

Universidade Federal de Ouro Preto

Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

PPGBIOTEC

Dissertação

**Análise composicional
e quantitativa do soroproteoma
na infecção experimental
por *Schistosoma mansoni***

Gustavo Gonçalves Silva

Ouro Preto
2019



UFOP

Universidade Federal de Ouro Preto
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Laboratório de Enzimologia e Proteômica

**Análise composicional e quantitativa do soroproteoma na infecção experimental
por *Schistosoma mansoni***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia com área de concentração em Genômica e Proteômica.

Autor: Gustavo Gonçalves Silva

Orientador: Prof. Dr. William de Castro Borges

Ouro Preto, Minas Gerais

2019

S381a Silva, Gustavo Gonçalves.
Análise composicional e quantitativa do soroproteoma na infecção experimental por *Schistosoma mansoni* [manuscrito] / Gustavo Gonçalves Silva. - 2019.
109f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientador: Prof. Dr. William de Castro Borges.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.
Área de Concentração: Genômica e Proteômica.

1. Esquistossomose. 2. Parasitologia. 3. Proteômica. I. Borges, William de Castro. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 616.993.122

Catálogo: www.sisbin.ufop.br



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos 08 dias do mês de março do ano de 2019, às 14:00 horas, nas dependências Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (Nupeb), foi instalada a sessão pública para a defesa de dissertação do mestrando Gustavo Gonçalves Silva, sendo a banca examinadora composta pelo Prof. Dr. William de Castro Borges (Presidente - UFOP), pelo Prof. Dr. Leonardo Maximo Cardoso (Membro - UFOP), pela Profa. Dra. Márcia Helena Borges (Membro - Externo). Dando início aos trabalhos, o presidente, com base no regulamento do curso e nas normas que regem as sessões de defesa de dissertação, concedeu ao mestrando Gustavo Gonçalves Silva 40 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "Análise Composicional e Quantitativa do Soroproteoma Na Infecção Experimental Por Schistosoma Mansoni", na área de concentração: Genômica e Proteômica. Terminada a exposição, o presidente da banca examinadora concedeu, a cada membro, um tempo para perguntas e respostas ao candidato sobre o conteúdo da dissertação, na seguinte ordem: Primeiro, Profa. Márcia Helena Borges; segundo, Prof. Leonardo Maximo Cardoso; terceiro, Prof. William de Castro Borges. Dando continuidade, ainda de acordo com as normas que regem a sessão, o presidente solicitou aos presentes que se retirassem do recinto para que a banca examinadora procedesse à análise e decisão, anunciando, a seguir, publicamente, que o mestrando foi aprovado por unanimidade, sob a condição de que a versão definitiva da dissertação deva incorporar todas as exigências da banca, devendo o exemplar final ser entregue no prazo máximo de 60 (sessenta) dias à Coordenação do Programa. Para constar, foi lavrada a presente ata que, após aprovada, vai assinada pelos membros da banca examinadora e pelo mestrando. Ouro Preto, 08 de março de 2019.

Prof. Dr. William de Castro Borges

Presidente

Prof. Dr. Leonardo Maximo Cardoso

Profa. Dra. Márcia Helena Borges

Mestrando

Agradecimentos

Aos meus pais e ao meu irmão.

Ao Professor Dr. William de Castro Borges pela oportunidade, orientação, exemplo, e por compartilhar comigo sua visão crítica e observações, refletindo na qualidade da minha formação acadêmica e do meu trabalho.

Ao Dr. Bruno Mattei pela disponibilidade e ensinamentos associados ao laboratório.

Ao Miguel de Jesus Cosenza Contreras pelas colaborações nos experimentos e resultados.

A Maiara Dias Nascimento pela colaboração.

Agradeço ao Professor Dr. Marcos Aurélio de Santana e ao Professor Dr. Milton Hércules Guerra de Andrade por terem me recebido muito bem no laboratório, assim como, ao Dr. Leandro Xavier Neves e Dra. Ananda Lima Sanson, ao Sr. José Henrique Braga Fortes, a Me. Luciana de Jesus Inácio, Me. Juliana Pereira Lage da Silveira Gasparini, e especialmente a Me. Mariana Siqueira Lacerda Mamede.

Ao grupo do Laboratório de Enzimologia e Proteômica e, a todos que diretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

Aos professores Jorgino Julio Cesar e Leonardo de Araújo Lopes pelo direcionamento, disponibilidade, conselhos, pelo ensino distinto e de qualidade, sempre foram meus exemplos, muito obrigado.

A Universidade Federal de Ouro Preto, ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“O importante é não parar de questionar.
A curiosidade tem a sua própria razão para existir.”

Albert Einstein.

Resumo

A esquistossomose é uma doença tropical negligenciada presente em 78 países. Cerca de 200 milhões de pessoas estão infectadas com parasitos do gênero *Schistosoma*, expondo um número muito maior de indivíduos ao risco de infecção. No decorrer da doença os vermes regurgitam os subprodutos de sua digestão, liberando proteínas na corrente sanguínea do hospedeiro. O conteúdo proteico do plasma é uma excelente fonte de informação para compreender melhor a doença no hospedeiro vertebrado. Abordagens proteômicas utilizando o plasma de indivíduos infectados podem contribuir para o entendimento de como os parasitos modificam ou induzem alterações no proteoma plasmático do hospedeiro. Essas investigações também podem ser úteis na busca de novos biomarcadores da esquistossomose. O objetivo deste projeto foi avaliar o proteoma plasmático e soroproteoma de camundongos na infecção experimental por *Schistosoma mansoni*, para o entendimento da relação parasito-hospedeiro e prospecção de novos alvos para o diagnóstico da doença. Amostras de plasma e soro de camundongos BALB/c e C57BL6 infectados e não infectados, foram colhidas nos períodos 5 e 7 semanas de infecção. As amostras foram investigadas utilizando 1D e 2D SDS PAGE e Western Blotting. Adicionalmente, proteômica em larga escala, baseada em espectrometria de massas foi utilizada para avaliação composicional e quantitativa das amostras investigadas. Em paralelo, métodos para aumentar a exploração do proteoma sérico foram utilizados para o enriquecimento de constituintes de baixa abundância, no intuito de aumentar o repertório de moléculas relacionadas à infecção. Os perfis uni e bidimensional das amostras de plasma e soro demonstraram diferenças entre as condições controle e infectado nos dois períodos investigados. Com a análise proteômica composicional em larga escala realizada por meio de espectrometria de massas, obteve-se a identificação de 362 constituintes. A análise quantitativa demonstrou 129 proteínas diferencialmente expressas, das quais 117 apresentaram aumento de expressão nas condições infectadas. A maioria das moléculas reguladas positivamente nessas condições pode estar associada com a resposta do hospedeiro frente à presença conjunta de parasitos e ovos nos tecidos. A dominância de algumas proteínas plasmáticas representa um desafio para a identificação de moléculas menos abundantes, os métodos de depleção empregados nesse estudo podem representar novas estratégias para identificação de biomarcadores da infecção por *S. mansoni*.

Palavras-chave: Esquistossomose, Parasitologia, Proteômica.

Abstract

Schistosomiasis is a neglected tropical disease present in 78 countries. Around 200 million people are infected with parasites of the *Schistosoma* genus, exposing a much larger number of individuals to the risk of infection. In the course of the disease, the worms regurgitate by-products of their digestion, releasing proteins into the host bloodstream. The protein content of plasma is an excellent source of information to better understand the disease in the vertebrate host. Proteomic approaches using the plasma from infected individuals may contribute to the understanding of how parasites modify or induce changes in the plasma proteome. These investigations may also be useful in the search for new biomarkers of schistosomiasis. Here we aimed to evaluate the plasma and serum proteomes of mice during experimental schistosomiasis to understand host-parasite interaction and to prospect new targets for diagnosis of the disease. Plasma and serum samples from infected and uninfected BALB/c and C57BL6 mice were collected at the 5th and 7th weeks post infection. Samples were evaluated through 1D and 2D SDS PAGE and Western Blotting. In addition, a mass spectrometric shotgun approach was used for the compositional and quantitative analyses. In parallel methods were employed to enrich for constituents of lower abundance present in the serum proteome in order to increase the repertoire of molecules related to the infection. The uni and bidimensional profiles of the plasma and serum samples demonstrated differences between the control and infected conditions in the two time points. The mass spectrometric based approach revealed the identification of 362 plasma constituents. Quantitative analysis showed 129 differentially expressed proteins, of which 117 demonstrated increased expression in the infected conditions. Most of the positively regulated molecules under these conditions could be related to the host's response to the presence of parasites and eggs in the tissues. The dominance of some plasma proteins poses a challenge for the identification of less abundant molecules, and the depletion methods used in this study may represent new strategies for the identification of biomarkers of the *S. mansoni* infection.

Keywords: Schistosomiasis, Parasitology, Proteomics.

Sumário

Lista de Figuras.....	x
Lista de Tabelas	xii
Lista de Abreviaturas	xiii
1. Introdução	1
1.1. Aspectos Gerais	2
1.2. Diagnóstico e Tratamento da Esquistossomose mansônica.....	4
1.3. O ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i>	6
1.4. Contribuições da Era Genômica em <i>Schistosoma sp.</i>	9
1.5. A Investigação da Relação Parasito-Hospedeiro na Doença.....	10
1.5.1. Abordagens Proteômicas na Investigação do Proteoma Plasmático	13
2. Objetivos.....	18
2.1. Objetivo Geral	19
2.2. Objetivos Específicos	19
3. Metodologia.....	20
3.1. Manutenção do Ciclo Experimental de <i>Schistosoma mansoni</i> e Delineamento Experimental	21
3.2. Obtenção das Amostras de Plasma.....	22
3.3. Obtenção das Amostras de Soro	23
3.4. Dosagem de Proteínas	23
3.5. Eletroforese Unidimensional	24
3.6. Eletroforese Bidimensional	25
3.7. Eletrotransferência para Membrana de PVDF e <i>Western Blotting</i>	25
3.8. Digestão Enzimática em Solução	26
3.9. Aquisição dos Dados Espectrais em Plataforma UHPLC-MS/MS.....	27
3.10. Busca de Identidades e Quantificação de Proteínas	28
3.11. Análise de Bioinformática.....	28
3.12. Análise Estatística.....	29
3.13. Métodos de Depleção e Enriquecimento do Soroproteoma	29
3.13.1. Depleção de Proteínas Séricas com Acetonitrila	29
3.13.2. <i>ProteoMiner™ Protein Enrichment Kit</i>	30
4. Resultados	32

4.1. Avaliação da Infecção e Evolução da Esquistossomose no Modelo Murino.....	33
4.2. O Proteoma Plasmático e o Soroproteoma na Esquistossomose Mansônica.....	34
4.2.1. Dosagem de Proteínas	34
4.2.2. Avaliação do Perfil Eletroforético Unidimensional.....	36
4.2.3. Avaliação do Perfil Eletroforético Bidimensional	38
4.2.4. Análise Proteômica Baseada em Espectrometria de Massas.....	40
4.2.5. Análise Composicional	43
4.2.6. Análise Quantitativa.....	46
4.3. Depleção por Acetonitrila.....	56
4.4. <i>ProteoMiner™ Protein Enrichment Kit</i>	59
5. Discussão	61
6. Conclusões	74
7. Referências	76
8. Anexos.....	87

Lista de Figuras

Figura 1. Distribuição da esquistossomose no Brasil, em 2018, pela faixa de positividade.....	3
Figura 2. Doenças tropicais negligenciadas passíveis de terapia preventiva.....	5
Figura 3. Representação do ciclo biológico de <i>Schistosoma mansoni</i>	7
Figura 5. Amplitude dinâmica das concentrações de proteínas no sangue.....	12
Figura 4. Estratégia de análise proteômica <i>Shotgun</i>	14
Figura 6. Representação do kit ProteoMiner™.....	16
Figura 7. Delineamento experimental da metodologia.....	21
Figura 8. Peso corporal, peso do baço e respectivas razões.....	33
Figura 9. Concentração de proteínas do plasma e soro na infecção com <i>S. mansoni</i>	35
Figura 10. 1D SDS PAGE: amostras de plasma dos grupos controle e infectado em 5 e 7 semanas de infecção.....	37
Figura 11. 1D SDS PAGE: amostras de soro dos grupos controle e infectado em 5 e 7 semanas de infecção.....	37
Figura 12. 2D SDS PAGE: amostras de plasma dos grupos controle e infectado em 5 e 7 semanas de infecção.....	38
Figura 13. 2D SDS PAGE: amostras de soro dos grupos controle e infectado em 5 e 7 semanas de infecção.....	39
Figura 14. <i>Western Blotting</i> bidimensional.....	40
Figura 15. Gráfico da correlação de <i>Pearson</i> entre as amostras.....	41
Figura 16. Cromatograma total de íons comparativo entre amostras Controle, Infectado (5 Semanas) e Infectado (7 semanas).....	42
Figura 17. Análise composicional.....	44
Figura 18. Diagrama de Venn.....	45
Figura 19. <i>Volcano Plot</i> das proteínas diferencialmente expressas.....	46
Figura 20. <i>Heatmap</i> demonstrando o perfil de expressão diferencial das 129 proteínas identificadas na análise quantitativa.....	47
Figura 21. Rede de interação entre proteínas diferencialmente expressas.....	54

Figura 22. Proteínas diferencialmente expressas, agrupadas por função..	55
Figura 23. Perfis eletroforéticos de amostras de soro depletado com Acetonitrila 60%, corado por Nitrato de Prata.....	57
Figura 24. Concentração de proteínas em amostras de soro depletadas e não depletadas..	58
Figura 25. Perfil eletroforético de amostras de soro total e após o emprego do ProteoMiner™ (Bio-Rad)..	59
Figura 26. Sistema Complemento.....	66

Lista de Tabelas

Tabela 1. Concentração de proteínas das amostras de plasma de camundongos controles e infectados por 5 e 7 semanas.....	35
Tabela 2. Concentração de proteínas das amostras de soro de camundongos controles e infectados por 5 e 7 semanas.....	36
Tabela 3. Indicadores obtidos pela plataforma observados em cada condição.	43
Tabela 4. Indicadores obtidos pela plataforma abrangendo a totalidade dos grupos.	43
Tabela 5. Proteínas diferencialmente expressas identificadas na análise quantitativa.	48
Tabela 6. Concentração de proteínas em amostras de Soro Não Depletado e em Soro Depletado por Acetonitrila 60%.....	58
Tabela 7. Concentração de proteínas de amostras de soro total e eluídas com NaCl 500 mM.	60
Tabela Suplementar 1. Proteínas identificadas na análise composicional.....	88
Tabela Suplementar 2. Proteínas unicamente identificadas nas três condições	102
Tabela Suplementar 3. Globulinas reguladas positivamente identificadas em amostras infectadas.....	107
Tabela Suplementar 4. Descrição das proteínas associadas às figuras 21 e 22.....	108

Lista de Abreviaturas

1D SDS PAGE	Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida, do inglês <i>One Dimensional Poliacrilamide Gel Electrophoresis</i>
2D SDS PAGE	Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida, do inglês <i>Two Dimensional Poliacrilamide Gel Electrophoresis</i>
AUC	Área sob a curva, do inglês <i>Area Under the Curve</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CCA	Centro de Ciência Animal
DTT	Ditiotreitol
ELISA	Imunoensaio Enzimático do inglês <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
HDC	Dissociação por alta energia, do inglês, <i>High Energy Collision Dissociation</i>
IAA	Iodoacetoamida
IPG	Gradiente de pH imobilizado do Inglês <i>Immobilized pH Gradient</i>
MeCN	Cianeto de Metila (Acetonitrila)
MEG	Microexon Gene
OMS	Organização Mundial da Saúde
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio, do inglês <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>

1. Introdução

1.1. Aspectos Gerais

A esquistossomose é uma doença tropical negligenciada, cuja magnitude de prevalência e severidade das manifestações clínicas a caracterizam como um importante problema de saúde pública (Ministério da Saúde, 2017). Os agentes etiológicos são parasitos pertencentes ao gênero *Schistosoma*, os quais se distribuem amplamente em diversas áreas geográficas ao redor do globo (Boissier *et al.*, 2016).

As espécies de maior relevância epidemiológica do gênero são *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907), *Schistosoma japonicum* (Katsurada, 1904), juntamente com *Schistosoma haematobium* (Bilharz, 1851), devido ao número de casos relacionados aos respectivos agentes etiológicos (Weerakoon *et al.*, 2015). Aproximadamente 200 milhões de pessoas em torno de 78 países possuem esquistossomose (Chuah *et al.*, 2016). Cerca de 90% dos casos estão contidos no continente africano (Huyse *et al.*, 2017). Os indivíduos infectados eliminam ovos nas fezes, expondo um número muito maior de pessoas ao risco de infecção (Rollemberg *et al.*, 2011).

No Brasil, em torno de 25 milhões de pessoas vivem em áreas endêmicas (Oliveira *et al.*, 2013). O Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geohelmintoses representa o esforço mais atual para avaliar a prevalência da doença no país (Figura 1). Realizado por meio do método de Kato-Katz, utilizou amostras de fezes de aproximadamente 197 mil indivíduos. Concluiu-se que 0,99% da população investigada foi infectada pelo *Schistosoma mansoni* (Katz, 2018).

A introdução da doença e o início de sua propagação no país estão relacionados aos contextos políticos e econômicos que se deram no período do Brasil colônia, particularmente pelo ingresso de africanos provindos do tráfico negreiro para trabalharem como escravos (Coura e Amaral, 2004). A entrada de indivíduos infectados no país inicialmente ocorreu nos portos de Recife e Salvador (Ministério da Saúde, 2014). A expansão das áreas endêmicas correlaciona-se com períodos migratórios dentro do território nacional. O Ciclo do Ouro e do Diamante no estado de Minas Gerais, e o declínio da produção açucareira no Nordeste, destacam-se como fatores que corroboraram para propagação da doença em outras áreas do país (Ministério da Saúde, 2014). Caramujos do gênero *Biomphalaria* participam ativamente da transmissão da

doença, por constituírem-se como o hospedeiro intermediário, este molusco se distribui majoritariamente pelas regiões sudeste e nordeste, contudo, apesar da ocorrência na região sul, nesta não há grandes relatos da doença, devido a necessidade de determinadas temperaturas e incidência de luz solar, serem fatores fundamentais para continuidade do ciclo de vida do parasito (Lopes *et al.*, 2017).

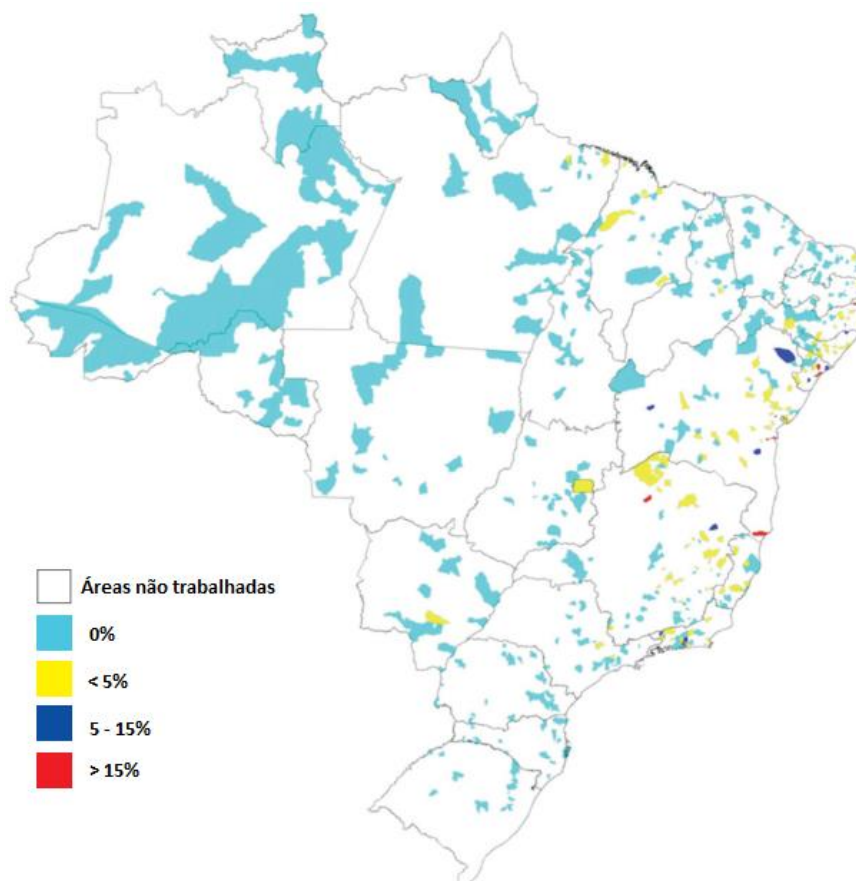


Figura 1. Distribuição da esquistossomose no Brasil, em 2018, pela faixa de positividade. Representação da distribuição da doença no país. Detalhe para as áreas de maior positividade, em vermelho, no Sudeste e Nordeste do Brasil. Notam-se alguns pontos isolados com menor positividade em direção ao interior do país. Particularmente, o estado de Minas Gerais demonstra áreas de baixa, média e alta prevalência.

Adaptado de: Katz, 2018.

A esquistossomose apresenta altas taxas de morbidade e mortalidade (Bocanegra *et al.*, 2015), a maioria de suas manifestações clínicas pode sugerir outras doenças pela similaridade dos sintomas (Ministério da Saúde, 2017). O diagnóstico da doença em conjunto com o tratamento, são ferramentas essenciais frente ao combate da esquistossomose (Ministério da Saúde, 2017).

1.2. Diagnóstico e Tratamento da Esquistossomose mansônica

As complicações clínicas no hospedeiro vertebrado decorrentes da esquistossomose podem tornar-se irremediáveis com a progressão da doença. A presença dos ovos do parasito nos tecidos do indivíduo infectado promove complicações hepatoesplênicas, aumento da pressão no sistema porta-hepático, varizes esofágicas, entre outros (Carvalho *et al.*, 2008). O diagnóstico utiliza exames parasitológicos, imunológicos e moleculares e, em conjunto com o tratamento, constituem meios fundamentais no combate à doença (Ogongo *et al.*, 2018).

Os métodos de diagnóstico da esquistossomose podem ser divididos em métodos diretos e indiretos (Ministério da Saúde, 2014). Dentre os métodos diretos, destacam-se a pesquisa de ovos nas fezes, a pesquisa de antígeno circulante do parasito e, em último caso, biópsia (Weerakoon *et al.*, 2015). Os métodos indiretos baseiam-se em reações antígeno e anticorpo e são pouco utilizados nos serviços de rotina, principalmente pela complexidade de execução e exigência de equipamentos específicos (Ministério da Saúde, 2014).

O exame parasitológico de fezes pela técnica de Kato-Katz, desenvolvida em 1972, é amplamente utilizado e foi preconizado pela Organização Mundial da Saúde como o método de escolha para diagnóstico de esquistossomose mansônica (Weerakoon *et al.*, 2015). A técnica permite a quantificação de ovos por gramas de fezes (Ministério da Saúde, 2014) e demonstra uma alta especificidade, sendo de simples execução e de baixo custo. No entanto, o método Kato-Katz apresenta sensibilidade reduzida em áreas de baixa prevalência e, portanto, subestima o número de indivíduos com baixa parasitemia (Ogongo *et al.*, 2018).

Para sobrepor as limitações da técnica de Kato-Katz, a metodologia do *Helmintex* utiliza da afinidade dos ovos de *S. mansoni* com partículas de óxido de ferro magnético (Candido *et al.*, 2018), podendo representar uma alternativa como método de referência aplicado ao diagnóstico da esquistossomose. Essa técnica demonstrou alta sensibilidade em comparação a outras metodologias, mesmo em regiões com baixa parasitemia (Lindholz *et al.*, 2018). Entretanto, os métodos diretos para detecção de ovos não são efetivos em diagnosticar a infecção antes de aproximadamente 4 a 5 semanas, pois

somente a partir desse período os ovos estarão presentes nas fezes de indivíduos infectados (Weerakoon *et al.*, 2015).

As abordagens sorológicas direcionadas ao diagnóstico da esquistossomose utilizam antígenos ou anticorpos provenientes de vários estágios do ciclo de vida do parasito, como a cercária, o esquistossômulo, o verme adulto, os ovos, assim como os antígenos circulantes secretados pelo parasito, como o Antígeno Circulante Anódico e Catódico. Os métodos sorológicos representam uma ferramenta distinta ao diagnóstico no contexto de indivíduos que apresentam baixa parasitemia, por demonstrar maior sensibilidade frente aos métodos convencionais de detecção dos ovos (Hinz *et al.*, 2017; Ogongo *et al.*, 2018).

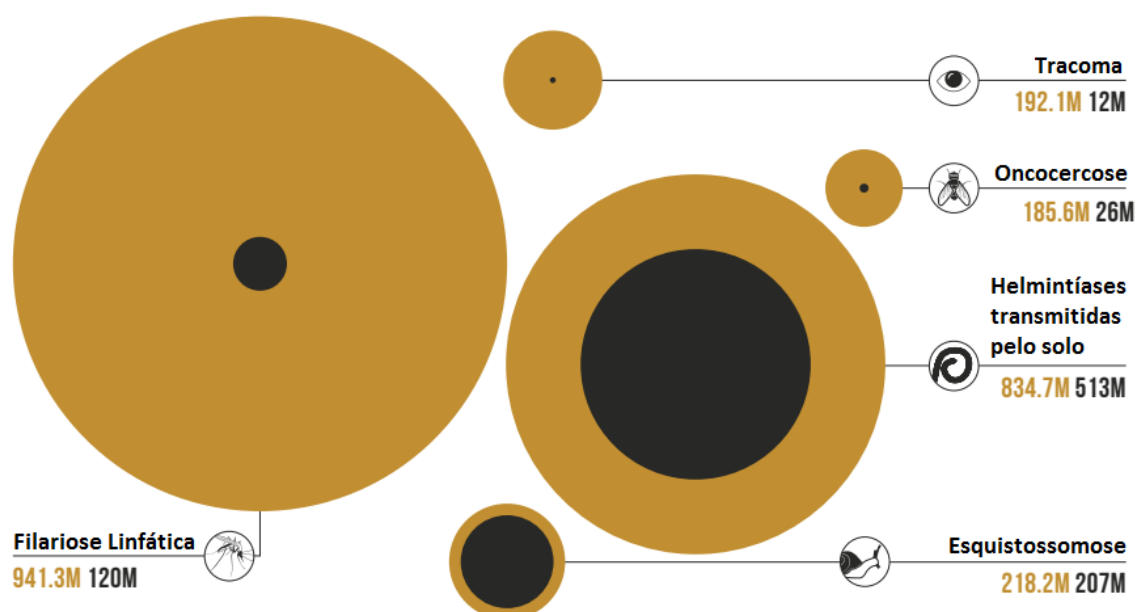


Figura 2. Doenças tropicais negligenciadas passíveis de terapia preventiva. Os círculos laranja representam o número estimado de indivíduos necessitados de terapia preventiva. Em preto, demonstra o número de indivíduos infectados. Destaque para relação indivíduos infectados aze necessitados de fármaco na esquistossomose.

Adaptado de: World Health Organization, 2017.

Os programas de tratamento preventivo em massa utilizados recentemente representam um esforço significativo no combate a doenças tropicais negligenciadas (World Health Organization, 2017). A recomendação da Organização Mundial da Saúde (OMS) para o controle da esquistossomose em áreas endêmicas (Figura 2) é o tratamento preventivo (World Health Organization, 2017).

O medicamento preconizado pela OMS para o tratamento da esquistossomose é o Praziquantel (World Health Organization, 2016). Disponibilizado no mercado em 1979 (Friedman *et al.*, 2018), o medicamento não demonstra eficácia contra a fase de vida de esquistossômulo, tendo sua ação restrita aos vermes adultos (Bustinduy *et al.*, 2016). O fármaco é de amplo espectro anti-helmíntico (Vitorino *et al.*, 2012), sendo licenciado para administração oral em adultos e crianças no tratamento de infecções ocasionadas pelas três espécies principais do gênero *Schistosoma* (Bustinduy *et al.*, 2016).

1.3. O ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*

O ciclo de vida do *Schistosoma mansoni* foi descrito inicialmente por Adolpho Lutz no Brasil e, de forma independente, no Egito por Robert Leiper. Trata-se de um ciclo heteroxeno (Figura 3), com a participação de moluscos do gênero *Biomphalaria* como hospedeiros intermediários e do homem como hospedeiro definitivo (Neves, 2002). Condições ambientais, de saneamento e indivíduos infectados eliminando ovos nas fezes, contribuem para a ocorrência do ciclo de vida do parasito e propagação da doença (Carvalho *et al.*, 2008).

O ovo de *S. mansoni* mede aproximadamente 150 µm e apresenta o genótipo definido, ZW para parasitos fêmeas e ZZ para machos (Hirai *et al.*, 2012). Ao ser carregado pelas fezes do hospedeiro vertebrado, o ovo atinge um curso de água. Em condições adequadas de temperatura (em torno de 28°C), iluminação solar e hipotonicidade eclode-se o miracídio. Esse possui formato cilíndrico, medindo em torno de 160-180 µm de comprimento e 60 µm de largura e é formado por placas epidérmicas ciliadas agrupadas em fileiras. Os cílios tem comprimento de 4 a 12 µm, os de tamanho maior estão concentrados na parte anterior, diminuindo à medida que se direcionam para a região posterior. Destaca-se na porção anterior o terebratorium, local de abertura das glândulas de penetração, das glândulas adesivas e dos quimiorreceptores (Carvalho *et al.*, 2008; Famakinde, 2017).

Após a eclosão, o miracídio nada ativamente por ação de batimentos sincronizados dos cílios, atingindo velocidade média de 2 mm/segundo. Quimiorreceptores são capazes de detectar glicoconjugados superficiais presentes no muco de caramujos do gênero

Biomphalaria. A percepção dos glicoconjugados pelo miracídio leva a aceleração dos movimentos e localização do molusco (Neves, 2002; Carvalho *et al.*, 2008; Famakinde, 2017).

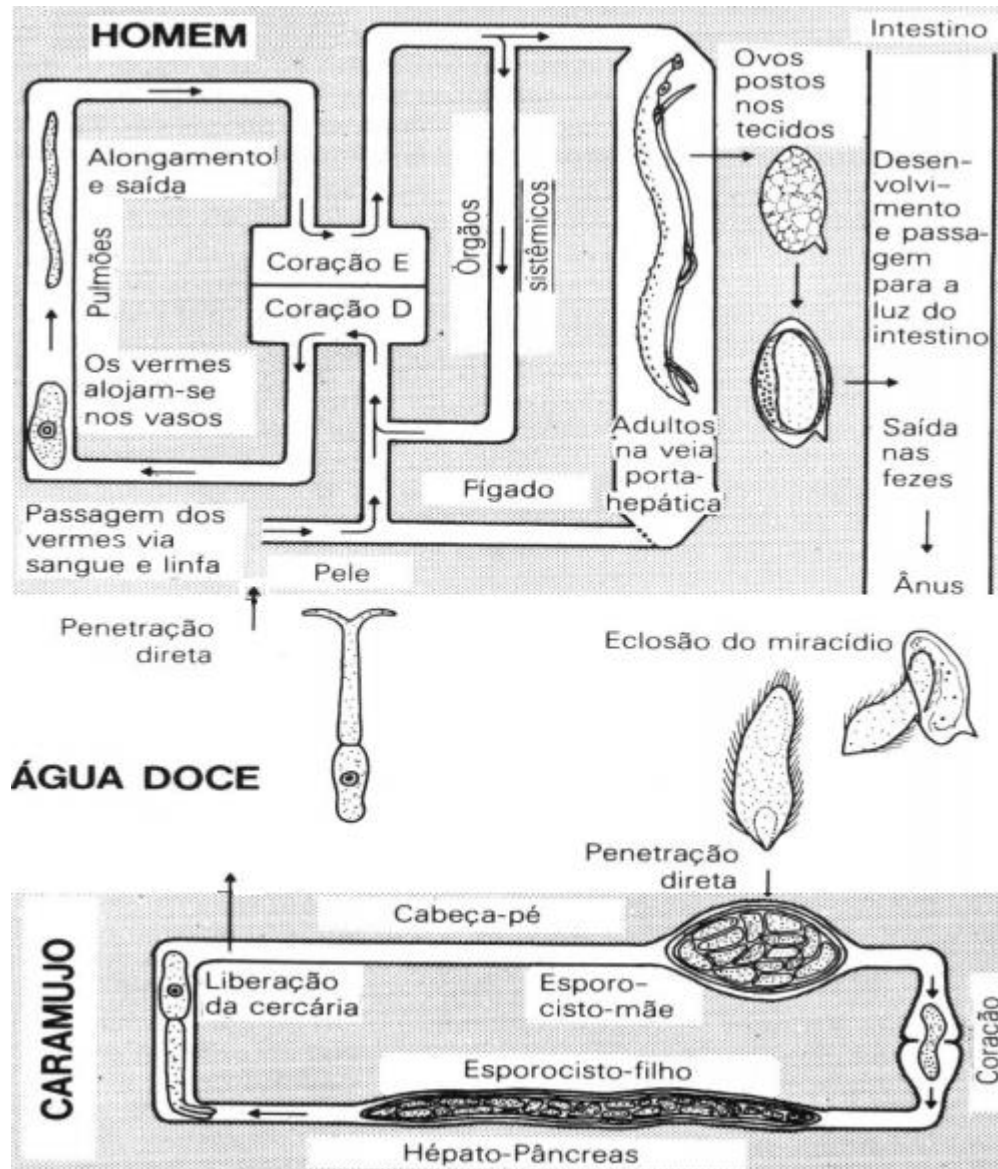


Figura 3. Representação do ciclo biológico de *Schistosoma mansoni*. O ciclo de vida de *S. mansoni* é heteroxeno com a participação do hospedeiro invertebrado, caramujos do gênero *Biomphalaria*, e hospedeiro vertebrado, representado pelo homem.

Fonte: Wilson, 1980.

Há três espécies no país que são permissíveis à infecção pelo miracídio: *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*. A penetração do miracídio ocorre no pé e no manto do molusco, sendo alcançada entre 3 e 15 minutos por movimentos

rotatórios, juntamente com secreções das glândulas. Cerca de 30% dos miracídios obtêm sucesso na penetração e iniciam o desenvolvimento intramolusco (Neves, 2002; Carvalho *et al.*, 2008; Famakinde, 2017).

Após a penetração, o miracídio passa por transformações morfológicas devido ao novo ambiente, que apresenta condições distintas de pH, osmolaridade, temperatura e disponibilidade de oxigênio, dando origem ao esporocisto primário. Divisões e diferenciações celulares consecutivas dão origem ao esporocisto secundário. Após 5 a 6 dias, essa forma de vida desloca-se para o hepatopâncreas e ovotéstis (Neves, 2002; Carvalho *et al.*, 2008; Famakinde, 2017).

O desenvolvimento intramolusco do esporocisto secundário ocorre após 3 a 4 semanas. A partir do poro de nascimento, as cercárias estão aptas a serem liberadas do esporocisto. Cada miracídio pode originar de 100 a 300 mil cercárias. Nessa etapa do ciclo de vida, a liberação ocorre no hepatopâncreas e ovotéstis, órgãos que se localizam na parte posterior e mais bem protegida da concha. A cercária migra através dos espaços intracelulares, sistema nervoso e hemolinfa do caramujo. A saída para o ambiente externo segue um ritmo circadiano. A temperatura e condições de luminosidade são fatores-chaves para a emergência cercariana (Neves, 2002; Carvalho *et al.*, 2008). O caramujo passa a eliminar cercárias após 4 a 7 semanas da infecção pelos miracídios e esse processo ocorre ao longo da vida do molusco, algo em torno de 1 ano (Ministério da Saúde, 2017).

As cercárias possuem comprimento aproximado de 500 μm . Na parte anterior, apresentam o corpo cercariano, onde se localizam as ventosas oral e ventral, as glândulas, as células nervosas e germinativas, além dos receptores térmicos e químicos. A cercária concentra-se sob a superfície da água, nadando ativamente ao encontro do hospedeiro vertebrado (Neves, 2002; Curwen *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2008). A penetração no hospedeiro, com duração média de 1,5 minutos (Haas e Haeberlein, 2009), ocorre na dependência da ação mecânica e proteolítica presentes nas glândulas acetabulares do corpo cercariano. O conteúdo proteico secretado é composto por isoformas de elastase, isoformas de serino protease, metaloproteases e dipeptidil peptidases (Curwen *et al.*, 2006).

Após a penetração, transformações metabólicas e teciduais levam ao estágio de esquistossômulo. Esse se adapta as novas condições fisiológicas de pH, disponibilidade de oxigênio, glicose, entre outros (Jeremias *et al.*, 2017). Essa fase larval atravessa a

camada mais externa da pele, a derme, em direção à epiderme e ganha acesso aos vasos sanguíneos. O parasito, na luz dos vasos, desloca-se até o pulmão e coração e, posteriormente, alcança o sistema porta-hepático (Neves, 2002; Curwen *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2008).

Em torno de 4 semanas após a infecção, vermes machos e fêmeas estão aptos ao pareamento, que ocorre nos ramos intra-hepáticos da veia porta. Esse processo é fundamental e influencia a expressão gênica em ambos os vermes, permitindo a maturação sexual e início da oviposição (Steinauer, 2009). As fêmeas ovipõem cerca de 300 ovos por dia, os quais são depositados no endotélio das paredes dos capilares. A partir da oviposição, os ovos são disseminados pelo fluxo sanguíneo para outros órgãos ou translocam através do epitélio, em direção ao lúmen intestinal (Costain *et al.*, 2018; Schwartz e Fallon, 2018).

Os ovos são metabolicamente ativos e altamente antigênicos, promovendo inflamações que levam à formação de granulomas ao seu redor. Muitos mecanismos associados ao deslocamento do ovo do endotélio até o lúmen intestinal ainda não estão bem elucidados. Contudo, após os ovos alcançarem o lúmen intestinal, esses são carregados pelas fezes e atingem um curso de água, iniciando novamente o ciclo (Costain *et al.*, 2018; Schwartz e Fallon, 2018).

1.4. Contribuições da Era Genômica em *Schistosoma sp.*

O *Schistosoma mansoni* se insere no contexto da era genômica inicialmente nos anos 80, como o início de investigações utilizando seu DNA (Simpson *et al.*, 1982). O projeto genoma de *Schistosoma sp.* iniciou em 1994, pela Organização Mundial da Saúde, com o intuito de prospectar novos alvos de tratamento, vacinais e diagnóstico da doença (Loverde *et al.*, 2004). Em paralelo, iniciou-se também um programa de descoberta de genes, para caracterização e entendimento da biologia do parasito (Franco, Gloria R *et al.*, 1995; Franco, Glória R *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 1995).

Em 2003 houve a publicação da análise do transcrito de *Schistosoma mansoni* (Verjovski-Almeida *et al.*, 2003), demonstrando mecanismos relacionados aos diversos processos fisiológicos desempenhados por essa espécie. A partir das anotações do *Gene*

Ontology foi possível a categorização dos transcritos, resultando em um panorama de funções desempenhadas pelo parasito (Verjovski-Almeida *et al.*, 2003).

A publicação do genoma ocorreu em 2009 (Berriman *et al.*, 2009), tratando-se de um genoma parcial (*draft*). Contribuições valiosas a respeito de vários mecanismos bioquímicos de *S. mansoni* foram reveladas, como informações relacionadas ao metabolismo de lipídios, processos metabólicos como glicólise, ciclo do ácido tricarboxílico, via das pentoses fosfato, entre outros.

A partir do estudo das sequências do genoma, novas abordagens foram empregadas, resultando em contribuições essenciais ao entendimento de expressão gênica em diversas fases de vida do parasito, do hospedeiro intermediário e vertebrado (Zerlotini e Oliveira, 2010). Posteriormente, novas atualizações e aperfeiçoamentos foram utilizados na análise do genoma e transcritoma de *S. mansoni* (Protasio *et al.*, 2012), os quais coletivamente possibilitaram novas estratégias a serem direcionadas as investigações relacionadas ao gênero *Schistosoma*.

1.5. A Investigação da Relação Parasito-Hospedeiro na Doença

Atualmente, há um repertório significativo de informações no contexto da esquistossomose no que diz respeito às manifestações clínicas da doença, assim como, sabe-se de forma mais detalhada sobre o ciclo de vida e biologia do parasito. Abordagens proteômicas já foram empregadas no hospedeiro intermediário (Wu *et al.*, 2017; Dinguirard *et al.*, 2018) e em diversas fases do ciclo de vida do parasito (Curwen *et al.*, 2004; Knudsen *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016). Contudo, ainda há esforços a serem direcionados para importantes questões, com o potencial de ampliar, principalmente, o conhecimento a respeito da relação parasito-hospedeiro.

Recentemente, algumas investigações proteômicas do gênero *Schistosoma* têm sido direcionadas a duas notáveis interfaces parasito-hospedeiro: o tegumento e o trato alimentar. Historicamente, o tegumento tem sido explorado na busca de candidatos vacinais e outros potenciais alvos terapêuticos (Sotillo *et al.*, 2015), principalmente por representar um sítio importante, onde ocorrem diversos processos fundamentais, como absorção de glicose, de certos aminoácidos, entre outros (Skelly *et al.*, 2014).

Como parte constituinte do trato alimentar, o esôfago de *Schistosoma sp.* é revestido pela glândula esofagiana. Os corpos celulares presentes nas glândulas são direcionados a produção de constituintes a serem secretados no lúmen esofágico. O esôfago nesses parasitos não se trata simplesmente de um condutor de sangue entre a cavidade oral e o intestino, mas é o local onde ocorre o processamento inicial do sangue (Li *et al.*, 2018). Há evidências de que as moléculas secretadas no lúmen esofágico do parasito interagem com eritrócitos, leucócitos e plaquetas, prevenindo que o sangue coagule, neutralizando, assim, agentes tóxicos ao parasito, como imunoglobulinas e fatores do complemento (Wilson *et al.*, 2015).

Os produtos secretados no lúmen esofágico foram identificados como enzimas hidrolíticas de origem lisossomal, MEGs (Microexon Genes), entre outros. As MEGs compreendem uma nova família de genes encontrados somente dentro do gênero *Schistosoma* (Wilson *et al.*, 2015). É necessário que os produtos da digestão dos parasitos sejam regurgitados para o ambiente externo ao verme, a corrente sanguínea, pois *Schistosoma sp.* são protostômios (Skelly *et al.*, 2014). Em experimentos *in vitro*, identificou-se no vômito desses parasitos proteínas que particularmente são secretadas no lúmen esofágico, como as MEGs (Neves, 2018).

O mecanismo de regurgitação pode promover o carreamento de proteínas secretadas no lúmen esofágico do parasito para a corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado. A regurgitação de constituintes unicamente identificados dentro do gênero *Schistosoma*, a exemplo das MEGs, justifica a análise do proteoma plasmático de indivíduos infectados com *Schistosoma sp.* para a identificação dessas moléculas regurgitadas.

A detecção no proteoma plasmático do hospedeiro vertebrado, de proteínas do parasito, exclusivamente identificadas em espécies do gênero *Schistosoma*, pode contribuir para o aumento da sensibilidade das técnicas de diagnóstico. A análise do proteoma plasmático de indivíduos infectados pode revelar biomarcadores da infecção, por meio das proteínas liberadas pelo parasito, e ainda permitir a identificação de alterações no nível de expressão das proteínas produzidas em resposta à infecção (Boschetti *et al.*, 2018). Contudo, a análise do proteoma plasmático constitui um desafio metodológico.

O sangue demonstra uma grande amplitude dinâmica na distribuição das concentrações de suas proteínas (Figura 5). As diferenças entre as concentrações dos constituintes de menor e maior abundância podem alcançar 10 ordens de magnitude (Geyer *et al.*, 2017).

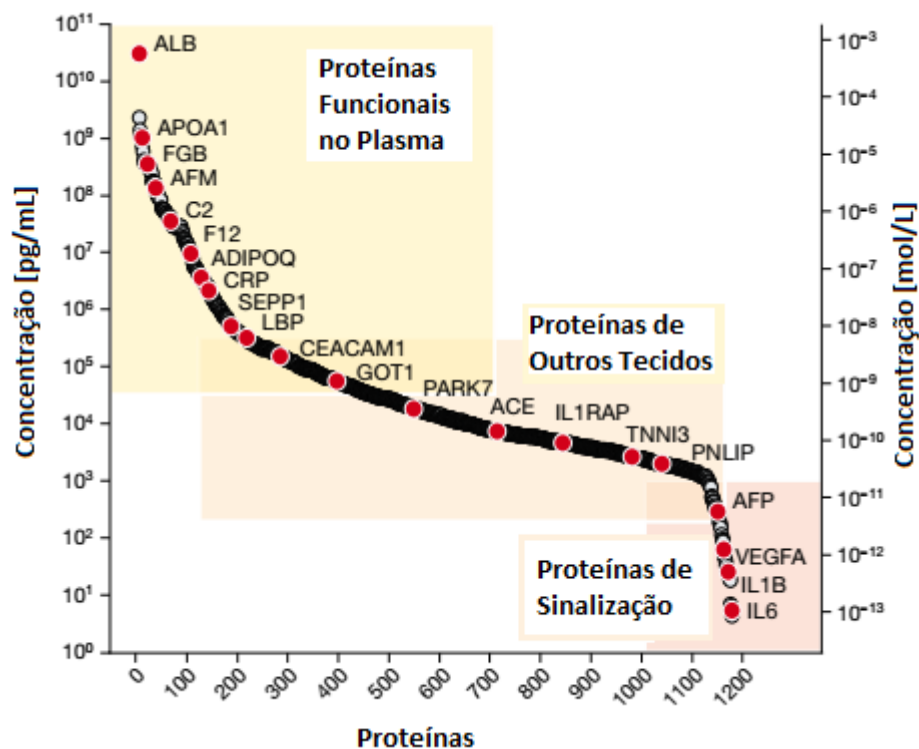


Figura 4. Amplitude dinâmica das concentrações de proteínas no sangue. As proteínas plasmáticas podem ser categorizadas em três classes. A primeira contém proteínas abundantes com papel funcional no plasma. A segunda classe consiste de proteínas provenientes dos tecidos, sem uma função específica na circulação. A terceira classe possui moléculas sinalizadoras, como hormônios e citocinas.

Fonte: GEYER *et al.*, 2017.

Este fluido biológico apresenta-se como um proteoma de alta complexidade (Geyer *et al.*, 2016). Poucas proteínas constituem-se como as mais abundantes, a exemplo da albumina, representando em torno de 60% da abundância acumulativa das proteínas do sangue. Em consequência, a identificação de moléculas de baixa abundância torna-se um grande desafio (Lin *et al.*, 2017). Particularmente, a identificação de moléculas regurgitadas pelo parasito pode demonstrar um alto grau de complexidade, devido à presumível baixa concentração dessas proteínas alvos e a grande distribuição dos constituintes proteicos nesse fluido biológico.

1.5.1. Abordagens Proteômicas na Investigação do Proteoma Plasmático

O proteoma refere-se ao complemento proteico expresso pelo genoma, esse termo atribuído por Marc Wilkins, durante a *First Siena Conference, 2D Electrophoresis: From Protein Maps to Genomes* em 1994 (Moreira, 2015). Desde então a proteômica tornou-se uma ferramenta distinta para a investigação e o entendimento dos mecanismos moleculares de um organismo.

As abordagens proteômicas utilizam de diferentes metodologias para avaliar o conteúdo proteico. Métodos de proteômica clássica incluem o emprego de técnicas de eletroforese. A separação de proteínas tomando por base a massa molecular constitui o fundamento da eletroforese unidimensional. A partir do deslocamento diferencial das proteínas em uma matriz de acrilamida/bis-acrilamida pode-se avaliar a distribuição dos constituintes em uma amplitude determinada de massa. Contudo, muitas proteínas possuem massas moleculares próximas, o que resulta em co-migrações de proteínas em regiões específicas do gel de eletroforese (Brunelle e Green, 2014).

Posteriormente, com intuito de aumentar a resolução na separação de proteínas em amostras complexas e obter um perfil eletroforético mais detalhado, a separação utilizando o ponto isoelétrico e, em seguida, a massa molecular das proteínas, constitui o princípio da eletroforese bidimensional. Essa metodologia de separação de proteínas, aperfeiçoada com a evolução tecnológica no campo da proteômica, permite maior resolução dos constituintes proteicos presentes em uma amostra (Görg, 2004; Rabilloud e Lelong, 2011).

Estabelecida como uma ferramenta robusta na identificação de proteínas, a análise proteômica em larga escala (*Shotgun*), baseada em espectrometria de massas, permite uma investigação mais detalhada, de alta sensibilidade e com maior resolução na identificação e quantificação de proteínas em amostras complexas (Cottrell, 2011; Feist e Hummon, 2015).

Em amostras direcionadas a estratégia de análise em proteômica *Shotgun* (Figura 4), inicialmente, emprega-se a adição do agente redutor, no intuito de reduzir as ligações dissulfeto entre os resíduos de cisteína. Em seguida, há a alquilação desses resíduos, resultando em uma modificação química denominada carbamidometilação. Em consequência, as proteínas da amostra estarão com os sítios de clivagem mais acessíveis

para ação da enzima escolhida para digestão. Após a digestão, os peptídeos obtidos são direcionados à plataforma de cromatografia líquida de alta resolução acoplada ao espectrômetro de massas (UHPLC-MS/MS) (Bereman *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013).

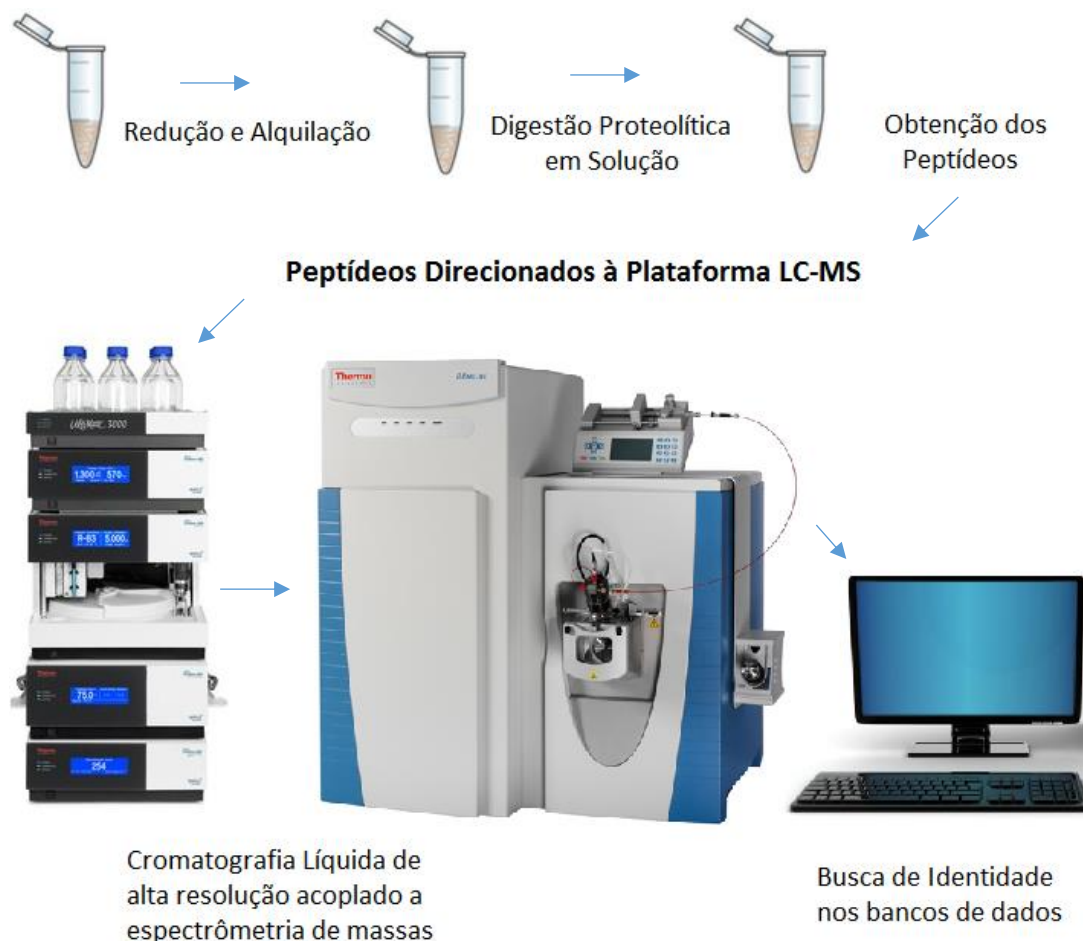


Figura 5. Estratégia de análise proteômica Shotgun. Representação das principais etapas em amostras submetidas à análise proteômica em larga escala.

Os peptídeos são separados via cromatografia líquida de alta resolução e, em seguida, por uma interface prévia com um sistema de cromatografia, alcançam o espectrômetro de massas. Por meio da técnica de eletropulverização, os peptídeos são ionizados pela aplicação de uma alta voltagem, criando um forte campo elétrico, o qual promove a formação de um aerossol composto por gotículas altamente carregadas. Essas diminuem em tamanho pela evaporação do solvente, resultando em gotas de diâmetro cada vez menor, um evento denominado *droplet fission*. Os peptídeos ionizados são então direcionados para o interior do espectrômetro, onde terão suas razões massa/carga (m/z)

resolvidas de acordo com o tipo de analisador de massas do equipamento (Cottrell, 2011; Moreira, 2015).

Após a determinação das razões massa/carga dos respectivos peptídeos, o espectrômetro de massas direciona-se para obtenção de informações referentes à sequência primária dos aminoácidos contidos nos íons, procedimento denominado MS Sequencial ou MSⁿ. Uma análise por MS² é geralmente suficiente para obtenção da composição de aminoácidos de um determinado peptídeo. Neste contexto, um peptídeo precursor é isolado. Ao colidir com um gás inerte, fragmentações das ligações internas desses peptídeos geram íons de menor massa molecular. Em particular, íons de série -y e -b são formados a partir da fragmentação das ligações peptídicas, e íons que diferem na razão m/z e são correspondentes à massa molecular de um resíduo de aminoácido (Cottrell, 2011; Moreira, 2015). Os espectros de massa obtidos são utilizados para a busca de identidade a partir de um banco de dados, confluindo-se os espectros teóricos e experimentais em uma digestão *in silico*, que resulta na identificação das proteínas da amostra (Gillette e Carr, 2013).

A utilização de uma plataforma robusta de espectrometria de massas, pode permitir a observação de alterações no proteoma plasmático que estejam associadas à presença da infecção no hospedeiro vertebrado. Contudo, para uma exploração mais detalhada deste proteoma e acesso a um grupo de proteínas que se apresentam em baixas concentrações no sangue, há metodologias que permitem a depleção dos constituintes mais abundantes e normalização da distribuição das concentrações proteicas. Em consequência, obtêm-se frações representativas de moléculas de alta, média e baixa abundância (Boschetti *et al.*, 2018; Prates *et al.*, 2018).

A adição de solventes orgânicos em amostras de soro ou plasma promove a precipitação de constituintes de alta massa molecular, permitindo um enriquecimento de proteínas de baixa massa. Particularmente, a adição de Acetonitrila na concentração de 60% tem se mostrado como um método reprodutivo e eficaz na depleção de proteínas em amostras de soro e plasma (Prates *et al.*, 2018).

Metodologias que possibilitam um acesso maior as frações de média e baixa abundância são essenciais para permitir a descoberta de biomarcadores e proteínas provenientes do parasito. Uma técnica com a proposta de normalização da distribuição proteica em amostras de soro ou plasma é o *kit* de enriquecimento proteico

*ProteoMiner*TM, que utiliza uma extensa e altamente diversificada biblioteca de peptídeos combinatoriais randômicos ligados à *beads* (Guerrier *et al.*, 2008).

Quando amostras biológicas complexas são aplicadas a uma coluna contendo os *beads* (Figura 6), proteínas de alta abundância saturam sua ligação de alta afinidade aos seus ligantes. Em contraste, as proteínas de média e baixa abundância concentram nos seus respectivos ligantes de afinidade específicos. Em consequência, há a redução da amplitude dinâmica de concentrações de proteínas, mantendo representantes de proteínas de alta a baixa abundância na amostra original (Guerrier *et al.*, 2008). A utilização do *ProteoMiner*TM já tem sido descrito na literatura, demonstrando a capacidade de aumento do repertório de constituintes identificados em amostras de plasma e soro, utilizando plataformas HPLC-MS/MS (Li *et al.*, 2017; Carcangiu *et al.*, 2018; Pisanu *et al.*, 2018).

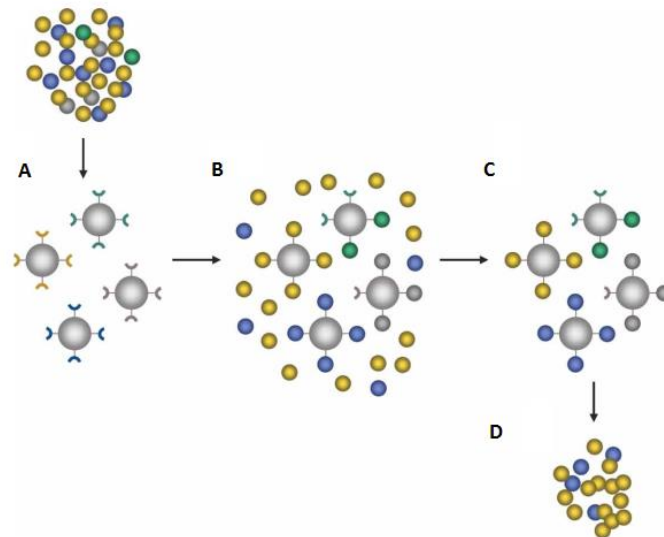


Figura 6. Representação do kit *ProteoMiner*TM. **A.** Amostra complexa é direcionada à interação com os *beads*. **B.** As proteínas ligam-se aos *beads* contendo uma diversidade de peptídeos combinatoriais. **C.** Após a lavagem, permanecem ligadas proteínas constituídas de alta, média e baixa abundância. **D.** As moléculas são eluídas da coluna contendo os *beads* e direcionadas às análises subsequentes.

Fonte: Adaptado de Guerrier, 2008.

As pesquisas no gênero *Schistosoma* até o momento, têm demonstrado evidências que corroboram para abordagens proteômicas direcionadas ao plasma e soro de indivíduos infectados. Este trabalho tem como objetivo a investigação do proteoma plasmático e soroproteoma de camundongos controles e infectados com *Schistosoma*

mansoni, para contribuir para o entendimento da relação parasito-hospedeiro e prospecção de novos alvos para o diagnóstico da doença.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

- ❖ Avaliar o proteoma plasmático e soroproteoma de camundongos na infecção experimental por *Schistosoma mansoni* para entendimento da relação parasito-hospedeiro e prospecção de novos alvos para o diagnóstico da doença.

2.2. Objetivos Específicos

- ❖ Avaliação do perfil eletroforético uni e bidimensional associado ao plasma/soro de camundongos após 5 e 7 semanas de infecção por *S. mansoni*;
- ❖ Análise composicional por espectrometria de massas do proteoma plasmático de camundongos após 5 e 7 semanas de infecção por *S. mansoni*;
- ❖ Análise proteômica quantitativa das amostras para identificação de proteínas diferencialmente expressas;
- ❖ Avaliação do emprego de Acetonitrila para depleção das proteínas plasmáticas/séricas no contexto da infecção por *S. mansoni*;
- ❖ Avaliação do emprego do *ProteoMiner™ Protein Enrichment Kit* (Bio-rad) para o enriquecimento de proteínas séricas no contexto da infecção por *S. mansoni*.

3. Metodologia

3.1. Manutenção do Ciclo Experimental de *Schistosoma mansoni* e Delineamento Experimental

Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob os protocolos n° 2017-34 e n° 2017-35. Neste trabalho, foram utilizadas duas linhagens de camundongos (*Mus musculus*), BALB/c e C57BL/6. Ao todo, 40 fêmeas, 20 de cada linhagem, foram fornecidos pelo Centro de Ciência Animal (CCA) da UFOP. O delineamento experimental do trabalho está ilustrado na figura 7.

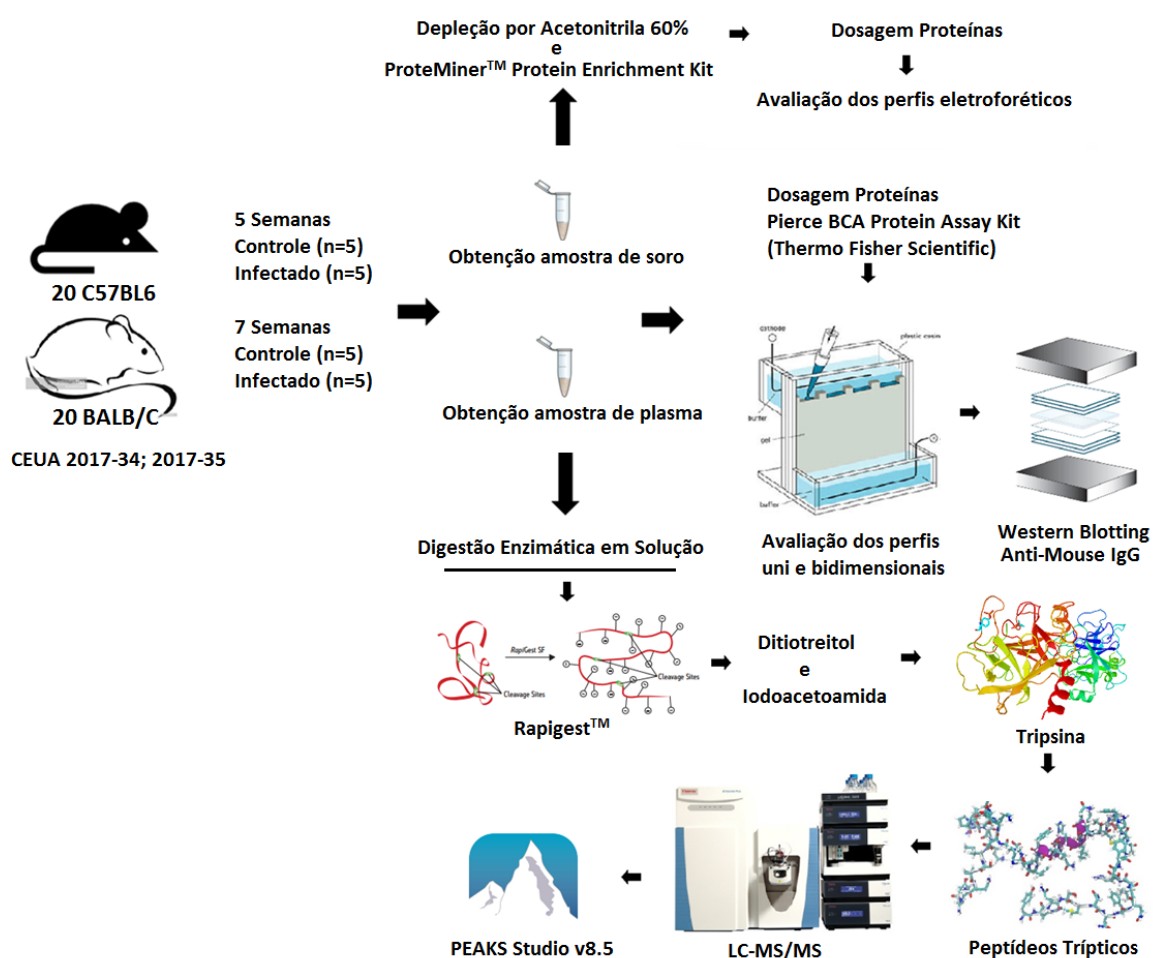


Figura 7. Delineamento experimental da metodologia. Representação esquemática ilustrando os experimentos descritos.

Para o procedimento de infecção dos animais, utilizou cercárias de *Schistosoma mansoni* da cepa Luiz Evangelista (LE), cedidas pelo Laboratório de Helmintologia e

Malacologia Médica do Instituto René Rachou (Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte).

A infecção do modelo murino deu-se inicialmente com a utilização dos anestésico: Cloridrato de Cetamina 10% (Dopalen) a 8 mg/kg e Cloridrato de Xilazina 2% (Anasedan) a 4 mg/kg, administrados via intraperitoneal. Os animais possuíam em torno de 4 semanas de vida. Após a administração do anestésico e constatação da ausência de motilidade dos camundongos, utilizou-se a cauda para infecção, inserindo-a em tubos de aço inoxidável contendo uma suspensão de 250 cercárias por indivíduo, durante 30 minutos. Os animais foram então realocados em seus microisoladores e observados até se recuperarem da anestesia. Os camundongos foram acompanhados semanalmente no CCA, realizando troca da maravalha, e reposição de água e ração. Durante a 5ª e 7ª semana pós infecção, houve a coleta de amostras de plasma e soro. Esses dois períodos estabelecidos para coleta de amostras correspondem, respectivamente, as etapas iniciais da fase aguda e ao ápice da esquistossomose no modelo murino (Pearce e Macdonald, 2002).

3.2. Obtenção das Amostras de Plasma

Para a obtenção das amostras de plasma, foram utilizados camundongos BALB/c controles e infectados com *S. mansoni*. As amostras foram coletadas na 5ª e na 7ª semana de infecção, em ambos os grupos.

Para a coleta de plasma, os animais foram anestesiados com Cloridrato de Cetamina 10% (Dopalen) a 24 mg/kg e Cloridrato de Xilazina 2% (Anasedan) a 12 mg/kg, administrando o anestésico via intraperitoneal. Após a constatação da perda do tônus muscular e dos sentidos, inseriu-se um tubo capilar com heparina no plexo retro-orbital do camundongo, redirecionando parte do fluxo sanguíneo para um microtubo, contendo 5 µL de heparina sódica (5.000 U/mL). Retirou-se de cada animal cerca de 100 µL de sangue. Após alcançar o volume desejado, homogeneizaram-se gentilmente as amostras, imediatamente armazenando em gelo.

Passada uma hora da coleta, não constatada coagulação, as amostras foram submetidas à centrifugação (Eppendorf Centrifuge 5415C, Brinkmann Instruments Inc.), a 548 x g durante 15 minutos. Os sobrenadantes de cada amostra foram recolhidos e

transferidos para novos microtubos, procedendo com esses a uma segunda centrifugação, de mesma velocidade, contudo por 30 minutos. Em seguida, recolheram-se somente os sobrenadantes, que foram transferidos para novos microtubos e armazenados a -20°C.

3.3. Obtenção das Amostras de Soro

Para a obtenção das amostras de soro, foram utilizados camundongos C57BL/6 controles e infectados com *S. mansoni*. Colheram-se as amostras na 5^a e na 7^a semana de infecção, em ambos os grupos.

Para a coleta de soro, os animais foram anestesiados com Cloridrato de Cetamina 10% (Dopalen) a 24 mg/kg e Cloridrato de Xilazina 2% (Anasedan) a 12 mg/kg, administrando o anestésico via intraperitoneal. Após a constatação da perda do tônus muscular e da ausência de resposta aos estímulos, a região abdominal dos camundongos foi exposta com auxílio de tesoura e pinça cirúrgicas. Ao obter acesso a cavidade torácica, identificou-se a veia cava superior, realizando nessa um corte suficiente para o extravasamento do sangue da veia para a cavidade torácica. Com o auxílio de pipeta e ponteira (Axygen™), colheu-se o sangue, que imediatamente foi transferido para um microtubo. Esse procedimento permitiu coletar um volume que variou de 400-500 µL por animal.

Os microtubos foram mantidos em temperatura ambiente. Passada uma hora da coleta, as amostras foram submetidas à centrifugação (Eppendorf Centrifuge 5415C, Brinkmann Instruments Inc.) a 548 x g, durante 15 minutos. Os sobrenadantes foram recolhidos e transferidos para novos tubos, procedendo com esses a uma segunda centrifugação, de mesma velocidade, entretanto por 30 minutos. Em seguida, recolheram-se somente os sobrenadantes, que foram transferidos para novos microtubos e armazenados a -20°C.

3.4. Dosagem de Proteínas

A dosagem de proteínas foi feita pela metodologia de BCA (Ácido Bicinconínico) (Smith *et al.*, 1985), utilizando o *PIERCE™ BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific). As amostras armazenadas a -20°C foram descongeladas em gelo e

homogeneizadas em agitador vortex. Em seguida, efetuou-se a diluição de 1:100 das amostras (2 µL de amostra em 198 µL de água ultrapura).

Adicionaram-se, em microplaca de microtitulação, 25 µL das amostras diluídas, juntamente com 200 µL do Reagente de Trabalho do *kit*, composto por 50 partes do Reagente A (Carbonato de Sódio, Bicarbonato de Sódio, Ácido Bicinconínico e Tartarato de Sódio em 0.1 M de Hidróxido de Sódio) e 1 parte do Reagente B (sulfato cúprico 4%). Triplicatas técnicas foram preparadas para cada amostra. Empregou-se, para a curva padrão, Albumina proveniente do *kit* de dosagem nas concentrações de 25, 125, 250, 500, 750, 1.000 e 1.500 µg/mL. A curva padrão foi feita em duplicata e água ultrapura foi utilizada como branco. Como resultado da reação entre as amostras e o reagente, há formação de um complexo de coloração roxa. Por meio dos valores de absorbância adquiridos utilizando o espectrofotômetro leitor de microplaca (Epoch, BioTek), no comprimento de onda de 562 nm, determinou-se a concentração das proteínas presentes nas amostras.

3.5. Eletroforese Unidimensional

Para avaliar o perfil eletroforético unidimensional das proteínas do soro e do plasma, alíquotas nas concentrações desejadas de proteínas, usualmente 10 µg ou 3 µg para aquelas em condições depletadas, foram adicionadas ao tampão de amostra (**Tampão SDS 2X**: Tris-HCl 0,125 M pH 6,8; SDS 4%; Glicerol 20%; DTT 10% e Azul de Bromofenol 0,002%/**Tampão SDS 6X**: Tris-HCl 0,35 M pH 6,8; SDS 10%; Glicerol 30%; DTT 9,3% e Azul de Bromofenol 0,012%).

As amostras foram submetidas à ebulição em água fervente durante 5 minutos, para a desnaturação das proteínas. Em seguida, as amostras e o padrão de massa molecular (Unstained Protein Molecular Weight Marker, Thermo Scientific/ColorBurst™ Electrophoresis Marker, Sigma Aldrich) foram aplicados às canaletas do gel. Utilizaram-se géis de separação 12% de Acrilamida/Bis-Acrilamida. As corridas eletroforéticas ocorreram com valor fixo de amperagem (20 mA/gel) e voltagem variável (90-170V). Ao término do processo, os géis foram corados ou por Coomassie Coloidal G-250 (Neuhoff *et al.*, 1988) ou pelo método de coloração por Nitrato de Prata (Blum *et al.*, 1987).

3.6. Eletroforese Bidimensional

Para avaliar o perfil bidimensional das proteínas das amostras, foi realizado, a princípio, a isoeletrofocalização (primeira dimensão). Inicialmente, adicionaram-se 30 μL de amostra contendo a concentração desejada de proteínas, usualmente um *pool* de 3 amostras contendo 50 μg de proteínas, aos sarcófagos (Strip Holder, GE). Em seguida, foram adicionados 5 μL de DTT 25% (p/v), 1 μL de *IPG Buffer Linear*, adequado para a faixa de pH 3-10, e 89 μL de Tampão de Reidratação (Ureia 7 M; Tiourea 2 M; CHAPS 4%; Azul de Bromofenol 0,002%). Posteriormente, colocaram-se as *Strips* de pH 3-10 e 7 cm (Immobiline™ GE Healthcare) nos sarcófagos selando-as com *Cover Fluid* (GE).

Programou-se o isoeletrofocalizador (Ettan IPGphor 3, GE) para a reidratação dos géis com duração de 12:30 h, seguida da focalização isoeletrica em três passos: 500 volts durante 30 minutos, 1.000 volts por 30 minutos e 8.000 volts por 3 horas. Terminada a primeira dimensão, as *Strips* foram condicionadas em tampão de equilíbrio (Ureia 6 M; Tris-HCl pH 8,8; Glicerol 54,5%; SDS 2%; Azul de Bromofenol 0,002%), no qual foram adicionados, respectivamente, DTT 1% (Sigma Aldrich) por 15 minutos, para redução de ligações dissulfeto, e Iodoacetoamida 4% (Sigma Aldrich) pelo mesmo tempo, para alquilação dos resíduos de cisteína. Em seguida, procedeu-se a segunda dimensão.

Com auxílio de uma pinça, colocaram-se as *Strips* sobre o gel de Acrilamida/Bis-Acrilamida 12%, aplicando também o padrão de massa molecular (Unstained Protein Molecular Weight Marker, Thermo Scientific/ColorBurst™ Electrophoresis Marker, Sigma Aldrich). As corridas eletroforéticas (segunda dimensão), ocorreram com valor fixo de amperagem (20 mA/gel) e voltagem variável (90-170V). Ao término do processo, os géis foram corados ou com Coomassie Coloidal G-250 ou pelo método de coloração por Nitrato de Prata.

3.7. Eletrotransferência para Membrana de PVDF e *Western Blotting*

Utilizou-se um *pool* com o soro de 3 animais infectados por 7 semanas na concentração final de 16,67 μg de proteínas, para o gel direcionado a eletrotransferência, e 50 μg de proteínas, para o gel réplica. Após separação das proteínas por eletroforese bidimensional, essas biomoléculas foram transferidas para a membrana de Fluoreto de

Polivinilideno (PVDF) (Amersham Hybond, GE), como descrito por Towbin *et al.* (1979). O gel de Acrilamida/Bis-Acrilamida e a membrana PVDF foram submetidos à corrente de 200 mA em tampão de transferência (Tris-HCl 25 mM pH 7,5; glicina 192 mM; SDS 0,2 %; etanol 20 %), por 2 horas, em banho de gelo, utilizando o módulo de *blotting* do sistema miniVE (GE Healthcare).

Após a eletrotransferência, submeteu-se a membrana de PVDF a solução de bloqueio (Tris-HCl 1 M pH 7,5; Tween 20 0,3%, leite em pó desnatado Molico[®] 5 %), mantendo-a sob agitação durante a noite. A membrana foi lavada em tampão de lavagem (Tris-HCl 10 mM pH 7,5), por 3 vezes, durante 5 minutos, e incubada, logo em seguida, sob agitação, no tampão de *immunoblotting* (Tris-HCl 1 M pH 7,5; Tween 20 0,3%; NaCl 2,5 M; leite em pó desnatado Molico[®] 5 %) por 20 minutos. Os anticorpos Anti-Mouse IgG conjugados à fosfatase alcalina e produzidos em cabra (Sigma Aldrich), foram adicionados a membrana na diluição de 1:2.000, que permaneceu sob essas condições por 2:45 h.

Transcorrido esse tempo, incubou-se a membrana no tampão de lavagem, por 3 vezes, durante 5 minutos, submetendo-a posteriormente à solução de revelação (Tris-HCl 1 M pH 9,0; NaCl 1 M; MgCl₂ 100mM) por 5 minutos. As proteínas foram reveladas com o substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/4-nitro azul de tetrazólio - BCIP[®]/NBT (Sigma Aldrich).

3.8. Digestão Enzimática em Solução

Para a digestão tríptica das proteínas, foram utilizadas duplicata de amostras de plasma dos animais infectados em 5 semanas, e controles e infectados em 7 semanas. Iniciou-se o protocolo de digestão diluindo 30 µg de proteínas em 160 µL de Bicarbonato de Amônio 25 mM. Logo depois, adicionaram-se 10 µL de RapiGestTM 1% (p/v) (Waters) as amostras, incubando-as a 80°C, em termobloco (BIO-PLUS IT-2002 Incubator), durante 10 minutos. Passados 5 minutos sob essa condição, homogeneizaram-se as amostras em vortex. Em seguida, as amostras foram incubadas em DTT 9,2 mg/mL (Sigma Aldrich) a 60°C por 10 minutos e, após resfriar a temperatura ambiente, foram submetidas a alquilação com Iodoacetoamida 33 mg/mL (Sigma Aldrich), ao abrigo da luz a temperatura ambiente, durante 30 minutos.

Após a alquilação dos resíduos de cisteína, adicionou-se a enzima Tripsina (*Sequencing grade modified trypsin*; Promega, Madison, EUA) as amostras, na proporção de 50:1 (proteína:tripsina), incubando-as a 37°C por 12 horas. Posteriormente, realizou-se a inativação do RapiGest™ adicionando Ácido Trifluoroacético (Sigma Aldrich) a 1%. A confirmação da acidificação ($\text{pH} \leq 2$) foi feita em fitas indicadoras (pH-Fix, Macherey-Nagel). Incubaram-se novamente as amostras a 37°C, em termobloco, por 30 minutos, centrifugando-as, após este período, a 20.000 x g, por 15 minutos, a 7°C (Hettich Zentrifugen Mikro 200R). Os sobrenadantes foram recolhidos e transferidos para os *vials* utilizados na plataforma de UHPLC.

3.9. Aquisição dos Dados Espectrais em Plataforma UHPLC-MS/MS

Após a digestão enzimática, aplicaram-se cerca de 500 ng de peptídeos na plataforma UHPLC UltiMate 3000 (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha). Inicialmente, os peptídeos foram direcionados à coluna Acclaim PepMap100 C₁₈ Nano-Trap Column (100 µm i.d. × 2 cm, 5 µm, 100 Å; Thermo Scientific). Os peptídeos retidos foram lavados durante 3 minutos em 2% MeCN/0,05% TFA, em um fluxo de 7 µL/min, antes de serem submetidos à separação em nano cromatografia líquida de fase reversa. Essa separação ocorreu na coluna Acclaim PepMap100 C₁₈ RSLC (75 µm i.d. × 15 cm, 2 µm, 100 Å; Thermo Scientific), em gradiente de acetonitrila a partir da combinação das fases A (0,1% ácido fórmico) e B (80% MeCN/0,1% ácido fórmico), sob fluxo de 300 nL/min, como a seguir: 3,8% de B durante 3 minutos, para equilibrar a coluna; em seguida, 3,8% - 30% de B até completar 120 min, subindo até 55% de B em 30 min; regeneração da coluna com 99% de B por 12 min e condicionamento do sistema com 3,8% de B durante 15 min. Ambas as colunas foram mantidas à 40°C durante o processo.

Os peptídeos eluídos, foram direcionados ao espectrômetro de massas Q Exactive (Thermo Scientific), foram ionizados com a fonte de ionização electrospray *Nanospray Flex Ion Source* (Thermo Scientific), operada a 3,8kV, com o sistema parametrizado em modo positivo. A temperatura do capilar de entrada foi mantida a 250°C e o nível RF das *S-lens* em 55. A aquisição dependente de dados (DDA) foi realizada em Top12. Os espectros de íons precursores (MS) foram adquiridos em janela de 300 - 2.000 *m/z*, com resolução de 70.000 e tempo máximo de injeção de 120 ms para 1e6 íons. Até 12 íons,

por cada espectro MS, foram selecionados em ordem decrescente de abundância e isolados numa janela de 1,2 m/z para dissociação por HCD (*high energy collision dissociation*), desde que exibissem carga $\geq +2$ até $\leq +4$ e contagem de 5×10^5 íons em até 60 ms de injeção (*threshold* 6.25e3). A ativação dos íons precursores se deu na célula de colisão com gás nitrogênio, com energia de colisão normalizada em 28-30V. Espectros de íons produtos (MS/MS) foram adquiridos com resolução de 17.500. Um tempo de exclusão dinâmica de 40 segundos foi ativado, reduzindo a análise repetitiva por MS/MS de íons precursores previamente selecionados.

3.10. Busca de Identidades e Quantificação de Proteínas

Os dados espectrais foram submetidos à busca de identidades e à quantificação por meio do programa *PEAKS Studio* v8.5 (Bioinformatics Solutions Inc.). Os parâmetros de busca utilizados foram: enzima tripsina; no máximo 2 sítios de clivagem perdidos; carbamidometilação de cisteínas (+57,02 Da); oxidação de metioninas (+15,99 Da); tolerância de até 10 ppm para íons precursores (MS) e de 0,1 Da para erro de massa dos fragmentos gerados (MS/MS). Utilizou-se o banco de dados de proteínas referente à *Mus musculus* disponível na plataforma UNIPROT (Uniprot, 2016), contendo 54.188 sequências.

Os resultados obtidos foram filtrados com um *False Discovery Rate* (FDR) de 1%, considerando as proteínas que possuem ao menos um peptídeo único. Para identificação de proteínas diferencialmente expressas, a análise quantitativa livre de marcadores (*Label-free*), foi realizada, a partir dos valores de área sobre a curva (AUC) dos peptídeos identificados nas respectivas proteínas. A área foi determinada através da média de até três dos peptídeos únicos mais abundantes identificados em cada proteína, sendo utilizada como indicativo da abundância dessa última na amostra. Os resultados quantitativos foram filtrados para proteínas com significância ≥ 13 e *Fold Change* ≥ 2 .

3.11. Análise de Bioinformática

Os dados espectrais foram avaliados utilizando o programa *Raw Meat* v2.1 (Vast Scientific). Para avaliação da correlação de *Pearson* entre as amostras, utilizou-se o

programa *R Studio* v1.1.442. As identidades dos constituintes diferencialmente expressos foram submetidas à plataforma de redes de associações de proteínas, *STRING* (Szklarczyk *et al.*, 2014), para observação de interações entre os componentes identificados.

3.12. Análise Estatística

Utilizou-se o programa *GraphPad Prism* v5.0 (San Diego, Califórnia, EUA) para avaliação da distribuição paramétrica ou não paramétrica dos dados, através do emprego do teste de Kolmogorov-Smirnov. Aplicou-se o *test t* para valores que apresentaram distribuição paramétrica e o teste de Mann-Whitney para valores com distribuição não paramétrica, a fim de avaliar diferenças estatísticas significativas.

3.13. Métodos de Depleção e Enriquecimento do Soroproteoma

3.13.1. Depleção de Proteínas Séricas com Acetonitrila

Com o intuito de promover a precipitação das proteínas de alta massa molecular, foram utilizadas amostras de soro provenientes de animais controles e infectados em 7 semanas de infecção. Alíquotas de 50 µL de soro, obtido conforme descrito no item 3.3 (Obtenção Amostras de Soro), foram diluídas (1:3) em água ultrapura. Adicionaram-se 225 µL de Acetonitrila (J. T. BAKER) as soluções, a fim de obter a concentração final de 60% de Acetonitrila. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em sonicadores (USC-2800, Unique) durante 10 minutos, por duas vezes consecutivas, e centrifugadas (Hettich Zentrifugen Mikro 200R) a 12.000 x g, durante 10 minutos, a 4°C, para recuperação do sobrenadante. Os sobrenadantes foram concentrados, até a secura, em um concentrador rotacional à vácuo (Christ RVC 2-18 CDplus) e armazenados a -20°C

As amostras submetidas à eletroforese unidimensional foram ressuspensas em 300 µl de bicarbonato de amônio (NH₄HCO₃) 50 mM (Sigma Aldrich). Por sua vez, aquelas direcionadas à eletroforese bidimensional foram ressuspensas em 300 µL de água ultrapura, devido a interferência de NH₄HCO₃ na isoeletrofocalização.

3.13.2. *ProteoMiner*TM Protein Enrichment Kit

Com o intuito de reduzir a distribuição dinâmica de concentração das proteínas do soro, foram utilizadas amostras de soro de camundongos controle e infectados, em 7 semana de infecção. Para obter um volume aproximado de 1 mL de amostra, volume preconizado pelo Kit para iniciar o protocolo, preparou-se um *pool* de amostras, para ambas as condições. Alíquotas de 2 µL de cada *pool*, diluídas (1:100) em água ultrapura, foram retiradas para dosagem de proteínas e posterior avaliação do perfil eletroforético.

Inicialmente, prepararam-se as colunas que contém os *beads*, centrifugando-as (Hettich Zentrifugen Mikro 200R) a 1.000 x g, por 1 minuto, para remover a solução de armazenamento. Em seguida, adicionaram-se 600 µL de tampão de lavagem (Tampão PBS 150 mM; NaCl 10 mM; NaH₂PO₄ pH 7,4), proveniente do kit, às colunas, imediatamente invertidas, por diversas vezes, durante 5 minutos. Posteriormente, as colunas foram centrifugadas a 1000 x g durante 1 minuto. Repetiram-se as etapas de lavagem e centrifugação por mais uma vez.

Para a etapa de ligação das proteínas do soro aos hexapeptídeos combinatoriais imobilizados, adicionaram-se as amostras nas respectivas colunas, incubando-as à temperatura ambiente, por 2 horas, em mesa agitadora (Vertex TS-2000A, VDRL Shaker). Em seguida, centrifugaram-se as colunas a 1000 x g por 1 minuto, descartando o material coletado. Adicionaram-se 600 µL de tampão de lavagem a essas, invertendo-as, por sucessivas vezes, durante 5 minutos. Posteriormente, as colunas foram centrifugadas a 1000 x g por 1 minuto, descartando novamente o material coletado. Repetiram-se as etapas de lavagem e centrifugação por mais três vezes.

Para a eluição das proteínas ligadas aos *beads*, adicionaram-se 600 µL de água ultrapura a essas, imediatamente invertidas, inúmeras vezes, por 1 minuto. Em seguida, as colunas foram centrifugadas a 1000 x g por 1 minuto, descartando o material eluído. Adicionaram-se 200 µL de solução composta por NaCl 500 mM e água ultrapura a essas, incubando-as a temperatura ambiente, por 15 minutos, sob leve agitação em vortex. Logo depois, centrifugaram-se as colunas a 1000 x g por 1 minuto, coletando o material eluído. Repetiu-se a etapa de eluição com solução de NaCl 500 mM por mais duas vezes. Posteriormente, efetuou-se a eluição das proteínas utilizando uma solução composta por

Tris-HCl 0,125 M pH 6,8, 10% DTT, 4% SDS e água ultrapura, aplicando os mesmos volumes e os mesmos procedimentos utilizados durante a eluição com a primeira solução.

As frações eluídas com a segunda solução foram armazenadas a -20°C . Por sua vez, prosseguiu-se com a dessalinização das frações eluídas com a primeira solução, aplicando o volume total obtido de cada amostra, aproximadamente 500 μL , em tubos Vivaspin (Vivaspin 500, 3 kDa MWCO, GE). Esses foram submetidos à centrifugação a 12.000 x g, durante 30 minutos, a 20°C . O material recolhido na câmara interna dos tubos, aproximadamente 250 μL , foi diluído em 250 μL de solução Tris-HCl 0,5 M pH 7 e centrifugado a 12.000 x g, durante 30 minutos, a 20°C . Repetiu-se, por mais duas vezes, esse procedimento, recolhendo, ao final, todo o volume retido na câmara interna dos tubos. Essas amostras foram submetidas a dosagem de proteínas. Entretanto, as amostras eluídas com a segunda solução não foram compatíveis com a metodologia de dosagem por BCA.

4. Resultados

4.1. Avaliação da Infecção e Evolução da Esquistossomose no Modelo Murino

No intuito de monitorar as condições dos animais frente a evolução da doença, obteve-se o peso corporal e o peso do baço de cada camundongo, assim, pode-se avaliar a relação peso do baço/peso corporal (Figura 8).

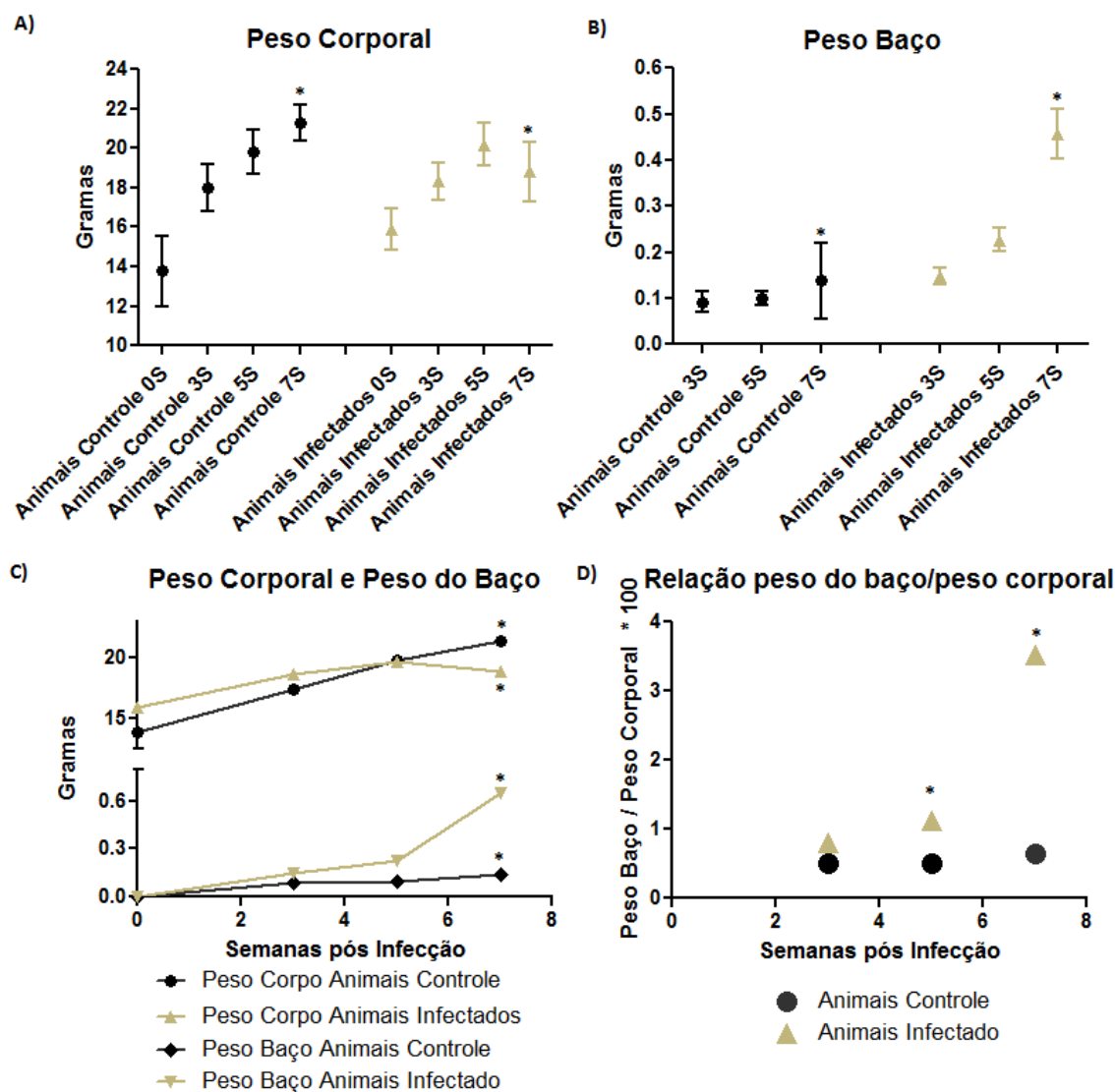


Figura 8. Peso corporal, peso do baço e respectivas razões. A e B) Os gráficos abordam as médias aritméticas e desvios padrões. 0S: peso no dia da infecção; 3S: 3 semanas de infecção; 5S: 5 semanas de infecção; 7S: 7 semanas de infecção. C) O peso do baço dos animais infectados apresentou aumento nos períodos avaliados. O peso corporal desses animais, por sua vez, diminuiu em 7 semanas da doença. D) A relação (peso do baço e peso corporal) para os camundongos infectados aumentou, consideravelmente, com a evolução da esquistossomose. Utilizou-se o *test t* e o teste de Mann-Whitney, devido a distribuição paramétrica e não paramétrica de alguns valores, para avaliar as diferenças significativas entre as condições, os asteriscos indicam $p \leq 0,05$.

Obteve-se o peso corporal dos animais nos tempos que compreendem o dia da infecção e 3, 5 e 7 semanas pós-infecção, obteve-se também o peso do baço de animais nestes mesmos períodos, exceto no dia da infecção. Com o curso do experimento, os animais demonstraram ganho de peso corporal, contudo, camundongos infectados no período de 7 semanas, apresentaram valores menores do que o grupo controle no mesmo período, observando diferenças significativas ($p=0,0021$), mas de modo contrário, o peso do baço de animais infectados neste mesmo período em comparação ao grupo controle, apresentou aumento ($p=0,04$).

Observou-se, com a evolução da esquistossomose no modelo murino, o aumento dos valores relativos a razão peso do baço e peso corporal, nos animais infectados, demonstrando, para 5 semanas de infecção, o valor de 1,128 e, para 7 semanas, o valor de 3,529. Os animais do grupo controle exibiram, respectivamente, os valores de 0,505 e 0,644. As razões calculadas apresentaram diferenças significativas entre os grupos controle e infectado nos períodos de 5 ($p=0,0004$) e 7 ($p=0,03$) semanas de infecção.

Após a eutanásia dos camundongos, avaliou-se também, visualmente, o aspecto dos fígados. Indivíduos infectados por 5 semanas demonstraram formação de granulomas em estágio inicial, os quais se intensificaram nas duas semanas seguintes. Os animais do grupo controle não apresentaram alterações macroscópicas do fígado.

4.2. O Proteoma Plasmático e o Soroproteoma na Esquistossomose Mansônica

4.2.1. Dosagem de Proteínas

Realizou-se a dosagem de proteínas, das amostras de plasma e soro dos grupos controle e infectado, nos períodos de 5 e 7 semanas de infecção (Figura 9), para avaliação comparativa entre as amostras (Tabela 1 e 2). Utilizou-se o *test t* para mensurar as diferenças nas concentrações de proteínas, das amostras de plasma e soro, dos indivíduos controle e infectados nos períodos investigados. Somente as amostras de plasma dos camundongos infectados (5 semanas) exibiram uma distribuição não paramétrica dos respectivos valores de concentração.

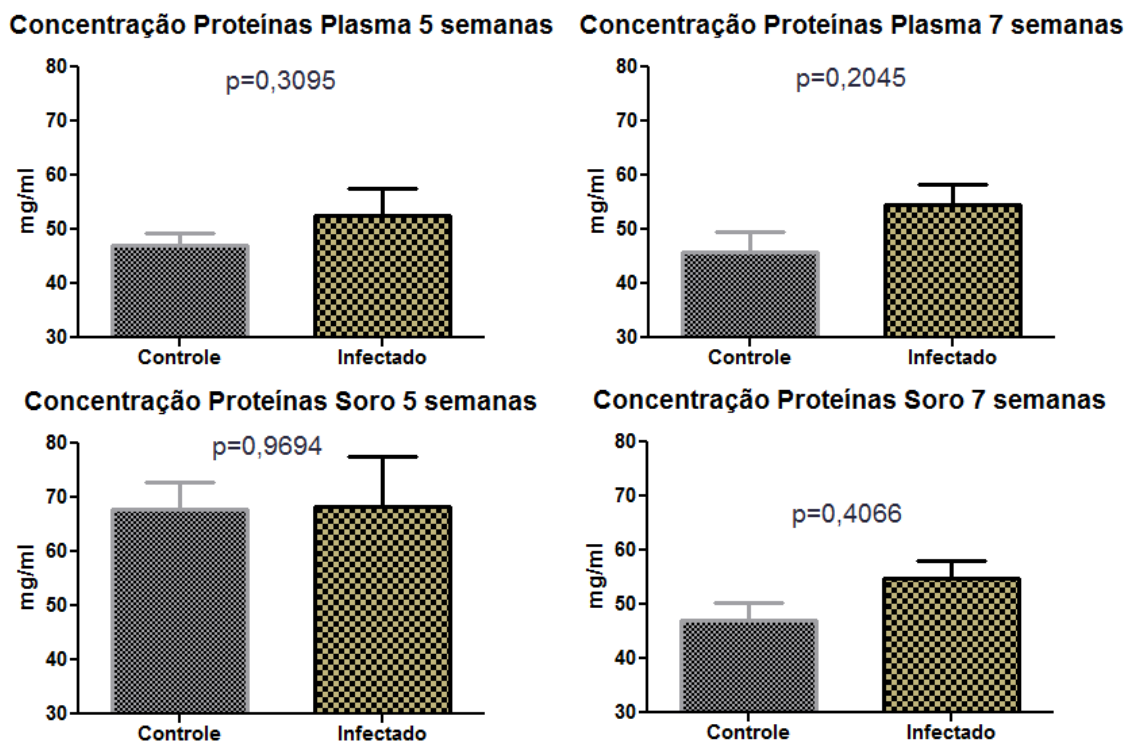


Figura 9. Concentração de proteínas do plasma e soro na infecção com *S. mansoni*. Os gráficos ilustram as médias aritméticas, e os desvios padrões das concentrações proteicas. Utilizou-se o *test t* e o teste de Mann-Whitney para avaliar diferenças significativas entre as amostras. As análises estatísticas revelaram valores de $p > 0,05$ em todas as condições.

Tabela 1. Concentração de proteínas das amostras de plasma de camundongos controles e infectados por 5 e 7 semanas.

Amostra	Concentração média (mg/mL)	Desvio Padrão	Coefficiente de variação dentro do grupo (%)
Controle (5 Semanas)	46,98	5,141	10,94
Infectado (5 Semanas)	52,65	11,15	21,17
Controle (7 Semanas)	45,77	8,270	18,07
Infectado (7 Semanas)	54,43	8,882	16,32

Tabela 2. Concentração de proteínas das amostras de soro de camundongos controles e infectados por 5 e 7 semanas.

Amostra	Concentração média (mg/mL)	Desvio Padrão	Coefficiente de variação dentro do grupo (%)
Controle (5 Semanas)	67,83	11,34	16.72
Infectado (5 Semanas)	68,28	20,69	30.30
Controle (7 Semanas)	47,01	7,538	16.04
Infectado (7 Semanas)	54,82	6,931	12.64

Amostras de plasma e soro, nos períodos de 5 e 7 semanas de infecção, não demonstraram diferenças estatísticas significativas entre as concentrações de proteínas dos grupos controles, em comparação ao grupo infectados.

4.2.2. Avaliação do Perfil Eletroforético Unidimensional

Examinou-se o perfil eletroforético unidimensional das amostras de plasma e soro, dos animais controles e infectados por 5 e 7 semanas, para avaliação do perfil composicional das amostras. Os perfis eletroforéticos unidimensionais das amostras de plasma (Figura 10) e soro (Figura 11) demonstraram similaridades entre si, apresentando, por sua vez, alterações decorrentes da doença no proteoma plasmático e soroproteoma, para os camundongos infectados nos períodos investigados.

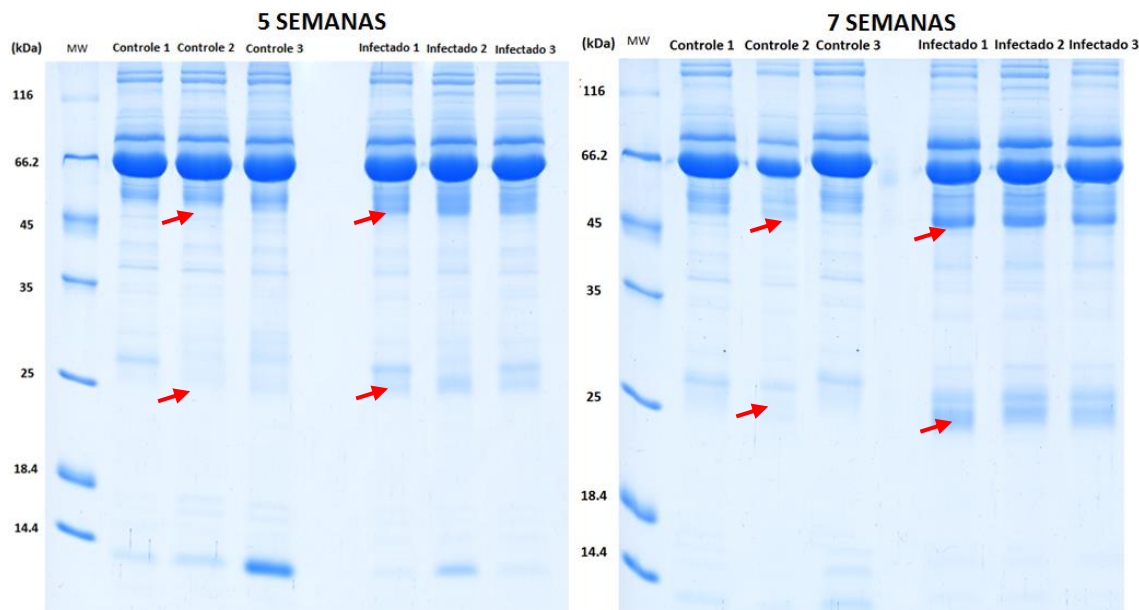


Figura 10. 1D SDS PAGE: amostras de plasma dos grupos controle e infectado em 5 e 7 semanas de infecção. Géis de poliacrilamida 12%, 10 µg de proteínas/canaleta, corados com Coomassie G-250. As setas evidenciam as principais alterações nas amostras de indivíduos controle e infectados.

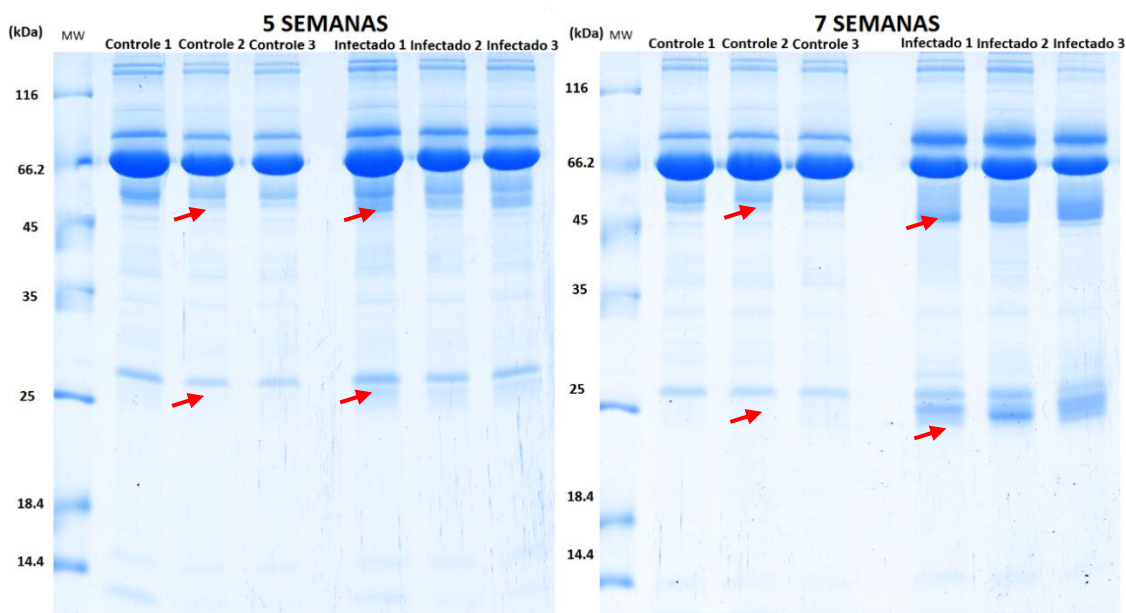


Figura 11. 1D SDS PAGE: amostras de soro dos grupos controle e infectado em 5 e 7 semanas de infecção. Géis de poliacrilamida 12%, 10 µg de proteínas/canaleta, corados com Coomassie G-250. As setas evidenciam as principais alterações nas amostras de indivíduos controle e infectados.

A eletroforese unidimensional revelou diferenças pontuais entre as amostras do grupo controle e infectado. Essas alterações se intensificaram, em 7 semanas de infecção, tanto no plasma, quanto no soro. Bandas em torno de 45 kDa mostraram-se mais visíveis

nas amostras de indivíduos infectados, bem como bandas de 25 kDa, já perceptíveis em 5 semanas de infecção, tornaram-se mais intensas com a progressão da doença.

4.2.3. Avaliação do Perfil Eletroforético Bidimensional

Examinou-se o perfil eletroforético bidimensional das amostras de plasma e soro, dos animais controle e infectados por 5 e 7 semanas, para obter uma avaliação eletroforética com maior resolução de separação.

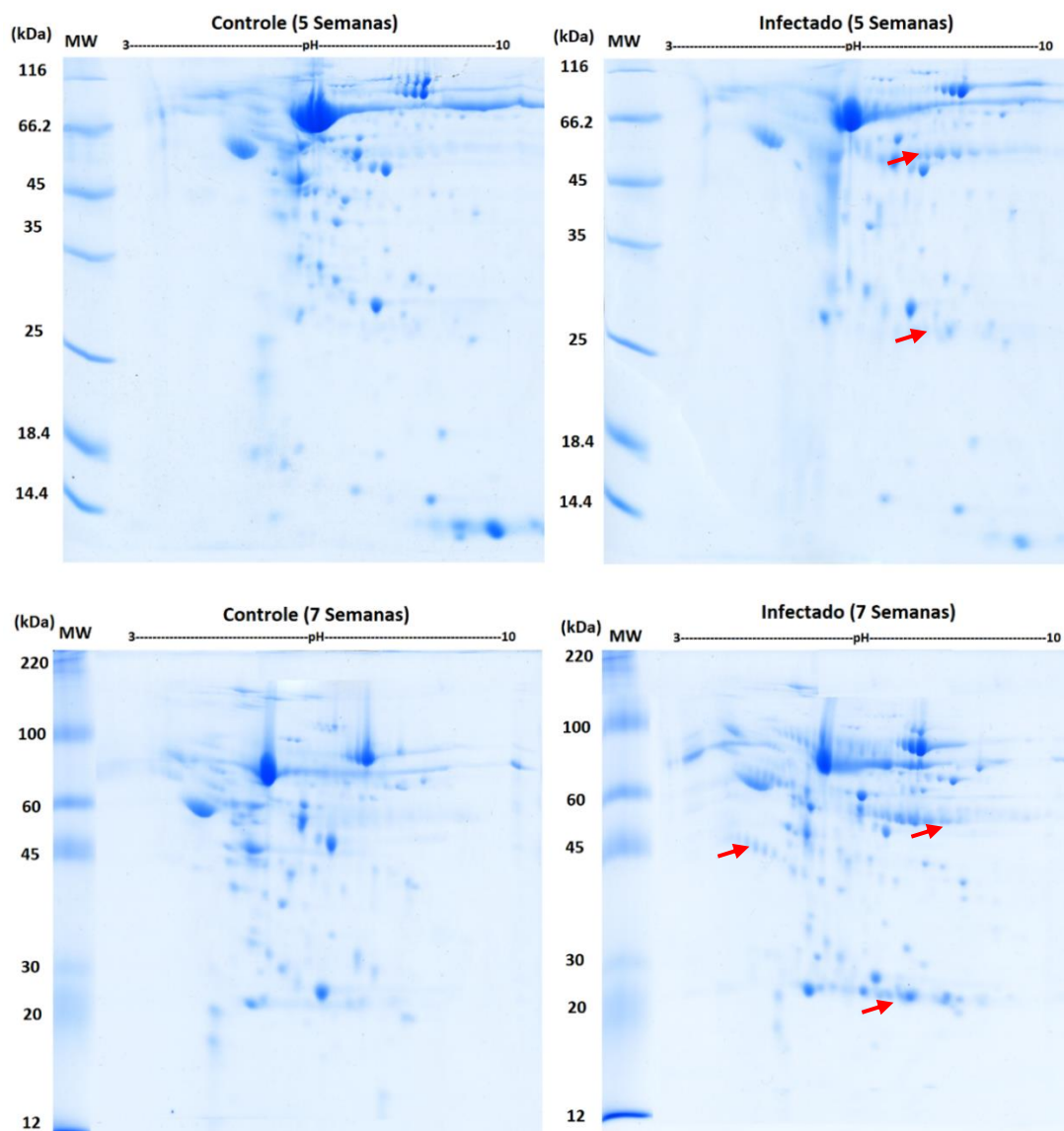


Figura 12. 2D SDS PAGE: amostras de plasma dos grupos controle e infectado em 5 e 7 semanas de infecção. Géis de poliacrilamida 12%, pH 3-10 linear, 7 cm, 50 μ g de proteínas/gel, corados com Coomassie G-250. As setas evidenciam as principais alterações nas amostras de indivíduos infectados.

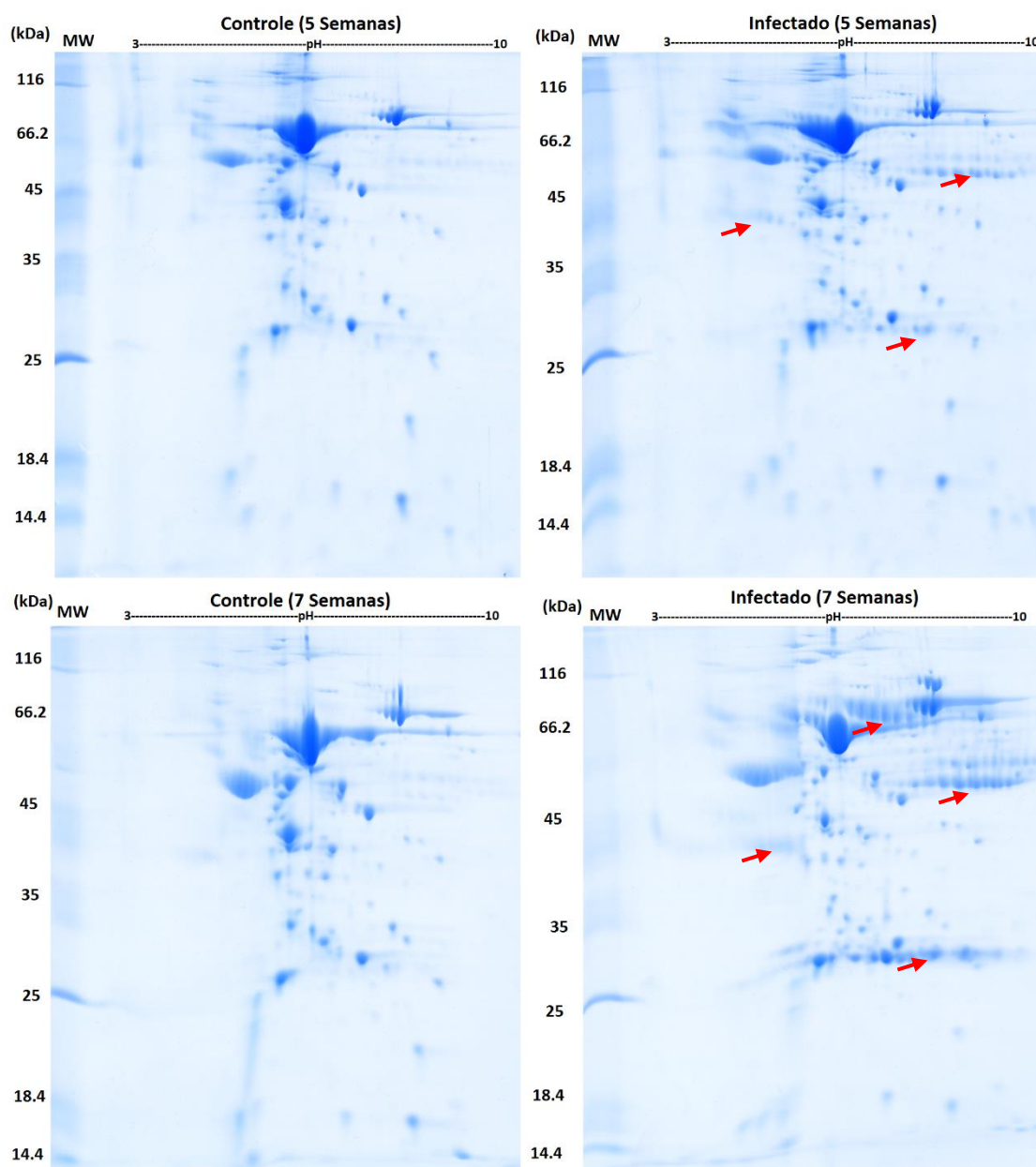


Figura 13. 2D SDS PAGE: amostras de soro dos grupos controle e infectado em 5 e 7 semanas de infecção. Géis de poliacrilamida 12%, pH 3-10 linear, 7 cm, 50 μ g de proteínas/gel, corados com Coomassie G-250. As setas evidenciam as principais alterações nas amostras de indivíduos infectados.

Os perfis eletroforéticos bidimensionais das amostras de plasma (Figura 12) e soro (Figura 13) exibiram semelhanças. Alterações decorrentes da doença foram observadas nos géis provenientes das amostras de camundongos infectados nos dois períodos investigados. Nas primeiras 5 semanas de infecção, as alterações apresentaram-se, como *spots* diferencialmente presentes, em torno de 25 kDa e entre 45 e 66 kDa. Essas diferenças demonstraram-se mais intensas no período de 7 semanas, evidenciando mais

spots únicos e de maior conteúdo proteico. As amostras do grupo controle, nos dois períodos, não apresentaram distinções.

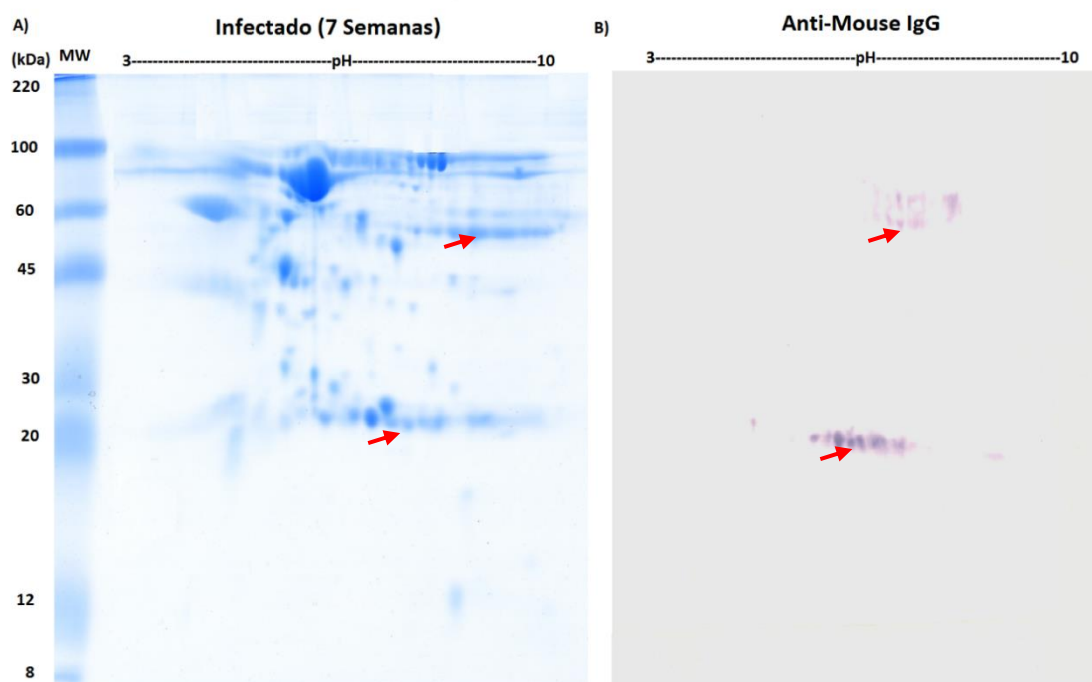


Figura 14. Western Blotting bidimensional. **A)** Gel de poliacrilamida 12%, pH 3-10 linear, 50 μ g de proteínas das amostras de soro de animais infectados (7 semanas), corado com Coomassie G-250. **B)** Membrana de PVDF demonstrando a reatividade de anticorpos Anti-Mouse a cadeias leves e pesadas de imunoglobulinas da classe IgG. As setas indicam a localização das respectivas cadeias no gel na membrana.

A técnica de *Western Blotting* bidimensional permitiu identificar as cadeias leves e pesadas de imunoglobulinas da classe IgG (Figura 14). Como consequência, a técnica possibilitou reconhecer, nos géis provenientes das amostras de indivíduos infectados por 7 semanas, quais *spots* diferencialmente presentes eram referentes a respectiva classe de anticorpos, assim como permitiu identificar, pontualmente, parte das alterações no soroproteoma do hospedeiro frente a doença.

4.2.4. Análise Proteômica Baseada em Espectrometria de Massas

Para a análise proteômica em larga escala, utilizaram-se duplicatas das amostras de animais controle em 7 semanas, infectados por 5 semanas e infectados por 7 semanas. A Figura 15 demonstra a correlação de *Pearson* entre duplicatas dos grupos Controle, Infectado (5 Semanas) e Infectado (7 semanas). A interpretação dos valores de correlação,

em conjunto com a análise do cromatograma total de íons (Figura 16), demonstraram um método reprodutível para a análise proteômica comparativa.

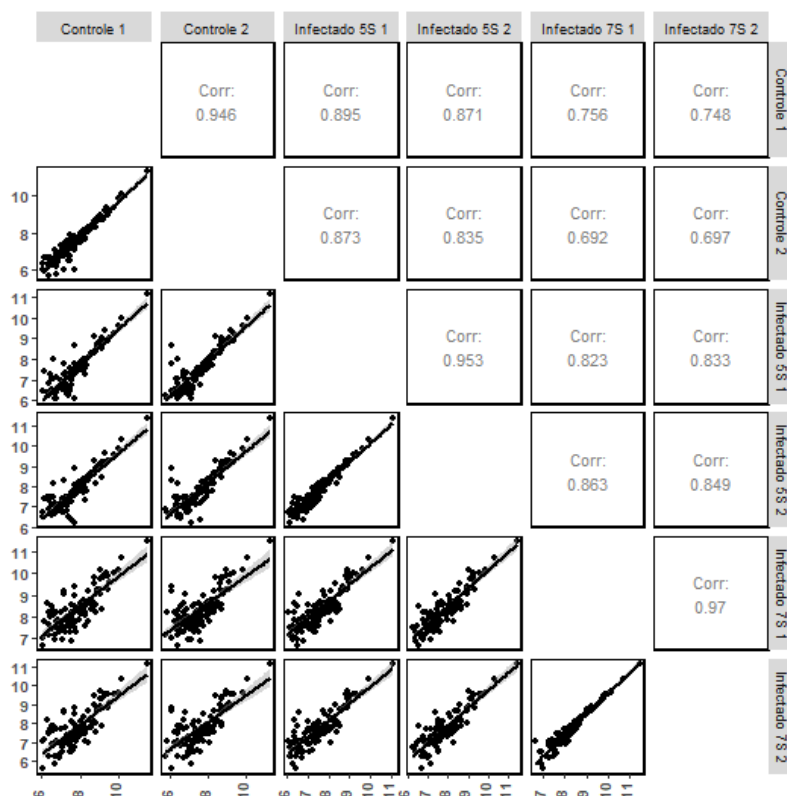


Figura 15. Gráfico da correlação de *Pearson* entre as amostras. Valores de área convertidos para \log_{10} . Legenda: 5S: 5 Semanas; 7S: 7 Semanas.

Os valores da correlação de *Pearson* entre duplicatas das mesmas condições (Controle 1 vs. Controle 2; Infectado (5 Semanas) 1 vs. Infectado (5 Semanas) 2; Infectado (7 semanas) 1 vs. Infectado (7 Semanas) 2) apresentaram-se todos com valores $> 0,94$ exibindo uma alta correlação entre as amostras.

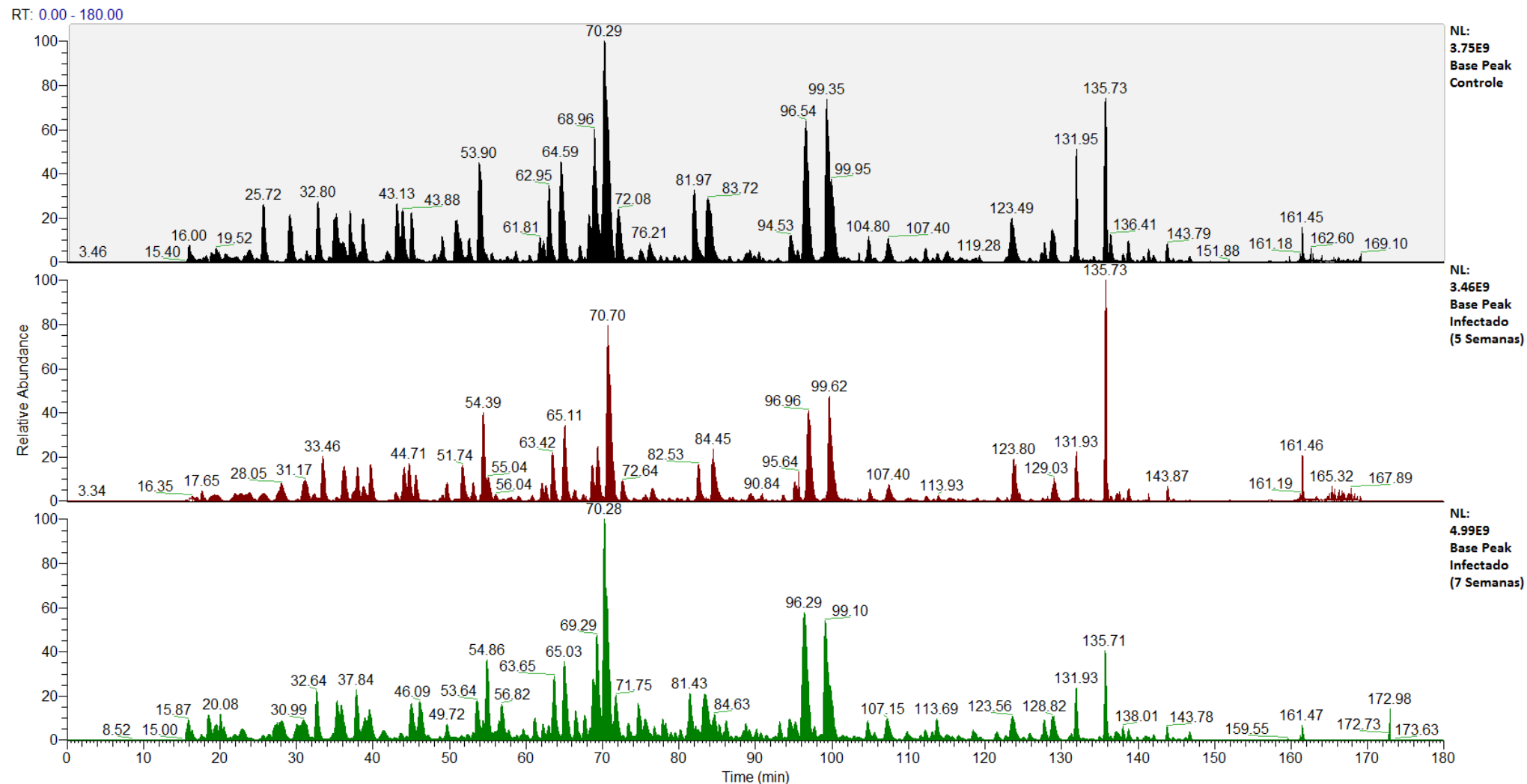


Figura 16. Cromatograma total de íons comparativo entre amostras Controle, Infetado (5 Semanas) e Infetado (7 semanas). Observam-se entre os gráficos, similaridades nos tempos de retenção (eixo x) e abundância relativa (eixo y) com os respectivos picos.

Tabela 3. Indicadores obtidos pela plataforma observados em cada condição.

Indicadores	Controle	Infectado (5 Semanas)	Infectado (7 Semanas)
#Análises LC-MS	2	2	2
MS	63.671	64.653	62.268
MS/MS	34.730	32.558	38.417
Grupos de proteínas	232	230	293

Tabela 4. Indicadores obtidos pela plataforma abrangendo a totalidade dos grupos.

Indicadores	Resultados
MS	190.592
MS/MS	105.705
Peptide-Spectrum Matches (PSM)	18.993
Sequências de peptídeos	2.463
Grupos de proteínas	362
Proteínas com peptídeos únicos	169 (=1); 47 (=2); 31 (=3); 115 (≥ 4)

A Tabela 3 demonstra o número de proteínas identificadas em cada condição, e seus respectivos indicadores obtidos na plataforma UHPLC-MS/MS, a amostra Infectado (7 Semanas) apresentou o maior número de identidades, contudo, os valores de espectros MS e MS/MS demonstraram similaridade. Na Tabela 4, observa-se o número total dos grupos de proteínas identificadas e indicadores correspondentes, demonstrando que 17,96% (18.993 PSM) dos espectros MS/MS obtidos, foram confluídos na busca de identidades.

4.2.5. Análise Composicional

A análise composicional, utilizando a estratégia de proteômica em larga escala, identificou 362 grupos de proteínas nas amostras de plasma (Tabela Suplementar 1). Esses constituintes, identificados pela plataforma UHPLC-MS/MS, apresentaram seis ordens de magnitude de variação dinâmica, refletindo a grande diferença de concentração das proteínas presentes no plasma (Figura 17). A abundância acumulativa demonstra que poucas moléculas contribuem com a maior parte da distribuição das proteínas. Nos grupos

controle, infectado (5 semanas) e infectado (7 semanas), uma única proteína, a *Serum albumin* (P07724), representou 82,8 %, 79,3% e 62,3% do conteúdo proteico presente na amostra, respectivamente.

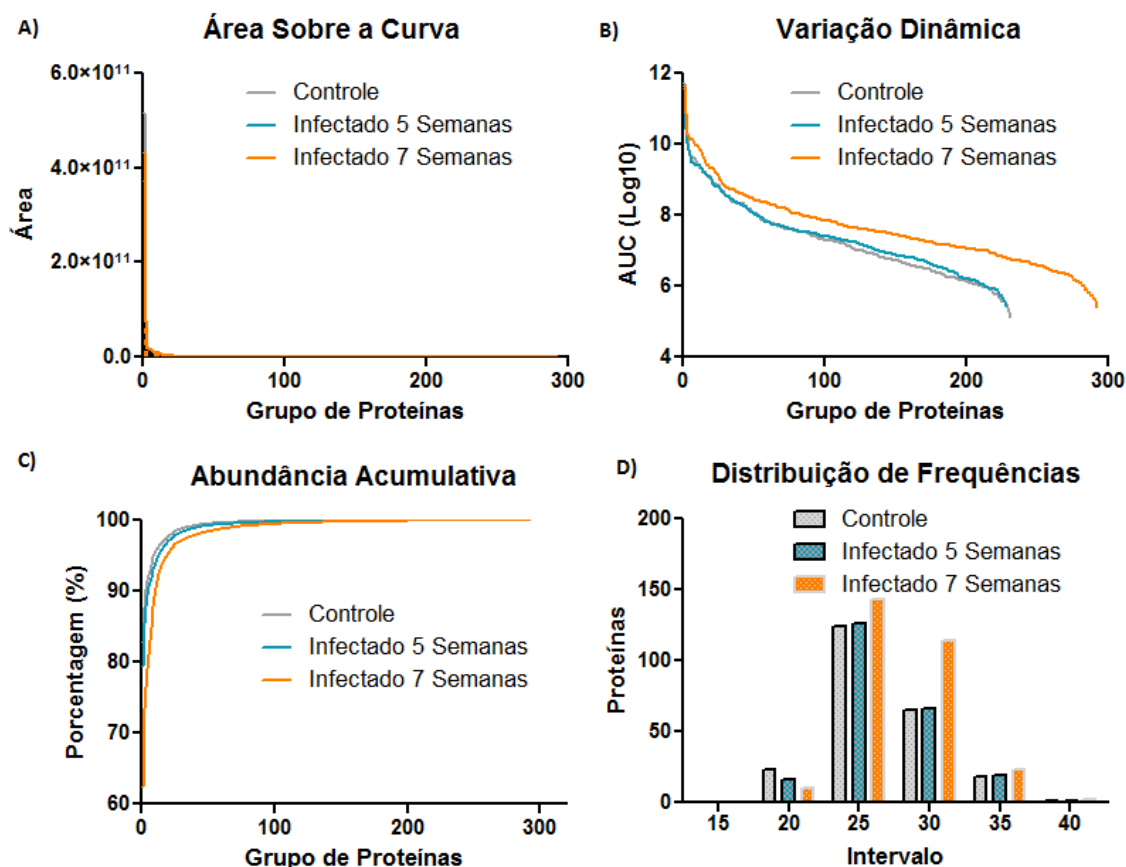


Figura 17. Análise composicional. **A)** Abundância das 362 proteínas determinada pela área sobre a curva (AUC). **B)** Variação dinâmica, em escala logarítmica (Log10), indicando uma cobertura de seis ordens de magnitude pela plataforma UHPLC-MS/MS. **C)** A abundância acumulativa revelou que poucas moléculas contribuíram com a maior parte do conteúdo proteico das amostras. **D)** Histograma de frequência, após conversão dos valores de AUC para Log2. Nesse formato, a distribuição não assume uma distribuição gaussiana.

Particularmente, os 10 componentes mais abundantes dos grupos controle, infectado (5 semanas) e infectado (7 semanas) ocuparam 95%, 93% e 89% da abundância acumulada, respectivamente, e são representados por: *α -2-HS-glycoprotein* (P29699), *Apolipoprotein A-I* (P29699), *Complement C3* (P01027), *Fibrinogen α chain* (E9PV24), *Fibrinogen β chain* (Q8K0E8), *Hemopexin* (Q91X72), *Immunoglobulin κ chain C region* (P01837), *Immunoglobulin μ chain C region* (P01872), *Murinoglobulin-1* (P28665), *Pregnancy zone protein* (Q61838), *Serine protease inhibitor A3K* (P07759), *Serotransferrin* (Q921I1) e *Serum albumin* (P07724).

A análise proteômica, por espectrometria de massas, das amostras de plasma evidenciou moléculas unicamente identificadas em cada condição (Tabela Suplementar 2). Das proteínas identificadas, 158 (43,64%) foram compartilhadas entre as condições controle e infectado nos dois períodos investigados (Figura 18). Setenta e seis constituintes (20,99%) apresentaram-se unicamente identificados em amostras de camundongos infectados por 7 semanas, e treze (3,59%) em amostras de animais infectados por 5 semanas. Quarenta e uma proteínas (11,32%) estão presentes apenas no grupo controle.

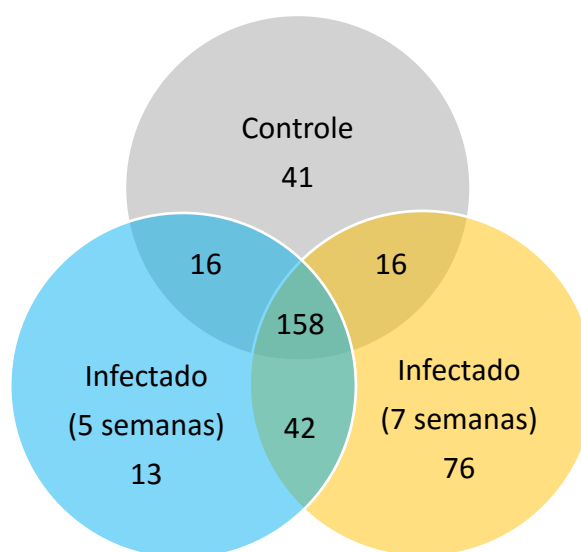


Figura 18. Diagrama de Venn. A maior parte das proteínas identificadas foram compartilhadas entre as três condições, representada por 158 moléculas.

As proteínas unicamente presentes na amostra Controle, estão relacionadas com a manutenção da homeostase e hemostasia, já as moléculas unicamente identificadas na amostras Infectado (5 Semanas) são, majoritariamente, identificadas como cadeias de anticorpos, o que demonstra neste período referente ao início da fase aguda, constituintes relacionados com a resposta do hospedeiro à doença. Proteínas identificadas somente na amostra Infectado (7 Semanas), estão relacionadas, predominantemente, à resposta inata e adaptativa.

4.2.6. Análise Quantitativa

Analisando as amostras de plasma por meio de proteômica *shotgun Label-free*, 35,6% das proteínas identificadas apresentaram-se diferencialmente expressas (Figura 19), sob parâmetros de $fold \geq 2$ e significância ≥ 13 , totalizando 129 constituintes (Figura 20). A maior parte das proteínas, 117 moléculas (90,69%), exibiu um aumento de expressão nos indivíduos infectados. Dessas, 46 (39,31%) estão contidas nas amostras de camundongos infectados por 5 semanas e 103 (88,03%) nas amostras de animais infectados por 7 semanas. Constituintes que demonstraram regulação negativa, nas amostras do grupo infectado, são representados por 18 (13,9%) proteínas.

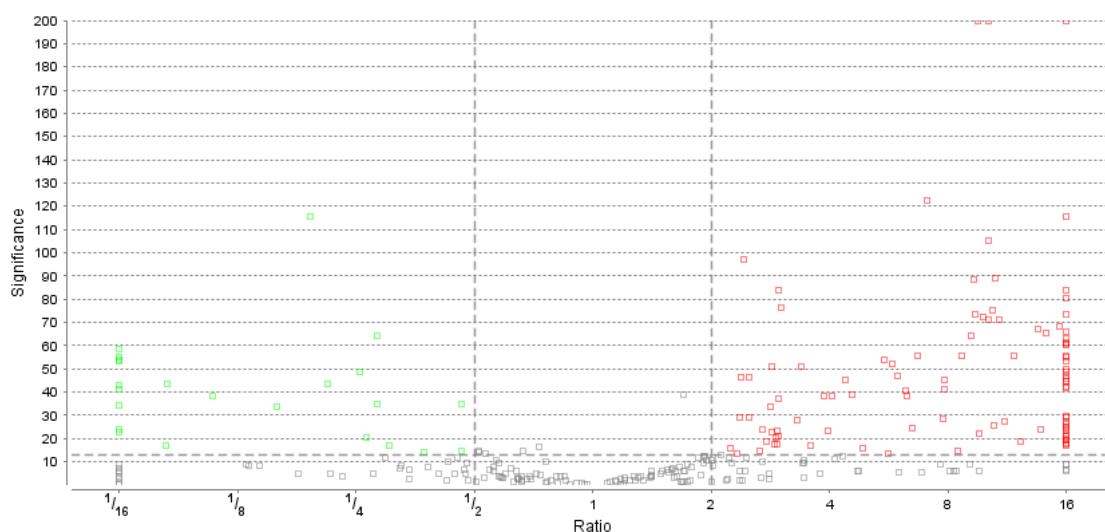


Figura 19. Volcano Plot das proteínas diferencialmente expressas. O nível de expressão é simbolizado pelas cores. Os pontos em verde representam moléculas reguladas negativamente e, os pontos em vermelhos, aquelas reguladas positivamente. A linha tracejada na horizontal representa um cut-off de significância ≥ 13 , o que reflete um $p < 0,05$. A marcação tracejada na vertical indica $fold \geq 2$.

A Tabela 5 demonstra os constituintes diferencialmente expressos identificados na análise quantitativa. A maioria das proteínas com regulação positiva, nas amostras de indivíduos infectados por 5 e 7 semanas, está relacionada à resposta do hospedeiro: como as imunoglobulinas, os fatores do complemento e as proteínas associadas a resposta da fase aguda da infecção. Entre os constituintes que apresentaram aumento de expressão nos camundongos infectados, as globulinas representam os componentes mais abundantes, compreendendo a maior parte da diversidade das proteínas nas amostras. Ao todo, 59 moléculas identificadas são imunoglobulinas (γ -globulina), 8 β -globulinas, 3 α 2-globulinas e 2 α 1-globulinas (Tabela Suplementar 3).

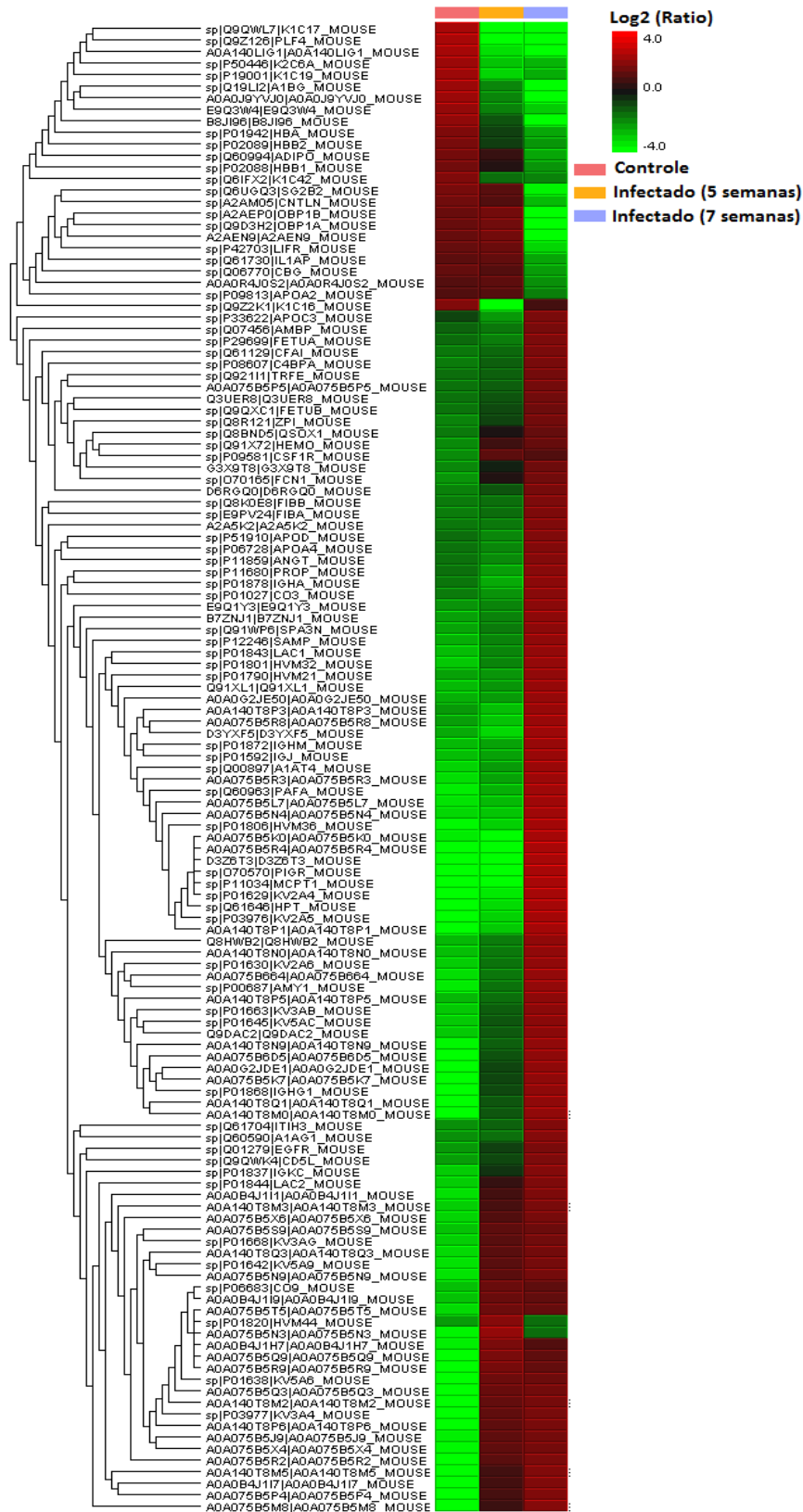


Figura 20. Heatmap demonstrando o perfil de expressão diferencial das 129 proteínas identificadas na análise quantitativa. Os retângulos em verde representam moléculas reguladas negativamente e, em vermelhos, aquelas reguladas positivamente.

Tabela 5. Proteínas diferencialmente expressas identificadas na análise quantitativa.

Parte I. Proteínas com aumento de expressão em amostras de indivíduos infectados.						
Número de Acesso	Descrição	Cobertura (%)	Peptídeos Únicos	Massa (Da)	Razão Infectado (5 Semanas)/Controle	Razão Infectado (7 Semanas)/Controle
Proteínas relacionadas à resposta imune						
Q8HWB2	Histocompatibility 2 Q region locus 4	15	2	39618	2.26	8.45
P01872	Immunoglobulin μ chain C region	58	24	49972	1.41	9.54
P01806	Immunoglobulin heavy chain V region 441	72	4	12911	2.34	38.47
P01790	Immunoglobulin heavy chain V region M511	45	3	13652	1.18	5.98
P01820	Immunoglobulin heavy chain V region PJ14	10	1	12447	4.85	1.65
P01801	Immunoglobulin heavy chain V-III region J606	43	1	12810	2.72	11.75
A0A075B5P5	Immunoglobulin heavy constant γ 3 (Fragment)	51	11	36317	1.19	2.50
A0A075B5R4	Immunoglobulin heavy variable 14-1 (Fragment)	26	1	12992	∞	∞
A0A075B5Q3	Immunoglobulin heavy variable 2-5	20	2	12557	∞	∞
A0A075B5Q9	Immunoglobulin heavy variable 5-15	33	1	12943	∞	∞
A0A075B5R3	Immunoglobulin heavy variable 7-2	20	1	13351	2.85	19.36
A0A075B5R2	Immunoglobulin heavy variable 7-3 (Fragment)	28	1	13457	∞	∞
A0A075B5S9	Immunoglobulin heavy variable 9-4	31	3	10934	5.99	6.71
A0A075B5R8	Immunoglobulin heavy variable V11-2 (Fragment)	28	2	13167	0.56	6.26
A0A075B5R9	Immunoglobulin heavy variable V14-3 (Fragment)	27	1	12975	∞	∞
A0A075B5T5	Immunoglobulin heavy variable V1-5	19	1	10846	10.77	10.05
A0A075B5X6	Immunoglobulin heavy variable V1-67	11	1	10976	7.74	10.50
A0A075B5X4	Immunoglobulin heavy variable V8-11 (Fragment)	22	1	13082	18.97	22.62
A0A0G2JDE1	Immunoglobulin heavy variable V8-12 (Fragment)	13	1	13263	1.00	2.39
P01592	Immunoglobulin J chain	28	5	18014	1.54	10.14
P01878	Immunoglobulin α chain C region	44	4	36876	0.52	3.32
P01868	Immunoglobulin γ -1 chain C region secreted form	56	3	35705	1.00	2.45
A0A075B5P4	Immunoglobulin γ -1 chain C region secreted form (Fragment)	59	2	35752	19.21	30.43
P01837	Immunoglobulin κ chain C region	87	8	11778	5.18	10.16
A0A075B5M8	Immunoglobulin κ chain variable 12-38	34	2	12428	∞	∞

A0A075B5K7	Immunoglobulin κ chain variable 14-100	14	1	12650	1.00	2.40
A0A140T8P3	Immunoglobulin κ chain variable 15-103 (Fragment)	14	1	12547	0.57	5.63
A0A075B6D5	Immunoglobulin κ chain variable 19-93	19	1	12735	13.54	34.81
A0A140T8P5	Immunoglobulin κ chain variable 8-24 (Fragment)	35	2	13264	2.52	7.85
A0A075B5N4	Immunoglobulin κ chain variable 8-27	60	2	10976	1.40	18.15
A0A140T8M3	Immunoglobulin κ chain variable 8-30 (Fragment)	35	1	13335	6.55	9.62
A0A140T8N0	Immunoglobulin κ chain variable 9-120 (Fragment)	51	3	12805	2.60	9.35
P01630	Immunoglobulin κ chain V-II region 7S34.1	27	1	12496	3.55	12.22
P03977	Immunoglobulin κ chain V-III region 50S10.1	46	1	12042	∞	∞
P01663	Immunoglobulin κ chain V-III region PC 4050	59	1	12005	3.83	10.18
P01668	Immunoglobulin κ chain V-III region PC 7210	36	2	11950	7.08	8.71
P01645	Immunoglobulin κ chain V-V region HP 93G7	63	2	11954	4.18	10.39
P01638	Immunoglobulin κ chain V-V region L6 (Fragment)	28	2	12986	33.20	33.12
P01642	Immunoglobulin κ chain V-V region L7 (Fragment)	29	3	12615	10.74	13.60
A0A140T8M0	Immunoglobulin κ variable 1-117 (Fragment)	43	1	13117	1.00	2.74
A0A0B4J1H7	Immunoglobulin κ variable 1-135 (Fragment)	46	7	13305	18.81	13.53
A0A140T8M2	Immunoglobulin κ variable 12-44 (Fragment)	45	1	12557	∞	∞
A0A140T8P6	Immunoglobulin κ variable 12-46 (Fragment)	45	2	12562	74.50	93.88
A0A075B5K0	Immunoglobulin κ variable 14-126 (Fragment)	19	1	13058	0	30.84
A0A0B4J1I1	Immunoglobulin κ variable 16-104 (Fragment)	23	2	12875	9.08	14.19
A0A075B5J9	Immunoglobulin κ variable 17-127	14	1	12330	15.00	18.14
A0A075B5N9	Immunoglobulin κ variable 3-7	36	1	10856	11.08	13.82
A0A0B4J1I9	Immunoglobulin κ variable 4-55 (Fragment)	43	1	12736	6.51	6.13
A0A0B4J1I7	Immunoglobulin κ variable 4-68 (Fragment)	17	1	12752	17.71	28.67
A0A075B5L7	Immunoglobulin κ variable 4-80 (Fragment)	14	1	12562	2.19	22.66
A0A140T8P1	Immunoglobulin κ variable 6-14 (Fragment)	48	1	12848	1.00	14.71
A0A140T8M5	Immunoglobulin κ variable 6-15 (Fragment)	53	3	12757	17.25	28.20
A0A140T8Q3	Immunoglobulin κ variable 6-17 (Fragment)	45	1	12760	9.00	11.19
A0A140T8N9	Immunoglobulin κ variable 6-32 (Fragment)	45	3	12656	10.22	29.70
A0A075B5N3	Immunoglobulin κ variable 8-28	42	2	10903	28.67	8.47
P03976	Immunoglobulin κ V-II region 17S29.1	27	1	12390	19.07	335.11

P01629	Immunoglobulin κ V-II region 2S1.3	45	2	12221	1.00	29.25
A0A075B664	Immunoglobulin λ variable 2	14	1	12165	4.75	17.67
P01843	Immunoglobulin λ -1 chain C region	81	5	11575	2.22	9.32
P01844	Immunoglobulin λ -2 chain C region	71	4	11255	5.91	9.84
D3Z6T3	Cathepsin E	5	2	39247	0	1
P09581	Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor	5	4	109179	2.66	2.47
P11034	Mast cell protease 1	21	4	27013	0	1
O70570	Polymeric immunoglobulin receptor	4	3	84999	0	1
A0A140T8Q1	Protein Igkv12-41 (Fragment)	45	2	12581	25.34	68.17
Proteínas relacionadas ao sistema complemento						
P01027	Complement C3	70	105	186483	0.76	3.40
D3YXF5	Complement component 7	5	3	93338	0.44	7.85
Q9DAC2	Complement component 8 γ subunit	42	5	18946	4.09	10.55
P06683	Complement component C9	10	6	62002	6.30	5.74
D6RGQ0	Complement factor H	58	36	125049	1.49	2.97
Q61129	Complement factor I	33	19	67261	1.15	2.76
P08607	C4b-binding protein	22	7	51524	1.28	2.85
P11680	Properdin	14	5	50327	0.59	2.97
Proteínas ligantes de ferro e heme						
G3X9T8	Ceruloplasmin	49	1	121080	1.94	2.93
Q61646	Haptoglobin	50	20	38752	1.00	21.24
Q91X72	Hemopexin	60	28	51318	2.22	2.85
Q07456	Protein AMBP	27	8	39029	0.84	2.24
Q921I1	Serotransferrin	74	56	76724	1.13	2.42
Proteínas relacionadas ao transporte e modulação do metabolismo de lipídeos						
P09813	Apolipoprotein A-II	15	2	11309	1.02	0.46
P06728	Apolipoprotein A-IV	84	35	45029	0.80	2.84
E9Q1Y3	Apolipoprotein B-100 (Fragment)	9	37	503910	1.20	4.58
P33622	Apolipoprotein C-III	46	3	10982	0.46	1.91
P51910	Apolipoprotein D	31	5	21530	0.77	2.71

A2A5K2	Phospholipid transfer protein	9	3	49023	1.00	2.95
Q9QWK4	CD5 antigen-like	42	14	38863	2.22	4.38
Proteínas relacionadas à circulação e coagulação sanguínea						
E9PV24	Fibrinogen α chain	44	36	87429	1.15	3.02
Q8K0E8	Fibrinogen β chain	77	35	54753	1.13	2.98
Q3UER8	Fibrinogen γ chain	72	32	50349	1.25	2.39
B7ZNJ1	Fibronectin	45	65	239720	1.44	5.51
Q60963	Platelet-activating factor acetylhydrolase	10	4	49258	3.16	27.79
Q8R121	Protein Z-dependent protease inhibitor	12	5	51797	1.67	2.94
Inibidores de protease						
Q00897	α 1-antitrypsin 1-4	40	2	45998	2.56	15.39
Q9QXC1	Fetuin-B	44	11	42713	1.37	2.36
Q61704	Inter- α -trypsin inhibitor heavy chain H3	24	18	99358	1.57	3.86
Q91WP6	Serine protease inhibitor A3N	43	12	46718	1.66	5.78
Proteínas relacionadas à resposta de fase aguda de infecção						
Q60590	α 1-acid glycoprotein 1	28	4	23895	1.42	4.07
P29699	α 2-HS-glycoprotein	53	15	37326	0.83	2.51
O70165	Ficolin-1	5	2	36298	2.33	3.59
Q91XL1	Leucine-rich HEV glycoprotein	24	8	37431	1.70	9.17
P12246	Serum amyloid P-component	45	10	26247	1.78	7.08
Q8BND5	Sulfhydryl oxidase 1	25	17	82785	1.68	2.34
Proteínas relacionadas a outros processos						
P00687	α -amylase 1	6	2	57644	6.74	23.95
P11859	Angiotensinogen	14	6	51990	0.78	2.89
Q01279	Epidermal growth factor receptor	5	5	134853	2.15	3.96
Q61730	Interleukin-1 receptor accessory protein	13	6	65741	1.05	0.27
A0A0R4J0S2	Insulin-like growth factor-binding protein	11	5	66990	1.07	0.37
P42703	Leukemia inhibitory factor receptor	13	12	122574	1.04	0.11
Q9D3H2	Odorant-binding protein 1a	35	4	18469	1.09	0.02
A2AEP0	Odorant-binding protein 1b	47	8	19394	1.10	0

A2AEN9	Predicted gene 5938	39	4	18508	1.11	0.02
A0A0G2JE50	Prominin-1	1	1	90016	1.36	7.81

Parte II. Proteínas com diminuição de expressão em amostras de indivíduos infectados.

Número de Acesso	Descrição	Cobertura (%)	Peptídeos Únicos	Massa (Da)	Razão Infectado (5 Semanas)/Controle	Razão Infectado (7 Semanas)/Controle
Proteínas relacionadas a transporte de moléculas						
Q06770	Corticosteroid-binding globulin	28	11	44769	0.88	0.28
P01942	Hemoglobin subunit α	61	8	15085	0.51	0.19
P02088	Hemoglobin subunit β -1	84	5	15840	0.65	0.28
P02089	Hemoglobin subunit β -2	80	5	15878	0.55	0.26
Proteínas estruturais						
Q9Z2K1	Keratin type I cytoskeletal 16	13	2	51606	0.03	0.62
Q9QWL7	Keratin type I cytoskeletal 17	38	7	48162	0	0
P19001	Keratin type I cytoskeletal 19	17	3	44542	0.06	0.12
Q6IFX2	Keratin type I cytoskeletal 42	20	4	50133	0.37	0.30
P50446	Keratin type II cytoskeletal 6A	26	4	59335	0.08	0.11
Proteínas relacionadas a outros processos						
Q60994	Adiponectin	13	3	26809	0.67	0.21
Q19LI2	α -1B-glycoprotein	12	6	56554	0.21	0
A2AM05	Centlein	1	1	160746	0.79	0.16
Q9Z126	Platelet factor 4	20	2	11243	0	0
E9Q3W4	Plectin	0	1	499110	0.24	0.08
B8JI96	Major urinary protein 14 (Fragment)	23	3	17365	0.37	0
A0A0J9YVJ0	Maltase-glucoamylase (Fragment)	3	3	112822	0.21	0
A0A140LIG1	N-acetylglucosaminyl-phosphatidylinositol biosynthetic protein (Fragment)	3	1	27766	0.04	0
Q6UGQ3	Secretoglobin family 2B member 2	35	3	12857	0.78	0.05

Na tabela 5 as proteínas foram agrupadas de acordo com suas funções, contudo, muitas das que foram inseridas em um determinado grupo são passíveis de serem categorizadas em outras funções biológicas. A maioria dos constituintes regulados positivamente nas amostras de indivíduos infectados, revelaram um aumento no nível de expressão com a evolução da doença. Um grupo particular de moléculas demonstrou valores de expressão muito elevados em comparação com os demais constituintes, destacando-se a *α-amylase* (P00687); *α1-antitrypsin* (Q00897); *Complement component 8* (Q9DAC2); *Haptoglobin* (Q61646); *Immunoglobulin kappa variable 12-46* (A0A140T8P6); *Immunoglobulin kappa chain V-II region 17S29.1* (P03976); *Platelet-activating factor acetylhydrolase* (Q60963) e *Protein Igkv12-41* (A0A140T8Q1).

Ao analisar os constituintes diferencialmente expressos por meio da plataforma de redes de associações de proteínas (*STRING*), observaram-se interações entre os componentes identificados na análise quantitativa (Figura 21). As proteínas demonstraram uma grande diversidade de funções desempenhadas no plasma, interagindo entre si em uma variedade de processos biológicos (Figura 22).

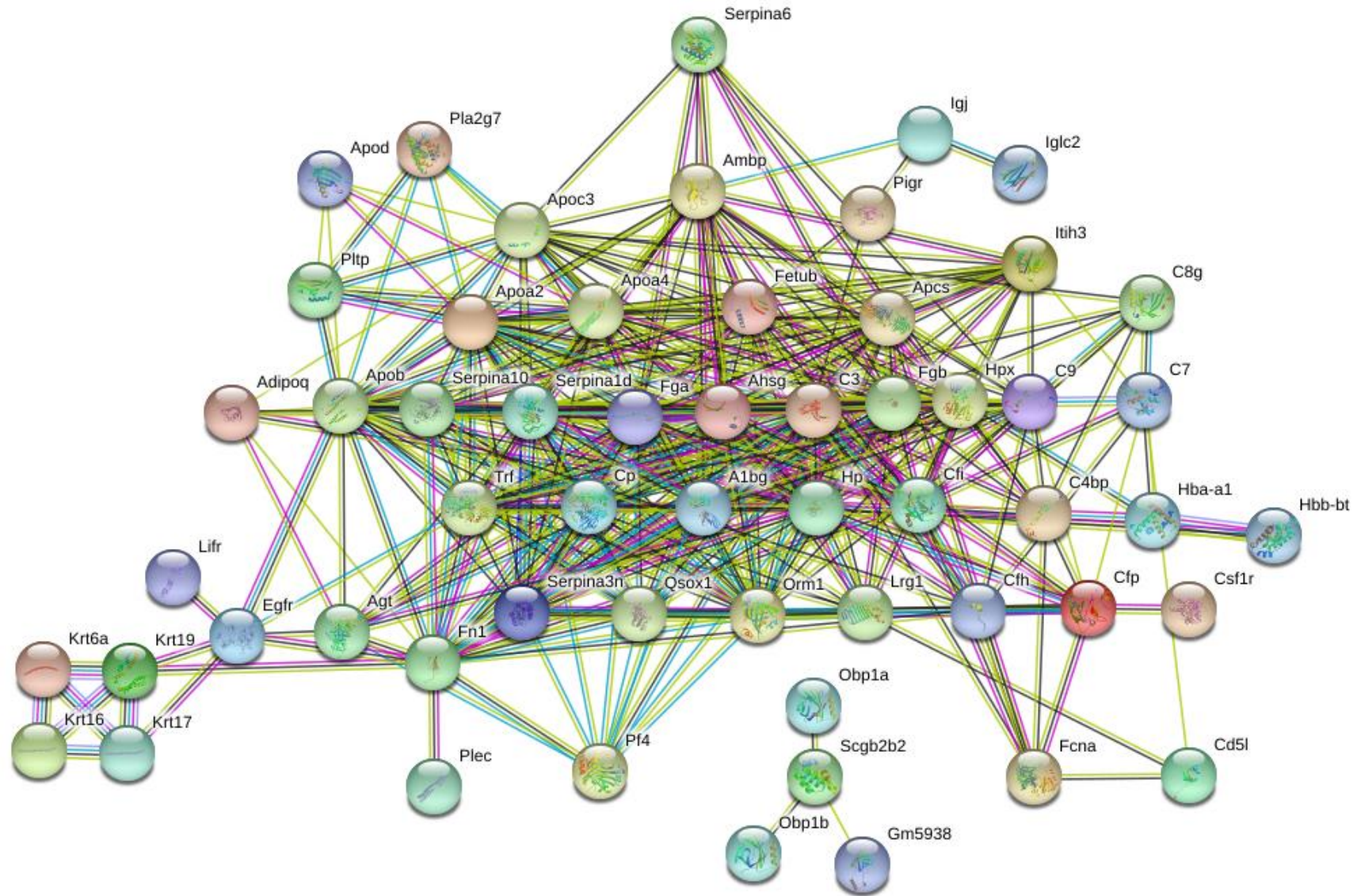


Figura 21. Rede de interação entre proteínas diferencialmente expressas. Submeteram-se as identidades dos constituintes diferencialmente expressos à plataforma de associações de proteínas STRING. A nomenclatura associada a cada proteína demonstrada na figura está descrita na Tabela Suplementar 4.

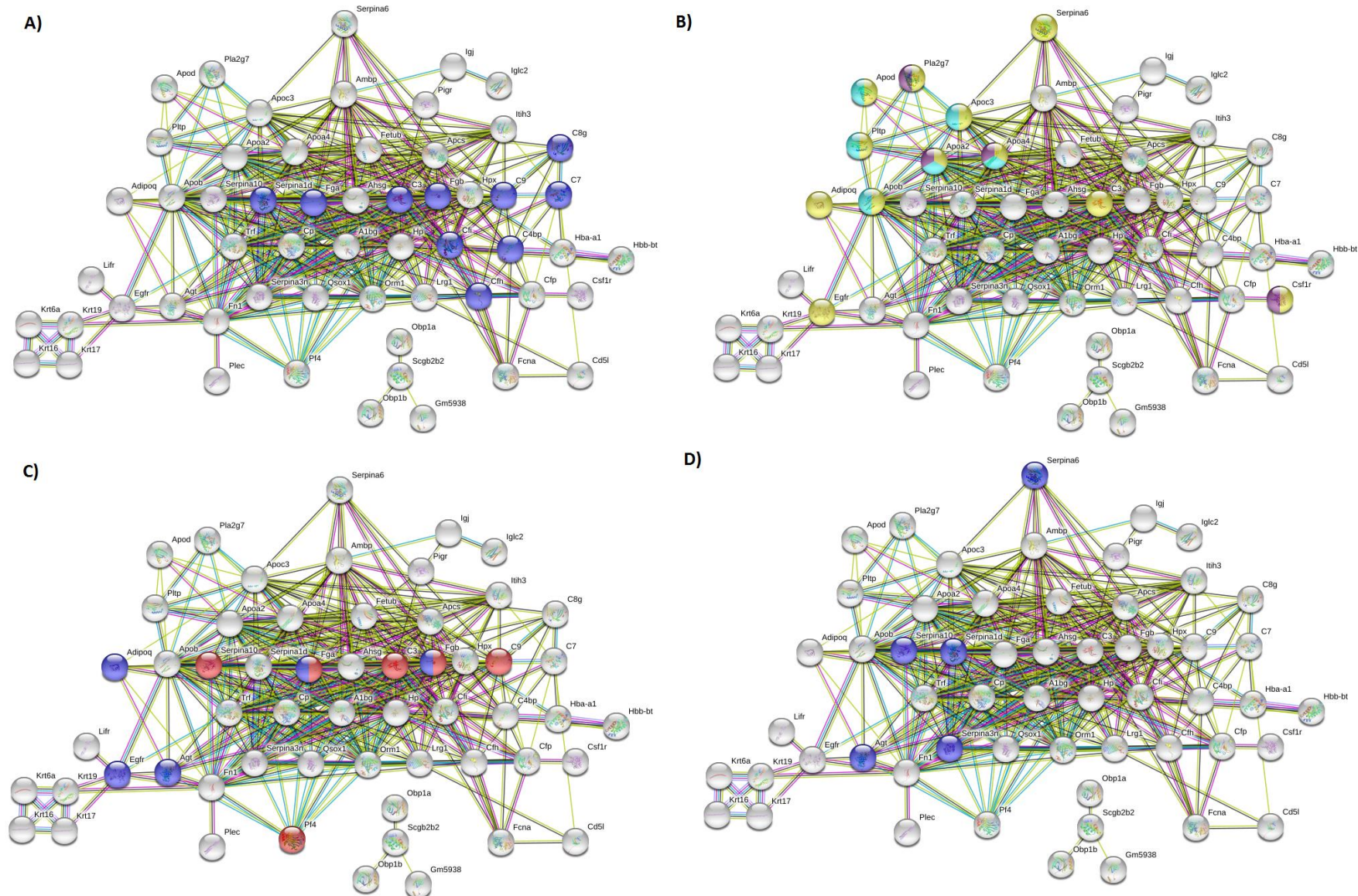


Figura 22. Proteínas diferencialmente expressas, agrupadas por função. **A)** Proteínas relacionadas ao complemento. **B)** Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos (amarelo), ao transporte de lipídeos (verde) e ao metabolismo de fosfolipídeos (roxo). **C)** Proteínas relacionadas à coagulação (vermelho) e circulação sanguínea (azul). **D)** Inibidores de protease. A nomenclatura associada a cada proteína demonstrada na figura está descrita na Tabela Suplementar 4.

4.3. Depleção por Acetonitrila

Avaliou-se o perfil eletroforético uni e bidimensional das amostras de soro, de indivíduos controle e infectados em 7 semanas, submetidas à depleção com Acetonitrila na concentração de 60%.

Os perfis eletroforéticos das amostras depletadas (Figura 23), demonstraram o enriquecimento de bandas de baixa massa molecular, apresentando uma diminuição de bandas e *spots* de proteínas que apresentavam-se com massas moleculares médias e altas.

Os perfis unidimensionais das amostras dos grupos controle e infectado apresentaram-se muito semelhantes. Contudo, apesar das amostras de indivíduos controles apresentarem intensidade maior em bandas de baixa massa molecular, o método de coloração empregado não permite inferir que nessas regiões realmente apresentam-se com maior quantidade de proteínas em relação ao infectado. Diferenças entre as condições controle e infectado não foram observadas por meio da eletroforese unidimensional, mesmo utilizando o método de coloração pela prata que demonstra maior sensibilidade. As diferenças entre os grupos controle e infectado foram observadas somente nos géis bidimensionais, demonstrando *spots* que mostraram-se unicamente presentes em amostras de indivíduos infectados.

A avaliação da depleção por meio da concentração de proteínas nas amostras de Soro Não Depletado e Soro Depletado (Tabela 6), demonstrou que as frações submetidas à Acetonitrila 60%, representam em média 0,32% do conteúdo proteico presente em amostras de indivíduos controle não depletado, e 0,34% das proteínas em amostras de indivíduos infectados não depletado.

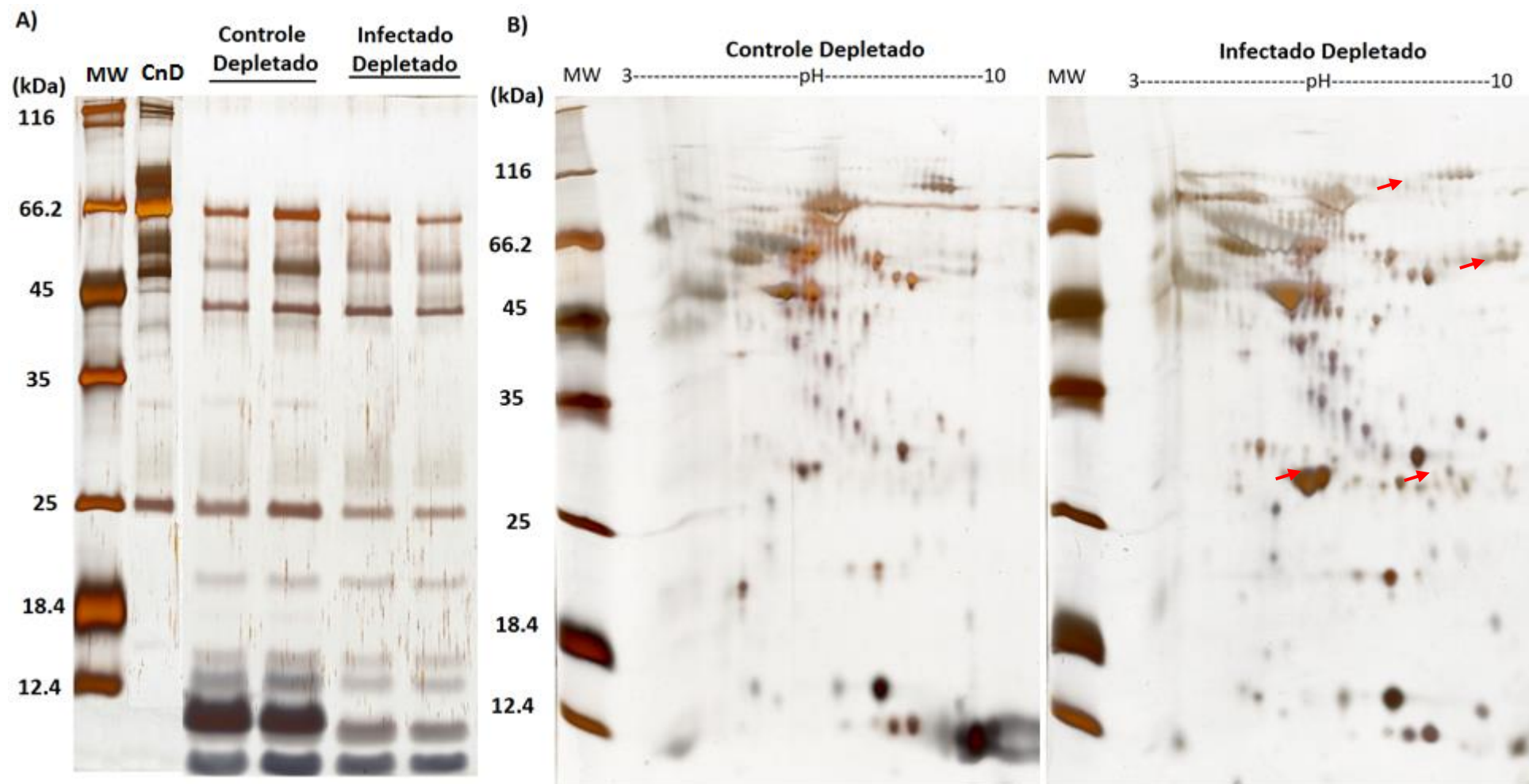


Figura 23. Perfis eletroforéticos de amostras de soro depletado com Acetonitrila 60%, corado por Nitrato de Prata. **A)** Perfil unidimensional de amostras depletadas controle e infectados, gel de poliacrilamida 12%, 3 µg de proteínas/canaleta. Legenda: CnD: Controle Não Depletado. **B)** Perfil bidimensional de amostras controle e infectado depletadas, géis de poliacrilamida 12%, pH 3-10 linear, 50 µg de proteínas/gel. As setas evidenciam as principais alterações em amostras de indivíduos infectados.

Tabela 6. Concentração de proteínas em amostras de Soro Não Depletado e em Soro Depletado por Acetonitrila 60%.

Amostra	Concentração Soro Não Depletado (mg/ml)	Concentração Soro Depletado (mg/ml)	Porcentagem associada à amostra de soro total (%)
Controle 1	41,70	0,165	0,40
Controle 2	42,66	0,159	0,37
Controle 3	50,11	0,167	0,33
Controle 4	58,92	0,177	0,30
Controle 5	68,33	0,157	0,23
Infectado 1	59,96	0,169	0,28
Infectado 2	58,03	0,197	0,34
Infectado 3	45,29	0,186	0,41
Infectado 4	61,07	0,211	0,35
Infectado 5	64,07	0,223	0,35
Média Controle	52,34	0,165	0,32
Média Infectado	57,69	0,197	0,34

As amostras de soro depletadas demonstraram diferenças significativas (Figura 24) entre as condições controle e infectado ($p=0,036$), assim como entre amostras de Soro Controle Não Depletado e Soro Controle Depletado ($p=0,0005$), e Soro Infectado Não Depletado e Soro Infectado Depletado ($p<0,0001$). Somente não observou diferenças significativas entre amostras de Soro Controle Não Depletado e Soro Infectado Não Depletado ($p=0,3339$).

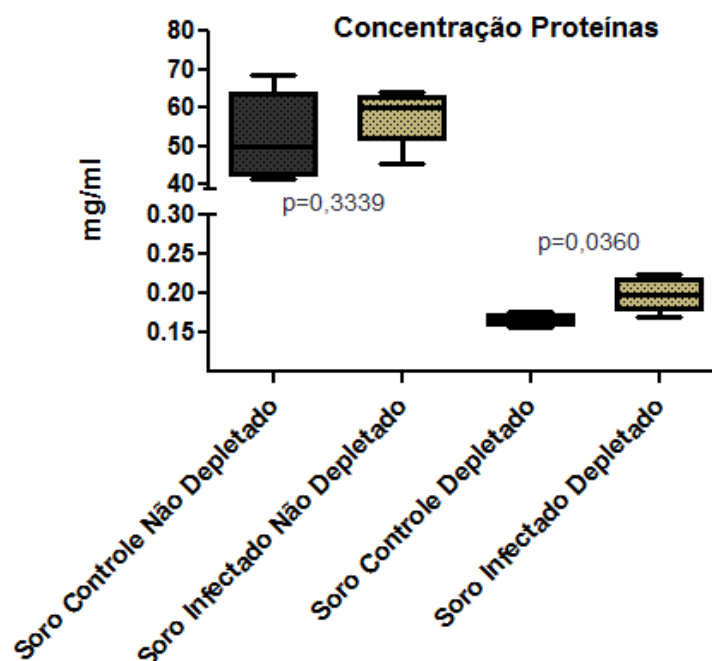


Figura 24. Concentração de proteínas em amostras de soro depletadas e não depletadas. O gráfico ilustra as médias e os valores máximos e mínimos das concentrações proteicas em cada condição. Utilizou-se o *test t* para avaliar diferenças significativas entre as amostras.

Os resultados demonstraram a Acetonitrila como solvente orgânico capaz de promover a depleção das proteínas de alta massa molecular. Essa estratégia permitiu o enriquecimento de proteínas de baixa abundância no soro, observando a redução da complexidade da amostra.

4.4. *ProteoMiner*TM Protein Enrichment Kit

Utilizou-se amostras de soro provenientes de animais controles e infectados em 7 semanas e, amostras de soro submetidas ao *kit ProteoMiner*TM, nas condições controles e infectados em 7 semanas, para avaliação do perfil eletroforético composicional.

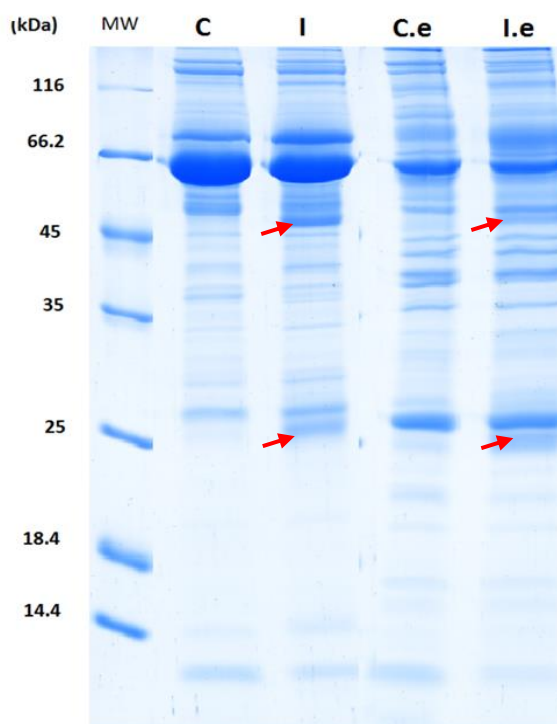


Figura 25. Perfil eletroforético de amostras de soro total e após o emprego do *ProteoMiner*TM (Bio-Rad). Gel de poliacrilamida 12%, cerca de 10 µg de proteínas/canaleta. Legenda: C: Soro Total Controle; I: Soro Total Infectado; Ce: Soro Controle Eluato; Ie: Soro Infectado Eluato. As setas evidenciam as principais alterações em amostras de indivíduos infectados.

O perfil eletroforético composicional das amostras de soro, de animais controles e infectados em 7 semanas submetidas ao *Kit ProteoMiner*TM (Bio-Rad), demonstrou a redução da intensidade de bandas referentes aos constituintes mais abundantes, observado por volta de 66 kDa, assim como, mostrou uma maior diversidade de bandas distribuídas ao longo das canaletas. Nos perfis eletroforéticos de amostras submetidas ao *kit* em

comparação à amostras de soro total sem depleção, observa-se o aparecimento de um número maior de bandas nas regiões abaixo de 25 kDa.

As alterações no soroproteoma decorrentes da infecção, observadas no perfil eletroforético de amostras de soro total de animais infectados, também se revelaram quando submetidas ao *kit*. A eluição da amostra infectada demonstrou por meio do gel, as mesmas características associadas à infecção, apresentando maior intensidade em algumas bandas, observadas em 25 e em torno de 50 kDa.

Os perfis das amostras submetidas ao *kit* demonstrado na Figura 25, compreendem amostras eluídas com solução contendo SDS (Dodecil Sulfato de Sódio). Devido à presença desse detergente, pode-se avaliar somente o perfil eletroforético unidimensional, uma vez que o SDS influencia na migração das proteínas durante o passo de isoeletrofocalização, na eletroforese bidimensional.

A tabela 7 demonstra as concentrações das amostras de soro total e, amostras eluídas com solução de NaCl 500 mM. Os valores obtidos de concentração em amostras submetidas ao *kit*, revelam que essas representam em torno de 0,7% das amostras de soro total sem depleção.

Tabela 7. Concentração de proteínas de amostras de soro total e eluídas com NaCl 500 mM.

Amostra	Concentração (mg/ml)	Porcentagem associada à amostra de soro total (%)
Soro Controle Total	56,59	-
Soro Infectado Total	55,95	-
Controle Eluato NaCl 500 mM	0,39	0,70
Infectado Eluato NaCl 500 mM	0,40	0,71

O gel de eletroforese demonstrou que as frações submetidas ao *kit* são representativas das amostras originais, mantendo as características associadas a uma amostra de soro. Observou a eficácia do método na normalização da distribuição dinâmica de proteínas, resultando em um perfil eletroforético composto por proteínas de baixa, média e alta massa molecular. O emprego das frações eluídas, direcionado a uma estratégia de análise por espectrometria de massas, pode aumentar o número de moléculas identificadas em uma amostra de soro.

5. Discussão

As complicações clínicas decorrentes da esquistossomose têm sido descritas há bastante tempo. Entretanto, o emprego de investigações direcionadas ao entendimento da relação parasito-hospedeiro na doença ainda são passíveis de serem realizadas, pelas contribuições pertinentes à pesquisa de biomarcadores e de novos candidatos vacinais.

Com este estudo, pôde-se conhecer o proteoma plasmático e o soroproteoma de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni*, em virtude da identificação de um repertório de proteínas relacionadas à infecção. Essas contribuem coletivamente para uma melhor compreensão dos mecanismos desempenhados pelo hospedeiro vertebrado, em resposta a presença dos parasitos.

5.1. Avaliação da esquistossomose no modelo experimental murino

No decorrer dos experimentos, com a evolução da doença nos animais, observou-se hepatoesplenomegalia nos camundongos infectados, manifestação clínica clássica da esquistossomose (Carvalho *et al.*, 2008). A avaliação da doença foi feita utilizando amostras coletadas na 5^a e 7^a semanas de infecção. Esses períodos investigados correspondem, respectivamente, as etapas iniciais da fase aguda e ao ápice da doença (Pearce e Macdonald, 2002).

O peso aumentado do baço, em conjunto com as razões (peso do baço/peso corporal) obtidas para os indivíduos infectados, demonstraram a ocorrência de esplenomegalia. Além disso, diferenças significativas foram observadas entre as razões calculadas para os animais controles e infectados. Essas observações, associadas à evolução da doença no modelo experimental murino, corroboram com resultados descritos na literatura (Manivannan *et al.*, 2012; Campos *et al.*, 2017).

5.2. Os perfis eletroforéticos das amostras de plasma e soro

As abordagens de proteômica baseada em eletroforese empregadas nas amostras investigadas, demonstraram similaridade entre os perfis eletroforéticos obtidos e os provenientes de amostras de plasma ou soro descritos na literatura (Bansal *et al.*, 2014). As alterações observadas em amostras de plasma de indivíduos infectados, refletiram-se

também em amostras de soro, demonstrando perfis eletroforéticos uni e bidimensionais muito semelhantes. O perfil eletroforético unidimensional revelou já em 5 semanas de infecção, a presença de bandas unicamente visualizadas em amostras de indivíduos infectados. Com a progressão da doença no modelo murino, obteve-se, para 7 semanas de infecção, um perfil unidimensional ainda mais discrepante quando comparado ao grupo controle, resultando no aumento de intensidade de bandas únicas.

Os perfis bidimensionais das amostras provenientes de animais infectados, nos dois períodos investigados, em comparação ao grupo controle, revelaram a existência de *spots* diferencialmente presentes e com intensidade maior em regiões específicas dos géis. Devido à natureza do corante utilizado, Coomassie G-250, uma intensidade maior, em determinada região do gel, representa uma maior quantidade de proteínas contidas na banda ou *spot*, visto que as concentrações de proteínas aplicadas aos géis foram sempre as mesmas, no intuito de propiciar a comparação entre as condições.

A investigação por *Western Blotting*, demonstrou a presença de cadeias leves e pesadas de imunoglobulinas da classe IgG nas amostras de indivíduos infectados por 7 semanas. Observou-se que, no perfil bidimensional dessas amostras, essa classe de anticorpos contribui significativamente com o número de *spots* associados às alterações, reforçando as diferenças na composição dessas amostras em relação ao grupo controle. Contudo, é possível que outras classes de γ -globulinas, como IgM e IgE, estejam presentes na amostras e sejam representadas por outros *spots*.

De fato, foi possível observar nas amostras de indivíduos infectados por 7 semanas, parte da resposta imunológica do hospedeiro frente a doença. As abordagens proteômicas baseadas em eletroforese e *Western Blotting* permitiram, coletivamente, a constatação de que existem diferenças no proteoma plasmático e no soroproteoma dos animais infectados, em relação ao grupo controle.

5.3. Análise proteômica composicional do plasma

O número de proteínas identificadas no plasma de camundongos, pela plataforma UHPLC-MS/MS, está de acordo com os resultados composicionais de proteômica baseada em espectrometria de massas de amostras de plasma, descritos na literatura (Pisanu *et al.*, 2018), embora não tenha sido utilizadas abordagens investigativas

relacionadas à esquistossomose nesse trabalho. Devido à natureza da amostra, representada pela alta abundância de algumas moléculas, a grande variação dinâmica de concentração de proteínas e ao fato de que, no plasma, há representantes proteicos de outros tecidos (Geyer *et al.*, 2016; Geyer *et al.*, 2017), demonstra a alta complexidade molecular desse proteoma (Anderson e Anderson, 2002).

A análise proteômica em larga escala, empregada neste estudo, permitiu a investigação das alterações existentes no proteoma plasmático de indivíduos infectados. Observando constituintes unicamente presentes nas amostras infectadas em 5 e 7 semanas e demonstrando proteínas diferencialmente expressas nos períodos investigados.

5.4. Constituintes diferencialmente expressos se relacionam com a resposta imunológica inata e adaptativa

A presença do *Schistosoma mansoni* e dos ovos desse parasito nos tecidos do hospedeiro vertebrado promove uma reação coordenada da resposta imunológica frente à infecção. Alguns componentes da imunidade inata destacaram-se, apresentando modulação positiva em amostras de indivíduos infectados. Esses parecem estar relacionados, de modo significativo, com a presença do parasito no hospedeiro vertebrado.

Inicialmente, com a penetração da cercária e migração do esquistossômulo no tecido epitelial do hospedeiro, os macrófagos residentes no epitélio respondem com a produção de citocinas, dentre elas, a Interleucina-1 (Pearce e Macdonald, 2002; Abbas *et al.*, 2015). Identificou-se, nas amostras de 5 semanas de infecção, o constituinte regulado positivamente *Interleukin-1 receptor accessory protein* (Q61730). A Interleucina-1 estimula as células endoteliais a expressarem moléculas de adesão, para o recrutamento de neutrófilos e monócitos (Abbas *et al.*, 2015). Com a progressão da doença, as populações de células associadas a desempenharem papéis na resposta imune podem aumentar, Cosenza-Contreras *et al.*, (2018) demonstrou em camundongos BALB/c, infectados por *S. mansoni* em 7 semanas, que no baço há um aumento significativo de macrófagos, em resposta a infecção. Particularmente durante a inflamação, macrófagos teciduais podem derivar de monócitos do sangue, que por sua vez derivam de precursores na medula óssea, pelos processos de proliferação e diferenciação (Lenzo *et al.*, 2012).

Nesta investigação, foi identificado, nos dois períodos de infecção avaliados, o aumento de expressão do componente *Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor* (P09581), em amostras de soro de animais infectados. Esse constituinte desempenha um papel essencial na regulação da manutenção, proliferação e diferenciação de células precursoras hematopoiéticas, especialmente macrófagos e monócitos e, promove também a liberação a partir destes, de quimiocinas pró-inflamatórias (Lenzo *et al.*, 2012). Os macrófagos no epitélio são a principal fonte de CD5L no organismo, a expressão dessa glicoproteína é regulada positivamente sob condições inflamatórias de origem infecciosa (Sanjurjo *et al.*, 2015). Essa molécula, *CD5 antigen-like* (Q9QWK4), foi identificada no soro de animais infectados nos dois períodos investigados, com aumento de expressão mais significativo nas amostras de 7 semanas de infecção. Já foi observado que esse constituinte desempenha funções relacionadas à modulação da migração de leucócitos, resposta inflamatória e, apresenta altas concentrações no soro, circulando associado à IgM (Kurokawa *et al.*, 2010; Sanjurjo *et al.*, 2015). O CD5L liga-se a células mielomonocíticas e linfóides, sugerindo que pode desempenhar um papel na regulação do sistema imune inato e adaptativo (Sarvari *et al.*, 2013).

Os neutrófilos fazem parte da resposta imunológica inata e, geralmente, são o primeiro tipo celular na resposta frente a infecções (Abbas *et al.*, 2015). Foram identificados constituintes regulados positivamente, relacionados à via de degranulação de neutrófilos, como *α 1-acid glycoprotein 1* (Q60590); *α 2-HS-glycoprotein* (P29699); *Leucine-rich HEV glycoprotein* (Q91XL1) e *Sulphydryl oxidase 1* (Q8BND5).

Um outro mecanismo de resposta da imunidade inata é o sistema complemento. Particularmente, todos os constituintes do complemento, identificados na análise quantitativa, demonstraram níveis de expressão aumentados nas amostras de animais infectados. Observou-se que a maioria dos componentes identificados está associada à Via Alternativa do sistema complemento (Figura 26). Contudo, moléculas relacionadas à ativação pela Via Clássica e pela Via da Lectina, também foram observadas. Como exemplo, temos a *C4b-binding protein* (P08607) a qual desempenha função no controle da ativação do complemento pela Via Clássica, e *Serum amyloid P-component* (P12246), que, por sua vez, liga-se ao componente C1q presente nessa via. A proteína *Ficolin-1* (O70165) atua como um receptor de reconhecimento de padrões na imunidade inata ativando a Via da Lectina e os monócitos. Particularmente, a ativação dessa via, pode se

dar por meio da ligação da lectina com a manose presente nas glicoproteínas que são secretadas pelos ovos do parasito (Schwartz e Fallon, 2018), assim como, o Antígeno Circulante Catódico e o Antígeno Circulante Anódico, também são de natureza glicoproteica (Skelly *et al.*, 2014).

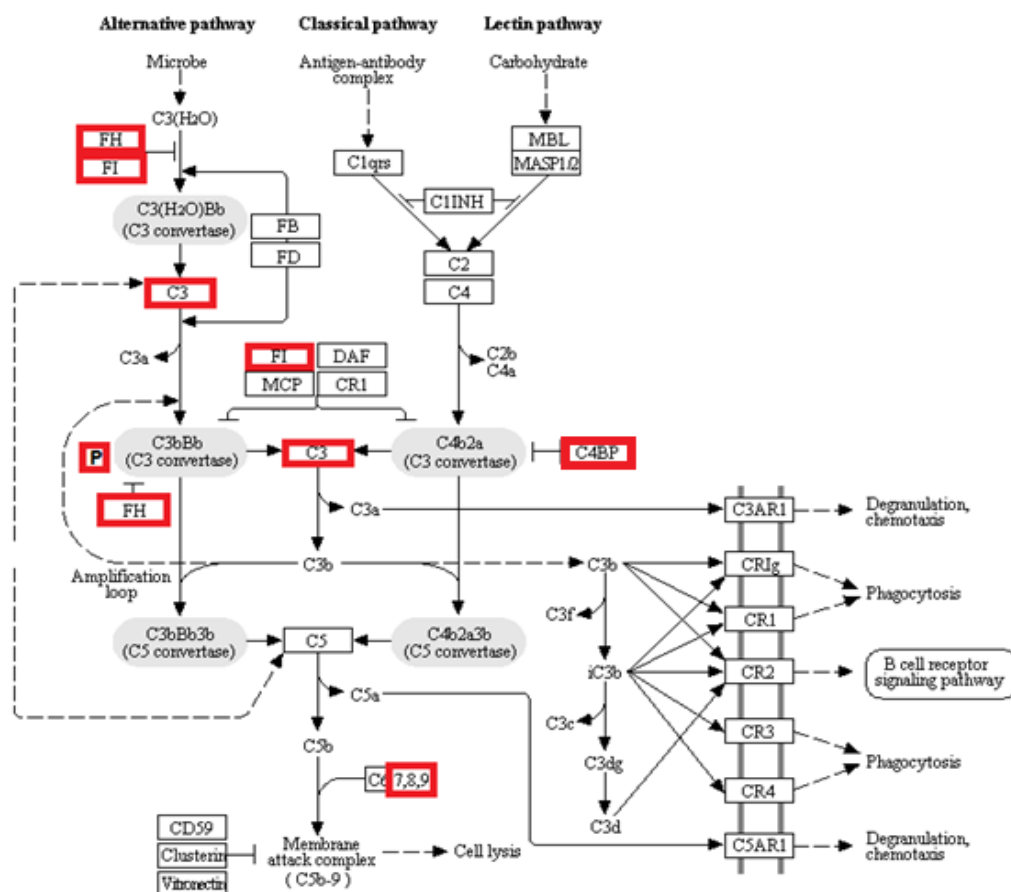


Figura 26. Sistema Complemento. As proteínas destacadas em vermelho são constituintes que foram identificadas com aumento de expressão, na análise quantitativa.

Fonte: Adaptado de (Kanehisa e Goto, 2000)

Todas as proteínas diferencialmente expressas identificadas, que compõem o sistema complemento ou ativam suas vias, demonstraram níveis de expressão maiores nos animais infectados por 7 semanas, em vez daqueles infectados por 5 semanas. Esse aumento pode estar associado à oviposição, como um processo adicional de contribuição antigênica na corrente sanguínea do hospedeiro. É válido ressaltar que o ovo do *S. mansoni* contém um embrião biologicamente ativo, capaz de secretar moléculas, e de

interagir com produtos do hospedeiro, exercendo contato e modulando constituintes relacionados à resposta imune no decorrer da infecção (Schwartz e Fallon, 2018).

Coletivamente, Braschi (2006) e Da'dara *et al.* (2017) demonstraram, *in vitro*, que o sistema complemento é ativado no soro quando há a incubação desse com o *Schistosoma mansoni*. Contudo, houve a degradação de certos constituintes do sistema complemento, principalmente C3, impossibilitando, dessa forma, a progressão da cascata do complemento. A evasão dos componentes do complemento, é um processo importante que parasito desempenha, resultando no estabelecimento com sucesso da infecção, e também, proporcionando a permanência do parasito de forma crônica no hospedeiro vertebrado (Skelly e Wilson, 2006).

Componentes da imunidade adaptativa também demonstraram aumento nos níveis de expressão em indivíduos infectados. Dentre eles, constituintes relacionados ao processamento e apresentação de antígenos via MHC de classe I, *Histocompatibility 2 Q region locus 4* (Q8HWB2), e classe II, *Cathepsin E* (D3Z6T3). Particularmente, a classe de proteínas que contribuiu com o maior número de identidades foram as imunoglobulinas, distribuídas nas diferentes cadeias leves e pesadas, resultando em 59 moléculas diferencialmente expressas, observou que o nível de expressão de alguns destes anticorpos tem demonstrado valores superiores que a média.

5.5. Proteínas relacionadas ao ferro e ao grupo heme demonstraram aumento de expressão nos períodos de infecção analisados

Os produtos da digestão do *Schistosoma* precisam de serem regurgitados. Entre os componentes presentes no vômito do parasito está a hemozoína, formada por dímeros do grupo prostético heme (Skelly *et al.*, 2014). O aumento do nível de expressão das proteínas associadas ao ferro e ao grupo heme, no proteoma plasmático de indivíduos infectados, pode estar relacionado à presença da hemozoína decorrente da regurgitação, permitindo que o heme e o ferro estejam circulantes no plasma. Todas as proteínas diferencialmente expressas, vinculadas ao transporte destes constituintes demonstraram, em 7 semanas de infecção, níveis de expressão maiores que em 5 semanas.

Essas observações foram reforçadas ao analisar as funções das respectivas moléculas identificadas, que exibiram aumento de expressão. A função da *Hemopexin*

(Q91X72) é ligar-se ao grupo heme no plasma e transportá-lo para o fígado, para a posterior hidrólise e recuperação de ferro (Uniprot, 2016). A *Serotransferrin* (Q921I1) é uma proteína transportadora e de ligação ao ferro, sendo responsável pelo transporte dessa molécula dos locais de absorção e degradação do heme, para os locais de armazenamento e utilização desse (Uniprot, 2016). Outras moléculas relacionadas ao ferro foram identificadas na análise quantitativa, como a *Ceruloplasmin* (G3X9T8), que possui atividade oxidativa, estando envolvida no transporte de ferro através da membrana celular (Hellman, Gitlin, 2002). Além da *Haptoglobin* (Q61646), a qual captura e combina-se com a hemoglobina livre no plasma durante a hemólise, permitindo a reciclagem hepática do ferro contido no complexo heme. Também desempenha um papel na modulação de muitos aspectos da resposta da fase aguda (Uniprot, 2016).

Possivelmente, esses constituintes expõem níveis de expressão aumentados no plasma, em resposta a presença de ferro e do heme, resultando que o hospedeiro processe esses componentes circulantes provenientes da regurgitação, uma vez que esses não podem ficar em sua forma livre no plasma. Isso porque o ferro promove a formação de radicais livres, capazes de causar a injúria de componentes macromoleculares do sangue (Adachi *et al.*, 2016; Leaf e Swinkels, 2016).

A infecção experimental realizada no modelo murino, utilizando uma alta carga parasitária, pode ter promovido uma situação de diminuição de eritrócitos nos camundongos infectados, associada ao grande consumo de sangue pelos parasitos. O *Schistosoma* adulto fêmea consome, por hora, cerca de 330 mil eritrócitos, e o macho, aproximadamente 39 mil (Skelly *et al.*, 2014). O que pode justificar a regulação negativa de *Hemoglobin subunit α* (P01942), *Hemoglobin subunit β -1* (P02088), *Hemoglobin subunit β -2* (P02089) em amostras de animais infectados. Em decorrência da alta demanda de consumo de hemácias pelos vermes, pode ter ocorrido o estímulo a eritropoese em animais infectados, o que associa-se com o aumento dos níveis de expressão de *Serotransferrin* (Q921I1) e *Ceruloplasmin* (G3X9T8), proteínas relacionadas ao transporte de ferro, para os locais que demandam esse elemento, a exemplo da produção de novas hemácias.

5.6. A presença dos parasitos e dos ovos no ambiente intravascular promove o aumento da expressão de constituintes relacionados à coagulação sanguínea

Dentre as proteínas diferencialmente expressas com aumento de expressão, foram observadas algumas que se relacionam com a cascata de coagulação, como *Fibrinogen α chain* (E9PV24), *Fibrinogen β chain* (Q8K0E8), *Fibrinogen γ chain* (Q3UER8) e *Fibronectin* (B7ZNI1). Essas proteínas desempenham funções no plasma, contribuindo com a ativação da cascata de coagulação. Contudo, identificou-se também o componente *Protein Z-dependent protease inhibitor* (Q8R121), que atua inibindo a atividade dos fatores de coagulação Xa e fator XIa. Essas observações envolvendo ora moléculas que promovem a coagulação, ora biomoléculas que a inibem, podem ser justificadas pelos mecanismos moleculares de resposta do hospedeiro a presença dos vermes e ovos nos vasos do sistema mesentérico e do sistema porta hepático do hospedeiro, conforme descrito a seguir.

Alguns autores constataram a expressão de calpaínas (SmCalp1) tegumentares no parasito, capazes de clivar a fibronectina (Wang *et al.*, 2017) e provocar, possivelmente, a interrupção do processo de coagulação. Outros pesquisadores verificaram, por sua vez, a expressão de uma ADPase (SmNPP5) na superfície tegumentar do *Schistosoma*, com potencial de inibir a agregação plaquetária (Elzoheiry *et al.*, 2018). Ovos depositados no endotélio vascular degradam, ativamente, a fibronectina, por expressarem SmCalp1 em seu envoltório (Wang *et al.*, 2017). Nos ovos localizam-se, ainda, receptores que se ligam ao plasminogênio, aumentando a atividade fibrinolítica desempenhada por esses (Schwartz e Fallon, 2018).

Alterações hemostáticas observadas no sangue dos camundongos, infectados com *Schistosoma mansoni* por 7 semanas, demonstraram que a formação do coágulo no sangue desses animais é mais rápida, embora a fibrinólise também seja (Da'dara *et al.*, 2016). Constatou-se ainda a associação entre os distúrbios hemostáticos e o aumento da fibrose no fígado durante a doença (Leite *et al.*, 2013).

Devido à presença dos parasitos no lúmen dos vasos sanguíneos e dos ovos na parede das veias, distúrbios no fluxo sanguíneo ocorrem nesses capilares, resultando em injúria tecidual e complicações trombóticas (Da'dara *et al.*, 2016). A lesão e a inflamação do endotélio vascular também podem ser decorrentes da formação de pólipos, sendo uma

das lesões intestinais mais frequentes observadas na doença (Shuja *et al.*, 2018), assim como, em decorrência da degranulação de neutrófilos, obtida em resposta a inflamação dos tecidos, que resulta na liberação de óxido nítrico e de espécies reativas de oxigênio, aumentando os danos teciduais (Lacy, 2006).

A lesão do endotélio vascular promove a liberação de grânulos plaquetários, e posterior formação do tampão plaquetário. Identificou-se um constituinte, com o nível de expressão altamente elevado, nas amostras de indivíduos infectados que atua modulando a ação do fator de ativação das plaquetas, *Platelet-activating factor acetylhydrolase* (Q60963). Em decorrência das complicações trombóticas, eventos intra-abdominais não pancreáticos, como o infarto do mesentério, podem ser observados, proporcionando um aumento de *α -amylase* (P00687) (Motta, 2000). Essa enzima apresentou, na análise quantitativa das amostras de camundongos infectados por 7 semanas, valores de expressão significativamente maiores, em comparação com as outras proteínas.

Essas considerações, em conjunto, demonstraram a resposta do hospedeiro vertebrado na presença dos parasitos, que consiste no aumento de expressão de proteínas associadas à coagulação, e à manutenção da hemostasia e injúria tecidual.

5.7. O comprometimento hepático na doença associado à expressão de proteínas plasmáticas

O fígado é o principal órgão responsável pela síntese de proteínas plasmáticas, hepatopatias podem resultar no declínio da concentração sérica de proteínas (Mcpherson e Pincus, 2013). Contudo, diferenças significativas não foram observadas nas concentrações das proteínas plasmáticas nos animais infectados, mesmo para aqueles infectados por 7 semanas. Nesse período em particular, observou-se nos indivíduos infectados, um comprometimento hepático significativo decorrente da formação de granulomas ao redor dos ovos presentes nesse órgão (Campos *et al.*, 2017).

Identificou-se na análise quantitativa, diversas proteínas que são sintetizadas no fígado, observando moléculas relacionadas ao transporte de lipídeos, como as apolipoproteínas, fatores da cascata de coagulação e diversas globulinas. Campos *et al.*, (2017) demonstrou que, em 5 semanas de infecção no modelo murino, há uma alta demanda de síntese proteica no fígado, e de forma contrastante, com a evolução da doença

para 7 semanas, ocorre uma diminuição significativa dos níveis de expressão proteicos no tecido hepático, com a regulação negativa de grande parte dos constituintes.

Embora haja um grande comprometimento do fígado em camundongos infectados por 7 semanas, muitas das moléculas de origem hepática, identificadas no proteoma plasmático, apresentaram-se com aumento de expressão. Ainda que esse aumento tenha sido constatado, pode ser decorrente de proteínas que foram secretadas pelo fígado no intervalo compreendido entre 5 e 7 semanas e, devido aos seus respectivos tempos de meia vida, permaneceram circulantes.

A esquistossomose propicia complicações hepáticas graves, como a formação de granulomas e fibrose periportal, esta última resulta na oclusão progressiva da veia porta, circulação venosa colateral, hipertensão portal e hemorragia do trato gastrointestinal superior (Leite *et al.*, 2013). A formação do granuloma e da fibrose no fígado estão associados as células estreladas hepáticas, quando ocorre a ativação destas, em decorrência há o aumento da síntese de actina, colágeno e componentes da matriz extracelular. O sistema Renina-Angiotensina desempenha um papel na ativação destas células, particularmente pela formação de Angiotensina II (Parreira *et al.*, 2018).

A enzima de origem renal Renina, catalisa a formação de Angiotensina I, quando atua sobre o Angiotensinogênio. Por meio da Enzima Conversora da Angiotensina, há a formação de Angiotensina II, a partir da Angiotensina I que é biologicamente inativa (Parreira *et al.*, 2018). No fígado a Angiotensina II favorece a ativação de células estreladas hepáticas, desempenhando efeitos pró-fibróticos e pró-inflamatórios, resultando na deposição excessiva de colágeno e remodelação da matriz extracelular, além da produção de citocinas inflamatórias (Attia *et al.*, 2018).

O *Angiotensinogen* (P11859) demonstrou níveis de expressão aumentados em amostras Infectado (7 Semanas), o que biologicamente conflui com o período da doença associado à intensa presença de granulomas e fibrose no fígado. A regulação positiva deste constituinte corrobora com a literatura, no contexto de que alguns componentes do sistema Renina-Angiotensina desempenham papéis cruciais na fibrose hepática e formação do granuloma, demonstrando níveis de expressão aumentados nestas condições, destacando o Angiotensinogênio, Renina, Enzima Conversora da Angiotensina, Angiotensina II e Receptores Tipo 1 de Angiotensina II (Bernstein *et al.*, 2018 e Paizis *et al.*, 2002).

5.8. Proteínas associadas ao transporte e modulação do metabolismo de lipídeos

Constatou-se, nos animais infectados, a presença de moléculas reguladas positivamente em animais infectados que estão relacionadas ao transporte de lipídeos, como as apolipoproteínas (A-II, A-IV, B-100, C-III, D), e a *Phospholipid transfer protein* (A2A5K2). Com 7 semanas de infecção, observou que todos esses constituintes alcançaram níveis de expressão maiores que em 5 semanas, salvo a *Apolipoprotein A-II* (P09813).

A proteína *CD5 antigen-like* (Q9QWK4), já descrita anteriormente no item 5.4 associada à resposta imunológica, também demonstra atuação como um importante regulador da síntese e do metabolismo de lipídeos (Kurokawa et al., 2010). Sua expressão é controlada por um fator de transcrição pertencente à família de receptores nucleares, desempenhando um papel fundamental na homeostase de lipídeos (Sanjurjo et al., 2015). Essa proteína é internalizada nos hepatócitos e adipócitos, por meio do receptor CD36 e promove o aumento da lipólise. Devido ao amplo espectro de processos biológicos que esse constituinte participa, já tem sido proposto investigações direcionadas a confirmarem essa proteína como um biomarcador de danos hepáticos e doenças inflamatórias (Kim et al., 2008; Sanjurjo et al., 2015).

Com a evolução da esquistossomose no modelo murino de 5 para 7 semanas, CD5L demonstrou aumento dos níveis de expressão no soro. Contudo, abordagens investigativas direcionadas a avaliação do perfil lipídico no soro de indivíduos infectados devem ser empregadas, no intuito de contribuir para o entendimento destas alterações observadas no proteoma plasmático.

5.9. Métodos empregados para maior exploração do soroproteoma

A utilização do solvente orgânico Acetonitrila na concentração de 60%, adicionado à amostras de soro, demonstrou, por meio da eletroforese, o enriquecimento de bandas de baixa massa molecular, permitindo acesso as proteínas de baixa abundância. Essas observações vão ao encontro dos resultados descritos na literatura, referentes à diminuição das variação dinâmica de concentrações de proteínas, nas amostras de plasma/soro, com o uso de Acetonitrila (Kay et al., 2008; Prates et al., 2018).

Segundo Guerrier *et al.*, (2008), bibliotecas de hexapeptídeos combinatoriais têm emergido como uma poderosa ferramenta no tratamento de amostras complexas. De fato, o emprego do *kit ProteoMiner*TM nas amostras de soro, garantiu um perfil eletroforético unidimensional composto por representantes de proteínas de baixa, média e alta massa molecular nas amostras investigadas. Esses resultados também foram observados por De Jesus *et al.*, (2017), apresentando um perfil unidimensional muito similar ao obtidos neste estudo.

Coletivamente, os métodos destinados a uma exploração mais detalhada do soroproteoma, permitiram também avaliar alterações no soro de animais infectados. Essas observações consolidam a estratégia de utilizar amostras depletadas e submetidas ao *kit*, na investigação proteômica baseada em espectrometria de massas, no intuito de contribuir com o aumento do repertório de moléculas identificadas, relacionadas à infecção (Boschetti *et al.*, 2018; Pisanu *et al.*, 2018), ou identificar proteínas secretadas por *Schistosoma mansoni*. Apesar da identificação de moléculas de baixa abundância representar um desafio, elas podem ter de uma importância biológica relevante para o diagnóstico da esquistossomose (Boschetti *et al.*, 2018).

6. Conclusões

- A esquistossomose experimental no modelo murino induz alterações plasmáticas detectáveis por proteômica clássica (eletroforese) e baseada em espectrometria de massas (análise *shotgun*);
- Dentre as proteínas diferencialmente expressas estão constituintes de alta abundância relacionados com resposta inflamatória, transporte e metabolismo de ferro e lipídeos e proteínas ligadas à manutenção da hemostasia;
- Os dois métodos de depleção sérica empregados nesse estudo apresentam potencial para a detecção de constituintes de menor abundância presentes em decorrência da infecção e, portanto, podem ser úteis para identificação de biomarcadores para prognóstico e diagnóstico da esquistossomose.

7. Referências

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Elsevier Brasil, 2015.
- ADACHI, T. *et al.* Iron stimulates plasma-activated medium-induced A549 cell injury. **Scientific reports**, v. 6, p. 20928, 2016.
- ANDERSON, N. L.; ANDERSON, N. G. The human plasma proteome history, character, and diagnostic prospects. **Molecular & cellular proteomics**, v. 1, n. 11, p. 845-867, 2002. ISSN 1535-9476.
- ATTIA, Yasmeeen M. *et al.* Telmisartan, an AT1 receptor blocker and a PPAR gamma activator, alleviates liver fibrosis induced experimentally by *Schistosoma mansoni* infection. **Parasites & vectors**, v. 6, n. 1, p. 199, 2013.
- BANSAL, N. *et al.* Low-and high-grade bladder cancer appraisal via serum-based proteomics approach. **Clinica chimica acta**, v. 436, p. 97-103, 2014.
- BEREMAN, M. S.; EGERTSON, J. D.; MACCOSS, M. J. Comparison between procedures using SDS for shotgun proteomic analyses of complex samples. **Proteomics**, v. 11, n. 14, p. 2931-2935, 2011.
- BERNSTEIN, Kenneth E. *et al.* Angiotensin-converting enzyme in innate and adaptive immunity. **Nature Reviews Nephrology**, v. 14, n. 5, p. 325, 2018.
- BERRIMAN, M. *et al.* The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. **Nature**, v. 460, n. 7253, p. 352, 2009.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, n. 2, p. 93-99, 1987.
- BOCANEGRA, C. *et al.* Epidemiology of schistosomiasis and usefulness of indirect diagnostic tests in school-age children in Cubal, Central Angola. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 10, p. e0004055, 2015.
- BOISSIER, J. *et al.* Outbreak of urogenital schistosomiasis in Corsica (France): an epidemiological case study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 8, p. 971-979, 2016.
- BOSCHETTI, E. *et al.* Protein biomarkers for early detection of diseases: The decisive contribution of combinatorial peptide ligand libraries. **Journal of proteomics**, v. 188, p. 1-14, 2018.

BRASCHI, Simon; WILSON, R. Alan. Proteins exposed at the adult schistosome surface revealed by biotinylation. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 5, n. 2, p. 347-356, 2006.

BRUNELLE, J. L.; GREEN, R. One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE). In: (Ed.). **Methods in enzymology**: Elsevier, v.541, 2014. p.151-159.

BUSTINDUY, A. L. *et al.* Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of praziquantel in Ugandan children with intestinal schistosomiasis: higher dosages are required for maximal efficacy. **MBio**, v. 7, n. 4, p. e00227-16, 2016.

CAMPOS, J. M. *et al.* Understanding global changes of the liver proteome during murine schistosomiasis using a label-free shotgun approach. **Journal of proteomics**, v. 151, p. 193-203, 2017.

CANDIDO, R. R. *et al.* Eggs and Magnetism: New Approaches for Schistosomiasis Diagnosis. **Trends in parasitology**, 2018.

CARCANGIU, L. *et al.* All Cats are Gray in the Dark: Enrichment/Depletion Approaches for Biomarker Discovery on *Felis catus* Plasma. **Proteomics**, v. 18, n. 20, p. 1800191, 2018.

CARVALHO, O. D. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. **Schistosoma mansoni & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. SciELO-Editora FIOCRUZ, 2008.

CHUAH, C. *et al.* Characterising granuloma regression and liver recovery in a murine model of schistosomiasis japonica. **International journal for parasitology**, v. 46, n. 4, p. 239-252, 2016.

COSTAIN, A. H.; MACDONALD, A. S.; SMITS, H. H. Schistosome egg migration: mechanisms, pathogenesis and host immune responses. **Frontiers in immunology**, v. 9, 2018.

COTTRELL, J. S. Protein identification using MS/MS data. **Journal of proteomics**, v. 74, n. 10, p. 1842-1851, 2011.

COURA, J.; AMARAL, R. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in brazilian endemic areas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 13-19, 2004.

COSENZA-CONTRERAS, Miguel *et al.* The Schistosomiasis SpleenOME: Unveiling the Proteomic Landscape of Splenomegaly Using Label-Free Mass Spectrometry. **Frontiers in immunology**, v. 9, 2018.

CURWEN, R. S. *et al.* The *Schistosoma mansoni* soluble proteome: a comparison across four life-cycle stages. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 138, n. 1, p. 57-66, 2004.

CURWEN, R. S. *et al.* Identification of novel proteases and immunomodulators in the secretions of schistosome cercariae that facilitate host entry. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 5, n. 5, p. 835-844, 2006.

DA'DARA, A. A.; DE LAFORCADE, A. M.; SKELLY, P. J. The impact of schistosomes and schistosomiasis on murine blood coagulation and fibrinolysis as determined by thromboelastography (TEG). **Journal of thrombosis and thrombolysis**, v. 41, n. 4, p. 671-677, 2016.

DA'DARA, A. A. *et al.* How schistosomes alter the human serum proteome. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 215, p. 40-46, 2017.

DE JESUS, J. R. *et al.* Depleting high-abundant and enriching low-abundant proteins in human serum: an evaluation of sample preparation methods using magnetic nanoparticle, chemical depletion and immunoaffinity techniques. **Talanta**, v. 170, p. 199-209, 2017.

DINGUIRARD, N. *et al.* Proteomic Analysis of *Biomphalaria glabrata* Hemocytes During in vitro Encapsulation of *Schistosoma mansoni* Sporocysts. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 2018.

ELZOHEIRY, M. *et al.* The Essential Ectoenzyme SmNPP5 from the Human Intravascular Parasite *Schistosoma mansoni* is an ADPase and a Potent Inhibitor of Platelet Aggregation. **Thrombosis and haemostasis**, 2018.

FAMAKINDE, D. O. Molecular context of *Schistosoma mansoni* transmission in the molluscan environments: A mini-review. **Acta tropica**, v. 176, p. 98-104, 2017.

FEIST, P.; HUMMON, A. Proteomic challenges: sample preparation techniques for microgram-quantity protein analysis from biological samples. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 2, p. 3537-3563, 2015.

- FRANCO, G. R. *et al.* Identification of new *Schistosoma mansoni* genes by the EST strategy using a directional cDNA library. **Gene**, v. 152, n. 2, p. 141-147, 1995.
- FRANCO, G. R.; SIMPSON, A. J.; PENA, S. D. Sequencing and identification of expressed *Schistosoma mansoni* genes by random selection of cDNA clones from a directional library. **MEMORIAS-INSTITUTO OSWALDO CRUZ**, v. 90, p. 215-216, 1995.
- FRIEDMAN, J. F. *et al.* Praziquantel for the treatment of schistosomiasis during human pregnancy. **World Health Organization. Bulletin of the World Health Organization**, v. 96, n. 1, p. 59-65, 2018.
- GEYER, P. E. *et al.* Revisiting biomarker discovery by plasma proteomics. **Molecular Systems Biology**, Hoboken, v. 13, n. 9, p. 942, 2017.
- GEYER, P. E. *et al.* Plasma proteome profiling to assess human health and disease. **Cell systems**, v. 2, n. 3, p. 185-195, 2016.
- GILLETTE, M. A.; CARR, S. A. Quantitative analysis of peptides and proteins in biomedicine by targeted mass spectrometry. **Nature methods**, v. 10, n. 1, p. 28, 013.
- GÖRG, A. 2-D electrophoresis: principles and methods. **GE Healthcare**, p. 25-29, 2004.
- GUERRIER, L.; RIGHETTI, P. G.; BOSCHETTI, E. Reduction of dynamic protein concentration range of biological extracts for the discovery of low-abundance proteins by means of hexapeptide ligand library. **Nature protocols**, v. 3, n. 5, p. 883, 2008.
- HAAS, W.; HAEBERLEIN, S. Penetration of cercariae into the living human skin: *Schistosoma mansoni* vs. *Trichobilharzia szidati*. **Parasitology research**, v. 105, n. 4, p. 1061-1066, 2009.
- HELLMAN, Nathan E.; GITLIN, Jonathan D. Ceruloplasmin metabolism and function. **Annual review of nutrition**, v. 22, n. 1, p. 439-458, 2002.
- HINZ, R. *et al.* Serological approaches for the diagnosis of schistosomiasis – A review. **Molecular and Cellular Probes**, v. 31, p. 2-21, 2017/02/01/ 2017.
- HIRAI, H.; HIRAI, Y.; LOVERDE, P. T. Evolution of sex chromosomes ZW of *Schistosoma mansoni* inferred from chromosome paint and BAC mapping analyses. **Parasitology international**, v. 61, n. 4, p. 684-689, 2012. ISSN 1383-5769.

- HUYSE, T. *et al.* Evolutionary epidemiology of schistosomiasis: linking parasite genetics with disease phenotype in humans. **International journal for parasitology**, 2017.
- JEREMIAS, W. D. J. *et al.* Comparative sequence analysis reveals regulation of genes in developing schistosomula of *Schistosoma mansoni* exposed to host portal serum. **PloS one**, v. 12, n. 6, p. e0178829, 2017.
- KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 1, p. 27-30, 2000.
- KATZ, N. **Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geohelmintos**: Centro de Pesquisa René Rachou. 2018.
- KAY, R. *et al.* Enrichment of low molecular weight serum proteins using acetonitrile precipitation for mass spectrometry based proteomic analysis. **Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry**, v. 22, n. 20, p. 3255-3260, 2008.
- KIM, Won Kon *et al.* Glycoproteomic analysis of plasma from patients with atopic dermatitis: CD5L and ApoE as potential biomarkers. *Experimental & molecular medicine*, v. 40, n. 6, p. 677, 2008.
- KNUDSEN, G. M. *et al.* Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* cercarial secretions. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 4, n. 12, p. 1862-1875, 2005.
- KUROKAWA, J. *et al.* Macrophage-derived AIM is endocytosed into adipocytes and decreases lipid droplets via inhibition of fatty acid synthase activity. **Cell metabolism**, v. 11, n. 6, p. 479-492, 2010.
- LACY, P. Mechanisms of degranulation in neutrophils. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, v. 2, n. 3, p. 98, 2006.
- LEAF, D. E.; SWINKELS, D. W. Catalytic iron and acute kidney injury. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 311, n. 5, p. F871-F876, 2016.
- LEITE, L. A. C. *et al.* Hemostatic dysfunction is increased in patients with hepatosplenic schistosomiasis mansoni and advanced periportal fibrosis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 7, p. e2314, 2013.

LENZO, Jason C. *et al.* Control of macrophage lineage populations by CSF-1 receptor and GM-CSF in homeostasis and inflammation. *Immunology and cell biology*, v. 90, n. 4, p. 429-440, 2012.

LI, S. *et al.* Digging More Missing Proteins Using an Enrichment Approach with ProteoMiner. **Journal of proteome research**, v. 16, n. 12, p. 4330-4339, 2017.

LI, X.-H. *et al.* Microexon gene transcriptional profiles and evolution provide insights into blood processing by the *Schistosoma japonicum* esophagus. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 2, p. e0006235, 2018.

LIN, L. *et al.* High throughput and accurate serum proteome profiling by integrated sample preparation technology and single-run data independent mass spectrometry analysis. **Journal of proteomics**, 2017.

LINDHOLZ, C. G. *et al.* Study of diagnostic accuracy of Helmintex, Kato-Katz, and POC-CCA methods for diagnosing intestinal schistosomiasis in Candéal, a low intensity transmission area in northeastern Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 3, p. e0006274, 2018.

LIU, M. *et al.* Proteomic analysis on cercariae and schistosomula in reference to potential proteases involved in host invasion of *Schistosoma japonicum* larvae. **Journal of proteome research**, v. 14, n. 11, p. 4623-4634, 2015.

LOPES, T. A. *et al.* Distribution and identification of the genus *Biomphalaria* Preston (1910): important insights into the epidemiology of Schistosomiasis in the Amazon region. *Revista da Biologia*, v. 17, n. 2, p. 31-37, 2017.

LOVERDE, P. T. *et al.* *Schistosoma mansoni* genome project: an update. **Parasitology International**, v. 53, n. 2, p. 183-192, 2004.

MANIVANNAN, B. *et al.* Proteomic changes at 8 weeks after infection are associated with chronic liver pathology in experimental schistosomiasis. **Journal of proteomics**, v. 75, n. 6, p. 1838-1848, 2012.

MCPHERSON, R. A.; PINCUS, M. B. **Diagnósticos Clínicos e Tratamentos por Métodos Laboratoriais de Henry**: Editora Manole. 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigilância da esquistossomose mansoni: diretrizes técnicas**: Ministério da Saúde. Brasília 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de vigilância em saúde**: Ministério da Saúde. Brasília. 2017.

MOREIRA, L. Ciências genômicas: fundamentos e aplicações. **Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética**, 2015.

MOTTA, V. T. Bioquímica clínica: princípios e interpretações. **Editora: Médica Massau**, v. 9, 2000.

NEUHOFF, V. *et al.* Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v. 9, n. 6, p. 255-262, 1988.

NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 11. Atheneu, 2002.

NEVES, L. X. Proteômica quantitativa baseada em espectrometria de massas para estudo do trato alimentar de *Schistosoma mansoni* com ênfase na glândula esofagiana e suas secreções. **Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFOP, Ouro Preto**, 2018.

OGONGO, P.; KARIUKI, T. M.; WILSON, R. A. Diagnosis of schistosomiasis mansoni: an evaluation of existing methods and research towards single worm pair detection. **Parasitology**, p. 1-12, 2018.

OLIVEIRA, C. N. F. D. *et al.* Tegument of *Schistosoma mansoni* as a therapeutic target. In: (Ed.). **Parasitic Diseases-Schistosomiasis**: InTech, 2013.

PAIZIS, Georgina *et al.* Up-regulation of components of the renin-angiotensin system in the bile duct-ligated rat liver. **Gastroenterology**, v. 123, n. 5, p. 1667-1676, 2002.

PARREIRA, Natália Alle *et al.* The comparative efficacy of renin-angiotensin system blockers in schistosomal hepatic fibrosis. **Experimental parasitology**, v. 191, p. 9-18, 2018.

- PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 7, p. 499, 2002.
- PISANU, S. *et al.* Comparative evaluation of seven commercial products for human serum enrichment/depletion by shotgun proteomics. **Talanta**, v. 185, p. 213-220, 2018.
- PRATES, J. *et al.* Modulating the protein content of complex proteomes using acetonitrile. **Talanta**, v. 182, p. 333-339, 2018.
- PROTASIO, A. V. *et al.* A systematically improved high quality genome and transcriptome of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 1, p. e1455, 2012.
- RABILLOUD, T.; LELONG, C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial. **Journal of proteomics**, v. 74, n. 10, p. 1829-1841, 2011.
- ROLLEMBERG, C. V. V. *et al.* Aspectos epidemiológicos e distribuição geográfica da esquistossomose e geo-helmintos, no Estado de Sergipe, de acordo com os dados do Programa de Controle da Esquistossomose. 2011. ISSN 0037-8682.
- SANJURJO, L. *et al.* AIM/CD5L: a key protein in the control of immune homeostasis and inflammatory disease. **Journal of leukocyte biology**, v. 98, n. 2, p. 173-184, 2015.
- SARVARI, Jamal *et al.* Differentially expressed proteins in chronic active hepatitis, cirrhosis, and HCC related to HCV infection in comparison with HBV infection: a proteomics study. *Hepatitis monthly*, v. 13, n. 7, 2013.
- SCHWARTZ, C.; FALLON, P. G. *Schistosoma* “Eggs-Itting” the Host: Granuloma Formation and Egg Excretion. **Frontiers in immunology**, v. 9, 2018.
- SHUJA, A. *et al.* Intestinal Schistosomiasis: A Rare Cause of Abdominal Pain and Weight loss. **Cureus**, v. 10, n. 1, 2018.
- SIMPSON, A. J.; SHER, A.; MCCUTCHAN, T. F. The genome of *Schistosoma mansoni*: isolation of DNA, its size, bases and repetitive sequences. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 6, n. 2, p. 125-137, 1982.
- SKELLY, P. J. *et al.* Schistosome feeding and regurgitation. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 8, p. e1004246, 2014.

SKELLY, P. J.; WILSON, R. A. Making sense of the schistosome surface. **Advances in parasitology**, v. 63, p. 185-284, 2006.

SMITH, P. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*, v. 150, n. 1, p. 76-85, 1985.

SOTILLO, J. *et al.* A quantitative proteomic analysis of the tegumental proteins from *Schistosoma mansoni* schistosomula reveals novel potential therapeutic targets. **International journal for parasitology**, v. 45, n. 8, p. 505-516, 2015.

STEINAUER, M. L. The sex lives of parasites: investigating the mating system and mechanisms of sexual selection of the human pathogen *Schistosoma mansoni*. **International journal for parasitology**, v. 39, n. 10, p. 1157-1163, 2009.

SZKLARCZYK, D. *et al.* STRING v10: protein–protein interaction networks, integrated over the tree of life. **Nucleic acids research**, v. 43, n. D1, p. D447-D452, 2014.

TANAKA, M. *et al.* Yeast artificial chromosome (YAC)-based genome mapping of *Schistosoma mansoni*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 69, n. 1, p. 41-51, 1995.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: the universal protein knowledgebase. **Nucleic acids research**, v. 45, n. D1, p. D158-D169, 2016.

VERJOVSKI-ALMEIDA, S. *et al.* Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. **Nature genetics**, v. 35, n. 2, p. 148, 2003.

VITORINO, R. R. *et al.* Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle. **Rev Bras Clin Med**, v. 1, n. 10, p. 39-45, 2012.

WANG, Q.; DA'DARA, A. A.; SKELLY, P. J. The human blood parasite *Schistosoma mansoni* expresses extracellular tegumental calpains that cleave the blood clotting protein fibronectin. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 12912, 2017.

WANG, T. *et al.* Proteomic analysis of the *Schistosoma mansoni* miracidium. **PloS one**, v. 11, n. 1, p. e0147247, 2016.

WEERAKOON, K. G. *et al.* Advances in the diagnosis of human schistosomiasis. **Clinical microbiology reviews**, v. 28, n. 4, p. 939-967, 2015.

WILSON, R. A. **Introdução à parasitologia**. EPU/Ed. da Universidade de Sao Paulo, 1980.

WILSON, R. A. *et al.* The Schistosome esophagus is a ‘hotspot’ for microexon and lysosomal hydrolase gene expression: implications for blood processing. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 12, p. e0004272, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Weekly Epidemiological Record, 23 September 2016, vol. 91, 39 (pp. 441–460). 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Crossing the billion: lymphatic filariasis, onchocerciasis, schistosomiasis, soil-transmitted helminthiases and trachoma: preventive chemotherapy for neglected tropical diseases. 2017.

WU, X.-J. *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. e1006081, 2017.

ZERLOTINI, A.; OLIVEIRA, G. The contributions of the Genome Project to the study of schistosomiasis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 4, p. 367-369, 2010.

ZHANG, Y. *et al.* Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. **Chemical reviews**, v. 113, n. 4, p. 2343-2394, 2013.

8. Anexos

Tabela Suplementar 1. Proteínas identificadas na análise composicional.

Número de acesso	Descrição	Cobertura (%)	Peptídeos únicos	Massa molecular (Da)	Área controle	Área infectado (5 semanas)	Área infectado (7 semanas)
P62259	14-3-3 protein ϵ	4	1	29174	5,74E+05		
P46471	26S proteasome regulatory subunit 7	3	1	48648			2,38E+07
O35176	ABPA2	45	3	10288	1,55E+07	6,92E+06	
P63260	Actin cytoplasmic 2	34	10	41793	2,22E+07	8,83E+06	8,36E+07
Q91WF3	Adenylate cyclase type 4	1	1	120380	6,40E+07		
F8WIC0	Adenylate kinase 7	1	1	82538		7,56E+06	3,56E+06
Q60994	Adiponectin	13	3	26809	2,56E+07	1,28E+07	9,96E+06
O89020	Afamin	41	21	69379	3,38E+08	2,12E+08	1,54E+08
B1AXD8	Akirin-2	7	1	22113	2,18E+07		
Q60590	α -1-acid glycoprotein 1	28	7	23895	1,99E+07	2,49E+07	1,96E+08
P07361	α -1-acid glycoprotein 2	8	1	23843			1,26E+07
P22599	α -1-antitrypsin 1-2	52	6	45975	1,68E+09	1,25E+09	1,62E+09
Q00897	α -1-antitrypsin 1-4	51	3	45998	1,01E+07	2,16E+07	5,23E+08
Q19LI2	α -1B-glycoprotein	12	6	56554	4,22E+07	1,55E+06	
Q61247	α -2-antiplasmin	32	17	54972	2,03E+08	2,25E+08	2,59E+08
P29699	α -2-HS-glycoprotein	53	16	37326	3,94E+09	2,51E+09	1,09E+10
P00687	α -amylase 1	6	2	57644			2,41E+06
Q924C5	α -protein kinase 3	1	1	180198	2,28E+08	2,72E+08	5,21E+08
Q01339	β -2-glycoprotein 1	51	17	38619	5,03E+08	4,25E+08	6,81E+08
P01887	β -2-microglobulin	21	3	13779	2,73E+07	2,30E+07	9,28E+06
G5E872	Aminopeptidase RNPEPL1	1	1	79535			2,16E+07
P11859	Angiotensinogen	14	6	51990	4,13E+06	8,39E+05	1,52E+07
Q8VHS6	Ankyrin repeat and SCS box protein 15	1	1	65512	1,60E+06		3,75E+06
B0V2N8	Annexin (Fragment)	6	1	19596	1,82E+06		
P32261	Antithrombin-III	45	22	52004	6,20E+08	6,23E+08	2,95E+08
Q00623	Apolipoprotein A-I	77	28	30616	7,98E+09	5,32E+09	1,40E+10
P09813	Apolipoprotein A-II	15	2	11309	8,39E+08	7,19E+08	4,42E+08
P06728	Apolipoprotein A-IV	84	36	45029	1,01E+09	5,91E+08	4,18E+09

E9Q1Y3	Apolipoprotein B-100 (Fragment)	11	41	503910	5,91E+06	7,12E+06	1,59E+08
P34928	Apolipoprotein C-I	28	3	9696	3,72E+07	4,93E+06	4,63E+07
Q05020	Apolipoprotein C-II	33	3	10741	8,52E+06		1,98E+07
P33622	Apolipoprotein C-III	46	3	10982	2,43E+08	8,98E+07	5,82E+08
Q61268	Apolipoprotein C-IV	16	2	14288	1,26E+07	1,78E+06	2,48E+07
P51910	Apolipoprotein D	31	5	21530	3,23E+07	1,70E+07	1,09E+08
P08226	Apolipoprotein E	42	15	35867	1,80E+08	1,70E+08	2,16E+08
Q9Z1R3	Apolipoprotein M	24	5	21273	3,33E+06	6,70E+06	1,43E+07
G3X9D6	Apolipoprotein N	6	2	27965	1,95E+07	2,44E+07	4,59E+07
P08607	C4b-binding protein	22	7	51524	1,02E+07	1,10E+07	6,86E+07
G3X8Q1	Calcineurin binding protein 1 isoform CRA_a	0	1	243169	2,54E+07		3,37E+07
P00920	Carbonic anhydrase 2	7	2	29033	1,03E+06		
P23953	Carboxylesterase 1C	27	8	61056	2,05E+09	1,66E+09	2,47E+09
D3Z5G7	Carboxylic ester hydrolase	19	5	62197	7,12E+08	6,18E+08	6,48E+08
Q9JHH6	Carboxypeptidase B2	5	3	48871	1,70E+06		8,52E+06
Q9JJN5	Carboxypeptidase N catalytic chain	22	9	51845	1,66E+07	1,21E+07	1,35E+07
Q9DBB9	Carboxypeptidase N subunit 2	27	13	60479	6,80E+07	6,59E+07	1,51E+08
Q9WVJ3	Carboxypeptidase Q	2	1	51813		2,85E+05	
D3Z7H8	Cartilage intermediate layer protein 2	1	1	125934	1,72E+06		
P10605	Cathepsin B	4	1	37280			2,98E+06
D3Z6T3	Cathepsin E	5	2	39247			2,44E+06
Q9QWK4	CD5 antigen-like	42	14	38863	1,96E+07	5,37E+07	2,72E+08
A2AM05	Centlein	1	1	160746	4,55E+06	1,46E+06	2,55E+05
G3X9T8	Ceruloplasmin	49	1	121080	5,14E+06	1,04E+07	3,68E+07
Q9EQI5	Chemokine ligand 7 isoform CRA_b	10	1	12252	3,37E+06	2,61E+06	
F6XLV1	Ciliary rootlet coiled-coil rootletin	1	1	186630	3,39E+06		
B7ZMV8	Clathrin heavy chain linker domain-containing protein 1	2	1	68106			9,81E+06
Q06890	Clusterin	40	18	51656	1,07E+08	1,00E+08	2,27E+08
O88783	Coagulation factor V	1	1	247228	1,32E+05		
O88947	Coagulation factor X	18	8	54018	1,58E+07	1,57E+07	3,05E+07

Q80YC5	Coagulation factor XII	9	3	65701	1,74E+06	6,15E+05	1,32E+06
Q07968	Coagulation factor XIII B chain	5	3	76195	3,77E+06	1,60E+06	
Q6PHN1	Coiled-coil domain-containing protein 57	1	1	116194	6,50E+07	3,36E+07	
Q02788	Collagen α -2(VI) chain	1	1	110334			6,08E+06
P14106	Complement C1q subcomponent subunit B	15	3	26717	4,76E+06	1,16E+06	1,49E+07
Q02105	Complement C1q subcomponent subunit C	4	1	25992	1,82E+06		
Q8CG16	Complement C1r-A subcomponent	1	1	80073	5,80E+05		
P01027	Complement C3	70	110	186483	3,96E+09	2,48E+09	1,43E+10
P01029	Complement C4-B	20	30	192914	4,55E+07	4,79E+07	3,87E+07
P06684	Complement C5	21	31	188877	3,40E+07	3,33E+07	1,15E+08
E9Q6C2	Complement component 1	3	2	77500	3,02E+06	1,33E+06	
Q91X70	Complement component 6	3	2	86631			6,34E+06
D3YXF5	Complement component 7	6	4	93338			7,28E+06
Q9DAC2	Complement component 8 γ subunit isoform	42	5	18946	3,03E+06	3,48E+07	1,94E+08
A2A998	Complement component C8 α chain	9	4	61008	4,98E+06	1,38E+06	1,94E+06
Q8BH35	Complement component C8 α chain	4	2	66229	1,46E+06	5,64E+06	3,81E+06
P06683	Complement component C9	10	6	62002	1,07E+06	8,23E+06	1,06E+07
P03953	Complement factor D	14	3	28057	3,89E+07	9,21E+06	3,82E+07
P06909	Complement factor H	57	42	139137	3,85E+08	4,58E+08	1,95E+09
Q61129	Complement factor I	33	19	67261	5,67E+07	7,52E+07	1,67E+08
Q62267	Cornifin-B	5	1	16636	4,30E+06		
Q06770	Corticosteroid-binding globulin	28	11	44769	3,89E+08	3,22E+08	6,40E+07
P14847	C-reactive protein	10	2	25360	1,52E+06	5,33E+05	5,17E+06
Q3LR78	CtBP-interacting BTB zinc finger protein	1	1	134160			1,07E+07
Q80U19	Disheveled-associated activator morphogenesis 2	1	1	128370	1,74E+07	1,86E+07	3,01E+06
J3KML0	Doublecortin domain-containing 2b	6	1	31346			2,32E+06
Q91XQ0	Dynein heavy chain 8 axonemal	0	1	541244		2,51E+07	

Q8VDF2	E3 ubiquitin-protein ligase UHRF1	1	1	88304			2,33E+07
Q61772	Ephrin type-A receptor 7	1	1	111860			4,77E+06
Q01279	Epidermal growth factor receptor	5	5	134853		4,47E+05	1,24E+07
E9Q1M5	Exostosin-2	4	1	45927	1,71E+07		
A2AS37	Expressed sequence AI182371	6	2	40432	1,96E+05	1,43E+06	4,11E+06
F8WI14	Extracellular matrix protein 1	8	4	62718	6,05E+06		5,23E+06
Q05816	Fatty acid-binding protein epidermal	7	1	15137	9,61E+05		
E9Q9C6	Fc fragment of IgG-binding protein	1	2	275239	2,06E+07	3,38E+07	3,89E+07
Q9QXC1	Fetuin-B	44	11	42713	7,08E+07	5,53E+07	3,67E+08
E9PV24	Fibrinogen α chain	44	36	87429	2,49E+09	2,50E+09	8,48E+09
Q8K0E8	Fibrinogen β chain	77	35	54753	2,57E+09	2,47E+09	8,98E+09
Q3UER8	Fibrinogen γ chain	72	32	50349	2,22E+09	2,15E+09	7,35E+09
B7ZNJ1	Fibronectin	46	66	239720	2,16E+08	2,71E+08	2,05E+09
Q08879	Fibulin-1	1	1	78033			1,45E+06
O70165	Ficolin-1	5	2	36298	3,33E+05	8,67E+05	3,32E+06
P13020	Gelsolin	42	28	85942	6,79E+08	4,96E+08	3,86E+08
P46412	Glutathione peroxidase 3	41	9	25424	1,00E+08	6,17E+07	2,89E+07
P01898	H-2 class I histocompatibility alpha chain	26	6	37251	1,91E+07	3,12E+07	3,05E+07
Q61646	Haptoglobin	50	20	38752		1,70E+08	6,47E+09
P01942	Hemoglobin subunit α	61	8	15085	1,66E+09	6,39E+08	2,95E+08
P02088	Hemoglobin subunit β -1	84	5	15840	7,68E+08	3,83E+08	1,93E+08
P02089	Hemoglobin subunit β -2	80	5	15878	2,18E+08	5,81E+07	4,51E+07
Q91X72	Hemopexin	60	28	51318	3,83E+09	7,21E+09	1,29E+10
P49182	Heparin cofactor 2	18	9	54497	2,08E+07	1,23E+07	4,69E+07
Q9R098	Hepatocyte growth factor activator	7	3	70568	3,07E+06	4,38E+06	
Q9ESB3	Histidine-rich glycoprotein	32	16	59163	1,42E+08	2,05E+08	3,36E+08
Q8HWB2	Histocompatibility 2 Q region locus 4	15	3	39618		2,25E+06	6,17E+06
P62806	Histone H4	8	1	11367	1,33E+06		
Q8BRH4	Histone-lysine N-methyltransferase 2C	0	1	540193			3,48E+07
E9Q5F9	Histone-lysine N-methyltransferase SETD2	0	1	285661	8,64E+05		

Q3V1J8	Hyaluronan-binding protein 2	2	1	57326			5,55E+05
P01878	Immunoglobulin α chain C region	44	4	36876	8,40E+06	1,89E+07	5,30E+08
P06336	Immunoglobulin ϵ chain C region	32	9	47321			6,72E+07
A0A075B5P4	Immunoglobulin γ -1 chain C region secreted form (fragment)	59	2	35752	7,92E+07	1,31E+09	3,02E+09
P01868	Immunoglobulin γ -1 chain C region secreted form	56	3	35705		3,41E+07	2,61E+08
P01863	Immunoglobulin γ -2A chain C region A allele	38	9	36389	3,44E+08	1,08E+08	4,19E+08
P01867	Immunoglobulin γ -2B chain C region	35	1	44259	5,73E+07		1,39E+08
P01741	Immunoglobulin heavy chain V region	11	1	12555		1,61E+06	2,65E+06
P01806	Immunoglobulin heavy chain V region 441	72	5	12911	1,70E+07	2,63E+07	1,51E+09
P18528	Immunoglobulin heavy chain V region 6.96	42	1	11007	3,82E+06	4,18E+07	1,58E+08
P18527	Immunoglobulin heavy chain V region 914	39	2	10661		1,99E+07	4,85E+07
P01783	Immunoglobulin heavy chain V region MOPC 21 (fragment)	16	1	15071	2,32E+06	5,30E+06	1,14E+07
P01790	Immunoglobulin heavy chain V region M511	52	4	13652	2,40E+06		4,35E+07
P01820	Immunoglobulin heavy chain V region PJ14	10	1	12447		3,05E+06	
P18524	Immunoglobulin heavy chain V region RF	27	1	12866		1,24E+06	1,08E+07
P01811	Immunoglobulin heavy chain V region UPC10	29	1	13001			2,60E+06
P01801	Immunoglobulin heavy chain V-III region J606	43	1	12810	4,88E+05	3,60E+06	2,89E+07
P01837	Immunoglobulin κ chain C region	87	8	11778	7,51E+08	3,02E+09	9,41E+09
P03976	Immunoglobulin κ chain V-II region 17S29.1	12	1	12390		3,98E+07	9,93E+08
P01631	Immunoglobulin κ chain V-II region 26-10	43	1	12273	8,23E+06		1,12E+08
P01629	Immunoglobulin κ chain V-II region 2S1.3	35	2	12221			3,30E+07

P01630	Immunoglobulin κ chain V-II region 7S34.1	21	2	12496		3,71E+05	1,19E+07
P03977	Immunoglobulin κ chain V-III region 50S10.1	46	1	12042		6,22E+06	1,08E+07
P01654	Immunoglobulin κ chain V-III region PC 2880/PC 1229	46	1	11980		1,12E+07	
P01660	Immunoglobulin κ V-III region PC 3741/TEPC 111	54	1	12099	1,01E+06	2,38E+07	3,89E+07
P01663	Immunoglobulin κ chain V-III region PC 4050	59	1	12005	3,65E+05	6,67E+06	5,18E+07
P01670	Immunoglobulin κ V-III region PC 6684	70	1	12039			1,75E+07
P01668	Immunoglobulin κ chain V-III region PC 7210	36	2	11950		2,61E+07	3,78E+07
P01645	Immunoglobulin κ chain V-V region HP 93G7	63	3	11954	1,15E+07	1,95E+07	2,08E+08
P01652	Immunoglobulin κ chain V-V region J606	15	1	11810			2,36E+07
P01638	Immunoglobulin κ chain V-V region L6 (fragment)	28	2	12986	1,91E+06	3,18E+07	3,90E+07
P01642	Immunoglobulin κ chain V-V region L7 (Fragment)	29	3	12615		3,34E+07	5,63E+07
P04944	Immunoglobulin κ chain V-VI region NQ5-78.2.6	15	1	11629			1,03E+06
P01675	Immunoglobulin κ chain V-VI region XRPC 44	24	1	11627	3,53E+06	5,54E+06	7,20E+06
P01843	Immunoglobulin λ -1 chain C region	81	5	11575	5,24E+06	7,02E+06	3,48E+08
P01723	Immunoglobulin λ -1 chain V region	36	1	12222	2,47E+06		5,41E+07
P01725	Immunoglobulin λ -1 chain V region S178	21	1	11654		2,64E+06	3,46E+07
P01844	Immunoglobulin λ -2 chain C region	71	4	11255		1,35E+07	1,68E+08
P01872	Immunoglobulin μ chain C region	58	24	49972	1,59E+09	1,95E+09	1,99E+10
A0A0A6YXW6	Immunoglobulin heavy constant α (fragment)	22	1	42078	9,81E+06		
A0A075B5P5	Immunoglobulin heavy constant γ 3 (fragment)	51	11	36317	2,13E+08	2,40E+08	7,94E+08
A0A0B4J1J6	Immunoglobulin heavy variable 10-1 (fragment)	11	1	13550			1,72E+07

A0A075B5R4	Immunoglobulin heavy variable 14-1 (fragment)	26	1	12992			1,88E+07
A0A075B680	Immunoglobulin heavy variable 1-62-2	31	2	11225		7,72E+06	
A0A0B4J1M0	Immunoglobulin heavy variable 1-77	42	1	10662		3,05E+06	
A0A075B5Y4	Immunoglobulin heavy variable 1-81 (fragment)	26	1	12989			5,24E+06
A0A075B5Q3	Immunoglobulin heavy variable 2-5	20	2	12557		6,54E+06	2,00E+07
A0A075B5Q4	Immunoglobulin heavy variable 5-12 (fragment)	31	1	13075		5,23E+05	
A0A075B5Q9	Immunoglobulin heavy variable 5-15	33	1	12943		3,28E+06	3,69E+06
A0A075B5Q2	Immunoglobulin heavy variable 5-9 (fragment)	19	1	12795		1,05E+07	3,90E+06
A0A075B5T3	Immunoglobulin heavy variable 6-6 (fragment)	41	2	13293			2,85E+07
A0A075B5R3	Immunoglobulin heavy variable 7-2	20	1	13351			1,39E+07
A0A075B5R2	Immunoglobulin heavy variable 7-3 (fragment)	28	2	13457	7,93E+05	8,62E+06	2,61E+07
A0A0A6YXQ0	Immunoglobulin heavy variable 8-8 (fragment)	6	1	13185			1,72E+07
A0A075B5S9	Immunoglobulin heavy variable 9-4	31	3	10934	2,05E+06	5,32E+07	6,82E+07
A0A075B5R8	Immunoglobulin heavy variable V11-2 (fragment)	28	2	13167			4,65E+07
A0A0A6YXN4	Immunoglobulin heavy variable V1-18 (fragment)	39	2	12913		5,10E+07	3,30E+07
A0A0A6YVW3	Immunoglobulin heavy variable V1-23 (Fragment)	26	1	12933			6,46E+06
A0A075B5V6	Immunoglobulin heavy variable V1-42	51	2	10776		9,17E+06	1,78E+07
A0A075B5R9	Immunoglobulin heavy variable V14-3 (fragment)	27	1	12975	2,48E+05	3,22E+06	1,21E+07
A0A075B5T5	Immunoglobulin heavy variable V1-5	19	1	10846	9,95E+06	8,51E+07	1,13E+08
A0A075B5X6	Immunoglobulin heavy variable V1-67	11	1	10976	1,39E+06	8,57E+06	1,65E+07
A0A075B5Y1	Immunoglobulin heavy variable V1-74	29	1	12900		9,97E+05	2,78E+06
A0A075B5X4	Immunoglobulin heavy variable V8-11 (fragment)	22	1	13082		1,83E+07	3,09E+07

A0A0G2JDE1	Immunoglobulin heavy variable V8-12 (fragment)	13	1	13263		1,83E+07	6,20E+07
A0A0A6YY60	Immunoglobulin heavy variable V8-5 (fragment)	20	1	13172			4,64E+05
P01592	Immunoglobulin J chain	28	5	18014	3,92E+06	3,45E+07	5,81E+08
A0A075B5M8	Immunoglobulin κ chain variable 12-38	30	2	12428			1,24E+07
A0A140T8N3	Immunoglobulin κ chain variable 13-84 (fragment)	37	2	12617		1,69E+06	3,78E+06
A0A075B666	Immunoglobulin κ variable 13-85 (fragment)	37	1	12709		7,96E+05	
A0A075B5K7	Immunoglobulin κ chain variable 14-100	14	1	12650			1,33E+07
A0A140T8P3	Immunoglobulin κ chain variable 15-103 (fragment)	14	1	12547			1,17E+07
A0A075B6D5	Immunoglobulin κ chain variable 19-93	19	1	12735		2,25E+07	8,56E+07
A0A075B5M2	Immunoglobulin κ chain variable 4-61	31	2	10153	5,26E+06	4,73E+07	1,47E+08
A0A0B4J1J2	Immunoglobulin κ chain variable 5-43 (fragment)	23	1	12600			1,08E+07
A0A140T8P5	Immunoglobulin κ chain variable 8-24 (fragment)	35	2	13264	3,25E+06	6,50E+06	1,47E+07
A0A075B5N4	Immunoglobulin κ chain variable 8-27	60	2	10976	1,17E+06		1,11E+08
A0A140T8M3	Immunoglobulin κ chain variable 8-30 (fragment)	35	1	13335		1,03E+07	1,54E+07
A0A140T8N0	Immunoglobulin κ chain variable 9-120 (fragment)	36	3	12805			7,33E+07
A0A075B5K2	Immunoglobulin κ chain variable 9-124	40	2	10420			6,41E+07
A0A0B4J1I0	Immunoglobulin κ variable 1-110 (fragment)	43	1	13079		3,24E+06	3,94E+07
A0A140T8M0	Immunoglobulin κ variable 1-117 (fragment)	43	1	13117		2,61E+07	2,67E+08
A0A0B4J1H7	Immunoglobulin κ variable 1-135 (fragment)	46	7	13305	5,66E+06	2,46E+08	2,52E+08
A0A140T8M2	Immunoglobulin κ variable 12-44 (fragment)	41	1	12557	1,14E+06	3,62E+07	2,11E+07
A0A140T8P6	Immunoglobulin κ variable 12-46 (fragment)	41	2	12562		6,89E+06	4,51E+07

A0A075B5K0	Immunoglobulin κ variable 14-126 (fragment)	19	1	13058			4,24E+07
A0A0B4J1I1	Immunoglobulin κ variable 16-104 (fragment)	23	2	12875		4,13E+07	9,24E+07
A0A075B5J9	Immunoglobulin κ variable 17-127	14	1	12330		2,74E+07	3,34E+07
A0A075B5P1	Immunoglobulin κ variable 3-1 (fragment)	18	1	12972		5,10E+06	1,08E+07
A0A075B5N9	Immunoglobulin κ variable 3-7	36	1	10856	2,34E+06	1,46E+07	3,63E+07
A0A075B677	Immunoglobulin κ variable 4-53	23	1	10366		4,07E+06	1,69E+07
A0A0B4J1I9	Immunoglobulin κ variable 4-55 (fragment)	27	1	12736	3,19E+06	2,44E+07	3,26E+07
A0A075B5M4	Immunoglobulin κ variable 4-57-1 (fragment)	32	1	12723			2,04E+07
A0A075B5M1	Immunoglobulin κ variable 4-63	27	2	10157		1,48E+06	8,39E+07
A0A0B4J1I7	Immunoglobulin κ variable 4-68 (fragment)	17	1	12752		7,26E+06	4,81E+06
A0A0B4J1I3	Immunoglobulin κ variable 4-74 (Fragment)	37	1	12892			7,15E+06
A0A075B5L7	Immunoglobulin κ variable 4-80 (fragment)	14	1	12562			2,04E+07
A0A075B5M7	Immunoglobulin κ variable 5-39	54	2	10345			4,23E+07
A0A075B5N7	Immunoglobulin κ variable 6-13	42	2	10441	4,56E+06	2,92E+07	7,03E+07
A0A140T8P1	Immunoglobulin κ variable 6-14 (fragment)	40	2	12848			2,82E+07
A0A140T8M5	Immunoglobulin κ variable 6-15 (fragment)	45	3	12757		2,25E+07	8,18E+07
A0A140T8Q3	Immunoglobulin κ variable 6-17 (fragment)	45	1	12760		7,19E+06	1,52E+07
A0A140T8P2	Immunoglobulin κ variable 6-20 (fragment)	32	1	12640	6,41E+06		
A0A140T8N5	Immunoglobulin κ variable 6-23 (fragment)	45	1	12787		2,19E+07	1,51E+07
A0A140T8N9	Immunoglobulin κ variable 6- 32(fragment)	45	3	12656		1,70E+07	9,64E+07
A0A140T8P7	Immunoglobulin κ variable 8-21 (fragment)	32	1	13128		3,60E+06	

A0A075B5N3	Immunoglobulin κ variable 8-28	42	2	10903		2,15E+07	1,83E+06
A0A075B664	Immunoglobulin λ variable 2	14	1	12165			5,40E+06
A0A0R4J0S2	Insulin-like growth factor-binding protein	11	5	66990	2,78E+06	6,16E+06	
E9PVD2	Inter α -trypsin inhibitor heavy chain 4	31	25	104588	2,45E+08	3,32E+08	3,21E+08
Q61702	Inter- α -trypsin inhibitor heavy chain H1	24	16	101067	5,60E+07	5,39E+07	9,68E+07
Q61703	Inter- α -trypsin inhibitor heavy chain H2	29	20	105928	2,24E+08	1,50E+08	4,16E+08
Q61704	Inter- α -trypsin inhibitor heavy chain H3	24	18	99358	4,07E+07	4,56E+07	4,51E+08
Q61730	Interleukin-1 receptor accessory protein	13	6	65741	6,63E+06	1,70E+07	8,57E+06
Q8K057	Intraflagellar transport protein 80 homolog	1	1	87811		1,78E+06	
Q811J3	Iron-responsive element-binding protein 2	1	1	104920			5,85E+06
A2A513	Keratin type I cytoskeletal 10	13	5	57041	1,20E+08	1,18E+08	1,79E+08
Q61414	Keratin type I cytoskeletal 15	12	1	49138	1,49E+06		9,75E+06
Q9Z2K1	Keratin type I cytoskeletal 16	12	2	51606	3,80E+06		
Q9QWL7	Keratin type I cytoskeletal 17	40	7	48162	4,25E+07		
P19001	Keratin type I cytoskeletal 19	17	3	44542	9,52E+06		
Q9D312	Keratin type I cytoskeletal 20	5	1	49034	1,03E+07		
Q6IFX2	Keratin type I cytoskeletal 42	20	4	50133	3,52E+07	8,78E+06	1,02E+07
P04104	Keratin type II cytoskeletal 1	6	2	65606	4,96E+07	6,70E+07	1,20E+08
Q3TTY5	Keratin type II cytoskeletal 2 epidermal	8	4	70923	3,43E+07	3,34E+07	7,40E+07
Q3UV17	Keratin type II cytoskeletal 2 oral	9	1	62845	3,95E+07	4,89E+07	2,63E+07
Q922U2	Keratin type II cytoskeletal 5	20	6	61767	1,95E+07	2,05E+06	1,01E+07
P50446	Keratin type II cytoskeletal 6A	26	4	59335	4,73E+07		4,13E+06
Q6NXH9	Keratin type II cytoskeletal 73	9	1	58911	6,15E+06		
Q8BGZ7	Keratin type II cytoskeletal 75	17	1	59741			2,11E+06
Q8VED5	Keratin type II cytoskeletal 79	11	2	57552	4,96E+07	3,11E+06	3,58E+07
E9Q0F0	Keratin 78	2	2	112265	5,36E+07	4,61E+07	1,13E+08
Q6S9I0	Kininogen 2	27	6	47887	1,94E+07	4,55E+07	9,11E+07
D3YTY9	Kininogen-1	50	18	53205	1,21E+09	1,47E+09	2,10E+09
Q91XL1	Leucine-rich HEV glycoprotein	24	8	37431	7,56E+06	1,49E+07	2,30E+08

A2AC11	Leucine-rich repeat-containing protein 45 (fragment)	6	1	17867	1,14E+08	8,21E+07	8,99E+07
P42703	Leukemia inhibitory factor receptor	14	13	122574	2,54E+07	1,27E+07	3,99E+05
Q8CGK3	Lon protease homolog mitochondrial	1	1	105843	5,31E+06	3,38E+06	7,65E+05
P51885	Lumican	29	9	38265	2,50E+07	1,37E+07	7,78E+07
P17897	Lysozyme C-1	8	1	16794	1,07E+06		
P09581	Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor	5	4	109179	1,51E+06	4,90E+06	1,04E+07
E9PYI4	Maestro heat-like repeat family member 8	1	1	119511			2,08E+06
B8JI96	Major urinary protein 14 (Fragment)	23	3	17365	5,73E+06		
A0A0J9YVJ0	Maltase-glucoamylase (Fragment)	4	4	112822	6,33E+06		
P98064	Mannan-binding lectin serine protease 1	7	4	79968	1,43E+06	2,70E+06	1,13E+07
P39039	Mannose-binding protein A	13	3	25396	4,10E+06	9,50E+05	4,08E+06
P41317	Mannose-binding protein C	28	6	25957	3,89E+07	2,93E+07	7,22E+07
P11034	Mast cell protease 1	21	4	27013			1,03E+07
A0A0R4J0I1	MCG1051009	34	1	46673	2,45E+06		
A9JTY7	MCG119409	9	1	10709	6,06E+06		
Q9Z1R9	MCG124046	8	1	26135			1,01E+08
Q792Z1	MCG140784	8	1	26221	3,34E+06	7,42E+05	1,29E+07
G5E8L8	Mitogen-activated protein kinase kinase 2	1	1	69684			2,90E+07
P28665	Murinoglobulin-1	54	69	165297	3,87E+09	2,74E+09	2,50E+09
A0A140LIG1	N-acetylglucosaminyl-phosphatidylinositol biosynthetic protein (Fragment)	3	1	27766	8,30E+06		
Q8VCS0	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	10	4	57707	2,36E+06	9,01E+06	1,46E+07
A2AQB2	Nebulin	0	1	353167		7,88E+06	2,21E+07
F8VQG7	NEDD4-binding protein 2	0	1	184699			2,41E+06
E9QP46	Nesprin-2	0	1	782157	4,19E+07		
S4R255	Nitric oxide synthase	1	1	160051	1,66E+06		
Q9D3H2	Odorant-binding protein 1a	40	4	18469	9,11E+07	6,21E+07	

A2AEP0	Odorant-binding protein 1b	53	8	19394	2,43E+07	3,69E+07	
Q8VGD7	Olfactory receptor 1395	2	1	35454		8,21E+05	4,73E+06
P16301	Phosphatidylcholine-sterol acyltransferase	8	3	49747	5,45E+07	1,08E+06	9,98E+07
O70362	Phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase D	12	7	93255	1,35E+07	1,45E+07	2,15E+07
A2A5K2	Phospholipid transfer protein	9	3	49023	1,08E+06	8,59E+05	4,35E+06
P97298	Pigment epithelium-derived factor	7	3	46234	2,07E+06	9,08E+05	1,38E+06
H9H9R5	Plasma kallikrein	24	14	71383	7,10E+07	5,17E+07	3,97E+07
P97290	Plasma protease C1 inhibitor	28	11	55585	7,03E+07	1,30E+08	2,24E+08
P20918	Plasminogen	61	41	90808	1,12E+09	1,14E+09	4,72E+08
Q9Z126	Platelet factor 4	20	2	11243	3,02E+06		
Q60963	Platelet-activating factor acetylhydrolase	14	5	49258			2,57E+07
E9Q3W4	Plectin	0	1	499110	7,77E+06		
A0A0A0MQK4	Polycystic kidney disease protein 1-like 1 (Fragment)	0	1	280631			1,47E+07
O70570	Polymeric immunoglobulin receptor	6	4	84999			1,94E+07
Q5SX22	Polyubiquitin-B (Fragment)	4	1	26620			4,94E+06
B8JJN0	Predicted gene 20547	21	26	142325	1,70E+08	1,63E+08	2,43E+08
A0A087WP63	Predicted gene 42715 (Fragment)	0	1	331542			7,38E+06
A0A0G2JGT0	Predicted gene 43218 (Fragment)	17	1	12726	2,48E+06		8,17E+06
E9PUM5	Predicted gene 4788	8	3	91445	3,76E+05	8,42E+05	2,74E+06
A2AEN9	Predicted gene 5938	39	4	18508	3,75E+07	3,76E+07	
Q61838	Pregnancy zone protein	62	73	165852	1,64E+10	1,15E+10	1,82E+10
Q922K7	Probable 28S rRNA methyltransferase	1	1	86752			2,61E+06
A0A0G2JED3	Probable ATP-dependent DNA helicase HFM1 (Fragment)	2	1	46368			2,99E+07
P02816	Prolactin-inducible protein homolog	5	1	16823		1,46E+06	
A0A0G2JE50	Prominin-1	1	1	90016	3,12E+07	2,20E+07	
P11680	Properdin	14	5	50327	6,55E+05		5,33E+07
Q07456	Protein AMBP	27	8	39029	1,46E+08	8,98E+07	5,21E+08
A0A140T8Q1	Protein Igkv12-41 (Fragment)	41	2	12581			4,54E+07

F8WHT2	Protein phosphatase Slingshot homolog 1	1	1	110769			1,06E+06
B2RUP2	Protein unc-13 homolog D	1	1	123119	8,49E+06	4,53E+06	1,20E+07
Q8CI01	Protein Z vitamin K-dependent glycoprotein	3	1	26837			5,50E+05
Q8R121	Protein Z-dependent protease inhibitor	12	5	51797	1,30E+07	1,80E+07	6,21E+07
P19221	Prothrombin	43	25	70269	2,20E+08	1,98E+08	2,40E+08
Q5F226	Protocadherin Fat 2	0	1	480113	1,75E+06		1,05E+07
A0A0G2JGL8	Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30	1	1	133028		1,68E+06	
P52480	Pyruvate kinase PKM	2	1	57845			6,57E+05
Q00724	Retinol-binding protein 4	29	5	23206	3,33E+07	5,66E+06	2,64E+07
Q80YF9	Rho GTPase-activating protein 33	1	1	139801			1,24E+06
D3YY36	RIKEN cDNA 1300017J02 gene	45	23	68601	1,46E+08	1,25E+08	8,54E+07
Q9CPN9	RIKEN cDNA 2210010C04 gene	3	1	26422	4,92E+08	7,50E+08	8,96E+08
H3BL88	RIKEN cDNA 9930021J03 gene (Fragment)	0	1	213683	3,57E+05		
Q0VBL3	RNA-binding motif protein 15	1	1	105722	3,01E+07		8,37E+06
S4R1W5	RNA-binding motif protein 6	1	1	128375	1,81E+06	5,44E+06	
P27664	Rod cGMP-specific 3' 5'-cyclic phosphodiesterase	1	1	99530	1,69E+07		
K3W4M2	Ryanodine receptor 1	0	1	564903	5,21E+06	2,46E+06	5,22E+06
E9Q401	Ryanodine receptor 2	1	2	564827	3,61E+07	4,12E+07	3,41E+07
F8VQK5	SAM and SH3 domain-containing protein 1	1	1	135621			1,22E+06
Q6UGQ3	Secretoglobin family 2B member 2	35	3	12857	3,23E+07	3,11E+07	
P70274	Selenoprotein P	10	3	42706	9,64E+06	3,78E+06	5,12E+06
P07759	Serine protease inhibitor A3K	55	6	46880	4,97E+09	2,98E+09	4,98E+09
Q03734	Serine protease inhibitor A3M	30	3	47064	6,94E+06	6,16E+06	1,49E+07
Q91WP6	Serine protease inhibitor A3N	43	13	46718	1,97E+07	2,01E+07	4,11E+08
Q3V3K3	Serine/threonine-protein kinase TA	2	1	53065	1,01E+07	1,14E+06	
Q921I1	Serotransferrin	75	57	76724	2,92E+10	2,84E+10	7,71E+10
P07724	Serum albumin	89	65	68693	5,16E+11	3,72E+11	4,33E+11

P05366	Serum amyloid A-1 protein	7	1	13770			2,32E+06
P31532	Serum amyloid A-4 protein	15	2	15088	9,11E+05	4,03E+06	6,83E+06
P12246	Serum amyloid P-component	45	10	26247	1,08E+08	1,86E+08	1,29E+09
P52430	Serum paraoxonase/arylesterase 1	37	10	39565	2,14E+08	9,95E+07	1,55E+08
Q6P5D8	Structural maintenance of chromosomes domain	0	1	225646	1,13E+07		
Q9CU62	Structural maintenance of chromosomes protein 1A	1	1	143235			7,39E+05
Q9CW03	Structural maintenance of chromosomes protein 3	1	1	141555	9,92E+05		
Q8BND5	Sulfhydryl oxidase 1	25	17	82785	1,30E+07	1,54E+07	7,97E+07
Q8R570	Synaptosomal-associated protein 47	2	1	46524			5,78E+06
Q71LX4	Talin-2	0	1	253618	7,93E+06		
Q6PFC0	TBC1 domain family member 16	2	1	86407			5,41E+07
O70372	Telomerase reverse transcriptase	1	1	127978	1,25E+06	2,28E+06	1,43E+06
A0A1Y7VL44	Tetratricopeptide repeat protein 7B	1	1	96045			3,47E+06
P35419	Thyroid peroxidase	2	1	101342			2,19E+06
Q3UEL9	Thyroxine-binding globulin	4	1	48080			4,65E+06
F7CR78	Titin (Fragment)	0	1	914024	4,60E+05		
Q571C7	Transcription factor TFIIB component B	0	1	270787	7,64E+05	1,61E+06	6,25E+05
Q62351	Transferrin receptor protein 1	2	1	85731			2,00E+06
A0A1D5RLL4	Transformation/transcription domain-associated protein	0	1	437355			2,37E+06
P07309	Transthyretin	46	5	15776	1,54E+07	9,27E+06	1,73E+07
Q8BQ33	Treslin	1	1	208333	9,38E+05		
Q0KL02	Triple functional domain protein	0	1	347862			4,72E+06
Q9QZ25	Vascular non-inflammatory molecule 3	3	1	56305	9,66E+05		
P21614	Vitamin D-binding protein	67	29	53600	1,36E+09	1,25E+09	2,08E+09
P29788	Vitronectin	28	10	54849	3,49E+08	3,15E+08	1,98E+08
A2AIS0	Voltage-dependent N-type calcium channel subunit α	0	1	257070	5,96E+05		
A2A485	Zinc finger MYND-type-containing 8	1	1	120841		0,00E+00	

Q8BXX2	Zinc finger and BTB domain-containing protein 49	1	1	83091			1,44E+07
B1B1D3	Zinc finger protein 40	1	1	93595	1,46E+07	5,20E+06	5,47E+06
Q64726	Zinc-alpha-2-glycoprotein	30	8	35332	3,46E+07	2,94E+07	6,93E+07

Tabela Suplementar 2. Proteínas unicamente identificadas nas três condições.

Parte I. Proteínas Unicamente Identificadas em Amostras Controle.

Número de acesso	Descrição	Cobertura (%)	Peptídeos únicos	Massa molecular (Da)	Área controle
P62259	14-3-3 protein ϵ	4	1	29174	5,74E+05
Q91WF3	Adenylate cyclase type 4	1	1	120380	6,40E+07
B1AXD8	Akirin-2	7	1	22113	2,18E+07
B0V2N8	Annexin (Fragment)	6	1	19596	1,82E+06
P00920	Carbonic anhydrase 2	7	2	29033	1,03E+06
D3Z7H8	Cartilage intermediate layer protein 2	1	1	125934	1,72E+06
F6XLV1	Ciliary rootlet coiled-coil rootletin	1	1	186630	3,39E+06
O88783	Coagulation factor V	1	1	247228	1,32E+05
Q02105	Complement C1q subcomponent subunit C	4	1	25992	1,82E+06
Q8CG16	Complement C1r-A subcomponent	1	1	80073	5,80E+05
Q62267	Cornifin-B	5	1	16636	4,30E+06
E9Q1M5	Exostosin-2	4	1	45927	1,71E+07
Q05816	Fatty acid-binding protein epidermal	7	1	15137	9,61E+05
P62806	Histone H4	8	1	11367	1,33E+06
E9Q5F9	Histone-lysine N-methyltransferase SETD2	0	1	285661	8,64E+05
A0A0A6YXW6	Immunoglobulin heavy constant α (fragment)	22	1	42078	9,81E+06
A0A140T8P2	Immunoglobulin κ variable 6-20 (fragment)	32	1	12640	6,41E+06
Q6NXH9	Keratin type II cytoskeletal 73	9	1	58911	6,15E+06
Q9Z2K1	Keratin type I cytoskeletal 16	12	2	51606	3,80E+06
Q9QWL7	Keratin type I cytoskeletal 17	40	7	48162	4,25E+07

P19001	Keratin type I cytoskeletal 19	17	3	44542	9,52E+06
Q9D312	Keratin type I cytoskeletal 20	5	1	49034	1,03E+07
P17897	Lysozyme C-1	8	1	16794	1,07E+06
B8JI96	Major urinary protein 14 (Fragment)	23	3	17365	5,73E+06
A0A0J9YVJ0	Maltase-glucoamylase (Fragment)	4	4	112822	6,33E+06
A0A0R4J0I1	MCG1051009	34	1	46673	2,45E+06
A9JTY7	MCG119409	9	1	10709	6,06E+06
A0A140LIG1	N-acetylglucosaminyl-phosphatidylinositol biosynthetic protein (Fragment)	3	1	27766	8,30E+06
E9QP46	Nesprin-2	0	1	782157	4,19E+07
S4R255	Nitric oxide synthase	1	1	160051	1,66E+06
Q9Z126	Platelet factor 4	20	2	11243	3,02E+06
E9Q3W4	Plectin	0	1	499110	7,77E+06
H3BL88	RIKEN cDNA 9930021J03 gene (Fragment)	0	1	213683	3,57E+05
P27664	Rod cGMP-specific 3' 5'-cyclic phosphodiesterase	1	1	99530	1,69E+07
Q6P5D8	Structural maintenance of chromosomes domain	0	1	225646	1,13E+07
Q9CW03	Structural maintenance of chromosomes protein 3	1	1	141555	9,92E+05
Q71LX4	Talin-2	0	1	253618	7,93E+06
F7CR78	Titin (Fragment)	0	1	914024	4,60E+05
Q8BQ33	Treslin	1	1	208333	9,38E+05
Q9QZ25	Vascular non-inflammatory molecule 3	3	1	56305	9,66E+05
A2AIS0	Voltage-dependent N-type calcium channel subunit α	0	1	257070	5,96E+05

Parte II. Proteínas Unicamente Identificadas em Amostras Infectado (5 Semanas).

Número de acesso	Descrição	Cobertura (%)	Peptídeos únicos	Massa molecular (Da)	Área infectado (5 semanas)
Q9WVJ3	Carboxypeptidase Q	2	1	51813	2,85E+05
Q91XQ0	Dynein heavy chain 8 axonemal	0	1	541244	2,51E+07
P01820	Immunoglobulin heavy chain V region PJ14	10	1	12447	3,05E+06
A0A075B680	Immunoglobulin heavy variable 1-62-2	31	2	11225	7,72E+06

A0A0B4J1M0	Immunoglobulin heavy variable 1-77	42	1	10662	3,05E+06
A0A075B5Q4	Immunoglobulin heavy variable 5-12 (fragment)	31	1	13075	5,23E+05
P01654	Immunoglobulin κ chain V-III region PC 2880/PC 1229	46	1	11980	1,12E+07
A0A075B666	Immunoglobulin κ variable 13-85 (fragment)	37	1	12709	7,96E+05
A0A140T8P7	Immunoglobulin κ variable 8-21 (fragment)	32	1	13128	3,60E+06
Q8K057	Intraflagellar transport protein 80 homolog	1	1	87811	1,78E+06
P02816	Prolactin-inducible protein homolog	5	1	16823	1,46E+06
A0A0G2JGL8	Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30	1	1	133028	1,68E+06
A2A485	Zinc finger MYND-type-containing 8	1	1	120841	0,00E+00

Parte III. Proteínas Unicamente Identificadas em Amostras (7 Semanas).

Número de acesso	Descrição	Cobertura (%)	Peptídeos únicos	Massa molecular (Da)	Área infectado (7 semanas)
P46471	26S proteasome regulatory subunit 7	3	1	48648	2,38E+07
G5E872	Aminopeptidase RNPEPL1	1	1	79535	2,16E+07
P10605	Cathepsin B	4	1	37280	2,98E+06
D3Z6T3	Cathepsin E	5	2	39247	2,44E+06
B7ZMV8	Clathrin heavy chain linker domain-containing protein 1	2	1	68106	9,81E+06
Q02788	Collagen α -2(VI) chain	1	1	110334	6,08E+06
Q91X70	Complement component 6	3	2	86631	6,34E+06
D3YXF5	Complement component 7	6	4	93338	7,28E+06
Q3LR78	CtBP-interacting BTB zinc finger protein	1	1	134160	1,07E+07
J3KML0	Doublecortin domain-containing 2b	6	1	31346	2,32E+06
Q8VDF2	E3 ubiquitin-protein ligase UHRF1	1	1	88304	2,33E+07
Q61772	Ephrin type-A receptor 7	1	1	111860	4,77E+06
Q08879	Fibulin-1	1	1	78033	1,45E+06
Q8BRH4	Histone-lysine N-methyltransferase 2C	0	1	540193	3,48E+07
Q3V1J8	Hyaluronan-binding protein 2	2	1	57326	5,55E+05
P01811	Immunoglobulin heavy chain V region UPC10	29	1	13001	2,60E+06

A0A075B5R4	Immunoglobulin heavy variable 14-1 (fragment)	26	1	12992	1,88E+07
A0A0B4J1M0	Immunoglobulin heavy variable 1-77	42	1	10662	3,05E+06
A0A075B5Y4	Immunoglobulin heavy variable 1-81 (fragment)	26	1	12989	5,24E+06
A0A075B5T3	Immunoglobulin heavy variable 6-6 (fragment)	41	2	13293	2,85E+07
A0A075B5R3	Immunoglobulin heavy variable 7-2	20	1	13351	1,39E+07
A0A0A6YXQ0	Immunoglobulin heavy variable 8-8 (fragment)	6	1	13185	1,72E+07
A0A075B5R8	Immunoglobulin heavy variable V11-2 (fragment)	28	2	13167	4,65E+07
A0A0A6YVW3	Immunoglobulin heavy variable V1-23 (Fragment)	26	1	12933	6,46E+06
A0A0A6YY60	Immunoglobulin heavy variable V8-5 (fragment)	20	1	13172	4,64E+05
P06336	Immunoglobulin ϵ chain C region	32	9	47321	6,72E+07
A0A075B5M8	Immunoglobulin κ chain variable 12-38	30	2	12428	1,24E+07
A0A075B5K7	Immunoglobulin κ chain variable 14-100	14	1	12650	1,33E+07
A0A140T8P3	Immunoglobulin κ chain variable 15-103 (fragment)	14	1	12547	1,17E+07
A0A0B4J1J2	Immunoglobulin κ chain variable 5-43 (fragment)	23	1	12600	1,08E+07
A0A140T8N0	Immunoglobulin κ chain variable 9-120 (fragment)	36	3	12805	7,33E+07
A0A075B5K2	Immunoglobulin κ chain variable 9-124	40	2	10420	6,41E+07
P01629	Immunoglobulin κ chain V-II region 2S1.3	35	2	12221	3,30E+07
P01652	Immunoglobulin κ chain V-V region J606	15	1	11810	2,36E+07
P04944	Immunoglobulin κ chain V-VI region NQ5-78.2.6	15	1	11629	1,03E+06
A0A075B5K0	Immunoglobulin κ variable 14-126 (fragment)	19	1	13058	4,24E+07
A0A075B5M4	Immunoglobulin κ variable 4-57-1 (fragment)	32	1	12723	2,04E+07
A0A0B4J1I3	Immunoglobulin κ variable 4-74 (Fragment)	37	1	12892	7,15E+06
A0A075B5L7	Immunoglobulin κ variable 4-80 (fragment)	14	1	12562	2,04E+07
A0A075B5M7	Immunoglobulin κ variable 5-39	54	2	10345	4,23E+07
A0A140T8P1	Immunoglobulin κ variable 6-14 (fragment)	40	2	12848	2,82E+07
P01670	Immunoglobulin κ V-III region PC 6684	70	1	12039	1,75E+07
A0A075B664	Immunoglobulin λ variable 2	14	1	12165	5,40E+06
Q811J3	Iron-responsive element-binding protein 2	1	1	104920	5,85E+06
Q8BGZ7	Keratin type II cytoskeletal 75	17	1	59741	2,11E+06

E9PYI4	Maestro heat-like repeat family member 8	1	1	119511	2,08E+06
P11034	Mast cell protease 1	21	4	27013	1,03E+07
Q9Z1R9	MCG124046	8	1	26135	1,01E+08
F8VQG7	NEDD4-binding protein 2	0	1	184699	2,41E+06
Q60963	Platelet-activating factor acetylhydrolase	14	5	49258	2,57E+07
A0A0A0MQK4	Polycystic kidney disease protein 1-like 1 (Fragment)	0	1	280631	1,47E+07
O70570	Polymeric immunoglobulin receptor	6	4	84999	1,94E+07
Q5SX22	Polyubiquitin-B (Fragment)	4	1	26620	4,94E+06
A0A087WP63	Predicted gene 42715 (Fragment)	0	1	331542	7,38E+06
Q922K7	Probable 28S rRNA methyltransferase	1	1	86752	2,61E+06
A0A0G2JED3	Probable ATP-dependent DNA helicase HFM1 (Fragment)	2	1	46368	2,99E+07
A0A140T8Q1	Protein Igkv12-41 (Fragment)	41	2	12581	4,54E+07
F8WHT2	Protein phosphatase Slingshot homolog 1	1	1	110769	1,06E+06
Q8CI01	Protein Z vitamin K-dependent glycoprotein	3	1	26837	5,50E+05
P52480	Pyruvate kinase PKM	2	1	57845	6,57E+05
F8VQK5	SAM and SH3 domain-containing protein 1	1	1	135621	1,22E+06
P05366	Serum amyloid A-1 protein	7	1	13770	2,32E+06
Q9CU62	Structural maintenance of chromosomes protein 1A	1	1	143235	7,39E+05
Q8R570	Synaptosomal-associated protein 47	2	1	46524	5,78E+06
Q6PFC0	TBC1 domain family member 16	2	1	86407	5,41E+07
A0A1Y7VL44	Tetratricopeptide repeat protein 7B	1	1	96045	3,47E+06
P35419	Thyroid peroxidase	2	1	101342	2,19E+06
Q3UEL9	Thyroxine-binding globulin	4	1	48080	4,65E+06
Q62351	Transferrin receptor protein 1	2	1	85731	2,00E+06
A0A1D5RLL4	Transformation/transcription domain-associated protein	0	1	437355	2,37E+06
Q0KL02	Triple functional domain protein	0	1	347862	4,72E+06
Q8BXX2	Zinc finger and BTB domain-containing protein 49	1	1	83091	1,44E+07
P07361	α -1-acid glycoprotein 2	8	1	23843	1,26E+07

P00687 α -amylase 1 6 2 57644 2,41E+06

Tabela Suplementar 3. Globulinas reguladas positivamente identificadas em amostras infectadas.

Classe	Proteína	Massa molecular (Da)	Razão Infectado (5 Semanas)/Controle	Razão Infectado (7 Semanas)/Controle
α 1-globulina	α 1-acid glycoprotein (Q60590)	23895	1.42	4.07
	α 1-antitripsin (Q00897)	45998	2.56	15.39
α 2-globulina	α 2-HS-glycoprotein (P29699)	37326	0.83	2.51
	Ceruloplasmin (G3X9T8)	121080	1.94	2.93
	Haptoglobulin (Q61646)	38752	1	21.24
β -globulinas	Serotransferrin (Q92111)	76724	1.13	2.42
	Complement C3 (P01027)	186483	0.76	3.40
	C4b-binding protein (P08607)	51524	1.28	2.85
	Complement C7 (D3YXF5)	93338	0.44	7.85
	Complement component 8 γ subunit isoform (Q9DAC2)	18946	4.09	10.55
	Complement C9 (P06683)	62002	6.3	5.74
	Complement Factor H (D6RGQ0)	125049	1.49	2.97
	Complement Factor I (Q61129)	67261	1.15	2.76
γ -globulina	Descritas na Tabela Suplementar 1	-	-	-

Tabela Suplementar 4. Descrição das proteínas associadas às figuras 21 e 22.

Abreviatura	Nome	Abreviatura	Nome	Abreviatura	Nome	Abreviatura	Nome
A1bg	α -1B-glycoprotein	H2-Q4	Histocompatibility 2, Q region locus 4	Cd51	CD5 antigen-like	Mcpt1	Mast cell protease 1
Adipoq	Adiponectin	Hba-a1	Hemoglobin subunit α	Cfh	Complement factor H	Mup14	Major urinary protein
Agt	Angiotensinogen	Hbb-bt	Hemoglobin subunit β 1	Cfi	Complement factor I	Obp1a	Odorant-binding protein 1a
Ahsg	α -2-HS-glycoprotein	Hp	Haptoglobin	Cfp	Properdin	Obp1b	Odorant-binding protein 1b
Ambp	Protein AMBP	Hpx	Hemopexin	Cntln	Centlein	Orm1	α -1-acid glycoprotein 1
Amy1	Amylase 1	Igj	Immunoglobulin J chain	Cp	Ceruloplasmin	Pf4	Platelet factor 4
Apcs	Serum amyloid P-component	Iglc2	Immunoglobulin λ -2 chain C region	Csf1r	Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor	Pigr	Polymeric immunoglobulin receptor
Apoa	Apolipoprotein A-II	Il1rap	Interleukin 1 receptor accessory protein	Ctse	Cathepsin E	Pla2g7	Platelet-activating factor acetylhydrolase
Apoa4	Apolipoprotein A-IV	Itih3	Inter- α -trypsin inhibitor heavy chain H3	EgfrZ	Epidermal growth factor receptor	Plec	Plectin
Apob	Apolipoprotein B-100 (Fragment)	Krt16	Keratin, type I cytoskeletal 16	Fcna	Ficolin-1	Pltp	Phospholipid transfer protein
Apoc3	Apolipoprotein C-III	Krt17	Keratin, type I cytoskeletal 17	Fetub	Fetuin-B	Qsox1	Sulfhydryl oxidase 1
Apod	Apolipoprotein D	Krt19	Keratin, type I cytoskeletal 19	Fga	Fibrinogen α chain	Scgb2b2	Secretoglobin, family 2B,

C3	Complement C3	Krt42	Keratin, type I cytoskeletal 42	Fgb	Fibrinogen β chain	Serpina10	Protein Z-dependent protease inhibitor α -1-antitrypsin 1-4 Serine (or cysteine) peptidase inhibitor Corticosteroid-binding globulin
C4bp	C4b-binding protein	Krt6a	Keratin, type II cytoskeletal 6A	Fn1	Fibronectin	Serpina1d	
C7	Complement component 7	Lifr	Leukemia inhibitory factor receptor	Gm5938	Predicted gene 5938	Serpina3	
C8g	Complement component 8 γ subunit isoform	Lrg1	Leucine-rich α -2-glycoprotein	Trf	Serotransferrin	Serpina6	
C9	Complement component C9	Cd51	CD5 antigen-like				
