGG38744.1)	0.0	94.06%	Aerolisina	5	Patogênese	12.2839
BS_14097_c0_g2_i1	Colágeno cadeia alfa-1(XII) like [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013088320.1)	0.0	75.85%	VWA	18	N/A	11.099
BS_15237_c0_g2_i3	Proteína não caracterizada LOC106067908 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013082633.1)	4 ^{e-86}	61.34%	Chromophore lyase CpcT/CpeT	5	Atividade Lyase (catalítica)	7,19741
BS_34478_c0_g1_i1	Hemoglobina tipo 2, parcial [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (CAJ44467.1)	3 ^{e-69}	91.34%	Globina	4	Ligante de oxigênio	-2.22197

Legenda: N/A, sem identificação; Pep únicos: peptídeos únicos; VWA, Von Willebrand fator tipo A; VWD, Von Willebrand fator tipo D, LTP, proteína de transporte de lipídios; EGF, fator de crescimento epidermal.

Em nossos resultados de caramujos 15 dpr, podemos observar no cluster 1 e 2 (Figura 15), a presença das proteínas *HemagglutiniN/Amebocyte aggregation factor-like*, *Apolipoprotein B-100-like*, *Reelin-like* e *Colágeno alfa-1(XII) chain-like*, todas com domínios funcionais relacionados aos processos de adesão, sinalização e fixação celular, mostrando evidências que, durante o processo de *immune priming* de *B. straminea*, as vias de resposta celular ainda podem estar ativas nos momentos mais tardias da reexposição.

Chama atenção a super expressão da *Apolipoprotein B-100-like* no grupo de 15dpr, pois ela se mostra suprimida em 1 dpr (Figura 15), sugerindo ser um componente de expressão mais tardia durante a resposta secundária desses moluscos.

O perfil de resposta humoral que podemos observar em *B. straminea* é composto principalmente por receptores de reconhecimento de patógenos (*C-type lectin* e FREP) e agentes citolíticos (*Aerolysin*). Lectinas e FREPs parecem desempenhar um importante papel na resposta inata de memória de *B. straminea* uma vez que apresenta regulação positiva em 1dpr (Figura 14, Cluster 1) e em 15dpr pudemos observar também a super expressão tanto exclusivamente do grupo reexposto (Cluster 1, Figura 15), como também uma expressão diferencial aumentada em relação aos grupos controle de caramujos que foram expostos apenas uma vez ao parasita (Cluster 2, Figura 15). A expressão aumentada desses componentes em *B. straminea* corroboram com os achados de PINAUD et al. (2019) que, através de estudos transcriptômicos e proteômicos com *B. glabrata* quando testam a capacidade de proteção da resposta de memória através do protocolo de *immune priming* utilizando diferentes linhagens de parasita.

O FREP encontrado em nossos resultados participando da resposta de memória, possui domínios bem conservados e similaridade com o FREP3 de *B. glabrata* (AEO50745.1), porém parte das sequencias são distintas, nos mostrando o quanto esses componentes podem variar entre as espécies. A mesma dificuldade em estudar esse tipo de molécula em *B. straminea* foi relatada por DE MELO et al. (2019) quando tentam através de qPCR analisar a expressão gênica de FREPs na hemolinfa desses caramujos, utilizando primers para sequências de *B. glabrata*. Através da análise da sequência proveniente do transcriptoma de *B. straminea* e dos seus domínios conservados, pudemos identificar tanto o domínio de fibrinogênio quanto de imunoglobulina em sua estrutura, sabendo disso, estudos estruturais e funcionais específicos podem caracterizar melhor esse componente, aumentando nosso conhecimento ao seu respeito. Além disso, o FREP3 é descrito como altamente relacionado à resistência de *B. glabrata* aos

trematódeos, podendo essa molécula estar relacionada ao perfil mais resistente de *B. straminea* (HANINGTON; FORYS; LOKER, 2012; PILA et al., 2017).

O papel da resposta imune através de proteínas relacionadas a produção de ROS e regulação do estresse oxidativo em nosso estudo, se mostrou relevante na análise da resposta primária em *B. straminea* e durante a resposta secundária, também, se mostrou presente pela regulação positiva de proteínas da família superóxido dismutase. Em nossos resultados, pudemos observar a forte presença de proteínas relacionadas à resposta ao estresse oxidativo na resposta primária, enquanto que na resposta secundária essa via se mostra mais sucinta, com apenas um componente relacionado em 15dpr (Figura 15). Em *B. glabrata*, a via que envolve ROS também parece estar ativada no perfil transcriptômicos da resposta inata de memória contra o *S. mansoni*, uma vez que também são encontradas famílias de proteínas com atividade semelhante (PINAUD et al., 2016).

Através do ponto isoelétrico (pI) da Biomphalisina diferencialmente expressa em *B. straminea*, observamos que possui um pH neutro porém levemente ácido (6.18), correspondente ao descrito no estudo de TETREAU et al. (2017) como relacionado à atividade específica antitrematódea (*S. mansoni* e *E. caproni*), onde detectaram outras isoformas da Biomphalisina compartilhando o mesmo tamanho, porém diferentes pontos isoelétricos, sendo cada isoforma resultante da interação do plasma de *B. glabrata* com diferentes tipos de patógenos como bactérias, leveduras e trematódeos.

Uma proteína correspondente a biomphalisina foi detectada up regulada no grupo 15dpr. Apesar da Biomphalisina aparecer diferencialmente expressa em um dos grupos controles (GC15), o aumento de expressão durante a segunda reexposição foi estatisticamente relevante, apresentando também o maior *fold change* (12.2839) entre as diferencialmente expressas (Figura 15). Em análise proteômica realizada por Pinaud et al., (2016) com *B. glabrata* reexpostos ao *S. mansoni*, essa proteína não foi detectada em nenhum tempo de reexposição, sendo levantada a hipótese que nessa espécie ela é rapidamente degradada depois de exercer sua função durante a resposta imune secundária, diferente do que detectamos em *B. straminea*, que continua com alta abundância.

Vale ressaltar que, em *B. glabrata*, Li et al., (2020) descrevem um cenário de formação de imunocomplexos capazes de destruir o esporocisto de *S. mansoni*. Tais imunocomplexos são formados principalmente por FREP3 e TEP1, podendo servir como ativadores da biomphalisina. O fato de algumas dessas moléculas serem identificadas como diferencialmente expressas durante a resposta imune, especialmente FREP3 e biomphalisina, podemos sugerir a

hipótese que o mecanismo semelhante pode acontecer durante a resposta de *B. straminea*, uma vez que são encontradas tais moléculas homólogas durante a resposta imune.

Identificamos também proteínas imunorelevantes exclusivas da hemolinfa de caramujos reexpostos (Tabela 9). Algumas, como os FREPs, se mostram com baixa identidade com sequencias já descritas na literatura sendo tal comportamento, discutido em trabalhos utilizando abordagens proteômicas em larga escala que também encontram certa dificuldade da captação dessas moléculas (TETREAU et al., 2017). Proteínas relacionadas a adesão, apresentaram alta identidade e considerável quantidade de peptídeos e peptídeos únicos, nos mostrando que em tempos mais tardios essa atividade ainda pode estar funcional nesse grupo.

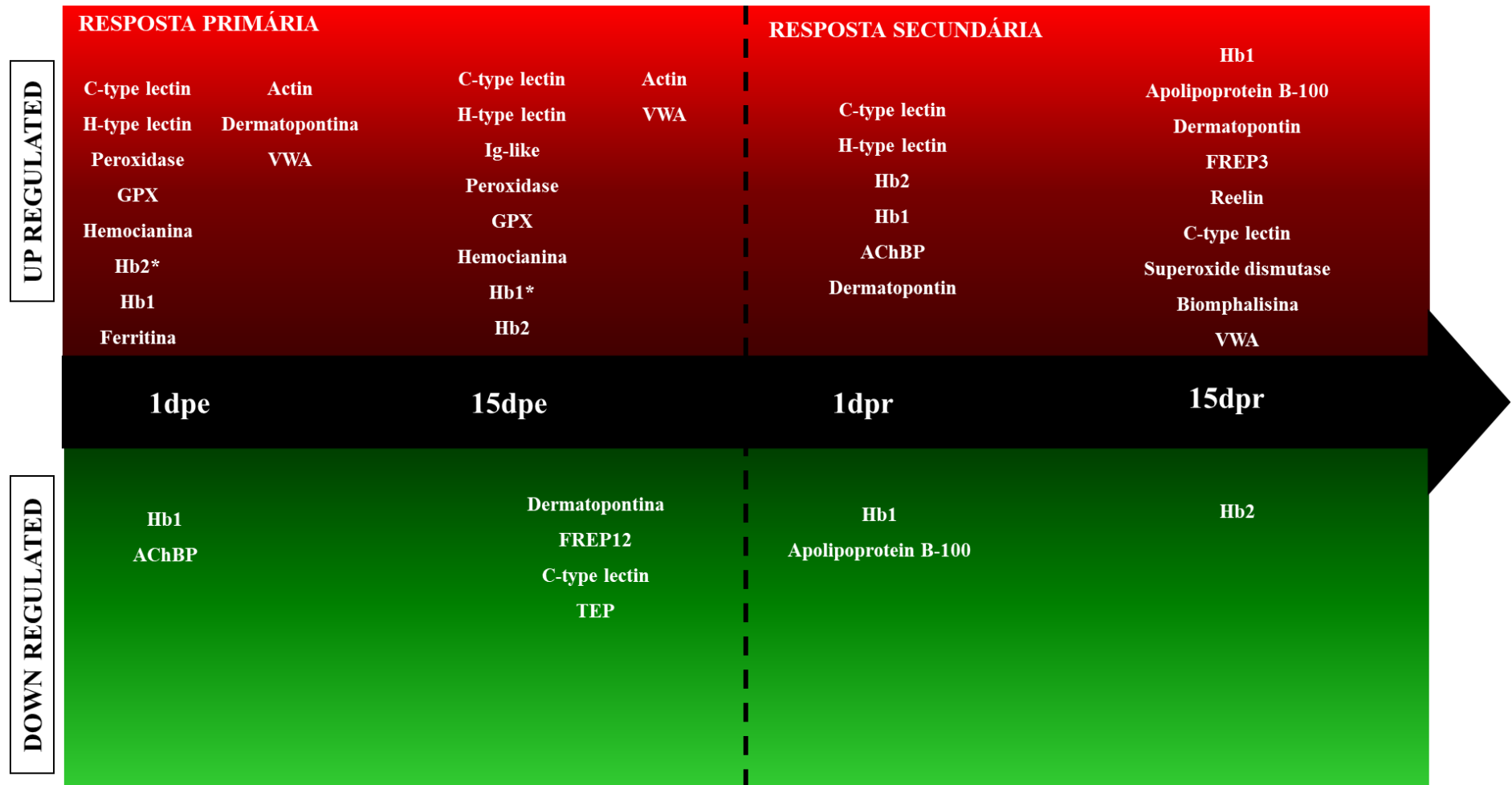
Tabela 9 - Proteínas identificadas exclusivamente em *B. straminea* 15 dpr ao *S. mansoni* (GA15)

Proteína ID	Descrição (Número de acesso)	^{e-} value	Identidade	Domínios conservados	Pep únicos	Anotação GO
BS_36491 _c0_g2_i1	Proteína contendo domínio Fibrinogênio 1-B-like [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013093995.1)	1 ^{e-35}	65.22%	N/A	2	N/A
BS_22496 _c3_g1_i7	Angiopietina-2-like [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013088362.1)	2 ^{e-160}	79.79%	Fibrinogênio-like, C-terminal	2	N/A
BS_4672 _c0_g1_i6	Proteína ligante de acetilcolina-like isoforma X2 [<i>Biomphalaria glabrata</i>]	1 ^{e-141}	85.71%	Ligante de neurotransmissor de canal iônico-	3	Atividade canal iônico; sinalizador transmembrana
BS_3618 _c0_g1_i1	Sushi, VWA, EGF e proteína contendo domínio pentraxina 1-like [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013073410.1)	0.0	95.98%	Sushi/SCR/CCP; EGF-like; Receptor de proteína tirosina quinase tipo A/B -like	18	Ligante de íons de Calcio
BS_9397 _c0_g2_i1	Ferritina-like [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013073968.1)	8 ^{e-164}	95.18%	Ferritina/Proteína DPS	6	Ligante de Ferro
BS_GG16421_c0_g1_i1	Proteína não caracterizada LOC106074468 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] (XP_013090705.1)	0.0	90.00%	Apextrina,	2	

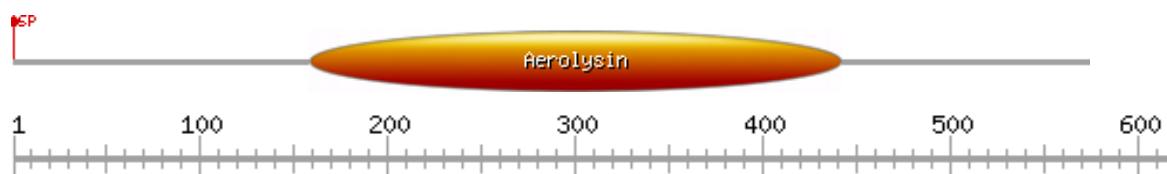
Legenda: N/A, sem identificação; Pep únicos: peptídeos únicos; VWA, fator de Von Willebrand tipo A; EGF, fator de crescimento epidermal

Comparando de forma qualitativa as proteínas diferencialmente expressas entre a resposta primária e secundária em nosso estudo (Figura 16), observamos que as duas respostas são compostas pela super expressão de várias espécies proteicas de lectinas (principalmente lectina tipo C) sendo descritas, através de análises estruturais e funcionais dessas proteínas construídas in vitro, com relação não só ao reconhecimento celular, como também aos processos de adesão celular, opsonização e ativação de vias de produção de ROS (BI et al., 2020). Essa hipótese é sustentada através da identificação de proteínas de *B. straminea* relacionadas a motilidade celular, fatores de coagulação e moduladores da resposta de estresse oxidativo, tanto na resposta primária (1dpe e 15 dpe) quando secundária (1dpr e 15 dpr), sugerindo uma ação conjunta dessas vias.

Figura 16 - Resumo esquemático das proteínas diferencialmente expressas na resposta primária e secundária de *B. straminea* ao *S. mansoni*



Legenda: *, mais predominante; **WVA**, Willebrand factor type A; **Hb1**, Hemoglobina tipo 1; **Hb2**, Hemoglobina tipo 2; **AChBP**, Acetylcholine binding protein; **TEP**, Thioester protein.

Figura 18 – Disposição estrutural do domínio de aerolisinas em bs-Biomphalysin

Legenda: régua representativa em número de aminoácidos; Domínio de aerolisina (laranja)

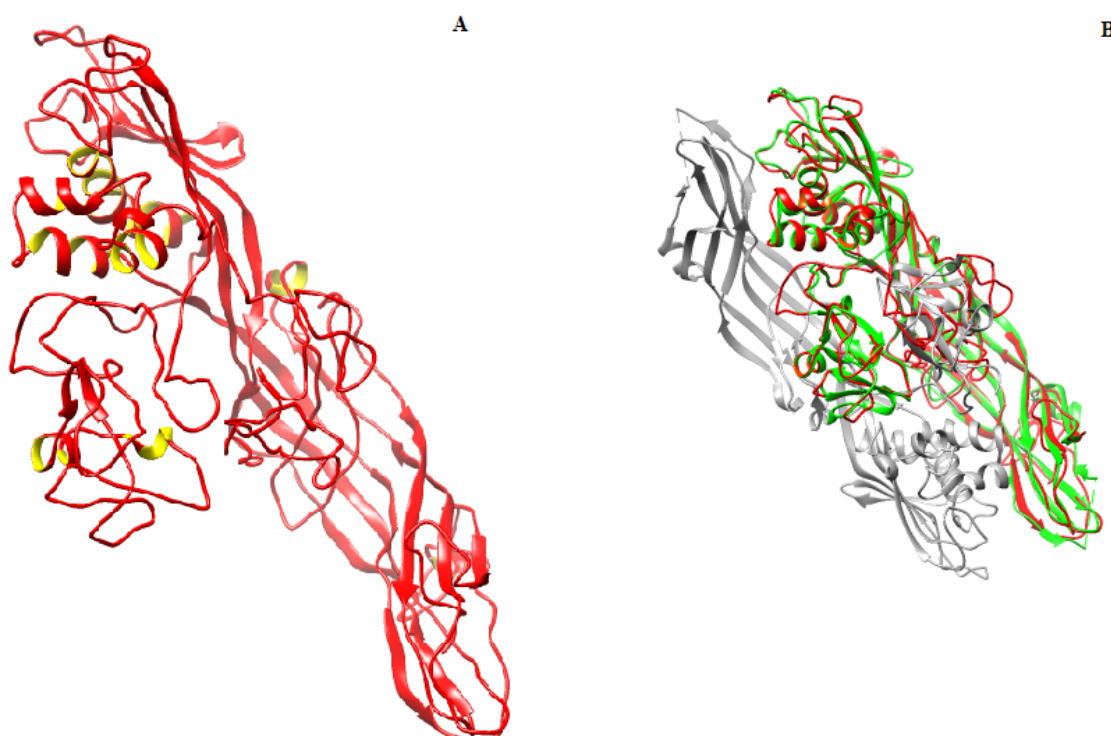
A predição da estrutura tridimensional foi realizada com C-score = -0.18 (Figura 19B), assim como a comparação com outras estruturas proteicas depositadas no PDB através do I Tasser server. Através do TM-align, o modelo com maior semelhança estrutural foi o *Proaerolysin Mutant W373L* (PDB ID: 1Z52) com TM-score = 0.729 (Figura 19B). As anotações biológicas de GO preditas para essa proteína a partir do COFACTOR e COACH sendo selecionados os termos com maior GO-score (Tabela 10).

Tabela 10 - Termos GO relacionados à estrutura predita de bs-Biomphalysin pelo I Tasser (COACH e COFACTOR)

Função Molecular	GO-score	Processo Biológico	GO-Score	Componente Celular	GO-Score
<i>binding</i> (GO:0005488)	0.48	<i>pathogenesis</i> (GO:0009405)	0.40	<i>host cell plasma membrane</i> (GO:0020002)	0.40

Legenda: GO - gene ontology

Figura 19- Predição da estrutura tridimensional da proteína bs-Biomphalysin de *B. straminea*



Legenda: Modelo tridimensional predito pelo I Tasser server com marcação das (A) (hélices em amarelo); Alinhamento entre as estruturas de bs-*Biomphalysin* (vermelho) e *Proaerolysin Mutant W373L* (PDB ID: 1Z52) (verde – cadeia A; cinza – cadeia B) (B).

A importância da predição estrutural dessas proteínas se dá pelo fato de auxiliar no entendimento de como tais moléculas se comportam em relação a outras proteínas, podendo complementar os estudos funcionais e estruturais dessa proteína.

Apesar de ser bastante promissora durante a resposta imune e estudada por alguns grupos, a *Biomphalysin* descrita em *B. glabrata* não possui modelo estrutural depositado nos principais bancos de dados, impossibilitando a comparação direta entre as estruturas proteicas.

Outra proteína bastante estudada em *B. glabrata* que se mostrou diferencialmente expressa em *B. straminea* foi a BS_933_c0_g1_i1, que através da análise por BLAST corresponde, com 92% de identidade, à *thioester containing protein 1.4* (BgTEP1.4) descrita em *B. glabrata* e para as análises subsequentes será chamada de BsTEP (Figura 20).

Figura 20 – Alinhamento entre sequências BsTEP de *B. straminea* e BgTEP1 (ADE45341.1) de *B. glabrata*

1	MKLLKILFVSFLVLECGQGNFISAPSNVPGTYYDISVDILKQHGIV	50	bsstep	501	VKSGVLELNGQREFNATFKVPSNAPIAQLMMYIRDSNEVVDLSAFS	550	bsstep	999	LSSSTNLALVVSFAEAQEFIPVDKEVLKASHFLDRQNLDSGFNEFG	1048
3	MKLLNLIFFVFLVLECGQGNFISAPSNVPGTYYDISVDILKQHGIV	52	ADE45341.1	502	VKSGVLELNGQREFNATFKVPSNAPIAQLMMYIRDSNEVVDLSAFN	551	ADE45341.1	1001	ISSSTNLALVVSFAEAQEFIPVDKEVLKASHFLDRQNLDSGFNEFG	1050
51	TVEAILQDVSHLSKPEDKILQTVNGTFSPGVRGTLSPIDFNLHCPNCR	100	bsstep	551	VEGIFENKVSFAKENETDVKVNSLELSADPSQVYVLAQDSVLLKKT	600	bsstep	1049	KVLDRNTQSTTAGPALTAFVLVALLKAKELADVQCKDINKRYLLGNA	1098
53	TVEAILQDYS-FSIPGPKSLTANGTFSPGVRGTLSPIDFNLHCSYCR	101	ADE45341.1	552	VEGIFENKVSFAKENETDVKVNSLELSADPSQVYVLAQDSVLLKKT	601	ADE45341.1	1051	KVLDRNTQSTTAGPALTAFVLVALLKAKELADVQCKDINKRYLLGNA	1100
101	ILLKGHNPFQEKAIYIQISSDILSIQTDKAIYKPKERNVYRILAVVY	150	bsstep	601	GNLTPNKVKDSFISKFKHGAIPTDSNFALSYSGSSINEVFSNMLVIAI	650	bsstep	1099	TLNATRNLERLMLADSIDNQPSLAVSYALAEAKSQLAQSAFEKLLAFVK	1148
102	ILLKGYNPLQEQFIQISSDILSIQTDKAIYKPKERNVYRILAVVY	151	ADE45341.1	602	GNLTPNKVKDSFISKFKHGAIPTDSNFALSYSGSSINEVFSNMLVIAI	651	ADE45341.1	1101	TLNATRNLERLMLADSIDNQPSLAVSYALAEAKSQLAQSAFEKLLAFVK	1150
151	NLQLYTGFNYEILDYDKNINVLGVRGTFGVVEGFQDSDQPSFGTVK	200	bsstep	651	DLKIFAPPNPPIPFDFSSSG--GRGRNGPQMAHSLLRDSAKESASVEHD	698	bsstep	1149	QEGGLEYSANSTVNNEELNRFINWRPRLQARPIDILITSYAILTYSSL	1198
152	NLQLYTGFNYEILDYDKNINVLGVRGTFGVVEGFQDSDQPSFGTVK	201	ADE45341.1	652	DLNIFAPPNPPIPFDFSSSG--GRGRNGPQMAHSLLRDSAKESASVEHD	700	ADE45341.1	1151	QEGGLEYSANSTVNNEELNRFINWRPRLQARPIDILITSYAILTYSSL	1200
201	INVRTETVSGEESQFEVAEYDLPFRQVQVGLPFPALLSDTTLSGTVEAK	250	bsstep	699	VETPTKPVDRVRSFFPESMLNLSVKSINGHATLTTPVDTITSNIVSAFA	748	bsstep	1199	GRLEALPSVRNLTQKNAQGGFVSTQTVVGLQALSSTYSSKSFSPDTNI	1248
202	INVRTETVSGEESQFEVAEYDLPFRQVQVGLPFPALLSDTTLSGTVEAK	251	ADE45341.1	701	VATSTKPVDRVRSFFPESMLNLSVKSINGHATLTTPVDTITSNIVSAFA	750	ADE45341.1	1201	GRLEALPSVRNLTQKNAQGGFVSTQTVVGLQALSSTYSSKSFSPDTNI	1250
251	YTFGQPVNGLVQLQIGENVDTDKCDVNRKVTESFEIKGKGFVSPLED	300	bsstep	749	TNPDTGLGVAPTTSKLRVFRPFVSLTYPRSVTRNEQFVQATVFVNLV	798	bsstep	1249	TIHVSMDNHLTHNWNSENLALQIQEIQSISQDSFSTASGSLALLDVE	1298
252	YTFGQPVNGLVQLQIGENVDTDKCDVNRKVTESFEIKGKGFVSPLED	301	ADE45341.1	751	TNSDTGLGVAPTTSKLRVFRPFVSLTYPRSVTRNEQFVQATVFVNLV	800	ADE45341.1	1251	TIHVSMDNHLTHNWNSENLALQIQEIQSISQDSFSTASGSLALLDVE	1300
301	IQRSDVNLNERKEIKITAFVTESSGKLGNGSVITYYGNRYQIKFLEMT	350	bsstep	799	DLHVTSLKENTFLTPVTPGPNQSNQVRSNEQGVVYFSLSAPTVGSL	848	bsstep	1299	YSFVWLKELSKPVFDVNTVLLDQKLSFNIDHVTCKFLKHDTGHWVQES	1348
302	IRRSVHLNEKKIKITAFVTESSGKLGNGSVITYYGNRYQIKFLEMT	351	ADE45341.1	801	DLHVTSLKENTFLTPVTPGPNQSNQVRSNEQGVVYFSLSAPTVGSL	850	ADE45341.1	1301	YSFVWLKELSKPVFDVNTVLLDQKLSFNIDHVTCKFLKHDTGHWVQES	1350
351	AVFKPGLKYTAYVQVTPDGLPPTDSNLKSVTSVTVQNTVPQQLYSP	400	bsstep	849	DIEVSARSNAADAIVRQILVHEGAPVYVNPILISLNNQSTFEKNIA	898	bsstep	1349	IPSGFVPDLSTLQGVAGVKRSERKGSFVAIYFDKISGSSLCYSVMTREA	1398
352	AVFKPGLKYTAYVQVTPDGLPPTDSNLKSVTSVTVQNTVPQQLYSP	401	ADE45341.1	851	DIEVSARSNAADAIVRQILVHEGAPVYVNPILISLNNQSTFEKNIA	900	ADE45341.1	1351	IPSGFVPDLSTLQGVAGVKRSERKGSFVAIYFDKISGSSLCYSVMTREA	1400
401	FSFSGTYPLSGQWNLPAINGILSIDIDPLNATSIDIKVSLNKQTTAEKR	450	bsstep	899	FTLPDSLVPSQSRIRVKTGDLIGSTVQSLTSLTLPTGCGEQLVKFTF	948	bsstep	1399	KVAKSQSQSYVRTDYDEPAQATVFYQPTLRDSTVCDVCPNCCP	1443
402	SSFSGSYPLSGQWNLPAINGILSIDIDPLNATSIDIKVSLNKQTTAEKR	451	ADE45341.1	901	FTLPDSLVPSQSRIRVKTGDLIGSTVQSLTSLTLPTGCGEQLVKFTF	950	ADE45341.1	1401	KVAKSQSQSYVRTDYDEPAQATVFYQPTLRDSTVCDVCLNCCP	1445
451	VKSYSHSNVYQLSLSKQKADTVLKITSTEAIDSLAYEIRSRSDH	500	bsstep	949	NIHIGRYLKATINQSEELNKKIILLNDGQYRQLTYKYRDNQSFAGVYD	998				
452	ISKSYSHSNVYQLSLSKQKADTVLKITSTEAIDSLAYEIRSRSDH	501	ADE45341.1	951	NIHIGRYLKATINQSEELNKKIILLNDGQYRQLTYKYRDNQSFAGVYD	1000				

Figura 21 – Esquema estrutural dos domínios conservados identificados em BsTEP de *B. straminea*

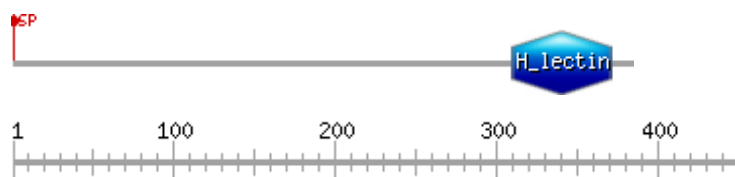


Legenda: Peptídeo sinal (vermelho); Macroglobulina 2 e 3 (laranja); Alfa2macroglobulina (azul); Domínio tioéster (verde)

A disposição estrutural dos domínios encontrados (Figura 21) na sequência mostram similaridade de arquitetura com a BgTEP1(DUVAL et al., 2020) estando presentes domínios macroglobulin, MG2 (IPR002890) e MG3 (IPR041555); domínio Alpha-2-macroglobulin, bait region (IPR011625); domínio Alpha-2-macroglobulin (IPR001599); domínio Alpha-macroglobulin-like, TED (IPR011626); e domínio Alpha-macroglobulin, receptor binding (IPR009048).

A lectina tipo H (BS_46313_c1_g2_i) esteve presente em caramujos 1 dia após a resposta secundária (1dpr). Como já dito anteriormente, esse tipo de lectina é bastante raro e existe quase nenhuma descrição desta família em caramujos *Biomphalaria*. Neste trabalho, pudemos observar sua presença tanto na resposta primária quanto na secundária, ambas em momentos iniciais (1dpe e 1dpr) da exposição. A presença do domínio completo de lectina tipo H (Figura 22) corrobora sua funcionalidade primordial, relacionada principalmente à ligação com carboidratos e reconhecimento (PIETRZYK-BRZEZINSKA; BUJACZ, 2020; SANCHEZ et al., 2006) e em *B. straminea* pode atuar semelhante às demais lectinas já descritas em *B. glabrata*.

Figura 22 - Esquema estrutural dos domínios conservados identificados em Lectina tipo H de *B. straminea*



Legenda: Peptídeo sinal (vermelho); Domínio lectina tipo H (azul)

Outra molécula bastante importante em *B. straminea* são os FREPs, que por suas estruturas altamente variadas não foi possível determinar seu modelo estrutural neste trabalho. Porém, neste estudo, pudemos identificar uma proteína similar ao FREP3, relacionado à resposta secundária com super expressão em 15dpr. Em relação aos domínios conservados presentes, foram encontrados os domínios de fibrinogênio (IPR036056) e de imunoglobulinas (IPR013783), todavia, análises utilizando outras abordagens precisam ser realizadas para caracterizar melhor essas moléculas tão variáveis.

7 CONCLUSÃO

Foi possível identificar uma boa quantidade de componentes proteômicos da hemolinfa de *B. straminea*, assim como detectar as proteínas diferencialmente expressas presentes tanto na resposta imune primária e secundária ao *S. mansoni*. Como esperado, a hemolinfa de *B. straminea* é composta predominantemente por proteínas descritas em algumas espécies de invertebrados, principalmente em *B. glabrata*.

Durante a resposta primária inicial, foi observada a super expressão de proteínas relacionadas a vias de reconhecimento e sinalização, adesão, resposta ao estresse oxidativo e predominância de hemoglobinas tipo 2, assim como a supressão principalmente de hemoglobinas tipo 1. Já no segundo tempo de análise, referente à resposta primária mais tardia, também foi observada a super expressão de moléculas de reconhecimento e sinalização, coagulação, adesão e proliferação celular e componentes de resposta ao estresse oxidativo. Importantes componentes foram suprimidos durante essa resposta mais tardia como lectinas, FREPs e TEPs e dermatopontina.

Em relação a resposta secundária ou de memória, o perfil de proteínas super expressas é bastante rico tanto em um quanto 15 dias após a reexposição dos caramujos. As principais proteínas imuno relevantes expressas em ambos os grupos estão relacionadas a processos de adesão, reconhecimento e opsonização, resposta ao estresse oxidativo, atividade citolítica e metabolismo de oxigênio, predominantemente hemoglobinas do tipo 1. Poucas proteínas se mostraram suprimidas durante a resposta secundária, o que sugere a alta reatividade do sistema imune de *B. straminea* quando treinado por uma primeira exposição ao parasito.

Sabe-se que estudos complementares podem ser realizados para averiguar melhor o funcionamento específico de cada via expressa em nossos resultados, porém, conseguimos analisar de forma panorâmica a resposta proteica na exposição do *B. straminea* ao *Schistosoma*.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, M. N.; KAUSAR, S.; CUI, H. The biological role of peroxiredoxins in innate immune responses of aquatic invertebrates. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 89, n. March, p. 91–97, 2019.
- ADEMA, C. M. et al. Differential transcriptomic responses of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Mollusca) to bacteria and metazoan parasites, *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei* (Digenea, Platyhelminthes). **Molecular Immunology**, v. 47, n. 4, p. 849–860, 2010.
- ADEMA, C. M.; LOKER, E. S. Digenean-gastropod host associations inform on aspects of specific immunity in snails. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 48, n. 2, p. 275–283, 2015.
- ARICAN-GOKTAS, H. D. et al. Differential Spatial Repositioning of Activated Genes in *Biomphalaria glabrata* Snails Infected with *Schistosoma mansoni*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 9, p. e3013, 11 set. 2014.
- BAGGERMAN, G. et al. Gel-Based Versus Gel-Free Proteomics: A Review. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 8, n. 8, p. 669–677, 2005.
- BARBOSA, C. S. et al. Turismo de risco para esquistossomose mansônica em Porto de Galinhas, Estado de Pernambuco, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 6, n. 3, p. 51–58, 2015.
- BARSNES, H.; VAUDEL, M. SearchGUI: A Highly Adaptable Common Interface for Proteomics Search and de Novo Engines. **Journal of Proteome Research**, v. 17, p. 2552–2555, 2018.
- BENDER, R. C. et al. Respiratory Burst of *Biomphalaria glabrata* Hemocytes : *Schistosoma mansoni*-Resistant Snails Produce More Extracellular H₂O₂ than Susceptible Snails Published by: Allen Press on behalf of The American Society of Parasitologists Stable URL : <https://www.js. The Journal of Parasitology>, v. 91, n. 2, p. 275–279, 2005.
- BI, J. et al. A typical C-type lectin, perlucin-like protein, is involved in the innate immune defense of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 103, n. March, p. 293–301, 2020.
- BLOUIN, M. S. et al. Three genes involved in the oxidative burst are closely linked in the genome of the snail, *Biomphalaria glabrata*. **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 1, p. 51–55, jan. 2013.
- BOISSIER, J. et al. Schistosomiasis reaches Europe. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 7, p. 757–758, 2015.
- BOUCHUT, A. et al. Compatibility in the *Biomphalaria glabrata*/*Echinostoma caproni* model: Potential involvement of proteins from hemocytes revealed by a proteomic approach. **Acta Tropica**, v. 98, n. 3, p. 234–246, 2006.
- BRASIL, M. DA S. **VIGILÂNCIA DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI: Diretrizes Técnicas**. Brasília: [s.n.].
- BUCHMANN, K. Evolution of innate immunity: Clues from invertebrates via fish to mammals. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. SEP, p. 1–8, 2014.
- CALDEIRA, R. L. et al. Characterization of South American Snails of the Genus *Biomphalaria* (Basommatophora: Planorbidae) and *Schistosoma mansoni* (Platyhelminthes: Trematoda) in Molluscs by PCR-RFLP. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1–5, 2016.
- CASTILLO, M. G. et al. *Biomphalaria glabrata* immunity: Post-genome advances. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 104, n. November 2019, p. 103557, 2019.
- CAVALCANTI, M. G. S. et al. Morphological characterization of hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea*. **Micron**, v. 43, n. 2–3, p. 285–291, 2012.
- COATES, C. J.; DECKER, H. Immunological properties of oxygen-transport proteins:

- hemoglobin, hemocyanin and hemerythrin. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, n. 2, p. 293–317, 12 jan. 2017.
- COATES, C. J.; NAIRN, J. Diverse immune functions of hemocyanins. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 45, n. 1, p. 43–55, 2014.
- COLLEY, D. G. et al. Human schistosomiasis. **The Lancet**, v. 383, n. 9936, p. 2253–2264, 2014.
- CONTRERAS-GARDUÑO, J. et al. Insect immune priming: ecology and experimental evidences. **Ecological Entomology**, v. 41, n. 4, p. 351–366, 2016.
- COUSTAU, C. et al. Advances in gastropod immunity from the study of the interaction between the snail *Biomphalaria glabrata* and its parasites: A review of research progress over the last decade. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 46, n. 1, p. 5–16, 2015.
- DE MELO, E. S. et al. Investigation of defense response and immune priming in *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea*, two species with different susceptibility to *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, p. 189–201, 2019.
- DEVABHAKTUNI, A.; ELIAS, J. E. Application of de Novo Sequencing to Large-Scale Complex Proteomics Data Sets. **Journal of Proteome Research**, v. 15, n. 3, p. 732–742, 2016.
- DHEILLY, N. M. et al. A family of variable immunoglobulin and lectin domain containing molecules in the snail *Biomphalaria glabrata*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 48, n. 1, p. 234–243, 2015.
- DINGUIRARD, N. et al. Proteomic Analysis of *Biomphalaria glabrata* Hemocytes During in vitro Encapsulation of *Schistosoma mansoni* Sporocysts. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. November, p. 1–17, 2018.
- DOLASHKA, P.; VOELTER, W. Antiviral activity of hemocyanins. **Invertebrate Survival Journal**, v. 10, p. 120–127, 2013.
- DREISEWERD, K. Recent methodological advances in MALDI mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 9–10, p. 2261–2278, 2014.
- DUVAL et al. A New Assessment of Thioester-Containing Proteins Diversity of the Freshwater Snail *Biomphalaria glabrata*. **Genes**, v. 11, n. 1, p. 69, 7 jan. 2020.
- FINN, R. D. et al. InterPro in 2017-beyond protein family and domain annotations. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D190–D199, 2017.
- FOGARTY, C. E. et al. Comparative study of excretory–secretory proteins released by *Schistosoma mansoni*-resistant, susceptible and naïve *Biomphalaria glabrata*. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, p. 452, 14 dez. 2019.
- GALINIER, R. et al. Biomphalysin, a New b Pore-forming Toxin Involved in *Biomphalaria glabrata* Immune Defense against *Schistosoma mansoni* Richard. **Otolaryngology - Head and Neck Surgery (Tokyo)**, v. 9, n. 3, p. 16, 2013.
- GIANNELLI, A. et al. Gastropod-Borne Helminths: A Look at the Snail-Parasite Interplay. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 3, p. 255–264, 2016.
- GOMES CASAVECHIA, M. T. et al. Systematic review and meta-analysis on *Schistosoma mansoni* infection prevalence, and associated risk factors in Brazil. **Parasitology**, v. 145, n. 8, p. 1000–1014, 3 jul. 2018.
- GORDY, M. A.; PILA, E. A.; HANINGTON, P. C. The role of fibrinogen-related proteins in the gastropod immune response. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 46, n. 1, p. 39–49, 2015.
- GOUBAL, B. et al. Innate immune memory: An evolutionary perspective. **Immunological Reviews**, v. 283, n. 1, p. 21–40, 2018.
- GROSSMANN, J. et al. A workflow to increase the detection rate of proteins from unsequenced organisms in high-throughput proteomics experiments. **PROTEOMICS**, v. 7, n. 23, p. 4245–4254, dez. 2007.
- GRYSEELS, B. et al. Human schistosomiasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 368, p. 1106–1118, 2006.

- HAHN, U. K.; BENDER, R. C.; BAYNE, C. J. Killing of *Schistosoma mansoni* Sporocysts by Hemocytes from Resistant *Biomphalaria glabrata*: Role of Reactive Oxygen Species. **The Journal of Parasitology**, v. 87, n. 2, p. 292, 2001.
- HANINGTON, P. C. et al. Time series analysis of the transcriptional responses of *Biomphalaria glabrata* throughout the course of intramolluscan development of *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei*. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 7, p. 819–831, 2010.
- HANINGTON, P. C.; FORYS, M. A.; LOKER, E. S. A somatically diversified defense factor, FREP3, is a determinant of snail resistance to schistosome infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 3, 2012.
- ITTIPRASERT, W. et al. Identification of immediate response genes dominantly expressed in juvenile resistant and susceptible *Biomphalaria glabrata* snails upon exposure to *Schistosoma mansoni*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 169, n. 1, p. 27–39, jan. 2010.
- JIANG, N. et al. Respiratory protein-generated reactive oxygen species as an antimicrobial strategy. **Nature Immunology**, v. 8, n. 10, p. 1114–1122, 26 out. 2007.
- JONES, P. et al. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. **Bioinformatics**, v. 30, n. 9, p. 1236–1240, 1 maio 2014.
- JUNQUEIRA, M. et al. Protein identification pipeline for the homology-driven proteomics. **Journal of Proteomics**, v. 71, n. 3, p. 346–356, ago. 2008.
- KATZ, N. **Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geohelmintoses**. [s.l.: s.n.].
- KISELEVA, O. et al. Proteomic Cinderella: Customized analysis of bulky MS/MS data in one night. **Journal of Bioinformatics and Computational Biology**, v. 16, n. 1, p. 1–13, 2018.
- KOKKINOPOULOU, M. et al. 3D-Ultrastructure, Functions and Stress Responses of Gastropod (*Biomphalaria glabrata*) Rhogocytes. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e101078, 27 jun. 2014.
- KOKKINOPOULOU, M. et al. On the Ultrastructure and Function of Rhogocytes from the Pond Snail *Lymnaea stagnalis*. **PLOS ONE**, v. 10, n. 10, p. e0141195, 21 out. 2015.
- KUHLMAN, B.; BRADLEY, P. Advances in protein structure prediction and design. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 11, p. 681–697, 2019.
- KURTZ, J.; FRANZ, K. Evidence for memory in invertebrate immunity. **Nature**, v. 425, n. 6953, p. 37–38, 2003.
- LARANCE, M.; LAMOND, A. I. Multidimensional proteomics for cell biology. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 16, n. 5, p. 269–280, 2015.
- LESUR, A.; DOMON, B. Advances in high-resolution accurate mass spectrometry application to targeted proteomics. **Proteomics**, v. 15, n. 5–6, p. 880–890, 2015.
- LI, H. et al. Coordination of humoral immune factors dictates compatibility between *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria glabrata*. **eLife**, v. 9, n. e51708, 9 jan. 2020.
- LOCKYER, A. E. et al. Identification of genes involved in interactions between *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni* by suppression subtractive hybridization. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 151, n. 1, p. 18–27, jan. 2007.
- LU, L. et al. **Genomic and transcriptional analysis of genes containing fibrinogen and igsf domains in the schistosome vector biomphalaria glabrata, with emphasis on the differential responses of snails susceptible or resistant to schistosoma mansoni**. [s.l.: s.n.]. v. 14
- LUGE, T.; FISCHER, C.; SAUER, S. Efficient Application of de Novo RNA Assemblers for Proteomics Informed by Transcriptomics. **Journal of Proteome Research**, v. 15, n. 10, p. 3938–3943, 2016.
- MARINGER, K. et al. Proteomics informed by transcriptomics for characterising active transposable elements and genome annotation in *Aedes aegypti*. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, 19 jan. 2017.

- MARTIN, A. M. et al. Synthesis of keyhole limpet hemocyanin by the rhogocytes of *Megathura crenulata*. **Invertebrate Biology**, v. 130, n. 4, p. 302–312, dez. 2011.
- MARTINS-MELO, F. R. ET AL. Mortality from neglected tropical diseases in Brazil, 2000–2011. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 94, n. 2, p. 103, 2016.
- MCCORMACK, T. et al. Identification and functional characterization of a novel acetylcholine-binding protein from the marine annelid *Capitella teleta*. **Biochemistry**, v. 49, n. 10, p. 2279–2287, 2010.
- MCMANUS, D. P. et al. Schistosomiasis. **Nature Reviews: Disease Primers**, v. 4, n. December, 1 dez. 2018.
- MILUTINOVIĆ, B.; KURTZ, J. Immune memory in invertebrates. **Seminars in Immunology**, v. 28, n. 4, p. 328–342, 2016.
- MITTA, G. et al. Gene discovery and expression analysis of immune-relevant genes from *Biomphalaria glabrata* hemocytes. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 29, n. 5, p. 393–407, 2005.
- MITTA, G. et al. Compatibility polymorphism in snail/schistosome interactions: From field to theory to molecular mechanisms. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 37, n. 1, p. 1–8, 2012.
- MITTA, G. et al. The Compatibility Between *Biomphalaria glabrata* Snails and *Schistosoma mansoni*. In: **Advances in Parasitology**. [s.l.: s.n.]. p. 111–145.
- MUTH, T. et al. A Potential Golden Age to Come — Current Tools , Recent Use Cases , and Future Avenues for De Novo Sequencing in Proteomics. v. 1700150, p. 1–14, 2018.
- NEGRÃO-CORRÊA, D. et al. Interaction of *Schistosoma mansoni* sporocysts and hemocytes of *Biomphalaria*. **Journal of Parasitology Research**, p. 6, 2012.
- NETEA, M. G.; QUINTIN, J.; VAN DER MEER, J. W. M. Trained immunity: A memory for innate host defense. **Cell Host and Microbe**, v. 9, n. 5, p. 355–361, 2011.
- PEÑA, J. J.; ADEMA, C. M. The planorbid snail *Biomphalaria glabrata* expresses a hemocyanin-like sequence in the albumen gland. **PLoS ONE**, v. 11, n. 12, p. 1–17, 2016.
- PHAM, L. N. et al. A specific primed immune response in *Drosophila* is dependent on phagocytes. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 3, 2007.
- PIETRZYK-BRZEZINSKA, A. J.; BUJACZ, A. H-type lectins – Structural characteristics and their applications in diagnostics, analytics and drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 152, p. 735–747, jun. 2020.
- PILA, E. A. et al. A Novel Toll-Like Receptor (TLR) Influences Compatibility between the Gastropod *Biomphalaria glabrata*, and the Digenean Trematode *Schistosoma mansoni*. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 3, p. 1–23, 2016.
- PILA, E. A. et al. Schistosomiasis from a Snail's Perspective: Advances in Snail Immunity. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 11, p. 845–857, 2017.
- PINAUD, S. et al. A Shift from Cellular to Humoral Responses Contributes to Innate Immune Memory in the Vector Snail *Biomphalaria glabrata*. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 1, p. 1–18, 2016.
- PINAUD, S. et al. Molecular characterisation of immunological memory following homologous or heterologous challenges in the schistosomiasis vector snail, *Biomphalaria glabrata*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 92, n. December 2018, p. 238–252, 2019.
- PORTELA, J. et al. Evidence for specific genotype-dependent immune priming in the lophotrochozoan *Biomphalaria glabrata* snail. **Journal of Innate Immunity**, v. 5, n. 3, p. 261–276, 2013.
- PORTET, A. et al. Integrated multi-omic analyses in *Biomphalaria-Schistosoma* dialogue reveal the immunobiological significance of FREP-SmPoMuc interaction. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 75, p. 16–27, 2017.
- PORTET, A. et al. BgTEP: An antiprotease involved in innate immune sensing in *Biomphalaria*

- glabrata. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. MAY, 2018.
- PRASAD, T. S. K. et al. Integrating transcriptomic and proteomic data for accurate assembly and annotation of genomes. **Genome Research**, v. 27, n. 1, p. 133–144, 2017.
- QIN, Z. et al. Antibacterial activity of hemocyanin from red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 75, p. 391–399, abr. 2018.
- QIU, C. et al. Molecular Cloning of Hemocyanin cDNA from *Fenneropenaeus chinensis* and Antimicrobial Analysis of Two C-terminal Fragments. **Marine Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 46–53, 27 fev. 2014.
- RABILLOU, T. et al. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 11, p. 2064–2077, 2010.
- RABILLOU, T.; LELONG, C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 10, p. 1829–1841, 2011.
- REY-CAMPOS, M. et al. Immune tolerance in *Mytilus galloprovincialis* hemocytes after repeated contact with *Vibrio splendidus*. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. AUG, p. 1–15, 2019.
- RODRIGUES, J. et al. Hemocyte Differentiation Mediates Innate Immune Memory in *Anopheles gambiae* Mosquitoes. **Science**, v. 329, n. 5997, p. 1353–1355, 10 set. 2010.
- ROEPSTORFF, P. Mass spectrometry based proteomics, background, status and future needs. **Protein and Cell**, v. 3, n. 9, p. 641–647, 2012.
- RUHAAK, L. R. et al. Mass Spectrometry Approaches to Glycomic and Glycoproteomic Analyses. **Chemical Reviews**, v. 118, n. 17, p. 7886–7930, 2018.
- SADD, B. M. et al. Trans-generational immune priming in a social insect. **Biology Letters**, v. 1, n. September, p. 386–388, 2005.
- SANCHEZ, J.-F. et al. Biochemical and Structural Analysis of *Helix pomatia* Agglutinin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 29, p. 20171–20180, 21 jul. 2006.
- SCHOLTE, R. G. C. et al. Spatial distribution of *Biomphalaria* spp., the intermediate host snails of *Schistosoma mansoni*, in Brazil. **Geospatial Health**, v. 6, n. 3, p. S95–S101, 2012.
- SHEEHAN, G.; FARRELL, G.; KAVANAGH, K. Immune priming: the secret weapon of the insect world. **Virulence**, v. 11, n. 1, p. 238–246, 1 jan. 2020.
- STĄCZEK, S. et al. Studies on localization and protein ligands of *Galleria mellonella* apolipoprotein III during immune response against different pathogens. **Journal of Insect Physiology**, v. 105, p. 18–27, fev. 2018.
- TANG, T. et al. Identification of multiple ferritin genes in *Macrobrachium nipponense* and their involvement in redox homeostasis and innate immunity. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 89, n. February, p. 701–709, 2019.
- TANG, X.; WANG, X.; ZHAN, W. An integrin β subunit of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* involved in WSSV infection. **Aquaculture**, v. 368–369, p. 1–9, nov. 2012.
- TETREAU, G. et al. Specific pathogen recognition by multiple innate immune sensors in an invertebrate. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. OCT, p. 1249, 5 out. 2017.
- THAKUR, S. S. et al. Deep and Highly Sensitive Proteome Coverage by LC-MS/MS Without Prefractionation. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 10, n. 8, p. M110.003699, 2011.
- TRAN, N. H. et al. De novo peptide sequencing by deep learning. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 31, p. 8247–8252, 2017.
- VERGOTE, D. et al. Characterisation of proteins differentially present in the plasma of *Biomphalaria glabrata* susceptible or resistant to *Echinostoma caproni*. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 2, p. 215–224, 2005.
- VIDOVA, V.; SPACIL, Z. A review on mass spectrometry-based quantitative proteomics: Targeted and data independent acquisition. **Analytica Chimica Acta**, v. 964, p. 7–23, 2017.
- VORONTSOVA, Y. L. et al. The effect of trematode infection on the markers of oxidative stress in the offspring of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. **Parasitology Research**, v.

118, n. 12, p. 3561–3564, 2019.

WANG, G. et al. A homologue of dermatopontin from *Haliotis diversicolor* and its response to pathogenic infection. p. 1537–1549, 2015.

WATT, R. K. The many faces of the octahedral ferritin protein. **Biometals**, v. 24, p. 489–500, 2011.

WHO. **Schistosomiasis and soiltransmitted helminthiasis: numbers of people treated in 2017**. [s.l: s.n.].

WU, X. et al. Proteomic analysis of *Biomphalaria glabrata* plasma proteins with binding affinity to those expressed by early developing larval *Schistosoma mansoni*. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 5, p. 1–30, 2017.

YANG, Y. et al. Prediction of the potential global distribution for *Biomphalaria straminea*, an intermediate host for *Schistosoma mansoni*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 5, p. 1–16, 2018.

ZHANG, S. M.; LOKER, E. S. The FREP gene family in the snail *Biomphalaria glabrata*: Additional members, and evidence consistent with alternative splicing and FREP retrosequences. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 27, n. 3, p. 175–187, 2003.

ZHANG, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC Bioinformatics**, v. 9, p. 1–8, 2008.

ZHANG, Y. et al. An Integrin from Shrimp *Litopenaeus vannamei* Mediated Microbial Agglutination and Cell Proliferation. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. e40615, 9 jul. 2012.

ZHENG, L. et al. Hemocyanin from Shrimp *Litopenaeus vannamei* Has Antiproliferative Effect against HeLa Cell In Vitro. **PLOS ONE**, v. 11, n. 3, p. e0151801, 23 mar. 2016.

ZHOU, Y. et al. The complete mitochondrial genome of invasive species *Biomphalaria straminea* (Planorbidae: *Biomphalaria*) and phylogenetic analysis. **Mitochondrial DNA Part B: Resources**, v. 4, n. 1, p. 937–938, 2019.