

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

JULLIANE ALMEIDA BASTOS

**AVALIAÇÃO DA VIA AUTOFÁGICA NO PARASITO *Schistosoma*
mansoni: uma abordagem por bioinformática e microscopia**

PATOS DE MINAS-MG

FEVEREIRO DE 2019

JULLIANE ALMEIDA BASTOS

AVALIAÇÃO DA VIA AUTOFÁGICA NO PARASITO *Schistosoma mansonii*: uma abordagem por bioinformática e microscopia

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Lizandra Guidi Magalhães Caldas

Co-orientador (a): Prof^a. Dr^a. Enyara Rezende Moraes

PATOS DE MINAS-MG

FEVEREIRO DE 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

B327a Bastos, Julliane Almeida, 1992-
2019 Avaliação da via autofágica no parasito *Schistosoma mansoni*
[recurso eletrônico] : uma abordagem por bioinformática e microscopia /
Julliane Almeida Bastos. - 2019.

Orientadora: Lizandra Guidi Magalhães Caldas.

Coorientadora: Enyara Rezende Moraes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.362>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Biotecnologia. 2. Autofagia. 3. *Schistosoma mansoni*. 4.
Esquistossomose - Tratamento farmacológico. I. Caldas, Lizandra Guidi
Magalhães, 1981- (Orient.). II. Moraes, Enyara Rezende, 1983-
(Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia. IV. Título.

CDU: 60

Maria Salete de Freitas Pinheiro - CRB6/1262

Juliane Almeida Bastos

**AVALIAÇÃO DA VIA AUTOFÁGICA NO PARASITO *Schistosoma mansoni*:
uma abordagem por bioinformática e microscopia**

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia como requisito parcial para
obtenção do título de mestre.

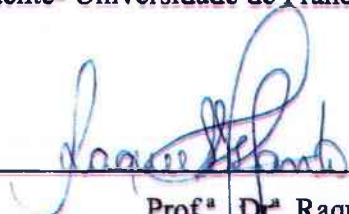
Aprovado em 20/02/2019.

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a Lizanda Guidi Magalhães Caldas

Presidente- Universidade de Franca/Universidade Federal de Uberlândia



Prof.^a Dr.^a Raquel Alves dos Santos

Membro -Universidade de Franca



Prof. Dr. Aulus Estevão Anjos de Deus Barbosa

Membro- Universidade Federal de Uberlândia

Patos de Minas-MG

2019

“Hey mãe!
Já não esquento a cabeça
Durante muito tempo isso foi só o que eu podia fazer
Mas, hey mãe por mais que a gente cresça
Há sempre alguma coisa que a gente não consegue entender...”
Engenheiros do Hawaii

À minha querida mãezinha que dedicou toda sua vida a seus filhos, que
nunca negou esforços para me auxiliar e acompanhar em cada momento.

Meu eterno muito obrigada!!!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que me guiou no decorrer de toda essa caminhada e colocou na minha vida pessoas muito especiais.

E como meu mestrado se passou em vários lugares, não havia como fazer os agradecimentos de forma diferente...

Ituiutaba-MG: Aos meus pais Márcia e Marcelo, aos meus irmãos Ulisses e Ana Paula, aos meus avós Orma e Arlindo, aos meus tios e primos, em especial à minha Madrinha Marli; por todo o suporte, principalmente psicológico, dado ao longo desses dois anos, por todo amor que me dedicaram a vida toda, e todos os momentos agradáveis que passamos juntos nos intervalos da minha pesquisa. Mãe, meu sucesso profissional é um mérito muito seu, obrigada por todo suporte desde a faculdade até este momento! Ao meu companheiro de vida Eduardo, o qual entrou de cabeça nesse mestrado e aguentou toda distância, dificuldades e ausências minhas nesses dois anos. À Faculdade de Ciências Integradas do Pontal (UFU), na qual me graduei em Ciências Biológicas e pude ter contato com professores incríveis, que desde lá contribuíram para a minha pós-graduação (Prof^a. Gabriela Lícia, Prof. Sandro Prado, Prof^a. Luciana Calabria, Prof. Luiz Fernando Izidoro, Prof. Hugo de Sousa...), assim como o Programa de Educação Tutorial (PETBio Pontal), suas atividades e toda dinâmica do grupo, os quais me prepararam para a vida. Aos meus amigos Camila Moura, Jaqueline Dall Agnoll, Teobaldo Vilela, Talita Cintra e Geison Rocha, por todo acompanhamento nos momentos de felicidade, e principalmente nos momentos de aperto, conselhos, conversas amigas, companhia nas muitas horas solitárias.

Cássia-MG: Aos meus tios Marinês e Humberto, e meus primos Valéria, Daniel, Samara (e família), e principalmente a Laura que convivia comigo diariamente; que prontamente me acolheram em seu ninho e me trataram tão bem no decorrer de 2018, que me aconselharam, me deram carinho e finais de semana incríveis em suas companhias.

Patos de Minas-MG: A minha co-orientadora Enyara e ao professor Matheus que tão prontamente me acolheram nos momentos de dúvida, me ajudando tanto presencialmente, quanto à distância. A todos os professores do programa de pós-graduação em Biotecnologia, que em suas disciplinas presenciais somaram muito na minha qualificação, em especial à professora Cristina Fűstenau que me incentivou e deu suporte para prestar este programa. A todos os colegas de pós-graduação, por todos os momentos de interação e aprendizado, em especial à Paula Marynella com quem eu dividia muitas dúvidas das disciplinas, minha parceira em Estatística, à Tamires Alves que tanto me auxiliou ao decorrer do trabalho e nos bate papos ao longo do ano, à Laysa Portilho por tudo que aprendi desde o início do trabalho e cada bate

papo sobre a vida. À dona Edina Maria, minha vizinha, minha companhia, que me alimentava com os biscoitos de queijo mais gostosos que já comi. Aos patrões e funcionários do Churrasco do Osvaldo, que me acolheram quando ainda me instalava na cidade, por suas amizades e paciência. Ao secretário da pós-graduação Aparecido.

Franca-SP: À minha orientadora de mestrado Professora Lizandra Guidi Magalhães Caldas que solidariamente aceitou me orientar, pela confiança depositada, e que muito contribuiu no meu crescimento ao longo do trabalho. A todos os colegas do Laboratório de Parasitologia (LAPPA): Mariana, Ana Carolina, Nicoli, Munik, Lucas, Jaqueline, ICs e Estagiários. À colega Larissa da Química Unifran. Sem a contribuição de vocês esse trabalho não aconteceria, obrigada pela parceria, aprendizado, pelos momentos de lazer e comilança. Ao laboratório de Mutagenese da Unifran. À Universidade de Franca pela infraestrutura fornecida.

Ao laboratório Mutiusuário de Microscopia Confocal da FMRP-USP.

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

“ A vida é uma viagem experimental, feita involuntariamente. É uma viagem do espírito através da matéria, e como é o espírito que viaja, é nele que se vive. Há, por isso, almas contemplativas que têm vivido mais intensa, mais extensa, mais tumultuariamente do que outras que têm vivido externas. O resultado é tudo. O que se sentiu foi o que se viveu. Recolhe-se tão cansado de um sonho como de um trabalho visível. Nunca se viveu tanto como quando e pensou muito. ”

Fernando Pessoa- O Livro do Desassossego

RESUMO

O parasito *Schistosoma mansoni* é o causador da esquistossomose no Brasil. Atualmente o fármaco Praziquantel (PZQ) é o esquistossomicida de escolha utilizado no tratamento contra a enfermidade, e a busca de novos fármacos eficazes contra o parasito se faz necessária, diante dos relatos sobre a presença de linhagens menos sensíveis ao PZQ. Desta forma, a busca pela presença de componentes da via de autofagia pode ser utilizada afim de explorar o desenvolvimento de novos alvos moleculares contra essa parasitose, através da identificação de genes constituintes desta via nos bancos de dados gerados pelos estudos de genômica e transcriptômica do parasito. Apoiado a tais fatos, este trabalho objetivou o estudo dos aspectos moleculares e funcionais da via de autofagia em *S. mansoni*, por meio da caracterização da via autofágica durante o ciclo de vida do parasito, com a identificação *in silico* dos principais componentes envolvidos; e identificação de vacúolos autofágicos em casais de vermes adultos através de microscopia eletrônica de transmissão e microscopia de fluorescência após fome por privação de glicose. Para tal fim, realizou-se análise *in silico* (Blastp- *Basic Local Alignment Search Tool – Protein*), utilizando como “query” proteínas de autofagia de ortólogos contra o genoma de *S. mansoni*, resultando em 21 proteínas preditas. Destas, as proteínas SmLGG-1, SmUNC-51, SmVPS-34 e SmATG-9, apresentaram significativa identidade com as proteínas LGG-1, UNC-51, VPS-34 E ATG-9 de *C. elegans*, respectivamente. As quatro proteínas preditas de *S. mansoni* apresentam os resíduos essenciais para sua função evolutivamente conservados, em conformidade aos mesmos domínios dos ortólogos. Construimos ainda, a árvore filogenética para estas quatro proteínas, comparando às proteínas ortólogas, corroborando com a árvore da vida. Para a avaliação dos casais de vermes adultos em condição de estresse nutricional, os vermes foram cultivados em meio de cultura suplementado com glicose em diferentes concentrações por até 72 horas, demonstrando alterações sutis em sua viabilidade principalmente a 72 horas, e significativa alteração na ovoposição conforme diminuição das concentrações de glicose. Finalmente, após análise de microscopia eletrônica de transmissão e de fluorescência, foi observada a presença aumentada de vacúolos ácidos nas menores concentrações de glicose a 72 horas. Em conformidade, as metodologias utilizadas confirmam a existência da via, necessitando de maiores detalhes para melhor entendimento da biologia do parasito, sendo de crucial importância estudos futuros que complementem a descrição da via em *S. mansoni*.

Palavras-chave: Doença negligenciada. Alvo molecular. Sinalização intracelular. Morte celular.

ABSTRACT

The parasite *Schistosoma mansoni* is the cause of schistosomiasis in Brazil. Currently the drug Praziquantel (PZQ) is the schistosomicide of choice used in the treatment of the disease, and the search for new effective drugs against the parasite is necessary, given the reports about the presence of lines less sensitive to PZQ. Thus, the search for the presence of components of the autophagy pathway can be used in order to explore the development of new molecular targets against this parasite, through the identification of genes constituent of this pathway in the databases generated by the genomic and transcriptome studies of the parasite. Based on these facts, this work aimed to study the molecular and functional aspects of the autophagy pathway in *S. mansoni*, through the characterization of the autophagic pathway during the life cycle of the parasite, with the *in silico* identification of the main components involved; and identification of autophagic vacuoles in couples of adult worms by transmission electron microscopy and fluorescence microscopy after starvation by glucose deprivation. For this purpose, *in silico* (Blastp- *Basic Local Alignment Search Tool - Protein*) was performed, using orthologous autophagy proteins against the *S. mansoni* genome, resulting in 21 predicted proteins. Of these, the SmLGG-1, SmUNC-51, SmVPS-34 and SmATG-9 proteins showed significant identity with the LGG-1, UNC-51, VPS-34 and ATG-9 proteins of *C. elegans*, respectively. The four predicted proteins of *S. mansoni* present the essential residues for their function evolutionarily conserved, according to the same domains of orthologous. We also construct the phylogenetic tree for these four proteins, comparing them to orthologous proteins, corroborating with the tree of life. For the evaluation of adult worms in nutrient stress conditions, the worms were cultivated in culture medium supplemented with glucose at different concentrations for up to 72 hours, showing subtle changes in their viability, mainly at 72 hours, and a significant change in ovoposition according to decreased glucose concentrations. Finally, after transmission electron microscopy and fluorescence analysis, the presence of acid vacuoles in the lowest glucose concentrations was observed at 72 hours. Accordingly, the methodologies used confirm the existence of the pathway, requiring more details for a better understanding of the parasite biology, being of crucial importance future studies that complement the description of the pathway in *S. mansoni*.

Key words: Intracellular signaling. Cell death. *Schistosoma mansoni*. Autophagy, Bioinformatics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	Diagrama esquemático do ciclo de vida de <i>S. mansoni</i>	18
FIGURA 2	Partições da árvore filogenética	21
FIGURA 3	Modelo esquemático da interação entre estresse do ER, autofagia e apoptose	23
FIGURA 4	Diferentes tipos de autofagia	25
FIGURA 5	Descrição esquemática da via de macroautofagia e sua maquinaria molecular em células de <i>C. elegans</i>	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATG	<i>Autophagy-related</i>
AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BEC-1	Proteína de <i>C. elegans</i> homóloga a Vps30/Atg6 de levedura, Beclin-1 de <i>H. sapiens</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Beclin-1	<i>Bcl-2 interacting myosin/moesin-like coiled-coil protein 1</i> . Homólogo mamífero de Atg6 / Vps30 de levedura
CED-1	Proteína de <i>C. elegans</i> homóloga a Bcl-2 de <i>H. sapiens</i>
DRAM1	<i>DNA damage-regulated autophagy modulator protein 1</i>
E1	Enzima 1
E2	Enzima 2
ER	<i>Endoplasmic reticulum</i>
EST	<i>Expressed sequence tag</i>
JNK-1	<i>C-Jun N-terminal kinases</i>
LA	Laranja de Acridina
LAMP2	<i>Lysosome-associated membrane protein type 2</i>
LMP-1	Proteína de <i>C. elegans</i> homóloga a LAMP2 de <i>H. sapiens</i>
LET-363	Proteína de <i>C. elegans</i> ortóloga a TOR1,2 de levedura
LGG-1	Proteína de <i>C. elegans</i> homóloga a Atg8 de levedura
LC3	<i>Microtubule-associated protein 1 light chain 3</i> . Um homólogo a Atg8 de levedura
MAP1LC3	<i>Microtubule-associated protein 1 light chain 3</i>
MI	Membrana de Isolamento
MTORC	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
mTORC1	<i>Mammalian TOR Complex I</i>
NJ	<i>Neighbor-joining</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORESTES	<i>Open Reading Frame Expressed Sequence Tags</i>
PCD	<i>Programmed cell death</i>
PAS	<i>Phagophore assembly site</i>

PE	Fosfatidiletanolamina
PI	Fosfatidilinositol
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PI3P	<i>Phosphatidylinositol 3- phosphate</i>
PZQ	Praziquantel
SQSTM1	<i>Sequestosome 1</i>
STX17	<i>Syntaxin 17</i>
TECPR1	<i>Tectonin beta-propeller repeat-containing protein 1</i>
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
TOR1	<i>TOR Complex I</i> de levedura
UNC-51	<i>Serine/threonine-protein kinase unc-51</i>
UTO	Unidade taxonômica operacional
VPS	<i>Vacuolar protein sorting</i>
ZFYVE1	<i>Zinc finger FYVE domain-containing protein 1</i>

SUMÁRIO

Capítulo 1: INTRODUÇÃO	13
REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
Avanços genômicos no parasito <i>Schistosoma mansoni</i>	18
Estresse celular e autofagia.....	21
REFERÊNCIAS	29
Capítulo 2: TRABALHO EXPERIMENTAL.....	43
SUMMARY STATEMENT.....	45
INTRODUCTION.....	46
MATERIAL AND METHODS.....	46
RESULTS.....	50
DISCUSSION.....	54
ACKNOWLEDGMENTS.....	58
COMPETITIVE INTERESTS	58
FUNDING	58
REFERENCES	59
Figures	70
Tables	78
ANEXOS.....	88

Capítulo 1: INTRODUÇÃO

Problema de pesquisa

A esquistossomose é uma doença negligenciada que afeta milhões de pessoas, principalmente em áreas tropicais e subtropicais no mundo (STEINMANN, et al., 2006; UTZINGER, et al., 2009; MCMANUS et al., 2018). O tratamento baseia-se no uso de Praziquantel (PZQ), que apesar de possuir várias vantagens em sua utilização, por ser o único medicamento de escolha, pode acarretar na propagação de linhagens menos sensíveis (BENNETT, 1997; MELMAN et al., 2009; CAFFREY, 2015). Assim, a maior compreensão da biologia do parasito pode fornecer informações importantes para o desenho e desenvolvimento de novas substâncias esquistossomicidas.

Desse modo, o estudo das vias de morte celular em parasitos para o desenvolvimento de fármacos é uma possibilidade que tem sido explorada em diversos patógenos unicelulares (BRUCHHAUS, 2007), mas pouco contra helmintos (MOHAPATRA et al., 2011; DE PAULA AGUIAR et al., 2016). Nos parasitos do gênero *Schistosoma*, a via de morte por apoptose mediada por Bcl-2 já é bem descrita (LEE et al., 2014) e sua estreita relação com a via de autofagia aponta a necessidade de identificar e caracterizar a existência da via autofágica, baseada em análises *in silico*, moleculares e morfológicas, em busca de potenciais alvos moleculares para o desenvolvimento de novas drogas contra a esquistossomose.

Hipótese

Baseado na importância da via de autofagia na biologia do parasito *S. mansoni*, há a necessidade de explorar o envolvimento das proteínas autofágicas, especificamente das proteínas: LGG-1, envolvida na degradação de agregados proteicos; a proteína UNC-51, que participa das etapas iniciais de formação da membrana do fagóforo juntamente com as proteínas VPS-34 e a proteína ATG-9, que em particular, participa de todas as etapas do processo; as quais confirmamos a hipótese de participação na via.

Objetivos

Diante de evidências relacionadas à existência da via autofágica no parasito *S. mansoni*, o objetivo geral foi identificar as principais proteínas envolvidas em autofagia no parasito, bem como selecionar proteínas com funções primordiais ao longo do processo.

O objetivo específico foi:

Etapa I: Caracterização computacional da via autofágica durante o ciclo de vida de *S. mansoni*

- Identificação *in silico* dos componentes envolvidos na via autofágica de *S. mansoni*;

Etapa II: Identificação de vacúolos autofágicos por microscopia em casais de vermes adultos após privação de glicose

- Análise do efeito da privação de glicose em casais de vermes adultos sobre a viabilidade e ovoposição dos parasitos;
- Identificar fisiomorfologicamente a presença de vacúolos autofágicos por microscopia eletrônica de transmissão;
- Identificar fisiomorfologicamente a presença de vacúolos ácidos por microscopia de fluorescência.

Justificativa

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, a esquistossomose, segunda endemia parasitária no mundo após a malária, coloca em risco de infecção mais de 779 milhões de pessoas pertencentes a regiões tropicais e subtropicais do mundo (WHO, 2017; MCMANUS et al., 2018).

O tratamento mais utilizado no caso de esquistossomose é com Praziquantel (PZQ), que é efetivo contra o parasito (CAFFREY, 2015), porém, não previne a reinfecção, e relatos têm demonstrado presença de linhagens menos sensíveis ao fármaco (FALLON et al., 1998; ISMAIL et al., 1999; MAGNUSSEN et al., 2003; CAFFREY, 2015). Desse modo, é de fundamental importância a procura por novas substâncias que tenham atividade esquistossomicida, bem como o entendimento dos mecanismos de morte celular os quais podem evidenciar potenciais alvos moleculares para o delineamento de novas drogas.

A ativação das vias de morte celular em parasitos para o desenvolvimento de medicamentos é uma possibilidade que tem sido explorada em diversos patógenos unicelulares. Dentre eles, a morte celular programada (Apoptose) é descrita em *Plasmodium spp.* (PICOT et al. 1997; AL-OLAYAN et al., 2002; VAN DE SAND et al., 2005; STURM et al., 2006), *Leishmania spp.* (SHAHA, 2006; DUSZENKO et al., 2006), *Trypanosoma cruzi* (DUSZENKO et al., 2006), *Trypanosoma brucei* (DUSZENKO et al., 2006), *Giardia lamblia* (CHOSE et al., 2003), entre outros. Enquanto a via de autofagia é bem descrita em *Leishmania mexicana* (WILLIAMS et al., 2006), *Toxoplasma gondii* (BESTEIRO et al., 2011), *Dictyostelium discoideum* (CALVO-GARRIDO et al., 2010; BOZZARO; EICHINGER, 2011; CALVO-

GARRIDO et al., 2011), *Plasmodium falciparum* (KITAMURA et al., 2012; HAIN et al., 2014; NAVALE et al., 2014), *Trypanosoma brucei* (BARQUILLA; CRESPO; NAVARRO, 2008), entre outros. Em helmintos, a via de apoptose é descrita em *Schistosoma sp.* (MOHAPATRA et al., 2011; LEE et al., 2014, DE PAULA AGUIAR et al., 2016) e a via de autofagia é muito bem caracterizada no nematóide *Caenorhabditis elegans* (MELÉNDEZ et al., 2003; TAVERNARAKIS et al., 2008; MELÉNDEZ ; LEVINE, 2009; KANG; YOU; AVERY; 2009; MORSELLI et al., 2010; ALBERTI et al., 2010; TIAN et al., 2010; AL RAWI et al., 2011; LU et al., 2011; WU et al., 2012; LIANG et al., 2012; LAPIERRE et al., 2013; SCHIAVI et al., 2013; SENGUPTA et al., 2013; MANIL-SÉGALEN et al., 2014; SCHIAVI, et al., 2015; PALIKARAS; LIONAKI; TAVERNARAKIS; 2015; ZHANG et al., 2015; PALMISANO; MELÉNDEZ, 2016); havendo necessidade de estudos em outros helmintos.

A via de autofagia, ainda não caracterizada em *Schistosoma mansoni*, apresenta genes constituintes nos bancos de dados gerados pelos estudos da genômica e transcriptômica, demonstrando a possibilidade da existência desta via de morte no parasito (VERJOVSKI-ALMEIDA et al., 2003; BERRIMAN et al., 2009; MOURÃO et al., 2012). Desta forma, ferramentas computacionais são grandes aliadas na identificação desses genes, visto que alguns transcritos são expressos apenas sob certas condições ou em células específicas (CARDOSO et al., 2018).

Desse modo, o conhecimento e a caracterização da via autofágica no parasito *S. mansoni* possibilitará o maior conhecimento de sua biologia, podendo abrir oportunidade para o desenvolvimento de novas substâncias esquistossomicidas contra alvos específicos desta via.

REFERENCIAL TEÓRICO

Aspectos gerais da esquistossomose

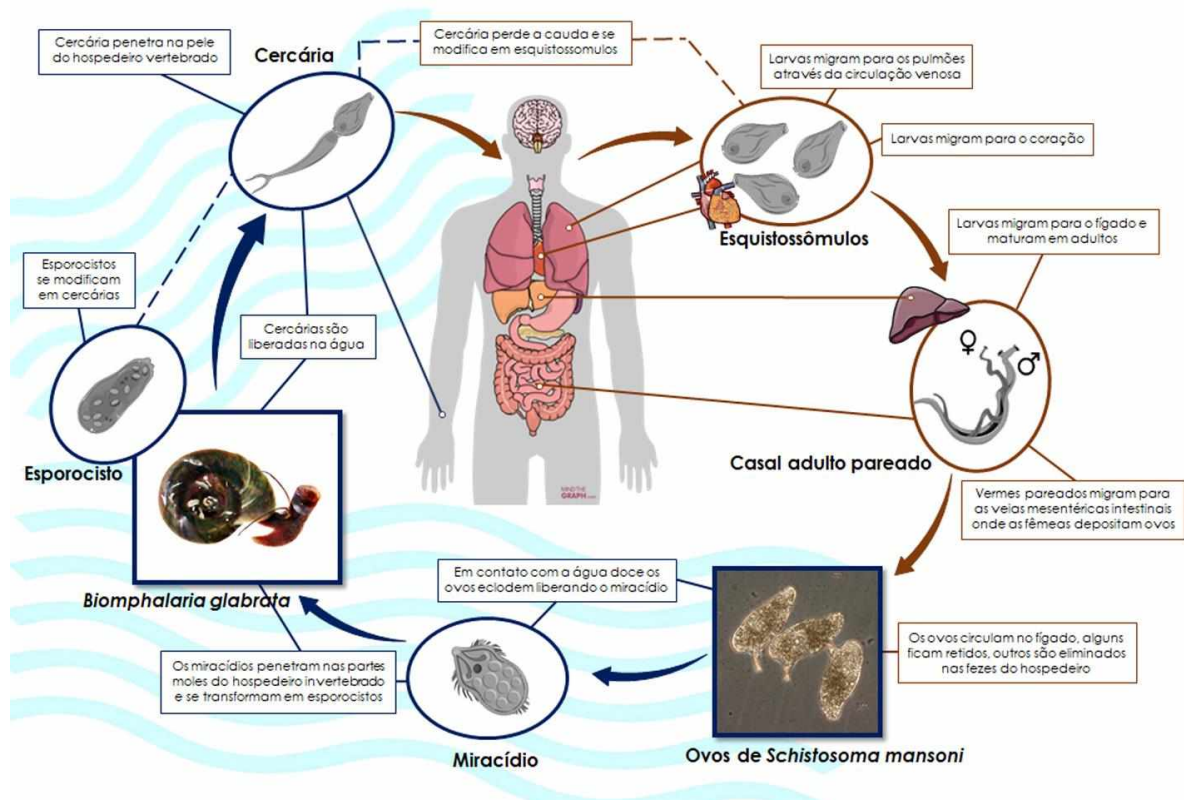
A esquistossomose é uma doença causada por parasitos que pertencem ao Filo Platyhelminthes, da Classe Trematoda, família Schistosomatidae, gênero *Schistosoma*. Após mais de 100 anos da descoberta da esquistossomose, a doença coloca em risco cerca de 779 milhões pessoas, segundo dados da OMS (Organização Mundial de Saúde), sendo endêmica em 78 países. As estimativas de 2015 demonstram que pelo menos 218 milhões de pessoas necessitaram de tratamento preventivo (WHO, 2017; MCMANUS et al., 2018).

Dentre as seis principais espécies causadoras da esquistossomose que podem infectar o ser humano: *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum*, *S. mekongi* e *S. malayensis*, a espécie endêmica no Brasil é *S. mansoni*. A infecção causada por esse parasito determina uma patologia denominada esquistossomose intestinal, popularmente conhecida no

Brasil como "Xistose", "Mal do caramujo" ou "Barriga d'água" (MELO; COELHO 2005; GRYSSELS, 2012; CAFFREY, 2015). De acordo com dados do Ministério da Saúde do Brasil, entre 2008 e 2016 foram registradas 2.275 internações por esquistossomose e 4.473 óbitos. Os estados mais afetados pela doença se encontram nas regiões Nordeste e Sudeste, e a causa é atribuída à presença dos hospedeiros intermediários nessas localidades (Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde do Brasil, 2018).

O parasito possui ciclo do tipo heteróximo, podendo sobreviver até 30 anos no hospedeiro definitivo, com média de 3 a 5 anos (**Figura 1**).

FIGURA 1 - Diagrama esquemático do ciclo de vida de *S. mansoni*.



Fonte: Esta figura foi desenhada usando o software Photoshop e o banco de imagens vetoriais da Servier Medical Art (<http://smart.servier.com/>) e da (<http://www.mindthegraph.com/>). A Servier Medical Art da Servier e a Mind the Graph estão licenciadas sob uma licença Creative Commons Attribution 3.0 Unported (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>) e licença Internacional Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>), respectivamente. Ciclo de vida adaptado de McManus et al. (2018, p. 2).

Nas veias mesentéricas do intestino do hospedeiro vertebrado, cada fêmea pode liberar cerca de 300 ovos por dia (MOORE; SANDGROUND, 1956; PELLEGRINO; COELHO, 1978), estes, são excretados nas fezes do hospedeiro definitivo (COLLEY et al., 2014). Os ovos,

em contato com água doce, de acordo com condições ambientais, como temperatura, luz intensa e oxigenação da água, podem eclodir liberando a forma larval ciliada de natação livre, o miracídio. Após a liberação, os miracídios irão em busca do hospedeiro intermediário, o caramujo do gênero *Biomphalaria*, penetram nas partes moles e se desenvolvem por 4 a 6 semanas em esporocistos. Posteriormente, por reprodução assexuada, se diferenciam em cercarias cerca de 30 dias após a infecção do hospedeiro intermediário (COELHO, 1957; PAN, 1996). Após, por estimulação da luz, são liberadas na água, podendo viver livremente por até 72 horas (GOBERT et al., 2006; GRYSEELS, 2006; GRYSEELS, 2012).

Ao penetrarem no hospedeiro vertebrado, as cercarias perdem a cauda, transformando-se na larva esquistossômulo, a qual resulta de drásticas mudanças na fisiologia e bioquímica do parasito (GOBERT et al., 2006); migram para os vasos dérmicos, se disseminam para a circulação sanguínea até chegarem aos pulmões, e para o sistema porta-hepático através da veia porta, onde se maturam nas formas adultas e se acasalam (GRYSEELS, 2006; GRYSEELS, 2012). No acasalamento, a superfície ventral do macho é modificada para formar um sulco, o canal ginecóforo, em que a fêmea reside (LO VERDE et al., 2004).

Após o acasalamento, os ovos presentes na parede do intestino, por reação inflamatória, podem ser expelidos na parede do intestino, podem induzir uma reação periovular inflamatória expelindo-os juntamente com as fezes (LENZI et al., 1987, 1991), os que não excretados podem induzir resposta granulomatosa autônoma que provoca efeitos patológicos locais e sistêmicos que vão desde anemia, fibrose intestinal e no fígado, esplenomegalia e complicações neurológicas, sendo de maior risco para crianças e adolescentes (WARREN, 1987; GRYSEELS et al, 2012; COLLEY et al 2014; MCMANUS et al., 2018).

Desta forma, destaca-se a complexidade dos mecanismos de adaptação deste helminto, que envolvem recombinação genética, ovos proeminentes e uma longa vida no interior de seu hospedeiro definitivo (ROLLINSON et al., 2012; GRYSEELS et al, 2012). Seu ciclo de vida é garantido através de reprodução assexuada dentro do hospedeiro intermediário, garantindo a transferência de novos parasitos para o hospedeiro vertebrado, tais processos são garantidos pelas habilidades do parasito em se esquivar das respostas imunes de seus hospedeiros (ROLLINSON et al., 2012; GRYSEELS et al, 2012).

O tratamento da esquistossomose em todo mundo baseia-se no uso do praziquantel (PZQ) (WHO, 2017; MCMANUS et al., 2018). Essa substância, é um medicamento altamente efetivo contra as seis espécies de *Schistosoma*, tem pouco ou nenhum efeito adverso e nos últimos anos, seu preço tem sido reduzido substancialmente (DOENHOFF et al., 2000; FENWICK et al., 2003; CAFFREY, 2015). No entanto, PZQ não previne a reinfecção,

tratamentos repetidos são necessários em áreas endêmicas e há indícios de presença de linhagens menos sensíveis ao medicamento (FALLON, 1998; ISMAEL et al., 1999; MAGNUSSEN et al., 2003; PICA- MATTOCCIA; 2009; MESSERLI, 2009;; MELMAN et al., 2009; CAFFREY, 2015). Apesar de o PZQ ser utilizado há mais de 30 anos, e seu mecanismo de ação não estar totalmente esclarecido (VALE et al., 2017), estudos *in vitro* demonstraram que quando parasitos machos são expostos ao PZQ sofrem uma intensa paralisia muscular que é acompanhada por um rápido influxo de íons cálcio, um menor influxo de íons sódio e uma diminuição de íons potássio, interrompendo a homeostase do íon cálcio, Ca^{2+} (CIOLI et al., 1995; PAX et al., 1978; WOLDE-MUSSIE et al., 1982; XIAO et al., 1984; XIAO; SUN; CHEN, 2018). Outros estudos observaram que PZQ causa alterações estruturais no tegumento dos parasitos como despolimerização de rede microtrabecular, seguida pela vacuolização e erosão da superfície levando a exposição dos antígenos de superfície do parasito (MELHORN et al. 1981; HARNETT; KUSEL, 1986).

Avanços genômicos no parasito *Schistosoma mansoni*

Após a publicação dos genomas de *S. mansoni* e *S. japonicum*, a pesquisa sobre a esquistossomose entrou na era pós-genômica, devido a necessidade da busca de novas ferramentas de controle da doença, contribuindo ainda para a melhor compreensão da biologia desses parasitos com potenciais aplicações biomédicas e biotecnológicas. (VERJOVSKI-ALMEIDA, 2003; BERRIMAN, 2009; MOURÃO et al., 2012; NAHUM; MOURÃO; OLIVEIRA, 2012).

Verjovski-Almeida e colaboradores (2003), utilizando a metodologia de *ORESTES* (*Open Reading Frame Expressed Sequence Tags*), que são sequências parciais expressas de cDNA com cerca de 150-800 pb, correspondentes às regiões centrais dos transcritos, sequenciaram 163.000 *ESTs* (*Expressed Sequence Tag*) provenientes de bibliotecas representativas dos seis estágios de desenvolvimento do parasito. Essas sequências resultaram em 31.000 *contigs* e a estimativa da existência de aproximadamente 14.000 genes no genoma do parasito (VERJOVSKI-ALMEIDA et al., 2003).

O estudo de Simpson et al. (1982), demonstrou que o genoma de *S. mansoni* era estimado em 270Mb. Posteriormente um esboço do genoma foi produzido pelo Wellcome Trust Sanger Institute, em colaboração com o Institute for Genomic Research, usando a estratégia de sequenciamento de genoma completo, no qual aproximadamente 3,8 milhões de leituras combinadas foram produzidas pelos dois centros de genoma e montadas usando o algoritmo de montagem Phusion (ALTSCHUL et al., 1990; MULLIKIN; NING, 2003). Assim, resultando

no genoma do esboço de 363Mb que codifica pelo menos 11.809 genes, organizado em oito pares de cromossomos, sendo sete pares autossômicos e um par de cromossomos sexuais (fêmea = ZW, macho = ZZ). Os cromossomos variam entre 18 a 73 MB e podem ser diferenciados por tamanho, forma e bandas C (BERRIMAN et al., 2009; PROTASIO et al., 2012).

O sequenciamento segue sob anotação e está em sua versão 7.0 disponível no banco de dados do Wellcome Sanger Institute (<ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/project/pathogens/Schistosoma/mansoni/v7/>). Entretanto, as partes desses genomas precisam ser cuidadosamente estudadas e anotadas, uma vez que o sequenciamento e o depósito das sequências em bancos de dados públicos são apenas as etapas iniciais para um entendimento completo (CARDOSO et al., 2018).

Desta forma, o mapa de ligação genética de *S. mansoni* abriu novas possibilidades de descoberta de genes e suas funções (CRISCIONE, 2009; TAIT, 2009), permitindo maior exploração da complexidade do parasito, como a especificidade do hospedeiro, virulência, resistência a medicamentos, bem como as descobertas de novos alvos de substâncias e de vacina para o tratamento efetivo da esquistossomose (NAHUM; MOURÃO; OLIVEIRA, 2012).

Haja vista a importância do sequenciamento do genoma de *S. mansoni*, mais de 45% das proteínas codificadas pelo parasito permanecem sem caracterização experimental ou até previsão funcional (BERRIMAN et al., 2009; ZERLOTINI, 2009; PROTASIO et al., 2012; SILVA, 2010).

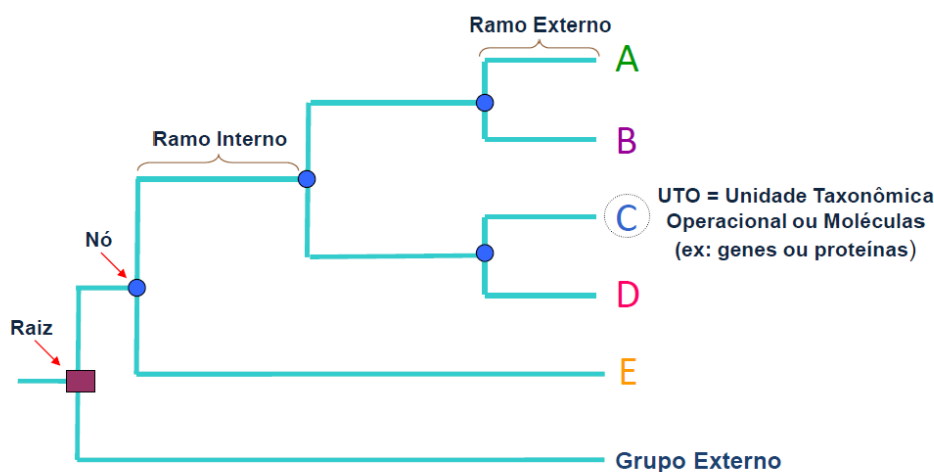
Portanto, tem-se utilizado duas abordagens: uma baseada em similaridade de sequências e outra baseada em análise filogenética (SILVA, 2010). Na primeira abordagem, a previsão da função é obtida com base na transferência de informação das sequências mais similares na base de dados para o gene ou proteína de interesse (ALTSCHUL et al., 1990).

A utilização da abordagem filogenética em conjunto à baseada em similaridade de sequências busca reduzir as limitações associadas a este método, aproveitando o peso que uma perspectiva evolutiva fornece às análises biológicas comparativas (EISEN, 1998; EISEN; WU 2002). Dentre as limitações do método baseado na similaridade de sequências estão o fato de que as proteínas podem ter mais de um domínio conservado, terem regiões importantes funcionamente, mas não conservadas evolutivamente, nem sempre refletindo na função proteica avaliada (GALPERIN; KOONIN, 1998; BRENNER, 1999; KOSKI; GOLDING, 2001; BROWN; SJOLANDER, 2006; NAHUM; PEREIRA, 2008; SILVA, 2010).

Sobre a abordagem baseada em análises filogenéticas, resultam em árvores filogenéticas representadas por relações de ancestralidades indicadas por hipóteses evolutivas (SILVA, 2010). A árvore filogenética é um grafo utilizado para representar a história evolutiva de um

grupo de moléculas ou organismos e consiste de nós, ancestral comum, conectados por ramos, cada ramo composto por uma unidade taxonômica operacional (UTO) (PAGE; HOLMES, 1998), que em nosso estudo representam as sequências dos organismos a partir dos quais os dados são provenientes (**Figura 2**).

FIGURA 2 - Partições da árvore filogenética. A, B, C, D e E representam as sequências proteicas a partir das quais a árvore foi reconstruída. A árvore representa a história evolutiva deste grupo de proteínas e consiste de nós conectados por ramos. Os nós internos representam ancestrais hipotéticos e o ancestral comum a todas as sequências de organismos que compõem a árvore é a raiz da árvore filogenética.



Fonte: Adaptado de Silva (2010, p. 11).

Assim, nas análises moleculares, cada nucleotídeo ou aminoácido é interpretado como um caracter que evolui de forma independente (RIDLEY, 2006), e a metodologia aplicada deve levar em consideração que diferentes proteínas ou segmentos de DNA não evoluem na mesma velocidade (SILVA, 2010). Desse modo, os métodos que convertem a informação molecular contida em proteínas e segmentos de DNA podem ser baseados em distância e baseados em caracteres (SCHNEIDER, 2007; NAHUM; PEREIRA, 2008). Neste trabalho, utilizamos o método baseado em distância “agrupamento de vizinhos”, do inglês, *neighbor-joining*, NJ, (SAITOU; NEI, 1987; STUDIER; KEPPLER, 1988) o qual compara as diferenças os pares das sequências alinhadas e converte as diferenças em uma matriz de distância que representa a distância evolutiva entre cada par. Assim, a matriz representa o número de diferenças observadas, ou o número esperado de substituições por sítio sob as premissas de um modelo de evolução molecular (NAHUM; PEREIRA, 2008).

Estresse celular e autofagia

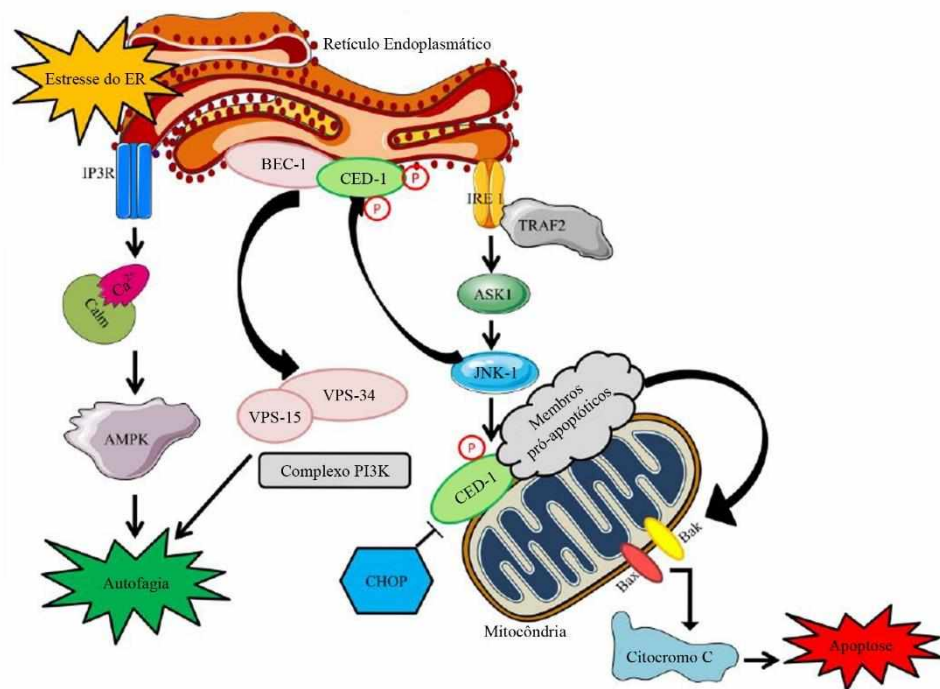
A morte celular programada (PCD) é morfologicamente classificada como do tipo 1, apoptose; do tipo 2, autofagia; e do tipo 3, necrose (KUMMAR et al., 2005). Entretanto, alguns autores apontam os caracteres morfológicos como insuficientes para classificar a autofagia como via de morte, visto que sua maior característica é promover a sobrevivência celular através do fluxo autofágico (KLIONSKY, et al., 2016).

Assim, morfologicamente, a necrose caracteriza-se pelo ganho no volume celular e inchaço das organelas que resulta na ruptura da membrana plasmática. Por outro lado, a apoptose caracteriza-se por gerar alterações morfológicas específicas como alteração mitocondrial, arredondamento da célula, redução do volume celular (picnose), condensação da cromatina, e a fragmentação do núcleo. Em contrapartida, a autofagia é restrita, partes do citoplasma são sequestradas dentro de vacúolos de membrana dupla e digeridas por hidrolases lisossomais (KROEMER et al., 2005, GALLUZZI et al., 2011). Tal processo pode levar a morte celular, ou simplesmente ser utilizado para garantir a homeostase celular, tendo uma relação funcional complexa com a apoptose (SHIMIZU et al., 2004; BAEHRECKE, 2005; BOYA, 2005).

Desta forma, as células, ao detectarem um sinal de estresse, podem se adaptar a ele em um mecanismo pró-sobrevivência, entretanto, caso os mecanismos adaptativos não consigam proteger as células, as vias de morte celular são ativadas (RAVANA; SRIKUMAR; TALWAR, 2017), podendo, em alguns casos, ocasionar fenótipos misturados de morte celular (KUMMAR et al., 2005; AMELIO; MELINO; KNIGHT, 2011; KLIONSKY, et al., 2016).

Uma forma de explicar como as células gerenciam um estresse é através da interação entre autofagia, estresse do ER (*Endoplasmic reticulum*) e apoptose (**Figura 3**) (RAVANAN; SRIKUMAR; TALWAR, 2017).

FIGURA 3 - Modelo esquemático da interação entre estresse do ER, autofagia e apoptose.



Fonte: Adaptado de Ravana; Srikumar; Talwar (2017, p. 14).

Sabe-se que o ER é a principal organela envolvida na síntese de proteínas e que após secretadas, essas proteínas passam por mecanismos de verificação (RAVANA; SRIKUMAR; TALWAR, 2017). Proteínas danificadas são acumuladas causando o estímulo/estresse do ER. Em estímulos de curta duração a resposta via ubiquitina-proteassoma é ativada (HETZ, 2012; URRÁ et al., 2016; INAGI, 2010; CHIANG et al., 2016), mas excedendo a capacidade de depuração dessas proteínas pela via ubiquitina-proteassoma, a via de autofagia é acionada. LU; BRAVE e JENTSCH (2017) descrevem que o melhor caminho para a depuração depende do estado físico da proteína dentro da célula, no qual substratos solúveis são degradados principalmente por proteassomas, enquanto grandes proteínas agregadas insolúveis são englobadas por fagóforos. A proteína chave atuante nesse processo é Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) /CED-1 de *C. elegans* presente no ER, que em conjunto a Beclin-1 (*Bcl-2 interacting myosin/moesin-like coiled-coil protein 1*) /BEC-1 de *C. elegans* auxiliam no processo de proteção do ER contra o estresse. Bcl-2/CED-1 é fosforilado por JNK (*c-Jun N-terminal kinases*), JNK-1 em *C. elegans*, separa-se do complexo Beclin-1/ATG-6, enquanto Beclin-1/ATG-6 ativa a autofagia via inibição de mTORC1 (*mammalian TOR Complex 1*) /LET-363 de *C. elegans* (GORMAND et al., 2011; TAKACS-VELLAI et al., 2005; ERDELYI et al., 2011). Entretanto, dependendo da gravidade do impacto do estresse a via pró-morte pode ser ativada, uma das formas pela qual esse processo acontece é pela fosforilação de Bcl-2/CED-1 anti-apoptóticos, derivados das mitocôndrias, por preteínas JNK/JNK-1, ligando Bcl-2/CED-1

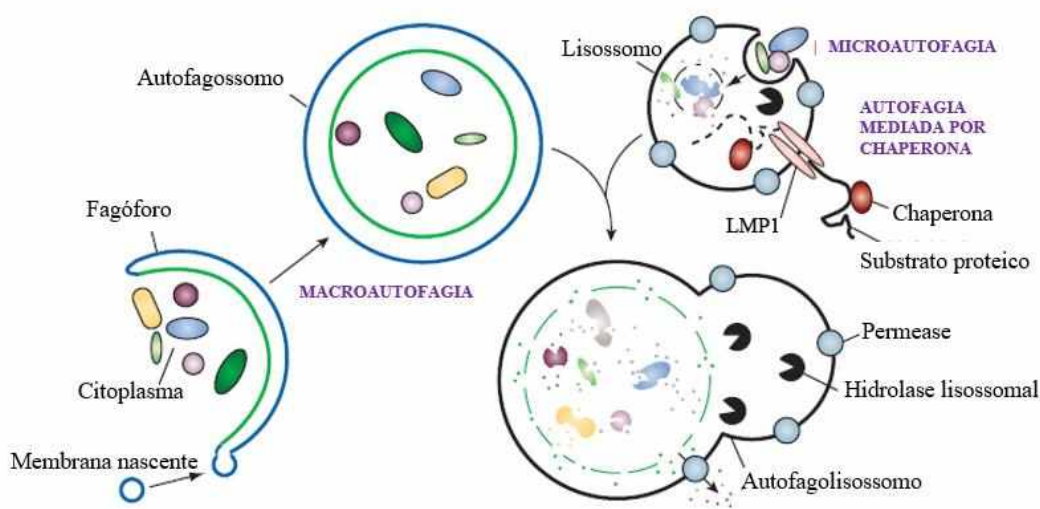
fosforilado aos fatores pró-apoptóticos, causando a inibição destes, induzindo a apoptose (**Figura 2**) (PARSONS; GREEN, 2010; RAVANAN; SRIKUMAR; TALWAR, 2017).

O termo autofagia foi empregado pela primeira vez por Christian De Duve em 1963, que descreveu a presença de vesículas intracelulares contendo partes do citoplasma e organelas em vários estados de desintegração (YANG; KLIONSKY, 2010). Entretanto, a maquinaria autofágica, ou seja, genes a ela relacionados como os genes Atg (*Autophagy related*), só foi caracterizada 30 anos depois em levedura, e rendeu prêmio Nobel em Fisiologia ou Medicina para o biólogo celular Yoshinori Ohsumi no ano de 2016 (TSUKADA; OHSUMI, 1993; KLIONSKY, 2016).

O processo autofágico é evolutivamente conservado, um fenômeno constitutivo que acontece a taxas basais em condições celulares normais para a reciclagem e regulação metabólica intracelular (MIZUSHIMA; KLIONSKY, 2007), mas também utilizado para a sobrevivência de células desnutridas ou estressadas, sendo importante para produção de adenosina trifosfato (ATP) durante a fome (MIZUSHIMA; KLIONSKY, 2007), gerando sinais de remoção de cadáveres apoptóticos (MELÉNDEZ; LEVINE, 2009; LOOS et al., 2014; RAVANAN; SRIKUMAR; TALWAR, 2017) e, degradação de produtos do metabolismo celular normal que podem se tornar citotóxicos após a acumulação, como organelas danificadas e agregados de proteína (BAEHRECKE, 2005; GALLUZZI, 2007).

Os mamíferos contam com três formas de autofagia: microautofagia, autofagia mediada por chaperona e macroautofagia (**Figura 4**) (SHEN; MIZUSHIMA, 2013).

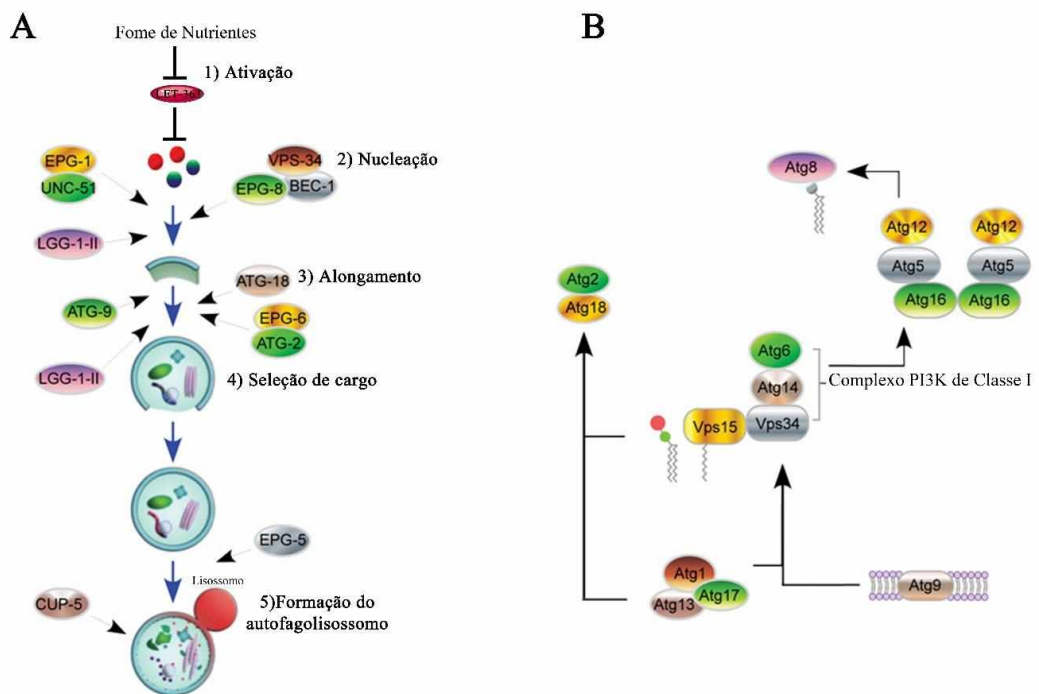
FIGURA 4 – Diferentes tipos de autofagia.



Fonte: Adaptado de Mizushima, et al. (2008, p. 1069).

A microautofagia envolve a absorção direta de material citoplasmático através de uma invaginação da membrana lisossômica (KROEMER et al., 2005); enquanto a autofagia mediada por chaperona caracteriza-se pela associação do lisossoma com a proteína de membrana 2 (LAMP2 (*lysosome-associated membrane protein type 2*) /LMP-1 de *C. elegans*) através da translocação de substratos autofágicos ligados a chaperonas citosólicas da família das proteínas de choque térmico (SHIMIZU et al., 2004). A macroautofagia é designada pela formação de vesículas de dupla membrana conhecidas como fagóforos que sequestram a carga do citoplasma que será degradada por enzimas- o fagóforo amadurece no autofagossoma, também composto por membrana dupla- e as entregam ao lisossomo através da fusão de suas membranas, formando o autofagolisossomo (**Figura 5**) (KROEMER et al., 2005; GALLUZZI, 2007; KLIONSKY, et al., 2016).

FIGURA 5 - Descrição esquemática da via de macroautofagia e sua maquinaria molecular em células de *C. elegans*. A) etapas da via de autofagia em *C. elegans*. B) Complexos envolvidos na lipidação de LGG-1/Atg8.



Fonte: Adaptado de Lu; Wu; Zhang (2013, p. 385).

Pelo fato de não podermos inferir sobre o tipo de autofagia em *S. mansoni*, doravante, trataremos neste estudo a macroautofagia como autofagia, pelo fato de que a macroautofagia é a forma mais comum e mais bem caracterizada (KROEMER et al., 2005; GALLUZZI, 2007).

É importante destacar ainda, que a nomenclatura dos genes/preteínas autofágicas se modificam entre variados organismos, desde leveduras a mamíferos, a exemplo da proteína Atg8 (*autophagy-related protein*) de *Saccharomyces cerevisiae*, cujo homólogo em *Homo sapiens* é MAP1LC3A (*microtubule-associated protein 1 light chain 3*) e em *C. elegans* recebe a nomenclatura LGG-1 (*autophagy-related protein*), sendo esta a que manteremos neste estudo, inicialmente acompanhada da nomenclatura da proteína homóloga de *S. cerevisiae*, objetivando maior compreensão, visto que os genes de *C. elegans*, foram utilizados como modelo, “query”, neste estudo.

Em conformidade, o processo autofágico envolve pelo menos 100 proteínas diferentes, destas, as ortólogas de LGG-1 (*autophagy-related protein 8*) (Homóloga de Atg8 de *S. cerevisiae*) são processados para se tornarem moléculas associadas a autofagossomos (RAMKUMAR et al., 2017). Assim, a verificação das proteínas Atg e proteínas a elas associadas podem fornecer informação sobre o mecanismo molecular de formação dos autofagossomos, o qual envolve várias unidades funcionais como a quinase UNC-51 (*serine/threonine-protein kinase unc-51*) (Homóloga a Atg1 de *S. cerevisiae*) e seus reguladores, o complexo PI3K de classe III (*phosphatidylinositol 3-kinase*), ATG-9 (*autophagy-related protein 9*), o complexo ATG-2 (*autophagy-related protein 2*) –ATG-18 (*autophagy-related protein 18*) e dois sistemas de conjugação similares a ubiquitina (MIZUSHIMA; YOSHIMORI; OHSUMI, 2011).

No entanto, a verificação da autofagia demanda considerar o processo como um todo, ao longo do tempo, levando-se em conta não apenas a presença de LGG-1/Atg8, ou o aumento na formação de autofagossomos, mas somar a isso a presença de lisossomos/vacúolos e a liberação dos produtos da degradação. Desta forma, Klionsky e colaboradores destacam outras oito proteínas importante envolvidas no fluxo autofágico que devem ser analisadas, tais como: ATG-9, ATG-5, LGG-3R, EPG-8, Bec-1, ATG-18, ATG-6, caracterizados na via de *C. elegans* (PALMISANO; MELÉNDEZ, 2016), e DRAM1 (*DNA damage-regulated autophagy modulator protein 1*), ZFYVE1 (*zinc finger FYVE domain-containing protein 1*), STX17 (*syntaxin 17*) e TECPR1 (*tectonin beta-propeller repeat-containing protein 1*) ainda não caracterizadas em *C. elegans* (KLIONSKY et al., 2016).

Outro fator que deve ser considerado é o Alvo Mecanicista do Complexo de Rapamicina 1 (mTORC1), caracterizado como LET-363 no nematódeo *C. elegans*, um complexo proteico

que tem efeito regulador negativo na autofagia através da supressão da função da UNC-51 (*serine/threonine-protein kinase unc-51*) - como complexo ULK1 (*uncoordinated-51-like kinase 1*) no estágio de inicial da via (YANG; KLIONSKY, 2010; MIZUSHIMA; YOSHIMORI; OHSUMI, 2011; SHEN; MIZUSHIMA, 2013). Em contrapartida, a quinase ativada por AMP (AMPK), que é ativada por altas taxas de AMP / ATP (*Adenosine monophosphate / Adenosine monophosphate*) presentes quando os nutrientes são limitados, tem efeito indutor da autofagia (WOUTERS, 2008; EISENBERG-LERNER et al., 2009).

Nesse sentido, o mecanismo autofágico (macroautofágico) ocorre em quatro etapas (**Figura 5**), as quais são nomeadas como: 1) Ativação da via (Iniciação), 2) Formação do autofagossomo (nucleação e alongamento), 3) Seleção de carga, 4) Formação do Autofagolisossomo e degradação da carga. Todas as etapas são de suma importância para que o processo autofágico aconteça (RAVANA; SRIKUMAR; TALWAR, 2017), as etapas do processo em *C. elegans* são descritas a seguir:

1) Ativação:

Sob condições de fome (falta ou indisponibilidade de aminoácidos, fator de crescimento, oxigênio e ou ATP), o complexo serina/treonina quinase do alvo da rapamicina LET-363/TOR1 é inibido ativando a autofagia, através perda de sinalização com UNC-51/Atg1 (HOSOKA et al., 2009, PALMISANO; MELÉNDEZ, 2016).

A ativação de UNC-51/Atg1 ativa EPG-1/Atg13 e EPG-7/Atg17 por fosforilação (GANLEY et al., 2009; PALMISANO; MELÉNDEZ, 2016). Esta ativação leva ao início de uma estrutura em forma de meia lua chamada fagóforo ou membrana de isolamento. UNC-51/Atg1 fosforila BEC-1/Atg6 do complexo de classe III de fosfoinosítideo 3-quinase PI3K para a progressão da autofagia (RUSSELL et al., 2013; PALMISANO; MELÉNDEZ, 2016). Acredita-se que a proteína integral ATG-9/Atg9 contribui com o desenvolvimento da membrana do autofagossomo (PALMISANO; MELÉNDEZ, 2016).

2) Nucleação:

O passo de nucleação é realizado principalmente pelo complexo PI3K, formado por BEC-1/Atg6, VPS-34/Vps34, EPG-8/Atg14), este, recruta proteínas de autofagia para as membranas de isolamento (MI) em mamíferos, estrutura pré-autofagossomal (PAS) em levedura. VPS-34/Vps34, a única enzima a ser designada como fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P) em mamíferos, através da produção do substrato fosfatidilinositol (PI), gerando um componente PI3P para a nucleação e crescimento do fagóforo (GLICK et al., 2010;

PALMISANO; MELÉNDEZ, 2016). É importante destacar que VPS-34/Vps34 é regulado por VPS-15/Vps15 (PANARETOU et al., 1997).

Algumas estruturas citoplasmáticas são propostas serem a fonte de membrana para a formação do autofagossomo, inicialmente denominado por fagóforo (RAVANA; SRIKUMAR; TALWAR, 2017), dentre essas estruturas estão o retículo endoplasmático (YLÄ-ANTTILA et al., 2009), as mitocôndrias (HAILEY et al., 2010), o compartimento intermediário ER-Golgi (ERGIC) (GE et al., 2013), complexo golgiense, endosomas de reciclagem (ORSI et al., 2012) e até a membrana plasmática (PURI et al., 2013).

3) Alongamento:

Dois complexos de conjugação a ubiquitina (LGG-1/Atg8 e ATG-5/Atg5-LGG-3/Atg12) são necessários para o alongamento do fagóforo e conclusão do autofagossomo em desenvolvimento. O LGG-1/Atg8 conjugado à fosfatidiletanolamina (PE) liga-se às membranas interna e externa do autofagossomo. O complexo de conjugação ATG-5/Atg5-LGG-3/Atg12 envolve a enzima ATG-7/Atg7 (semelhante a E1 da via ubiquitina-proteassoma), a enzima atg10/Atg10 (semelhante a E2 da via ubiquitina-proteassoma) e a ATG-16/Atg16, formando o complexo ATG-5/Atg5-ATG-12/Atg12-ATG-16/Atg16 que acrescenta a curvatura adequada do fagóforo e é essencial para a lipidação de ATG-8/Atg8 (OTOMO et al., 2013). Ainda envolve a cisteína protease ATG-4/Atg4, e a enzima ATG-3/ Atg3 (semelhante a E2 da via ubiquitina-proteassoma). Após lipidação do ATG-8/Atg8, este é recrutado para a superfície interna e externa do autofagossoma, permanece associado à membrana autofagosomal até a fusão com lisossoma. Depois disso, o ATG-8/Atg8 lipidado presente na superfície externa da membrana se dissocia, enquanto aqueles que estão associados com a membrana na superfície interna são degradados com a carga (TANIDA et al., 2008; RAVANA; SRIKUMAR; TALWAR, 2017).

4) Seleção de cargo:

A seleção do substrato é descrita para as proteínas SQSTM1 (GLICK et al., 2010; ZHANG et al., 2015), ALFY/ WDFY-3 (ABOUNIT et al., 2012) e NBR1/Atg9 (KIRKIN et al., 2009), proteínas de ligação à ubiquitina, que interagem com o domínio LIR de ATG-8/Atg8 lipidado.

5) Formação do autofagolisossomo:

A formação de autofagolisossomos é descrita tanto pela fusão endossomas precoce e tardio (formando então, estruturas denominadas anfisomas), e posterior fusão com lisossomos, ou pela fusão direta de autofagossomos com lisossomos (GANLEY, 2013). Desta forma, o

autofagossomo completo se funde com o lisossomo, levando à degradação da carga dentro do autofagolisossomo (PALMISANO; MELÉNDEZ, 2016).

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, D. P. *et al.* Curcumin generates oxidative stress and induces apoptosis in adult *Schistosoma mansoni* worms. **PLOS One**, v. 11, n. 11, p. 1-25, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167135>
- ABOUT, K.; SCARABELLI, T. M.; MCCAULEY, R. B. Autophagy in mammalian cells. **World Journal of Biological Chemistry**, v. 3, n. 1, p. 1-6, 2012. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v3.i1.1>
- AL RAWI, S. *et al.* Postfertilization autophagy of sperm organelles prevents paternal mitochondrial DNA transmission. **Science**, v. 334, n. 6059, p. 1144-1447, 2011. <https://doi.org/10.1126/science.1211878>
- ALBERTI, A. *et al.* The autophagosomal protein LGG-2 acts synergistically with LGG-1 in dauer formation and longevity in *C. elegans*. **Autophagy**, v. 6, n. 5, p. 622-633, Dec. 2010. <https://doi.org/10.4161/auto.6.5.12252>
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- AL-ADHAMI, B. H. *et al.* A study of some characteristics of individual clones of *Schistosoma mansoni* with emphasis on the biological and metabolic activities. **Parasitology**, v. 123, p. 563–572, 2001. <https://doi.org/10.1017/S0031182001008812>
- AL-ADHAMI, B. H. *et al.* The properties of acidic compartments in developing schistosomula of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, v. 127, p. 253–264, 2003. <https://doi.org/10.1017/S003118200300369X>
- AL-ADHAMI, B. H. *et al.* The role of acidic organelles in the development of schistosomula of *Schistosoma mansoni* and their response to signalling molecules. **Parasitology**, v.130, p. 309–322, 2005. <https://doi.org/10.1017/S0031182004006511>
- AL-OLAYAN, E. M. *et al.* Apoptosis in the malaria protozoan, *Plasmodium berghei*: a possible mechanism for limiting intensity of infection in the mosquito. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 1133–1143, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(02\)00087-5](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00087-5)
- AMELIO, I.; MELINO, G.; KNIGHT, R. A. Cell death pathology: Cross-talk with autophagy and its clinical implications. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 414, p. 277–281, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.09.080>
- BAEHRECKE, E. H. Autophagy: dual roles in life and death? **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.6, p. 505–510, 2005. <https://doi.org/10.1038/nrm1666>

- BARQUILLA, A.; CRESPO, J. L.; NAVARRO, M. Rapamycin inhibits trypanosome cell growth by preventing TOR complex 2 formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 38 p. 14579-14584, 2008. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802668105>
- BENNETT, J. L. *et al.* The development of resistance to anthelmintics: a perspective with an emphasis on the antischistosomal drug praziquantel. **Experimental Parasitology**, v. 87, p. 260–267, 1997. <https://doi.org/10.1006/expr.1997.4229>
- BERRIMAN, M. *et al.* The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. **Nature**, v. 460, p. 352–358, 2009. <https://doi.org/10.1038/nature08160>
- BESTEIRO, S. *et al.* Autophagy protein Atg3 is essential for maintaining mitochondrial integrity and for normal intracellular development of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. **PLOS Pathogens**, v. 7, n. 12, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002416>
- BOGITSH, B. J. Cytochemistry of gastrodermal autophagy following starvation in *Schistosoma mansoni*. **Journal of Parasitology**, v. 61, p. 237–248, 1975. <https://doi.org/10.2307/3279000>
- BOYA, P. *et al.* Inhibition of Macroautophagy Triggers Apoptosis. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25: 1025–1040, fev. 2005. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.3.1025-1040.2005>
- BOZZARO, S.; EICHINGER, L. The professional phagocyte *Dictyostelium discoideum* as a model host for bacterial pathogens. **Current Drug Targets**, v. 12, n. 7, p. 942-954, 2011. <https://doi.org/10.2174/138945011795677782>
- BRENNER, S. E. Errors in genome annotation. **Trends in Genetics**, v. 15, n. 4, p. 132–133, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(99\)01706-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(99)01706-0)
- BROWN, D.; SJÖLANDER, K. Functional classification using phylogenomic inference. **PLOS Computational Biology**, v. 2, n. 6, p. 77, 2006. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0020077>
- BRUCHHAUS, I. *et al.* Protozoan parasites: programmed cell death as a mechanism of parasitism. **Trends in Parasitology**, v. 23, p. 376-383, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.06.004>
- CALVO-GARRIDO, J. *et al.* Autophagy in *Dictyostelium*: genes and pathways, cell death and infection. **Autophagy**, v. 6, n. 6, p. 686-701, 2010. <https://doi.org/10.4161/auto.6.6.12513>
- CALVO-GARRIDO, J. *et al.* A proteolytic cleavage assay to monitor autophagy in *Dictyostelium discoideum*. **Autophagy**, Reino Unido, v. 7, n. 9, p. 1063-1068, 2011. <https://doi.org/10.4161/auto.7.9.16629>
- CARNEIRO-SANTOS, P. *et al.* Acidic vesicles of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, v. 87, p. 1001–1006, 2001. <https://doi.org/10.1017/S0022149X00028066>
- CLARKSON, J.; ERASMUS, D. A. *Schistosoma mansoni*: an *in vivo* study of drug-induced autophagy in the gastrodermis. **Journal of Helminthology**, v. 58, p.59-68, 1984. <https://doi.org/10.4155/fmc.15.27>

CAFFREY, C. R. Schistosomiasis and its treatment. **Future Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 6, p. 675–76, 2015. <https://doi.org/10.4155/fmc.15.27>

CHOSE, O. *et al.* Cell death in protists without mitochondria. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1010, p. 121–125, 2003. <https://doi.org/10.1196/annals.1299.021>

CARDOSO, T. C. S. *et al.* New insights into tomato microRNAs. **Scientific Reports**, v. 8, n. 16069, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34202-3>

CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; ARCHER, S. Antischistosomal drugs: Past, present and future. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 68, p. 35-85, 1995. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(95\)00026-7](https://doi.org/10.1016/0163-7258(95)00026-7)

CHIANG, C. K. *et al.* Involvement of Endoplasmic Reticulum Stress, Autophagy, and Apoptosis in Advanced Glycation End Products-Induced Glomerular Mesangial Cell Injury. **Scientific Reports**, v. 6, n. 34167, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep34167>

COELHO, M. V. Ação das formas larvárias do *Schistosoma mansoni* sobre a reprodução de *Australorbis glabratus*. **Publicações Avulsas do Instituto Aggeu Magalhães**, Rio de Janeiro: Brasil, v. 3, p. 39-54, 1954.

COLLEY, D. G. *et al.* Human schistosomiasis. **The Lancet**, v. 13, p. 1-12, 2014. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61949-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61949-2)

CRISCIONE, C. D. *et al.* Genomic linkage map of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. **Genome Biology**, vol. 10, n. 6, 2009. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-6-r71>

DE PAULA AGUIAR, D. *et al.* Curcumin Generates Oxidative Stress and Induces Apoptosis in Adult *Schistosoma mansoni* Worms. **PLOS ONE**, v. 11, n. 11, p. 1-25, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167135>

DOENHOFF, M.; KIMANI, G.; CIOLI, D. Praziquantel and the control of schistosomiasis. **Parasitol Today**, v. 16, n. 9, p. 364-366, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(00\)01749-X](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(00)01749-X)

MCMANUS, D. P. *et al.* Schistosomiasis. **Nature Reviews Disease Primer**, v. 4, n. 13, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0013-8>

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolatin of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, n. 1, p. 13-15, 1987.

DUBOIS, F. *et al.* Histone deacetylase inhibitors induce apoptosis, histone hyperacetylation and up-regulation of gene transcription in *Schistosoma mansoni*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 68, n. 1, p. 7-15, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.06.001>

DUSZENKO, M. *et al.* Death of a trypanosome: a selfish altruism. **Trends in Parasitology**, v. 22, p. 536–542, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.08.010>

- EISEN, J. A. Phylogenomics: improving functional predictions for uncharacterized genes by evolutionary analysis. **Genome Research**, v. 8, p. 163-167, 1998. <https://doi.org/10.1101/gr.8.3.163>
- EISEN, J. A.; WU, M. Phylogenetic analysis and gene functional predictions: phylogenomics in action. **Theoretical Population Biology**, v. 61, p. 481–487, 2002. <https://doi.org/10.1006/tpbi.2002.1594>
- EISENBERG-LERNER, A. *et al.* Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, p. 966–975, 2009. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.33>
- ERDÉLYI, P. *et al.* Shared developmental roles and transcriptional control of autophagy and apoptosis in *Caenorhabditis elegans*. **Journal Cell Science**, v. 124, n. 9, p. 1510-1518, 2011. <https://doi.org/10.1242/jcs.080192>
- FALLON, P. G. Schistosome resistance to praziquantel. **Drug Resistance Updates**, v. 1, n.4, p. 236-41, 1998. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.08.010>
- FENWICK, A.; SAVIOLI, L.; ENGELS, D.; ROBERT, N. B.; TODD, M. H. Drugs for the control of parasitic diseases: current status and development in schistosomiasis. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 509-515, 2003. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2003.09.005>
- FINN, R. D. *et al.* Pfam: the protein families database. **Nucleic Acids Research**, v. 42 p. 222-230, 2013. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1223>
- GALLUZZI, L. *et al.* Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. **Cell Death and Differentiation**, v. 14, p. 1237–1243, 2007. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402148>
- GALLUZZI, L. *et al.* Programmed Necrosis: From Molecules to Health and Disease. **International Review of Cell and Molecular Biology**. v. 289, p.1-35, 2011. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386039-2.00001-8>
- GALLUZZI, L. *et al.* Molecular definitions of autophagy and related processes. **The EMBO Journal**, v. 36, n. 13, 2017. <https://doi.org/10.15252/emboj.201796697>
- GALPERIN, M. Y.; KOONIN, E. V. Sources of systematic error in functional annotation of genomes: domain rearrangement, non-orthologous gene displacement and operon disruption. **In Silico Biology**, v.1, p. 55-67, 1998.
- GANLEY, I. G. *et al.* ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 18, p. 12297-12305, 2009. <https://doi.org/10.1074/jbc.M900573200>.
- GANLEY, I. G. Autophagosome maturation and lysosomal fusion. **Essays in Biochemistry**, v.55, p. 65-78, 2013. <https://doi.org/10.1042/bse0550065>
- GLASER, J. *et al.* Anti-Schistosomal Activity of Cinnamic Acid Esters: Eugenyl and Thymyl Cinnamate Induce Cytoplasmic Vacuoles and Death in Schistosomula of *Schistosoma*

mansoni. **Molecules**, v. 20, p. 10873-10883, 2015.

<https://doi.org/10.3390/molecules200610873>

GLICK, D.; BARTH, S.; MACLEOD, K. F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. **The Journal of Pathology**, v. 221, n. 1, p. 3-12, 2010. <https://doi.org/10.1002/path.2697>

GOBERT, G. N.; CHAI, M.; MCMANUS, D. P. Biology of the schistosome lung-stage schistosomulum. **Parasitology**, v.134, n.4, p.453-460, 2006.

<https://doi.org/10.1017/S0031182006001648>

GORMAND, A. *et al.* Regulation of AMP-activated protein kinase by LKB1 and CaMKK in adipocytes. **Journal of cellular biochemistry**, v. 112, n. 5, p. 1364-1375, 2011.

<https://doi.org/10.1002/jcb.23053>

GRYSEELS, B. *et al.* Human schistosomiasis. **The Lancet**, v. 368, p. 1106–1118, 2006.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69440-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69440-3)

GRYSEELS, B. Schistosomiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, p. 383–897, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.004>

HACKETT, F. The cultures of *Schistosoma mansoni* and production of life cycle stages.

Methods in Molecular Biology, v. 21, p. 89-99, 1993. <https://doi.org/10.1385/0-89603-239-6:89>

HAIN, A. U. P.; BOSH, J. Autophagy in *Plasmodium*, a multifunctional pathway? **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v.8, n. 11, p. 3, 2013.

<https://doi.org/10.5936/csbj.201308002>

HAIN, A. U. *et al.* Identification of an Atg8-Atg3 protein-protein interaction inhibitor from the medicines for Malaria Venture Malaria Box active in blood and liver stage *Plasmodium falciparum* parasites. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 11, p. 4521-4531, 2014.

<https://doi.org/10.1021/jm401675a>

HARNETT, W.; KUSEL, J. R. Increased exposure of parasite antigens at the surface of adult male *Schistosoma mansoni* exposed to praziquantel *in vitro*. **Parasitology**, v. 93, P. 401- 405, 1986. <https://doi.org/10.1017/S0031182000051568>

HARROP, R.; WILSON, R. A. Protein synthesis and release by cultures chistosomula of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, Reino Unido, v.107, n.3, p. 265-274, 1993.

HAILEY, D.W. *et al.* Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. **Cell**, v. 141, n. 4, p. 656-667, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.009>

HETZ, C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 13, n. 2, p. 89, 2012.

<https://doi.org/10.1038/nrm3270>

HOSOKA, W. A. *et al.* Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. **Molecular Biology of the Cell**, v. 20, n. 7, p. 1981-1991, 2009. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-12-1248>

INAGI, R. Endoplasmic reticulum stress as a progression factor for kidney injury. **Current opinion in pharmacology**, v. 10, n. 2, p. 156-165, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.11.006>

ISMAIL, M. *et al.* Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from Egyptian villagers. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60; p. 932-35, 1999. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.60.932>

JURBERG, A. D. *et al.* The embryonic development of *Schistosoma mansoni* eggs: proposal for a new staging system. **Development Genes and Evolution**, v.219, n.5, p.219-244, 2009. <https://doi.org/10.1007/s00427-009-0285-9>

KANEHISA, M; GOTO, S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. **Nucleic Acids Research**, v.28, p. 27-30, 2000. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>

KANG, C.; YOU, Y. J.; AVERY, L. Dual roles of autophagy in the survival of *Caenorhabditis elegans* during starvation. **Genes & Development**, v. 21, n. 17, p. 2161-2171, 2007. <https://doi.org/10.1101/gad.1573107>

KIEL, J. A. Autophagy in unicellular eukaryotes. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 365, p. 819-30, 2010. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0237>

KITAMURA, K. *et al.* Autophagy-related Atg8 localizes to the apicoplast of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **PLOS One**, v. 7, n. 8, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042977>

KIRKIN, V. *et al.* A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. **Molecular Cell**, v. 33, n. 4, p. 505-516, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.01.020>

KLIONSKY, D. J. *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. **Autophagy**, 3 ed., v. 4, p. 1554-8627, 2016. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1100356>

KOSKI, L. B.; GOLDING, G. B. The closest BLAST hit is often not the nearest neighbor. **Journal of Molecular Evolution**, v. 52, p. 540-2, 2001. <https://doi.org/10.1007/s002390010184>

KROEMER, G. *et al.* Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell Death and Differentiation**, v.12 n. 2, p. 1463–1467, 2005. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401724>

KROEMER, G.; JAATTELA, M. Lysosomes and autophagy in cell death control. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, p. 886–897, 2005. <https://doi.org/10.1038/nrc1738>

KUMMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Robbins e Cotran, bases patológicas da doença. **Elsevier**, ed. 7, p. 03-48, 2005.

LAPIERRE, L. R. *et al.* The TFEB orthologue HLH-30 regulates autophagy and modulates longevity in *Caenorhabditis elegans*. **Nature Communications**, v. 4, n. 2267, p. 1-8, 2013. <https://doi.org/10.1038/ncomms3267>

LEE, E. F. *et al.* Apoptosis in schistosomes: toward novel targets for the treatment of schistosomiasis. **Trends in Parasitology**, EUA, v. 30, n.2, p. 75-84, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.12.005>

LENZI, J. A. *et al.* Congenital and nursing effects on the evolution of *Schistosoma mansoni* infection in mice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 4, p. 257-67, 1987. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761987000800049>

LENZI, H. L. *et al.* Extracellular matrix in parasitic and infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 3, p. 77-90, 1991. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761991000700012>

LOOS, J. A., *et al.* Identification and pharmacological induction of autophagy in the larval stages of *Echinococcus granulosus*: an active catabolic process in calcareous corpuscles. **International Journal for Parasitology**, v. 44, p. 415- 427, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.02.007>

LO VERDE, *et al.* *Schistosoma masoni* male-female interactions. **Canadian Journal of Zoology**, v.82, p.357-374, 2004. <https://doi.org/10.1139/z03-217>

LIANG, Q.; YANG, P.; TIAN, E.; HAN, J.; ZHANG, H. The *C. elegans* ATG101 homolog EPG-9 directly interacts with EPG-1/Atg13 and is essential for autophagy. **Autophagy**, v. 8, n. 10, p. 1426-1433, 2012. <https://doi.org/10.4161/auto.21163>

LIU, S. *et al.* Evaluation of cell death pathways initiated by antitumor drugs melatonin and valproic acid in bladder cancer cells. **FEBS Open Bio**, v. 7, p. 798–810, 2017. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12223>

LU, Q. *et al.* The WD40 repeat PtdIns(3)P-binding protein EPG-6 regulates progression of omegasomes to autophagosomes. **Developmental Cell**, v. 21, n. 2, p. 343-357, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.06.024>

LU, K.; DEN BRAVE, F.; JENTSCH, S. Receptor oligomerization guides pathway choice between proteasomal and autophagic degradation. **Nature Cell Biology**, v. 19, n. 6, p. 732-739, 2017. <https://doi.org/10.1038/ncb3531>

LU, Q.; WU, F.; ZHANG, H. Aggrephagy: lessons from *Caenorhabditis elegans*. **Biochemical Journal**, 2013. v. 452, 385 p. il color. <https://doi.org/10.1042/BJ20121721>

MAGNUSSEN, P. Treatment and re-treatment strategies for schistosomiasis control in different epidemiological settings: a review of 10 years' experiences. **Acta Tropica**, v. 86, p. 243-54, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(03\)00045-7](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(03)00045-7)

MANIL-SÉGALEN, M., *et al.* The *C. elegans* LC3 acts downstream of GABARAP to degrade autophagosomes by interacting with the HOPS subunit VPS39. **Developmental Cell**, v. 28, n. 1, p. 43-55, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.11.022>

MARCHLER-BAUER *et al.*, CDD: NCBI's conserved domain database. **Nucleic Acids Research**, Reino Unido, v. 43, p. 222–226, 2014. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1221>

MELÉNDEZ, A. *et al.* Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. **Science**, v. 301, n. 5638, p. 1387-1391, 2003. <https://doi.org/10.1126/science.1087782>

MELÉNDEZ, A.; LEVINE, B. Autophagy in *C. elegans*. **WormBook**, v. 24, p. 1–26, 2009. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.147.1>

MELHORN, H. *et al.* *In vivo* and *in vitro* experiments on the effects of praziquantel on *Schistosoma mansoni*. **Drug Research**, v. 31, p. 544 – 554, 1981.

MELMAN, S. D. *et al.* Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, p. 504–504, 2009. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000504>

MELO, A. L.; COELHO, P. M. Z. Parasitologia Humana: *Schistosoma mansoni* e a doença. **Atheneu**: Rio de Janeiro, ed. 11, p. 193–212, 2005.

MESSERLI, S. M. *et al.* *Schistosoma mansoni* P- glycoprotein levels increase in response to praziquantel exposure and correlate with reduced praziquantel susceptibility. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 167, p. 54–59, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.04.007>

MIKHAYLOVA, O. *et al.* VHL-regulated MiR-204 suppresses tumor growth through inhibition of LC3B-mediated autophagy in renal clear cell carcinoma. **Cancer Cell**, v. 21, p. 532-46, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.019>

BRASIL. Ministério da Saúde. Situação Epidemiológica e estratégias de prevenção, controle e eliminação das Doenças Tropicais Negligenciadas no Brasil, 1995 a 2016. **Boletim Epidemiológico**. Cidade: 2018. v. 49, n. 49, numero p. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/novembro/19/2018-032.pdf>. Acesso em: janeiro 2019.

MIZUSHIMA, N. *et al.* Autophagy fights disease through cellular self-digestion. **Nature**, v. 451, n. 7182, p. 1069-75, 2008. <https://doi.org/10.1038/nature06639>

MIZUSHIMA, N.; YOSHIMORI, T.; OHSUMI, Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 27, p. 107–132, 2011. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154005>

MIZUSHIMA, N.; KLIONSKY, D. J. Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. **Annual Review of Nutrition**, v. 27, p. 19-40, 2007. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.27.061406.093749>

MIZUSHIMA, N. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. **Nature Reviews**, 2008. v. 5, n. 7, p. 1069 p. il color. <https://doi.org/10.1038/nature06639>

MOHAPATRA, A. D. *et al.* Caspase dependent programmed cell death in developing embryos: a potential target for therapeutic intervention against pathogenic nematodes. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 9, p. 1-16, 2011.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001306>

MOORE, D.V.; SANDGROUND, J. H. The relative egg producing capacity of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.5, p.831–840, 1956. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1956.5.831>

MORSELLI, E. *et al.* Caloric restriction and resveratrol promote longevity through the Sirtuin-1-dependent induction of autophagy. **Cell Death & Disease**, v. 1, p. 10, 2010.
<https://doi.org/10.1038/cddis.2009.8>

MOURÃO, M. M. *et al.* Recent advances in *Schistosoma* genomics. **Parasite Immunology**, v. 34, p. 151–162, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2011.01349.x>

MULLIKIN, J. C.; NING, Z. The phusion assembler. **Genome Research**, v. 1, p. 81-90, 2003. <https://doi.org/10.1101/gr.731003>

NAHUM, L. A.; MOURÃO, M. M.; OLIVEIRA, G. New Frontiers in *Schistosoma* Genomics and Transcriptomics. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, p. 1-11, 2012.
<https://doi.org/10.1155/2012/849132>

NAHUM LA, PEREIRA SL. Phylogenomics, Protein Family Evolution, and the Tree of Life: An Integrated Approach between Molecular Evolution and Computational Intelligence. **Springer-Verlag**, v. 122, n. 11, p. 259–279, 2008.

NAVALE, R. *et al.* Characterization of the autophagy marker protein Atg8 reveals atypical features of autophagy in *Plasmodium falciparum*. **PLOS One**, v. 9, n. 11, 2014.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113220>

OLIVEIRA, M. F. *et al.* Inhibition of heme aggregation by chloroquine reduces *Schistosoma mansoni* infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p. 843-852, 2004.
<https://doi.org/10.1086/422759>

OLIVEIRA, F. A. **Avaliação do efeito do praziquantel, da oxamniquina e da associação destas drogas sobre o verme adulto de *Schistosoma mansoni***. Dissertação (mestrado) – apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, p. 24-27, 2005.

ORSI, A. *et al.* Dynamic and transient interactions of Atg9 with autophagosomes, but not membrane integration, are required for autophagy. **Molecular biology of the cell**, v. 23, n. 10, p. 1860- 873, 2012. <https://doi.org/10.1091/mbc.e11-09-0746>

OTOMO, C. *et al.* Structure of the human ATG12~ ATG5 conjugate required for LC3 lipidation in autophagy. **Nature structural & molecular biology**, v. 20, n. 1, 59-66, 2013.
<https://doi.org/10.1038/nsmb.2431>

PAGE, R. D. M.; HOLMES, E. C. Molecular Evolution. A phylogenetic approach. **Blackwell Science Ltd.**, p. 346, 1998.

PALIKARAS, K., LIONAKI, E., TAVERNARAKIS, N. Coordination of mitophagy and mitochondrial biogenesis during ageing in *C. elegans*. **Nature**, v. 521, n. 7553, p. 525-528, 2015. <https://doi.org/10.1038/nature14300>

PALMISANO, N. J., MELÉNDEZ, A. Detection of Autophagy in *Caenorhabditis elegans*. **Cold Spring Harbor Protocols**, v.2, p. 107-117, 2016. <https://doi.org/10.1101/pdb.top070466>

PAN, S. C. *Schistosoma mansoni*: the ultrastructure of larval morphogenesis in *Biomphalaria glabrata* and of associated host-parasite interactions. **Japanese journal of medical science & biology**, v. 49, p. 129-149, 1996. <https://doi.org/10.7883/yoken1952.49.129>

PANARETOU, C. *et al.* Characterization of p150, an adaptor protein for the human phosphatidylinositol (PtdIns) 3-kinase substrate presentation by phosphatidylinositol transfer protein to the p150-; PtdIns 3- kinase complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 4, p. 2477-2485, 1997. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.4.2477>

PARSONS, M. J., GREEN, D. R. Mitochondria in cell death. **Essays in biochemistry**, v. 47, p. 99-114, 2010. <https://doi.org/10.1042/bse0470099>

PAX, R.; BENNETT, J. L.; FETTERER, R. A Benzodiazepine Derivative and raziquantel: Effects on Musculature of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 304, p. 309-315, 1978. <https://doi.org/10.1007/BF00507974>

PELLEGRINO, J.; COELHO, P. M. *Schistosoma mansoni*: wandering capacity of a worm couple. **The Journal of Parasitology**, v.64, p.181–182, 1978. <https://doi.org/10.2307/3279647>

PICA- MATTOCCIA, L. *et al.* Genetic analysis of decreased praziquantel sensitivity in a laboratory strain of *Schistosoma mansoni*. **Acta Tropica**, v. 111, p. 82–85, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.01.012>

PICOT, S. *et al.* Apoptosis related to chloroquine sensitivity of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, p. 590–591, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(97\)90039-0](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(97)90039-0)

PROTASIO, A. V. *et al.* A systematically improved high quality genome and transcriptome of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. **PLOS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001455>

PURI, C. *et al.* Diverse autophagosome membrane sources coalesce in recycling endosomes. **Cell**, v. 154, n. 6, p. 1285-1299, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.044>

RAMKUMAR, A. *et al.* Classical autophagy proteins LC3B and ATG4B facilitate melanosome movement on cytoskeletal tracks. **Autophagy**, v. 13, n.7, p. 1- 49, 2017. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1327509>

RAVANAN, P.; SRIKUMAR, I. F.; TALWAR, P. Autophagy: the spotlight for cellular stress responses. **Life Sciences**, v. 188, p. 53-67, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.08.029>

RAVANAN, P.; SRIKUMAR, I. F.; TALWAR, P. Autophagy: the spotlight for cellular stress responses. **Life Sciences**, 2017. v. 188, 17 p., il color. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.08.029>

RIDLEY, M. Evolução. Porto Alegre: **Editora Artmed**, 3. ed. cap. 15, p. 447-495, 2006.

ROLLINSON, D. *et al.*, Time to set the agenda for schistosomiasis elimination. **Acta Tropica**, p. 1-18, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.04.013>

RUSSELL, R. C. *et al.* ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. **Nature cell biology**, v.15, n. 7, p. 741-750, 2013. <https://doi.org/10.1038/ncb2757>

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-25, 1987. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>

SCHIAVI, A. *et al.* Autophagy induction extends lifespan and reduces lipid content in response to frataxin silencing in *C. elegans*. **Experimental Gerontology**, v. 48, n. 2, p. 191-201, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2012.12.002>

SCHIAVI, A, *et al.* Iron-Starvation-Induced Mitophagy Mediates Lifespan Extension upon Mitochondrial Stress in *C. elegans*. **Current Biology**, v. 25, n.14, p. 1810-1822, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.05.059>.

SCHNEIDER, H. Métodos de análise filogenética. 3. ed. Ribeirão Preto: **Holos Editora**, 2007. cap. 6, p. 56-71.

SENGUPTA, T. *et al.* Base excision repair AP endonucleases and mismatch repair act together to induce checkpoint-mediated autophagy. **Nature Communications**, v. 4, p. 2674, 2013. <https://doi.org/10.1038/ncomms3674>

SETTEMBRE, C. *et al.* TFEB controls cellular lipid metabolism through a starvation-induced autoregulatory loop. **Nature Cell Biology**, v. 15, p. 647–658, 2013. <https://doi.org/10.1038/ncb2718>

SHAHA, C. Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease pathogenesis. **Indian Journal of Medical Research**, v. 123, p. 233–244, 2006.

SHEN, H; MIZUSHIMA, N. At the end of the autophagic road: an emerging understanding of lysosomal functions in autophagy. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 39, n. 2, p. 61-71, fev. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.12.001>

SHIMIZU, S. *et al.* Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. **Nature Cell Biology**, v. 6, p. 1221–1228, 2004. <https://doi.org/10.1038/ncb1192>

SILVA, L. L. **O filoma de *Schistosoma mansoni***. Tese de mestrado, apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, p. 1-71, 2010. Disponível em: <http://www.pggenetica.icb.ufmg.br/defesas/141M.PDF>. Acesso em: 18 maio 2017.

SILVA, L. L. **O filoma de *Schistosoma mansoni***. Tese de mestrado, apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010, 11 p. il. color. Disponível em: <http://www.pggenetica.icb.ufmg.br/defesas/141M.PDF>. Acesso em: 18 maio 2017.

SIMPSON, A. J.; SHER, A.; MCCUTCHAN, T. F. The genome of *Schistosoma mansoni*: isolation of DNA, its size, bases and repetitive sequences. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 6, p. 125–137, 1982. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(82\)90070-6](https://doi.org/10.1016/0166-6851(82)90070-6)

SMITHERS, S. R.; TERRY, R. J. Infection of Laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni*: and the recovery of adult worms. **Parasitology**, v. 55, p. 695 – 700, 1965. <https://doi.org/10.1017/S0031182000086248>

STEINMANN, P. *et al.* Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **The Lancet Infectious Diseases**, v.6, p.411-425, 2006. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70521-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70521-7)

STUDIER, J. A., KEPPLER, K. J. A note on the neighbor-joining algorithm of Saitou and Nei. **Molecular Biology and Evolution**, v. 5, p. 729-31, 1988. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040527>

STURM, A. *et al.* Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science**, v. 313, p. 1287–1290, 2006. <https://doi.org/10.1126/science.1129720>

TAIT, A. Genetics and genomics converge on the human blood fluke. **Genome Biology**, v. 10, n. 6, p. 1-3, 2009. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-6-225>

TAKACS-VELLAI, K. *et al.* Inactivation of the autophagy gene bec-1 triggers apoptotic cell death in *C. elegans*. **Current Biology**, v. 15, n. 16, p. 1513-1517, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.07.035>

TAMURA, K. *et al.* MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 8, p. 1596–1599, 2007. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm092>

TANIDA, I.; UENO, T.; AND KOMINAMI, E. LC3 and Autophagy. **Methods in Molecular Biology**, v. 445, p. 77-88, 2008. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-157-4_4

TAVERNARAKIS, N. *et al.* The effects of p53 on whole organism longevity are mediated by autophagy. **Autophagy**, v. 4, n. 7, p. 870-873, 2008. <https://doi.org/10.4161/auto.6730>

TIAN, Y., *et al.* *C. elegans* screen identifies autophagy genes specific to multicellular organisms. **Cell**, v. 141, n. 6, p. 1042-1055, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.034>

THOMÉ, M. P. **Nova abordagem para análise de autofagia com o marcador Laranja de acridina**. Trabalho de conclusão de curso de graduação, apresentado ao Instituto de Ciências básicas da saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p. 11-13, 2013.

TSUKADA, M.; OHSUMI, Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 333, n. 1-2, p. 69-74, 1993.
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80398-E](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80398-E)

URRA, H. *et al.* Endoplasmic Reticulum Stress and the Hallmarks of Cancer. **Trends in Cancer**, v. 2, n. 5, p. 252-262, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2016.03.007>

UTZINGER, J. *et al.* Schistosomiasis and neglected tropical diseases: towards integrated and sustainable control and a word of caution. **Parasitology**, v.136, p. 1859, 2009.
<https://doi.org/10.1017/S0031182009991600>

VALE, T. C. *et al.* Neuroschistosomiasis mansoni: literature review and guidelines. **The Neurologist**, v. 18, p. 333–342 2012. <https://doi.org/10.1097/NRL.0b013e3182704d1e>

VAN DE SAND, C. *et al.* The liver stage of *Plasmodium berghei* inhibits host cell apoptosis. **Molecular Microbiology**, v. 58, p. 731–742, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04888.x>

VERJOVSKI-ALMEIDA, S. *et al.* Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. **Nature Genetics**, v. 35, p. 148–157, 2003.
<https://doi.org/10.1038/ng1237>

WARREN, K. S. Schistosomiasis: past, present and future. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 4, p. 25-30, 1987. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761987000800006>

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Schistosomiasis. Media Center – Fact Sheets, 2017. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>. Acesso em: julho de 2017.

WILLIAMS, R. A., TETLEY, J. L., MOTTRAM, J. C. Cysteine peptidases CPA and CPB are vital for autophagy and differentiation in *Leishmania mexicana*. **Molecular Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 655-674, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05274.x>

WOLDE-MUSSIE, E. *et al.* *Schistosoma mansoni*: Calcium Efflux and Effects of Calcium-Free Media on Responses of the Adult Male Musculature to Praziquantel and Other Agents Inducing Contraction. **Experimental Parasitology**, v.53, p. 270-278, 1982.
[https://doi.org/10.1016/0014-4894\(82\)90069-8](https://doi.org/10.1016/0014-4894(82)90069-8)

WOUTERS, B.; KORITZINSKY, M. Hypoxia signaling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, p. 851–864, 2008.
<https://doi.org/10.1038/nrc2501>

WU, F. *et al.* Differential function of the two Atg4 homologues in the aggrephagy pathway in *Caenorhabditis elegans*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 35, p. 29457-29467, 2012. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.365676>

XIAO, S. *et al.* Prasiquantel-Induced Vesicle Formation in the Tegument of Male *Schistosoma mansoni* is Calcium Dependent. **The Journal of Pathology**, v. 70, n. 1, p. 177-179, 1984.

XIAO, S. H., SUN, J., CHEN, M. G. Pharmacological and immunological effects of praziquantel against *Schistosoma japonicum*: a scoping review of experimental studies. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 7, n. 1, p. 9, 2018. <https://doi.org/10.1186/s40249-018-0391-x>

YANG, Z.; KLIONSKY, D. J. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 22, p. 124–131, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.11.014>

YLÄ-ANTTILA, P. *et al.* 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. **Autophagy**, v. 5, n. 8, p. 1180-1185, 2009. <https://doi.org/10.4161/auto.5.8.10274>

ZHANG H. *et al.* Guidelines for monitoring autophagy in *Caenorhabditis elegans*. **Autophagy**, v. 11, n. 1, p. 9-27, 2015. <https://doi.org/10.1080/15548627.2014.1003478>

ZERLOTINI A. *et al.* SchistoDB: a *Schistosoma mansoni* genome resource. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. 579–582, 2009. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn681>

Capítulo 2: TRABALHO EXPERIMENTAL

Intenção de submissão ao periódico “JOURNAL OF EXPERIMENTAL BIOLOGY” ISSN: 0022-0949, as normas encontram-se em anexo.

Uncovering autophagy pathway in *S. mansoni*: bioinformatic and morfological approaches

Julliane A. Bastos^{1,*}, Laysa G. Portilho¹, Tamires C. Alves¹, Mariana C. Pagotti², Lucas A. L. Paula², Arthur B. Ribeiro², Denise C. Tavares², Matheus de S. Gomes¹, Enyara R. Morais¹, Lizandra G. Magalhães^{1,2,*}

¹Laboratório de Análises Moleculares e Bioinformática, Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, *Campus* Patos de Minas, Patos de Minas-MG;

²Núcleo de Pesquisa em Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade de Franca, Franca – SP.

*Corresponding author's email address: julliane.bastos@ufu.br (JAB), lizandra.magalhaes@unifran.edu.br (LGM).

Key words: Intracellular signaling. Cell death. *Schistosoma mansoni*. Autophagy, Bioinformatics.

Abbreviations:

AMPK- AMP-activated protein kinase

AMP- activated protein kinase (AMPQ)

ATG- Autophagy-related

ATP- Adenosine triphosphate

BEC-1- *C. elegans* protein homologous to yeast Vps30/Atg6, Beclin-1 to *H. sapiens*

BLASTp- Basic Local Alignment Search Tool – Protein

CDD- Conserved domain database

CO₂- Carbon dioxide

E1- Enzyme 1

EPG- Ectopic P granules protein

GC- Germ cell

HCl- Hydrogen chloride

LET-363- *C. elegans* protein orthologous to yeast TOR1,2

LGG-1- *C. elegans* protein homologous to yeast Atg8

LE- Luiz Evangelista

M- Mitochondria

ME- Malformed *S. mansoni* eggs

NE- Normal *S. mansoni* eggs

N- Núcleo

NaOH- Hidróxido de sódio
NC- Negative control
PBS- Phosphate buffered saline
PFAM- PFAM database
PZQ-Praziquantel
RPMI- Created by the Roswell Park Memorial Institute
S- Substrate
Sm- *Schistosoma mansoni* protein
Spm- Sperm
TEM- Transmission Electron Microscopy
UNC-51- Serine/threonine-protein kinase unc-51
V- Vacuole
VKR- Venus kinase receptor
VPS- Vacuolar protein sorting

SUMMARY STATEMENT

Possible molecular targets against schistosomiasis: characterisation of the autophagic proteins SmLGG-1, SmUNC-51, SmVPS-34 and SmATG-9 in *Schistosoma mansoni* through bioinformatics and transmission electron microscopy and fluorescence microscopy.

ABSTRACT

The autophagy pathway is an evolutionarily conserved catabolic process consisting of the selection of substrates to be degraded in double-membrane vacuoles called autophagolysosomes. The identification and characterisation of the autophagy pathway in *Schistosoma mansoni* may reveal new molecular targets against Schistosomiasis, since there is evidence of less sensitive strains of Praziquantel (PZQ), the only drug of choice against the disease. To identify and characterise the pathway through bioinformatics analyses, we used the local alignment of components of the orthologous autophagic pathway against the *S. mansoni* database. We identified 21 proteins predicted in *S. mansoni*, and analysed the domain conservation and phylogeny of the predicted proteins SmLGG-1, SmUNC-51, SmVPS-34 and SmATG-9, which have important functions from pathway activation to the degradation of substrates in the autophagolysosome. We demonstrated, through transmission electron microscopy and fluorescence microscopy, the increased presence of acid vacuoles in pairs of adult worms after nutrient deprivation for up to 72 hours.

INTRODUCTION

Schistosomiasis is a neglected disease that affects millions of people, especially in tropical and subtropical regions of the world (McManus, 2018). The treatment is based on the use of Praziquantel (PZQ), which despite having several advantages in its use, including the fact that it is the only available drug, may lead to the appearance of less sensitive lines (Bennett, 1997; Melman et al., 2009; Caffrey, 2015). Thus, a greater understanding of the metabolic pathways of the parasite may provide important information for the design and development of new schistosomicidal substances.

In the parasite *Schistosoma mansoni*, there have been reports of the presence of autophagic vacuoles (Bogitsh, 1975; Al-Adhami et al., 2001; Carneiro-Santos et al., 2001; Al-Adhami et al. 2005; Glaser et al., 2015); until now, the identification and characterisation of the molecular components involved in the pathway, and their respective functions, remain unknown. In addition, it is possible to identify genes constituting the autophagic pathway in databases generated by genomic and transcriptomic studies of *S. mansoni* (Verjovski-Almeida et al., 2003; Berriman et al., 2009; Mourão et al., 2012).

The process of macroautophagy consists of distinct stages consisting of 1) activation of the pathway, either by stress of the endoplasmic reticulum or the restriction of nutrients; 2) nucleation – the formation of a phagophore (also referred to as an insulation membrane or the pre-autophagosomal structure); 3) elongation and closure to form the autophagosome; 4) substrate selection; 5) fusion of the autophagosome with a lysosome, resulting in a double membrane structure called an autophagolysosome; and 6) degradation of the autophagolysosomal content and recycling of the degraded material (Figure 1) (Mizushima and Klionsky 2007 ; Xie and Klionsky, 2007 ; Nakatogawa et al., 2009; Galluzzi et al., 2017; Ravana; Srikumar; Talwar, 2017).

In parasites of the genus *Schistosoma*, the Bcl-2-mediated apoptosis death pathway is well described (Lee et al., 2014) and its close relationship with the autophagy pathway leads to the need to identify and characterise this pathway based on in silico, molecular and morphological analyses in search of potential molecular targets for the development of new drugs against schistosomiasis. In this work, we attempted to reconstitute the autophagy pathway in *S. mansoni* using bioinformatics approaches and also showed, through microscopy, the presence of autophagic vacuoles under conditions of glucose deprivation.

MATERIAL AND METHODS

Identification of the autophagic pathway in the *S. mansoni* database

For the identification and comparison of homologous sequences involved in the pathway studied in *S. mansoni*, the sequences of the main proteins mentioned in the literature were used as the "query" for the *Caenorhabditis elegans* homologue database available at <https://www.wormbase.org/#012-34-5> (Lee et al., 2018), and aligned to the genome of *S. mansoni* available at <http://www.sanger.ac.uk/resources/downloads/helminths/schistosoma-mansoni.html> (Berriman et al., 2009; Protasio et al., 2012), using the BLASTp program (Basic Local Alignment Search Tool - Protein) presente on site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast> (Johnson et al., 2008). Identities close to or greater than 30% were accepted with an E-value <10⁻⁵. The genetic sequence and the mRNA sequence encoding the proteins under investigation were retrieved from the GeneDB Database available at https://apollo.genedb.org/Smansoni/jbrowse/index.html?tracks=DNA%2CAnnotations%2Cgene%2CmRNA&highlight=&loc=Schisto_mansoni.Chr_1%3A26191086..39286422 and the conserved domain database using the PFAM (PFAM database) available at <http://pfam.xfam.org/> (Finn et al., 2013) and CDD (Conserved domain database) programs available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi> (Marchler-Bauer et al., 2015). The orthologues found were named using the first letters of the species name, Sm, followed by the name of the protein found in *C. elegans* and the number in the occurrence of paralogues.

Phylogenetic analysis

For the evolutionary analysis of *Schistosoma mansoni*, the ATG-9, LGG-1, VPS-34 and UNC-51 proteins of orthologues, and the predicted proteins Smp_149960.1, Smp_073790.1, Smp_128130.1 and Smp_157350.1 of *S. mansoni* were aligned using ClustalX 2.1 (Larkin et al., 2007). The phylogenetic tree was inferred using the neighbour-joining method (Saitou and Nei, 1987). The statistical reliability of the internal branches was evaluated using 2000 bootstrap replicates, showing values of above 30 in the branches. Molecular phylogenetic analyses were performed using the MEGA 5.2.2 software using the maximum parsimony method based on the amino acid sequence (Tamura et al., 2007). Sequence logos were generated using WebLogo 2.8.2 available at <http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi> (Crooks et al., 2004).

Maintenance of the life cycle of *S. mansoni*

The life cycle of *S. mansoni*, LE (Luiz Evangelista) strain is routinely maintained by the serial passage in the mollusc *Biomphalaria glabrata*, intermediate host and in BALB/c mice as definitive host (Hackett, 1993) in the Parasitology Research Laboratory of the University of

Franca (LAPPA). The maintenance of the cycle was approved by the Ethical Commission for the Use of Animals of the University of Franca (protocol n° 5199070417).

S. mansoni eggs present in faeces from mice previously infected with the parasite were collected by the Hoffmann method and exposed for approximately 1 hour under light for the liberation of miracidia. Miracides are used to infect the intermediate host, which after 38 to 45 days release the infecting form of the parasite, the cercariae; this, in turn, infects the vertebrate host. About 200 cercariae were inoculated in the mice subcutaneously and the adult worms were recovered after 56 days from the hepatic portal system and the mesenteric veins by perfusion (Smithers and Terry 1965). After collection, the parasites were maintained in complete RPMI 1640 medium (Gibco) for a maximum of 30 minutes and subsequently plated in culture media with specific glucose concentrations.

Cultivation of adult worms in culture medium with glucose deprivation on viability and oviposition of adult worms

Pairs of adult worms were recovered from BALB/c mice, as previously described. Subsequently, an adult worm pair was transferred to each well in a 24-well culture dish (Kasvi) containing 1 ml of RPMI 1640 medium (Cultilab) deprived of glucose or supplemented with different concentrations of glucose (0 mg mL⁻¹ a 1 mg mL⁻¹) and 10% dialysed foetal bovine serum (Invitrogen), this procedure was elaborated in the group of based on to dependence to glucose to the long life cycle of *S. mansoni* (Bueding, 1950). The parasites were incubated in a humidifying atmosphere at 37°C in the presence of 5% CO₂ for 24, 48 and 72 hours and, during these periods, the general parameters such as viability, mortality and oviposition were evaluated. The viability and pairing of the couples were evaluated using an inverted microscope (Primo Vert Microscope, Carl Zeiss, Göttingen, Germany) and viability was determined according to a viability scale of 0-3, with 3 = normally moving worms, 2 = decreased motor activity, 1 = minimal motor activity with occasional movements, and 0 = death of worms, with no movement for more than 2 minutes of observation (Ramirez et al., 2007). As a negative control, the glucose concentration of 2 mg mL⁻¹ was used in adult worm couples under the same conditions. Three independent experiments were carried out, and four adult worms were evaluated per concentration in each experiment (24 pairs of parasites in total). The results were expressed as the mean ± standard deviation of the viability of male and female adult worms.

Transmission Electron Microscopy (TEM)

Adult worms were cultured and incubated as previously described at glucose concentrations of 2 mg mL⁻¹ (negative control), 0.5 mg mL⁻¹ and 0 mg mL⁻¹, and after 24, 48 and 72 hours were carefully separated with the aid of a brush and fixed in 3% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) for 2 hours at 37°C. Subsequently, they were washed three times with the same buffer and post-fixed in 3% glutaraldehyde in phosphate buffer for 1 hour at room temperature. Then, dehydrated in increasing concentrations of ethanol, the infiltration was achieved with araldite and acetone and the inclusion in araldite. Semi-thin cuts were made on a 0.5 micrometre glass slide microtome and stained with haematoxylin/eosin. The best cuts were selected, obtaining ultra-thin cuts with a diamond knife at 60 nm thickness, which were contrasted, observed and electromicrographed under a Jeol-JSM-5200 (Jeol) transmission electron microscope at the Multiuser Microscopy Laboratory of the Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. A total of 10 couples were evaluated.

Fluorescence Microscopy with Acridine Orange

Detection of the acid vacuoles by staining with acridine orange was performed, as described previously by Filippi-Chiela et al., 2013, 2011; Kanzawa et al., 2004, and briefly described below.

Adult worms were cultured and incubated as previously described at glucose concentrations of 2 mg mL⁻¹ (negative control), 0.5 mg mL⁻¹ and 0 mg mL⁻¹. After incubation periods of 24, 48 and 72 hours, the couples were carefully separated with the aid of a brush, and each parasite was transferred to a well of a culture dish containing RPMI 1640 medium (Cultilab) at the same concentrations of glucose that were previously used.

Then, 1 mL of a solution of acridine orange (Sigma Aldrich) dye previously dissolved in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4 at a concentration of 2.7 µM was added to each culture well. After 15 minutes of incubation with the dye at room temperature, the dye containing solution was removed, and the parasites were washed 5 times with RPMI 1640 medium without glucose (Cultilab). The parasites were then transferred to slides and assembled using 100 µl of Fluormont (Electron Microscopy Science, Hatfield, EUA) and analysed under a fluorescence microscope coupled with a photographic camera (Axio Cam MRc Carl Zeiss, Göttingen, Germany). The filters used were FS 15 (Excitation: BP 534-558 nm, FT: 580nm, Emission: 590 nm) for red fluorescence and FS 25 for HE (Excitation: TBP 405+495+575 nm (HE), TFT: 435+510+600 nm (HE), Emission: TBP 460+530+625 nm) for green fluorescence.

Statistical analysis

When possible, the results were evaluated by the one-way analysis of variance followed by determination of the significance of the differences between two or more groups (Dunnett or Tukey pairwise comparisons). The critical level was set at 5% ($P < 0.05$) to allow a difference of statistically significant values. The tests were performed using GraphPad Prism version 5.0 for Windows (GraphPad software, USA).

RESULTS

In silico analysis of the constituents of the autophagy pathway

To characterise the probable proteins involved in autophagy in *S. mansoni*, we sought to identify all of the components involved in autophagic machinery in the nearest orthologue and model organism in autophagic studies, *C. elegans* (Klionsky et al., 2016; Palmisano and Meléndez, 2016). Using local alignment, as well as the presence and arrangement of conserved domains, 21 predicted proteins were identified in *S. mansoni* (Table 1) involved in processes from the activation of autophagy to the degradation of the substrate within the autophagolysosome.

Among these, the proteins called ATGs, primarily described in yeasts, have distinct conserved domains. Although the name only classifies them as being linked to autophagy, the domain families differ for each according to their function. Each domain, size and identity of the 21 predicted proteins were analyzed separately (data not shown), and four of them were chosen for the more detailed analyses. The criterion of choice was based on the functional importance of these proteins along the autophagic flow. Therefore, the first protein chosen was LGG-1, the most widely studied autophagy-related protein, homologous to yeast ubiquitin-like protein ATG8 (Klionsky et al. 2016). The second choice was UNC-51, which is involved in the first steps of phagophore formation, activating EPG-1 and EPG-7 by phosphorylation (Ganley et al., 2009; Palmisano and Meléndez, 2016), as well as phosphorylating BEC-1 in the PI3K complex (Russell et al., 2013). The third choice was the VPS-34 protein, designated phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P), through the production of the substrate phosphatidylinositol (PI), which supports the expansion and growth of the phagophore (Proikas-Cezanne et al, 2015; Glick et al., 2010; Palmisano and Meléndez, 2016). The fourth protein of choice was ATG-9, which is the only integral protein of the Atg membrane that is essential for the formation of autophagosomes in all eukaryotes (Klionsky et al., 2016).

The predicted SmLGG-1 protein (Smp_073790.1 sequence deposited in the GeneDB database) is similar in size to the *C. elegans* LGG-1 (WBGene00002980) orthologous protein, 123 and 125 amino acids, respectively, and 68% identity, E-value $7e^{-57}$. SmLGG-1 present the

domain ATG8 (PF02991), with the coverage region of residue 13 to 116, and E-value 6.7×10^{-44} . LGG-1 is referred to as Ubl (ubiquitin-like proteins), which unlike the others that are conjugated to proteins, is conjugated to phosphatidylethanolamine (PE) (Ichimura et al., 2000). For this conjugation to occur, LGG-1 needs to be activated by an E1-like enzyme, Atg-7 (Kim et al., 1999; Tanida et al., 1999). Accordingly, the SmLGG-1 predicted protein showed an ATG-7 binding site and also a likely tubulin-binding site in the N-terminal region (Table S1). This domain is part of the clone of the ubiquitin superfamily (CL0072) (Larsen and Wang, 2002). Figure 2A shows the weblog analysis and multiple sequence alignments of the ATG8 domain, highlighting the active site amino acids and flanking residues. Figure S1 shows the phylogenetic tree of UNC-51 proteins, showing the relationships between orthologous proteins.

The predicted SmUNC-51 protein (Smp_157350.1 sequence deposited in the GeneDB database) superior size to *C. elegans* UNC-51 (WBGene00006786) orthologous protein, with 1024 and 856 amino acids, respectively, had a 59% identity, E-value 2×10^{-52} . SmUNC-51 present the domain Pkinase (PF00069), with the coverage region of residue 4 to 158, and E-value 2×10^{-32} . UNC-51 is referred to as a protein kinase, which are enzymes that catalyse the phosphorylation of proteins by transferring a phosphoryl group from ATP to threonine, serine or tyrosine residues (McAlpine, 2013). As in UNC-51, the serine/threonine Pkinase (PF00069) catalytic domain was located in the N-terminal portion of SmUNC-51. This domain is composed of an active site, an ATP-binding site, a polypeptide substrate binding site and an activation loop (A-loop). However, the *S. mansoni* protein does not present part of the first three domains, and may be the result of a truncation. In contrast, the amino acid residues present in the domains are, except for Gly17, exchanged for residues of the same group in *S. mansoni* (Table S1). *C. elegans* also possesses, after this domain, a region that is rich in serine and proline, which is also found in *S. mansoni*, although the domain (DUF3543) in the C-terminal portion is not identified by PFAM and CDD. Figure 2B shows the weblog analysis and multiple sequence alignments of the Pkinase domain, highlighting the active site amino acids and flanking residues. Figure S2 shows the phylogenetic tree of UNC-51 proteins, showing the relationships between orthologous proteins.

The predicted SmVPS-34 protein (Smp_128130.1 sequence deposited in the GeneDB database) of approximate size to the *C. elegans* VPS-34 (WBGene00006932) orthologous protein, with 919 and 901 amino acids, respectively, presented 30% identity, E-value 1×10^{-109} . SmVPS-34, present the domain PI3Ka (PF00613), with the coverage region of residue 295 to 533, and E-value 5.8×10^{-42} , and the PI3PI4kinase (PF00454) domains divided into two parts, the first with the coverage region of residue 663 to 727, and E-value 8.9×10^{-12} ; the second with the

coverage region of residue 731 to 861, E-value $4.4e^{-25}$. VPS-34 is a lipase kinase, a class III phosphatidylinositol 3-kinase (PI3 kinase) (Wang and Yang, 2016). The PI3PI4 kinase domain conserves important residues such as Lys771, which binds to the PI substrate, and Lys781 from *H. sapiens* (Su et al., 2017). It is believed that nutrient deprivation causes a reduction in the acetylation of cytoplasmic proteins, acetylated by p300 (Mariño et al., 2014); thus, acetylation in K771 reduces the affinity of VPS34 for the substrate, and therefore its activity (Su et al., 2017). These lysines are conserved in the activation loop of *S. mansoni* in which *H. sapiens* Lys771 is conserved in *S. mansoni* at position 802 and *H. sapiens* Lys781 is replaced by Arg812 of the same R group. To this, at the ATP binding site, Bilanges et al. (2017) reports the importance of the Asp761 residue after mutation, leading to the partial inactivation of VPS34 and subtle decrease of autophagy in mice livers. This residue is also conserved in *S. mansoni*, Asp792. Miller et al. (2010) points out that some residues of the C-terminal helical domain are important for the structural conformation of Vps34 of *H. sapiens*, playing a role in membrane catalysis and self-inhibition, which prevents the hydrolysis of ATP when it is not in the membrane. These residues, Phe612, Phe716, Asp774, Arg775, His776, Asn779, Asp792, Phe795 and Pro801, are preserved in *S. mansoni* in the respective positions Phe612, Phe716, Asp743, Arg744, His745, Asn777, Asp761, Tyr764, Pro770; and Phe614, Cys695, D758, Arg759, His760, Asn763, Asp776, Phe779 and Pro785 in *C. elegans*. This domain consists of an active site, an ATP binding site, a catalytic loop and an activation loop (A-loop). Of these, the ATP binding site showed greater waste exchange by different groups (Table S1). Figure 2C shows the weblog analysis and multiple sequence alignments of the PI3PI4kinase domain, highlighting the active site amino acids and flanking residues. Figure S3 shows the phylogenetic tree of VPS-34 proteins, showing the relationships between orthologous proteins.

The predicted SmATG-9 protein (Smp_149960.1 sequence deposited in the GeneDB database), superior size to the *C. elegans* ATG-9 (WBGene00020706) orthologue protein, with 1094 and 921 amino acids, respectively, presented 30% identity, E-value $1e^{-92}$. SmATG-9 present the domain Apg9 (PF04109), with the coverage region of residue 166 to 523, and E-value $1.1e^{-109}$. ATG-9 is the only integral membrane protein of the autophagic components. It has 6 highly conserved transmembrane segments with 2 terminals oriented to the cytosol, and is involved in interactions with other components of the pathway (Noda et al., 2000; Young et al., 2006). The phosphorylation of Atg9 is responsible for regulating the interaction with Atg23 and Atg27 in yeast (Feng et al., 2016); however, the only yeast-phosphorylated residues that were identified in *S. mansoni* were Asp509 and Cys512, and Asp577 and Cys580 in *C. elegans*. Figure 2D shows the weblog analysis and alignment of multiple sequences of the Apg9 domain,

highlighting the important amino acids and flanking residues. Figure S4 shows the phylogenetic tree of ATG-9 proteins, showing the relationships between orthologous proteins.

Analysis of glucose deprivation on viability and oviposition of couples of adult worms

Mizushima and Klionsky (2007) defined that cells under nutrient deprivation and starvation catabolise damaged cellular components in order to generate substrates for the production of adenosine triphosphate (ATP). Thus, by gradually depriving the glucose concentrations of adult worm pairs up to the glucose concentration of 0 mg, we observed a reduction in viability that was dependent on the reduction of glucose concentration and time, with a significant reduction in viability with 0 mg of glucose, showing statistical significance (** $P < 0.01$) in the viability scale in relation to the control, in the absence of glucose, from 48 hours (Figure 3A). When checking egg numbers, it was observed that there was no change in the number of eggs released at the glucose concentration of 1 mg when compared to the parasites incubated with 2 mg of glucose; however, at other concentrations, there was a significant reduction in the number of eggs released, with a statistically significant difference (***) $P < 0.001$) in the oviposition scale in relation to the control, at concentrations equal to or less than 0.5 mg glucose per mL, from 48 hours (Figure 3B). In addition, malformed eggs and the presence of spermatozoa and germ cells in the lowest concentrations of glucose (0.5 to 0 mg) were observed after 48 hours (Figura 3E, F, G); however, worm morphology was not observed.

Analysis of glucose deprivation on ultrastructural changes and the formation of autophagy vacuoles

In continuity, ultrastructural changes and the presence of autophagic vacuoles were evaluated for the same times and glucose concentrations. As observed in Figures 4 and 5, at concentrations equal to or less than 0.5 mg glucose, after 48 hours, the number of vacuoles observed by transmission electron microscopy began to intensify (Figures 4D, F and 5D, F).

It was observed that the integument integrity and normal cellular structures, such as the nucleus and mitochondria, were maintained in both female worms and males of the negative control (Figures 4A, C, E and 5A, C, E). The integrity of the integument and a small accumulation of lipid droplets were observed both for the negative controls and the deprived glucose worms, which have previously been described in parasites kept in culture (Haseeb et al., 1984) (Figures 4 and 5).

When evaluating females incubated for 48 hours, under total glucose deprivation, an increase in the number of vacuoles and vacuoles of different sizes in the cytoplasm of the vitelline cells was observed (Figures 4D, G, g). In males, these modifications were more subtle (Figure 5). Within 72 hours, the females presented increased numbers of vacuoles of different sizes in the cytoplasm of the cells (Figures 4F, H, h), and although the same modifications were observed in males, they were subtler. The figures 4I and 4J shows in greater detail the double membrane of vacuoles after 48 hours and 72 hours at 0 mg glucose per mL in adult female worms.

Finally, after 72 hours time, the presence of acid vacuoles was evaluated by fluorescence electron microscopy.

When evaluating females and males of the negative control, no alterations were observed in the integument and a small number of vacuoles were marked in bright red by acridine orange (Figures 6B, b and 7B, b). When evaluating males and females at a concentration of 0 mg mL⁻¹ of glucose, a significant increase in the presence of red spots in the worms was observed (Figures 6D, d and 7D, d). However, the number of acid vacuoles presented by male worms was lower in the positive control and at the concentration of 0 mg mL⁻¹ of glucose.

DISCUSSION

The evolutionary conservation of the *S. cerevisiae* autophagic genes allowed the identification of genes that encode the main components of the autophagic pathway in *C. elegans* (Meléndez et al. 2003; Melendez and Levine 2009; Palmisano and Meléndez, 2016). In the same way, we searched for these components in *S. mansoni*, based on homology of the genomic sequences between this parasite and *C. elegans*.

Thus, as a result of BLASTp, of the 28 proteins described in *C. elegans* (Palmisano and Meléndez, 2016) against the *S. mansoni* genome, we found 21 proteins predicted to participate in the *S. mansoni* autophagy pathway (Table 1). Of these, the EPG-3 and EPG-6 proteins, as described by Palmisano and Meléndez (2016), are genes that were recently identified in *C. elegans* (Tian et al. 2010; Lu et al. 2011) and do not have an orthologue in *S. cerevisiae*; this may indicate that autophagy involves membrane dynamics that are more complex in higher eukaryotes. This hypothesis can be reinforced by the fact that these proteins are predicted in *S. mansoni* (Table 1).

Protein domains are the functional and evolutionary units of proteins which may result in new protein sequences through their identification and annotation (Oshoa and Singh, 2017).

Domains are often predicted in protein sequences using, for example, the Markov model of the PFAM algorithm (Eddy, 2008), which models a domain family and is constructed from known sequence alignments (Finn et al., 2010).

Thus, it is of paramount importance to consider the chemical properties of the substituted amino acids, since amino acid differences within a family of proteins may be conservative; that is, an amino acid residue may be replaced by a residue with similar chemical properties, as well as exchanged for residues from different groups, which can contribute to the explanation of evolutionary distance (Nelson and Cox, 2014).

Accordingly, we highlight residues from some conserved domains of the predicted proteins SmUNC-51, SmLGG-1, SmVPS-34 and SmATG-9 from *S. mansoni* which were exchanged between their orthologues in *C. elegans*, without inferring whether each can influence domain function. These analyses demonstrated conserved residues of important functions for each protein. However, more detailed studies of the functions of each protein and each domain are important since the VPS-34 protein is involved in more than one pathway and talks to other autophagic proteins such as VPS-15 and p300, as well as other metabolic pathways. In addition, some of the functions are linked to non-conserved or intrinsically disordered protein regions, requiring more detailed studies.

Therefore, the identity between protein sequences, together with the presence of conserved domains fundamental to the function of these components in the autophagy pathway between the *S. mansoni* proteins and their orthologues, are the first step in identifying the pathway in this parasite (Nelson and Cox 2014).

Phylogenetic analysis of SmUNC-51, SmLGG-1, SmVPS-34 and SmATG-9 proteins

According to Nelson and Cox (2014), the evolutionarily conserved domains are represented by the parts of the sequence that show particularly good agreement. Thus, if two organisms are closely related, the sequences of their proteins must be similar, while residues that are less important for protein function can vary over time, by replacing one amino acid with another. Therefore, the greater the divergence between sequences, the greater the evolutionary distance between two organisms (Nelson and Cox 2014).

Our phylogenetic analyses are in accordance with the data of the phylome of *S. mansoni* available at http://www.phylomedb.org/phylome_22 (Silva et al., 2012), and, therefore, with the tree of life of the parasite. The evolutionary distance of amino acids between the four predicted proteins of *S. mansoni* and *C. elegans*, both from the Platyhelminthes phylum, as well

as the evolutionary distance of more complex eukaryotes such as those of the Chordata phylum is an example (Figures S1, S2, S3, S4).

Analysis of glucose deprivation on viability and oviposition of couples of adult worms

It is known that autophagy occurs at baseline rates for the maintenance of cellular homeostasis. However, physiological or pathological conditions such as starvation of nutrients such as amino acids, oxygen, ATP, and growth factors, can increase these rates (Mizushima and Klionsky, 2007).

Another nutrient involved in the regulation of autophagy is glucose, and its importance in the survival of schistosomes within the host is well known (Bueding, 1950). Cells deprived of glucose induce autophagy via AMPK (AMP-activated protein kinase) activation and increased ammonia production (Kim et al., 2011; Cheong et al., 2011; Codogno et al., 2012).

Schistosomes use host glial cells, consuming their dry weight in glucose every hour (Bueding, 1950). Glucose is also required when worms are paired to produce high numbers of eggs by females (Coles, 1984), in line with the fact that after 72 hours of total glucose deprivation, most of the worm pairs in the study have separated (data not shown). Thus, the predicted presence of insulin signalling in *S. mansoni*, plus the presence of a phosphatidylinositol-3 kinase homologue in the Sanger database, implies an important role for insulin in the growth and development of the parasite (You et al., 2011) and may justify the drastic decrease in ovulation as the glucose concentrations decreased as a function of time (Figure 3B). Accordingly, poor egg formation under glucose deprivation, as well as the presence of sperm and germ cells (Figures 3E, F, D), can be justified by the increase in PI3K pathways, which were activated by insulin receptors in *Xenopus* oocytes (Mood et al., 2004), a function that is correlated with insulin-like receptors in *S. mansoni*, SmVKRs (Venus kinase receptor), which are particularly expressed in the ovaries of female worms (You et al., 2011).

In addition, females showed greater sensitivity to glucose deprivation compared to males; this was also shown in other studies with substances such as EF-24 (Badoco, 2017), Curcumin (Magalhães et al., 2009), Piplartina (Moraes et al., 2010) and Epiisopiloturin (Veras, et al., 2012), all of which showed better activity in females.

Transmission electron microscopy reveals an increase in vacuoles after 48 hours at the concentration of 0.5 mg of glucose

Microscopy analyses showed an increase in the amount of double-membrane vacuoles at concentrations of 0.5 mg to 0 mg glucose per 1 ml RPMI 1640 medium; the increase was

more pronounced in females than in males (Figures 4 and 5). Notably, the females presented these vacuoles in the cells of the region of the vitellary, a proliferative tissue occupying two-thirds of the posterior of the female. It also produces cells that surround the ovum and provide precursor proteins that form the shell and nutrients that aid in the development of the embryo, and is therefore involved in the production of eggs (LoVerde, 2002). The highest presence of autophagic vacuoles occurred after 72 hours of total glucose deprivation, a condition which was sufficient to cause high cell stress, thereby justifying the increase in the number of vacuoles according to the work described by Becker et al. (1980) after treatment with PZQ, and Badoco (2017) after showing marked vacuolisation and vesicle formation in adult males and females.

In *C. elegans*, Takács-Vellai et al. (2005) reports the activity of the important autophagic BEC-1 protein as being required for viability and fertility. Melendez and Levine (2009) point out that animals lacking maternal and zygotic expression of BEC-1 die in an early stage during embryogenesis. However, it remains unclear whether the absence of other autophagic genes (and possibly the autophagy pathway) confers similar phenotypes (Melendez and Levine, 2009).

Fluorescence microscopy revealed that acid vacuoles increase after 72 hours at a glucose concentration of 0 mg

The maturation of autophagosomes is characterised by the acidity that is present in the stage after fusion with lysosomes, making this an important characteristic to detect the process in the later form (Traganos and Darzynkiewicz, 1994). Thus, in an attempt to verify whether the vacuoles observed had acidic characteristics, we used the acridine orange dye, which is a marker of acid vacuoles due to its ability to cross biological membranes. This characteristic is derived from the fact that this dye is a weak lipophilic base, which crosses the membrane and, when it comes in contact with acidic regions, loses its ability to cross membranes, therefore being retained (Traganos and Darzynkiewicz, 1994). This dye emits bright green and dark red fluorescence in the cytoplasm and nucleolus, and exhibits bright red fluorescence in the acid compartments, with the red fluorescence intensity being proportional to the degree of acidity in acid compartments (Paglin et al. 2001; Traganos and Darzynkiewicz 1994; Schoijet et al., 2016).

To confirm the increased presence of acid vacuoles, we used this methodology in a qualitative way for the presence of autophagolysosomes. We chose the 72 hours time and the 0 mg glucose concentration per ml medium. Our results showed that the worms of the negative control have a red fluorescence level due to red fluorescence in lysosomes and basal autophagy

(Figure 6B, b and 7B, b); however, as the glucose concentration decreases, and therefore the induction of autophagy increases, the amount of acid vesicles increases (Figure 6D, d and 7D, d). Flow cytometry studies with *Trypanosoma cruzi* (Schoijet et al., 2017), mouse fibroblasts (Thomé et al. 2016), mouse bone marrow cells (Beltran, 2012), prostate cancer cells (Shin et al., 2012), PC3 and also in plants such as *Colletotrichum acutatum* (Barbosa, 2007), demonstrated the increased fluorescence of red/orange dots in comparison to green dots after the induction of autophagy induced by any specific substance.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Laboratory of Mutagenesis, Parasitology and Molecular Biology of the University of Franca for technical assistance.

COMPETITIVE INTERESTS

The authors declare no financial or competing interests.

FUNDING

This study was supported by the National Council for Scientific and Technological Development, Brazil–CNPq (Fellowship: 303946/2018-0), Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

REFERENCES

- Al-Adhami, BH, Doenhoff, MJ, Thornhill, J, Akhkha, A, White, E and Kusel, JR.** (2001). A study of some characteristics of individual clones of *Schistosoma mansoni* with emphasis on the biological and metabolic activities. *Parasitology*. **123**, 563–572.
- Al-Adhami, BH, Thornhill, J, Akhkha, A, Doenhoff, MJ and Kusel, JR.** (2003). The properties of acidic compartments in developing schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*. **127**, 253–264.
- Al-Adhami, BH, Noble, C, Sharaf, O, Thornhill, J, Doenhoff, MJ and Kusel, JR.** (2005) The role of acidic organelles in the development of schistosomula of *Schistosoma mansoni* and their response to signalling molecules. *Parasitology*. **130**, 309–322.
- Badoco, FR.** (2017). Estudo do análogo de curcumina EF-24 e Praziquantel nos aspectos bioquímicos e morfológicos envolvidos com a morte celular do parasito *Schistosoma mansoni*. Tese de mestrado, Universidade de Franca, Franca-SP, Brasil.
- Barbosa, AC.** (2007). *Colletotrichum acutatum*: Melanização, penetração em membranas artificiais, autofagia e mobilização de lipídeos. Tese de mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, Brasil.
- Beltran, JSO.** (2012). Avaliação da participação dos processos apoptóticos, necróticos e autofágicos na hipoplasia medular de camundongos submetidos à desnutrição proteica. Tese de mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Bennett, JL, Day, T, Feng-Tao, L, Ismail, M, Farghaly, A.** (1997). The development of resistance to anthelmintics: a perspective with an emphasis on the antischistosomal drug praziquantel. *Exp Parasitol*. **87**, 260–267
- Berriman, M, Haas, BJ, LoVerde, PT, Wilson, RA, Dillon, GP, Cerqueira, GC, Mashiyama, ST, Al-Lazikani, B, Andrade, LF, Ashton, PD, et al.** (2009). The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature*. **460**, 352–358. doi: 10.1038/nature08160.
- Bilanges, B, Alliouachene, S, Pearce, W, Morelli, D, Szabadkai, G, Chung, YL, Chicanne, G, Valet, JM. Hill, PJ, Voshol, L. et al.** (2017). Vps34 PI 3-kinase inactivation enhances insulin sensitivity through reprogramming of mitochondrial metabolism. *Nat Commun*. **8**, 1804.
- Bogitsh, BJ.** (1975). Cytochemistry of gastrodermal autophagy following starvation in *Schistosoma mansoni*. *Journal of Parasitology*. **61**, p. 237–248.

- Brown, EJ, Albers, MW, Bum, Shin, T, Ichikawa, K, Keith, CT, Lane, WS and Schreiber, SL.** (1994). A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin–receptor complex. *Nature*. **369**, 756–758.
- Bueding, E.** (1950). Carbohydrate metabolism of *Schistosoma mansoni*. *J Gen Physiol*. **33**, 475–95.
- Caffrey, CR.** (2015). Schistosomiasis and its treatment. *Future Med. Chem.* **7**, 675–76.
- Carneiro-Santos, P, Thornhill, JA, Doenhoff, MJ, Hagan, P and Kusel, JR.** (2001). Acidic vesicles of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Research*. **87**, 1001–1006.
- Cheong, H, Lindsten, T, Wu, J, Lu, C, Thompson, CB.** (2011). Ammonia-induced autophagy is independent of ULK1/ULK2 kinases. *Proc Natl Acad Sci EUA A*. **108**, 11121-11126.
- Codogno, P, Mehrpour, M, Proikas-Cezanne, T.** (2012). Canonical and non-canonical autophagy: variations on a common theme of self-eating? *Nat Rev Mol Cell Biol*. **13**, 7-12.
- Coles, GC** (1984). Recent advances in schistosome biochemistry. *Parasitology*. **89**, 603–37.
- Crooks, GE, Hon, G, Chandonia, J and Brenner, SE.** (2004). WebLogo: A Sequence Logo Generator. *Genome Res*. **14**, 1188–1190.
- Fares, H and Greenwald, I.** (2001). Genetic analysis of endocytosis in *Caenorhabditis elegans*: coelomocyte uptake defective mutants. *Genetics*. **159**, 133-45.
- Feng, Y, He, D, Yao, Z, Klionsky, DJ.** (2014). The machinery of macroautophagy. *Cell Res*. **24**, 24-41.
- Filippi-Chiela, EC, Thomé, MP, Bueno e Silva, MM, Pelegrini, AL, Ledur, PF, Garicochea, B, Zamin, LL and Lenz, G.** (2013). Resveratrol abrogates the temozolomide-induced G2 arrest leading to mitotic catastrophe and reinforces the temozolomide-induced senescence in glioma cells. *BMC Cancer*. **13**, 1-13.
- Filippi-Chiela, EC, Villodre, ES, Zamin, LL and Lenz, G.** (2011). Autophagy interplay with apoptosis and cell cycle regulation in the growth inhibiting effect of resveratrol in glioma cells. *PLoS ONE*. **6**, 1-13.
- Finn, RD, Coghill, P, Eberhardt, RY, Eddy, SR, Mistry, J, Mitchell, AL, Potter, SC, Punta, M, Qureshi, M, Sangrador-Vegas, A, Salazar, GA, Tate, J and Bateman, A.** (2016). The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Research*. **44**, 279–285. doi: 10.1093/nar/gkt1223.

- Ganley, IG, Lam du, H, Wang, J, Ding X, Chen S, Jiang X.** (2009). ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem.* **284**, 12297-12305.
- Ganley, IG.** (2013). Autophagosome maturation and lysosomal fusion. *Ensaio Biochem.* **55**, 65-78.
- Galluzzi, L, Baehrecke, EH, Ballabio, A, Boya, P, Bravo-San, Pedro, JM, Cecconi, F, Choi, AM, Chu, CT, Codogno, P, et al.** (2017). Molecular definitions of autophagy and related processes. *The EMBO Journal.* **36**, 1811-1836.
- Glaser, J., Schurigt, U, Suzuki, BM, Caffrey, CR, Holzgrabe, U.** (2015). Anti-Schistosomal Activity of Cinnamic Acid Esters: Eugenyl and Thymyl Cinnamate Induce Cytoplasmic Vacuoles and Death in Schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Molecules.* **20**, 10873-10883.
- Glick, D, Barth, S and Macleod, KF.** (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol.* **221**, 3-12.
- Hackett, F.** (1993). The cultures of *Schistosoma mansoni* and production of life cycle stages. *Methods Mol Biol.* **21**, 89-99.
- Hansen, M, Taubert, S, Crawford, D, Libina, N, Lee, SJ and Kenyon, C.** (2007). Lifespan extension by conditions that inhibit translation in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell.* **6**, 95–110.
- Haseeb, MA, Eveland, LK and Fried, B.** (1984). Histochemical lipid studies on *Schistosoma mansoni* adults maintained *in situ* and *in vitro*. *International Journal for Parasitology.* **14**, 83-88.
- Hedgecock, EM, Culotti, JG, Thomson, JN and Perkins, LA.** (1985). Axonal guidance mutants of *Caenorhabditis elegans* identified by filling sensory neurons with fluorescein dyes. *Developmental Biol.* **111**, 158–170.
- Hunt-Newbury, R, Viveiros, R, Johnsen, R, Mah, A, Anastas, D, Fang, L, Halfnight, E, Lee, D, Lin, J, Lorch, A, McKay, S, et al.** (2007). High-throughput in vivo analysis of gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol.* **5**, 1981-1997.
- Ichimura, Y, Kirisako, T, Takao, T, Satomi, Y, Shimonishi, Y, Ishihara, N, Mizushima, N, Tanida, I, Kominami, E, Ohsumi, M et al.** (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature.* **408**, 488-492.

- Jia, K, Chen, D and Riddle, DL.** (2004). The TOR pathway interacts with the insulin signaling pathway to regulate *C. elegans* larval development, metabolism and life span. *Development*. **131**, 3897–3906.
- Jia, K, Hart, AC and Levine, B.** (2007). Autophagy genes protect against disease caused by polyglutamine expansion proteins in *Caenorhabditis elegans*. *Autophagy*. **3**, 21-25.
- Johnson, M, Zaretskaya, I, Raytselis, Y, Merezhuik, Y, McGinnis, S and Madden, TL** (2008). NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Research*. **36**, 5–9. doi: 10.1093/nar/gkn201.
- Kamath, RS, Fraser, AG, Dong, Y, Poulin, GB, Durbin, R, Gotta, M, Kanapin, A, Le Bot, N, Moreno, S, Sohrmann, M, Welchman, DP, Zipperlen, P and Ahringer, J.** (2003). Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature*. **421**, 231-7.
- Kanzawa, T, Germano, IM, Komata, T, Ito, H, Kondo, Y and Kondo, S.** (2004). Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death Differ*. **11**, 448-457.
- Kihara, A, Noda, T, Ishihara, N and Ohsumi, Y.** (2001). Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*. **152**, 519–530.
- Kim, J, Dalton, VM, Eggerton, KP, Scott, SV and Klionsky, DJ.** (1999). Apg7p/Cvt2p is required for the cytoplasm-to-vacuole targeting, macroautophagy, and peroxisome degradation pathways. *Mol. Biol. Cell*, **10**, 1337-1351.
- Kim, J, Kundu, M, Viollet, B and Guan, KL.** (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*. **13**, 132-41.
- Khan, LA, Yamanaka and T, Nukina, N.** (2008). Genetic impairment of autophagy intensifies expanded polyglutamine toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun*. **368**, 729-35.
- Klionsky, DJ, Abdelmohsen, K, Abe, A, Abedin, MJ, Abeliovich, H, Acevedo Arozena, A, Adachi, H, Adams, CM, Adams, PD, Adeli K, et al.** (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*, **4**, 1554-8627.

- Kovács, AL, Vellai, T and Müller, F.** (2003). Autophagy in *Caenorhabditis elegans*. Autophagy (Klionsky D). **1**, 19–225.
- Kuroyanagi, H, Yan, J, Seki, N, Yamanouchi, Y, Suzuki, Y, Takano, T, Muramatsu, M, and Shirasawa, T.** (1998). Human ULK1, a novel serine/threonine kinase related to UNC-51 kinase of *Caenorhabditis elegans*: cDNA cloning, expression, and chromosomal assignment. Genomics. **51**, 76–85.
- Larkin, MA, Blackshields, G, Brown, NP, Chenna, R, McGettigan, PA, McWilliam, H, Valentin, F, Wallace, IM, Wilm, A, Lopez, R, et al.** (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics. **23**, 2947–2948.
- Larsen, CN and Wang, H.** (2002). The Ubiquitin Superfamily: Members, Features, and Phylogenies. Journal of Proteome Research. **1**, 411-419.
- Lee, EF, Young, ND, Lim, NT, Gasser, RB and Fairlie, WD.** (2014). Apoptosis in schistosomes: toward novel targets for the treatment of schistosomiasis. Trends in Parasitology. **30**, 75-84.
- Lee, RYN, Howe, KL, Harris, TW, Arnaboldi, V, Cain, S, Chan, J, Chen, WJ, Davis, P, Gao, S, Grove, C et al.** (2018). WormBase 2017: molting into a new stage. Nucleic Acids Res. **46**, 869-874. doi: 10.1093/nar/gkx998.
- LoVerde, PT.** (2002). Presidential address. Sex and schistosomes: an interesting biological interplay with control implications. J Parasitol. **88**, 3–13.
- Lu, Q, Yang, P, Huang, X, Hu, W, Guo, B, Wu, F, Lin, L, Kovacs, AL, Yu, L and Zhang, H.** (2011). The WD40 repeat PtdIns(3)P-binding protein EPG-6 regulates progression of omegasomes to autophagosomes. Dev Cell. **21**, 343-57.
- Lu, K, den Brave, F and Jentsch, S.** (2017). Receptor oligomerization guides pathway choice between proteasomal and autophagic degradation. Nat Cell Biol. **19**, 732-739.
- Magalhães, LG, Machado, CB, Moraes, ER, Bueno de Carvalho, EM, Soares, CS, Silva, SH, Da Silva Filho, AA and Rodrigues, V.** (2009). *In vitro* schistosomicidal activity of curcumin against *Schistosoma mansoni* adult worms. Parasitology Research. **104**, 1197-1201.
- Mariño, G, Pietrocola, F, Eisenberg, T, Kong, Y, Malik, AS, Andryushkova, A, Schroeder, S, Pendl, T, Harger, A, Niso-Santano, M et al.** (2014). Regulation of Autophagy by Cytosolic Acetyl-Coenzyme A. Molecular Cell. **53**, 710–725.

- Matsuura, A, Miki, T, Wada, Y and Ohsumi, Y.** (1997). Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*. **192**, 245–250.
- McAlpine, F, Williamson, LE, Tooze, SA and Chan, EY.** (2013). Regulation of nutrient-sensitive autophagy by uncoordinated 51-like kinases 1 and 2. *Autophagy*. **9**, 361-73.
- McKay, SJ , Johnsen, RC , Khattra, JS , Asano, J. , Baillie, DL , Chan, S. , Dube, NA , Fang, LL , Goszczynski, B, Ha, E et al.** (2003). Gene expression profiling of cells, tissues, and developmental stages of the nematode *C. elegans*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. **68**, 159-69.
- Meléndez, A, Tallóczy, Z, Seaman, M, Eskelinen, EL and Hall, DH.** (2003). Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. *Science*. **301**, 1387-1391.
- Meléndez, A and Levine, B.** (2009). Autophagy in *C. elegans*. *WormBook*. **24**, 1–26.
- Melman, SD, Steinauer, ML, Cunningham, C, Kubatko, LS, Mwangi, IN, Wynn, NB, Mutuku, MW, Karanja, DM, Colley, DG, Black, CL, et al.** (2009). Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl. Trop. Dis*. **3**, 504–504.
- Miller, S, Tavshanjian, B, Oleksy, A, Perisic, O, Houseman, BT, Shokat, KM and Williams, RL.** (2010). Shaping development of autophagy inhibitors with the structure of the lipid kinase Vps34. *Science*. **327**, 1638-42.
- Mizushima, N, Kuma, A, Kobayashi, Y, Yamamoto, A, Matsubae, M, Takao, T, Natsume, T, Ohsumi, Y and Yoshimori, T.** (2003). Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J Cell Sci*. **116**, 1679-88.
- Mizushima, N and Klionsky, DJ.** (2007). Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Annu. Rev. Nutr*. **27**, 19-40.
- Mood K, Bong, YS, Lee, HS, Ishimura, A and Daar, IO.** (2004). Contribution of JNK, Mek, Mos and PI-3K signaling to GVBD in *Xenopus* oocytes. *Cell Signal*. **16**, 631-42.
- Moraes, J, Nascimeto, C, Lopes, PO, Nakano, E et al.** (2010). *Schistosoma mansoni*: *In vitro* schistosomicidal activity of pipartine. *Experimental Parasitology*. **127**, 357-64.

- Mourão, MM, Grunau, C, LoVerde, PT, Jones, MK and Oliveira G.** (2012). Recent advances in *Schistosoma* genomics. *Parasite Immunology*. **34**, 151–162.
- Nakatogawa, H, Suzuki, K, Kamada and Y, Ohsumi, Y.** (2009). Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **10**, 458-67.
- Nelson, DL and COX, MM.** (2014). Princípios de bioquímica de Lehninger. Em Aminoácidos, Peptídeos e Proteínas (ed. 6), pp. 75-114. Porto Alegre: Artmed.
- Noda, T and Ohsumi, Y.** (1998). Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem*. **273**, 3963–3966.
- Noda, T, Kim, J, Huang, WP, Baba, M, Tokunaga, C, Ohsumi, Y and Klionsky, DJ.** (2000). Apg9p/Cvt7p is an integral membrane protein required for transport vesicle formation in the Cvt and autophagy pathways. *J Cell Biol*. **148**, 465–480.
- Ochoa, A and Singh, M.** (2017). Domain prediction with probabilistic directional context. *Bioinformatics*. **33**, 2471-2478.
- Paglin, S, Hollister, T, Delohery, T, Hackett, N, McMahon, M, Sphicas E, Domingo D and Yahalom, J.** (2011). A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res*. **61**, 439-44.
- Palmisano, NJ and Meléndez, A.** (2016). Detection of Autophagy in *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harb Protoc*. **2**, 107-117.
- Panaretou, C, Domin, J, Cockcroft, S and Waterfield, MD.** (1997). Characterization of p150, an adaptor protein for the human phosphatidylinositol (PtdIns) 3-kinase. *J Biol Chem*. **272**, 2477–2485.
- Proikas-Cezanne, T, Takacs, Z, Dönnies, P and Kohlbacher, O.** (2015). WIPI proteins: essential PtdIns3P effectors at the nascent autophagosome. *J Cell Sci*. **128**, 207-17.
- Protasio, AV, Tsai, IJ, Babbage, A, Nichol, S, Hunt, M, Aslett, MA, De Silva, N, Velarde, GS, Anderson, TJ, Clark, RC, et al.** (2012). A systematically improved high quality genome and transcriptome of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *PLoS neglected tropical diseases*. **6**, 1-13. doi: 10.1371/journal.pntd.0001455.
- Ravanan, P, Srikumar, IF and Talwar, P.** (2017). Autophagy: the spotlight for cellular stress responses. *Life Sci*. **188**, 53-67.

- Reece-Hoyes, JS, Shingles, J, Dupuy, D, Grove, CA, Walhout, AM, Vidal, M and Hope, I.** (2007). Insight into transcription factor gene duplication from *Caenorhabditis elegans* Promoterome-driven expression patterns. *BMC Genomics*. **8**, 27.
- Reggiori, F, and Klionsky, DJ.** (2006). Atg9 sorting from mitochondria is impaired in early secretion and VFT-complex mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci*. **119**, 2903–2911.
- Roggo, L, Bernard, V, Kovacs, AL, Rose, AM, Savoy, F, Zetka, M, Wymann, MP and Müller, F.** (2002). Membrane transport in *Caenorhabditis elegans*: an essential role for VPS34 at the nuclear membrane. *EMBO J*. **21**, 1673-83.
- Ruck, A, Attonito, J, Garces, KT, Núñez, L, Palmisano, NJ, Rubel, Z, Bai, Z, Nguyen, KC, Sun, L, Grant, BD, Hall, DH and Meléndez, A.** (2011). The Atg6/Vps30/Bec1 ortholog BEC-1 mediates endocytic retrograde transport in addition to autophagy in *C. elegans*. *Autophagy*. **7**, 386-400
- Russell, RC, Tian, Y, Yuan, H, Park, HW, Chang, YY, Kim, J. et al.** (2013). ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nature cell biology*. **15**, 741-750.
- Saitou, N and Nei, M.** (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. **4**, 406-25.
- Samara, C, Syntichaki, P and Tavernarakis, NN.** (2008). Autophagy is required for necrotic cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Death Differ*. **15**, 105-12.
- Schaheen, L, Dang, HT and Fares, HJ.** (2006). Basis of lethality in *C. elegans* lacking CUP-5, the Mucopolidosis Type IV orthologue. *Dev Biol*. **293**, 382-91.
- Schoijet, AC, Sternlieb, T and Alonso, GD.** (2017). The Phosphatidylinositol 3-kinase Class III Complex Containing TcVps15 and TcVps34 Participates in Autophagy in *Trypanosoma cruzi*. *J Eukaryot Microbiol*. **64**, 308-321.
- Sean, R and Eddy, A.** (2008). Probabilistic Model of Local Sequence Alignment That Simplifies Statistical Significance Estimation. *PLoS Computational Biology*. **4**, 1-14.
- Silva, LL, Marcet-Houben, M, Nahum, LA, Zerlotini, A, Gabaldón, T and Oliveira, G.** (2012). The *Schistosoma mansoni* phylome: using evolutionary genomics to gain insight into a parasite's biology. *BMC Genomics*. **13**, 1-13.

- Simmer, F, Moorman, C, Van der Linden, AM, Kuijk, E, Van den Berghe, PV, Kamath, FS, Fraser, AG, Ahringer, J and Plasterk, RH.** (2003). Genome-wide RNAi of *C. elegans* using the hypersensitive rrf-3 strain reveals novel gene functions. *PLoS Biol.* **1**, 77-84.
- Shin, SW, Kim, SY and Park, J.** (2012). Autophagy inhibition enhances ursolic acid-induced apoptosis in PC3 cells. *Molecular Cell Research.* **1823**, 451-457.
- Shintani, T, Mizushima, N, Ogawa, Y, Matsuura, A, Noda and T, Ohsumi, Y.** (1999). Apg10p, a novel protein-conjugating enzyme essential for autophagy in yeast. *EMBO J.* **18**, 5234–5241.
- Smithers, SR and Terry, RJ.** (1965). Infection of Laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni*: and the recovery of adult worms. *Parasitology.* **55**, 695-700.
- Steinmann, P, Keiser J, Bos, R, Tanner, M and Utzinger, J.** (2006). Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *The Lancet Infectious Diseases.* **6**, 411-425.
- Su, H, Yang, F, Wang, Q, Shen, Q, Huang, J, Peng, C, Zhang, Y, Wan, W, Wong, CCL, Sun, Q, Wang, F, Zhou, T and Liu, W.** (2017). VPS34 Acetylation Controls Its Lipid Kinase Activity and the Initiation of Canonical and Non-canonical Autophagy. *Mol. Cell.* **67**, 907–921.
- Takács-Vellai, K, Vellai, T, Puoti, A, Passannante, M, Wicky, C, Streit, A, Kovács, AL and Müller, F.** (2005). Inactivation of the autophagy gene bec-1 triggers apoptotic cell death in *C. elegans*. *Curr. Biol.* **15**, 1513-1517.
- Tamura, K, Dudley, J, Nei, M and Kumar, S.** (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**, 1596–1599.
- Tanida, I, Mizushima, N, Kiyooka, M, Ohsumi, M, Ueno, T, Ohsumi, Y and Kominami, E.** (1999). Apg7p/Cvt2p: A novel protein-activating enzyme essential for autophagy. *Mol Biol Cell.* **10**, 1367-79.
- Tian, Y, Li, Z, Hu, W, Ren, H, Tian, E, Zhao, Y, Lu, Q, Huang, X, Yang,, P, Li X, Wang, X, Kovács, AL, Yu, L and Zhang, H.** (2010). *C. elegans* screen identifies autophagy genes specific to multicellular organisms. *Cell.* **141**, 1042-1055.
- Traganos, F and Darzynkiewicz, Z.** (1994). Lysosomal proton pump activity: supravital cell staining with acridine orange differentiates leukocyte subpopulations. *Methods Cell Biol.* **41**, 185-94.

- Utzinger, J, Raso, G, Brooker, S, De Savigny, D, Tanner, M, Ornbjerg, N, Singer, BH and N'goran, EK.** (2009). Schistosomiasis and neglected tropical diseases: towards integrated and sustainable control and a word of caution. *Parasitology*. **136**, 1859-1874.
- Vellai, T, Takacs-Vellai, K, Zhang, Y, Kovacs, AL, Orosz, L and Muller, F.** (2003). Genetics: Influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*. *Nature*. **426**, 620-621.
- Veras, LM, Guimarães, MA, Campelo, YD, Vieira, MM et al.** (2012). Activity of Epiisopiloturine Against *Schistosoma mansoni*. *Current Medicinal Chemistry*. **19**, 1- 8.
- Verjovski-Almeida, S, DeMarco, R, Martins, EA, Guimarães, PE, Ojopi, EP, Paquola, AC, Piazza, JP, Nishiyama, MY Jr, Kitajima, JP, Adamson, RE, et al.** (2003). Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. *Nat Genet*. **35**, 148–157.
- Wu, F, Li, Y, Wang, F, Noda, NN and Zhang, H.** (2012). Differential function of the two Atg4 homologues in the aggrephagy pathway in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem*. **287**, 29457-67.
- Wu, F, Watanabe, Y, Guo, XY, Qi, X, Wang, P, Zhao, HY, Wang, Z, Fujioka, Y, Zhang, H, Ren and JQ, et al.** (2015). Structural Basis of the Differential Function of the Two *C. elegans* Atg8 Homologs, LGG-1 and LGG-2, in Autophagy. *Mol Cell*. **60**, 914-29.
- Xie, Z, and Klionsky, DJ.** (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol*. **9**, 1102-1109.
- Yamada, T, Carson, AR, Caniggia, I, Umebayashi, K, Yoshimori, T, Nakabayashi, K and Scherer, SW.** (2005). Endothelial nitric-oxide synthase antisense (NOS3AS) gene encodes an autophagy-related protein (APG9-like2) highly expressed in trophoblast. *J Biol Chem*. **280**, 18283–18290.
- You, H, Gobert, GN, Jones, MK, Zhang, W, McManus, DP.** (2011). Signalling pathways and the host-parasite relationship: putative targets for control interventions against schistosomiasis: signalling pathways and future anti-schistosome therapies. *Bioessays*. **33**, 203-14.
- Young, AR, Chan, EY, Hu, XW, Köchl, R, Crawshaw, SG, High, S, Hailey, DW, Lippincott-Schwartz, J and Tooze, SA.** (2006). Starvation and ULK1- dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *J Cell Sci*. **119**, 3888–3900.

Zhang, Y, Yan, L, Zhou, Z, Yang, P, Tian, E, Zhang, K, Zhao, Y, Li, Z, Song, B, Han, J, et al. (2009). SEPA-1 mediates the specific recognition and degradation of P granule components by autophagy in *C. elegans*. *Cell*. **136**, 308–321.

Figures

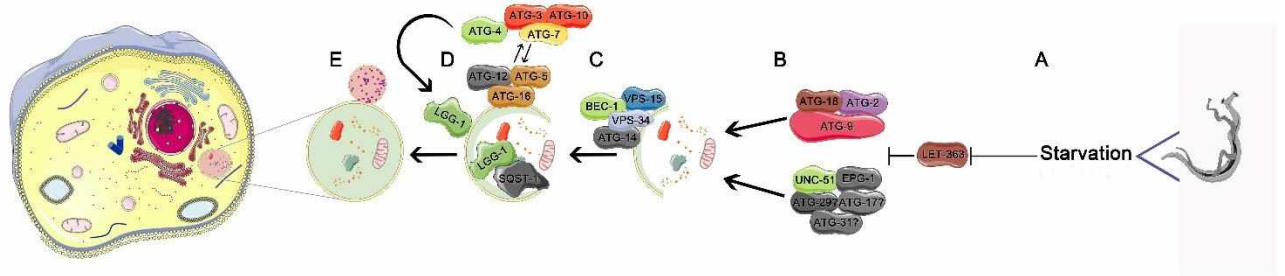


Fig. 1. Schematic drawing of the autophagy pathway in *S. mansoni*. A) Activation of the autophagy pathway delineated by studies in yeasts, mammals and the nearest orthologue *C. elegans*. We presume that after nutrient restriction, there is inactivation of LET-363 and the onset of autophagy with the activation of UNC-51. B) The formation of autophagosomes requires the integral protein ATG-9. C) Nucleation requires the PI3K class III complex, which recruits autophagy proteins to the isolation membrane. D) Two conjugation complexes (LGG-1 and ATG-12) are required for elongation and closure of the isolation membranes forming the autophagosome. Lipidated LGG-1 binds to the internal and external membranes of the autophagosome and also to specific adapter proteins, which bind to poly-ubiquitinated protein aggregates. E) Fusion of the autophagosome to the lysosome forming the autophagolysosome double membrane structure into which the substrate to be degraded is inserted. This figure was drawn using the software Photoshop and the vector image bank of Servier Medical Art (<http://smart.servier.com/>). Servier Medical Art by Servier is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>). Adapted from Palmisano and Meléndez, 2016.

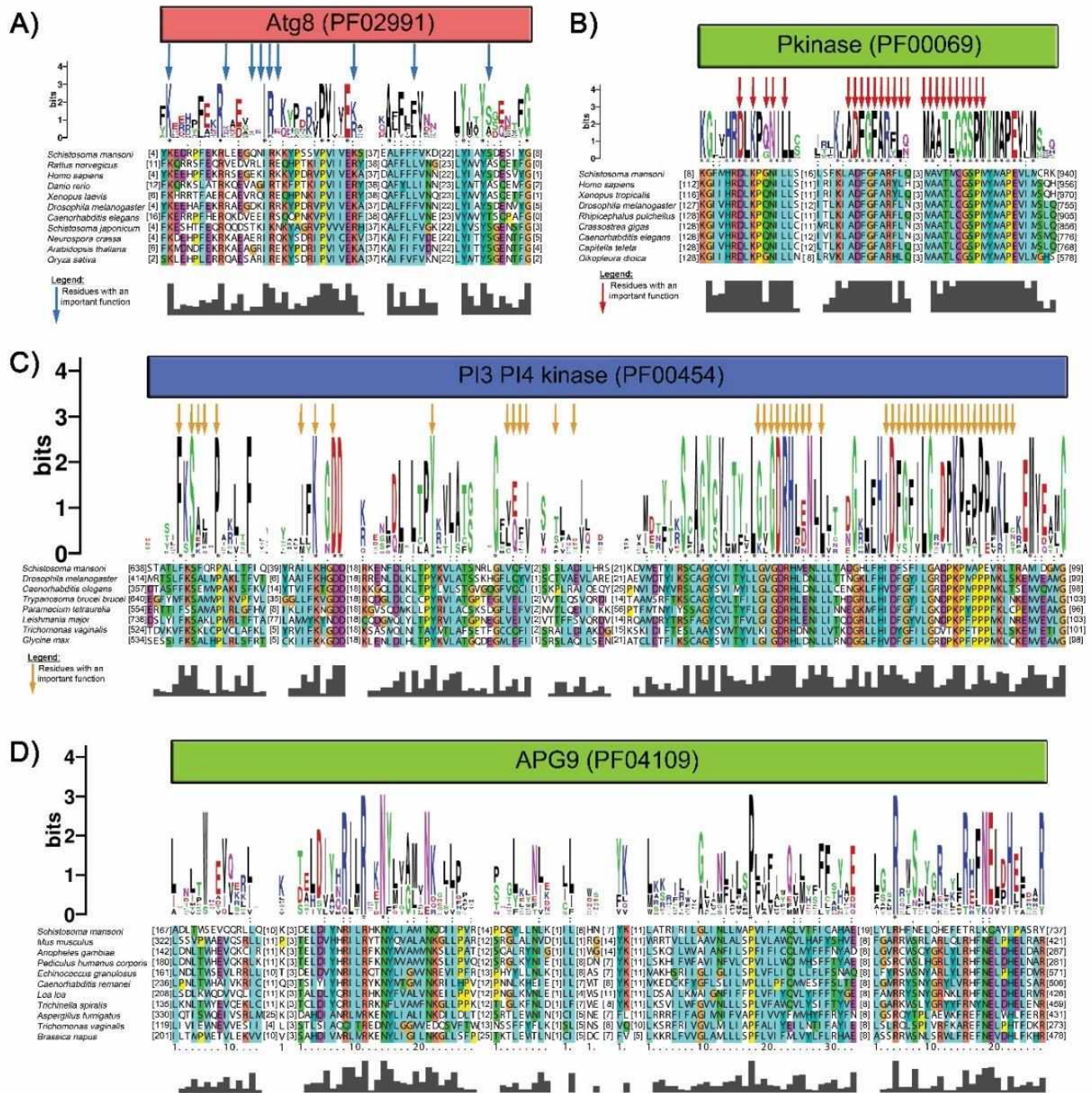


Fig. 2. Weblogo analysis and multiple sequence alignment of the *S. mansoni* proteins SmLGG-1 (Smp_073790.1), SmUNC-51 (Smp_157350.1), SmVPS-34 (Smp_128130.1) and SmATG-9 (Smp_149960.1). A) Amino acid analysis of the active site and flanking residues in the conserved domain ATG8 (PF02991). The blue arrows show the amino acid residues of probable tubulin binding sites (Lys-Leu-Gln-Asn-Arg-Lys); and binding to the enzyme ATG-7 (Ser-Phe-Ser). B) Amino acid analysis of the active site and flanking residues in the conserved domain Pkinase (PF00069). The red arrows show the amino acid residues of probable active site (Asp – Lys – Gly – Asn – Leu – Asp – Phe – Gly – Ser – Pro – Met), adenosine triphosphate binding site (ATP) (Asp – Lys – Gly – Asn – Leu – Asp), polypeptide substrate binding site (Ala - Asp – Gly – Phe - Gly – Ser - Pro - Met) and activation

loop (A- Loop) (Ala - Asp - Phe - Gly - Phe – Ala – Arg - Phe - Leu - Gln - Met, - Ala - Val - Thr - Met - Cys - Gly – Ser - Pro - Met). D) Amino acid analysis of the active site and flanking residues in the conserved domain PI3PI4kinase (PF00454). The orange arrows show the amino acid residues of probable adenosine triphosphate binding site (ATP) (Phe - Ser - Phe – Gln – Pro – Ile – Lys – Asp – Tyr - Val- Gln - Phe – Val - Ser – Asp – Asn – Leu – Ile – Asp), catalytic loop (Gly – Val - Gly – Asp – Arg – His – Met – Glu –Asn) and activation loop (A- Loop) (Asp - Phe - Ser - Phe – Ile – Leu - Gly - Ala - Asp- Pro - Lys - Pro – Met – Ala - Pro – Glu - Val – Arg – Leu - Thr). E) Amino acid analysis of the active site in the conserved domain APG9 (PF04109). The height of each amino acid symbol in the Weblog indicates the conservation of amino acid residues in a given position. The asterisk denotes conserved amino acids in specific position.

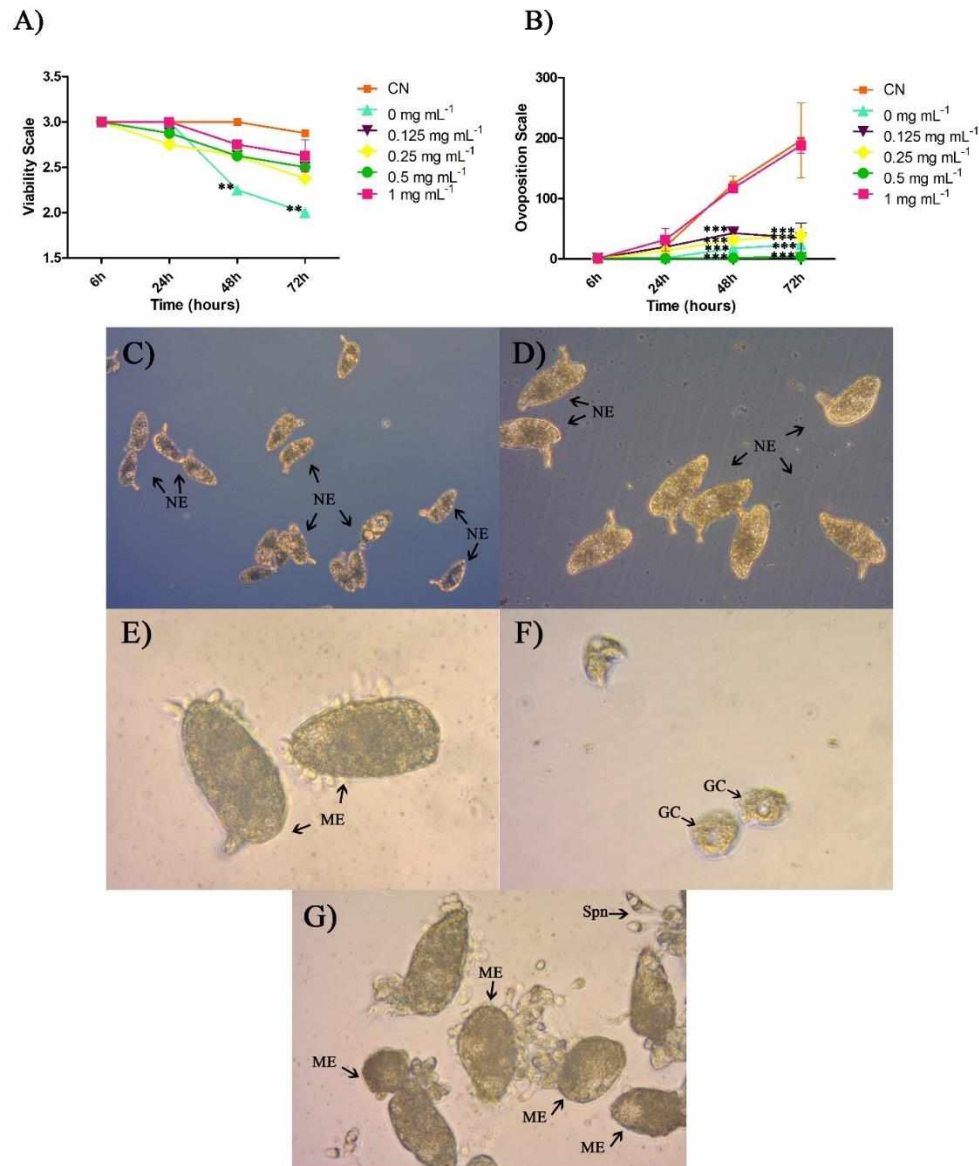


Fig. 3. In vitro effect of glucose concentration on viability and oviposition. Adult worms were incubated for up to 72 h in RPMI 1640 medium without glucose, supplemented with glucose at concentrations of 2 mg at 0 mg mL⁻¹, and the viability and number of eggs were monitored using an inverted microscope. Results from three independent experiments, being evaluated four couples of worms per concentration in each experiment. A) The groups had a statistically significant difference (** P<0.01) in the viability scale in relation to the control, in the absence of glucose, after 48 h. B) The groups had a statistical difference (*** P<0.001) on the oviposition range in relation to the control, at concentrations equal to or less than 0.5 mg glucose per mL, from 48 h. C), D), E), F) and G) Inverted microscopy of *S. mansoni* eggs. C) and D) Normal, viable *S. mansoni* eggs, NE, at concentrations 2 mg (NC), 10x increase, and 1 mg glucose per mL, 20x increase, after 72h. F) Presence of germ cells, GC, of *S. mansoni* at the concentration of 0.25 mg of glucose per mL after 72h, increase of 40x. E) Malformed *S. mansoni* eggs (ME) at concentration 0.5 mg after 48h, 40x increase. G) Malformed *S. mansoni* eggs, ME, and Sperm, Spm, at concentration 0 mg glucose per mL after 48h, 20x increase.

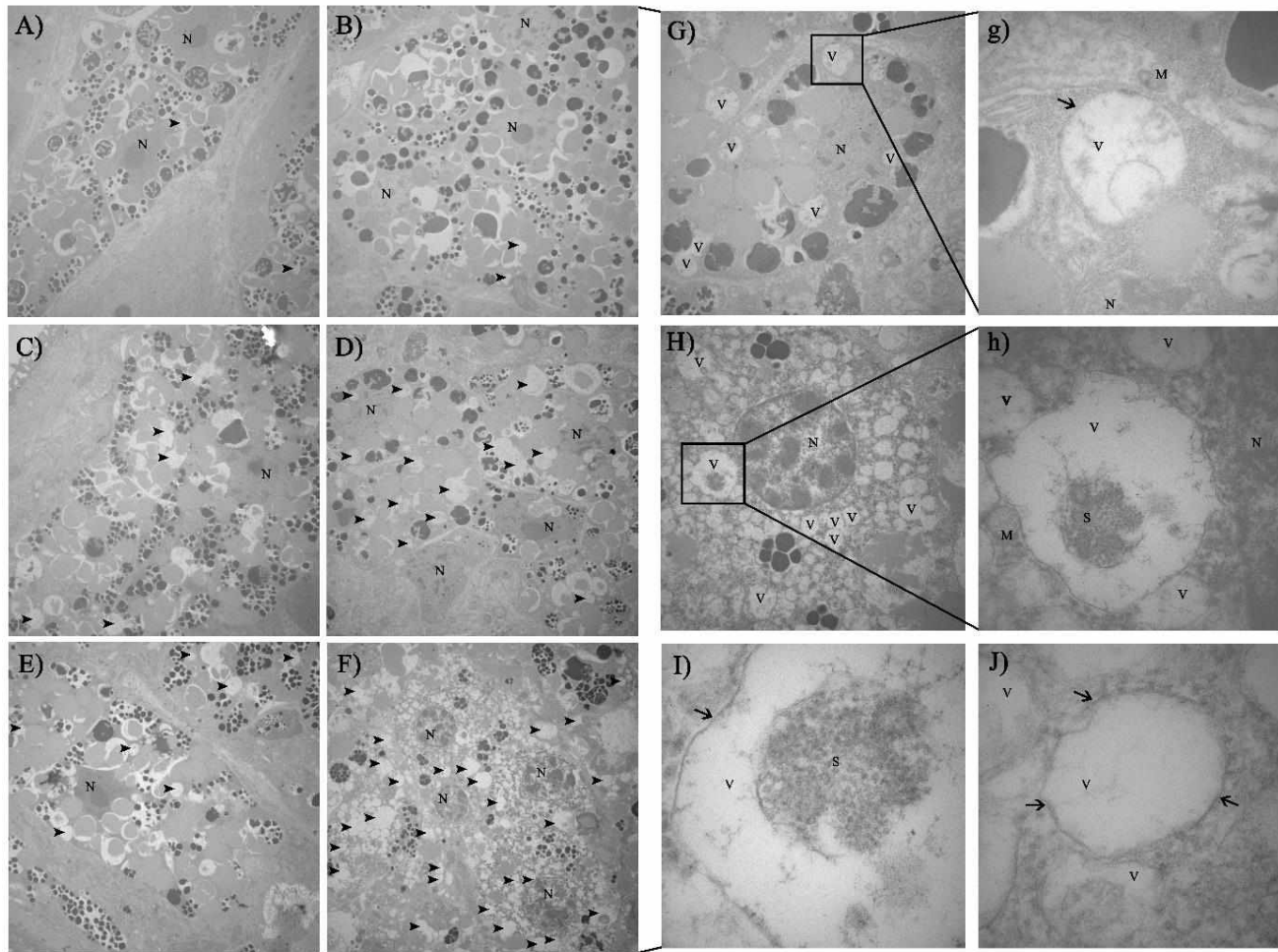


Fig. 4. Electron microscopy of subtegument cell transmission in adult *S. mansoni* females. A), B) and C) negative control (NC) after 24, 48 and 72 hours, respectively. D), E) F) 0 mg glucose per mL after 24, 48 and 72 hours, respectively. Increase in the number of vacuoles in females deprived of glucose after 48h, in comparison to females of the negative control group. Increase of 5x. The magnifications of areas marked in G) and H) are shown in g) and h) (increase of 40x), respectively. G) 0 mg glucose per mL after 48 hours, 10kx increase. H) 0 mg glucose per mL after 72 hours, 14kx increase. I) 0 mg glucose per mL after 48 hours, 140x increase. J) 0 mg glucose per mL after 72 hours, increase of 200x. The black arrows, double membrane; V, vacuole; N, nucleus; M, mitochondria, S, substrate.

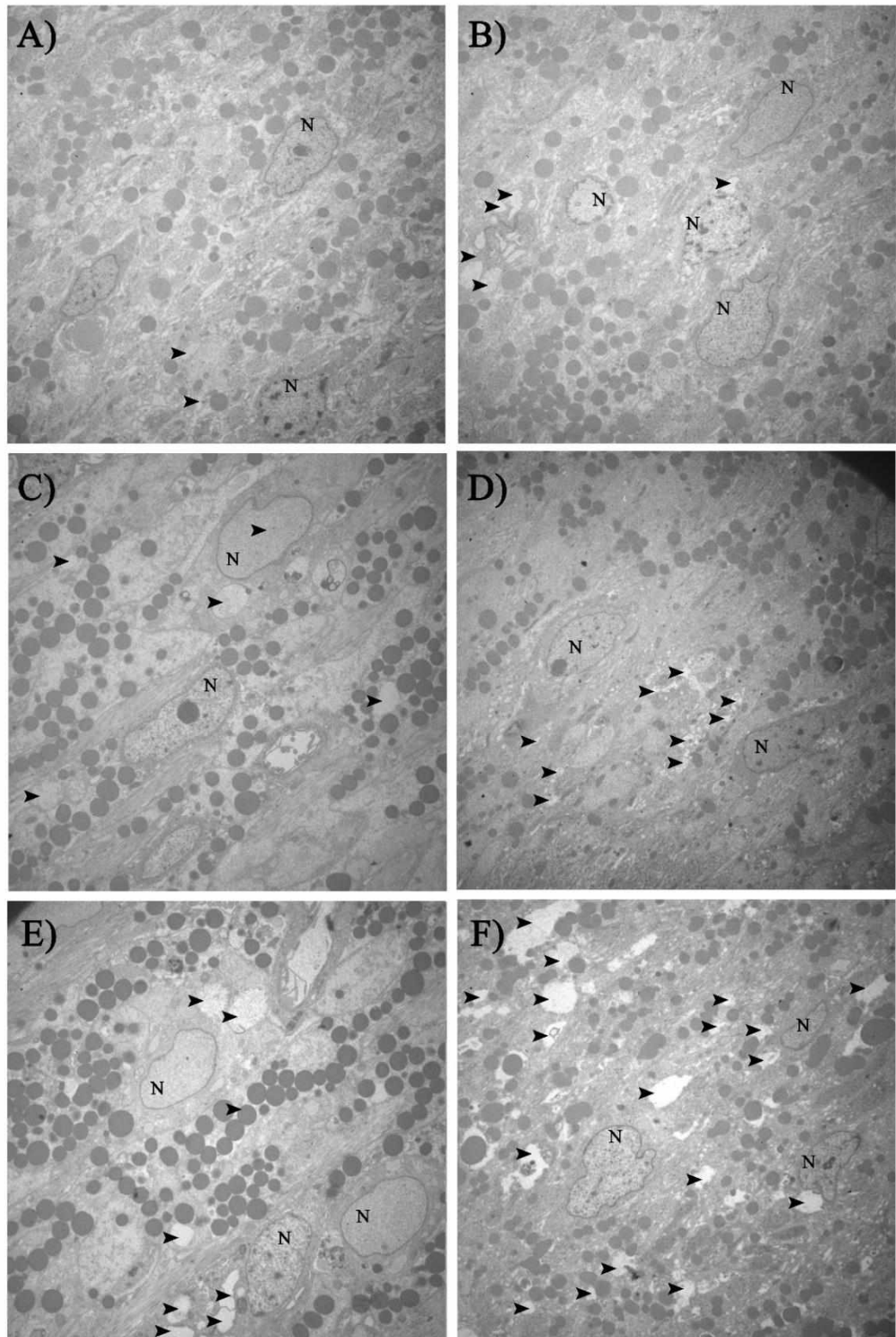


Fig. 5. Electron microscopy of subtegument cell transmission in adult males of *S. mansoni*. A), B) and C) negative control (NC) after 24, 48 and 72 hours, respectively. D), E), F) 0 mg glucose per mL after 24, 48 and 72 hours, respectively. Increased amounts of vacuoles in deprived males of glucose after 48h, compared to males of the negative control group. Increase of 5x. Black arrows, possible vacuoles; N, nucleus.

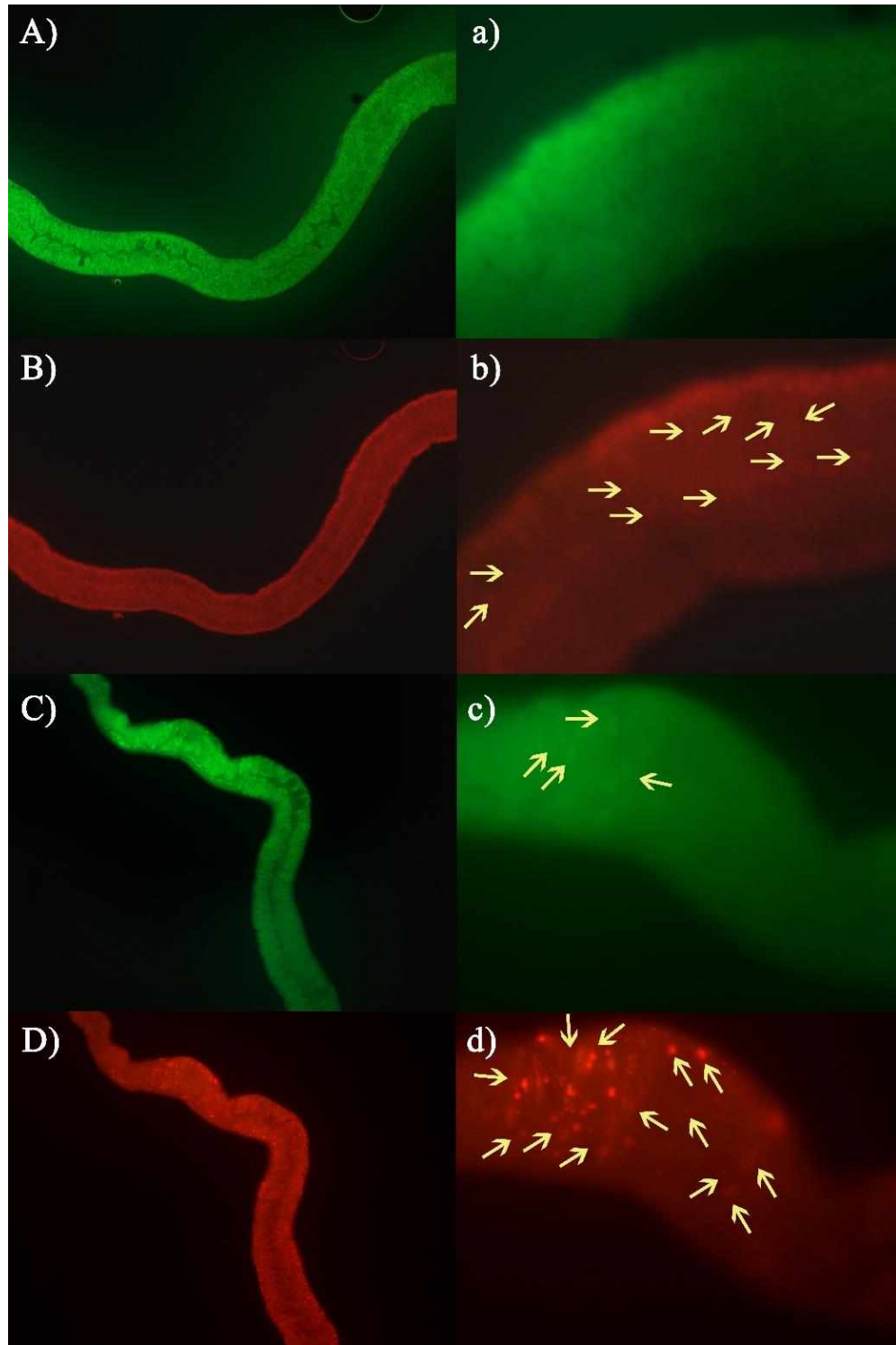


Fig. 6. Electron micrographs of fluorescence of *S. mansoni* adult females stained with acridine orange. The magnifications of areas marked A), B), C) and D) show an increase of 10x, while a), b), c) and d) show an increase of 40x, respectively. A) Negative control (CN) after 72 hours, green dots demonstrate cytoplasm, nucleus and nucleolus. B) Negative control (CN) after 72 hours, spare points to figure A) in bright red, show acid vacuoles. C) 0 mg glucose per mL after 72 hours, green dots demonstrate cytoplasm, nucleus and nucleolus. D) 0 mg glucose per mL after 72 hours, spares to figure C) in bright red, show acid vacuoles.

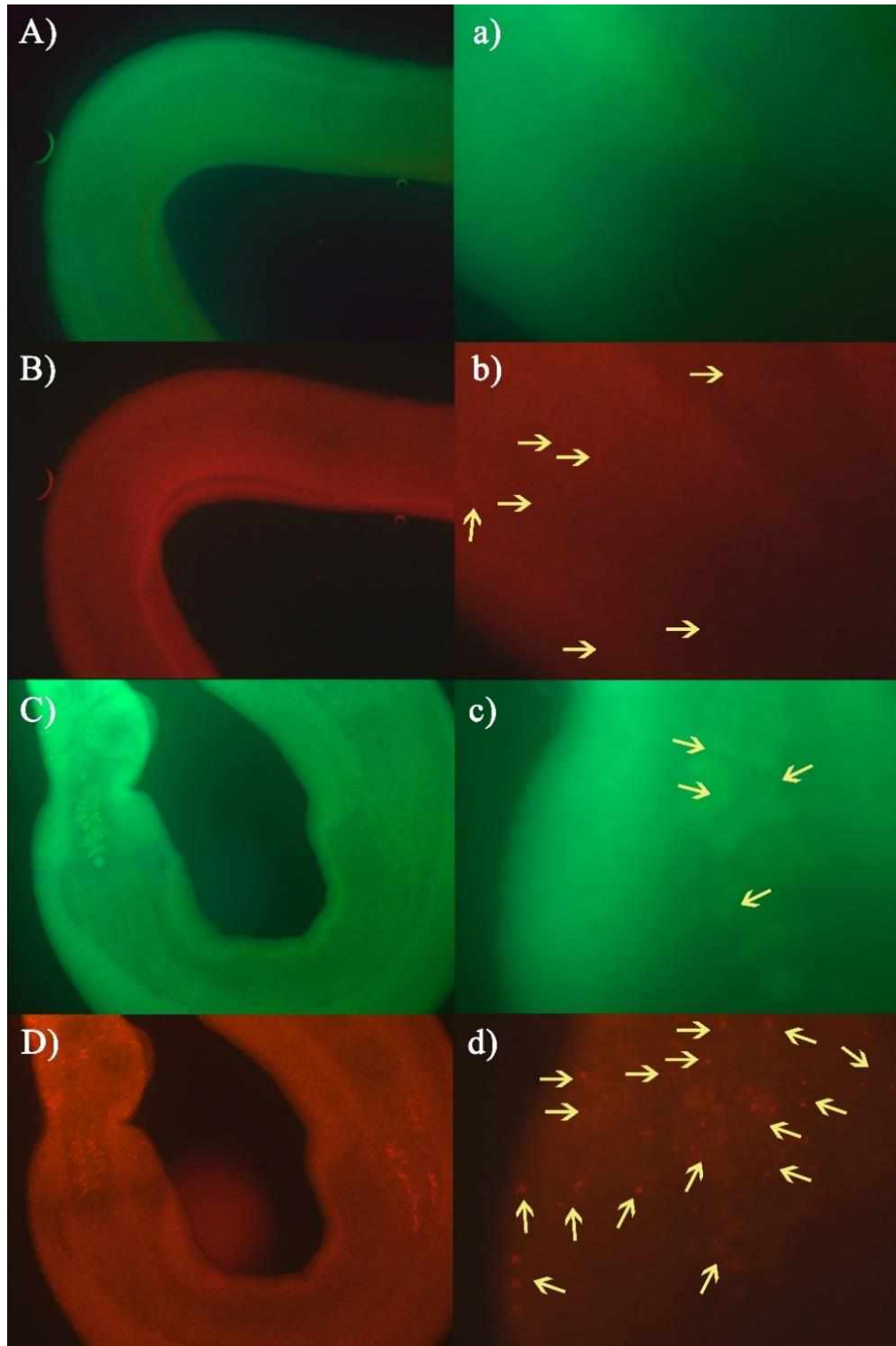


Fig. 7. Electronic fluorescence microscopy of *S. mansoni* adult males stained with acridine orange. The magnifications of areas marked A, B), C) and D) show an increase of 10x, while a), b), c) and d) show an increase of 40x, respectively. A) Negative control (CN) after 72 hours, the arrows demonstrate cytoplasm, nucleus and nucleolus. B) Negative control (CN) after 72 hours, spare points to figure A) in bright red, show acid vacuoles. C) 0 mg glucose per mL after 72 hours, green dots demonstrate cytoplasm, nucleus and nucleolus. D) 0 mg glucose per mL after 72 hours, the arrows indicate spare points to figure C) in bright red, indicate the presence of acid vacuoles.

Tables

Table 1 - Predicted proteins involved in the autophagy pathway in the *S. mansoni* parasite. Proteins identified in the database of *C. elegans* with supposed function in the autophagic pathway and local alignments of the BLASTp in *S. mansoni*.

Autophagy Protein	Putatives orthologous in <i>S. mansoni</i>	Predicted function in the autophagy pathway	Orthologous in <i>C. elegans</i> (WormBase)	Preserved Domains in <i>S. mansoni</i>	Putative protein size in <i>S. mansoni</i> (aa)	Identity (BLASTp) (%)	E-value (BLASTp)	Function reference in <i>C. elegans</i>
<i>Induction</i> LET-363 isof. a	Smp_122910.4	Orthologue of human MTOR; is predicted to have protein kinase activity; involved in TOR signalling, the main inhibitor of autophagy.	WBGene00002583	DUF3385, FAT, FRB dom FKBP12, PI3 PI4 kinase	3376	49	4e ⁻¹⁶²	Brown et al. 1994; Noda and Ohsumi 1998; Vellai et al. 2003; Jia et al. 2004; Hansen et al. 2007; 2008; Palmisano and Melendez 2016
LET-363 isof. b	Smp_122910.1	Orthologue of human MTOR; is predicted to have protein kinase activity; involved in TOR signalling, the main inhibitor of autophagy.	WBGene00002583	DUF3385, FAT, FRB dom FKBP12, PI3 PI4 kinase, FATC	3439	49	5e ⁻¹⁶²	Brown et al. 1994; Noda and Ohsumi 1998; Vellai et al. 2003; Jia et al. 2004; Hansen et al. 2007; 2008; Palmisano and Melendez 2016
UNC-51	Smp_157350.1	Orthologue on <i>S. cerevisiae</i> Atg1p autophagy protein and vertebrate ULK proteins, exhibits protein kinase activity. It forms a protein complex involved in the formation of the insulation membrane.	WBGene00006786	Pkinase	1021	59	2e ⁻⁵²	Hedgecock et al. 1985; Ogura et al. 1994; Matsuura et al. 1997; Kuroyanagi et al. 1998; Meléndez et al. 2003; Zhang et al. 2009; Palmisano and Melendez 2016
<i>Nucleation</i> BEC-1	Smp_048990.1	Spiral orthologous protein to the autophagy proteins of yeasts and mammals Atg6/Vps30/Becn1. By homology, it may be part of the PI3K complex which plays a role in the localization of autophagy proteins to pre-autophagosomal structure.	WBGene00000247	APG6	598	32	5e ⁻²⁵	Ruck et al. 2011; Jia, Hart and Levine, 2007; Melendez et al., 2003; Palmisano and Melendez 2016
VPS-34	Smp_128130.1	Orthologue of the phosphoinositide 3-kinase VPS34 in <i>S. cerevisiae</i> , required for vesicular traffic, including endocytosis, apoptosis and autophagy.	WBGene00006932	PI3Ka, PI3 PI4 kinase	919	30	1e ⁻¹⁰⁹	Roggo et al., 2002 ; Ruck et al., 2011; Fares and Greenwald, 2001; Palmisano and Melendez 2016

VPS-15	Smp_123610.1	Orthologue of human PIK3R4 (phosphoinositide-3-kinase 4 regulatory subunit); predicted to have ATP binding activity and protein kinase activity.	WBGene00020706	WD40	1783	36	2e ⁻²⁹	Panaretou et al. 1997; Kihara et al. 2001; Kovács et al. 2003, Palmisano and Melendez 2016
ATG-2	Smp_148650.1	Large protein, orthologous to <i>S. cerevisiae</i> Atg2p, and human ATG2A and ATG2B; interacts with Atg9 in vesicle recycling.	WBGene00019748	ATG C	3111	25	2e ⁻²⁰	Hunt-Newbury et al., 2007 ; McKay et al., 2003 ; Khan, Yamanaka, Nukina, 2008; Palmisano and Melendez 2016
ATG-18	Smp_150510.1	Protein containing WD40 orthologous repeat to the autophagic protein of <i>S. cerevisiae</i> Atg18p and human WIP11; binding activity to phosphatidylinositol phosphate; is involved in apoptosis and autophagy. Involved in the closure of the autophagous membrane.	WBGene00018294	Not identified by Pfam	597	44	3e ⁻⁷³	Simmer et al., 2003 ; Hunt-Newbury et al., 2007; Schaheen, Dang and Fares, 2006; McKay et al., 2003; Khan, Yamanaka and Nukina; 2008; Melendez et al., 2003; Palmisano and Melendez 2016
<i>Elongation/ closure</i> LGG-1	Smp_073790.1	Orthologue of <i>S. cerevisiae</i> Atg8p and mammalian MAP-LC3; by homology, LGG-1 is predicted to be necessary for the degradation of cellular components by autophagy. Essential for the degradation of protein aggregates.	WBGene00002980	ATG8	125	68	7e ⁻⁵⁷	Melendez et al., 2003; Wu et al. 2015; Palmisano and Melendez 2016
LGG-2	Smp_087940.1	Orthologue of the <i>S. cerevisiae</i> Atg8p protein and homologous to the light chain subunit 3 (LC3) of the microtubule-associated proteins 1A and 1B (MAP1A and MAP1B); LGG-2 is expected to associate with MAP1A and MAP1B and to microtubules and may play a role in the regulation of MAP1A and MAP1B microtubule binding activity and in the positive regulation of autophagosome maturation. It has specific functions of loading and stage of development in aggregate degradation.	WBGene00002980	ATG8	120	40	3e ⁻²⁷	Khan, Yamanaka and Nukina, 2008; Kamath et al., 2003; Melendez et al., 2003; Wu et al. 2015; Palmisano and Melendez 2016
ATG-4.1 isof. a	Smp_039820.4	Encodes an orthogenic cysteine protease predicted for the autogenic <i>S. cerevisiae</i> protein Atg4p and the human ATG4A and ATG4B; exhibits protease activity relative to LGG-1.	WBGene00013595	Peptidase family C54	404	47	1e ⁻⁴⁶	Wu, Li, Wang, Noda, Zhang, 2012; Reece-Hoyes et al., 2007; Hunt-Newbury et al., 2007 ; McKay et al., 2003; Khan,

ATG-4.1 isof. b	Smp_039820.3	Encodes an orthogenic cysteine protease predicted for the autogenic <i>S. cerevisiae</i> protein Atg4p and the human ATG4A and ATG4B; exhibits protease activity relative to LGG-1.	WBGene00013595	Peptidase family C54	398	47	$2e^{-46}$	Yamanaka and Nukina, 2008, Palmisano and Melendez 2016 Wu, Li, Wang, Noda, Zhang, 2012; Reece-Hoyes et al., 2007; Hunt-Newbury et al., 2007; McKay et al., 2003; Khan, Yamanaka and Nukina, 2008; Palmisano and Melendez 2016
ATG-4.2	Smp_213790.1	It encodes an orthogenic cysteine protease predicted for the <i>S. cerevisiae</i> Apg4p protein, and for human ATG4C. ATG-4.2 is analogous to ATG-4.1 and to human ATG4A and ATG4B.	WBGene00014080	Peptidase family C54	542	26	$7e^{-27}$	Khan, Yamanaka and Nukina, 2008 ; Melendez et al., 2003; Palmisano and Melendez 2016
ATG-3	Smp_077400.1	Orthologue of the <i>S. cerevisiae</i> Atg3p and human ATG3 protein; involved in macroautophagy; probably in the expansion of the gallbladder.	WBGene00021922	Autophagy N, Autophagy act C, Autophagy C	328	45	$2e^{-85}$	Hunt-Newbury et al., 2007; McKay et al., 2003; Khan, Yamanaka and Nukina, 2008; Palmisano and Melendez 2016
ATG-7	Smp_316730.1	Enzyme similar to the activation enzyme of ubiquitin E1, orthologous to <i>S. cerevisiae</i> protein Apg7p; predicted to have activating enzyme activity of the ubiquitin modifier; acting in conjunction with Atg-10 promoting the conjugation of Atg5 with Atg12 (Atg16L1); Together with Atg3 which together with the Atg16L1 complex conjugates phosphatidylethanolamine with LCB3.	WBGene00010882	ATG7 N, ThiF	708	38	$6e^{-147}$	Jia, Hart, Levine, 2007; Khan, Yamanaka, Nukina, 2008 ; Melendez et al., 2003; Palmisano and Melendez 2016
ATG-10	Smp_044260.1	Orthologue of human ATG10; predicted to be associated with phagophore formation.	WBGene00008427	Autophagy_act_C	186	29	$7e^{-12}$	Shintani et al. 1999; Mizushima et al. 2002; Meléndez et al. 2003; Tian et al. 2010; Palmisano and Melendez 2016;
ATG-5	Smp_345560.1	Orthologue of the <i>S. cerevisiae</i> Atg5p and human ATG5 protein; to form a complex on the external surface of the phagophore.	WBGene00022152	APG5	321	26	$2e^{-20}$	Samara, Syntichaki, Tavernarakis, 2008; Khan, Yamanaka, Nukina, 2008; Palmisano and Melendez 2016

ATG-16.1	Smp_347350.1	Orthologue of the <i>S. cerevisiae</i> Atg16p protein and ATG16L1 and human ATG16L2. Parameters to ATG-16.2. Predicts to form a complex on the outer surface of the phagophore.	WBGene00017178	WD40	339	33	3e ⁻⁵⁵	Mizushima et al., 2003; Hunt-Newbury et al., 2007; McKay et al., 2003; Palmisano and Melendez 2016
<i>All membrane steps</i> ATG-9	Smp_149960.1	Orthologue of human ATG9A (9A related to autophagy) and ATG9B (9B related to autophagy); integral membrane protein. Involved in all processes of autophagic flow	WBGene00014151	APG9	1094	30	1e ⁻⁹²	Noda et al. 2000; Yamada et al. 2005; Reggiori and Klionoky 2006; Palmisano and Melendez 2016
EPG-3	Smp_019980.1	Orthologue to human VMP1; involved in the macroautophagy and in the negative regulation of autophagosome assembly.	WBGene00012559	Not identified by Pfam	401	47	5e ⁻¹¹³	Tian et al. 2010; Palmisano and Melendez 2016
EPG-6	Smp_344630.1	Protein containing the WD40 repeat related to the mammalian WIPI3/4 protein family (WD40 repeat protein interacting with phosphoinositides); activity necessary for the formation of autophagosomes of omegassomes (subdomains of endoplasmic reticulum enriched with PtdIns (3) and for the adequate distribution of the autophagic proteins ATG-9 and EPG-1). EPG-6 binds to ATG-2 in vitro and in vivo and also bind, in vitro, to PI3P.	WBGene00012641	Not identified by Pfam	404	23	6e ⁻¹⁸	Lu et al., 2011; Palmisano and Melendez 2016

Descriptions of genes linked to autophagy in *C. elegans* are available at <https://www.wormbase.org/#012-34-5>.

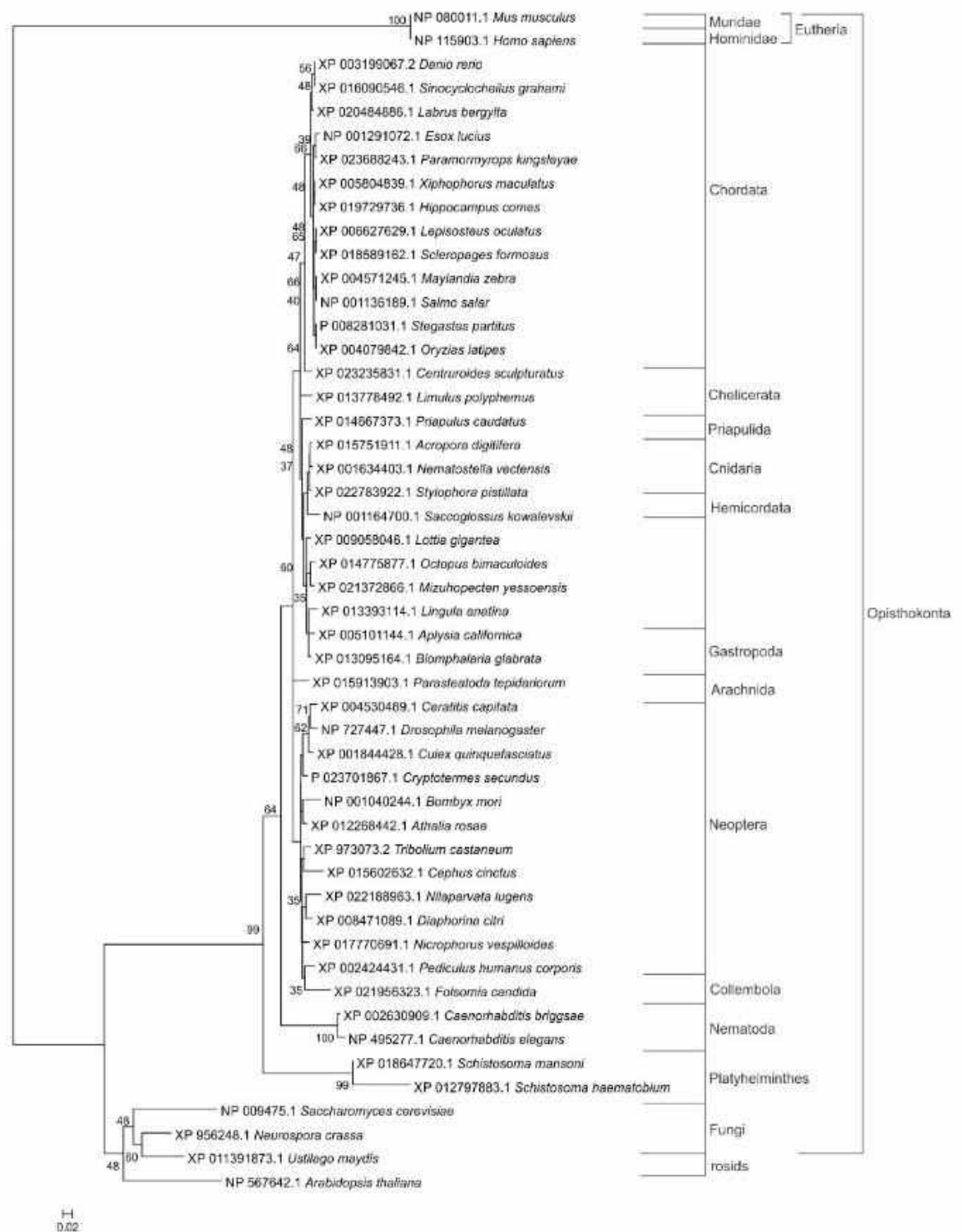


Fig. S1. Phylogenetic tree of *S. mansoni* LGG-1 protein and its orthologues. Evolutionary history was inferred using the neighbour-joining method. The percentages of replicate trees in which the associated taxa are grouped in the bootstrap test (2000 replicates) are shown next to the branches. The tree is drawn in scale, with branching lengths in the same units as the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The analysis involved 50 nucleotide sequences.

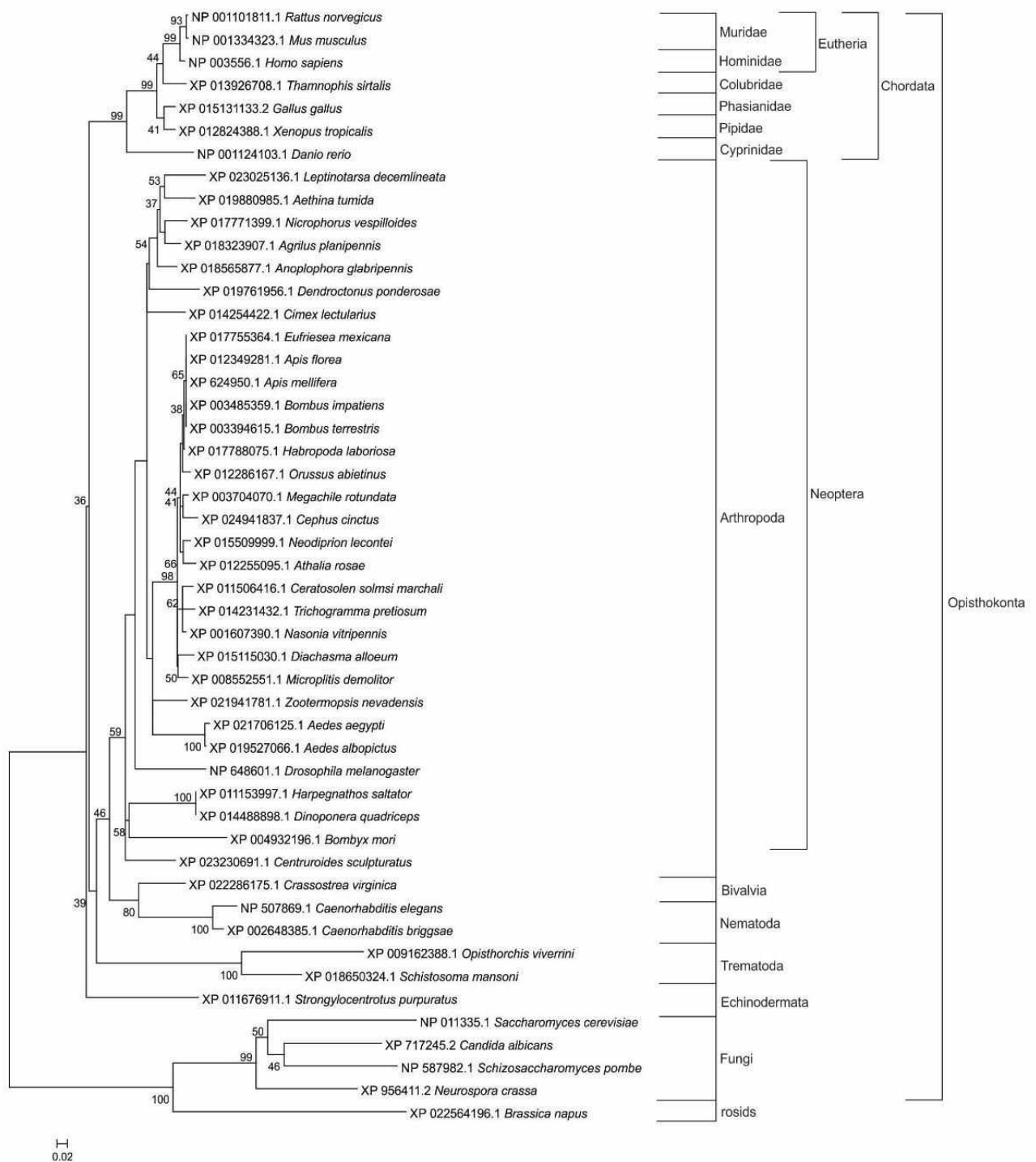


Fig. S2. Phylogenetic tree of *S. mansoni* UNC-51 protein and its orthologues. Evolutionary history was inferred using the neighbour-joining method. The percentages of replicate trees in which the associated taxa are grouped in the bootstrap test (2000 replicates) are shown next to the branches. The tree is drawn in scale, with branching lengths in the same units as the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The analysis involved 49 nucleotide sequences.

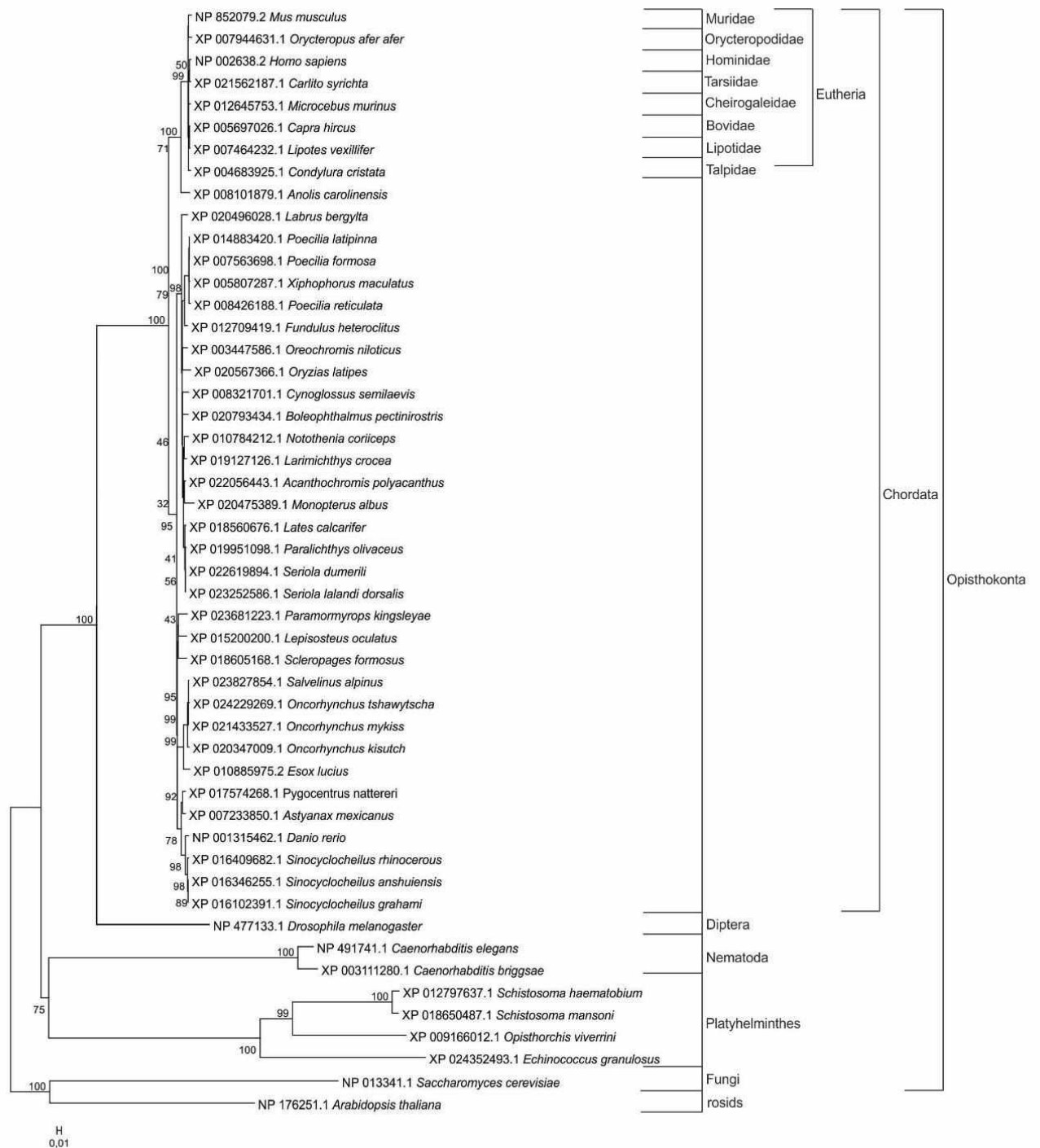


Fig. S3. Phylogenetic tree of *S. mansoni* VPS-34 protein and its orthologues. Evolutionary history was inferred using the neighbour-joining method. The percentages of replicate trees in which the associated taxa are grouped in the bootstrap test (2000 replicates) are shown next to the branches. The tree is drawn in scale, with branching lengths in the same units as the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The analysis involved 50 nucleotide sequences.

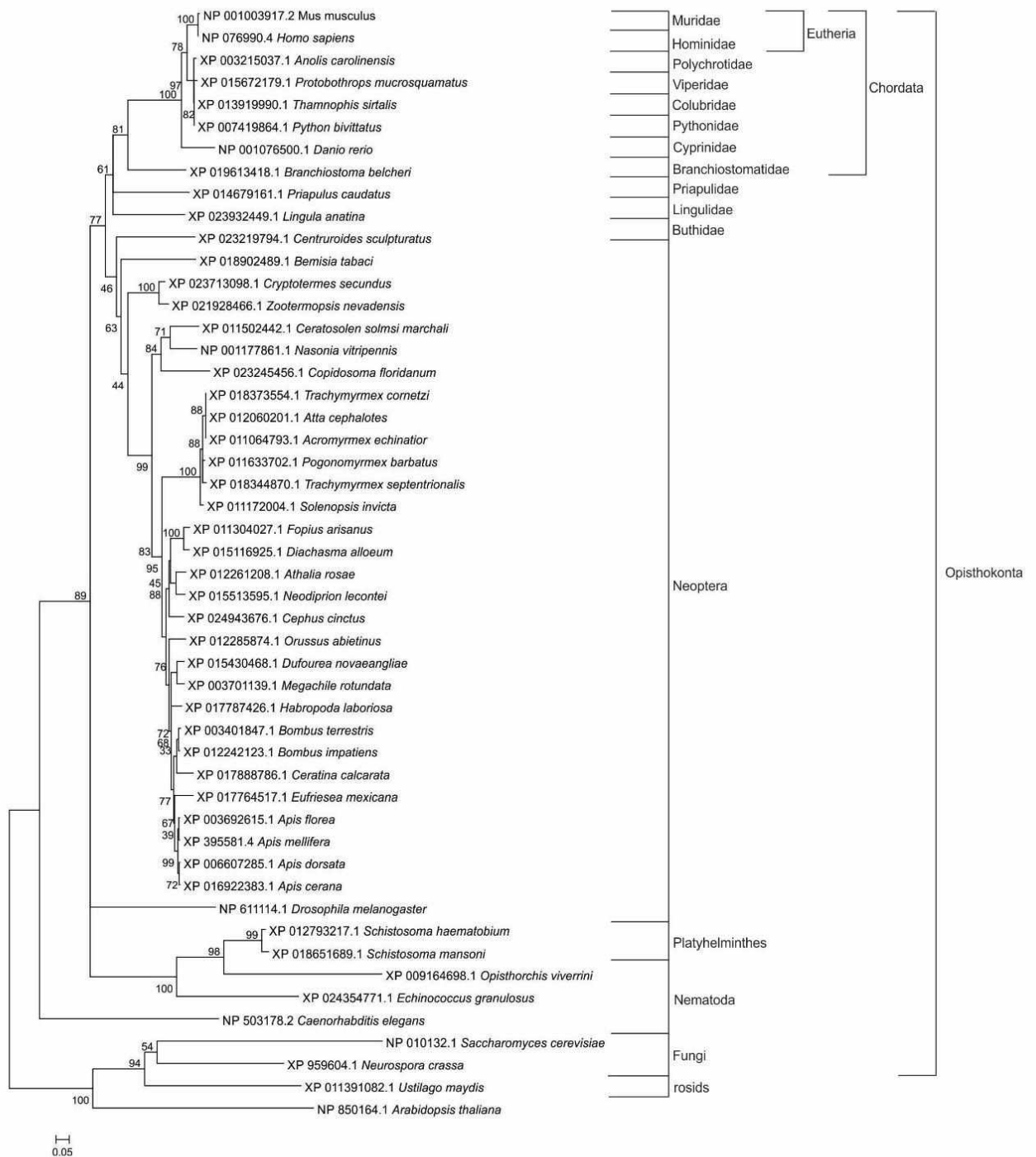


Fig. S4. Phylogenetic tree of *S. mansoni* ATG-9 protein and its orthologues. Evolutionary history was inferred using the neighbour-joining method. The percentages of replicate trees in which the associated taxa are grouped in the bootstrap test (2000 replicates) are shown next to the branches. The tree is drawn in scale, with branching lengths in the same units as the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The analysis involved 50 nucleotide sequences.

Table S1 - Non-conserved amino acid residues between *S. mansoni* and *C. elegans* at the functional sites of the ATG8, Pkinase and PI3PI4kinase domains.

Domain	Putative site function	Amino acid residue, position in	Group R of the amino acid residue, position in	Amino acid residue, position in	Group R of the amino acid residue, position in
		<i>S. mansoni</i>	<i>S. mansoni</i>	<i>C. elegans</i>	<i>C. elegans</i>
Domain ATG8 (PF02991)	Tubulin-binding site	Leu15	Group R aliphatic, apolar	Arg15	Group R positively charged
		Gln19	*Group R negatively charged	Asp19	* Group R negatively charged
		Asn20	Group R polar, not charged	Lys20	Group R positively charged
		Lys23	*Group R positively charged	Arg23	* Group R positively charged
	ATG-7 binding site	Ser36	Group R polar, not charged	Ala36	Group R aliphatic, apolar
Domain Pkinase (PF00069)	Putative site function	Amino acid residue, position in	Group R of the amino acid residue, position in	Amino acid residue, position in	Group R of the amino acid residue, position in
		<i>S. mansoni</i>	<i>S. mansoni</i>	<i>C. elegans</i>	<i>C. elegans</i>
	Probable active site	Gly17	Group R aliphatic, apolar	Gln138	Group R polar, not charged
	ATP binding site	-	-	-	-
	Polypeptide substrate binding site	-	-	-	-
	Activation loop (A-loop)	Gln53	* Group R polar not charged	Asn170	* Group R polar, not charged
		Val59	* Group R aliphatic, apolar	Ala176	* Group R aliphatic, apolar
		Met61	* Group R aliphatic, apolar	Leu178	* Group R aliphatic, apolar
Domain PI3PI4kinase (PF00454)	Putative site function	Amino acid residue, position in	Group R of the amino acid residue, position in	Amino acid residue, position in	Group R of the amino acid residue, position in
		<i>S. mansoni</i>	<i>S. mansoni</i>	<i>C. elegans</i>	<i>C. elegans</i>
	ATP binding site	Phe647	Group R aromatic	Glu617	Group R, negatively charged
		Gln648	Group R polar, not charged	Met618	Group R aliphatic, apolar
		Phe716	Group R aromatic	Cys695	Group R polar, not charged
		Val717	* Group R aliphatic, apolar	Ile696	* Group R aliphatic, apolar
		Ser721	Group R polar, not charged	Pro700	Group R aliphatic, apolar
		Asp724	Group R, negatively charged	Ala703	Group R aliphatic, apolar
		Ile791	* Group R aliphatic, apolar	Val775	* Group R aliphatic, apolar
		Val772	* Group R aliphatic, apolar	Leu746	* Group R aliphatic, apolar
	Catalytic loop	Met777	* Group R aliphatic, apolar	Leu761	* Group R aliphatic, apolar
		Glu778	* Group R, negatively charged	Asp762	* Group R, negatively charged
	Activation loop (A-loop)	Ser794	Group R polar, not charged	Gly778	Group R aliphatic, apolar

Ala799	Group R aliphatic, apolar	Arg783	Group R positively charged
Ala805	* Group R aliphatic, apolar	Pro789	* Group R aliphatic, apolar
Glu807	Group R, negatively charged	Pro791	Group R aliphatic, apolar
Val808	* Group R aliphatic, apolar	Met792	* Group R aliphatic, apolar
Arg809	* Group R positively charged	Lys793	* Group R positively charged

* Exchange of amino acid residue by residue of the same group

ANEXOS

**Normas da Revista Submetida: periódico “JOURNAL OF EXPERIMENTAL
BIOLOGY” ISSN: 0022-0949**

Preparação de manuscritos

Informação geral

Novas submissões - formato livre

Submissões revisadas

Comprimento do manuscrito

Preparando o texto e tabelas

Formatos de arquivo

Artigo seções

Preparando o texto

Preparando Tabelas

Preparando Equações de Exibição

Preparando figuras

Informação geral

Preparando gráficos e diagramas (arte de linha)

Preparando imagens fotográficas

Manipulação de imagem

Permissões de figura

Preparando filmes

Informação suplementar

1. Informações gerais

O JEB exige que os autores submetam seus manuscritos online usando o sistema de processamento Bench> Press manuscript . Os autores devem ler as políticas do periódico antes de preparar seus manuscritos, e todos os manuscritos devem aderir aos termos de submissão da revista .

Todas as pré-submissões ou consultas gerais de editoriais devem ser direcionadas ao Escritório Editorial .

1.1. Novas submissões - formato livre

Para tornar o envio do manuscrito o mais fácil possível para os autores, o JEB permite o envio sem formatação.

Na primeira submissão, os autores podem submeter seu manuscrito em qualquer formato; no entanto, encorajamos os autores a ler as diretrizes de preparação do manuscrito abaixo e a considerar a facilidade com que um manuscrito é lido pelos revisores e editores (por exemplo, espaçamento de linhas, números de linhas).

Todos os manuscritos devem aderir às nossas diretrizes sobre o comprimento do manuscrito .

1.2. Submissões revisadas

No JEB, > 95% das submissões revisadas são aceitas para publicação.

Todos os manuscritos revisados devem seguir as diretrizes abaixo para preparar textos e tabelas , figuras , filmes e informações suplementares .

Os autores devem preencher e enviar uma lista de verificação de submissão com seus manuscritos. Este formulário pede que os autores confirmem que seguiram as diretrizes de melhores práticas em relação a assuntos experimentais, relatórios de dados e estatísticas. A lista de verificação é baseada nos Princípios e Diretrizes do NIH para Relatórios de Pesquisas Pré-Clinicas e tem o objetivo de ajudar a garantir altos padrões de notificação e auxiliar a reprodutibilidade.

2. Comprimento do manuscrito

A tabela a seguir mostra a contagem máxima de palavras do texto principal (incluindo as legendas principais de texto e figura, mas não a página de título, resumo, seção de materiais e métodos ou lista de referência) e número máximo de itens de exibição (figuras e tabelas) para diferentes tipos de artigo.

Tipo de artigo	Contagem máxima de palavras	No máximo. de itens de exibição
Artigo de Pesquisa	7000	10
Comunicações Curtas	2500	3
Métodos e Técnicas	2500	3
Revisões	7000	8
Comentário	4500	5

Artigos que excedam os limites especificados acima serão devolvidos aos autores no momento da apresentação. Observe que os limites finais das palavras dependerão do artigo submetido e ficam a critério dos Editores.

3. Preparando o texto e as tabelas

As informações abaixo se referem a um artigo de pesquisa padrão. Para todos os outros tipos de artigo, consulte as diretrizes de estilo e layout fornecidas em nossa página de [tipos de artigos](#) .

3.1 Formatos de arquivo

Para textos e tabelas de manuscritos, nosso **formato de arquivo** preferido é o **Microsoft Word .docx** (ou **.doc**). Também aceitamos Pages (formato rtf) e LaTeX.

Por favor, inclua tabelas como parte do arquivo do manuscrito. As tabelas devem ser editáveis e não incorporadas como imagem.

Se você estiver enviando um arquivo LaTeX, inclua todos os arquivos de componentes, como .st (arquivo de estilo), .cls (arquivo de classe) e .bib (arquivo de bibliografia) no envio do arquivo. Por favor, note que os arquivos LaTeX serão convertidos em arquivos do Microsoft Word durante o processo de produção e que os autores serão obrigados a verificar cuidadosamente a conversão de símbolos e caracteres especiais no estágio de prova.

Para equações matemáticas, nosso formato de arquivo preferido é MathType. Também aceitamos o Equation Editor (Microsoft Word) e o LaTeX.

3.2. Artigo seções

3.2.1. *Folha de rosto*

Esta seção deve incluir um **título** de 120 caracteres ou menos que resuma de forma clara e concisa suas descobertas específicas e evite abreviações especializadas, um **título corrente** de 40 caracteres ou menos, os **nomes** completos (incluindo as iniciais do meio) e **afiliações de todos os autores** (incluindo os endereços atuais). Para autores que se mudaram) e o **endereço de e-mail do autor correspondente**. Por favor, note todos os casos em que os autores contribuíram igualmente para o trabalho. Por favor, inclua também de **3 a 6 palavras-chave** para fins de indexação (selecione palavras-chave que tornem seu manuscrito facilmente pesquisável).

3.2.2. *Mapa recapitulativo*

Forneça uma breve Declaração resumida para uso em tabelas de alertas de conteúdo enviados por e-mail e on-line. O texto deve ter entre 15 e 30 palavras e deve explicar, sem exagero, por que alguém deveria ler o artigo. Por favor, não repita simplesmente o título e evite termos e abreviações desconhecidos, pois o texto deve ser compreensível para não especialistas. Nós nos reservamos o direito de editar o texto.

3.2.3. *Abstrato*

Forneça um breve resumo de no máximo 250 palavras para artigos de pesquisa (150 palavras para comunicações curtas e métodos e técnicas). Isso deve apresentar de forma sucinta e clara o tópico do artigo, resumir as principais conclusões e destacar a significância dos dados e principais conclusões. O resumo é usado abstraindo os serviços sem modificação e freqüentemente é lido com mais frequência do que o artigo completo e, portanto, precisa ser compreensível por si só. Não inclua subtítulos ou referências e evite abreviaturas não padrão.

3.2.4. Introdução

Esta seção deve fornecer sucintamente as informações básicas necessárias para definir os resultados em seu próprio contexto biológico. Não deve conter subtítulos.

3.2.5. Materiais e métodos

Esta seção deve incluir detalhes suficientes para entender e replicar os experimentos realizados, em conjunto com as referências citadas. Para facilitar a descrição detalhada de materiais e métodos (permitindo que o leitor compreenda e replique completamente os protocolos experimentais), esta seção não conta para o limite de palavras para o comprimento do artigo. Os materiais e métodos devem ser divididos em seções, e devem incluir subseções detalhando reagentes, modelos animais e análise estatística. Forneça nomes e locais (cidade, estado, país) para TODOS os fornecedores de equipamentos e reagentes. Dê nomes latinos e autoridade taxonômica (por exemplo, Linnaeus) para todas as espécies experimentais. Os padrões de relatórios devem seguir aqueles recomendados em nossas políticas de periódicos e lista de verificação de envio.

3.2.6. Resultados

Esta seção deve descrever os resultados dos experimentos realizados e deve ser desmembrada por subtítulos para organizar as descobertas apresentadas e acompanhar o leitor pelos resultados. A reprodutibilidade dos resultados deve ser incluída - veja nossa lista de verificação para mais informações. Assegure-se de que a distinção entre novos resultados e descobertas publicadas / fatos estabelecidos seja clara.

3.2.7. Discussão

Esta seção deve explicar a significância dos resultados e colocá-los no contexto mais amplo da literatura atual. A discussão pode conter subtítulos para destacar áreas importantes que são expandidas no texto.

3.2.8. Agradecimentos

Esta seção deve mencionar quaisquer indivíduos ou grupos que não sejam nomeados como autores, mas que tenham contribuído para a pesquisa apresentada (por exemplo, em termos de reagentes, tempo, experiência) ou redação do manuscrito.

3.2.9. Interesses competitivos

Inclua uma declaração para identificar quaisquer influências potenciais que os leitores possam precisar saber ao pensar sobre as implicações da pesquisa apresentada. Para obter informações mais específicas sobre as afiliações e associações que devem ser divulgadas, consulte nossa página de políticas de periódicos. Autores sem interesses financeiros ou concorrentes devem explicitamente afirmar isso e incluir a declaração 'Nenhum interesse competido declarado'.

3.2.10. Financiamento

Detalhes de todas as fontes de financiamento devem ser fornecidos. É da responsabilidade do autor correspondente fornecer as informações de financiamento relevantes de TODOS os autores. Por favor, forneça o nome da agência de financiamento oficial, conforme listado no Registro de Funder Crossref, ou seja, 'Institutos Nacionais de Saúde', não 'NIH', e todos os números de subsídios relevantes. Se o seu financiador não estiver listado no registro, forneça o nome completo.

Quando os indivíduos precisarem ser especificados para determinadas fontes de financiamento, por favor, adicione as iniciais após a agência relevante ou o número do subsídio. Por favor, use o seguinte formato: Este trabalho foi apoiado pelo National Institutes of Health [AA123456 para CS, BB765432 para MH]; e o Alcohol & Education Research Council [hfygr667789]. Onde nenhum financiamento específico foi fornecido para a pesquisa, por favor indique 'Esta pesquisa não recebeu nenhuma concessão específica de nenhuma agência de financiamento nos setores público, comercial ou sem fins lucrativos'.

3.2.11. Disponibilidade de dados

Todos os conjuntos de dados disponíveis publicamente que suportam o seu trabalho devem ser incluídos na seção Disponibilidade de dados. Os detalhes devem incluir o nome do repositório, o identificador, como número de acesso ou doi e, quando possível, incluir um hiperlink para o URL do conjunto de dados. Os conjuntos de dados devem ser disponibilizados publicamente

no momento da publicação. Para obter mais informações sobre nossos requisitos de depósito de dados, consulte nossas [Políticas do Diário](#) .

Observe que o JEB endossa os [Princípios de citação de dados do Force 11](#) e recomenda que as referências a conjuntos de dados também sejam incluídas na lista de referência com DOIs / números de acesso e hiperlinks, quando disponíveis.

3.2.12. Referências

Todas as referências citadas no texto, tabelas e legendas de figuras devem ser incluídas em uma única lista de referências no final do artigo. Encorajamos fortemente a citação da literatura primária sobre os artigos de revisão, sempre que possível, e por esse motivo não temos um limite no número de referências que podem ser incluídas. Para informações específicas sobre a formatação de referência, consulte a seção de [referências](#) abaixo.

3.2.13. Legendas de figuras

Legendas de figuras devem ser listadas no final do manuscrito. A primeira frase da legenda deve resumir a figura e estar em negrito. Cada legenda da figura deve ser independente e conter informações suficientes para garantir que a figura seja compreensível sem precisar se referir ao texto principal. Os painéis de figuras devem ser rotulados com letras maiúsculas (A, B, C, etc.) e cada painel deve ser descrito na legenda. Quaisquer abreviaturas não fornecidas no texto principal devem ser definidas. Para mais detalhes sobre o que deve ser incluído nas legendas das figuras, consulte nossa [lista de verificação de envio](#) .

3.2.14. Apêndices

Esta seção opcional pode ser usada para informações críticas para o manuscrito, mas interromperia o fluxo do artigo e não seria adequada para inclusão como [informação suplementar](#) . Deve ser formatado de acordo com o estilo normal da revista. Todas as figuras, tabelas e equações devem ser numeradas separadamente do texto principal como Fig. A1, Tabela A1, Eqn A1, etc. Por favor, note que o texto, figuras e tabelas em um Apêndice contam para o [comprimento](#) total do [manuscrito](#) .

3.3. Preparando o texto

3.3.1. Informação geral

Prepare manuscritos em inglês (a ortografia dos EUA ou do Reino Unido é aceitável, mas seja consistente dentro do manuscrito). Sua escrita deve ser compreensível para editores e revisores, e seu estilo de escrita deve ser conciso e acessível. Se o inglês não for sua primeira língua, considere usar um serviço de edição de idioma antes do envio.

Assegure-se de que o idioma em seu manuscrito seja original e não contenha passagens de texto previamente publicadas (incluindo aquelas de suas próprias publicações) - veja nossas políticas para mais detalhes. Todos os manuscritos aceitos são rotineiramente selecionados usando um software de detecção de plágio.

Use o espaçamento de 1,5 linhas e a numeração contínua de linhas em todo o artigo para facilitar a revisão on-line.

Não insira figuras no texto.

Cite cada figura, tabela e filme no texto em ordem numérica. Peças de figuras ou tabelas devem ser rotuladas com letras maiúsculas (A, B, C, etc.). Use o seguinte formato para citações: Fig. 1A, B ou Figs 1, 2 ou Tabela 1 ou Filme 1.

Se necessário, as equações de exibição devem ser citadas usando o seguinte formato: Eqn 1.

Para figuras suplementares, tabelas e equações, cite como na figura S1, tabela S1, Eqn S1.

Defina abreviações na primeira menção e inclua uma lista de símbolos e abreviações usadas.

Para caracteres especiais não disponíveis em um teclado padrão (por exemplo, caracteres gregos, símbolos matemáticos), use a fonte Symbol ou a função 'Inserir símbolo' no Microsoft Word, onde for possível. Para caracteres especiais que não estão disponíveis através desta rota, use os caracteres MathType; não use imagens incorporadas (por exemplo, GIF).

3.3.2. Unidades e nomenclatura

As unidades de medida devem seguir o sistema SI, por exemplo, ml s^{-1} em vez de ml / s . Orientações sobre o uso da convenção do SI podem ser encontradas aqui. Digite um espaço entre um dígito e uma unidade, por exemplo, 1 mm (exceto 1%, 1° C).

Use sem e sd para erros padrão, etc.

Nomenclatura taxonômica: os nomes latinos e a autoridade taxonômica (por exemplo, Linnaeus) devem ser fornecidos para todas as espécies experimentais. Todos os nomes de espécies devem estar em itálico.

Nomenclatura genética: os nomes dos genes devem estar no tipo itálico, mas o produto proteico de um gene deve estar no tipo romano. A nomenclatura genética deve estar de acordo com as convenções estabelecidas e deve ser aprovada pelo curador de nomenclatura relevante, se aplicável. Veja abaixo alguns links relevantes.

HGNC lista de bancos de dados do genoma: <http://www.genenames.org/useful/all-links#ovgdb>

Caenorhabditis elegans : <http://www.wormbase.org>

Dictyostelium : <http://dictybase.org/>

Frango: <http://birdgenenames.org/cgnc/guidelines>

Drosophila: <http://flybase.org/wiki/FlyBase:Nomenclature>

Humano: <http://www.genenames.org/about/guidelines>

Milho: http://www.maizegdb.org/maize_nomenclature.php

Mouse: <http://www.informatics.jax.org/mgihome/lists/lists.shtml>

Saccharomyces cerevisiae: <http://www.yeastgenome.org/>

Schizosaccharomyces pombe: <http://www.pombase.org/submit-data/gene-naming-guidelines>

Xenopus: <http://www.xenbase.org/gene/static/geneNomenclature.jsp>

Zebrafish: <https://wiki.zfin.org/display/general/ZFIN+Zebrafish+Nomenclature+Guidelines>

3.3.3. Referências

3.3.3.1. Referências no texto

As referências no texto devem ser citadas usando o sistema de referência de Harvard (nome, data).

Cada referência citada no texto (incluindo aquelas citadas em informações suplementares) deve ser listada na lista de Referência e vice-versa: por favor, verifique-as cuidadosamente.

Citações de literatura no texto são as seguintes.

Um autor - (Jones, 1995) ou (Jones, 1995; Smith, 1996).

Dois autores - (Jones e Kane, 1994) ou (Jones e Kane, 1994; Smith, 1996).

Mais de dois autores - (Jones et al., 1995) ou (Jones et al., 1995a, b; Smith et al., 1994, 1995).

Manuscritos aceitos para publicação, mas ainda não publicados: inclua na Lista de Referência e cite como (Jones et al., No prelo).

Manuscritos publicados em servidores de pré-impressão, mas ainda não publicados: inclua na Lista de referência e cite como (Smith et al., 2016 preprint).

Citação de trabalho não publicado: desencorajamos a citação de dados não publicados; se for necessário, use o formato (SP Jones, observações / dados não publicados). Dados não publicados não podem ser incluídos na lista de referência.

Teses de doutoramento: incluir na lista de referência e citar como (Smith, 2016).

URLs de sites: cite no texto, mas não inclua na lista de Referência; forneça o URL e, se o site for atualizado com frequência, a data em que o site foi acessado.

Comunicações pessoais (ou seja, as observações não publicadas de outros cientistas): quando uma pessoa que não é autor no artigo é a fonte de dados não publicados, esses dados devem ser citados como uma comunicação pessoal usando o formato (nome completo, instituição, comunicação pessoal). As comunicações pessoais não devem ser citadas na lista de referência e só serão publicadas quando substantiadas por permissão por escrito (por exemplo, e-mail) do cientista citado.

Conjunto de dados: recomendamos que todos os conjuntos de dados disponíveis publicamente sejam totalmente referenciados na lista de referência com um número de acesso ou identificador único, como um DOI. Cite como (Jones e Jane, 1994).

3.3.3.2. *Lista de referência*

As referências são listadas em ordem alfabética de acordo com o sobrenome e as iniciais do primeiro autor.

Use o seguinte estilo:

Periódico

Rivera, ARV, Wyneken, J. e Blob, RW (2011). Cinemática dos membros dianteiros e padrões motores de tartarugas marinhas (*Caretta caretta*): os padrões motores são conservados na evolução de novas estratégias locomotoras? *J. Exp. Biol.* **214**, 3314-3323.

Livro

Hochachka, PW e Somero, GN (2002). *Adaptação Bioquímica: Mecanismo e Processo na Evolução Fisiológica*. Oxford, Reino Unido: Oxford University Press.

Capítulo de livro

Feller, G. (2008). Função enzimática a baixas temperaturas em psicrofílos. Em *Protein Adaptation in Extremophiles* (ed. KS Siddiqui e T. Thomas), pp. 35-69. Nova York: Nova Science Publishers, Inc.

Servidor de pré-impressão

Baillie-Johnson, P., van den Brink, SC, Balayo, T., Turner, DA e Martinez Arias, A. (2014). Geração de agregados de células ES de camundongos que apresentam quebra de simetria, polarização e comportamento coletivo emergente in vitro. *bioRxiv* doi: 10.1101 / 005215.

Tese de doutorado

Jones, AR (2016). Título da tese. *Tese de doutorado*, Universidade de Washington, Seattle, WA.

Conjunto de dados com identificador persistente

Zheng, L.-Y., Guo, X.-S., Ele, B., Sun, L.-J., Peng, Y. e Dong, S.-S. (2011). Dados do genoma de sorgo sacarino e sorgo (*Sorghum bicolor*). *Banco de dados GigaScience* . <http://dx.doi.org/10.5524/100012>.

Kingsolver, JG, Hoekstra, HE, Hoekstra, JM, Berrigan, D., Vignieri, SN, Hill, CE, Hoang, A., Gibert, P. e Beerli, P. (2001). Dados de: A força da seleção fenotípica em populações naturais. *Repositório Digital Dryad* . <http://dx.doi.org/10.5061/dryad.166>.

Se houver mais de 10 autores, use 'et al.' depois do 10º autor.

Dentro de um grupo de artigos com o mesmo primeiro autor, liste primeiramente os trabalhos de autor único, depois os trabalhos com dois autores, depois, et al. papéis. Se mais de uma referência existir para cada tipo, organize em ordem de data. Use a e b para os artigos publicados no mesmo ano.

'No prelo' as citações devem ter sido aceitas para publicação e o nome do periódico ou editor incluído.

3.4. Preparando Tabelas

Prepare tabelas no formato 'cell' e inclua no mesmo arquivo que o texto principal. As tabelas devem ser editáveis e não incorporadas como imagem.

O título da tabela deve ser uma única frase e deve resumir o conteúdo da tabela. Detalhes referentes a um ou mais itens isolados na tabela são melhor informados em uma nota de rodapé da tabela. As unidades devem ser colocadas entre parênteses no topo de cada coluna (não se repita na tabela).

3.5. Preparando Equações de Exibição

Nosso formato de arquivo preferido para equações é o MathType. Também aceitamos o Equation Editor (Microsoft Word) ou o LaTeX.

Por favor, numere todas as equações de exibição, consecutivamente. Eles devem assumir a forma:

$$\dot{Q} = \frac{-\kappa A_p [p]}{\mu T_p}, \quad (1).$$

As unidades devem ser definidas no texto e não incluídas na equação.

4. Preparando figuras

4.1. Informação geral

As figuras devem ser numeradas em uma única série que reflita a ordem em que são referidas no texto.

As figuras devem ser preparadas no menor tamanho que irá transmitir a informação científica essencial; O tamanho final da figura fica a critério da revista. Para obter mais informações sobre como organizar suas figuras para otimizar a visualização por revisores e leitores, baixe nossas diretrizes de [layout de figura](#).

No envio inicial, você pode enviar um único arquivo PDF contendo todos os textos e figuras. Depois que um artigo for aceito para publicação, você deverá enviar arquivos separados para cada figura (veja abaixo os formatos de arquivo).

Legendas de figuras devem ser incluídas no arquivo de texto principal e não no arquivo de figura.

Não há custos para o uso de cores em figuras, embora o uso gratuito de cores em gráficos e diagramas deva ser evitado e a cor só deve ser usada para melhorar a clareza científica.

Nós encorajamos fortemente o uso de cores que são adequadas para leitores daltônicos, particularmente na preparação de imagens de microscopia fluorescente. Mais notavelmente, desencorajamos o uso de vermelho / verde para a exibição de imagens de 2 canais; os autores devem considerar uma combinação de cores alternativa (por exemplo, magenta / verde).

4.2. Preparando gráficos e diagramas (arte de linha)

4.2.1. *Informação geral*

O tamanho máximo, incluindo letras e etiquetas, é de 180 mm × 210 mm.

Espessuras de linha e símbolos devem ser de tamanho suficiente para garantir clareza se o valor for reduzido em tamanho.

Para gráficos, nossos símbolos preferidos são preenchidos e círculos abertos, triângulos, quadrados ou diamantes; onde possível, o mesmo símbolo deve ser usado para a mesma entidade em diferentes figuras.

Cor: insira a arte da linha no modo RGB (não CMYK), pois isso maximiza a qualidade da cor e mostra como as figuras serão exibidas on-line; NÃO use cores Spot, Pantone ou Hex e NÃO atribua um perfil de cores.

Rotulagem de texto: use letras maiúsculas em negrito de 12 pt (A, B, C, etc.) para distinguir painéis de figuras; outra rotulagem deve ser de 8 pt Fonte Arial (caso de sentença) (os títulos devem estar em negrito); para seqüências de genes, use a fonte Courier para garantir que cada letra tenha a mesma largura; use a fonte Symbol para caracteres gregos.

4.2.2. *Formatos de arquivo*

Os autores devem enviar suas figuras de origem em um formato editável (gráfico vetorial) que retenha informações de fonte, linha e forma. Esse formato garante que possamos editar onde for necessário e produzir PDFs impressos e on-line de alta qualidade.

Aceitamos os seguintes formatos de arquivo para gráficos / arte de linha: EPS, PDF e WMF.

Aplicativos como o Adobe Illustrator, Canvas, DeltaGraph, Corel Draw, Freehand, MatLab e SigmaPlot fornecem esses formatos.

Por favor, certifique-se de que você 'exportar' ou 'salvar' com informações (texto / fonte) incluído

Salve as informações de texto / fonte como 'texto' e não 'curvas' ou 'contornos'.

Se combinar imagens, sempre 'embeba' imagens; NÃO simplesmente "vincule" eles. No Adobe Illustrator, copiar e colar ou arrastar uma imagem diretamente do Adobe Photoshop irá incorporar a imagem. Alternativamente, se você usar o comando 'Local', desmarque 'Link' na caixa de diálogo. Para outros aplicativos de software, consulte a documentação (geralmente haverá uma opção 'link', 'proxy', 'OLE' ou 'OPI', que NÃO deve ser usada com arquivos EPS).

Observe que o envio de formatos JPEG ou TIFF para gráficos / arte de linha pode atrasar a produção de seu artigo.

4.3. Preparando imagens fotográficas

4.3.1. Informação geral

As imagens fotográficas (também conhecidas como imagens de bitmap) são compostas de pixels (por exemplo, microscopia de luz, fluorescência e eletrônica, géis e fotografia tradicional)

O tamanho máximo, incluindo letras e etiquetas, é de 180 mm x 210 mm.

As imagens devem ser salvas com uma resolução de 300 pixels por polegada. Qualquer opção de qualidade de imagem deve ser definida no máximo.

Para micrografias, use uma barra de escala para mostrar a ampliação e dê o comprimento disso na legenda da figura.

Cor: forneça imagens no modo RGB (não CMYK), pois isso maximiza a qualidade da cor e mostra como as figuras serão exibidas on-line; NÃO use cores Spot, Pantone ou Hex e NÃO atribua um perfil de cores.

Rotulagem de texto: use letras maiúsculas em negrito de 12 pt (A, B, C, etc.) para distinguir painéis de figuras; outra rotulagem deve ser de 8 pt Fonte Arial (caso de sentença) (os títulos devem estar em negrito); para seqüências de genes, use a fonte Courier para garantir que cada letra tenha a mesma largura; use a fonte Symbol para caracteres gregos.

4.3.2. Formatos de arquivo

Formatos de arquivo aceitos são: **EPS / PDF** (baseado em vetor, como o Adobe Illustrator).

Formato EPS / PDF para figuras com dados mistos, como gráficos vetoriais desenhados em linha e imagens fotográficas.

Formato TIFF com camadas de texto ativadas, somente para imagens fotográficas.

ARIAL ou HELVETICA deve ser a escolha de fonte usada em toda a preparação da figura.

Imagens do PowerPoint: NÃO aceitamos arquivos do PowerPoint. Em vez disso, salve como PDF usando as instruções abaixo.

Vá para 'imprimir' e escolha 'Salvar como PDF' na caixa de diálogo de impressão

Você pode baixar o software gratuito que permitirá imprimir arquivos EPS / PDF no disco: [Download de software para Windows](#)
[Download de software para Mac](#)

4.4. Manipulação de imagem

Quaisquer alterações feitas em figuras usando software de computador devem ser consistentes com nossa política de manipulação de imagens. As imagens apresentadas no manuscrito devem permanecer representativas dos dados originais, e o autor correspondente será solicitado a confirmar isso no momento da apresentação. Por favor, leia nossos requisitos para a preparação de seus dados ([download PDF](#)) para evitar um possível atraso no processo de publicação ou rejeição com base no não cumprimento destas diretrizes.

Todos os manuscritos aceitos são rotineiramente selecionados pelo nosso departamento de produção para qualquer indicação de manipulação de imagem. Se for detectada evidência de

manipulação inadequada, os Editores do periódico podem solicitar que os dados originais sejam fornecidos e, se necessário, podem revogar a aceitação do artigo.

4.5. Permissões de figura

É de responsabilidade do autor obter permissão para usar figuras de outra publicação em qualquer artigo submetido ao JEB e para garantir que tal uso seja creditado à fonte. Quaisquer taxas associadas ao uso da figura são de responsabilidade do autor. Permissão por escrito do autor e / ou editor do material original, conforme apropriado, deve ser fornecida no momento do envio, caso contrário a publicação pode ser atrasada. Se uma figura foi modificada de uma figura publicada anteriormente, por favor, verifique com os proprietários dos direitos autorais para ver se a permissão é necessária e incluir uma citação / referência completa para o artigo original.

5. Preparando filmes

Nosso **formato de arquivo** preferido para filmes é o **.mp4** , mas também aceitamos .mov. Os filmes devem ser preparados no menor tamanho de arquivo que possa transmitir as informações científicas essenciais. Temos um limite de 500 MB para todos os arquivos de filme. Se os seus filmes excederem esse limite, entre em contato com o Escritório Editorial para obter orientação antes de enviar o artigo.

Por favor, inclua os títulos e legendas de todos os filmes em seu PDF de informações complementares (veja a seção sobre como preparar informações suplementares). Mantenha as legendas o mais curtas possível e certifique-se de que elas explicam o que está sendo exibido no filme e os detalhes necessários de como o filme foi feito.

Os filmes devem ser numerados em uma única série que reflita a ordem em que são citados no texto, por exemplo, ver Filme 1. Filme 2, etc. Por favor, não use legenda alfabética, por exemplo, Filmes 1A-C devem ser rotulados novamente como Filmes 1- 3

Todos os filmes serão reproduzidos na versão on-line de texto completo do artigo e um link para cada filme será incluído no PDF de informações complementares.

Ao preparar seus filmes, observe as recomendações abaixo:

Use uma resolução não superior a 1280x720 (720p), como a maioria dos leitores visualizará em um computador ou dispositivo móvel

Use um codec de compressão de vídeo bem caracterizado, como o H.264, e use a codificação multi-pass, se disponível

Não exceda um bitrate de 2500mbps para vídeo codificado em H.264 720p

Mantenha a duração ao mínimo necessário para ilustrar seu ponto

Não inclua uma faixa de áudio, a menos que seja essencial

Se estiver incluindo áudio, use um codec de compactação de áudio bem caracterizado, como o AAC

Não exceda uma taxa de bits de 128 kbps, taxa de amostragem de 44,1 kHz ou contagem de canal de 2 para áudio codificado

Por favor, note que nos reservamos o direito de disponibilizar filmes ou outros formulários de dados em acesso aberto através do site da Companhia de Biólogos , You Tube e outros canais on-line. Onde o fizermos, os filmes e outras formas de dados poderão, de vez em quando, ser disponibilizados sob os termos da Licença Creative Commons Atribuição 3.0 Unported (CC-BY) (cujos termos estão definidos em <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/legalcode>). Estes termos permitem a cópia e / ou adaptação do filme e a distribuição do filme ou qualquer adaptação por qualquer meio e em qualquer meio ou formato para qualquer outra pessoa, inclusive para fins comerciais, desde que você seja creditado como o autor original. Não haveria nenhum custo adicional para você, o autor.

6. Informação suplementar

Dados essenciais para a interpretação dos resultados do trabalho principal devem ser incluídos no artigo principal. Informações suplementares fornecem acesso a dados de suporte que não aparecem no artigo impresso ou no PDF, mas que acompanham a versão final de um documento on-line.

Esses dados são revisados e sujeitos aos mesmos critérios que os dados a serem publicados no próprio documento. Durante a revisão por pares, os editores e revisores são solicitados a avaliar se as informações suplementares são apropriadas e essenciais para apoiar as conclusões de um artigo.

Todos os dados suplementares serão estritamente limitados a **um total de 50 MB por artigo (excluindo arquivos de filmes e submissões de capas).**

Apenas aceitamos arquivos de dados - como conjuntos de dados, filmes, áudio, figuras e tabelas - como informações suplementares. NÃO aceitamos arquivos de texto que forneçam materiais e métodos adicionais, resultados ou discussões relacionadas ao artigo; estes devem ser incluídos no próprio artigo. Análises estatísticas e computacionais devem idealmente ser incluídas na seção de métodos ou como um apêndice no artigo principal. Arquivos muito grandes ou aqueles que exigem software especializado não são adequados como informações suplementares. Para grandes conjuntos de dados, por exemplo, análises computacionais, consulte nossas diretrizes sobre [deposição de dados](#).

Os critérios para cada tipo de informação suplementar estão listados na tabela abaixo. O número total de itens de informações suplementares de todos os tipos (figuras, tabelas, filmes, etc.) por artigo não deve exceder o número total de figuras e tabelas no artigo principal.

Tipo de dados	Critério	Estilo de citação
Figuras e Tabelas	Max. de 6 itens por artigo (não deve exceder o número total de figuras / tabelas no artigo principal)	Fig. S1, Fig. S2; Tabela S1, Tabela S2, etc.
Conjuntos de dados	Incluir como tabelas suplementares	Tabela S1, Tabela S2, etc.
Filmes e clipes de áudio	Max. de 3 filmes / áudio por artigo	Filme S1, Filme S2, etc. ; Áudio S1, Áudio S2, etc.

Com exceção dos filmes (consulte a seção sobre como [preparar os filmes](#)) e das tabelas grandes, **todas as informações complementares, incluindo títulos de filmes e legendas, devem ser agrupadas em um único arquivo PDF**. Se sua tabela for muito grande, ou se você

desejar que os leitores possam exportar e / ou manipular os dados, preferiríamos enviá-la como um arquivo do Microsoft Excel.

Use um sistema de numeração separado daquele usado no artigo principal e use o formato Fig. S1, Fig. S2, Tabela S1, etc. Se uma figura suplementar se referir a uma figura particular no texto, por favor cite-o o mais próximo possível desta figura possível. Para a conveniência dos leitores, coloque cada número ao lado da legenda correspondente no PDF de informações suplementares. Por favor, inclua uma legenda para cada figura e um título para cada tabela.

Observe que os arquivos de informações suplementares não são copiados pelo JEB e, portanto, os autores devem garantir que todos os arquivos sejam verificados cuidadosamente antes do envio e que o estilo de termos e números esteja de acordo com o do artigo. A modificação das informações suplementares após a publicação exigirá uma correção formal.

Consulte cada informação suplementar pelo menos uma vez no texto do artigo principal (o artigo publicado na edição impressa da revista).