

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA**

**ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DA INTERAÇÃO
DA LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE
(LDL) HUMANA COM O TEGUMENTO DO
Schistosoma mansoni E IDENTIFICAÇÃO DA
PROTEÍNA LIGANTE DE LDL**

ADRIANA DA SILVA ANDRADE PEREIRA

RECIFE, 2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

**ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DA INTERAÇÃO DA
LIPOPROTEINA DE BAIXA DENSIDADE (LDL)
HUMANA COM O TEGUMENTO DO *Schistosoma mansoni*
E IDENTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA LIGANTE DE LDL**

ADRIANA DA SILVA ANDRADE PEREIRA

Prof. Dr. JOSÉ LUIZ DE LIMA FILHO
Orientador

Prof^ª. Dr^ª. MARIA ELIZABETH CAVALCANTE CHAVES
Co-Orientadora

RECIFE, 2008

Pereira, Adriana da Silva Andrade

Análise ultraestrutural da interação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) humana com o tegumento do *Schistosoma mansoni* e identificação da proteína ligante de LDL. / Adriana da Silva Andrade Pereira. – Recife: A Autora, 2008.

Iv; 66 fls. .: il.

Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) – UFPE. CCB

1. *Schistosoma* i 2. Lipoproteína 3. *Schistosoma mansoni*
4. Microscopia I.Título

595.122
616.963

CDU (2ª. Ed.)
CDD (22ª. Ed.)

UFPE
CCB – 2008 – 88

ADRIANA DA SILVA ANDRADE PEREIRA

ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DA INTERAÇÃO DA
LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE (LDL) HUMANA COM O
TEGUMENTO DO *Schistosoma mansoni* E IDENTIFICAÇÃO DA
PROTEÍNA LIGANTE DE LDL

Dissertação apresentada para
o cumprimento parcial das
exigências para obtenção do
título de Mestre em
Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de
Pernambuco

Aprovado por: _____

Data: ____/____/____

Ata da defesa de dissertação da Mestranda **Adriana da Silva Andrade Pereira**, realizada em 28 de fevereiro de 2008, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia da UFPE.

Às 14:30 horas, do dia vinte e oito de fevereiro de 2008, foi aberto, na Sala de Aulas do Mestrado em Bioquímica e Fisiologia da UFPE, o ato de defesa de dissertação da mestranda **Adriana da Silva Andrade Pereira**, aluna do Curso de Mestrado em Bioquímica e Fisiologia/CCB/UFPE. Iniciando os trabalhos o Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho fez a apresentação da aluna, de seu orientador, ele próprio, da co-orientadora Profa. Dra. Maria Elizabeth Cavalcanti Chaves, bem como da Banca Examinadora composta pelos professores doutores: José Luis de Lima Filho, na qualidade de Presidente, Ranilson de Souza Bezerra e Maria das Graças Carneiro da Cunha, ambos do Depto. de Bioquímica/UFPE e Luis Carlos Alves do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. Após as apresentações, o Prof. Dr. José de Lima Filho convidou a aluna para a apresentação de sua dissertação intitulada: "**Análise Ultraestrutural da Interação da Lipoproteína de baixa densidade (LDL) humana com o Tegumento do *Shistosoma mansoni* e identificação da proteína Ligante e LDL**", e informou que de acordo com o Regimento Interno do Curso, a candidata dispõe de até 50 (cinquenta) minutos para apresentação do trabalho e o tempo de arguição para cada examinador, juntamente com o tempo gasto pela aluna para responder às perguntas será de 30 (trinta) minutos. A aluna procedeu à explanação e comentários acerca do tema em **30 (trinta) minutos**. Após a apresentação da mestranda, o Sr. Presidente convidou a Banca Examinadora para ocupar seus lugares e passou a palavra ao primeiro examinador, Prof. Dr. Luis Carlos Alves que agradeceu o convite, fez alguns comentários e sugestões, e iniciou sua arguição. Ao final, o referido professor deu-se por satisfeito. Em seguida, o Sr. Presidente passou a palavra para a Profa. Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha, que agradeceu o convite, fez alguns comentários e sugestões, e iniciou sua arguição. Ao final, a referida professora deu-se por satisfeita. Logo após, o Sr. Presidente passou a palavra para o Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra, que agradeceu ao convite, fez alguns comentários e sugestões, iniciando sua arguição. Ao final, o referido professor deu-se por satisfeito. Em seguida o Sr. Presidente passou a palavra para a co-orientadora Profa. Dra. Maria Elizabeth Cavalcanti Chaves que agradeceu o convite, fez alguns comentários e parabenizou a aluna e passou a palavra para o Sr. Presidente que, na qualidade de orientador, fez alguns comentários a respeito do trabalho da aluna, agradecer à Banca Examinadora e parabenizar a candidata. Finalmente, a sessão foi suspensa para proceder ao julgamento pela Banca Examinadora, a qual se reuniu na Secretaria do Curso. Após alguns comentários, a Banca decidiu, por unanimidade, conceder a menção "**Aprovada com Distinção**". Nada mais havendo a tratar, lavrei a presente ata que vai assinada por mim, Secretário, e demais membros da Banca Examinadora. Recife, 28 de fevereiro de 2008.



The block contains three handwritten signatures. The top signature is in cursive and appears to be 'J. de Lima Filho'. The middle signature is 'Luis Carlos Alves' written in a stylized, bold cursive. The bottom signature is 'Maria das Graças Carneiro da Cunha' written in a cursive script.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	I
LISTA DE FIGURAS	II
RESUMO	III
ABSTRACT	IV
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 <i>Schistosoma mansoni</i>	01
1.1.1 Ciclo biológico	01
1.1.2 Vermes adultos	02
1.1.3 Tegumento do verme adulto de <i>Schistosoma mansoni</i>	04
1.1.3.1 Função do tegumento	04
1.1.3.2 Morfologia do tegumento	05
1.1.4 Esquistossomose mansônica	06
1.1.3.3 Descrição da doença	06
1.1.3.4 Ocorrência	08
1.1.3.5 Diagnóstico	09
1.1.4.3.1 Diagnóstico laboratorial	10
1.1.4.3.2 Diagnóstico por imagem	11
1.1.5 Tratamento	11
1.2 Lipoproteínas	11
1.2.1 Conceito	11
1.2.2 Composição das lipoproteínas	12
1.2.3 Metabolismo das lipoproteínas de baixa densidade (LDL)	13
1.2.4 Receptores de lipoproteínas no <i>Schistosoma</i>	14
1.3 Considerações sobre as principais técnicas usadas em material biológico	16
1.3.1 Proteômica.....	16
1.3.2 Microscopia eletrônica de varredura.....	17
1.3.4 Immunoblotting	19
2. OBJETIVOS.....	20
2.1 Geral	20
2.2 Específico.....	20
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
4. ARTIGO.....	29
4.1 Abstract	31
4.2 Introduction	32
4.3 Materials and Methods.....	35
4.3.1 Animals	35
4.3.2 Sample preparation for two-dimensional electrophoresis and scanning electron microscopy.....	35

4.3.3 Two-dimensional (2D) electrophoresis -----	35
4.3.4 Immunoblotting -----	36
4.3.5 Scanning electron microscopy-----	37
4.4 Results -----	38
4.4.1 Viability of the adult worms -----	38
4.4.2 Interaction of the LDL with the tegument of the <i>Schistosoma mansonii</i> -----	38
4.4.3 2D-electrophoresis and Immunoblotting-----	39
4.5 Discussion -----	41
4.6 Acknowledgments -----	45
4.7 References -----	46
4.8 Figure captions -----	52
4.9 Figures-----	54
5. CONCLUSÕES -----	58
6. ANEXOS -----	59
6.1 Normas para redação de artigos para a revista “Experimental Parasitology” -----	59
6.2 Aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da UFPE -----	64
6.3 Indicadores de Produção 2006-2008 -----	65

AGRADECIMENTOS

A Deus por me ajudar a trilhar esse caminho e sempre me fazer forte diante de dos desafios;

Agradeço em especial aos meus pais, *Marise Andrade e Aderaldo Andrade*, pela dedicação, companheirismo e apoio no decorrer do curso;

A minha família: meu irmão *Kleyton*, minhas avós *Ardale e Rita*, tias *Marilene e Mirian*, sobrinha *Ana Livia*, cunhada *Moane*, primos *Luis Paulo e Karina* pela confiança e total suporte;

À Professora Elizabeth Chaves, que foi minha orientadora, e a quem devo minha iniciação à ciência, por toda sua paciência, dedicação, amizade, tempo dispensado em ensinamentos preciosos, não só científicos mas também humanos, e que levarei para o resto de minha vida;

Ao meu orientador Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho, por nunca duvidar da capacidade de seus orientandos;

Aos funcionários do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, em especial: *Felipe Viegas, Sérgio e Rafael Padilha* que deram grande contribuição para a realização deste trabalho.

Aos amigos: *Humberto Bertão, Danielle Padilha, Marcela Outtes, Germana Michelle, Rosineide Albuquerque, Telma Valquíria, Simone Patrícia, Marta Rafaela* e a tantos mais que fizeram parte desta caminhada.

Aos amigos do Labenz: *Diego Buarque, Marina Marcuschi, Renata França Werlayne Mendes, Helane Costa, Talita Espósito e Thiago Cahú*.

Aos amigos da turma do mestrado em Bioquímica, especialmente: *Ian Porto, Milena Sales, Jaqueline Maciel e Valdeene Jansen*.

Aos funcionários do departamento de Bioquímica: *Miron Oliveira, Djalma Santos e Neide Fernandes*.

Agradeço ainda às minhas amigas para todas as horas: *Ana Luiza, Amanda Rafaela, Ivana Porto, Natália Lima, Patrícia Vasconcelos, Tamara De'Carli e Danielle Moura* por sempre terem sido grandes companheiras.

O sucesso deste trabalho deve-se a todos aqueles que, de alguma maneira, somaram esforços aos meus durante todo o tempo da pesquisa.

Meus sinceros agradecimentos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de vida das três espécies de <i>Schistosoma</i> -----	02
Figura 2 – Verme Adulto Macho de <i>Schistosoma mansoni</i> -----	03
Figura 3 – Verme Adulto Fêmea de <i>Schistosoma mansoni</i> -----	04
Figura 4 – Micrografia das dobraduras da região mediana dorsal do verme adulto macho do <i>Schistosoma mansoni</i> , apresentando poros no tegumento -----	05
Figura 5 – Ovo de <i>Schistosoma mansoni</i> -----	10
Figura 6 – Estrutura de uma Proteína de Baixa Densidade (LDL) -----	12
Figura 7 – Endocitose por Receptor de LDL -----	14
Figura 8 – Microscópio Eletrônico de Varredura-----	18

ARTIGO

Figure 1 – Electron micrographs of the medial dorsal region in the <i>Schistosoma mansoni</i> tegument.-----	54
Figure 2 – Ultrastructure of the anterior region and suckers of the male adult worm of <i>Schistosoma mansoni</i> incubated with LDL for 60 min.-----	54
Figure 3 – Electron micrographs of the tegument of adult worms of <i>Schistosoma mansoni</i> incubated with human LDL for 30 min. -----	55
Figure 4 – Electron micrographs of dorsal regions of <i>S. mansoni</i> worms showing the sizes of LDL particles after the incubations-----	55
Figure 5 – Scanning electron micrographs of the posterior region and gynecophoral canal of the adult male worm of <i>Schistosoma mansoni</i> .-----	56
Figure 6 – Two-dimensional (2-D) electrophoresis and Immunoblotting on PVDF sheets of insoluble fraction of <i>Schistosoma mansoni</i> . -----	56
Figure 7 – Identification of LDL binding proteins of adult worms of <i>Schistosoma mansoni</i> with SDS-PAGE and western blotting techniques-----	57

RESUMO

A esquistossomose mansônica é uma doença endêmica em várias partes das América e da África, causada pelo *Schistosoma mansoni*. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde existem entre 200 e 300 milhões de pessoas infectadas no mundo e aproximadamente 1 bilhão sob risco. O verme adulto do *Schistosoma mansoni* adquiriu uma habilidade peculiar para escapar do ataque do sistema imune do hospedeiro. Muitos mecanismos têm sido propostos para explicar a sobrevivência do parasita, um deles é a aquisição de lipoproteínas plasmáticas. O que chama a atenção para as lipoproteínas nestes mecanismos é o fato de os esquistossômulos não sintetizarem nem colesterol, nem ácidos graxos de cadeia longa, entretanto, estes compostos estão presentes nas suas estruturas. Provavelmente, eles adquirem do hospedeiro através da interação do tegumento do verme com as lipoproteínas no sangue do animal infectado. Neste trabalho, microscopia eletrônica de varredura, eletroforese 2-D e “immunoblotting” foram utilizadas como ferramentas para estudar a interação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) com o tegumento do *Schistosoma mansoni* e identificar a proteína ligante de LDL. Depois de 50 dias de infecção (100 cercárias, cepa São Lourenço da Mata - SLM), camundongos albinos (*Mus musculus*) foram sacrificados e os vermes adultos retirados, os quais foram separados para incubação com LDL para a microscopia eletrônica de varredura e preparação do extrato para identificação da proteína ligante de LDL. Os vermes foram lavados e incubados em meio de cultura RPMI 1640 + 10% (v/v) de soro deficiente de lipoproteína (LPDS), contendo 40 µg de LDL/mL durante 30, 60, 120 min. Vermes controles foram processados da mesma forma sem LDL. O extrato de proteínas foi obtido e 200 µg de proteínas foram aplicadas em fitas gradiente de pH imobilizado (IPG strip), 7 cm, pH=3-10, seguidos de focalização isoeletrica no sistema Multiphor II (GE Healthcare) e SDS-PAGE. Proteínas foram transferidas para membranas de PDVF, e bloqueadas com caseína 3%. Subsequentemente, incubações foram feitas com soro humano, anticorpo policlonal anti-LDL (chicken) e conjugado peroxidase anti-chicken (IgG). A membrana foi revelada com substrato TMB e duas bandas foram identificadas apresentando pesos moleculares e pontos isoeletricos (pI) de 55.5 kDa e pI 5.12 e de 28.5 kDa e pI 7.17, respectivamente. Os resultados da microscopia eletrônica de varredura demonstraram uma maior interação de partículas de LDL com a região dorsal mediana do parasita, em relação à outras regiões do tegumento. Agregados lipoprotéicos foram observados nas incubações de 30 e 60 min, sendo verificado uma diminuição na incubação de 120 min. O tamanho das partículas de LDL diminuiu com o tempo de incubação, esses resultados sugerem que a redução do tamanho das partículas pode ser devido ao uso dos lipídeos das lipoproteínas pelo verme. Concluimos que a identificação da proteína ligante poderá ajudar novos projetos terapêuticos, levando a um bloqueio da interação LDL/parasita e consequentemente a morte dos vermes.

Palavras-chave: Schistosoma, Lipoproteínas, *Schistosoma mansoni*, Interação com LDL, Microscopia.

ABSTRACT

The schistosomiasis *mansoni* is an endemic disease in several parts of the America and Africa, caused by the *Schistosoma mansoni*. According to the World Health Organization there are between 200 and 300 millions of persons infected in the world and approximately 1 billion under risk. The adult worm of the *Schistosoma mansoni* acquired a peculiar ability to escape from the attack of the host immune system. Many mechanisms have been proposed for explaining the parasite survival in the host organism, one of them is the acquisition of plasma lipoproteins. What calls the attention for the lipoproteins in these mechanisms is the fact that the schistosoma does synthesize neither cholesterol, nor long chain fatty acids; however these compounds are present in its structures. Probably, they acquire lipids from of the host through the interaction of the tegument of the worm with lipoproteins in the blood of the infected animal. In this work, scanning electron microscopy, 2-D electrophoresis and "immunoblotting" were utilized as tools for studying the interaction of the low density lipoprotein (LDL) with the tegument of the *Schistosoma mansoni* and identifying the LDL binding protein. After 50 days of infection (100 cercariae SLM strain), mice were sacrificed and the adult worms collected and immediately separated for scanning electron microscopy studies and for the preparation of the crude extract of *S. mansoni*, 2D electrophoresis and blotting experiments. Briefly, the worms were washed and incubated in RPMI 1640, containing 10% of LPDS (v/v), 40 µg LDL/ml during the times 30, 60 and 120 min. Controls were done without LDL. The proteins extract was obtained and 200 µg of proteins in hydration buffer were use to hydrated IPG strips (7 cm, pH 3-10), followed by isoelectric focusing (IEF) in a Multiphor II system (GE Healthcare) and SDS-PAGE. Proteins were transferred for membranes of polyvinylidifluoride (PDVF), and blocked with casein 3% (w/v). Subsequently, incubations were done with human serum, antibody polyclonal anti-LDL (chicken) and conjugate peroxidase-anti-chicken (IgG). The membrane was revealed with substrate TMB and two bands were identified, presenting molecular weight and isoelectric points (pI) of 55,5 kDa and pI 5,12; 28,5 kDa and pI 7,17, respectively. The results of the electron microscopy showed a bigger interaction of LDL particles with the dorsal medial region of the parasite, regarding the other regions of the worm tegument. Aggregates of lipoproteins were observed in the incubations of 30 and 60 min, being verified a diminution in the incubation of 120 min. The size of the LDL particles diminished with the time of incubation, suggesting that the reduction of the size of the particles can be due to the capture and use of the lipoprotein lipids by the worm. We conclude that the identification of the binding protein will be able to help in news therapeutic projects, aiming the blockage of the LDL/parasite interaction and consequently, the death of the worms.

Keywords: Schistosoma, Lipoproteins, *Schistosoma mansoni*, Interaction of LDL

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Schistosoma mansoni*

1.1.1 Ciclo Biológico

O ciclo evolutivo do *Schistosoma mansoni* se desenvolve em duas fases principais: no caramujo (hospedeiro invertebrado ou intermediário) e no homem e outros mamíferos (hospedeiros vertebrados ou definitivos). No Brasil, os caramujos que servem como hospedeiros intermediários são do gênero *Biomphalaria* e das espécies *B. glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*. Destas, apenas as duas primeiras são encontradas no Nordeste brasileiro.

Os vermes adultos do *Schistosoma mansoni* apresentam um acentuado dimorfismo sexual e atingem a fase adulta de seu ciclo biológico no sistema vascular do hospedeiro definitivo (Neves, 2000), onde alcançam as veias mesentéricas, migrando contra a corrente circulatória e depositando seus ovos nos ramos da veia mesentérica inferior (Rey, 2001). As fêmeas fazem postura no nível da submucosa, cada fêmea põe em média 400 ovos por dia. A circulação e a extrusão dos ovos para o tecido circundante (vasos hepáticos, por exemplo), fazem proliferar o endotélio vascular, promovendo a formação de granulomas com conseqüente fibrose tecidual, particularmente no fígado o que provoca obstrução e hipertensão portal, enquanto outros ovos atravessam a mucosa intestinal e são eliminados nas fezes. Antes disso, o casal de vermes já se deslocou para outros ramos da rede vascular onde o mesmo processo irá repetir-se sucessivamente (Rodrigues & Costa, 1987). Cinco anos é a vida média do *S. mansoni*, embora alguns casais possam viver mais de 30 anos, eliminando ovos.

Alcançando a água, os ovos eclodem na presença de luz e calor, e liberam os miracídeos, larvas ciliadas, que nadam ativamente até encontrarem o hospedeiro intermediário. O desenvolvimento das larvas do parasita em esporocistos primários, esporocistos secundários e cercárias (larvas infectantes) dura de vinte a trinta dias (Rey, 2001). A penetração das cercárias na pele do hospedeiro vertebrado inicia a fase de desenvolvimento parasitário no hospedeiro definitivo. Durante a penetração, as larvas infectantes se transformam em esquistossômulos e migram através dos vasos sanguíneos ou linfáticos para os pulmões e, finalmente para o sistema vascular intra-hepático. Esse

processo dura em torno de duas semanas, enquanto a maturação dos parasitas até a forma adulta é alcançada 30 - 45 dias após a penetração. Os vermes machos e fêmeas migram para os ramos da veia mesentérica inferior, onde ocorre o acasalamento e a postura dos ovos (Rey, 2001).

A aquisição de nutrientes ocorre pela ingestão de sangue do hospedeiro pela ventosa oral, no intestino o material é digerido por enzimas e os produtos solúveis são regurgitados. Parte da hemoglobina ingerida é degradada por proteases e incorporada pelo verme adulto especialmente pelas fêmeas, que além de possuírem uma maior concentração de proteases, ingerem mais sangue, acreditando-se que precisem de hemoglobina para a produção de ovos (Chiang & Caulfield, 1989). A segunda rota é a aquisição de nutrientes através de sua superfície (ou tegumento).

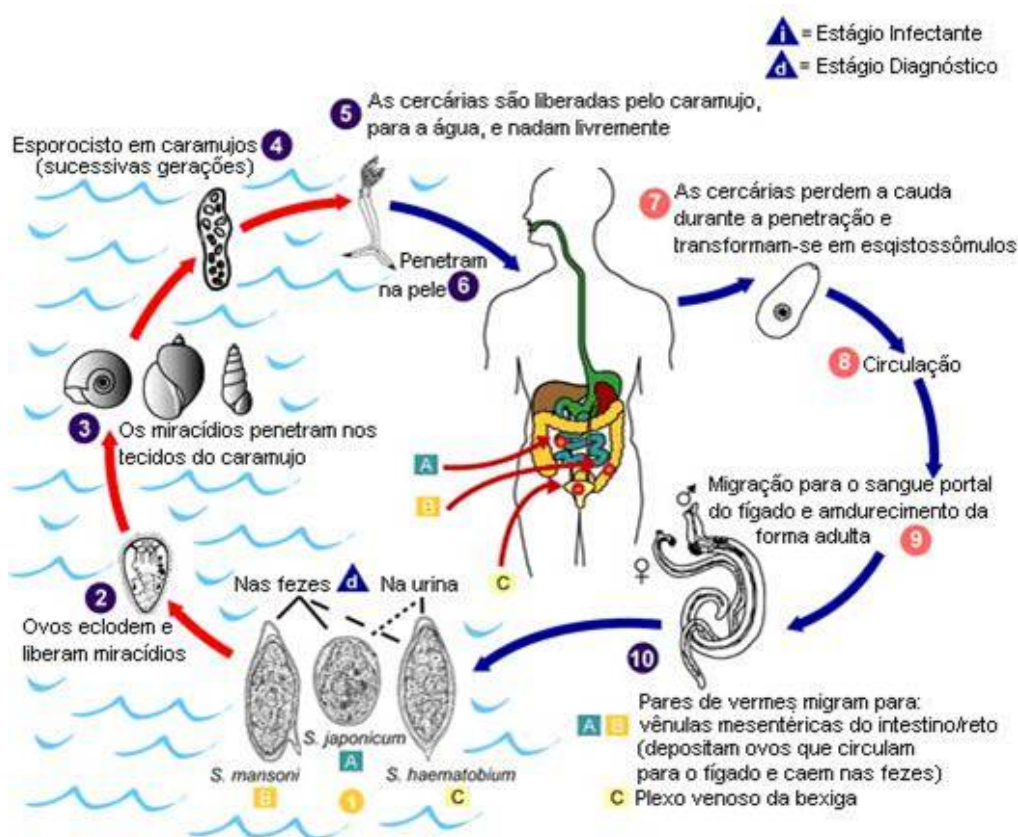


Figura 1: Ciclo de vida das três espécies de *Schistosoma*.

Fonte: <http://www.cve.saude.sp.gov.br>

(Endereço eletrônico acessado dia 10 de fevereiro de 2008)

1.1.2 Vermes adultos

O verme adulto macho mede cerca de 1 cm. Tem cor esbranquiçada, com tegumento recoberto de minúsculas projeções (tubérculos). Apresenta o corpo dividido

em três porções: anterior, na qual encontramos a ventosa oral e a ventosa ventral (acetábulo), a mediana e a posterior (que se inicia logo após a ventosa ventral), onde aparece o canal ginecóforo. Este nada mais é, do que dobras das laterais do corpo no sentido longitudinal, para albergar a fêmea e fecundá-la. Em seguida à ventosa oral, temos o esôfago, que se bifurca ao nível do acetábulo e funde-se depois formando um ceco único que irá terminar na extremidade posterior. Logo atrás do acetábulo, encontramos de sete a nove massas testiculares que se abrem diretamente no canal ginecóforo. O verme não possui órgão copulador e, assim, os espermatozóides passam pelos canais deferentes, que se abrem no poro genital, dentro do canal ginecóforo, daí fecundando a fêmea (Neves, 2000).

A fêmea tem cor escura devido ao ceco com sangue semidigerido, possui tegumento liso, vive no canal ginecóforo, tem corpo mais fino, cilíndrico e mais longo que o macho, medindo entre 1,2 a 1,6 cm de comprimento. Em sua porção anterior encontra-se a ventosa oral e o acetábulo, semelhante ao macho, seguindo-se da vulva, útero (com um ou dois ovos) e ovário. Em sua porção posterior localizam-se as glândulas vitelogênicas e o ceco. Em seu habitat definitivo, a fêmea fecundada começa a ovipor, insinuando-se nas vênulas mais estreitas da mucosa ou da submucosa do reto, sigmóide e outros segmentos do intestino, enchendo-os de fiadas de ovos produzidos um a um, os quais passam dos locais de ovo posição para a luz intestinal, onde serão expelidos junto às fezes (Rodrigues & Costa, 1987).

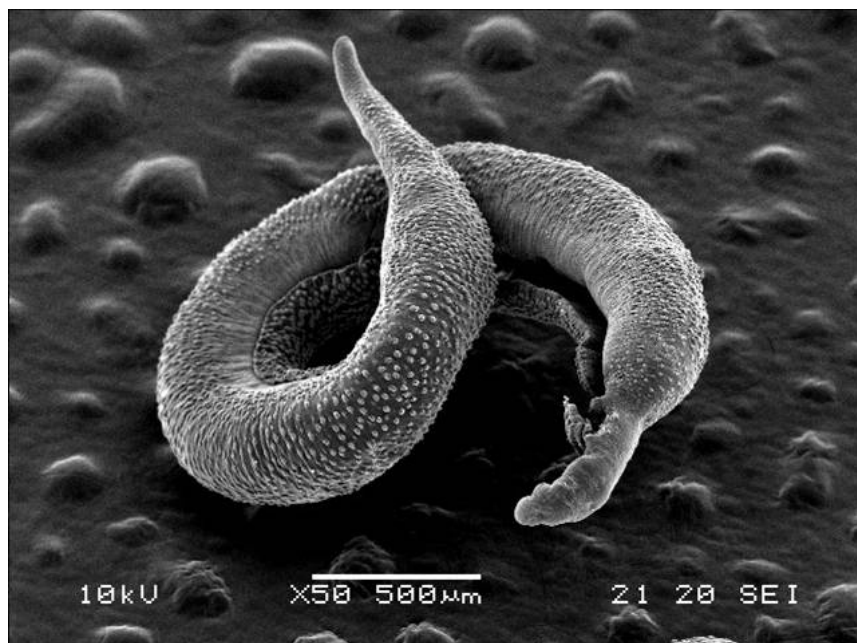


Figura 2: Verme Adulto Macho de *Schistosoma mansoni*

Fonte: Pereira, A.S.A.

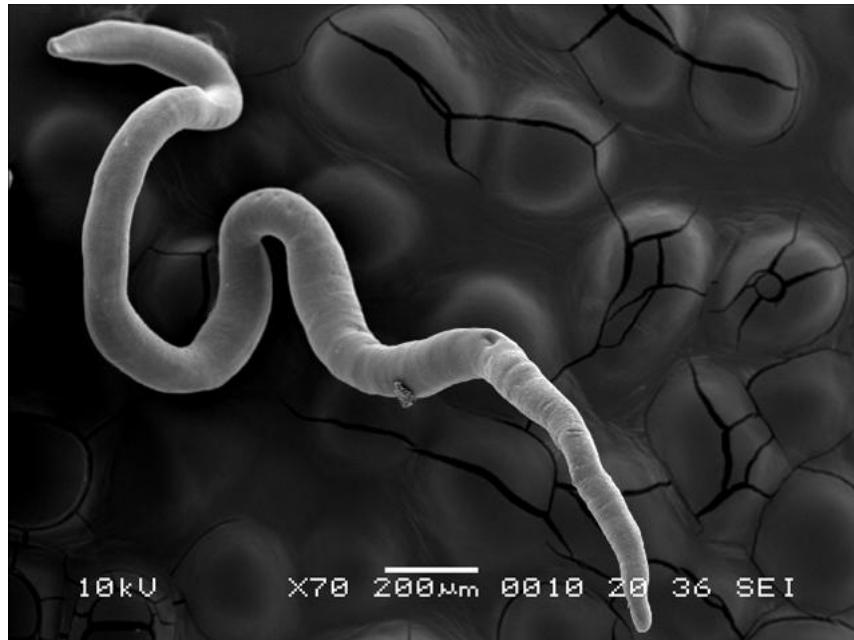


Figura 3: Verme Adulto Fêmea de *Schistosoma mansoni*

Fonte: Pereira, A.S.A.

1.1.3 Tegumento do Verme adulto do *Schistosoma mansoni*

1.1.3.1 Função do Tegumento

O tegumento é um complexo sincicial que forma uma interface importante entre o parasita e o hospedeiro e pode apresentar-se como a principal rota para absorção de glicose, aminoácidos e outros nutrientes de forma similar, e também a excreção de produtos metabólicos como ácido láctico (Cornford & Huot, 1981; Cornford *et al.*, 1983; Bryant, 1993; Camacho & Agnew, 1995). A interação entre moléculas do hospedeiro e o *S. mansoni* pode ser considerada a característica chave para a sobrevivência do parasita.

Embora o verme adulto possua a função intestinal na qual está envolvido, ingestão e digestão de células e macromoléculas, existe um grande tráfego de moléculas pequenas através do seu tegumento. A superfície da membrana do tegumento também liga uma grande variedade de moléculas do hospedeiro, tais como: substâncias dos grupos sanguíneos, antígenos de histocompatibilidade, imunoglobulinas e lipoproteínas (Goldring *et al.*, 1976; Ramalho-Pinto *et al.*, 1978; Sher *et al.*, 1978; Smith & Kusel, 1979; Torpier *et al.*, 1979). Alguns trabalhos (Rumjanek *et al.*, 1983; Bennett &

Caulfield, 1991; Tempone *et al.*, 1997; Fan *et al.*, 2003) tem demonstrado a interação da LDL com cercárias de *S. mansoni*, tal mecanismo de interação prejudicaria o reconhecimento do verme pelo sistema imune do hospedeiro levando a permanência do parasita por longos períodos no organismo infectado.

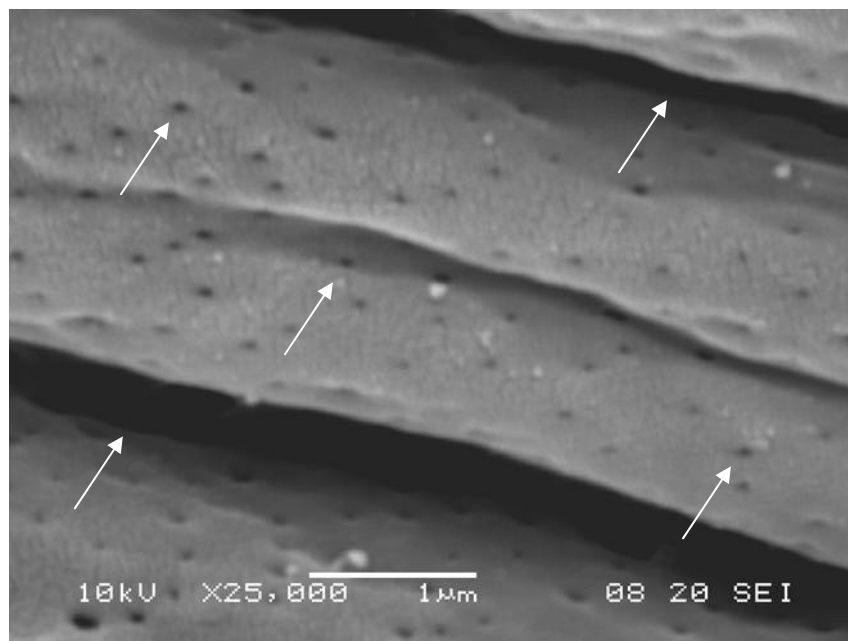


Figura 4: Micrografia das dobraduras da região mediana dorsal do verme adulto macho do *Schistosoma mansoni*, apresentando poros no tegumento (→)

Fonte: Pereira, A.S.A.

1.3.2 Morfologia do tegumento

O tegumento do schistosoma é uma estrutura incomum, sendo envolvida por duas bi-camadas lipídicas muito próximas e opostas na forma de uma membrana plasmática normal que descansa sobre uma outra região denominada de membranocálice (Wilson, *et al.*, 1974; Krautz-Peterson *et al.*, 2007).

Como o tegumento não possui as membranas laterais, seu citoplasma se estende como uma unidade contínua, ou um sincício, ao redor do corpo do verme. O citoplasma tegumental é conectado por numerosos e finos processos citoplasmáticos para interconectar corpos celulares, que se encontram abaixo das camadas periféricas do músculo; estes contêm núcleos, retículo endoplasmático, complexo de Golgi e mitocôndrias. A importação dos nutrientes através da superfície do tegumento implica a presença de proteínas de transporte (chamadas às vezes de permeases) na membrana plasmática do tegumento. Tais proteínas que importam os nutrientes são expostas aos

mesmos no sangue do hospedeiro e, como tal, devem estar disponíveis para o ataque quimioterápico ou imunológico (Krautz-Peterson *et al.*, 2007).

O tegumento do *S. mansoni* apresenta-se dotado de numerosas e variadas saliências e organelas tácteis. A presença de poros e fissuras sugere a possibilidade de substratos ou metabólitos entrarem ou saírem através dessas aberturas. (Senft & Gibler, 1977).

A região anterior do verme adulto de *S. mansoni*, onde ficam localizadas as ventosas, oral e ventral, consiste numa superfície com algumas espículas emergindo do tegumento e limitada por um número pequeno de poros. Esta região possui dobraduras menores que outras regiões e é composta por pequenas ranhuras e canais (Gobert *et al.*, 2003). A face dorsal mediana e posterior do parasita macho apresentam um aspecto dobrado com numerosos tubérculos recobrindo todo o dorso, desde as ventosas até a cauda.

Uma grande característica topográfica do *S. mansoni* inclui um achatamento dorso-ventral da extremidade posterior que se curva sobre a fêmea látero-ventralmente, formando o canal ginecóforo (Neves, 2000). Na região do canal ginecóforo são observadas muitas aberturas, possivelmente para trocas de substâncias entre o macho e a fêmea, enquanto esta se encontra dentro do canal.

Alguns estudos têm demonstrado que a condição nutricional do hospedeiro definitivo influencia os valores morfométricos do verme (Neves *et al.*, 2001). Vermes obtidos de animais com baixa quantidade de proteína apresentam tubérculos mais numerosos, planos, concentrados e áreas vacuoladas. Tais características não são vista nos animais tratados com alta quantidade de proteína. Não há informações disponíveis a cerca da relação entre a espessura do tegumento e as condições fisiológicas do hospedeiro.

1.1.4 Esquistossomose mansônica

1.1.4.1 Descrição da Doença

O *Schistosoma mansoni*, platelminto trematódeo, é o agente causador da esquistossomose mansônica, uma doença endêmica em várias partes da África, Ásia e das Américas (Rey, 2001). A esquistossomose é uma infecção transmitida ao homem

pelo contato com água de coleções hídricas contaminadas por cercárias, uma das fases do ciclo evolutivo do *S. mansoni*. A doença caracteriza-se por uma fase aguda e outra crônica quando os vermes adultos, machos e fêmeas, passam a viver nas veias mesentéricas ou vesiculares do hospedeiro definitivo (Ribeiro *et al.*, 2004). Os ovos expelidos pelas fêmeas produzem granulomas e cicatrizes nos órgãos onde se alojam ou são depositados. O quadro sintomático depende do número de ovos e do órgão onde estão localizados. A principal complicação da esquistossomose mansônica é a hipertensão portal nos casos avançados que se caracteriza por hemorragia, ascite, edema e insuficiência hepática severa, casos que, apesar do tratamento, quase sempre evoluem para óbito. Na fase aguda o paciente apresenta febre, cefaléia, sudorese, astenia, anorexia e emagrecimento, pode ainda ter mialgia, tosse e diarreia (às vezes, disenteria, acompanhada de dores abdominais e distensão do abdome); náuseas e vômitos. Manifestações de hipersensibilidade como urticária, prurido generalizado, edema da face, placas eritematosas ou lesões purpúricas também podem ocorrer. Excepcionalmente, os pacientes desenvolvem na fase aguda, quadros clínicos mais graves com icterícia, coma ou abdome agudo (fase aguda toxêmica). Na fase crônica o quadro clínico varia desde a ausência de alterações hemodinâmicas acentuadas até formas severas como hipertensão portal, hipertensão pulmonar, síndrome cianótica, glomerulopatias, forma pseudoneoplásica, forma nervosa (com paraplegia de instalação rápida), forma panvisceral, associação com salmonelose septicêmica prolongada e outras associações mórbidas (Cimerman, 2002).

A Esquistossomose é classificada em quatro formas:

- 1) *Tipo 1 ou Forma Intestinal* - caracterizada por diarreias repetidas que podem ser muco-sanguinolentas, com dor ou desconforto abdominal, podendo ser assintomática;
- 2) *Tipo 2 ou Forma Hepatointestinal* - presença de diarreias. Ao exame, o paciente apresenta hepatomegalia e à palpação, nodulações correspondentes às áreas de fibrose decorrentes da granulomatose periportal ou fibrose de Symmers, nas fases mais avançadas dessa forma clínica;
- 3) *Tipo 3 ou Forma Hepatoesplênica Compensada* - presença de hepatoesplenomegalia. As lesões perivasculares intra-hepáticas geram transtornos na circulação portal e certo grau de hipertensão provocando congestão passiva do baço. Nesse estágio, inicia-se a formação de circulação colateral e de varizes do esôfago, com o comprometimento do estado geral do paciente;

4) *Tipo IV ou Forma Hepatoesplênica Descompensada* - forma mais grave da doença, responsável pelos óbitos. Caracteriza-se por fígado volumoso ou já contraído por fibrose perivascular, esplenomegalia avantajada, ascite, circulação colateral, varizes do esôfago, anemia acentuada, desnutrição e hiperesplenismo. A forma pulmonar e cárdio-pulmonar são encontradas nos estágios avançados da doença. Outra forma importante é a neuroesquistossomose (Ministério da Saúde, 2002).

1.1.4.2 Ocorrência

A esquistossomose mansônica é encontrada na África, na Península Arábica e na América do Sul (Antilhas, Venezuela, Suriname e Brasil), de grande importância epidemiológica, ela está presente em aproximadamente 74 países em desenvolvimento afetando mais de 300 milhões de pessoas (Van Balkom *et al.*, 2005). No Brasil, a transmissão ocorre principalmente numa faixa contínua, ao longo do litoral, desde o estado do Ceará até o Rio Grande do Sul; para o oeste, a esquistossomose tem sido encontrada em Goiás, Distrito Federal e Mato Grosso. Entretanto, a maior endemicidade ocorre em Alagoas, Sergipe, Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais e Pernambuco (Carmo & Barreto, 1994; Carvalho *et al.*, 1994; Rey, 2001).

No estado de Pernambuco a doença é característica das áreas litorâneas e da Zona da Mata (Araújo *et al.*, 2007; Favre *et al.*, 2006).

A zona da mata do estado de Pernambuco, também é conhecida como a zona da cana-de-açúcar e abrange 43 municípios que ocupam 8.6% de sua área. Em 2000 a população da zona da mata foi estimada em 1,2 milhões de pessoas, onde 31% vivem em áreas rurais. Das 280 mil casas estimadas 46% não têm acesso à água encanada e 75% não têm saneamento básico (IBGE, 2000).

A esquistossomose é uma das doenças endêmicas mais presentes nas campanhas de controle de doenças, realizadas pelo Ministério da Saúde, na Zona da Mata do estado desde 1977 (Favre *et al.*, 2001). A última avaliação feita pelo Ministério da Saúde através da fundação nacional da saúde (Funasa) entre 1996 e 1999 revelou que 35 das municipalidades tiveram ainda índices de prevalência acima de 10% (Favre *et al.*, 2006).

Em 1999, o Ministério da Saúde descentralizou as atividades de vigilância e controle criando um programa de epidemiologia e controle de doença (PCE), onde os municípios tornaram-se responsáveis pela gerência e execução das atividades do

programa para o controle de esquistossomose dentro do sistema único de saúde (SUS). Em áreas endêmicas tais como a zona da mata, as atividades de PCE-SUS envolvem duas etapas principais:

- ◆ Exames duas vezes ao ano de populações inteiras através dos órgãos municipais da saúde
- ◆ Tratamento dos positivos através das unidades locais da saúde do programa da saúde da família (PSF) (Barbosa *et al.*, 2006). Cada unidade de PSF atende a até mil famílias ou casas.

Na zona da mata, as atividades de PCE-SUS foram iniciadas em 2001. Em 2004, 100.932 pessoas já tinham sido examinadas, onde 13.828 (13.7%) foram positivas para o *S. mansoni*. Entre estes, 2129 (20.8%) abrigaram mais de 100 ovos por grama de fezes (Favre *et al.*, 2006).

Na zona litorânea do estado de Pernambuco, chuvas torrenciais já provocaram surtos de esquistossomose.

Em 2000, na praia de Porto de Galinhas houve um registro de 662 casos da doença, sendo 62% de casos agudos. Por causa das chuvas, a enchente propiciou o carreamento do vetor responsável pela transmissão, o caramujo *Biomphalaria glabrata*, antes restritos aos focos peridomiciliares, para ruas e residências, provocando infecção humana em massa. Inquérito malacológico realizado no local evidenciou que os caramujos foram introduzidos em Porto por intermédio da importação de areias de rios de áreas endêmicas para aterramento de quintais. A infecção dos moluscos se deu em virtude de vazamentos de fossas com fezes de indivíduos parasitados, e a enchente encarregou-se de espalhar os caramujos infectados (Barbosa *et al.*, 2001).

1.1.4.3 Diagnóstico

Como as diferentes manifestações clínicas da esquistossomose podem confundir-se com outras doenças, o diagnóstico de certeza é feito pelo achado de ovos nas fezes.

1.1.4.3.1 Diagnóstico laboratorial

Exame parasitológico de fezes – Ovos de *S. mansoni* podem ser encontrados nas fezes, a partir do 40º dia do contágio, sendo a técnica de sedimentação espontânea (Hoffman, *et al.*, 1934) utilizada para identificação dos mesmos. Os ovos são de 114 a 175 mm de comprimento e de 45 a 68 mm de espessura, tendo uma espinha lateral proeminente. O método de Kato-Katz é utilizado em inquéritos coproscópicos e investigações epidemiológicas devido à sua facilidade operacional em campo e por permitir a quantificação de ovos por grama de fezes.

Biópsia retal - A biópsia é um método de fácil execução e indolor, porém por ser uma técnica invasiva, é pouco utilizada. Na esquistossomose crônica, sem hipertensão portal, uma biópsia retal apresenta cerca de 80% de positividade enquanto que no exame de fezes, 50%.

Reações sorológicas - o diagnóstico utilizando soro do paciente para detecção de IgG e IgM contra *S. mansoni* pode indicar infestação atual ou passada. Existem vários tipos de reações sorológicas para a esquistossomose, mas não têm ampla aplicação na prática. ELISA e imunofluorescência são utilizados em estudos clínicos e experimentais.

Intradermorreação - consiste na inoculação de antígeno geralmente preparado com vermes adultos ou cercárias, na face anterior do antebraço. Sua interpretação é feita 15 minutos após a inoculação segundo critérios preconizados por Meyer & Pífano, 1945. Não tem sido utilizada na prática.



Figura 5: Ovo de *Schistosoma mansoni*

Fonte: <http://br.geocities.com/estevesneto2001/25zoo/stbz/ps.htm>
(Endereço eletrônico acessado dia 10 de fevereiro de 2008)

1.1.4.3.2 Diagnóstico por imagem

A ultra-sonografia hepática é importante no diagnóstico da fibrose de Symmers. Esta fibrose é causada pelos ovos produzidos pelas fêmeas que não são eliminados nas fezes, ficando retidos no intestino e no fígado (Ministério da Saúde, 2002).

1.1.5 Tratamento

O tratamento tem como base não apenas promover a cura da doença ou diminuir a carga parasitária dos pacientes, mas impedir sua evolução para formas graves. Estudos mostram que a quimioterapia pode reduzir também a hepatoesplenomegalia. Praziquantel (Cestox®) é a droga de escolha contra todas as espécies, podendo ser utilizado também o oxamniquine (Mansil®). Os efeitos colaterais de ambas as drogas são tonturas, náuseas, cefaléia, sonolência, sendo a tontura mais freqüente com oxamniquine e náuseas e vômitos com praziquantel. O tratamento cirúrgico da esquistossomose está indicado nas formas com complicações, como hipertensão porta e outras (Ministério da Saúde, 2002).

1.2 LIPOPROTEÍNAS

1.2.1 Conceito

As lipoproteínas são complexos moleculares de lipídios e proteínas específicas denominadas de apolipoproteínas. Essas partículas dinâmicas estão em constante estado de síntese, degradação e remoção do plasma. As partículas lipoprotéicas apresentam composição variada de lipídios e proteínas, podendo ser classificadas como: quilomicra (QM), lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL). As lipoproteínas funcionam tanto para manter os lipídios solúveis, à medida que os transporta no plasma, quanto para fornecer um mecanismo eficiente para entregar seu conteúdo lipídico aos tecidos. Nos seres humanos, o sistema de entrega é menos perfeito que em outros animais e, como resultado, os seres humanos experimentam uma deposição gradual de lipídios – especialmente colesterol – nos tecidos (Pamella, 2005). Este colesterol em excesso está presente na forma de partículas de LDL, chamadas de “mau colesterol”. A relação entre

o colesterol na forma de HDL e na forma de LDL, pode ser usada para avaliar a suscetibilidade ao desenvolvimento de doença cardíaca (Stryer, 2004). Isto representa um risco de vida em potencial quando a deposição de lipídios contribui para a formação de placas, causando o estreitamento dos vasos sanguíneos – uma condição conhecida como aterosclerose.

1.2.2 Composição das Lipoproteínas

Os principais lipídios transportados por partículas de lipoproteínas são os triacilgliceróis e o colesterol (livre ou esterificado), obtidos da dieta ou da síntese “de novo” (Stryer, 2004). As lipoproteínas são compostas de um centro de lipídio neutro (contendo triacilglicerol ou ésteres de colesterol, ou ambos) circundando por uma concha de apolipoproteínas (apoproteínas), fosfolípideo e colesterol não-esterificado, todos orientados de modo que suas porções polares estejam expostas na superfície da lipoproteína, tornando assim a partícula solúvel em solução aquosa.

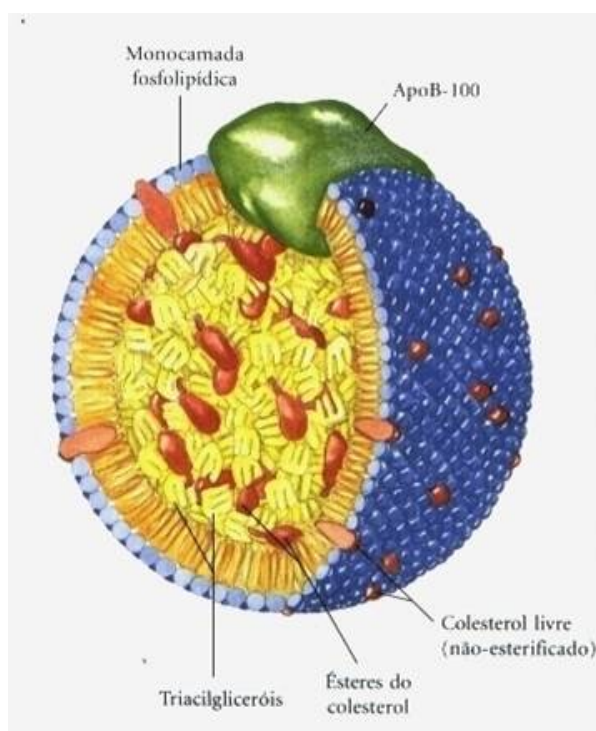


Figura 6: Estrutura de uma Proteína de Baixa Densidade (LDL)

Fonte: Princípios de Bioquímica, Lehninger, 2002

Cada classe de lipoproteína tem uma função específica determinada por seu lugar de síntese, composição lipídica e conteúdo de apolipoproteína. Pelo menos nove apolipoproteínas diferentes são encontradas entre as lipoproteínas do plasma humano (ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, ApoB-48, ApoB-100, ApoC-I, ApoC-II, ApoD e ApoE.); elas podem ser distinguidas por seu tamanho, suas reações com anticorpos específicos e sua distribuição característica nas classes de lipoproteínas. Essas partes protéicas agem como sinalizadoras, tanto dirigindo as lipoproteínas para tecidos específicos, como ativando enzimas que agem sobre elas (Lehninger, 2002).

Os quilomícrons são partículas de lipoproteína de menor densidade e maior tamanho e contem a maior percentagem de lipídio e a menor percentagem de proteína. As VLDLs e LDLs são sucessivamente mais densas, tendo um maior conteúdo de proteína e menor conteúdo de lipídio. As HDLs são as mais densas lipoproteínas plasmáticas. As lipoproteínas plasmáticas podem ser separadas com base na sua mobilidade eletroforética.

1.2.3 Metabolismo das Lipoproteínas de Baixa Densidade (LDL)

As partículas de LDL retêm a apoB-100, mas perdem suas outras apolipoproteínas para o HDL. Elas contêm muito menos triacilglicerol que suas VLDLs predecessores e têm uma concentração elevada de colesterol e ésteres de colesterol.

Brotamento e fusão de membranas são à base de diversos processos biológicos importantes.

As membranas têm que ser capazes de se separar e reunir para captar, transportar e liberar moléculas. Muitas captam moléculas pelo processo de endocitose por receptor. Aqui, uma proteína ou complexo maior liga-se inicialmente a um receptor na superfície da célula. Após a proteína ter sido ligada, proteínas especializadas agem fazendo com que a membrana se invagine na vizinhança da proteína ligada. A membrana invaginada depois se rompe e se funde, formando uma vesícula (Stryer, 2004).

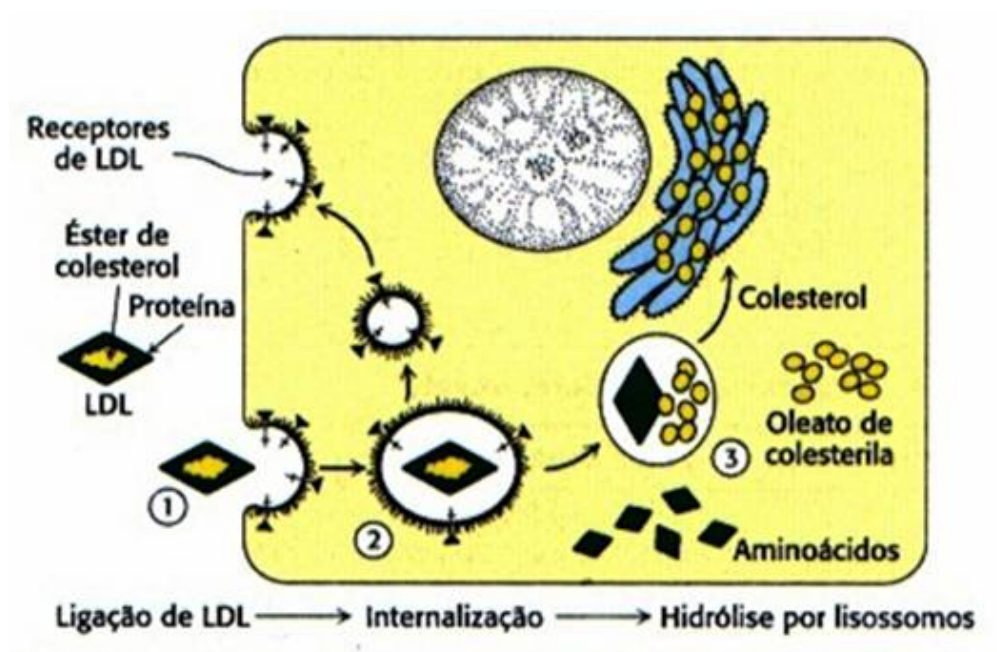


Figura 7: Endocitose por Receptor de LDL

Fonte: Stryer, 2004

A endocitose por receptor exerce um papel importante no metabolismo do colesterol. Parte do colesterol no sangue está na forma de um complexo lipoprotéico denominado lipoproteína de baixa densidade (LDL; do inglês *low density lipoprotein*). Em humanos, este complexo se liga a um receptor de LDL, uma proteína integrante da membrana, o segmento da membrana citoplasmática contendo o complexo da LDL com seu receptor se invagina e se destaca da membrana, sendo internalizado na célula. A LDL separa-se do receptor, que é reciclado de volta para a membrana, enquanto a LDL se funde com o lisossomo, uma organela que contém um conjunto de enzimas digestivas. O colesterol é liberado na célula, para armazenamento ou uso na biossíntese de membranas, e os componentes protéicos restantes são degradados. Vários hormônios, proteínas de transporte e anticorpos empregam endocitose por receptor para entrada na célula. Uma consequência menos vantajosa é que esta via está disponível para vírus e toxinas como um meio para entrar nas células (Bennet & Caulfield, 1991; Xu *et al.*, 1993; Stryer, 2004).

1.2.4 Receptores de lipoproteínas no *Schistosoma*

As lipoproteínas circulantes são abundantes no plasma humano e de outros animais, podendo ser utilizadas tanto pelo *S. mansoni*, como por outros parasitas

(Rogers, 1991) como fonte de colesterol, já que como dito anteriormente, o *S. mansoni* não apresenta habilidade para sintetizar colesterol e ácidos graxos de cadeia longa pela via *de novo*, e estas moléculas serem importantes para manter a integridade da superfície da membrana, que forma a interface entre o parasita e o hospedeiro (MacGregor *et al.*, 1989).

Lipoproteína de baixa densidade (LDL), o maior carreador de colesterol no plasma humano, se liga à superfície da larva e dos vermes adultos de *Schistosoma* (Fan *et al.*, 2003). Em trabalhos realizados com esquistossômulo de *S. mansoni*, a forma larval que primeiro estabelece contato com o interior do hospedeiro definitivo, observou-se que eles expressavam uma proteína de 45 kDa assim que entravam em contato com o soro humano e que, quando a LDL humana era adicionada ao meio tornava-se adsorvida sobre sua superfície (Rumjanek *et al.*, 1985). Receptores ou proteínas ligantes envolvidas na interação com LDL ou VLDL têm sido descritos em esquistossômulos e vermes adultos de *S. mansoni* e *S. japonicum* (Fan *et al.*, 2003). Proteínas de 45kDa são expressas na superfície das membranas do estágio larval do *S. mansoni* se ligam a LDL humana (Rumjanek *et al.*, 1988). As proteínas de 45 kDa são sintetizadas pelas cercarias e não pelo estágio de esquistossômulo.

Trabalhando-se com vermes adultos de *S. japonicum* foi observado a ocorrência de um suposto receptor para LDL humana, com um peso molecular aparente de 43 kDa, o qual esteve presente no tegumento e no intestino dos parasitas, segundo os referidos autores a interação dos sítios ligantes da lipoproteína requer a presença de lisina e arginina (Rogers *et al.*, 1989; Rogers *et al.*, 1990). Um receptor de lipoproteína de vermes adultos de *S. japonicum* já foi identificado usando cromatografia e técnicas de blotting (Rogers *et al.*, 1989, Fan *et al.*, 2003).

Em mamíferos, a LDL liga-se ao receptor na superfície celular, segue-se a internalização do complexo com subsequente degradação proteolítica da LDL, contudo, não tem sido demonstrado que ocorra fagocitose nos vermes de *S. mansoni*. Assim, na falta de fagocitose a incorporação de lipídios deve ocorrer por mecanismo de transferência direta entra a LDL e a membrana do parasita de uma maneira similar ao que ocorre entre os lipídios e os lipossomas evitando a absorção de grandes moléculas sobre o tegumento.

Por outro lado a LDL é rica em esteróis e fosfatidilcolina, necessários para síntese de membranas, podendo funcionar como fonte de lipídios para o parasita e ao mesmo tempo, como proteção contra os ataques do sistema imune do hospedeiro,

mascarando os antígenos do parasita em experimentos utilizando esquistossômulos (Chiang & Caulfield, 1989).

As evidências sugerem que esses parasitas expressam receptores para lipoproteínas do hospedeiro, sendo um caminho necessário para aquisição de lipídeos.

1.3 Considerações sobre as principais técnicas usadas em material biológico

1.3.1. Proteômica

A proteômica é uma técnica poderosa e extensamente usada para análise de complexos protéicos extraídos de células, tecidos, ou outras amostras biológicas. A eletroforese bi-dimensional (2-D), em gel de poliacrilamida é um método de separação de proteínas poderoso e amplamente utilizado para análise simultânea das centenas ou milhares de produtos dos genes. Esta técnica classifica proteínas de acordo com duas propriedades independentes, em dois passos distintos: a primeira dimensão, que é a focalização isoeletrica (FIE), separa as proteínas de acordo com seus pontos isoeletricos; a segunda dimensão, gel de eletroforese SDS-PAGE, separa as proteínas de acordo com seus pesos moleculares. Cada “spot” no resultado do ensaio da segunda dimensão corresponde a uma espécie de proteínas da amostra.

A eletroforese bi-dimensional (2-D) foi introduzida por O’Farrel e J. Klose em 1975. Na técnica original da focalização isoeletrica, a separação da primeira dimensão era realizada através de gradientes de pH gerados por carreadores anfólitos, moléculas pequenas, solúveis e anfotéricas, com uma alta capacidade de neutralização próxima ao seu ponto isoeletrico (pI), em géis de poliacrilamida distribuídos em tubos (capilares) de vidro (Berkelman & Stenstedt, 2002). Após separar as proteínas, a possibilidade de identificá-las aumenta muito, principalmente, quando se utiliza a espectrometria de massas, tecnologia altamente sensível que permite trabalhar com uma quantidade anteriormente inimaginável com as técnicas convencionais (Vasilescu & Figeys, 2006).

A tecnologia proteômica é dinâmica e consiste em técnicas já conhecidas pela química de proteínas tradicional às quais vêm sendo incorporados avanços tecnológicos, que seguem se inovando rapidamente. Isso proporciona eficiência cada vez maior, além de permitir separar e identificar um número imenso de proteínas a partir de quantidades muito pequenas de amostra.

Avanços na 2-D, espectrometria de massa e bioinformática têm promovido a possibilidade de mapeamento e caracterização de proteínas de várias populações (Cohen *et al.*, 2002). Os métodos proteômicos têm envolvido a 2-D, programas de análises de imagens, métodos de digestão enzimática, análise de proteínas por espectrometria de massa, gerando dados de peptídeos fragmentados (Patterson *et al.*, 2001; Graves *et al.*, 2002; Aebersold & Mann, 2003).

1.3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura

Durante a fase de produção ou análise de materiais, quase sempre se torna necessário analisar a sua microestrutura. Esta análise microestrutural é muito importante, pois permite:

- ◆ Entender as correlações microestrutura - defeitos - propriedades;
- ◆ Predizer as propriedades do material quando estas correlações são estabelecidas.

As técnicas mais utilizadas para este tipo de análise são: *Microscopia Ótica* e *Microscopia Eletrônica*. No caso da microscopia ótica, o contraste da imagem é resultado da diferença de reflectividade da luz nas diversas regiões da microestrutura, uma vez que o sistema é constituído basicamente pela fonte de iluminação e do sistema de lentes. Para materiais que são opacos a luz visível, como é o caso dos metais, da maioria dos cerâmicos e polímeros, somente a superfície pode ser observada e a mesma precisa ser cuidadosamente preparada de maneira a revelar os detalhes da microestrutura. Uma das limitações da microscopia ótica é o aumento máximo conseguido que fica em torno de 2 000 vezes. Como consequência, pequenos detalhes estruturais não são possíveis de serem detectados através desta técnica.

Nesta era de intenso avanço tecnológico, cada vez mais os cientistas têm a necessidade de observar, analisar e explicar corretamente os fenômenos que ocorrem na escala micrométrica ou submicrométrica. A microscopia eletrônica de varredura se apresenta como a técnica mais adequada, pois permite alcançar aumentos muito superiores ao da microscopia ótica. Dependendo do material pode atingir até 900 000 vezes, mas para a análise de materiais normalmente o aumento é da ordem de 10 000 vezes (Maliska & Klein, 1997; Lourenço *et al.*, 2002).

No caso da microscopia eletrônica a área ou o microvolume a ser analisado é irradiado por um fino feixe de elétrons ao invés da radiação da luz. Como resultado da interação do feixe de elétrons com a superfície da amostra, uma série de radiações são

emitidas tais como: elétrons secundários, elétrons retroespalhados, raios-X característicos, elétrons Auger, fótons, etc. Estas radiações quando captadas corretamente irão fornecer informações características sobre a amostra (topografia da superfície, composição, cristalografia, etc.).

Na microscopia eletrônica de varredura, os sinais de maior interesse para a formação da imagem são os elétrons secundários e os retroespalhados. À medida que o feixe de elétrons primários vai varrendo a amostra estes sinais vão sofrendo modificações de acordo com as variações da superfície. Os elétrons secundários fornecem imagem de topografia da superfície da amostra e são os responsáveis pela obtenção das imagens de alta resolução, já os retroespalhados fornecem imagem característica de variação de composição (Maliska & Klein, 1997).

O Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) se tornou um instrumento imprescindível nas mais diversas áreas: eletrônica, geologia, ciência e engenharia dos materiais, ciências da vida, etc. Em particular, o desenvolvimento de novos materiais tem exigido um número de informações bastante detalhado das características microestruturais só possível de ser observado no MEV. Podemos afirmar que onde haja um grupo de desenvolvimento de materiais, há a necessidade de um MEV para as observações microestruturais (Santos *et al.*, 2003).



Figura 8: Microscópio Eletrônico de Varredura

Fonte: www.fugiwara.com.br/prod/mev.htm
(Endereço eletrônico acessado dia 10 de fevereiro de 2008)

1.3.2. Immunoblotting

Western Blot (alternadamente, immunoblot) é um método para detecção de uma proteína específica em uma dada amostra, homogenato ou extrato de tecido. É usado um gel de eletroforese para separar proteínas nativas ou desnaturadas pelo tamanho do polipeptídeo (condições desnaturantes) ou pela estrutura 3-D da proteína (condições não-desnaturantes / nativa) (Burnette, 1981; Towbin *et al.*, 1979).

As proteínas são transferidas a uma membrana (tipicamente nitrocellulose ou polivinildifluorido - PVDF), onde são detectadas usando os anticorpos específicos para uma proteína marcada. Existem muitas companhias especializadas em fornecer os anticorpos (monoclonais ou policlonais) contra milhares de diferentes proteínas. Isto reduziu drasticamente o tempo de realização do Blot (Renart *et al.*, 1979).

Este método é utilizado em campos como: biologia molecular, bioquímica, imunogenética e de outras disciplinas da biologia molecular. Outras técnicas relacionadas incluem o uso de anticorpos para detectar proteínas em tecidos e células, como exemplo ELISA.

O método foi originado no Laboratório de George Stark em Stanford - USA. O nome Western Blot foi dado à técnica por W. Neal Burnette (Burnette, 1981).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Localizar os sítios de ligação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) humana sobre o tegumento do verme adulto macho de *Schistosoma mansoni* e identificar a(s) proteína(s) ligante(s) de LDL no parasita.

2.2 Objetivos Específicos

- ◆ Infectar camundongos Swiss albino (*mus musculus*), com cercárias de *S. mansoni* obtidas de caramujos *Biomphalaria glabrata*;
- ◆ Obter vermes adultos de *S. mansoni* a partir dos animais infectados;
- ◆ Isolar a LDL por centrifugação diferencial a partir de sangue humano de indivíduos sadios;
- ◆ Incubar em diferentes intervalos de tempo, os vermes adultos de *S. mansoni* com a LDL humana;
- ◆ Identificar por microscopia eletrônica de varredura a ultra-estrutura dos vermes adultos e os locais de ligação da LDL sobre o tegumento do *S. mansoni*;
- ◆ Usar eletroforese bidimensional (2D) e “blotting” para identificar os “spots” correspondentes a(s) proteína(s) de ligação da LDL com o verme adulto de *S. mansoni*.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, p. 198-207, 2003.

ARAÚJO, K.C.G.M.; RESENDES, A. P. C.; SOUZA-SANTOS, R.; SILVEIRA JÚNIOR, J. C.; BARBOSA, C. S. Spatial analysis of *Biomphalaria glabrata* foci and human cases of mansoni schistosomiasis in Porto de Galinhas, Pernambuco State, Brazil, in the year 2000. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23(2), p.409-417, 2007.

BARBOSA, C.S.; COUTINHO, A. L.; MONTENEGRO, S. M. L.; ABATH, F.; SPINELLI, V. Epidemia de esquistossomose aguda na praia de Porto de Galinhas, Pernambuco. **Caderno de Saúde Pública**, v.17, p.725-728, 2001.

BARBOSA, C. S.; FAVRE, T. C.; PIERI, O. S.; AMARAL, R. S. Epidemiologia e controle da esquistossomose no Brasil. In HL Lenzi, OS Carvalho, PMZ Coelho (eds), **Esquistossomose**, Fiocruz, Rio de Janeiro, *in press.*, 2006.

BENNET, M.W.; CAULFIELD, J. P. Specific binding of human low-density lipoprotein to the surface of *Schistosoma mansoni* and ingestion by the parasite. **American Journal of Pathology**, v.138 (5), p. 1173-1182, 1991.

BERKELMAN, T. & STENSTEDT, T. 2-D Electrophoresis-Principles and Methodos. **Amersham Biosciences**, v. 80, p. 6429-6460, 2002.

BRYANT, C. Organic acid excretion by helminths. **Parasitology Today**, v. 9 (2), p. 58-60, 1993.

BURNETTE, N.W. "'Western blotting': electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate — polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A". **Analytical Biochemistry**, v. 112 (2), p. 195-203, 1981.

CAMACHO, M.; AGNEW A. *Schistosoma*: Rate of glucose import is altered by acetylcholine interaction with tegumental acetylcholine receptors and acetylcholinesterase. **Experimental Parasitology**, v. 81, p.584-591, 1995.

CARMO, E. H.; BARRETO, M.L. *Schistosomiasis mansoni* in Bahia, Brazil: historical trends and control measures. **Caderno de Saúde Pública**, v.10, p.425-439, 1994.

CARVALHO, O. S.; MASSARA, C.L., SILVEIRA-NETO, H. V.; ALVARENGA, A.G.; VIDIGAL, T.H.D.A; GUERRA, H.L.; SANTOS, M.A.A.; CHAVES, A.; KATZ, N. *Schistosomiasis mansoni* in the region of the Triângulo Mineiro, state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89(4), p.509-512, 1994.

CHIANG, C.; CAULDFIELD, J.P. Human lipoprotein binding to *Schistosoma mansoni*. **American Journal of Pathology**, v.135, p.1015-1024, 1989.

CIMERMAN, B. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. 2ª Ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 2002.

COHEN, A.M.; RUMPEL, K.; COOMBS, G.H.; WASTLING, J.M. Characterization of global protein expression by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry: proteomic of *Toxoplasma gondii*, **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 39-51, 2002.

CORNFORD E. M.; HUOT M. E. Glucose transfer from male to female schistosomes. **Science**. v. 213, p. 1269-1271, 1981.

CORNFORD, E. M.; DIEP C. P.; ROWLEY, G. A. *Schistosoma mansoni*, *S. japonicum*, *S. haematobium*: Glycogen content and glucose uptake in parasites from fasted and control hosts. **Experimental Parasitology**. v. 56, p.397-408, 1983.

FAN, J.; GAN, X.; YANG, W.; SHEN, L.; McMANUS, D. P.; BRINDLEY, P.J. A *Schistosoma japonicum* very low-density lipoprotein-binding protein. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 35, p.1436 – 1451, 2003.

FAVRE, T.C.; XIMENES, A. A. R.; GALVÃO, A. F.; PEREIRA, A. P. B.; WANDERLEY, T. N.; BARBOSA, C. S.; PIERI, O. S. Attaining the minimum target of resolution WHA 54.19 for schistosomiasis control in the sugar-cane zone of Pernambuco, Northeastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101 (1), p. 125-132, 2006.

FAVRE, T. C.; XIMENES, A. A. R.; GALVÃO, A. F.; PEREIRA, A. P. B.; WANDERLEI, T. N.; BARBOSA, C. S.; PIERI, O. S. Reliability of current estimates of schistosomiasis prevalence in the Rainforest Zone of the state of Pernambuco, Northeastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101(1), p. 73-78, 2006.

Fundação Nacional de Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. 5ª Ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

GOBERT, G. N.; STENZEL D. J.; McMANUS, D. P.; JONES, M. K. The ultrastructural architecture of the adult *Schistosoma japonicum* tegument. **International Journal for Parasitology**. v. 33, p. 1561-1575, 2003.

GOLDRING O. L.; CLEGG, J. A.; SMITHERS, S. R.; TERRY, R. J. Acquisition of human blood group antigens by *Schistosoma mansoni*. **Clinical and Experimental Immunology**. v.26, p. 181-187, 1976.

GRAVES, P.R.; HAYSTEAD, T. A. Molecular biologist's guide to proteomics. **Microbiology and molecular Biology Reviews**, v. 66, p.39-63, 2002.

HOFFMAN, W.A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. Sedimentation, concentration method in Schistosomiasis, Puerto Rico. **Journal of Public Health**. v. 9, p. 283 - 291, 1934.

IBGE, 2000. www.ibge.gov.br. Acessado às 15:00h do dia 20 de fevereiro de 2008,

KATO, K.; MIURA, M. Comparative examinations. **Japan Journal Parasitology**, v.3, p.35, 1954.

KATZ, N. & CHAIA, G. Coprological diagnosis of Schistosomiasis. I. Evaluation of quantitative technique. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.10, p. 295-298, 1968.

KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutation in mammals. **Humangenetik**, v. 26, p. 231-243, 1975.

KRAUTZ-PETERSON, G.; CAMARGO, S.; HUGGEL, K.; VERREY, F.; SHOEMAKER, C. B.; SKELLY, P. J. Amino acid transport in Schistosomes: Characterization of the permease heavy chain SPRM1hc. **The Journal of Biology Chemistry**, v. 282, n. 30, p. 21767-21775, 2007.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L., COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**, 3ª ed. São Paulo: Savier, 2002.

LOURENÇO, J. M.; TEZZA, R.; MALISKA, A. M. Characterization by scanning electron microscopy of unalloyed iron plasma sintered. In: SBMM Evento de microscopia e microanálise no mercosul, 2002, Curitiba. **Evento de microscopia e microanálise no mercosul - SBMM - 2002**, 2002.

MAcGREGOR, A. N.; KUSEL, J.R. Isolation and characterization of a surface membrane glycoprotein from adult *Schistosoma mansoni*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.34, p.237-244, 1989.

MALISKA, A. M.; KLEIN, A. N. Electron Microscopy Analysis of Nitrided Layers on Sintered Fe and Fe-3.0%Ni Plasma-Processed Using Different Gas Mixtures. **Acta Microscópica**, v. 6, p. 322-323, 1997.

MAYER, M.; PIFANO C., F. Diagnosis of schistosomiasis by intradermal reactions with an antigen prepared from adult worms of *Schistosoma mansoni*. A preliminary study on 5000 intradermal reactions. **Revista de Sanidad y Asistencia Social** , v.10, p.3, 1945.

NEVES D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. **Parasitologia Humana**. 10º ed. São Paulo: Atheneu, 2000, p. 174 – 193.

NEVES, R. H.; MACHADO-SILVA, J. R.; PELAJO-MACHADO, M.; OLIVEIRA, S. A.; COUTINHO, E. M.; LENZI, H. L.; GOMES, D. C. Morphological aspects of *Schistosoma mansoni* adult worms isolated from nourished and undernourished mice: a comparative analysis by confocal laser scanning microscopy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96 (7), p. 1013-1016, 2001.

O'FARREL, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v.250, p.4007-4021, 1975.

PAMELA, C.C.; RICHARD, A.H.; FERRIER, D.R. **Bioquímica Ilustrada**. 3ª ed. São Paulo: Artes médicas, 2005.

PATTERSON, S.D.; AEBERSOLD, R.; GOODLETT, D.R. Mass spectrometry based methods for protein identification and phosphorylation site analysis. **Proteomics**. From protein sequence to function, Bios Scientific publishers Ltd, Oxford, p. 87-130, 2001.

RAMALHO-PINTO, F. J.; McLAREN, D. J.; SMITHERS, S. R. Complement-mediated killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* by rat eosinophils *in vitro*. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 147, p. 147-156, 1978.

RENART, J.; REISER, J.; STARK, G. R. "Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure". **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76(7), p. 3116-3120, 1979.

REY, L. **Parasitologia médica** 2º ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2001, Cap.31-35, p.342-467.

RIBEIRO P.J., AGUIAR L.A.K., TOLEDO C.F., BARROS S.M.O., BORGES D.R.. Programa educativo em esquistossomose: modelo de abordagem metodológica. **Revista de Saúde Pública**, v. 38(3), p.415-421, 2004.

RODRIGUES, L. E.; COSTA, M. F. D. Bioquímica da esquistossomose mansônica. VI – Alterações do comportamento hepático relacionado ao tempo de infecção. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina**, v. 20, p.169-174, 1987.

ROGERS, M.V. Do Parasites express receptors for host lipoproteins? **Parasitology Today**, v. 7(5), 1991.

ROGERS, M.V.; HENKLE, K.J.; FIDGE, N.H.; MITCHELL, G.F. Identification of a multispecific lipoprotein receptor in adult *Schistosoma japonicum* by ligand blotting analyses. **Molecular Biochemistry Parasitology**, v. 35, p. 79-88, 1989.

ROGERS, M.V.; QUILICI, D.; MITCHELL, G.F.; FIDGE, N.H. Purification of a putative lipoprotein receptor from *Schistosoma japonicum* adult worms. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 41, p.93-100, 1990.

RUMJANEK, F. D.; McLAREN, D. J.; SMITHERS, S. R. Serum-induced expression of a surface protein in *Schistosoma mansoni*: a possible receptor for lipid uptake. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 9, p. 337-350, 1983.

RUMJANEK, F. D.; PEREIRA, M. A. C.; SILVEIRA, A.M.V. The interaction of human serum with the surface membrane of Schistosomula of *Schistosoma mansoni*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 14, p. 63-73, 1985

RUMJANEK, F.D.; CAMPOS, E.G.; AFONSO, L.C. Evidence for the occurrence of LDL receptors in extracts of schistosomula of *Schistosoma mansoni*. **Molecular Biochemistry Parasitology**, v.28, p.145-152, 1988.

SANTOS, L.J.C.; BERRIER, J.; GRIMALDI, M.; CASTRO, S.S. The use scanning electron microscopy (sem) to recognition of clay coatings. **Boletim Paranaense de Geociências**, v. 53, p. 35-43, 2003.

SENFT, A. W.; GIBLER, W. B. *Schistosoma mansoni* tegumental appendages: scanning microscopy following thiocarbohydrazide-osmium preparation. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.26 (6), p.1169-1177, 1977.

SHER, A.; HALL, B. F.; VADAS, M. A. Acquisition of murine major histocompatibility complex gene products by schistosomula of *Schistosoma mansoni*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 148, p.46-57, 1978.

SMITH, H. V.; KUSEL, J. R. The acquisition of antigens in the intercellular substance of mouse skin by schistosomula of *Schistosoma mansoni*. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 36, p. 430-435, 1979.

STRYER, L.; TYMOCZKO, J.L.; BERG, J.M. **Bioquímica**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2004.

TEMPONE, A. J.; BIANCONI, M. L.; RUMJANEK, F. D. The interaction of human LDL with the tegument of adult *Schistosoma mansoni*. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 177, p. 139 – 144, 1997.

TORPIER, C.D.; CAPRON, A.; OUAISSI, M. A. Receptor for IgG Fc and human β -2 microglobulin on *Schistosoma mansoni* schistosomula. **Nature**, v. 278, p. 447-449, 1979.

TOWBIN, H.; STAEGELIN, 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(9), p.4350-4354, 1979.

Van BALKOM, B.W.M.; Van GESTEL, R.A.; BROUWERS, J.F.H.M.; KRIJGSVELD, J.; TIELENS, A.G.M.; HECK, A.J.R.; Van HELLEMOND, J.J. Mass spectrometric analysis of the *Schistosoma mansoni* tegumental sub-proteome. **Journal of Proteome Research**, v. 4, p. 958-966, 2005.

VASILESCU, J; FIGEYS, D. Mapping protein–protein interactions by mass spectrometry (Review Article). **Current Opinion in Biotechnology**, v. 17(4), p. 394-399, 2006.

WILSON, R. A.; BARNES, P. E. The tegument of *Schistosoma mansoni*: observations on the formation, structure and composition of cytoplasmatic inclusions in relation to tegument function. **Parasitology**, v. 68, p. 239–258, 1974.

XU, X.; REMOLD, H.G.; CAULFIELD, J. P. Potencial role for scavenger receptors of human monocytes in the killing of *Schistosoma mansoni*. **American Journal of Pathology**, v.142 (3), p. 685-689, 1993.

TRABALHO:

PROTEINS OF THE *Schistosoma mansoni* TEGUMENT INTERACT WITH LOW DENSITY LIPOPROTEIN (LDL)



Este artigo será submetido à Revista Internacional Experimental Parasitology

PROTEINS OF THE *Schistosoma mansoni* TEGUMENT INTERACT WITH LOW DENSITY LIPOPROTEIN (LDL)

Adriana S. A. Pereira^b, Natália L. Cavalcanti^b, José L. Lima-Filho^{a,b}, Maria E. C.
Chaves^{a,b}

^a Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco;

^b Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco;

Corresponding Author:

Maria Elizabeth Cavalcante Chaves

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco

Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco

Rua Professor Moraes Rego, S/N

CEP 50670-901

Telephone number: + 55 81 2126 8540

Fax: + 55 81 21268484

4.1 ABSTRACT

Mechanisms have been proposed for explaining the *Schistosoma mansoni* survival and one of them is the acquisition of host plasma lipoproteins. In this work, tools were used for studying the LDL interaction with the *S. mansoni* and the identification of the LDL-binding protein. Worms were incubated in RPMI 1640, 10% of LPDS, 40 µg LDL/ml during 30, 60 and 120 min. Controls were done without LDL. Crude protein extract was prepared. IEF, SDS-PAGE and Western blotting were used. Proteins were identified with MW and pI of 55.5 kDa and 5.12; 28.5 kDa and 7.17. The results showed a bigger interaction of LDL with the dorsal medial region of the parasite. Aggregates of lipoproteins were also observed. The size of the LDL diminished with the time of incubation, suggesting that the reduction can be due to the capture and use of the lipids by the worm.

Keywords: Schistosoma, Lipoproteins, *Schistosoma mansoni*, Interaction of LDL

4.2 INTRODUCTION

Shistosomiasis is an infectious disease caused by the trematode flatworms of the genus *Schistosoma* (Knudsen et al, 2005). The schistosomiasis *mansoni* is an endemic disease in some parts of South and Central America and Africa, being an important cause of morbidity with a very significant effect on the economy and welfare in tropical and subtropical countries (Van Balkom et al, 2005). In Brazil, around 12 millions people are infected by the *S. mansoni*, the prevalence is increasing in some areas of the Southeast, Center-West and mainly, in the Northeast (Barreto, 1991; Carmo and Barreto, 1994; WHO, 1998; Rey, 2001). Approximately 10% of the infected people suffer of chronic disease with impaired liver function (Gobert et al, 2003).

The longevity of adult worms of *S. mansoni* can be considered as depending on two factors, a successful adjustment to the environmental conditions in the mesenteric veins of the host and an effective immune evasion strategy to the host's humoral and/or cellular effectors (Tempone et al, 1997). Some mechanisms have been considered to explain the survival of the parasite in the hosts: immunosuppression, protection of the tegument for the presence of lipid bilayer and acquisition of host antigens (Chiang and Caulfield, 1989). Although the adult worms display a functional gut which is involved in the ingestion and digestion of whole cells and presumably macromolecules, there is an intense traffic of small molecules through the tegument of these organisms (Tempone et al, 1997). The lipids for all of schistosome's membranes, including the tegumental membranes, must be derived from the host because the parasite do not synthesize cholesterol and fatty acids *de novo* (Bennett and Caulfield, 1991), leading to believe that they are acquired from host plasma lipoproteins. Beside the fact that lipids are transferred from host to parasite, the LDL molecules bound to the external surface

of the tegument, confer an extra advantage to the schistosomes, they mask or hide antigens recognized by human anti-schistosomal antibodies, avoiding the immune system attack. It was previously shown that the binding of LDL to the surface of schistosomula inhibits the binding of human anti-schistosomal antibodies (Chiang and Caulfield, 1989). Lipoproteins in human serum (HS) and purified LDL, very low-density lipoprotein (VLDL), and apolipoprotein B (apo B) were demonstrated on the surface of schistosomula of *Schistosoma mansoni* by fluorescence and immunoelectron microscopy using a polyclonal goat anti-human apolipoprotein B antibody (anti-apo B) (Chiang and Caulfield, 1989). The specific binding of human LDL to schistosomula is mediated by GPI-linked low molecular weight proteins (17.8 ± 0.8 and 15.7 ± 0.6 kDa), in intact schistosomula, that are continually synthesized and transported to the parasite surface (Xu and Caulfield, 1992). Previous studies have shown evidence that a brief contact of human serum with schistosomula of *S. mansoni*, intermediate the expression of a protein dublet of 45 kDa on the surface of the tegument, which bound human LDL. LDL binding proteins with 60, 35 and 14 kDa were evidenced in the tegument of adult *Schistosoma mansoni* (Tempone et al, 1997). A 43 kDa putative LDL receptor from *Schistosoma japonicum* adult worms has also been identified (Rogers et al, 1990).

Recently, a polyhistidine-tagged recombinant tegumental protein *S. japonicum* very low density lipoprotein binding protein (SVLBP) from adult *Schistosoma japonicum* was used to vaccinate mice. The worm numbers and egg deposition recovered from the livers and veins of the immunized mice were 33.5% and 47.6% less than that from control mice. There was also a marked increase in the antibody response in vaccinated mice (Gan et al, 2006).

In this work, it was investigated the presence of a LDL binding protein in the adult worm of the *Schistosoma mansoni* by 2D electrophoresis and immunoblotting using anti-human LDL antibody.

4.3 MATERIALS AND METHODS

4.3.1 Animals

Male swiss mice 60 days old were kept in a temperature (26 °C) and exposed to a 12 h light and dark cycle. All animal procedures were done in accordance with approved ethical and biosafety protocols.

4.3.2 Sample preparation for two-dimensional electrophoresis and scanning electron microscopy

Adult worms of *S. mansoni* were obtained from mice infected with 100 cercariae (SLM strain) after 50 days of the infection. It was done a perfusion of the hepatic portal system with saline solution (0.85% of NaCl, p/v) (Duvall & Dewitt, 1967) for withdrawal of the worms. Subsequently, the worms were washed with phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4 and stored at -20°C for the preparation of the insoluble extract or incubated with culture medium RPMI 1640 and fixed with glutaraldehyde 2.5% (v/v) in 0.1 M sodium cacodylate buffer for scanning electron microscopy. The preparation of extracts of the adult worms was made in accordance with the procedure recommended for Görg *et al.* (1988).

4.3.3 Two-dimensional (2D) electrophoresis

Insoluble extract samples were solubilized in rehydration solution containing 9M urea, 0,5% (w/v) 3-[(3-Cholamidopropyl) – dimethylammonium] – propane-sulfonate (CHAPS), 0,2% (w/v) dithiothreitol (DTT), 0,5% (v/v) IPG buffer (pH 3-10) e 0,002% de bromophenol blue. Samples for the 2D (200 µg of protein, quantified by Lowry *et al.*, 1951) were prepared mixing the samples in 125 µl of rehydration solution, which were

applied to 7 cm immobilized linear gradient of pH 3–10 strip, respectively. The strips were kept at room temperature for overnight rehydration. Isoelectrofocusing (IEF) was performed in three steps (1-200V, 0.0001 kVh; 2- 3500V, 2.8 kVh; 3- 3500V, 3.7 kVh). Proteins were subjected to IEF in a Multiplhor II system (GE Healthcare, USA) connected to a thermostatic circulator (GE Healthcare, USA).

The focused strips were equilibrated with 6M urea, 30% glycerol, 50 mM Tris-HCl (pH 8.8), 2% SDS, 65 mM DTT for 15 min, alkylated with 135 mM iodoacetamide in the same above solution without DTT for another 15 min and directly applied on the top of a 10% polyacrylamide gel (14% T, 2.6% C). For the second dimension, SDS-PAGE was performed at constant current (20 mA per gel) using a vertical system. Proteins were revealed by Coomassie Blue. Image analysis was performed using the Image Master® software (Amersham Biosciences, Sweden). The reproducibility and pattern quality of each set of 2D gel was evaluated by conducting three independent experiments.

4.3.4 Immunoblotting

Proteins were transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes at constant current of 100mA, during 1h according to Towbin et al. (1979). After blotting, membranes were incubated overnight at 4°C in PBS (pH 7.4) containing 3% casein. Subsequently, the membranes were washed 3 times with PBS (pH 7.4) and incubated for 2h at room temperature with 1:10 diluted human serum in PBS (pH 7.4). Then, the membranes were washed 3 times with PBS and incubated in a 1:1000 diluted chicken anti-low density lipoprotein (LDL) affinity purified polyclonal antibody (CHEMICON INTERNATIONAL) in PBS for 2h at room temperature, washed 3 times with PBS and incubated in a 1:1000 diluted anti-chicken IgY (IgG) peroxidase conjugate (SIGMA) in

PBS for 2h at room temperature. The membranes were washed thoroughly with PBS and the proteins visualized by the use of TMB substrate [10mM tetramethylbenzidine (TMB), 18mM sodium dioctyl-sulfosuccinate in 25% (v/v) ethanol, 50mM citric acid, 90mM sodium phosphate monobasic and 40 μ L of hydrogen peroxide. The reaction was finished with the addition of distilled water. The analysis of the 2D electrophoresis gel and immunoblotting were made through the digitization of the images caught in ImageScanner II (GE Healthcare, the USA).

4.3.5 Scanning electron microscopy

Immediately after the withdrawal, worms were divided in 7 groups, each one with 5 parasites. The worms were incubated in times of 0, 30, 60 and 120 min, in culture plate (24 wells), with 1 ml of RPMI 1640 medium, containing free lipoprotein serum (LPDS) and 40 μ g de LDL/mL, obtained for ultracentrifugation (Havel et al, 1955). Controls without LDL were also included.

After incubation, male adults worms of *S. mansoni* were transferred to Ependorff tubes (1.5 ml), washed 2 times with PBS buffer pH 7.4, fixed with glutaraldehyde 2.5% (v/v) in sodium cacodylate 0.1 M buffer and prepared for scanning electron microscopy. Briefly, worms were washed 3 times with 0.1 M sodium cacodylate buffer, incubated in osmium citrate 2% (p/v) for 30 minutes, washed 3 times with distilled water. Subsequently, samples were dehydrated once with ethanol 30%, 50%, 70%, 90% and 3 times with ethanol at 100%, during 10 minutes each time. The worms separated by groups, were placed in supports, metallized with gold for visualization in the scanning electron microscopy JEOL-JSM-5600 LV, Electron Microscope (Storey & Ogbogu, 1991).

4.4 RESULTS

4.4.1 Viability of the adult worms - The Fig. 1 shows electronic micrographs of the medial dorsal region of the *Schistosoma mansoni* adult male worms incubated in RPMI 1640 without the presence of LDL, at the times of 0, 30, 60 and 120 min of incubation. None morphological alteration was seen in the surface of the worms due to the prolonged time of incubation. It was also observed that the incubation of the worms with human LDL did change neither the morphology nor the capacity of the male worm to interact with the female in the gynecophoral canal (Fig. 2A). The Fig. 2B and 2C show well preserved structures of ventral and oral suckers, respectively, after 60 min incubation with LDL in RPMI 1640 medium. The central and the intermediate zone, as well as the edge of the ventral sucker are seen in Fig. 2D. They do not differ from the same structures of worms incubated in RPMI 1640 medium without LDL.

4.4.2 Interaction of the LDL with the tegument of the *Schistosoma mansoni* - The study of the tegument in the three main regions (anterior, medial and posterior) of the adult male worms of the *S. mansoni* demonstrated marked differences between them. After LDL incubation of 30, 60 e 120 min with the *S. mansoni* tegument, the specimens were treated to scanning electron microscopy. The analysis of the material showed LDL particles bound to the surface of the tegument in the anterior, medial and posterior regions of the male adult worm of *S. mansoni* (Fig. 3A, 3B, 3C and 3D). It is worthwhile to observe the distribution of the LDL particles around the tubercles on the ridges and groves and the increased number of particles in the dorsal medial and posterior region, when compared with the anterior region. It was not observed lipoprotein binding on spines.

In this work, it was observed a larger number of LDL particles on the dorsal regions of male adult worm of *S. mansoni* than in the ventral ones. Aggregates of LDL particles were noticed on the tegument in the incubations times of 30 (Fig. 4A and 4B) and 60 min. Those aggregates have diminished when the incubations were done during 120 min (Fig. 4C and 4D). The comparison between 30 and 120 min of incubation showed that the particles size have also diminished, 2,650 – 860nm to 634 – 363 nm, respectively. It is noticed the presence of numerous porous on the tegument surface, which may act in the absorption of nutrients.

The posterior region of the tegument presents a more furrowed aspect than the other regions of the worm with a bigger concentration of tubercles and spines (Fig. 5A). Bulges are found between the grooves, suggesting growth of new tubercles (Fig. 5A and 5B). In this region was not observed intense interaction of lipoproteins with the surface of the worm as seen in the medial region.

The gynecophoral canal of the male adult worm houses the female for reproduction. Small spines emerge from innumerable porous constituting a uniform layer (Fig. 5C). It is possible to observe that as much as bigger is the amount of spines and tubercles in the surface of the worm, smaller will be the interaction with the lipoprotein particles. It was seen a small quantity of LDL in the gynecophoral canal with incubation of 120 min (Fig. 5D).

4.4.3 2D-electrophoresis and Immunoblotting - The protein profile of the crude extract of *S. mansoni* was obtained through two-dimensional electrophoresis. A bigger concentration of proteins was found in a pH range of 4.5 to 8.5 (Fig. 6A). Two bands were identified, a protein with apparent molecular weight of 55.5 kDa and isoelectric point (pI) of 5.12 and to another band with molecular weight of 28.5 kDa and pI 7.17

(Fig. 6B). The SDS-PAGE and western blotting were analyzed (Fig. 7A and 7B) using the program Image Master® software (GE Healthcare,USA). This program created matching algorithm that compares gel images to find matches between related spots, that is, spots representing the same protein in the gels. Thus, locating in the gel two corresponding proteins the bands found in immunoblotting.

4.5 DISCUSSION

The adult worm of *S. mansoni* does not possess some essential metabolic routes, which disable them to synthesize important compounds for its development. These parasites neither synthesize long chain fatty acid, nor sterols. However, the literature (Bennett and Caulfield, 1991; Tempone et al, 1997; Loukas et al, 2001; Fan et al, 2003) indicates that they are dependents on such molecules for the modulation of its membranes, which are in constant changes. Thus, it is evident that mechanisms for transference of lipids or precursors of lipids between the definitive host and the parasite must exist. The incapacity to synthesize fatty acids and cholesterol, the presence of these lipids in their membranes, the constant renovation of such membranes and the relatively long permanence of the worm in the host organism, come awaking the interest of many researchers in studying the origin of such molecules (Chiang and Caulfield, 1989; Furlong, 1991; Rogers, 1991; Krieger and Herz, 1994; Brouwers et al, 1998; Fan et al, 2003).

The adsorption of proteins to a membrane surface is a complex process, where different forces act including: affinity of the proteins for the parasite surface; intermolecular attraction and repulsion forces; lateral diffusion of the adsorbed proteins and the conformational modification that the proteins could undergo upon adsorption. Several physicochemical characteristics of a surface (i.e. hydrophobicity, electrical charge, chemical reactivity and topology) have an effect on the adsorption process (Minton, 2000; Ravichandran and Talbot, 2000; Mejia et al, 2004). The transport process across parasite cell membranes must assume important role since these organisms have to compensate their biosynthetic deficiencies incorporating a variety of metabolites and precursors (Rumjanek et al, 1985). Thus, in the case of schistosoma, the

solutes traffic across the tegument must be very intense during all stages of the parasite development after infection in human and others mammals. Although the adult parasites possess a primitive gut where red cells can be digested, small molecule adsorption occurs through the tegument (Uglen and Read, 1975; Rumjanek et al, 1985). In this work, human LDL bound to the tegument of adult male worms of *S. mansoni*. Long term incubations (120 min) caused a decrease of approximately 30% of the original particles size in the beginning of the experiments. Our results bear the opinions of others authors (Xu and Caulfield, 1992) concerning to the capture and internalization of lipids by the schistosoma, which seems to be independent of endocytosis. Thus, without endocytosis the incorporation of lipids must occur as a direct transference enters the LDL and the membrane of the parasite (Tempone et al, 1997). However, it can not be excluded the possibility of LDL internalization in *Schistosoma mansoni* through LDL receptors in a way similar or not to human receptors. New experiments must be done to clarify this question. The time required to stimulate the expression of LDL binding protein on the surface of the adult worm is very short (Rumjanek et al, 1985; Rumjanek et al, 1988), causing to the immediate capture of lipids.

The literature demonstrates that many parasites request host lipoproteins for their survival. One of the first reports about the request of host lipoproteins by parasites came from a study with *Trichomonas vaginalis*. Axenic culture of trypanosomes was dependent upon supplementation with various serum components for optimal parasite growth, particularly lipoproteins (Peterson and Alderete, 1984; Rogers, 1991).

The LDL particles distribution on the male adult worm of *S. mansoni* was not uniform, being more concentrated on the dorsal medial region, meanwhile in the anterior and posterior regions, they were scarcely distributed. The gynecophoral canal is considered a contact zone male-female and can also serve to transfer free amino acids

and other small molecules through easy diffusion (Senft and Gibler, 1977), it does not seem to capture lipids through the mechanism of LDL binding, probably due to absent of receptors in this region.

The presence of many aggregates of LDL may have been caused by the ability of the lipoproteins to self-assemble into homogeneous particles of identical size composition (Shih et al, 2007). The manner through which lipoprotein particles assemble has not yet been understood. Computational methods, such as molecular dynamic (MD) offer the only form to identify this mechanism. Simulation has been used successfully to explain this assembly of micelle around of the membrane (Bond et al, 2005; Psachoulia et al, 2006).

The binding of LDL to its receptor in *S. mansoni* is inhibited by polyanions (Chiang and Cauldfield, 1989), in the present work one of the LDL binding proteins found in the western blotting had pI 5.1 what means that in the blood circulation it exist with negative charges. In this way, the interaction with the receptor would be electrostatic.

It was also observed that schistosomula, expressed a protein of 45 kDa when in contact with the human serum (Rumjanek et al, 1983). Adult worms of *S. japonicum* presented a supposed receptor for LDL human, with molecular weight apparent of 43 kDa, which was present in the tegument and the gut of the parasites (Rogers et al, 1989). It was related the discovery of three LDL binding proteins in the adult worm of *S. mansoni* whose molecular weight were 60, 35 and 14 kDa (Tempone et al, 1997). The presence of two LDL-binding proteins (55 and 28 kDa) in our work in relation to others studies can be due to different methodologies used that can partially break the protein structure and/or to the different stages of the parasite's life.

Results from transmission electron microscopy of the adult worms of *S. mansoni* suggest that the lipoproteins particles can be internalized for the receptor or dispersed in the tegument of the worm waiting stimulation for arising to the surface of the parasite (Rumjanek et al, 1985). Considering that the LDL human presents the capacity to interact with the surface of adult worms of *S. mansoni*, studies must be developed aiming at to clarify the mechanism of interaction of the LDL and the function of the lipoprotein in the supply of lipids for the formation of the membranes of the parasite.

4.6 ACKNOWLEDGMENTS

This work was financially supported by CNPq and CAPES. The authors would like to thank Mr. Rafael Padilha, Mr. Felipe Viegas and Mr. Sérgio Santos for the technical assistance.

4.7 REFERENCES

Barreto, M. L., 1991. Geographical and socioeconomic factors relating to the distribution of *Schistosoma mansoni* infection in an urban area of north-east Brazil. Bulletin of the World Health Organization 69, 93-102.

Bennett, M.W., Caulfield, J.P., 1991. Specific binding of human low-density lipoprotein to the surface of *Schistosoma mansoni* and ingestion by the parasite. American Journal of Pathology 138, 1173-1182.

Bond, P.J., Curhbertson, J., Sansom, M.S.P., 2005. Simulation studies of the interactions between membrane proteins and detergents. Biochemical Society Transactions 33, 910-912.

Brouwers, J.F.H.M., Van Hellemond, J.J., van Golde, L.M.G., Tielens, A.G.M., 1998. Ether lipids and their possible physiological function in adult *Schistosoma mansoni*. Molecular and Biochemical Parasitology 96, 49-58.

Carmo, E.H., Barreto, M.L., 1994. *Schistosomiasis mansoni* in Bahia, Brazil: historical trends and control measures. Caderno de Saúde Pública 10, 425-439.

Chiang, Chun-Pin, Caulfield, J.P., 1989. Human lipoprotein binding to schistosomula of *Schistosoma mansoni*. Displacement by polyanions, parasite antigen masking, and persistence in young larvae. American Journal of Pathology 135, 1015 – 1024.

Chiang, Chun-Pin, Caulfield, J.P., 1989. The binding of human low-density lipoproteins to the surface of Schistosomula of *Schistosoma mansoni* is inhibited by polyanions and reduces the binding of anti-schistosomal antibodies. American Journal of Pathology 134, 1007-1017.

Duvall, R.H., Dewitt, W.B., 1967. An improved perfusion technique for recovering adult schistosomes from laboratory animals. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 16, 483.

Fan, J., Gan, X., Yang, W., Shen, L., McManus, D. P., Brindley, P.J., 2003. A *Schistosoma japonicum* very low-density lipoprotein-binding protein. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 35, 1436 – 1451.

Furlong, S.T., 1991. Unique roles for lipids in *Schistosoma mansoni*. Parasitology Today 7, 59-62.

Gan, Xiao-Xian, Shen, Li-Ying, Wang, Y., Ding, Jian-Zu, Shen, Hui-Ying, Zeng, Xiao-Peng, McManus, D.P., Brindley, P.J., Fan, J. 2006. Recombinant tegumental protein *Schistosoma japonicum* very low-density lipoprotein binding protein as a vaccine candidate against *Schistosoma japonicum*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 101, 9-13.

Gobert, G.N., Stenzel D.J., McManus, D.P., Jones, M.K., 2003. The ultrastructural architecture of the adult *Schistosoma japonicum* tegument. International Journal for Parasitology 33, 1561-1575.

Görg, A., Postel, W., Günther, S., 1988. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 9, 531-546.

Havel, R.J., Eder, H.A., Bragdon, J.H., 1955. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *The Journal of Clinical Investigation* 34, 1345-1353.

Knudsen, G.M., Medzihradsky, K.F., Lim, Kee-Chong, Hansel, E., McKerrow, J.H. 2005. Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* cercarial secretions. *Molecular & Cellular Proteomics* 4, 1862-1875.

Krieger, M., Herz J., 1994. Structure and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annual Review of Biochemistry* 62, 601- 637.

Loukas, A., Jones, M.K., King, L.T., Brindley, P.J., McManus, D.P., 2001. Receptor for Fc on the surfaces of schistosomes. *Infectious Immunology* 69, 3646-3651.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.

Mejia, J.S., Moreno, F., Muskus, C., Vélez, I.D., Titus, R.G., 2004. The surface-mosaic model in host-parasite relationships. *Trends in Parasitology* 20, 508-511.

Minton, A.P., 2000. Effects of excluded surface area and adsorbate clustering on surface adsorption of proteins I. Equilibrium models. *Biophysical Chemistry* 86, 239-247.

Peterson, K.M., Alderete, J.F., 1984. Selective acquisition of plasma proteins by *Trichomonas vaginalis* and human lipoproteins as a growth requirement for this species. *Molecular and Biochemical Parasitology* 12, 37-48.

Psachoulia, E., Bond, P.J., Sansom, M.S.P., 2006. MD simulations of mistic: conformational stability in detergent micelles and water. *Biochemistry* 45, 9053-9058.

Ravichandran, S., Talbot, J., 2000. Mobility of adsorbed proteins: A Brownian dynamics study. *Biophysical Journal* 78, 110-120.

Rey, L., 2001. *Parasitologia médica*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Rogers, M.V., 1991. Do Parasites express receptors for host lipoproteins? *Parasitology Today* 7, 117-120.

Rogers, M.V., Henkle, K.J., Fidge, N.H., Mitchell, G.F., 1989. Identification of a multispecific lipoprotein receptor in adult *Schistosoma japonicum* by ligand blotting analyses. *Molecular Biochemistry Parasitology* 35, 79-88.

Rogers, M.V., Quilici, D., Mitchell, G.F., Fidge, N.H., 1990. Purification of a putative lipoprotein receptor from *Schistosoma japonicum* adult worms. *Molecular and Biochemical Parasitology* 41, 93-100.

Rumjanek, F.D., Campos, E.G., Afonso, L.C., 1988. Evidence for the occurrence of LDL receptors in extracts of schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Molecular Biochemistry Parasitology* 28, 145-152.

Rumjanek, F.D., McLaren, D.J., Smithers, S.R., 1983. Serum-induced expression of a surface protein in *Schistosoma mansoni*: a possible receptor for lipid uptake. *Molecular and Biochemical Parasitology* 9, 337-350.

Rumjanek, F.D., Pereira, M.A.C., Silveira, A.M.V., 1985. The interaction of human serum with the surface membrane of Schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 14, 63-73.

Senft, A.W., Gibler, W.B., 1977. *Schistosoma mansoni* tegumental appendages: scanning microscopy following thiocarbohydrazide-osmium preparation. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 26, 1169-1177.

Shih, A.Y., Freddolino, P.L., Arkhipov, A., Schulten, K., 2007. Assembly of lipoprotein particle revealed by coarse-grained molecular dynamics simulations. *Journal of Structural Biology* 157, 579-592.

Storey, D.M., Ogbogu, V.C., 1991. Observations on third-stage larval and adults of *Litomosoides carinii* (Nematoda: Filarioidea) by scanning and transmission electron microscopy. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 85, 111-121.

Tempone, A. J., Bianconi, M. L., Rumjanek, F. D., 1997. The interaction of human LDL with the tegument of adult *Schistosoma mansoni*. Molecular and Cellular Biochemistry 177, 139 – 144.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications". Proceedings of the National Academy of Sciences 76, 4350-4354.

Uglen, G.L., Read, C.P., 1975. Sugar transport and metabolism in *Schistosoma mansoni*. Journal of Parasitology 61, 390-397.

Van Balkom, B.W.M., Van Gestel, R.A., Brouwers, J.F.H.M., Krijgsveld, J., Tielens, A.G.M., Heck, A.J.R., Van Hellemond, J.J., 2005. Mass spectrometric analysis of the *Schistosoma mansoni* tegumental sub-proteome. Journal of Proteome Research 4, 958-966.

WHO, 1998. Report of the WHO Informal Consultation on Schistosomiasis Control http://www.who.int/ctd/schisto/99_2en.pdf.

Xu, X., Caulfield J.P., 1992. Characterization of human low density lipoprotein binding proteins on the surface of schistosomula of *Schistosoma mansoni*. European Journal of Cell Biology 57, 229-235.

4.8 FIGURE CAPTIONS

Figure 1 – Electron micrographs of the medial dorsal region in the *Schistosoma mansoni* tegument. Male adult worms were incubated with RPMI 1640 medium, supplemented with LPDS in the following times: (A) 0 min (control); (B) 30 min; (C) 60 min; (D) 120 min. As observed, the tegument was completely preserved in the tubercles, spines, ridges and grooves. (A: Bar=20 μ m; B, C and D: Bar=10 μ m).

Figure 2 - Ultrastructure of the anterior region and suckers of the male adult worm of *Schistosoma mansoni* incubated with LDL for 60 min. (A) Anterior region with oral and ventral suckers, observing still a female in the gynecophoral canal; (B) Ventral sucker; (C) Oral sucker; (D) Detail of the ventral sucker re-covered by a layer of spines. (A: Bar=100 μ m; B: Bar=50 μ m; C: Bar=20 μ m and D: Bar=10 μ m).

Figure 3 – Electron micrographs of the tegument of adult worms of *Schistosoma mansoni* incubated with human LDL for 30 min. Dorsal areas of the anterior (A), medial (B and C) and posterior (D) regions. LDL particles are seen on the surface of the tegument. (A, B and C: Bar=5 μ m and D: Bar=10 μ m).

Figure 4 - Electron micrographs of dorsal regions of *S. mansoni* worms showing the sizes of LDL particles after the incubations. 30 min incubation: (A) Large LDL particles bound to the tegument; (B) Particles size ranging from 2,650 to 860 nm; 120 min incubation: (C) Small LDL particles; (D) Particles size ranging from 634 to 343 nm. (A: Bar=5 μ m; B: Bar=2 μ m and C, D: Bar=1 μ m).

Figure 5 - Scanning electron micrographs of the posterior region and gynecophoral canal of the adult male worm of *Schistosoma mansoni*. (A and B) Posterior region not presenting significant interaction of LDL particles, incubation of 60 min with LDL; (C) Surface of the gynecophoral canal; (D) Gynecophoral canal presenting a small number of LDL particles, 120 min of incubation. (A, B and D: Bar=10 μ m; C: Bar=2 μ m).

Figure 6 – Two-dimensional (2-D) electrophoresis and Immunoblotting on PVDF sheets of insoluble fraction of *Schistosoma mansoni*. (A) Protein profile of the crude extract of adult worms of *S. mansoni* in 2D electrophoresis. 200 μ g of protein were applied to IPG strips of pH 3-10. (B) Two bands of protein with apparent molecular weight (MW) of 55.5 kDa and isoelectric point (pI) of 5.12 and to another with MW 28.5 kDa and pI 7.17. 200 μ g of protein were applied and the proteins transferred to a PVDF membrane at constant current of 100mA, during 1h.

Figure 7 – Identification of LDL binding proteins of adult worms of *Schistosoma mansoni* with SDS-PAGE and western blotting techniques. (A and B) Image analysis of the SDS-PAGE and Immunoblotting using the program Image Master® software (GE Healthcare,USA) and identification of two binding proteins of LDL.

4.9 FIGURES

Figure 1

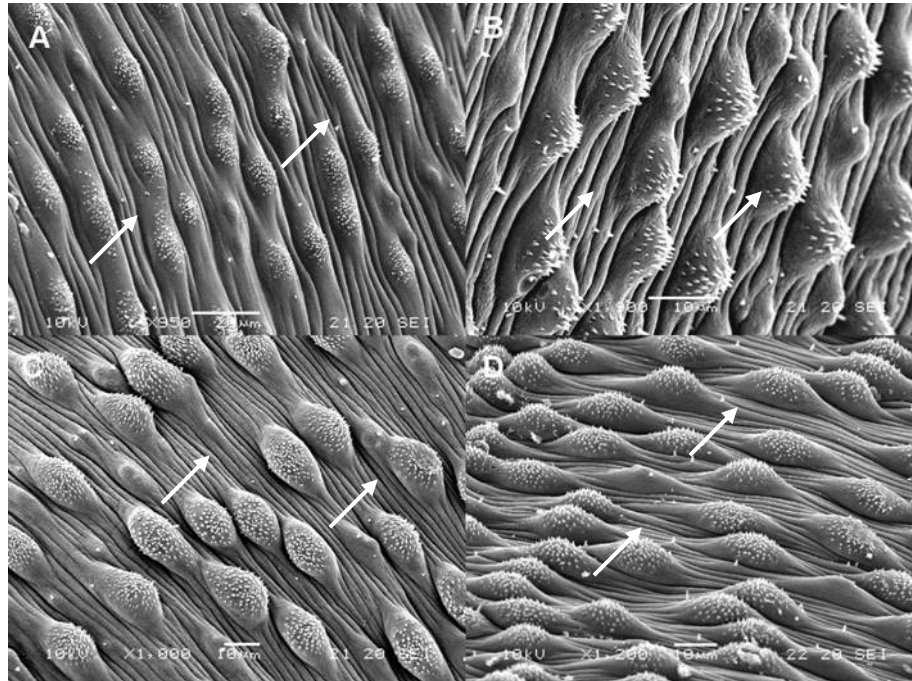


Figure 2

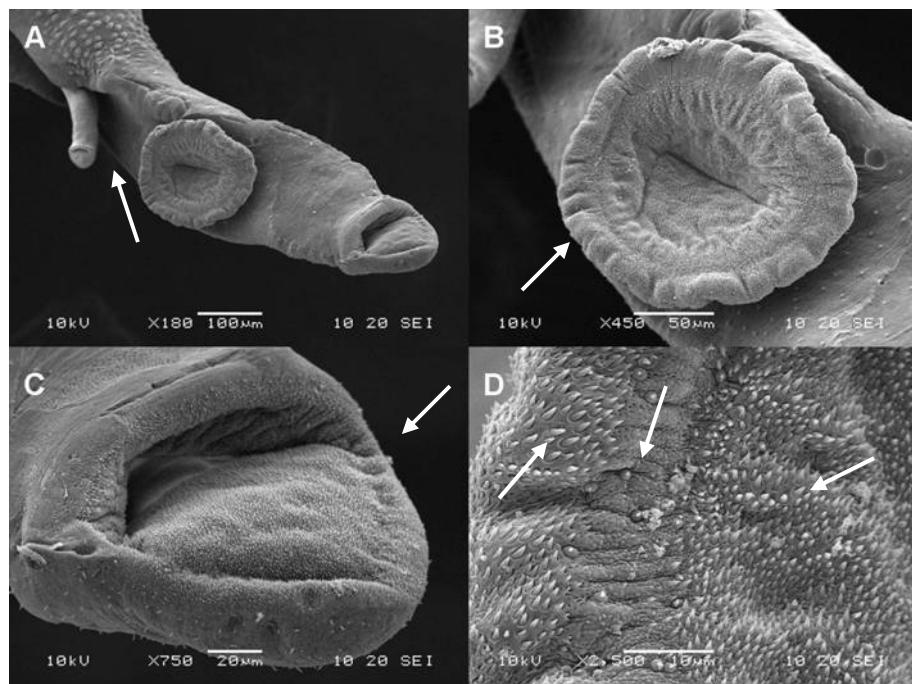


Figure 3

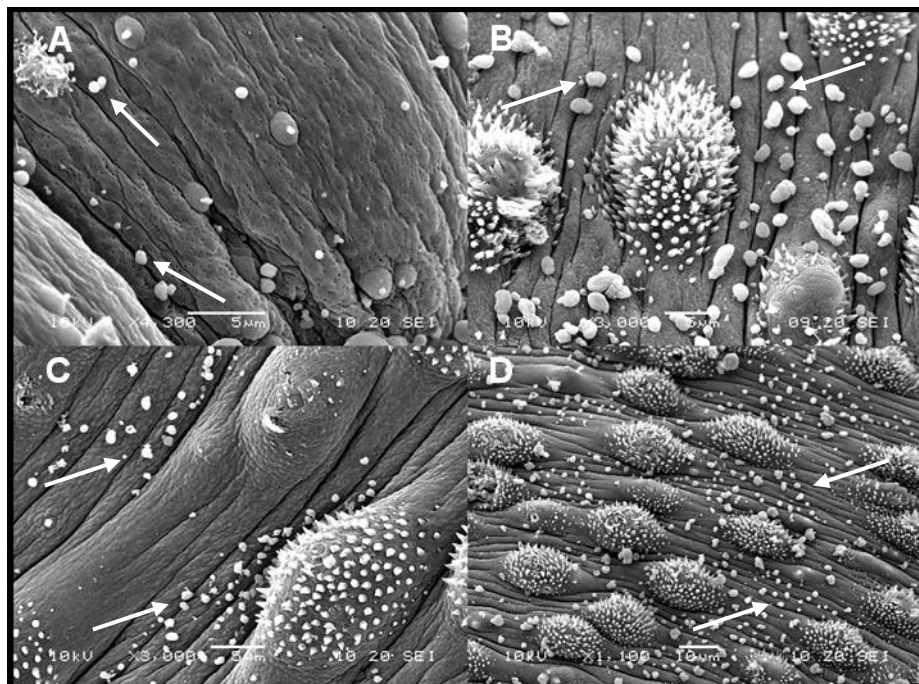


Figure 4

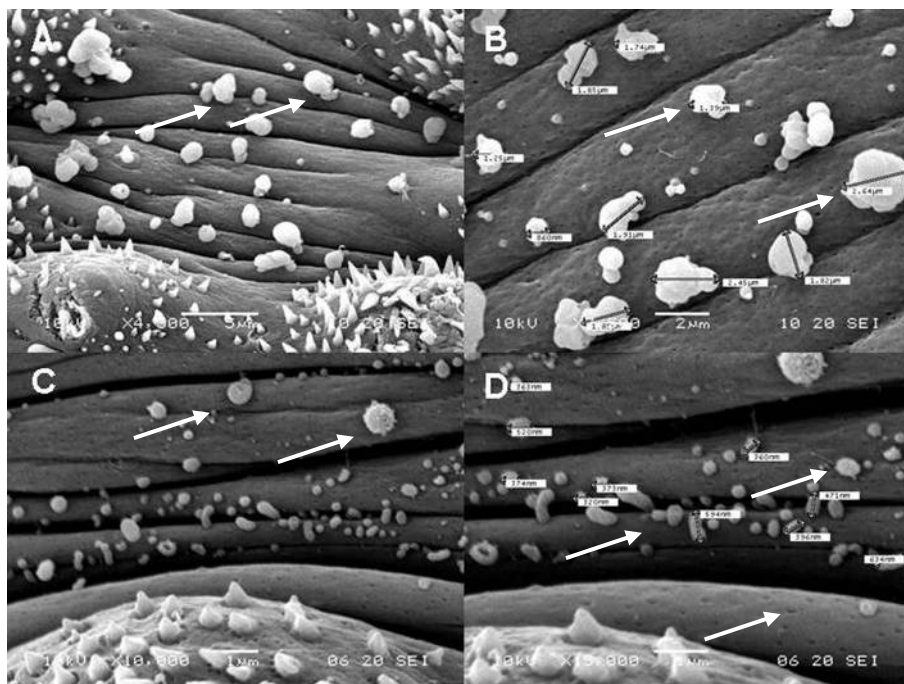


Figure 5

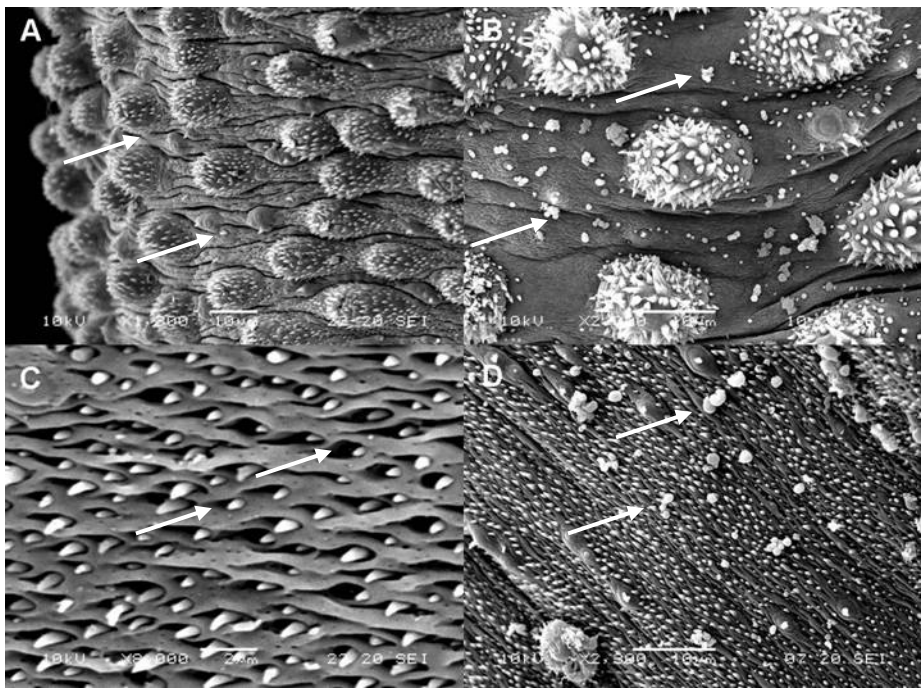


Figure 6

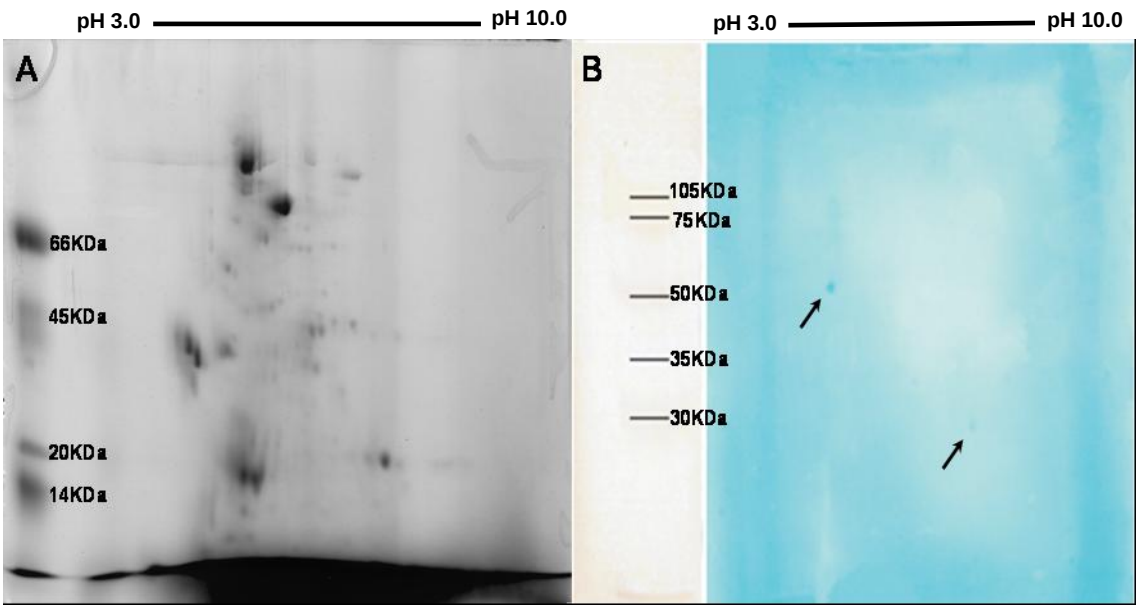
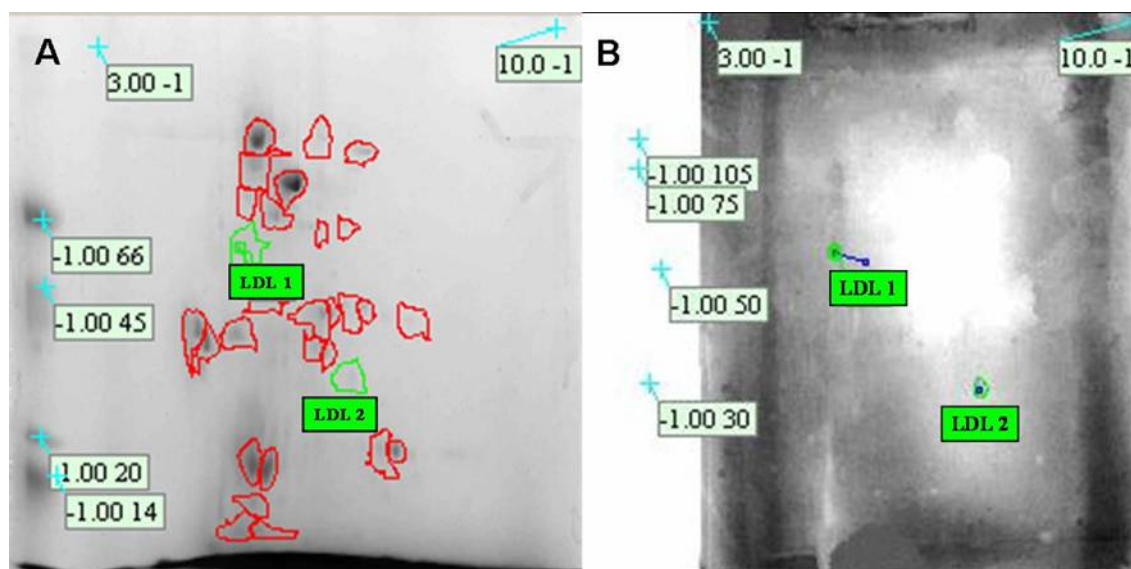


Figure 7

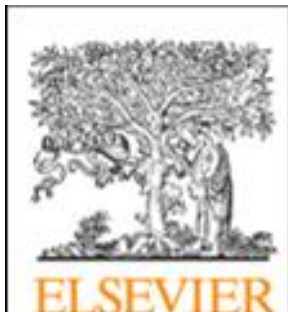


5. CONCLUSÃO

- ◆ Lipoproteínas de baixa densidade (LDL) se ligam ao tegumento do verme adulto macho de *Schistosoma mansoni*;
- ◆ A maior interação das partículas de LDL ocorre na região dorsal mediana do tegumento do verme;
- ◆ A região posterior apresenta uma menor interação com lipoproteínas;
- ◆ Na região anterior aparentemente não há ligação de lipoproteínas, assim como no canal ginecóforo;
- ◆ Com o uso das técnicas de eletroforese bi-dimensional e Immunoblotting foram reconhecidas duas proteínas ligantes de LDL por ligação específica com anticorpo anti-LDL, com peso molecular de 55,5 kDa e 28,5 kDa e ponto isoelétrico de 5,12 e 7,17, respectivamente.

6. ANEXOS

6.1 Normas para redação de artigos para a revista “Experimental Parasitology”



Guide for Authors

Experimental Parasitology

Editorial Office

525 B Street, Suite 1900

San Diego, CA 92101-4495, USA

Tel: (619) 699-6421; Fax: (619) 699-6700

E-mail: ep@elsevier.com

Experimental Parasitology publishes research papers, research briefs, and capsule reviews on topics that are at the experimental forefront of parasitology.

Submission of Manuscripts

Research papers and briefs are not solicited, but should be submitted to the Editors. Minireviews are invited and topics should be submitted to the Editors for consideration. Manuscripts must be written in English.

Authors are requested to submit their papers electronically by using online manuscript submission available at <http://ees.elsevier.com/ep>. This site will guide authors step by step through the submission process. Authors can upload their articles as LaTeX, Microsoft (MS) Word, or WordPerfect files. It is also possible to submit an article in PostScript or Adobe Acrobat PDF format, but if the article is accepted, the original source files will be needed. If you submit a word processing file, the system generates an Adobe Acrobat PDF version of the article, which is used for the reviewing process.

Authors, reviewers, and editors send and receive all correspondence by e-mail and no paper correspondence is necessary.

You will be asked to submit:

- Cover Letter: Document (Word, WordPerfect, RTF, PDF, LaTeX) containing your cover letter to the Editors.

- Response to Reviews (Resubmissions Only): Document (Word, WordPerfect, RTF, PDF, LaTeX) detailing your response to the reviewers' and editor's comments of a previously rejected manuscript that you are resubmitting.
- Manuscript: Single word processing (Word, WordPerfect, RTF) or LaTeX file consisting of the title page, abstract, manuscript text, and any figure/table legends.
- Table: Tables should be separate from the manuscript text, and can be uploaded individually or consolidated into a single file. The file description you input below when uploading your table must include the table number or range (e.g., Table 1, Tables 2-4).
- Figure: Figures should be uploaded individually as TIF or EPS files. While other figure formats are allowed by the system (GIF, JPEG, Postscript, PICT, PDF, Excel, and PowerPoint), they will delay the production process, should your manuscript be accepted. The file description you input below when uploading your figure must include the figure number (e.g., Fig. 2A).

Authors in Japan kindly note that, upon request, Elsevier Japan will provide a list of people who can check and improve the English of an article before submission. Contact our Tokyo office: Elsevier, 4F Higashi-Azabu, 1 Chome Bldg., 1-9-15 Higashi-Azabu, Minato-ku, Tokyo 106-0044, Japan; tel.: +81-3-5561-5032; fax: +81-3-5561-5045; e-mail: jp.info@elsevier.com.

Please submit the names and addresses, including e-mail addresses, of three to five potential reviewers of their paper to facilitate and accelerate editorial handling. There are no submission fees or page charges.

Manuscripts are accepted for review with the understanding that no substantial portion of the study has been published or is under consideration for publication elsewhere and that its submission for publication has been approved by all of the authors and by the institution where the work was carried out. Manuscripts that do not meet the general criteria or standards for publication in *Experimental Parasitology* will be immediately returned to the authors, without detailed review.

Upon acceptance of an article, authors will be asked to transfer copyright (for more information on copyright, see <http://www.elsevier.com/authors>). This transfer will ensure the widest possible dissemination of information. A letter will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript. A form facilitating transfer of copyright will be provided after acceptance.

If material from other copyrighted works is included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: contact Elsevier Global Rights Department, P.O. Box 800, Oxford OX5 1DX, UK; phone: (+44) 1865 843830, fax: (+44) 1865 853333, e-mail: permissions@elsevier.com.

Preparation of Manuscripts

Manuscripts should be written in clear, concise, and grammatical English and should be typed with double-spaced lines and wide margins. The manuscript and figures will not

be returned to the authors unless specifically requested at the time of the submission. Pages should be numbered consecutively and organized as follows:

The *title page* (p. 1) should contain the article title, authors' names and complete affiliations, footnotes to the title, and the address for manuscript correspondence (including e-mail address and telephone and fax numbers). If possible, the specific designation of the parasite, followed by a colon, should precede the rest of the title. The common or scientific name of the host should appear at the end of the title (e.g., "*Neoaplectana glaseri*: infectivity of clones reared in species isolation of larvae of the insect weevil, *Hylobius pales*"). For Minireviews, the title, as described above, should be preceded by the heading Minireview.

The *abstract* (p. 2) must be a single paragraph that summarizes the main findings of the paper in less than 150 words.

Index descriptors and abbreviations. A list of keywords and phrases should follow the abstract. They should reflect the contents of the paper accurately and help to describe it to scientific nonexpert readers. The taxonomic designations of all organisms discussed in a manuscript must be included. Larger taxonomic categories should also be mentioned (e.g., in a paper on *Watsonius watsoni*, the term "trematode" should appear as an index descriptor). All abbreviations used in the body of the manuscript should be defined in this section [e.g., Deoxyribonucleic acid (DNA)]; only the abbreviation should be used thereafter. Avoid lab jargon abbreviations; use only those that have general usage and genuinely save space.

Whenever enzymes are the subject of reporting, the Enzyme Commission (EC) number must be used for accurate identification and retrieval purposes in the *Index Descriptors and Abbreviations* section. EC numbers may be found in "Recommendations (1984) of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry, 1984," *Enzyme Nomenclature* (Academic Press, Inc., 525 B Street, Suite 1900, San Diego, CA 92101-4495, USA).

Materials and methods should be sufficiently detailed to enable the experiments to be reproduced.

Results and Discussion may be combined and may be organized into subheadings.

Acknowledgments should be brief and should precede the references. Avoid footnotes. Disclaimers, funding support, and other circumstantial information should be included in the *Acknowledgments* section.

References should be cited in the text by the author's surname and date (e.g., Jones and Smith, 1987), not by number. Only articles that have been published or are in press should be included in the references. Unpublished results or personal communications should be cited as such in the text. Please note the following examples.

Becnel, J.J., 1997. Complementary techniques: preparations of entomopathogens and diseased specimens for more detailed study using microscopy. In: Lacey, L.A. (Ed.), *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Academic Press, San Diego, pp. 337-353.

Eichler, S., Schaub, G.A., 2002. Development of symbionts in triatomine bugs and the effects of infections with trypanosomatids. *Experimental Parasitology* 100, 17-27.

Tanada, Y., 1992. *Insect Pathology*. Academic Press, San Diego.

Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals in order of appearance in the text. Type each table double-spaced on a separate page with a short descriptive title typed directly above and with essential footnotes below.

Figures. Number all figures consecutively with Arabic numerals. Type the legends double-spaced in a list at the end of the manuscript. Figures should be cropped to contain only information relevant to the manuscript. Areas of major interest should not be too close to the edges of the micrograph. Magnifications must be given in the legends or a magnification scale bar must be placed within the micrograph and its dimension should be indicated in the legend. Please refer to <http://www.elsevier.com/artworkinstructions> for detailed instructions on preparing electronic artwork.

Color figures. Illustrations in color in print can be accepted only if the authors defray the cost. However, if together with your accepted article, you submit usable color figures, then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. [Please note: Because of technical complications that can arise in converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print), please submit in addition usable black-and-white files corresponding to all the color illustrations.]

Black and white figures for exclusive use as **cover illustrations** may be submitted by authors who are also submitting a manuscript for consideration. These figures do not need to relate to the manuscript being submitted but should relate to the larger scope and focus of *Experimental Parasitology*.

Each figure and table must have a descriptive legend. When figures or tables refer to parasite or host, the name of the organism should be spelled out completely at least once in each legend.

DNA sequences and GenBank accession numbers. Authors wishing to enable other scientists to use the accession numbers cited in their papers via links to these sources should type this information in the following manner: For each and every accession number cited in an article, authors should type the accession number in bold, underlined text. Letters in the accession number should always be capitalized (see example below). This combination of letters and format will enable the typesetter to recognize the relevant texts as accession numbers and add the required link to GenBank's sequences.

Example: GenBank accession nos. **AI631510**, **AI631511**, **AI632198**, and **BF223228**), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048**), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**).

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. An error in a letter or number can result in a dead link.

In the final version of the *printed article*, the accession number text will not appear bold or underlined. In the final version of the *electronic copy*, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases, enabling readers to go directly to that source from the article.

Preparation of Supplementary Material

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer additional possibilities for publishing supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips, and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect (<http://www.sciencedirect.com>). To ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. Please note, however, that supplementary material will not appear in the printed journal. Files can be stored on 3.5-inch diskette, ZIP disk, or CD (either MS-DOS or Macintosh). For more detailed instructions, please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

Proofs

PDF proofs will be sent by e-mail to the corresponding author. To avoid delay in publication, only necessary changes should be made, and corrections should be returned promptly. Authors will be charged for alterations that exceed 10% of the total cost of composition.

Abstracting and Indexing

Experimental Parasitology is covered by the following abstracting and indexing services: BIOSIS, Chemical Abstracts, Excerpta Medica, Helminthological Abstracts-Series A, Index Medicus, Institute for Scientific Information, International Abstracts of Biological Sciences, and Protozoological Abstracts.

6.2 Aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEa) da UFPE

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: (55 81) 2126 8840 / 2126 8351
Fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Ofício nº 43/07

Recife, 21 de maio de 2007

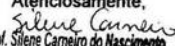
Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEa) da UFPE
Para: **Prof. José Luiz de Lima Filho**
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami/LIKA - UFPE
Processo nº 016275/2006-81

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEa-UFPE) avaliaram a resposta de V. Sa. referente ao primeiro parecer da CEEa sobre o projeto de pesquisa intitulado “**Estudo de classes de proteínas do *Schistosoma mansoni* por análise proteômica**”.

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEa-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,

Prof. Silene Carneiro do Nascimento
 Presidente CEEa

CCB: Integrar para desenvolver

6.3 Indicadores de Produção 2006-2008

Resumos apresentados na XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular SBBq, 2006.

B-23. IDENTIFICATION OF BIOTINYLATED PROTEINS IN THE ADULT WORMS OF SCHISTOSOMA MANSONI USING 2-D ELECTROFORESES.

Pereira, A.S.A.; Amaral, I.P.G.; Chaves, M.E.C.

H-68. IMMOBILIZATION OF ANTI-HUMAN IgG AND ANTI-HSA ON FERROMAGNETIC DACRON.

Amaral, I.P.G.; Pereira, A.S.A.; Chaves, M.E.C.

Resumos apresentados na VIII Reunião Regional Nordeste da SBBq, 2006.

390-1 BIOCHEMICAL PARAMETERS AND PROTEIN PROFILE OF RATS TREATED WITH DIFFERENT DOSES OF THE FITOTERAPIC MELXI.

Pereira, A.S.A.; Bertão, H.G.; Cavalcanti, N.L.; Lima Filho, J.L.; Chaves, M.E.C.

388-1 HISTOPATHOLOGICAL ANALYSIS OF INFLAMMATORY DISEASE IN THE RESPIRATORY SYSTEM OF RATS TREATED WITH THE FITOTERAPIC MELXI.

Bertão, H.G.; Pereira, A.S.A.; Cavalcanti, N.L.; Ribeiro, M.H.M.L.; Cavalcanti, C.L.B.; Lima Filho, J.L.; Chaves, M.E.C.

Resumos apresentados na XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular SBBq, 2007.

H-78 CELLULAR DENSITY AND BIOCHEMICAL COMPOSITION OF CHAETOCEROS MUELLERI LEMMERMAN (BACILLARIOPHYTA) IN ALTERNATIVE CULTURE MEDIA.

Cavalcanti, N.L.; Moreira, E.G.; Pereira, A.S.A.; Bertão, H.G.; Moura-Junior, A.M.; Koenig, M.L.; Chaves, M.E.C.; Carvalho, V. C. O.

M-31 ADHERENCE OF *Candida albicans* AND *Candida parapsilosis* TO EPITHELIAL CELLS AND CORRELATION WITH CELL SURFACE CARBOHYDRATES.

Lima-Neto, R.G.; Couto, F.M.M.; Beltrao, E.I.C.; Ribeiro, D.R.P.; Bertão, H.G.; Pereira, A.S.A.; Neves, R.P.

H-18 BIOCHEMICAL IDENTIFICATION OF BIOTINYLATED PROTEINS IN THE ADULT WORMS OF *Schistosoma mansoni*.

Pereira, A.S.A.; Bertão, H.G.; Cavalcanti, N.L.; Lima Neto, R.G.; Ribeiro, D.R.P.; Chaves, M.E.C.

H-131 PROTEOMIC ANALYSIS OF INFLAMMATORY DISEASE IN THE RESPIRATORY SYSTEM OF RATS TREATED WITH THE FITOTERAPIC MELXI.

Bertão, H.G.; Pereira, A.S.A.; Cavalcanti, N.L.; Lima Neto, R.G.; Ribeiro, D.R.P.; Lima Filho, J.L.; Ribeiro, M.H.M.L.; Chaves, M.E.C.

H-11 SCALE-UP PRODUCTION OF SACCHAROMYCES CEREVISIAE USING OPUNTIA FICUS-INDICA AS SUBSTRATE.

Ribeiro, D.R.P.; Lins, C.I.M.; Silva, G.M.M.; Pereira, A.S.A.; Bertão, H.G.; Lima Neto, R.G.; Martins, D.B.G.; Lima Filho, J.L.

Resumos apresentados na II Reunião Regional da Federação de Sociedade de Biologia Experimental, 2007.**01.049** IDENTIFICATION OF BIOTINYLATED PROTEINS IN THE ADULT WORMS OF *Schistosoma mansoni*.

Pereira, A.S.A.; Chaves, M.E.C.

Resumos apresentados no Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007.**1** AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E PERFIL FITOQUÍMICO DA PRÓPOLIS VERMELHA.

Pereira, A.S.A.; Lustosa, S.R.; Galindo, A.B.; Randau, K.P.; Ximens, E.A.

2 SÃO REALMENTE OS CONSERVANTES EFICAZES?

Malvezzi, A.M.; Pereira, A.S.A.; Ramos, S.V.V.; Barreto, G.B.; Ximenes, E. A.

Resumos apresentados no XX Congresso Brasileiro de Parasitologia, 2007.**1** PREVALÊNCIA DE PARASITOSE INTESTINAIS NA POPULAÇÃO DO MUNICÍPIO DE IGARASSU, PERNAMBUCO.

Pereira, A.S.A.; Farias, I.P.; Ramos, A.L.G.; Ribeiro, D.R.P.; Mendes, G.F.

Resumos apresentados no V Congresso Brasileiro de Micologia, 2007.**1** ANÁLISE DO CONSUMO DE AÇÚCARES DURANTE PRODUÇÃO DE BIOINGREDIENTES UTILIZANDO SACCHAROMYCES CEREVISIAE EM EXTRATO REGIONAL.

Ribeiro, D.R.P.; Lins, C.I.M.; Veras, F.F.; Vieira, H.; Pereira, A.S.A.; Martins, D.B.G.; Lima Filho, J.L.