UFOP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO NÚCLEO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



Modificação pós-traducional dependente de SUMO em Schistosoma mansoni: padrão de expressão diferencial durante a transição cercária a esquistossômulo

Roberta Verciano Pereira

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Guerra de Sá

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Biologia Molecular.

Ouro Preto, maio de 2010

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular NUPEB/ICEB/UFOP e no Instituto Carlos Chagas no Paraná, com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Dedico esta dissertação aos meus pais, Roberto e Alinéia, aos meus irmãos, Aline e Rafael, aos meus avós e familiares. Agradeço pelo carinho, apoio e compreensão em todos os momentos da minha vida. Amo muito vocês!!!

"Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e viver com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se atreve, e a vida é muito bela para ser insignificante..."

"O mais interessante disso tudo, é que às vezes, quando tudo dá errado acontecem coisas tão maravilhosas que jamais teriam acontecido se tudo tivesse dado certo."

Charles Chaplin

Agradecimentos

A Deus, por sempre ter guiado meus passos durante toda a minha vida.

Aos meus pais amados, Alinéia e Roberto e meus queridos irmãos, Aline e Rafael, pelo apoio incondicional, carinho, amor, respeito, dedicação e por estarem sempre presentes ao meu lado. Amo vocês demais da conta!!!!

À Profa. Dra. Renata Guerra de Sá, por ter me dado a chance de descobrir meu caminho e por todo ensinamento e carinho durante todos esses anos de convivência.

Aos professores Dr.Elísio Alberto Evangelista, Dr. William de Castro Borges e Dr. Elio Hideo Baba por todo o carinho, atenção e disponibilidade.

Ao PET-Farmácia/UFOP, pelas oportunidades e pelo aprendizado.

À Priscila e Lívia, grandes amigas, vou guardá-las para sempre no meu coração. Não sei nem como agradecer todo carinho e amizade. Obrigada por tudo!!!

À Natália, por todo carinho, companheirismo e aprendizado durante todos estes anos. Sua amizade é muito importante para mim.

À Nayara, minha irmã de coração, obrigada por toda ajuda e pelas risadas diárias.

As minhas queridas amigas Karina e Roberta, por todo apoio, companheirismo, carinho e amizade.

À Enyara e ao Paulo, grandes amigos, obrigada por fazerem parte da minha vida. Nunca vou esquecer todo o apoio e a agradável convivência.

À Izabela e toda a sua família por ter me acolhido, pela amizade e pela agradável convivência.

À Nilza, por todos os conselhos, apoio e todo o carinho.

Aos amigos Matheus, Listerine e Roenick pelo companheirismo e por nunca ter me negado ajuda.

À equipe do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UFOP, que participou da minha formação científica: Cláudia, Helaine, Cássio, Letícia, Naiara, Leonardo, Leandro (Nerso), Leandro (Bartira), Victor, Diego, Daniel, Eneida, Ezequiel, Gustavo e Eduardo.

À Carla e Josiane, pelo carinho e pela atenção que me dispensaram nos experimentos no Institudo Oswaldo Cruz, PR.

Aos colegas do mestrado.

A todos os amigos dos laboratórios do NUPEB.

A Cida, um amor de pessoa, pela generosidade e carinho.

À minha família: avós, tios e primos, obrigada pelo carinho, confiança e incentivo.

Ao CNPq, FAPEMIG e CAPES, pelo financiamento e apoio dado para que este trabalho fosse realizado.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse concretizado. Obrigada!

<u>SUMÁRIO</u>

LISTA DE FIGURASix
LISTA DE TABELAS xvii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS xviii
RESUMO xxi
ABSTRACT xxii
1. Introdução1
1.1. Aspectos Gerais2
1.2. Ciclo de vida do parasito e patologia da esquistossomose3
1.3. Regulação da expressão gênica em <i>S. mansoni</i> 7
1.4. Modificação pós-traducional de proteínas10
1.5. Proteína Ubiquitina – símile: Small Ubiquitin Modifier (SUMO)
1.6. Via de conjugação de SUMO aos seus substratos alvo: o processo de sumorilação13
1.7. Enzima E1 ativadora (Aos1/Uba2)14
1.8. Enzima E2 conjugadora (Ubc9)15
1.9. SUMO E3 ligases16
1.10. Proteases específicas de SUMO18
1.11. Proteínas modificadas por SUMO20
2. Objetivos
2.1. Objetivo Geral
3. Materiais e Métodos26
3.1. Obtenção dos parasitos27
3.1.1. Manutenção do ciclo de vida de <i>S. mansoni</i>
3.2. Análise da expressão gânica por aRT_PCR (<i>Peal Time</i>) 29
3.2.1 Extração do RNA total
3.2.2. Oligonucleotídeos iniciadores
3.2.3. RT-PCR e obtenção dos cDNAs
3.2.5. Reação da PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)
3.2.5. Curva de eficiência dos iniciadores32
3.2.6. Curva de dissociação dos <i>amplicons</i> 35
3.3. Análise estatística
3.4. Expressão heteróloga das proteínas: SmUbc9, SmPIAS e SmRanBP2

3.4.1. Vetor de clonagem	
3.4.2. Desenho de iniciadores e amplificação	
3.4.3. Purificação de produtos de amplificação	
3.4.4. Transformação de bactérias cálcio competentes	
3.4.4.1 Preparo de células cálcio competentes	
3.4.4.2 Transformação por choque térmico	
3.4.5. Expressão das proteínas recombinantes em <i>E. coli</i>	
3.4.6. Purificação das proteínas heterólogas	
3.5. Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE)	40
3.6. Confirmação da identidade da proteína por espectrometria de massa	40
3.7. Produção de anticorpos policlonais	41
3.8. Preparação do extrato protéico bruto das fases de vermes adultos, cercárias e	
esquistossömulos	
3.9. Western blot para detecção da proteína SmUbc9 e dos conjugados sumorilados	s em extratos
protéicos totais de vermes adultos, cercárias e esquistossômulos	
4. Resultados	
4.1. Genes da maquinaria de sumorilação são diferencialmente expressos em S. ma	nsoni 44
4.2. Clonagem de SmUbc9, SmPIAS e SmRanBP2 em vetor pDEST17 pela tecnologia	Gateway [®] 50
4.3. Obtenção de SmUbc9 e SmPIAS recombinantes	52
4.4. Perfil de expressão de SmUbc9 em <i>S. mansoni</i>	54
4.5. Padrão de expressão de SmPIAS em esquistossômulos de 3,5 horas	55
4.6. Conjugados sumorilados diferencialmente expressos durante o ciclo de vida do) parasito 56
5. Discussão	58
6. Conclusões	73
7. Perspectivas	75
8. Referências Bibliográficas	77
9. Anexos	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Esquistossomose mansônica e sua distribuição mundial. http://www.path.cam.ac.uk/~schisto/schistosoma/map.mansoni.gif.

Figura 02: Ciclo de vida do S. *mansoni.* Dentro do seu hospedeiro vertebrado, as formas larvais (esquistossômulo, A) dão origem a parasitos sexualmente maduros (verme adulto, B), os quais se acasalam e produzem ovos (C) que são liberados para o meio aquático. Os ovos eclodem e liberam os miracídios (D), que penetram nos caramujos, dando origem a numerosos esporocistos (E). Os esporocistos geram cercárias (F) que saem do caramujo e são liberados na água, as quais são as formas infectantes para o hospedeiro vertebrado (VERJOVSKI-ALMEIDA e cols., 2003).

Figura 03: Expressão gênica em *S. mansoni.* Genes altamente expressos e perfil estágio-específico baseado nos projetos transcriptoma do parasito (HAN e cols., 2009).

Figura 04: Desenho esquemático comparativo mostrando as estruturas primárias e terciárias de ubiquitina, SUMO1 e SUMO2/3. Sumo1 apresenta 18% e 50% de identidade com ubiquitina e com SUMO2/3, respectivamente. Porém, a estrutura tridimensional é bastante similar. Adaptado de Melchior (2007).

Figura 05: Desenho esquemático mostrando as enzimas envolvidas na conjugação de SUMO a seus substratos alvo. O mecanismo envolve a ação sequencial de três classes de enzimas: E1 ativadora, E2 conjugadora e E3 ligase. Já o processo reverso é realizado por apenas uma classe de enzimas, as SENPs que também são responsáveis pelo processamento de SUMO. Adaptado de Melchior (2007).

Figura 06: Representação esquemática de reações catalisadas por Ulp/SENPs. Processamento, desconjugação e edição da cadeia de SUMO. Adaptado de Mukhopadhyay e Dasso (2007). Figura 07: Substratos de SUMO nos diversos compartimentos celulares. A proteína SUMO realiza suas funções modificando importantes proteínas majoritariamente no núcleo, mas também podendo sumorilar substratos citoplasmáticos. Adaptado de Melchior (2007).

Figura 08: Esquistossômulos obtidos por cultivo in vitro. Os esquistossômulos foram cultivados por dois dias em estufa de CO₂ 5% a 37°C em meio 169 e analisados em lupa de aumento.

Figura 09: RNA total obtido a partir de formas evolutivas do *S. mansoni.* O RNA total foi obtido utilizando o kit SV40 a partir de vermes adultos (1), cercárias (2), esquistossômulos com 3,5 horas de cultivo *in vitro* (3); esquistossômulos com 1 dia de cultivo *in vitro* (4); esquistossômulos com 2 dias de cultivo *in vitro* (5); esquistossômulos com 3 dias de cultivo *in vitro* (6); esquistossômulos com 5 dias de cultivo *in vitro* (7) e esquistossômulos com 7 dias de cultivo *in vitro* (8).

Figura 10: *Plot* de amplificação referente à curva de eficiência do gene alfatubulina. Em X está demonstrado o valor dos ciclos de PCR e em Y os valor de Δ Rn. Foi utilizado cDNA de cercária e uma diluição seriada de 4 vezes.

Figura 11: Curva padrão referente ao gene alfa-tubulina. Em X estão demonstrados os valores de Log da concentração de cDNA e em Y os valores de C_T correspondes a cada diluição. Os valores de *slope* e de coeficiente de linearidade estão representados a direita do gráfico. Foi utilizado cDNA de cercária e uma diluição seriada de 4 vezes.

Figura 12. Desenho dos vetores de clonagem e expressão em *E. coli.* (A) pDONRTM221 - Em destaque o sítio RFA de inserção do gene com os adaptadores attP1 e attP2 que permitem a recombinação com os adaptadores attB1 e attB2 do gene. B) pDESTTM17 - destacando as principais características do vetor, como o promotor T7, a sequência codificadora de 6 histidinas, sítios attR de recombinação com os sítios attL dos clones de entrada, gene de seleção ccdB. Fonte: Catálogo *Gateway*® *Tecnology Invitrogen* (2006).

Figura 13: Expressão relativa do gene *Smsmt3* em *S. mansoni*. A expressão de *Smsmt3* foi avaliada nos estágios de cercárias, esquistossômulos mecanicamente

transformados (MTS-3,5 horas, MTS-1 dia, MTS-2 dias, MTS-3 dias, MTS-5 dias, MTS-7 dias) e vermes adultos. Como gene constitutivo foi utilizado *a-tubulina* e a expressão gênica relativa, determinada pelo método do $2^{-\Delta Ct}$. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de Tukey com P<0,05 no programa GraphPad Prism. As diferenças estatísticas entre os estágios foram determinadas pelos sinais: * diferente de verme adulto, ** diferente de cercária, *** diferente de MTS-3,5 horas, [#] diferente de MTS-1 dia, ^{##} diferente de MTS-2 dias e ^{###} diferente de MTS-3 dias. Os resultados foram multiplicados por 10².

Expressão relativa dos genes Figura 14: Smaos1 Smuba2 е no desenvolvimento de S. mansoni. A expressão destes genes foi avaliada nos estágios de cercárias, esquistossômulos mecanicamente transformados (MTS-3,5 horas, MTS-1 dia, MTS-2 dias, MTS-3 dias, MTS-5 dias, MTS-7 dias) e vermes adultos. Como gene constitutivo foi utilizado α -tubulina e a expressão gênica relativa foi determinada pelo método do 2^{-ΔCt}. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de Tukey com P<0,05 no programa GraphPad Prism. As diferenças estatísticas entre os estágios foram determinadas pelos sinais: * diferente de verme adulto, ** diferente de cercária, *** diferente de MTS-3,5 horas, # diferente de MTS-1 dia, ## diferente de MTS-2 dias e ### diferente de MTS-3 dias. Os resultados foram multiplicados por 10².

Figura 15: Expressão relativa do gene *Smubc9* no desenvolvimento de *S. mansoni.* A expressão deste gene foi avaliada nos estágios de cercárias, esquistossômulos mecanicamente transformados (MTS-3,5 horas, MTS-1 dia, MTS-2 dias, MTS-3 dias, MTS-5 dias, MTS-7 dias) e vermes adultos. Como gene constitutivo foi utilizado *a-tubulina* e a expressão gênica relativa foi determinada pelo método do $2^{-\Delta Ct}$. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de Tukey com P<0,05 no programa GraphPad Prism. As diferenças estatísticas entre os estágios foram determinadas pelos sinais: * diferente de verme adulto, ** diferente de cercária, *** diferente de MTS-3,5 horas, [#] diferente de MTS-1 dia, ^{##} diferente de MTS-2 dias e ^{###} diferente de MTS-3 dias. Os resultados foram multiplicados por 10².

Figura 16: Expressão relativa dos genes Smpias e Smranbp2 no desenvolvimento de S. mansoni. A expressão destes genes foi avaliada nos

estágios de cercárias, esquistossômulos mecanicamente transformados (MTS-3,5 horas, MTS-1 dia, MTS-2 dias, MTS-3 dias, MTS-5 dias, MTS-7 dias) e vermes adultos. Como gene constitutivo foi utilizado α -tubulina e a expressão gênica relativa foi determinada pelo método do 2^{- Δ Ct}. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de Tukey com P<0,05 no programa GraphPad Prism. As diferenças estatísticas entre os estágios foram determinadas pelos sinais: * diferente de verme adulto, ** diferente de cercária, *** diferente de MTS-3,5 horas, [#] diferente de MTS-1 dia, ^{##} diferente de MTS-3 dias, [&] diferente de MTS-5 dias e ^a diferente de PIAS. Os resultados foram multiplicados por 10².

Figura 17: Expressão relativa dos genes *Smsenp1* e *Smsenp7* no desenvolvimento de *S. mansoni*. A expressão destes genes foi avaliada nos estágios de cercárias, esquistossômulos mecanicamente transformados (MTS-3,5 horas, MTS-1 dia, MTS-2 dias, MTS-3 dias, MTS-5 dias, MTS-7 dias) e vermes adultos. Como gene constitutivo foi utilizado α -tubulina e a expressão gênica relativa foi determinada pelo método do 2^{- Δ Ct}. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de Tukey com P<0,05 no programa GraphPad Prism. As diferenças estatísticas entre os estágios foram determinadas pelos sinais: * diferente de verme adulto, ** diferente de cercária e *** diferente de MTS-3,5 horas. Os resultados foram multiplicados por 10².

Figura 18: Análise dos produtos de RT- PCR correspondentes aos genes *Smpias, Smranbp2 e Smubc9*. Cerca de 10 μ L da reação de RT-PCR, realizada como descrito em Material e Métodos, foram analisados em gel de agarose 1,2%-TBE e corados com brometo de etídeo. (PM) padrão de peso molecular em pb; (1) SmPIAS; (2) SmRanBP2 e (3) SmUbc9. PM-1kb = padrão de massa molecular *1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen*); os sítios attB aumentam em torno de 32 nucleotídeos.

Figura 19: Análise da purificação dos *amplicons* correspondentes aos genes *Smpias, Smranbp2* e *Smubc9* obtidos por RT-PCR. Cerca de 2 μL da purificação, foram analisados em gel de agarose 1,2%- TBE e corados com brometo de etídeo. (PM) padrão de peso molecular em pb; (1) SmPIAS; (2) SmRanBP2 e (3) SmUbc9. PM-1kb = padrão de pares de base *1 kb Plus DNA Ladder* (*Invitrogen*); os sítios attB aumentam em torno de 32 nucleotídeos.

Figura 20: Minepreparação de DNA plasmidial e confirmação da clonagem por PCR dos plasmídeos. Em (A) DNA plasmidial obtido de *E. coli* analisados em gel de agarose 0,8%- TBE, onde (PM) padrão de massa molecular em pb; (2) pDEST 17 + SmPIAS e (3) pDEST 17 + SmRanBP2, (4) pDEST 17 + SmUbc9. Em (B) RT-PCR de colônia em gel de agarose 1,2%- TBE, onde (PM) padrão de peso molecular em pb; (1) SmPIAS; (2) SmRanBP2 e (3) SmUbc9.

Figura 21: Expressão de SmUbc9 e SmPIAS pela plataforma Gateway®. (1-PM) Massa molecular BenchMark (Invitrogen); (2,5,8) Extrato protéico total de *E. coli* antes da indução por IPTG 1 mM; (3,6,9) Fração de proteínas solúveis de *E. coli* induzidas por IPTG 1 mM ; (4,7,10) Fração de proteínas insolúveis de *E. coli* induzidas por IPTG 1 mM. As frações são das proteínas SmPIAS, SmRanBP2 e SmUbc9, respectivamente. Cerca de 20 µL de cada fração foram analisados em SDS-PAGE 12% e corados com *coomassie blue*.

Figura 22: Purificação das proteínas recombinantes SmUbc9 e SmPIAS. Três eluições obtidas na purificação das proteínas SmPIAS e SmUbc9. Cerca de 20 µL de cada fração foram analisados em SDS-PAGE 12% e corados com *coomassie blue*. Legenda: proteína SmPIAS purificada (1,2,3- frações purificadas) e a proteína SmUbc9 purificada (4,5,6- frações purificadas) e padrão de massa molecular (7-BenchMark- Invitrogen).

Figura 23: Confirmação da identidade por espectrometria de massa. A proteína SmUbc9 recombinante foi comparada com a proteína SmUbc9 do banco de dados (Smp_103710), demonstrando uma identidade de 100% e cobertura de 58%. Em destaque, sublinhado e em vermelho, estão os peptídeos gerados pela análise em espectrofotômetro de massas.

Figura 24: Perfil de expressão de SmUbc9. (A) Cerca de 50 µg de proteínas totais foram fracionados em gel de poliacrilamida 12%, transferidos para membrana de PVDF, incubados com anticorpo anti-Ubc9 de rato e revelado com NBT/BCIP. (B) Os níveis de expressão relativa foram obtidos pela análise densitométrica das bandas utilizando o programa *Quantity one*® (Bio-Rad). Como normalizador foi utilizado anticorpo anti- β -actina de coelho. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de Tukey com P<0,05 no programa GraphPad Prism. Os níveis de expressão

relativa de Ubc9 foram verificados nos seguintes os estágios: cercária, MTS-3,5 horas, MTS-1d, MTS-2d, MTS-3 dias e verme adulto. As diferenças estatísticas entre os estágios foram determinadas pelos sinais: * diferente de cercária, ** diferente de MTS-3,5 horas, *** diferente de MTS-1 dia, [#] diferente de MTS-2 dias e ^{##} diferente de MTS-3 dias. Os resultados foram multiplicados por 10².

Figura 25: Perfil de SmPIAS em MTS-3,5 horas. Cerca de 50 µg de proteínas totais foram fracionados em gel de poliacrilamida 12%, transferidos para membrana de PVDF, incubados com anticorpo anti-PIAS de rato e revelado com NBT/BCIP.

Figura 26: Perfil de proteínas sumoriladas em *S. mansoni.* Cerca de 50 µg de proteínas totais foram fracionados em gel de poliacrilamida 12%, transferidos para membrana de PVDF, incubados com anticorpo anti-SUMO de coelho e revelado com NBT/BCIP. Legenda: 1- verme adulto, 2- MTS-7d, 3- MTS-5d, 4- MTS-3d, 5- MTS-2d, 6- MTS-1 dia, 7- MTS-3,5 horas e 8- cercária.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Meio 169 com seus componentes e concentração.

Tabela 2: Número de acesso das sequências e iniciadores *forward* (F') e *reverse* (R') referentes aos genes avaliados.

Tabela 3: *Slope*, eficiência e R² dos iniciadores utilizados avaliado através de uma curva de eficiência.

Tabela 4: Iniciadores para clonagem na plataforma Gateway®.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- **ATP:** Adenosina trifosfato
- BCIP: 5-bromo-4-cloro-3 indolil-fosfato
- CBP: do inglês, Creb Binding Protein
- ChIP: Imunoprecipitação de cromatina
- D.O: Densidade optica
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- DNA: Ácido desoxirribonucléico
- DNase: Desoxirribonuclease
- dNTP: Desoxirribonucleosídeos trifosfatados
- **DTT:** Dithiothreitol
- E1: Enzima Ativadora
- E2: Enzima Conjugadora
- E3: Enzima Ligase
- ESTs: do inglês, Expressed Sequence Tags
- FAT10: do inglês, F-Adjacent Transcript-10
- **GO:** Gene Ontology
- HDACs: Histonas deacetilases
- HECT: do inglês, Homologous to E6-AP C-Terminus Domain
- HSF1: fator de transcrição de choque térmico
- **IPTG:** Isopropil-β-D-tiogalactosídeo
- IR: do Inglês, Internal Repeat
- ISG15: do inglês, Interferon-Stimulated Gene-15
- miRNA: microRNAs

MTS: do inglês Mechanically Transformed Schistosomula

NBT: Nitrobluetetrazolium

NCBI: do inglês, National Center for Biotechnology Information

NEDD8: do inglês, **N**eural Precursor Cell-**E**xpressed **D**evelopmentally **D**ownregulated-**8**

NIH: National Institutes of Health

ORESTES: do inglês, Open Reading Frame Expression Sequence Tags

ORF: do inglês, Open Read Frame

PCR: do inglês, Polymerase Chain Reaction

PcG: Polycomb

PIAS: do inglês, Protein Inhibitor of Activated STAT

Pfam: do inglês, Protein Family Database

PTM: Modificação pós-traducional

qRT-PCR: do inglês, Quantitative Reverse Transcription PCR

RanBP: do inglês, Ran Binding Protein

RING: do inglês, Really Interesting New Gene

RT-PCR: do Inglês, Reverse Transcriptase PCR

SC: do Inglês Sinergy Control

SCF: do Inglês, SKP1-Cullin-F Box

SENPs: do inglês, Sentrin Specific Protease

SIM: do Inglês, SUMO Interaction Motif

Sm: Schistosoma mansoni

STUbLs: SUMO-targeted Ubiquitin Ligases

SUMO: do Inglês, Small Ubiquitin-Related Modifier

TIGR: The Institute for Genomic Reasearch

Tris: Tris-hidroximetilaminometano
Uba: do Inglês, Ubiquitin Activating
Ubc: do Inglês, Ubiquitin-Conjugating Enzyme
Ubl: do Inglês, Ubiquitin-Like
Ulp: do Inglês, Ubiquitin-Like Protease
WHO: World Health Organization

RESUMO

A conjugação de SUMO aos substatos alvo ocorre através de um mecanismo análogo ao da ubiquitina, pela ação sequencial de três classes de enzimas: E1 ativadora (Aos1-Uba2), E2 conjugadora (Ubc9) e E3 ligases (PIAS, Polycomb2 e RanBP2). SUMO é sintetizada como um precursor inativo, que requer processamento por proteases específicas (SENPs). A conjugação de SUMO é uma modificação reversível e transitória. As mesmas enzimas que convertem SUMO em sua forma madura também catalisam a clivagem dos seus substratos. A reconstituição da via de sumorilação em Schistosoma mansoni, baseado em busca por homologia utilizando banco de dados disponíveis, mostra a existência de 9 genes envolvidos com esta via: dois genes para SUMO (Smsmt3b/c), um para E1 (Smaos1-uba2), um para E2 (Smubc9), dois para E3 (Smpias e Smranbp2) e dois para SENPs (Smsenp1/7). Neste trabalho, os níveis de expressão destes genes foram quantificados utilizando o método de qRT-PCR e RNA total obtidos a partir de cercária, verme adulto e esquistossômulos de 3,5 horas a 7 dias de cultivo in vitro (MTS). Os resultados evidenciaram um padrão de expressão gênica diferencial para todos os genes analisados. Vale ressaltar que os níveis de transcritos foram 3 vezes maiores em MTS-3,5h quando comparado com cercária e verme adulto. Os níveis de SmUbc9 foram analisados por Western blot, utilizando anticorpos policionais específicos para a proteína de S. mansoni produzidos utilizando a proteína recombinante. Os resultados sugerem níveis equivalentes da SmUbc9 nos estágios analisados. O perfil de substratos sumorilados foi determinado utilizando a técnica de Western blot usando anti-SUMO. Foi observado um perfil estágio-específico de conjugados sumorilados e um aumento nos estágios iniciais do desenvolvimento dos esquistossômulos. Estes dados demonstram que os constituintes da via de sumorilação são diferencialmente expressos, sugerindo um perfil estágio-específico durante a transição cercária-esquistossômulo. Considerando que esta transição não é controlada por uma síntese real de proteínas, esses resultados em conjunto, sugerem que a via de modificação pós-traducional dependente de SUMO pode regular processos biológicos importantes durante esse período do ciclo biológico do parasito.

ABSTRACT

Attachment of SUMO to target proteins occur through by similar mechanism to ubiquitination, with sequential action of three enzymes: E1 activating (Aos1-Uba2), E2 conjugation (Ubc9) and E3 ligases (PIAS, Polycomb2 and RanBP2). SUMO is synthesized as inactive precursors that require processing by specific proteases (SENPs). SUMO attachment is a reversible and transient modification. The same enzymes that convert SUMO to its mature form also catalyse the cleavage from their substrates. Reconstitution of SUMOylation pathway in Schistosoma mansoni, based on homology search using available databases, shown the existence of nine genes related with SUMOylation: two genes to SUMO (Smsmt3b/c), one to E1 (Smaos1uba2), one to E2 (Smubc9), two to E3 (Smpias e Smranbp2) and two to SENPs (Smsenp1/7). In this work, the expression levels of these genes was quantified by qRT-PCR and total RNA obtained from cercariae, adult worm and mechanically transformed schistosomula cultivated from 3.5 h to 7 days in vitro (MTS). The results revealed differential gene expression profile to all analyzed genes. We also observed that the transcripts levels were 3 times higher in MTS-3,5h when compared with cercariae and adult worm. The SmUbc9 levels were analysed by Western blot, using specific polyclonal antibodies to S. mansoni protein produced using recombinant protein. The results suggest equivalent levels of SmUbc9 in the same evolutive stages analysed. The SUMOylated substrates profile was detected by Western blot using anti-SUMO. We observed a stage-specific profile of SUMOylated conjugated and an accumulation in initial stages of schistosomula development. These data demonstrate that SUMOylation pathway components are differentially expressed in S. mansoni, suggesting a stage-specific profile during cercariae-schistosomula transition. Whereas this transition is not controlled by real protein synthesis whole results suggest that posttranslational modification SUMO dependent could regulate important biological process during this period of parasite life-cycle.

1. Introdução

1.1. Aspectos Gerais

O encontro de ovos de *Schistosoma* em múmias egípcias e chinesas datadas de 3.500 antes de Cristo mostra o quanto antiga é a esquistossomose (AMARAL & PORTO, 1994). O gênero *Schistosoma* foi descrito primeiramente por Bilharz em 1852, que denominou o gênero deste helminto de *Schistosoma*, uma vez que o macho apresenta no corpo uma fenda longitudinal (*schisto=*fenda; *soma=*corpo), conhecido como canal ginecóforo, local onde a fêmea permanece alojada para que a fecundação ocorra. Entretanto a denominação da espécie *Schistosoma mansoni* foi dada por Sambon em 1907. Estudos de Pirajá da Silva na Bahia, realizados na mesma época, contribuíram muito para a confirmação que o *S. mansoni* produzia ovos, habitava as veias mesentéricas e tratava-se de uma espécie distinta (NEVES, 2005).

O parasito *S. mansoni* é o causador da esquistossomose mansônica humana, popularmente conhecida como "Barriga d'água", "Xistose" ou "Mal do Caramujo". A esquistossomose possui uma ampla distribuição geográfica, sendo uma das parasitoses humanas mais difundidas pelo mundo. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, mais de 200 milhões de pessoas são afetadas em todo o mundo e estima-se que mais de 1,53 milhões de pessoas estão incapacitadas devido à doença (Figura 01). Entre estes, 10% apresentam a forma severa da doença e de 50 a 60% das pessoas infectadas, representando em torno de 100 milhões de indivíduos, exibem manifestações clínicas da doença, constituindo um sério problema de saúde pública (WHO, 2008). Também vale destacar que, anualmente, ocorrem de 250 a 500 milhões de pessoas estão em risco de contaminação.

No Brasil devido ao clima tropical existem condições favoráveis à sua transmissão, constituindo então, em um importante problema de saúde pública, especialmente nas regiões nordeste e sudeste do país (KATZ, 2003; MELO & COELHO, 2005).

Acredita-se que a introdução desta helmintíase no território brasileiro tenha ocorrido durante o tráfico de escravos originários da África, tendo início, portanto, em Recife e Salvador. A migração de indivíduos dessas áreas endêmicas contribuiu para a disseminação desta parasitose em áreas até então indenes, onde as precárias condições sanitárias favoreceram o contato das fezes de indivíduos infectados com hospedeiros intermediários susceptíveis (ARAÚJO, 1986; PARAENSE, 1986; AMARAL & PORTO, 1994). Considera-se como área endêmica a região que compreende o estado do Maranhão até o Espírito Santo, incluindo Minas Gerais. Observam-se também focos isolados no Distrito Federal e nos estados do Pará, Piauí, Goiás, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

As três espécies que melhor se adaptaram ao parasitismo humano são: *S.mansoni*, encontrada nas Américas Central e do Sul e na África; *S. hematobium*, encontrada na África e Oriente Médio; *S. japonicum*, encontrada na China, Japão e nas Filipinas (BRINDLEY, 2005; MELO & COELHO, 2005).



Figura 01: Esquistossomose mansônica e sua distribuição mundial. http://www.path.cam.ac.uk/~schisto/schistosoma/map.mansoni.gif.

1.2. Ciclo de vida do parasito e patologia da esquistossomose

O S. mansoni é um trematódeo do gênero Schistosoma, família Schistosomatidae, classe Trematóda e sub-classe Digenea, possuindo um ciclo biológico do tipo heteroxênico, com acentuado dimorfismo sexual, diferentes estágios de desenvolvimento e duas formas aquáticas. O parasito apresenta um ciclo biológico complexo envolvendo uma passagem por um hospedeiro invertebrado, representado por moluscos do gênero *Biomphalaria*, e um habitat permanente no hospedeiro definitivo, representado pela espécie humana (REY, 1991). Durante o ciclo de vida de S. mansoni, ocorrem diversas mudanças estruturais, fisiológicas e bioquímicas no parasito devido às adaptações sofridas em diferentes meios como a água e o ambiente interno de seus hospedeiros.

O ciclo evolutivo do parasito, como demonstrado na Figura 02, apresenta uma fase sexuada no hospedeiro vertebrado e uma assexuada no hospedeiro

Introdução

invertebrado. O ciclo se inicia quando a fêmea deposita seus ovos imaturos e espiculados no sistema porta-hepático. Estes ovos se desenvolvem, uma parte se aloja nos tecidos, especialmente no fígado induzindo a formação do granuloma e outra parte atinge o lúmen intestinal, e posteriormente são eliminados com as fezes, que em contato com a água doce eclodem estimulados pela temperatura, luz intensa e oxigenação, liberando a forma larval denominada miracídio. Este, por sua vez, nada ativamente a procura do hospedeiro intermediário susceptível. No Brasil, os hospedeiros intermediários de maior interesse são os caramujos das espécies: B. glabrata, B. tenagophila e B. straminea, dos guais o B. glabrata é o mais importante do ponto de vista epidemiológica (COURA & AMARAL, 2004; MELO & COELHO, 2005). Os mecanismos envolvidos no reconhecimento do caramujo, de acordo com alguns relatos, são controlados por dois tipos de respostas. Primeiro, o miracídio responderia a estímulos físicos do ambiente e, segundo aos estímulos químicos originados pelo molusco (KAPP e cols., 2003). Imediatamente após penetrar na hemocele do caramujo, o miracídio sofre metamorfose, tornando-se esporocistomãe. A segunda geração, que consiste de numerosos esporocistos-filhos, desenvolve-se por multiplicação assexuada. Estes, por sua vez, migram pelo sistema hemolinfático até atingirem o hepatopâncreas e gônadas do hospedeiro intermediário, onde por reprodução assexuada, originam as formas de vida livre, conhecidas como cercárias, aproximadamente 30 dias após a infecção.

Após deixarem o molusco, as cercárias, devido ao fototropismo, nadam por movimentação da cauda e permanecem agrupadas em águas rasas, onde têm um contato máximo com o hospedeiro vertebrado. Em contato com a pele humana, as cercárias respondem a sinais químicos como os ácidos graxos de cadeia média e penetram na pele por ação mecânica e enzimática (McKERROW & SALTER, 2002).

As cercárias possuem três tipos de glândulas com vesículas secretórias: as glândulas acetabulares, a glândula da cabeça e os corpos celulares sub tegumentares, cada uma delas com função na invasão do hospedeiro ou na transformação do parasito (CURWEN & WILSON, 2003). As cercárias penetram ativamente através da secreção de enzimas digestivas e este processo leva apenas alguns minutos. Após a penetração, as cercárias perdem a cauda, e algumas horas depois completam a metamorfose transformando-se em esquistossômulos. Estes últimos permanecem na pele pelo menos durante 48 horas antes de migrar para o

4

sistema porta-hepático. Estes migram através da corrente sanguínea, atingem o coração e o pulmão e, em seguida, o fígado. No sistema porta-hepático, ocorre o desenvolvimento dos parasitos até a fase de vermes adultos, a maturação, o acasalamento e o início da ovoposição (NEVES, 2005). Um casal de vermes adultos ovopõem cerca de 300-1000 ovos/dia. Alguns ovos permanecem na circulação, podendo atingir órgãos, como os pulmões, medula óssea, rim, baço, coração, e especialmente o fígado. Os demais se movem progressivamente até atingir o lúmen intestinal, sendo eliminados junto às fezes (WILSON, 1980).



Figura 02: Ciclo de vida do *S. mansoni.* Dentro do seu hospedeiro vertebrado, as formas larvais (esquistossômulo, A) dão origem a parasitos sexualmente maduros (verme adulto, B), os quais se acasalam e produzem ovos (C) que são liberados para o meio aquático. Os ovos eclodem e liberam os miracídios (D), que penetram nos caramujos, dando origem a numerosos esporocistos (E). Os esporocistos geram cercárias (F) que saem do caramujo e são liberadas na água, as quais são as formas infectantes para o hospedeiro vertebrado (VERJOVSKI-ALMEIDA e cols., 2003).

A patogenia da esquistossomose depende de vários fatores, dos quais podemos destacar: a carga parasitária, a linhagem do parasito, as características do

Introdução

hospedeiro, isto é, a imunidade, o estado nutricional e a idade. As características marcantes desta patologia em longo prazo são: hipertensão portal, esplenomegalia e ascite. O ovo é o principal fator patogênico na esquistossomose (STADECKER, 1992). Dos ovos depositados na parede intestinal, 30% são eliminados nas fezes. O restante permanece retido nas paredes do intestino e no parênquima hepático, sendo responsáveis pela reação inflamatória granulomatosa nos tecidos. Os ovos liberam antígenos solúveis, e por isso ao se fixarem em tecidos, como o fígado e intestino, desencadeiam uma reação inflamatória granulomatosa ao seu redor, podendo resultar em fibrose, hipertensão portal, varizes esofagianas ou retais, hemorragia e óbito. A fase inicial da formação do granuloma é caracterizada por uma grande migração de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos em torno da região de necrose causada pelo ovo. Com o tempo esta área de necrose desaparece, havendo produção de colágeno e fibrosamento (COSTA-CRUZ e cols., 2004; MELO & COELHO, 2005). A severidade dos sintomas pode ser relatada tanto através da intensidade da infecção como da resposta imune individual (GRYSEELS e cols., 2006).

O desenvolvimento do *S. mansoni* ocorre como resultado da expressão coordenada de um conjunto de genes distintos, necessários para as alterações bioquímicas e adaptações morfológicas observadas durante o ciclo de vida. Desta forma, os conhecimentos dos genes e dos mecanismos que controlam as suas expressões permitirão uma melhor compreensão de como o parasito está programado para viver em ambientes tão distintos (HAN e cols., 2009).

Um dos aspectos mais fascinante da biologia do *S. mansoni* é o fato do parasito sobreviver por vários anos exposto aos mecanismos imunológicos do hospedeiro sem apresentar dano aparente. Isso pode ser atribuído, em parte, à expressão diferencial de antígenos que ocorre durante a maturação do verme, bem como ao desenvolvimento de uma dupla membrana externa, constantemente renovada (HOCKLEY, 1973; WILSON & BARNES, 1974; SNARY e cols., 1980). Outros mecanismos parecem também implicados na evasão da resposta imune. Assim, a aquisição de proteínas do hospedeiro como: 1) antígenos dos grupos sanguíneos (GOLDRING e cols., 1976), 2) antígenos do complexo principal de histocompatibilidade I e II (SHER e cols., 1978), 3) proteínas inativadoras do sistema complemento (PEARCE e cols., 1990), bem como a síntese de algumas proteínas

6

que bloqueiam a ação de determinados componentes imunitários (LACLETTE e cols., 1992; GHENDLER e cols., 1994; PARIZADE e cols., 1994) parecem ser utilizadas pelo parasito como estratégia de defesa. Claramente, o parasito desenvolveu mecanismos de evasão à resposta imune do hospedeiro. Assim, eles secretam produtos que favoravelmente enganam ou suprimem a resposta imune do hospedeiro e se protegem com uma barreira refratária à imunidade chamada de tegumento (VAN HELLEMOND e cols., 2006).

O principal fator na patogênese da esquistossomose é decorrente da formação granulomatosa em resposta aos antígenos solúveis dos ovos e do parasito (MATHEW & BOROS, 1986; LEPTAK & McKERROW, 1997).

1.3. Regulação da expressão gênica em S. mansoni

O parasito *S. mansoni*, apresenta um genoma estimado em 363 Mega bases com 11890 genes, organizado em oito pares de cromossomos sendo sete pares autossômicos e um par de cromossomos sexuais com um conteúdo de GC de 34%. Os machos são homogaméticos (ZZ) e as fêmeas heterogaméticas (ZW) (TANAKA, 1995; BERRIMAN e cols., 2009). As iniciativas de sequenciamento do genoma completo do parasito *S. mansoni* ainda estão em andamento com projetos financiados pelo *National Institutes of Health* (NIH) no instituto TIGR (*The Institute for Genomic Reasearch*, Rockville, MD, USA), por uma iniciativa brasileira, a Minas Gerais *Genome Network EST Project* e também pelo *Institute Sanger Center*, financiado pela *Welcome Trust*, UK (EL-SAYED e cols, 2004, BRINDLEY, 2005).

Atualmente, com a disponibilidade de quase 200.000 ESTs, aliado ao projeto genoma do *S. mansoni,* em fase final de conclusão, o Schistosoma integra-se à categoria dos organismos com os quais se podem utilizar técnicas modernas para, por exemplo, identificar genes estágio-específicos, avaliação global dos efeitos causados por drogas sobre o metabolismo do parasito (OLIVEIRA e cols., 2008).

A análise do transcriptoma através da classificação funcional dos transcritos pelo *Gene Ontology* (GO) confirma a presença de genes associados a eucariotos e processos específicos dos metazoários, como diferenciação eixo anterior-posterior, dorso-ventral, epitélio, processo neural, motilidade, diferenciação sexual, maturação, longevidade, parasitismo, evasão imune e resposta a estresse. Além disso, genes envolvidos com o controle da expressão gênica e a diferenciação ficaram

Introdução

evidenciados sugerindo sua implicação no nível de silenciamento da cromatina (VERJOVSKI e cols., 2003).

Neste contexto, estudos demonstraram que 28 genes analisados possuem a característica de estarem envolvidos, na sobrevida do parasito, e também são expressos na superfície da célula ou apresentam a característica de serem secretáveis, e são exclusivamente expressos nos estágios intra-mamífero. Todas essas características os tornam candidatos a vacinas. Outros genes que são expressos exclusivamente na transição cercária- esquistossômulo-verme adulto, e são essenciais para a sobrevivência do parasito se tornam também bons candidatos à vacina (VERJOVSKI e cols., 2004).

Estudos recentes demonstraram uma expressão diferencial de diversos transcritos durante a transição cercária/verme adulto. Análises identificaram que proteínas envolvidas na formação da membrana, na degradação de hemoglobina e na evasão do sistema imune são altamente expressas nesta transição, propiciando crescimento, desenvolvimento e reprodução do parasito. Assim como foi observada também, nesta etapa, uma diminuição dos genes relacionados com respiração aeróbica (HAN e cols., 2009). Sabe-se que essa diferenciação na composição de proteínas específicas entre esses dois estágios para adaptação do parasito aos diferentes meios e hospedeiros está relacionada a alterações na regulação da expressão gênica (Figura 03).

De maneira particular o período de transformação de cercária em esquistossômulo deve ser ressaltado devido a grande mudança no perfil de expressão protéica representado nesta fase. Durante esse período ocorrem várias mudanças morfológicas e bioquímicas como perda da cauda, secreção do conteúdo da glândula acetabular, duplicação da bicamada lipídica da superfície, perda do glicocálix, mudança do núcleo heterocromático para eucromático, intolerância à água e às proteínas da via do complemento do sistema imune e redução no catabolismo do piruvato (RAMALHO-PINTO, 1974; BLANTON e cols., 1987).

8



Figura 03: Expressão gênica em *S. mansoni.* Genes altamente expressos e perfil estágioespecífico baseado nos projetos transcriptoma do parasito (HAN e cols., 2009).

Os mecanismos que coordenam a expressão gênica nos eucariotos são diversos, podendo atuar em vários níveis, desde transcricionais como empacotamento do DNA até pós-traducionais, tais como fosforilação, glicosilação e ubiquitinação que modulam função, localização e estabilidade de diversas proteínas.

Neste trabalho demos ênfase particular ao mecanismo de modificação póstraducional dependente de proteínas.

1.4. Modificação pós-traducional de proteínas

No contexto celular, processos de modificações de pós-traducional, como fosforilação, a glicosilação e a acetilação, controlam vários processos celulares importantes que mantém a homeostase e o funcionamento celular, sendo responsáveis por alterações de função e/ou localização de proteínas e estruturas celulares pré-existentes (JENTSCH & SCHLENKER, 1995). Além de modificações por grupamentos químicos, a regulação da expressão gênica também pode ser realizada por modificações dependentes de proteínas. Dentre elas, destaca-se a ubiquitinação, processo no qual uma proteína denominada ubiquitina se liga a outras proteínas. Essa conjugação está envolvida em diversas funções celulares importantes, tais como, degradação de proteínas, progressão do ciclo celular e regulação da transcrição (COUX e cols., 1998; DEMARTINO & SLAUGHTER, 1999).

A ubiquitina é um protótipo de uma família de proteínas (UBLs) que são caracterizadas pelo duplo resíduo de gilicina na porção C-terminal e pela capacidade de se conjugarem a outras proteínas. Esta proteína, altamente conservada durante a evolução das espécies, possui uma massa estimada de 8000 Da, com 76 resíduos de aminoácidos. A poliubiquitinação da lisina 48 (K48) das proteínas está relacionada com a proteólise citoplasmática dependente de proteassoma. As proteínas monoubiquitinadas na lisina 29 (K29) estão relacionadas com a modulação de receptores de superfície na endocitose (CIECHANOVER & SCHWARTZ,1988).

Por apresentar um papel regulatório no tempo de meia vida de proteínas chaves em células eucarióticas, o sistema de conjugação da ubiquitina tem mostrado exercer importantes papéis numa ampla variedade de processos celulares, tais como, o reparo do DNA (JENTSCH, 1992), controle do ciclo celular (GOEBL e cols., 1988) e resposta ao estresse (SEUFERT e cols., 1990).

A atividade do proteassoma de vermes adultos e cercárias foi analisada depois de serem incubados com os inibidores do proteassoma. Todos os inibidores do proteassoma mostraram uma inibição de cerca de 80% em cercária. Em vermes adultos, a inibição foi cerca de 59% na presença de MG-115. A proteólise endógena também foi verificada e os resultados que mostraram que em cercária, a proteólise endógena aumentou cerca de 1,4 a 2,5 vezes depois da estimulação com ATP com ou sem ubiquitina. A adição de MG132 um peptídeo aldeído inibidor do proteassoma, causou uma redução de 90% e 75% na proteólise endógena,

Introdução

estimulada por ATP e ubiquitina em cercária e vermes adultos, respectivamente (GUERRA-SÁ e cols., 2005).

Recentemente, dados bioquímicos forneceram as primeiras evidências da relação entre a via de ubiquitinação e o CSN, quando se demonstrou a interação do CSN com o complexo E3 ligase SCF (LYAPINA e cols., 2001). Algumas evidências experimentais, também indicam que o CSN interage diretamente com o proteassoma 26S e compete com o complexo 19S, e em excesso molar de CSN ocorre a substituição da tampa do 19S pelo CSN, o que influencia diretamente a atividade peptidásica do proteassoma *in vitro* (HUANG e cols., 2005).

Desta forma, através da análise do banco de dados do transcriptoma e da análise da expressão dos genes que codificam para as subunidades da tampa do proteassoma e do complexo COP9 signalossoma, foi possível sugerir que existe uma regulação diferencial das subunidades da tampa do proteassoma e das subunidades do COP9 em cercárias. Estes resultados aliados aos resultados da diminuição da taxa de proteólise em cercária permitem inferir que os baixos níveis de proteólise em cercária podem sugerir uma montagem alternativa do proteassoma em cercária comparado com os resultados de expressão diferencial dos componentes da base e da tampa do proteassoma e do COP9 signalossoma em cercária e em vermes adultos (CABRAL e cols., 2006).

Modificações dependentes de proteínas semelhantes à ubiquitina também apresentaram grande notoriedade nos últimos anos, sendo alvos de diversos estudos, dentre elas destacam-se SUMO, NEDD8, ISG15 e FAT10. Entre os sistemas que modificam proteínas, a ligação de SUMO aos substratos alvo, processo denominado sumorilação, representa depois da ubiquitinação, o exemplo mais estudado de modificação pós-traducional que envolve interação proteínaproteína (SEELER & DEJEAN, 2003).

1.5. Proteína Ubiquitina – símile: <u>Small Ubiquitin Mo</u>difier (SUMO)

A SUMO é uma proteína que apresenta 18% em similaridade de sequência primária com a ubiquitina, contudo apresenta uma grande similaridade em estrutura tridimensional, como pode ser observado na Figura 04. Pode-se também verificar que a SUMO possui em sua porção carboxi-terminal um duplo motivo de Glicina (GliGli), pelo qual se conjuga aos substratos alvo e uma extensão N-terminal variável de aproximadamente 22 aminoácidos. Em contraste com a ubiquitina, a SUMO1 não é capaz de se conjugar a ela mesma e formar cadeias poli-SUMO (JOHNSON, 2004, MELCHIOR, 2007).

Embora o mecanismo dos processos de ubiquitinação e sumorilação seja semelhante, os alvos modificados, nem sempre são os mesmos. Porém, em alguns casos a sumorilação pode competir com ubiquitinação, visto que podem se ligar ao mesmo resíduo de lisina dos alvos protéicos (SEELER & DEJEAN, 2003). Recentes estudos identificaram as enzimas STUbLs (*SUMO-targeted ubiquitin ligases*), que possuem domínios SIM e RING, e, portanto são capazes de reconhecer e marcar com ubiquitina substratos sumorilados, direncionando-os para degradação via proteassoma 26S(HEIDEKER e cols., 2009; TATHAM e cols., 2008).

A via de sumorilação é conservada e vital em diversos organismos. As espécies *D. melanogaster* e *S. cerevisiae* expressam apenas um gene codificando para SUMO, enquanto que em plantas são expressos oito genes codificando para SUMO (KUREPA e cols., 2002). Em mamíferos SUMO1 está em sua maioria na forma conjugada, enquanto que as duas outras isoformas de SUMO, as proteínas SUMO2 e SUMO3 se apresentam na forma não conjugada, e são sujeitas à conjugação depois de situações de estresse celular (SAITOH e cols., 2000). Relatos recentes apontam para a existência de SUMO4, participando de eventos relacionados a doenças auto-imunes (PEARCE & MERRIMAN, 2006).

SUMO pode se ligar a proteína alvo de duas maneiras distintas, por formação de uma ligação covalente através da ligação sequencial de três classes de enzimas ou por interação não-covalente através do motivo SIM. Este motivo está relacionado com a montagem de complexos transcricionais repressores, porém o mecanismo exato das interações não-covalentes permanece por ser elucidado (GARCIA-DOMINGUEZ & REYES, 2009).



Figura 04: Desenho esquemático comparativo mostrando as estruturas primárias e terciárias de ubiquitina, SUMO1 e SUMO2/3. Sumo1 apresenta 18% e 50% de identidade com ubiquitina e com SUMO2/3, respectivamente. Porém, a estrutura tridimensional é bastante similar. Adaptado de Melchior (2007).

1.6. Via de conjugação de SUMO aos seus substratos alvo: o processo de sumorilação

A conjugação de SUMO aos seus substratos alvo, assim como a ubiquitinação, depende de três enzimas, que são necessárias, para primeiramente ativar o substrato alvo, através de uma enzima do tipo E1, com gasto de energia na forma de ATP. A enzima E1 catalisa a adenilação do motivo Gli-Gli na porção C-terminal de SUMO. A SUMO se liga a E1 de forma não covalente, e então SUMO é transferida ao resíduo de cisteína da enzima E1 para formar uma ligação tiól-éster entre o grupo sulfidrila (-SH) da cisteína e o grupamento – COOH da SUMO. Assim, SUMO é então transferida a Ubc9, a enzima E2, formando uma ligação tiól-éster com o grupamento sulfidrila do sítio ativo de Ubc9. Posteriormente as E3 ligases ligam a SUMO ao substrato auxiliando na ligação ao substrato (JOHNSON & GUPTA, 2001; KAGEY e cols., 2003; KAHYO e cols., 2001; PICHLER e cols., 2002; SACHDEV e cols., 2001; TAKAHASHI e cols., 2001). Desta forma, SUMO é ligada ao substrato através de uma ligação isopeptídica entre a sua porção C-terminal (–

COOH) e um grupamento ε-amino de um resíduo de lisina especifico da proteína alvo (CHEN, 2004).

As vias de ubiquitina e SUMO são vias de conjugação mecanicamente semelhantes, porém as enzimas que participam do processo de ubiquitinação não são as mesmas que participam da sumorilação, como descritas nos itens seguintes (Figura 05).



Figura 05: Desenho esquemático mostrando as enzimas envolvidas na conjugação de SUMO a seus substratos alvo. O mecanismo envolve a ação sequencial de três classes de enzimas: E1 ativadora, E2 conjugadora e E3 ligase. Já o processo reverso é realizado por apenas uma classe de enzimas, as SENPs que também são responsáveis pelo processamento de SUMO. Adaptado de Melchior (2007).

1.7. Enzima E1 ativadora (Aos1/Uba2)

A enzima ativadora de SUMO é um heterodímero consistindo de duas subunidades, ou seja, a subunidade Aos1 de 38 kDa e a subunidade Uba2 de 71 kDa (DOHMEN e cols., 1995, JOHNSON e cols., 1997). Ambas as subunidades são conservadas entre as espécies e, em *S. cerevisiae*, esta proteína é essencial para a viabilidade da levedura. Em levedura, a subunidade Aos1 é 29% idêntica à região N-terminal da E1 de ubiquitina de levedura, enquanto a porção Uba2 apresenta 28%

Introdução

de identidade com os 561 aminoácidos da porção C-terminal da enzima E1 de ubiquitina de levedura. Essas regiões de homologia contêm os dois motivos de ligação a SUMO (um em Aos1 e outro em Uba2) e a sequência consenso do sítio ativo de cisteína, responsável pelas ligações tiól-ésteres, realizadas por essas enzimas, visto que E1 catalisa a adenilação de SUMO, e então forma a ligação tiól-éster com a posterior transferência para a enzima E2 conjugadora (MELCHIOR, 2000; CHEN, 2004).

1.8. Enzima E2 conjugadora (Ubc9)

A enzima conjugadora E2 de SUMO, a proteína Ubc9 é uma proteína bastante conservada entre espécies, e foi primeiramente identificada em mutantes de levedura sensíveis a temperatura (SEUFERT e cols., 1995; WATANABE e cols., 1996). As similaridades entre SUMO e ubiquitina são reforçadas pela notável similaridade entre Ubc9 e a grande família de enzimas conjugadoras de ubiquitina (GIRAUD e cols., 1998; HAS & SIEPMANN, 1997; TONG e cols., 1997).

Apesar de existirem semelhanças entre Ubc9 e as enzimas E2 de ubiquitina, a diferença entre a superfície de cargas entre essas proteínas, torna-se uma diferença muito peculiar e determinante, na especificidade da Ubc9 por SUMO. A superfície de cargas da Ubc9 é positivamente carregada, apresentando um ponto isoelétrico de 8.7, em contraste com o ponto isoelétrico das E2s, mais negativamente carregadas, que apresentam um pI em torno de 6.7 (CHEN, 2004). Esses resultados, explicam a especificidade de Ubc9 por SUMO. Até o momento, Ubc9 é a única enzima capaz de conjugar SUMO aos seus substratos alvo.

Ubc9 representa um ponto crítico na via de SUMO, visto que interage com e catalisa a conjugação de todos os alvos identificados. A sumorilação dos substratos é dependente de uma sequência consenso Ψ KxE (Ψ representa um aminoácido hidrofóbico, K é uma lisina, x é qualquer aminoácido e E representa o aminoácido Glu). Esse motivo foi identificado através da comparação dos sítios de modificação de SUMO1 nas proteínas alvo (DESTERRO e cols., 1997).

A análise da estrutura de mutantes de substratos por espectro de ressonância magnética nuclear, combinada com a análise da cinética de reação da modificação, revelaram que o motivo ΨKxE é onde Ubc9 se liga aos substratos alvos (LIN e cols., 2002). Alguns substratos requerem somente a enzima E2 para conjugação,

15

Introdução

enquanto outros alvos protéicos necessitam da ação das E3 ligases ou de motivos de interação com SUMO (SIM), que são responsáveis pelo aumento da conjugação com o sítio consenso ou redirecionamento da conjugação para sítios não-consenso (LIN e cols., 2006; MEULMEESTER e cols., 2008). Um sítio consenso extendido, ψ-K-x-E-x-x-S-P, foi recentemente identificado em diversas proteínas que são para conjugação com SUMO e quinases dirigidas por prolina (GONG e cols., 2003; KANG e cols., 2006).

Estudos indicam que a Ubc9 realiza suas funções em diferentes compartimentos celulares. Em leveduras, experimentos utilizando a proteína de fusão Ubc9-ßgalactosidase, mostraram que a proteína de fusão estava localizada no interior do núcleo (SEUFERT е cols., 1995). Experimentos utilizando imunoflorescência indireta detectaram Ubc9 endógena no citoplasma, no nucleoplasma e perto do envelope nuclear, de células de mamíferos (MELCHIOR, 2000). Este aglomerado de Ubc9 perto do envelope nuclear está diretamente associado com a modificação de RanGAP1 e RanBP2 (MAHAJAN e cols., 1998). Em adição, recentes evidências indicam que Ubc9 é multifuncional e exerce suas funções independentes da via de sumorilação (LIU e cols., 2007; KAUL e cols., 2002). Estudos recentes demonstraram a importância de Ubc9 no desenvolvimento do câncer e sua regulação em células cancerígenas, sugerindo que esta é mediada por miRNA (WU e cols., 2009).

As outras isoformas de SUMO, ou seja, a SUMO2 e SUMO3 também se ligam a Ubc9 na mesma superfície, onde se liga SUMO1 e com a mesma afinidade (TATHAM e cols., 2003). Este fato está correlacionado com a conservação da superfície de ligação de Ubc9 nos três parálogos, embora SUMO2 e SUMO3 apresentem somente 50% de identidade em sequência de aminoácidos com SUMO1 (SAITOH & HINCHEY, 2000).

1.9. SUMO E3 ligases

A existência de proteínas que funcionam como SUMO E3 ligases, permaneceu desconhecida até a descoberta de que as proteínas Siz1 e Siz2, que são membros da família PIAS (*protein inhibitor of activated STAT*), funcionavam como enzimas que ligavam SUMO aos seus substratos (TAKAHASHI e cols., 2001).
Introdução

Até o momento estão caracterizadas três tipos de proteínas que funcionam como SUMO E3 ligases: Siz-PIAS, Polycomb2 e RanBP2.

O nome Siz é derivado dos nomes dos domínios <u>SAP e Miz</u>, e estes dois domínios estão presentes em todas as proteínas PIAS. A proteína Siz2 foi primeiramente descoberta como um ligante de Cdc12 de levedura em experimentos de duplo-híbrido (STRUNNIKOV e cols., 2001). Depois de alguns meses dessa descoberta, dois grupos anunciaram que Siz1 e Siz2 apresentavam atividade SUMO E3 ligase (JOHNSON & GUPTA, 2001; TAKAHASHI e cols., 2001).

Pelo menos cinco diferentes proteínas PIAS, codificadas por quatro genes distintos, estão descritos em mamíferos. PIAS1 e PIAS3 foram identificadas como ligantes específicos e reguladores negativos dos fatores de transcrição STAT1 e STAT3, respectivamente, e PIASxα, PIASxβ e PIASy foram identificadas por homologia e são derivadas do processamento alternativo do mRNA de PIAS1 e 3 (JOHNSON, 2004). PIAS1 foi independentemente identificada como uma proteína que interage com a proteína Gu/RNAII-helicase, e foi denominada GBP (VALDEZ e cols., 1997). Até o momento não foi elucidado ao certo, quantas variantes oriundas de processamento de RNA, são expressos para cada gene do tipo PIAS.

A função SUMOE3 ligase das proteínas PIAS depende da presença do domínio SP-RING, que é caracterizado como um domínio de 35 aminoácidos com o domínio conservado SAP na porção N-terminal e outro domínio conservado RING na porção central da proteína, sendo o domínio RING responsável pela interação com Ubc9. O domínio RING está presente em das sub-famílias de E3 ligases (PICHLER e cols., 2004).

Outra classe de SUMO3 ligase caracterizada é denominada Polycomb2 ou Pc2. A proteína Pc2 é uma proteína de 558 aminoácidos com um tamanho predito de 61kDa (SANTIJN e cols., 1997). A proteína hPc1/m33 e a proteína hPc3, possuem o domínio <u>Chromatin organization modifier</u> (chromo), na porção amino-terminal e o domínio C-box, na porção carboxi-terminal, sendo o domínio chromo responsável pela ligação à cromatina e o domínio C-box responsável pela repressão da expressão gênica (PICHLER e cols., 2004). A função E3 ligase parece estar relacionada com a região da molécula que se localiza entre a região chromo e a região C-box. Esta região não mostra nenhuma similaridade com outra SUMO ou ubiquitina E3 ligase (KAGEY e cols., 2003).

As funções associadas com as proteínas PcG, estão relacionadas à manutenção do padrão de expressão dos genes homeóticos durante o desenvolvimento embrionário, à diferenciação das células hematopoiéticas e à regulação da proliferação celular. Essas funções podem ser antagonizadas pelo grupo de ativadores transcricionais, da família trithorax (TRX) (revisado por BROCK & VAN LOHUIZEN, 2001; FRANCIS & KINGSTON, 2001; JACOBS & LOHUIZEN, 2002; ORLANDO, 2003; SATIJN & OTTE, 1999).

O terceiro tipo de SUMO3 ligase caracterizado até o momento é a proteína RanBP2/Nup358, e consiste num resíduo de aproximadamente 300 aminoácidos que se localiza na região do complexo do poro nuclear (PICHLER e cols., 2002; YOKOYAMA e cols., 1995; WANG e cols., 1999). O domínio E3, que é denominado IR (*internal repeat*), contém duas repetições de um resíduo de aproximadamente 50 aminoácidos que não apresenta nenhuma similaridade de sequência com outras E3 ligases de ubiquitina anteriormente caracterizadas. Esse domínio IR, tem a capacidade de sumorilar RanGAP1 e formar um composto trimérico estável envolvendo SUMO, Ubc9 e RanGAP1 e assim pode ser responsável pela localização de SUMO- RanGAP1 no complexo do poro nuclear (SAITOH e cols, 1998; MATUNIS e cols., 1998).

Além dessas E3 ligases, histonas deacetilases (HDACs) e proteínas Topors também tem sido descritas como proteínas que facilitam a sumorilação de certos substratos. SUMO ligases, assim como diversas ubiquitinas ligases, parecem funcionar mais como um adaptador do que com a atividade enzimática propriamente dita (GREGOIRE e cols., 2005; HAMMER & YAN, 2007; TAKAHASHI e cols., 2001).

1.10. Proteases específicas de SUMO

O padrão de proteínas sumoriladas é dinâmico e muda durante o ciclo celular em resposta a vários estímulos (LI & HOCHSTRASSER, 2000). As proteases de SUMO, também chamadas de isopeptidases, apresentam duas funções nesse processo: elas removem SUMO das proteínas, tornando a modificação reversível, e também fornecendo uma fonte de SUMO livre para ser usada para conjugação a outras proteínas. A proteína SUMO em sua forma livre é gerada tanto da clivagem do pequeno peptídeo da porção C-terminal da pré-proteína quanto da desumorilação de conjugados de SUMO com outras proteínas (Figura 06). De qualquer forma, ambas essas fontes de SUMO livre são importantes para a manutenção dos níveis normais de SUMO intracelulares (KUREPA e cols., 2002; JOHNSON e cols., 1997).

Todas as enzimas que clivam SUMO contêm uma porção C-terminal de aproximadamente 200 aminoácidos, chamado ULP (Ubiquitin-like protease), responsável pela atividade de clivagem (MOSSESSOVA & LIMA, 1999). O domínio ULP não apresenta nenhuma similaridade de sequência com as proteases que clivam ubiquitina. Ao invés disso, o domínio ULP está relacionado, com proteases virais (LI & HOCHSTRASSER e cols., 2000; STRUNNIKOV e cols., 2001). As proteases de SUMO têm uma porção N-terminal variável, as quais podem ser sequências regulatórias que direcionam as enzimas para diferentes partes da célula (LI & HOCHSTRASSER, 2003; HANG e cols., 2002; IATHANA e cols., 2006).

Nos genomas de mamíferos, sete genes codificam para proteínas com domínio ULP e pelo menos uma dessas cliva Nedd8 ao invés de SUMO (GAN-ERDENE e cols., 2003; MENDOZA e cols., 2003; YEH e cols., 2000). Essas enzimas incluem SENP3, a qual se localiza no nucleoplasma; SUSP1 encontrada no citoplasma; SENP1 encontrada no núcleo (NISHIDA e cols., 2000; KIM e cols., 2000; BAILEY e cols., 2002).

Os domínios catalíticos de SENP1 e SENP2 discriminam entre os parálogos de SUMO, assim como no processamento de substratos: SENP1 processa SUMO1 com maior eficiência que SUMO2/3 (SHEN e cols., 2006, XU e cols., 2005).



Figura 06: Representação esquemática de reações catalisadas por Ulp/SENPs. Processamento, desconjugação e edição da cadeia de SUMO. Adaptado de Mukhopadhyay e Dasso (2007).

A diversidade dos locais onde as proteases de SUMO podem ser encontradas na célula e a capacidade de diferenciar os substratos reflete como a via de sumorilação pode ser regulada em relação aos pares específicos para conjugação aos alvos celulares (SEELER & DEJEAN, 2003; MUKHOPADHYAY & DASSO 2007).

1.11. Proteínas modificadas por SUMO

ANDREOU e TAVERNARAKIS (2009) revisaram a modificação dependente de SUMO e observaram que esta conjugação está envolvida no controle de diversos processos importantes em todos os compartimentos celulares (Figura 07). Pode-se destacar o papel de SUMO na manutenção da integridade do genoma, em processos de transdução de sinais e controle da transcrição. Estudos recentes demonstraram que já foram identificados mais de 250 alvos protéicos e mais de 1000 proteínas como possíveis alvos da via de conjugação por SUMO).





O primeiro substrato modificado por SUMO foi descoberto por Mahajan e colaboradores (1998), e está relacionado com controle do transporte de moléculas do citoplasma para o núcleo, através do complexo do poro nuclear.

Diversos relatos colocam SUMO na evidência como participante de um mecanismo emergente que permite o controle da atividade transcricional. Estudos envolvendo receptores nucleares, e a proteína Sp3 indicam que essas proteínas

Introdução

possuem um domínio chamado SC, que apresenta homologia de sequência com sítio de sumorilação Ψ kxE (INIGUEZ-LLUHI & PEARCE, 2000). Também esses estudos indicam que a mutação de cada um dos aminoácidos do sítio de sumorilação, leva a uma abolição da repressão, sugerindo que a sumorilação (ou ligação da Ubc9) está mecanisticamente envolvida na repressão (SNOWDEN e cols., 2000; YANG e cols., 2006). O mecanismo, pelo qual SUMO inibe a transcrição, ainda não está completamente elucidado, mas um modelo possível é que a modificação por SUMO pode promover ou inibir as interações proteína-proteína e desta forma regular a montagem de complexos transcricionais (VERGER e cols., 2003).

A via de sumorilação está envolvida em importantes aspectos da fisiologia celular, incluindo, transcrição dos genes, mitose, localização sub-celular, transporte núcleo-citoplasma e regulação da estabilidade protéica (VERGER e cols., 2003).

1.12. SUMO em parasitos

Apesar da via de conjugação de SUMO ser conservada e vital em todos os eucariotos superiores analisados, seus substratos e os processos nos quais ela está envolvida em eucariotos inferiores ainda não foram elucidados (ISSAR e cols., 2008).

Em parasitos do filo Apicomplexa, Issar e colaboradores (2008) demonstraram que o *Plasmodium falciparum* possui conjugados sumorilados em diversos compartimentos celulares e que alguns alvos protéicos parecem estar envolvidos em processos de silenciamento gênico, transcrição, tráfego de proteínas e transdução de sinal. Por outro lado, em *Toxoplasma gondii*, foram identificados os constituintes da via de sumorilação, bem como substratos envolvidos no processamento de RNA, na tradução protéica, na resposta ao estresse e no processo de ubiquitinação (BRAUN e cols., 2008). García-Estrada e colaboradores (2008) identificaram a proteína LORIEN, uma E3 ligase de SUMO do tipo SP-RING/Miz em *Leishmania infantum*, sugerindo que LORIEN possa modular a atividade de fatores transcricionais neste parasito.

Somando-se a essas evidências, o nosso grupo caracterizou a existência de dois parálogos para SUMO em *S. mansoni*, denominados, *Smsmt3b* e *Smsmt3c*, correspondentes a SUMO2 e SUMO1, respectivamente (CABRAL e cols., 2008). Ao

analisar os parálogos para *smt3* foram observados 48.8% de identidade, como previamente descrito para outros organismos (SAITOH e cols., 2004). Foi observado também um perfil de expressão diferencial de *Smsmt3b/c* em cercária, esquistossômulos, verme adulto e ovos. O gene *Smsmt3c* é cerca de sete vezes mais abundante do que *Smsmt3b*, corroborando com estudos anteriores que sugerem um padrão de expressão de *Smsmt3b* induzido por resposta a estresse (KUREPA e cols., 2002; CABRAL e cols., 2008).

Além disso, durante os últimos anos, os processos de modificação póstraducional dependente de ubiquitina e proteínas ubiquitina-símile, vêm sendo extensivamente estudada pelo nosso Laboratório. A hipótese do nosso grupo é que o S. mansoni é um bom exemplo onde à maquinaria de sumorilação pode apresentar uma grande contribuição ao desenvolvimento do parasito, uma vez que: 1- as larvas miracídio e cercária dos trematódeos digenéticos são adaptadas para existência de natação ativa e ausência de alimento; 2- a penetração no hospedeiro é acompanhada por uma importante reorganização dos tecidos e da fisiologia do parasito, que pode ser adequadamente descrita como metamorfose; 3- após a penetração da cercária, o desenvolvimento do esquistossômulo pode ser dividido entre a migração da pele até os pulmões e deste para o fígado. A fase de crescimento se inicia ao final da migração dos pulmões, quando o parasito recebe estímulos do hospedeiro (LAWSON & WILSON, 1980); 4- outros estudos ainda indicam que a fase de migração compreende desde o dia zero pós-infecção, quando o parasito está alojado na pele, chegando ao fígado no oitavo dia (CRABTREE & WILSON, 1980). As divisões celulares também só acontecem guando o parasito chega ao sistema porta-hepático (CLEGG e cols., 1965).

Esta hipótese é corroborada por várias evidências que indicam que a síntese protéica é bastante diminuída no dia zero, aumento progressivamente até alcançar o pico máximo no oitavo dia pós-infecção, quando o verme recebe o estímulo para crescer e também concluir a formação do tegumento heptalaminado, característico de vermes adultos totalmente diferenciados (HOCKLEY & McLAREN, 1973, YUCKENBERG e cols., 1987; HARROP & WILSON, 1993).

Além disso, proteínas pré-sintetizadas na fase de cercária poderiam ser utilizadas no processo de transformação que acontece durante a migração do esquistossômulo no hospedeiro mamífero (HARROP & WILSON, 1993). Neste

22

processo de migração o parasito passa por um estado metabólico semi-dormente, havendo apenas mudanças na morfologia do verme, possivelmente para se adequar em tamanho aos capilares das veias, que compreendem a rota de migração do esquistossômulo (WILSON e cols., 1978).

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Considerando os resultados anteriores, que mostram que o *S. mansoni* é um dos raros exemplos de eucariotos inferiores com parálogos para SUMO e que durante o desenvolvimento no interior do hospedeiro mamífero, este parasito tem uma rota complexa de migração, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar o padrão de expressão dos genes da via de modificação pós-traducional dependente de SUMO durante a transição cercária a esquistossômulo. Para isso foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- Obter esquistossômulos com 3,5 horas, 1, 2, 3, 5 e 7 dias de cultivo in vitro;
- Determinar a expressão dos genes, através de PCR quantitativo, que codificam para SUMO e para as enzimas envolvidas na conjugação de SUMO às proteínas alvo: E1 ativadora (SmAos1-SmUba2), E2 conjugadora (SmUbc9), E3 ligases (SmPIAS e SmRanBP2) e proteases (SmSENP1 e SmSENP7) durante a transição cercária a esquistossômulo;
- Expressar em sistema heterólogo, as proteínas SmUbc9, SmPIAS e SmRanBP2;
- Produzir, a partir das proteínas recombinantes expressas, anticorpos específicos para identificação do perfil de expressão durante os estágios de vida do parasito supracitados;
- Avaliar o padrão de conjugados sumorilados em extratos de proteínas totais desse parasito.

3. Materiais e Métodos

3.1. Obtenção dos parasitos

3.1.1. Manutenção do ciclo de vida de S. mansoni

O ciclo biológico da linhagem LE do *S. mansoni* é mantido rotineiramente no Laboratório de Helmintologia e Malacologia Médica (LHMM) no Centro de Pesquisas René Rachou, utilizando moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata*, como hospedeiros intermediários, e camundongos Swiss e BALB/c, como hospedeiros definitivos. Os ovos de *S. mansoni*, presentes nas fezes de camundongos das linhagens Swiss ou Balb/C previamente infectados com o parasito foram recolhidos pelo método de Hoffmann (1934) e expostos por aproximadamente uma hora sob luz, para a liberação dos miracídios. Os miracídios (aproximadamente 18) foram utilizados para infectar o caramujo, que após 38 a 43 dias liberaram as cercárias, que são as formas infectantes do parasito, que por sua vez foram utilizadas para infectar o hospedeiro vertebrado. As cercárias foram inoculadas nos camundongos por via subcutânea.

Os camundongos infectados, após aproximadamente 45 dias, foram sacrificados e os vermes adultos recuperados do sistema porta-hepático por perfusão, como descrito por Smithers e Terry (1965). Após a coleta, os parasitos foram mantidos em meio RPMI (Invitrogen) a 37°C, suplementado com 20 µM de tampão HEPES, pH 7.5, sendo em seguida congelados a -70°C até o momento do uso.

3.1.2. Transformação mecânica de cercárias em esquistossômulos

A transformação de cercárias em esquistossômulos foi feita segundo o método descrito por Harrop e Wilson, 1993. Em linhas gerais, as cercárias após serem liberadas pelos caramujos foram transferidas para um béquer de vidro de 1000 mL e incubadas em gelo por duas horas para sedimentar. Transcorrido este período, o sobrenadante foi aspirado com o auxílio de pipeta Pasteur. As cercárias presentes no fundo do tubo foram transferidas para um tubo de poliestireno (tipo falcon) de 15 mL, ressuspendidas em 10 mL de água declorada autoclavada e deixadas em gelo por 10 minutos. O processo de lavagem com água declorada e descarte do sobrenadante foi repetido por três vezes. Posteriormente a água foi retirada e foram adicionados 6 mL de meio RPMI 1640 (Invitrogen), cada tubo

continha aproximadamente 200.000 cercárias. Para a transformação mecânica, as cercárias foram vigorosamente agitadas em vórtex, sob velocidade máxima, durante 90 segundos para que ocorra a separação da cauda do corpo cercáriano. O volume do tubo foi transferido para uma garrafa de cultura estéril de 50 mL. Em seguida, foi acrescentado no frasco, 30 mL de meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 1% de penicilina cristalina G (1000 UI/mL) e estreptomicina (1000 μ g/mL), e incubado em estufa de CO₂ 5% a 37°C por três horas e meia.

Para a remoção das caudas, 1 mL de meio RPMI 1640 foi adicionado em cada *eppendorf* contendo os esquistossômulos recém transformados e as caudas, que foram removidas através de lavagens repetidas com meio RPMI, com um intervalo de quatro minutos entre cada lavagem, para sedimentação dos esquistossômulos e remoção das caudas presentes no sobrenadante. As lavagens foram acompanhadas em microscópio de luz invertida (Leitz, Diavert). O precipitado de esquistossômulos sem a presença de caudas foi considerado como os esquistossômulos com 3,5 horas de cultivo *in vitro*. Estes foram separados e utilizados para cultivo ou armazenados em tubos de 1,5 mL e mantidos a -80°C até o momento do uso.

Composição	Concentração
Hidrolisado de lactoalbumina	0,1%
Glicose	0,1%
Hipoxantina	5 x 10 ⁻⁷ M
Triiodotironina (T ₃)	2 x 10 ⁻⁷ M
Serotonina	1 x 10 ⁻⁶ M
Hidrocortisona	1 x 10 ⁻⁶ M
Meio mínimo vitamina	0,5%
Meio Schneider	5%
HEPES	20 mM
RPMI	q.s.p. 500 mL

Tabela 1: Meio 169 com seus componentes e concentração.

O cultivo de esquistossômulos foi realizado em placas de seis poços contendo 8 mL de meio 169 (Tabela 1) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) e 1% de penicilina cristalina G (1000 UI/mL)/estreptomicina (1000 µg/mL) por poço. Os tempos de cultivo foram esquistossômulos 3,5 horas; 1; 3; 5 e 7 dias. A Figura 8 mostra uma preparação típica de esquistossômulos obtidos após padronização desta metodologia.



Figura 08: Esquistossômulos obtidos por cultivo *in vitro*. Os esquistossômulos foram cultivados por dois dias em estufa de CO_2 5% a 37°C em meio 169 e analisados em lupa de aumento.

3.2. Análise da expressão gênica por qRT-PCR (Real Time)

3.2.1. Extração do RNA total

Cerca de 100 mg de vermes adultos, 200.000 cercárias, 200.000 esquistossômulos de 3,5 horas, 1, 2, 3, 5 e 7 dias foram utilizados para extração de RNA total utilizando o kit RNA total (SV total RNA Isolation System - Promega[™]), seguindo o protocolo do fabricante.

A amostra biológica foi homogeneizada em 1 mL de TRIzol[®] Reagent (Invitrogen[™]) com auxílio de um homogeneizador tipo politron. Posteriormente, o homogeneizado foi transferido para tubos *eppendorf* de 1,5 mL e incubado por cinco minutos à temperatura ambiente para permitir a completa dissociação dos

complexos de nucleoproteínas. A seguir foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio (Sigma - St. Louis, MO, USA) para cada 1,0 mL de TRIzol. A mistura foi homogeneizada vigorosamente com auxílio de um vortex. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12.000g a 4°C. A fase aguosa foi transferida para um novo tubo seguido da adição de volume equivalente de etanol 95% v/v (preparado com água livre de RNAses) e homogeneizado suavemente por inversão o tubo, por três vezes, para a precipitação do RNA. A seguir o RNA total foi purificado com o kit SVRNA System conforme instrução do boletim técnico do fabricante. А padronização da metodologia foi avaliada em gel de agarose/formaldeído, como mostra a Figura 09. A pureza e quantificação dos RNAs foram determinadas utilizando o aparelho NanoDrop (GE) avaliando as relações entre os comprimentos de onda 260/280 e 260/230 indicativos de pureza do amostra.



Figura 09: RNA total obtido a partir de formas evolutivas do S. *mansoni*. O RNA total foi obtido utilizando o kit SV40 a partir de vermes adultos (1), cercárias (2), esquistossômulos com 3,5 horas de cultivo *in vitro* (3); esquistossômulos com 1 dia de cultivo *in vitro* (4); esquistossômulos com 2 dias de cultivo *in vitro* (5); esquistossômulos com 3 dias de cultivo *in vitro* (6); esquistossômulos com 5 dias de cultivo *in vitro* (7) e esquistossômulos com 7 dias de cultivo *in vitro* (8).

3.2.2. Oligonucleotídeos iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores específicos para os genes em estudo, foram baseados nas sequências de mRNA depositadas no banco de dados GeneDB (http://www.genedb.org/Homepage/Smansoni) e idealizados pelo programa *Gene Runner* (*Version 3.05*), conforme a Tabela 2.

Gene	Primer	N° de acesso
	F: 5'-GGCTCGTTGGAAATGGAAG-3'	
sumo	R: 5'-TCTGGGAGGGCAATCTTTAG-3'	Smp_045510
	F: 5'-GAACCATCAAATACAGAGACGG-3'	
aos1	R: 5'-AGAAATCAGGCATAGGCTGTC-3'	Smp_048760.1/Smp_048760.2
	F: 5'-ACGGGATGTTATGAATGTCAGC-3'	
uba2	R: 5'-GTGAATTGGCTCAGATGGAGTG-3'	Smp_166220
	F:5'-GGGAGGGAGGATTGTTCAG-3'	
ubc9	R:5'-ATAAAGGTGGCTCAAACTTGC-3'	Smp_103710
	F: 5'-TGTCGTCATGTTCAGTGCTATG-3'	
pias	R: 5'-CACACAGGACAATTCCAAGTTG-3'	Smp_172130
	F: 5'-GATTTGGTTGGTGGAGGTAGAC-3'	
ranbp2	R: 5'-TTTGGCACGGTTCTCAGC-3'	Smp_016410
	F: 5'-AGGAAACGGAGGCGGGATTC-3'	
senp1	R: 5'-ACACTGGAGACACGGGATGAGC-3'	Smp_033260.2
	F: 5'-TCAGTTACACGGCCCTTTATC-3'	
senp7	R: 5'-CCTGAGAAGTGGATGCGATC-3'	Smp_159120
	F: 5'-CGTATTCGCAAGTTGGCTGACCA-3'	-
Alfa-tubulina	R: 5'-CCATCGAAGCGCAGTGATGCA-3'	M80214

Tabela 2: Número de acesso das sequências e iniciadores *forward* (F') e *reverse* (R') referentes aos genes avaliados.

3.2.3. RT-PCR e obtenção dos cDNAs

A primeira fita do cDNA foi sintetizada utilizando 1µg de RNA total extraído e o Kit High Capacity RT-PCR System (Applied Biosystems), seguindo as recomendações dadas pelo fabricante.

Para cada 1µg de RNA total, foram utilizados 2 µL de iniciadores randômicos (10x RT *Random primer*), 0,8 µL de dNTPs [25x dNTP Mix (100mM)], 1µL de transcriptase reversa (Multi Scribe[™] Reverse Transcriptase) e água livre de RNAse para um volume final de 10 µL. A mistura foi incubada a 25°C por 10 minutos, seguidos de 120 minutos a 37°C e 85° por 5 minutos, com auxílio de um termociclador (*Biocycler,* version 3.2). A amostra ficou estocada a -20°C até o momento do uso.

3.2.5. Reação da PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

Para análise da expressão dos genes em estudo foi utilizada a técnica de PCR em tempo real. As reações foram realizadas pelo kit SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) em placas de 96 poços (MicroAmp[®] Optical 96 Well Reaction Plate – Applied Biosystems) e seladas com adesivo óptico (MicroAmp[™] Optical Adhesive Film – Applied Biosystems) ao final do procedimento. Foram pipetados 3 µL dos iniciadores (na concentração de 2,5 µM) em triplicata e 7 µL de um mix de reação contendo 2 µL de cDNA diluído 5 vezes (com água livre de DNAse) e 5 µL de SYBR[®] Green Master Mix, totalizando um volume de reação em cada poço de 10 µL. Os ensaios foram realizados em triplicata biológica para todos os genes avaliados, com o controle endógeno presente em todas as placas. Os valores de baseline (ciclos iniciais em que há pequenas alterações na fluorescência) foram ajustados para 3-15 ciclos. O threshold, desvio padrão médio do repórter normalizado (Rn) para os ciclos iniciais da PCR multiplicado por um fator ajustável, foi ajustado à região associada ao crescimento exponencial do produto da PCR e, portanto, fixado em 0,2 para todas as amostras, uma vez que se comparou o mesmo gene em diferentes grupos. O Rn refere-se à relação entre a intensidade de fluorescência emitida pelo corante repórter pela intensidade de fluorescência emitida pelo corante da referência passiva (ROX).

As análises foram feitas pelo método de quantificação relativa da expressão gênica (ΔC_T), que permite quantificar diferenças no nível de expressão de um alvo específico entre as diferentes amostras. Os níveis dos genes alvos foram normalizados pelos níveis do controle endógeno. Os resultados foram alcançados por uma fórmula aritmética que considera a quantidade do alvo, normalizado (2^{- ΔC_T}).

A reação de qRT-PCR foi conduzida conforme programação contida no aparelho ABI 7300 Applied Biosystems.

3.2.5. Curva de eficiência dos iniciadores

Para determinar as eficiências relativas da amplificação dos alvos e do controle endógeno foram construídas curvas padrões para cada *amplicon* a partir de uma mesma amostra. O ensaio foi realizado em triplicata e a concentração dos iniciadores foi de 2,5 µM.

A curva padrão foi representada por um gráfico de regressão linear semi-*log* do valor de C_T (eixo Y) em comparação ao *log* da quantidade inicial do ácido nucléico (eixo X). Foi utilizado o cDNA de cercária em cinco diluições seriadas de quatro vezes.

O *slope* da curva padrão foi usado para estimar a eficiência de amplificação. Uma reação 100% eficiente produzirá um aumento de dez vezes no *amplicon* da PCR a cada 3,32 ciclos durante a fase exponencial de amplificação ($\log_2 10 = 3$, 3219), ou seja, o *amplicon* dobra em quantidade durante a fase geométrica. O cálculo da estimativa da eficiência (E) foi calculado pela fórmula: E= ($10^{-1/s/ope} - 1$) x 100. Os iniciadores foram considerados apropriados para avaliar a expressão gênica pelo sistema SYBR[®] G*reen* quando apresentaram eficiência de reação acima de 80% e abaixo de 120%. Os valores de *baseline* foram ajustados para 3-15 ciclos e o *threshold* fixado em 0,1 para todas as amostras.



Figura 10: *Plot* de amplificação referente à curva de eficiência do gene alfa-tubulina. Em X está demonstrado o valor dos ciclos de PCR e em Y os valor de Δ Rn. Foi utilizado cDNA de cercária e uma diluição seriada de 4 vezes.



Figura 11: Curva padrão referente ao gene *alfa-tubulina.* Em X estão demonstrados os valores de Log da concentração de cDNA e em Y os valores de C_T correspondes a cada diluição. Os valores de *slope* e de coeficiente de linearidade estão representados a direita do gráfico. Foi utilizado cDNA de cercária e uma diluição seriada de 4 vezes.

Gene	Slope	Eficiência	R ²
smt3	- 3,1822	1,0618	0,9963
aos1	-3,2466	1,0324	0,9889
uba2	-3,4998	0.9961	0,9943
ubc9	-3,4539	0,9477	0,9955
Pias	-2,9588	1,0976	0,9817
ranbp2	-3,7072	0,8610	0,9867
senp1	-3,3618	0,9836	0,9991
senp7	-3,2236	1,0427	0,9611

Tabela 3: *Slope*, eficiência e R² dos iniciadores utilizados avaliado através de uma curva de eficiência.

3.2.6. Curva de dissociação dos amplicons

Foi realizada a análise da curva de dissociação dos *amplicons* para identificar a formação de produtos inespecíficos no final de cada corrida, possivelmente gerados a partir de excesso de iniciadores ou falha no desenho dos mesmos.

Ao final dos 40 ciclos da qRT-PCR, a temperatura foi elevada gradualmente de 60 à 95°C, mantendo-se por 15 segundos em cada grau Celsius. Na medida em que os *amplicons* desnaturaram, o sinal fluorescente emitido pelo SYBR[®] G*reen* foi reduzido e a temperatura em que metade do produto da PCR estava dissociada medida. O gráfico resultante permitiu verificar se houve um ou mais produtos de PCR presentes em cada reação devido a diferenças de temperatura de *melting* (Tm), específicas e dependentes do tamanho do fragmento e do conteúdo de GC (%GC). O Tm desejado foi acima de 80°C.

3.3. Análise estatística

A expressão relativa das proteínas envolvidas na via de sumorilação nos diversos estágios analisados foi comparada pela análise da variância (ANOVA) por ONE-WAY (Teste de Tukey) e o teste *T de Student*, quando adequado. Foi considerado estatisticamente significante p< 0,05. A análise estatística foi realizada pelo programa PRISMA (GraphPad Prism 5).

3.4. Expressão heteróloga das proteínas: SmUbc9, SmPIAS e SmRanBP2

3.4.1. Vetor de clonagem

A clonagem e expressão foram realizadas de acordo com a tecnologia *Gateway*® (Invitrogen), a qual utiliza métodos baseado na recombinação sítioespecífica existente em bacteriófagos lambda (LANDY, 1989). Para a clonagem foram utilizados um vetor de entrada, pDONR[™]221, e um vetor de expressão, pDEST[™]17 (Figura 12).



Figura 12. Desenho dos vetores de clonagem e expressão em *E. coli*. (A) pDONR[™]221 - Em destaque o sítio RFA de inserção do gene com os adaptadores attP1 e attP2 que permitem a recombinação com os adaptadores attB1 e attB2 do gene. B) pDEST[™]17 - destacando as principais características do vetor, como o promotor T7, a seqüência codificadora de 6 histidinas, sítios attR de recombinação com os sítios attL dos clones de entrada, gene de seleção ccdB. Fonte: Catálogo *Gateway*® *Tecnology Invitrogen* (2006).

3.4.2. Desenho de iniciadores e amplificação

Foram desenhados iniciadores direto e reverso para amplificação das sequências correspondentes aos genes Smubc9, Smpias e Smranbp2, com o auxílio do programa Gene Runner (Version 3.05), usando como base as sequências destes disponíveis banco de dados do GeneDB genes no (http://www.genedb.org/Homepage/Smansoni). Para clonagem e expressão em E. coli foram acrescentadas as sequências correspondentes aos sítios attB nas extremidades dos iniciadores para inserção das sequências na plataforma Gateway® de clonagem (Tabela 4).

Gene	Primers
RanBP2 F	5' <u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC</u> ATGTGTTTAAATCTTATAATGT 3'
RanBP2 R	5' <u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCC</u> TAGAAAACAAATTACGTCGATT 3'
PIAS F	5' <u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTC</u> ATGGACGATGATGATGACGATTTA 3'
PIAS R	5' <u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCC</u> CGACCAAGAACCATCCGAATGAAA 3'
Ubc9 F	5' <u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC</u> ATGAAGAACCCTGATGGGTCGTTA 3'
Ubc9 R	5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTTACAAGTTGGGATTTCGAAAAGA 3'

Tabola li iniciadoro para cionagoni na plataronna Gatonay c	Tabela 4:	Iniciadores	para clonagem	na plataforma	Gateway®
---	-----------	-------------	---------------	---------------	----------

Os genes foram amplificados a partir do cDNA de cercária com o auxílio do *kit PCR Platinum*® *Pfx* (Invitrogen), o qual utiliza uma DNA polimerase proveniente de *Thermococcus sp.* de linhagem KDO (TAKAGI e cols., 1997; NISHIOKA e cols., 2001), chamada *Platinum*® *Pfx DNA Polymerase*. Esta é uma enzima de alta fidelidade que minimiza os erros de polimerização, possibilitando melhores resultados. A mistura para a reação continha, em um volume final de 20 µl, 10 pmol dos iniciadores direto e reverso, 0,3 mM dos quatro desoxirribonucleotídeos (dNTP), 1 mM de MgSO₄, 10 ng de cDNA e 1 unidade de *Platinum*® *Pfx* DNA polimerase, em tampão *Pfx* 1X. As reações foram mantidas a 94°C, por 3 minutos e a seguir submetidas a 35 ciclos de PCR: desnaturação – 94°C, 15 segundos –, hibridação dos *iniciadores* – 55°C, 30 segundos – e polimerização – 68°C, 1 minuto. O produto da amplificação foi analisado em gel de agarose 1,5%.

3.4.3. Purificação de produtos de amplificação

A purificação dos produtos de amplificação é realizada tanto para eliminar possíveis sequências amplificadas inespecificamente e que não são de interesse para o trabalho, quanto para remover os iniciadores que contém os sítios de recombinação attB, e que são fortes competidores pelo sítio attP do vetor, dificultando a clonagem dos insertos.

A metodologia de purificação escolhida foi a purificação em gel: 10% do produto de amplificação é aplicado em uma canaleta do gel de agarose 2% e todo o produto restante é aplicado em outra canaleta. O gel é submetido à eletroforese e, então, a parte do gel que possui 10% do produto de amplificação é removida do gel, juntamente com o marcador de peso molecular e a seguir, corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e visualizado sob luz ultravioleta com auxílio de um transiluminador. Em seguida, a porção do gel marcado é disposta ao lado do restante do gel e, com base na marcação realizada no gel corado, pode-se cortar o pedaço do gel no qual o fragmento de interesse se encontra, evitando desta maneira, contaminá-lo com brometo de etídeo e expô-lo a UV.

Em seguida, a banda cortada do gel foi colocada no interior de uma ponteira de 1000 mL com filtro, a qual foi encaixada em um tubo *eppendorf*. A seguir, este tubo foi centrifugado a 6000 x g por 5 minutos. O fragmento de DNA contido no sobrenadante foi precipitado pela adição de acetato de sódio 3M na proporção 1:10

(1 parte de acetato de sódio para 10 partes de produto da purificação), etanol 100% na proporção 3:1 e 1µl de glicogênio (10 mg/mL). A solução foi homogeneizada e incubada por 20 minutos em banho de gelo seco ou durante a noite a -20° C. A seguir, a mistura foi centrifugada por 20 minutos a 14000 x g, lavada 2 vezes com etanol 70% e o precipitado, incubado a 50° C, e ressuspenso em 10µl de água ultrapura estéril.

3.4.4. Transformação de bactérias cálcio competentes

3.4.4.1 Preparo de células cálcio competentes

Uma colônia de *E. coli* da cepa desejada foi inoculada em 5 mL de meio LB contendo antibiótico apropriado para cada cepa. A cultura foi incubada a 37°C por 18 horas sob agitação constante. Um volume de 1 mL (inóculo de 1:100) desta cultura foi transferido para 100 mL de meio LB e a mesma foi incubada a 37°C sob agitação constante até o início da fase de crescimento exponencial (DO_{600nm} de 0.4 a 0.6).

Após o crescimento, as células foram resfriadas no gelo por 15 minutos. A partir desse ponto todas as etapas foram feitas a 4°C. A cultura foi centrifugada a 4000 x g, por 5 minutos, a 4°C, e as células foram ressuspensas em 50 mL (metade do volume da cultura original) de tampão de preparo de células cálcio competentes, gelado e estéril (tampão PIPES) e mantidas no gelo durante 30 minutos para então serem submetidas a uma centrifugação nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 2 mL (1/50 do volume da cultura original) de tampão PIPES para estocagem de células cálcio competentes. As células foram aliquotadas e estocadas a -70°C.

3.4.4.2 Transformação por choque térmico

Aproximadamente 100 µl de células cálcio competentes foram incubadas com aproximadamente 50 ng dos plasmídeos purificados por 30 minutos em gelo. Logo depois, foi realizado choque térmico – três minutos a 42 °C e três minutos no gelo. Após a realização da transformação, as células foram incubadas em meio LB, por uma hora a 37 °C sob agitação de 220 rpm, e inoculadas em 5 ml de meio LB com antibiótico apropriado para seleção ou plaqueadas em meio LB ágar também com antibiótico para seleção. A cultura líquida foi incubada sob agitação (220 rpm) a 37 °C durante a noite (16 horas) e a cultura em placa foi incubada da mesma forma, porém sem agitação.

3.4.5. Expressão das proteínas recombinantes em E. coli

A expressão foi realizada em células competente de *E. coli*, linhagem BL21(DE3)pLysE. Para tanto, a célula foi transformada com o vetor de expressão recombinado (pDEST17 + gene correspondente). A seguir, as células foram incubadas em 1 mL de LB caldo por 1 hora a 37°C sob agitação de 200 rpm. Posteriormente, as células foram inoculadas em 10 mL de LB caldo suplementado com 100 mg/L de ampicilina e 25 mg/L de cloranfenicol (ampicilina é o antibiótico de seleção do plasmídeo recombinado e cloranfenicol é usado para seleção da população de *E.coli* BL21(DE3)pLysE), cultivadas sob agitação (200 rpm) a 37 °C por 16 horas. As culturas foram diluídas 10 vezes acrescentando- se 90 mL de LB caldo suplementado com ampicilina (100 mg/L) e cloranfenicol (25 mg/L), e cultivadas novamente a 37°C sob agitação (200 rpm) até D.O.₆₀₀ de 0,8. Para induzir a expressão gênica foram adicionados 1 mM de IPTG às culturas e estas foram incubadas por três horas nas mesmas condições anteriores. As células cultivadas foram centrifugadas a 5000g durante 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado.

A seguir, as proteínas solúveis e insolúveis foram fracionadas. Inicialmente, as células foram recuperadas por centrifugação a 5000g durante 15 minutos a 4°C e o sobrenadante, descartado. A seguir, a massa bacteriana foi lavada com PBS 1X e, posteriormente, ressuspensa em 5 mL de tampão de lise (Tris HCl 50 mM pH 8,0; PMSF 1 mM) seguido de sonicação à potência 8 por 15 segundos e resfriado em banho de gelo (repetido 4 vezes). Nessa fração estão as proteínas totais expressas pela célula. O homogenato foi novamente centrifugado a 10000g por 10 minutos a 4°C. No sobrenadante estão as proteínas solúveis e no precipitado, a fração de proteínas insolúveis (isoladas em corpúsculos de inclusão). O precipitado foi lavado 3 vezes com tampão de lavagem (Tris HCl 50 mM pH 8,0; NaCl 500 mM; TritonX-100 2%). Para solubilizar as proteínas insolúveis, o precipitado foi ressuspenso com tampão de solubilização (Uréia 300 mM, NaCl 300 mM, NaH₂PO₄ 50 mM; Imidazol 10 mM).

As frações proteínas totais, solúveis e insolúveis foram analisadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% e coradas com *coomassie blue.*

3.4.6. Purificação das proteínas heterólogas

As proteínas recombinantes foram purificadas em SDS-PAGE preparativo, corado com KCI 100 mM gelado. A seguir, a banda correspondente a proteína é retirada do gel e eletroeluída em membranas para diálise em 1 mL de solução salina a 50 Volts por duas horas. Este processo foi repetido outras duas vezes para completa extração das proteínas do gel. Amostras de 20 µL de cada fração eluída foram analisadas em gel de poliacrilamida 12%, corado com *coomassie blue.*

3.5. Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O extrato protéico total foi analisado por SDS-PAGE. Cerca de 20 µg da amostra juntamente com 10µL de tampão da amostra foram incubados a 100°C durante 3 minutos e em seguida, aplicados em gel a 12%. A corrida deverá ocorrer a 200V e 20mA durante aproximadamente 1 hora e 30 minutos. Os resultados obtidos após eletroforese das amostras em SDS-PAGE foram observados pela coloração do gel por *coomassie blue* 250. Para tanto os géis foram incubados por aproximadamente 30 minutos à temperatura ambiente neste corante e, a seguir, os géis foram descorados com solução de descoloração para SDS-PAGE para visualização das bandas.

3.6. Confirmação da identidade da proteína por espectrometria de massa

Cerca de 3 µg das proteínas recombinantes foram separadas por SDS-PAGE 12% o qual foi posteriormente corado com *coomassie blue*. A banda de interesse foi retirada do gel e submetida à redução e alquilação na presença de 50 e 200 mM de DTT e iodoacetamida, respectivamente. Após o tratamento, a banda foi submetida ao processo de digestão *in* gel durante 12 horas na presença de tripsina. As amostras foram analisadas através de injeção direta de 5,0mL dos peptídeos trípticos no espectrômetro que opera por electrospray do tipo LCMS-IT-TOF (Shimadzu). Os dados provenientes do espectro MS foram submetidos à busca de identidade no NCBI utilizando-se o software MASCOT e levaram em consideração a

oxidação de metioninas e a carbamidometilação de cisteínas. Esse experimento foi conduzido sob orientação do Prof. William de Castro Borges, DECBI/UFOP.

3.7. Produção de anticorpos policionais

Os anticorpos policionais contra as proteínas recombinantes foram obtidos através da imunização de ratos da linhagem Wistar com aproximadamente cinco semanas de idade, no início das inoculações. Todos os animais foram tratados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e o protocolo institucional foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFOP, n°192/08).

A fim de obter anticorpos específicos, foram realizados testes com o soro préimune, para verificar se existem anticorpos pré-formados pelo rato capazes de reconhecer proteínas de *S. mansoni*. Para tanto, foram realizados ensaios de *Western blot*.

3.8. Preparação do extrato protéico bruto das fases de vermes adultos, cercárias e esquistossômulos

A partir de parasitos adultos, cercárias e esquistossômulos foram preparados extratos de proteínas totais. Os parasitos foram homogeneizados no tampão (Tris-HCI 100mM pH 7,5; Glicerol 1%, EDTA 5mM, NaCl 150mM, Triton- X 0,5%, DTT 1mM, lodoacetamida 10mM, MG132 50μM e 1X Inibidor de Proteases – Sigma). O material foi brevemente sonicado e centrifugado a 10.000*g* por 30 minutos. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi centrifugado a 40.000*g* por 60 minutos. Proteínas foram dosadas pelo kit QuantiPro BCA assay (Sigma-Aldrich), exatamente como descrito no boletim técnico do fabricante. Para a construção da curva padrão, utilizamos uma solução padrão de soro albumina bovina a 100 μg/mL em diversas diluições.

3.9. *Western blot* para detecção da proteína SmUbc9 e dos conjugados sumorilados em extratos protéicos totais de vermes adultos, cercárias e esquistossômulos

Após a corrida eletroforética das frações protéicas de vermes adultos, cercárias e esquistossômulos para a detecção dos conjugados sumorilados, o gel foi

preparado para a transferência (Biorad Trans-Blot) de acordo com o método descrito por Towbin e cols. (1979). Inicialmente, o gel foi imerso na solução de transferência (25 mM Tris-HCl, 0,192M de glicina, 20% de etanol absoluto, pH 8,3) por cerca de 20 minutos. Após a montagem do sistema de transferência, as proteínas presentes no gel de poliacrilamida foram transferidas para membrana de PVDF (GE Healthcare), sendo o processo de transferência realizado durante 2 horas sob voltagem fixa de 100 Volts a 4°C. Após o término da transferência, a membrana foi submetida ao Western blot, sendo incubado overnight a 4°C, sob agitação, com a solução de bloqueio (leite desnatado em pó 5%, 50 mM de Tris-HCl pH7.5, 0,1% de Tween 20). Após o bloqueio, a membrana foi lavada três vezes durante cinco minutos com Tris-HCI 10mM pH7,5 e incubada por três horas a temperatura ambiente com o anticorpo primário policional, de coelho anti-SUMO. A diluição do anticorpo primário foi realizada em solução de imunoblotting (leite desnatado em pó 5%, 50 mM de Tris-HCl, 150mM de NaCl, 0,1% de Tween 20) e utilizada a seguinte razão do anticorpo 1:1000. Os anticorpos primários não ligados foram então retirados e a membrana devidamente lavada três vezes de cinco minutos cada com Tris-HCI 10 mM pH7,5, posteriormente incubada durante 1 hora e 30 minutos a temperatura ambiente com o anticorpo secundário anti- IgG de coelho conjugado à fosfatase alcalina (diluição de 1:2500 em tampão de imunoblotting). Após a lavagem das membranas para remoção dos anticorpos secundários não ligados, as membranas foram reveladas com NBT (nitrobluetetrazolium) e BCIP (5-bromo-4cloro-3indolil-fosfato) (Gibco BRL). Para a detecção da proteína Ubc9 foi realizado o mesmo experimento, utilizando como anticorpo primário anti-Ubc9 na diluição 1:1000 e como anticorpo secundário anti-IgG de rato na diluição 1:2000. A revelação foi realizada utilizando NBT/BCIP.

4. Resultados

4.1. Genes da maquinaria de sumorilação são diferencialmente expressos em *S. mansoni*

Devido à conservação da via entre as espécies, e baseando-se em sequências depositadas nos bancos de dados de genoma do *S. mansoni*, foi possível caracterizar os componentes do sistema de sumorilação *in silico* (CABRAL, 2007). A reconstituição da via de sumorilação em *S. mansoni*, baseado em busca por homologia utilizando banco de dados disponíveis, mostra a existência de 9 genes envolvidos com sumorilação: dois genes codificantes para SUMO (*Smt3a/b*), um para E1 (*SmSae1/Sae2*), um para E2 (*SmUBC9*), dois para E3 (*SmPIAS e SmRan*) e dois para SENPs (*SmSenp1/7*). Analisando os dados obtidos, verifica-se que o repertório dos genes do parasito é muito semelhante aos observados em *C. elegans* e *D. melanogaster*, confirmando a conservação da via de sumorilação nos genomas analisados.

O perfil de expressão dos genes *Smsmt3c, Smaos1, Smuba2, Smubc9, Smpias, Smranbp2, Smsenp1 e Smsenp7* foi realizada utilizando a técnica de qRT-PCR, conforme descrito no item 3.2.5. Foram utilizados RNA total de cercária, vermes adultos e esquistossômulos mecanicamente transformados (MTS) com 3,5 horas, 1, 2, 3, 5 e 7 dias de cultivo *in vitro*. Os níveis de mRNA foram avaliados em em duplicata biológica e triplicata técnica. Os resultados estão expressos em níveis de RNA em relação ao gene da *alfa-tubulina*, utilizado como gene constitutivo e o método do 2^{-ΔCt}.

Na Figura 13 foi observado que o gene que codifica para SmSMT3 apresenta expressão durante as fases analisadas do ciclo de vida do parasito. Verifica-se que os níveis de transcritos são em média três vezes mais abundantes em MTS-3,5 horas quando comparados a MTS com 1, 2, 5 e 7 dias de cultivo *in vitro*, cercária e verme adulto. Durante as fases de desenvolvimento dos esquistossômulos, observa-se uma discreta variação no perfil de expressão. Há um aumento de duas vezes em MTS-3d em relação MTS-2d e MTS-5d. Quando se compara cercária e verme adulto, não se observa diferenças significativas entre os níveis de transcritos desses estágios.



Figura 13: Expressão relativa do gene *Smsmt3c* em *S. mansoni.* A expressão de *Smsmt3c* foi avaliada nos estágios de cercárias, esquistossômulos mecanicamente transformados (MTS-3,5 horas, MTS-1 dia, MTS-2 dias, MTS-3 dias, MTS-5 dias, MTS-7 dias) e vermes adultos. Como gene constitutivo foi utilizado α -tubulina e a expressão gênica relativa, determinada pelo método do 2^{-ΔCt}. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de Tukey com P<0,05 no programa GraphPad Prism. As diferenças estatísticas entre os estágios foram determinadas pelos sinais: * diferente de verme adulto, ** diferente de Cercária, *** diferente de MTS-3,5 horas, # diferente de MTS-1 dia, ## diferente de MTS-2 dias e ### diferente de MTS-3 dias. Os resultados foram multiplicados por 10².

Na Figura 14 foi observado um perfil de expressão gênica parecido entre *Smaos1* e *Smuba2*, não havendo variação significativa entre esses genes em nenhuma fase do parasito. O perfil de expressão é caracterizado por altos níveis de expressão dos transcritos nas fases de cercária (duas vezes) e MTS-3,5 horas (quatro vezes) em relação às demais formas evolutivas avaliadas, enfatizando a importância desta via nestes estágios larvais. Verifica-se também um perfil de expressão gênica parecido entre MTS-1 dia a MTS-7 dias, no qual há um aumento de 1,5 vezes no MTS-3 dias em relação as fases correspondentes a MTS-1 dia a 7 dias. Quando se compara cercária e verme adulto, observa-se um aumento de duas vezes dos transcritos do primeiro em relação ao segundo.



Figura 14: Expressão relativa dos genes *Smaos1 e Smuba2* no desenvolvimento de *S. mansoni.* A expressão destes genes foi avaliada nos estágios de cercárias, esquistossômulos mecanicamente transformados (MTS-3,5 horas, MTS-1 dia, MTS-2 dias, MTS-3 dias, MTS-5 dias, MTS-7 dias) e vermes adultos. Como gene constitutivo foi utilizado α -tubulina e a expressão gênica relativa foi determinada pelo método do $2^{-\Delta Ct}$. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de Tukey com P<0,05 no programa GraphPad Prism. As diferenças estatísticas entre os estágios foram determinadas pelos sinais: * diferente de verme adulto, ** diferente de cercária, *** diferente de MTS-3,5 horas, [#] diferente de MTS-1 dia, ^{##} diferente de MTS-2 dias e ^{###} diferente de MTS-3 dias. Os resultados foram multiplicados por 10².

Para o gene *Smubc9* foi observado que os transcritos são em média quatro vezes mais abundantes em MTS-3,5 horas quando comparados a MTS de 1, 2, 5 e 7 dias de cultivo *in vitro*, cercária e verme adulto. Na Figura 15, foi verificado também um nível de expressão dos transcritos bastante similar em cercária e em verme adulto. Durante as fases de desenvolvimento dos esquistossômulos, observa-se que não há uma variação significativa no perfil de expressão do gene, com um pico de expressão (duas vezes) durante MTS-3 dias, demonstrando a importância dessa enzima do tipo E2 para os estes estágios larvais.



Figura 15: Expressão relativa do gene *Smubc9* no desenvolvimento de *S. mansoni.* A expressão deste gene foi avaliada nos estágios de cercárias, esquistossômulos mecanicamente transformados (MTS-3,5 horas, MTS-1 dia, MTS-2 dias, MTS-3 dias, MTS-5 dias, MTS-7 dias) e vermes adultos. Como gene constitutivo foi utilizado α -tubulina e a expressão gênica relativa foi determinada pelo método do 2^{-ΔCt}. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de Tukey com P<0,05 no programa GraphPad Prism. As diferenças estatísticas entre os estágios foram determinadas pelos sinais: * diferente de verme adulto, ** diferente de cercária, *** diferente de MTS-3,5 horas[#] diferente de MTS-1 dia, ^{##} diferente de MTS-2 dias e ^{###} diferente de MTS-3 dias. Os resultados foram multiplicados por 10².

Foi verificado também o perfil das E3 ligases durante as fases evolutivas analisadas. Na Figura 16 pode-se observar que *Smpias* apresenta um pico de expressão em 3,5 horas, onde a expressão praticamente triplica, em relação ao estágio de cercária. Posteriormente, ocorre uma diminuição da expressão quase chegando a zero em MTS-2dias. Quando o parasita se encontra em sua migração da pele para os pulmões (MTS-3 e 5 dias), o perfil não se altera, seguido por um aumento de três vezes nos níveis de transcrito em MTS-7 dias. Por fim, ocorre novamente uma diminuição de quase três vezes dos níveis de expressão em vermes adultos e em cercária em relação à MTS-7 dias.

Smranbp2 apresenta uma expressão diferencial, sendo que o gene começa a ser expresso em cercária. Depois com 3,5 horas, início da fase de desenvolvimento do esquistossômulo, a expressão desse gene aumenta aproximadamente quatro vezes em relação à expressão inicial em cercária. Posteriormente quando o verme alcança 2 dias, ocorre uma diminuição acentuada (15 vezes) da expressão, a qual se mantém em níveis acentuados até MTS-5 dias cerca de oito vezes em relação a

cultura de MTS-2 dias. Seguida de uma posterior diminuição em MTS-7 dias (quatro vezes) e um aumento de duas vezes o estágio de vermes adultos, onde o parasita alcança a sua completa maturação, atingindo níveis similares ao de cercária.

Quando se compara as duas E3 ligases observarmos um perfil de expressão gênica parecido entre os genes *Smpias* e *Smranbp2* em verme adulto, em cercária e em MTS-3,5 horas a MTS-3 dias. Em MTS-5 dias, verifica-se que um alta expressão de *Smranbp2* (quatro vezes) em relação à *Smpias*, já em esquistossômulos de 7 dias, observa-se uma inversão do perfil dos transcritos com um aumento de duas vezes dos níveis de *Smpias* comparado com *Smranbp2*. Isso sugere a modificação de substratos específicos durante entre estes estágios evolutivos.



Figura 16: Expressão relativa dos genes *Smpias e Smranbp2* no desenvolvimento de *S. mansoni.* A expressão destes genes foi avaliada nos estágios de cercárias, esquistossômulos mecanicamente transformados (MTS-3,5 horas, MTS-1 dia, MTS-2 dias, MTS-3 dias, MTS-5 dias, MTS-7 dias) e vermes adultos. Como gene constitutivo foi utilizado α -tubulina e a expressão gênica relativa foi determinada pelo método do 2^{-ΔCt}. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de Tukey com P<0,05 no programa GraphPad Prism. As diferenças estatísticas entre os estágios foram determinadas pelos sinais: * diferente de verme adulto, ** diferente de cercária, *** diferente de MTS-3,5 horas, ^{###} diferente de MTS-3 dias, [&] diferente de MTS-5 dias e ^a diferente de PIAS. Os resultados foram multiplicados por 10².

A Figura 17 mostra o perfil das proteases durante o desenvolvimento inicial do parasito. Foi observado um perfil de expressão gênica parecido entre os genes *Smsenp1* e *Smsenp7* durante todos os estágios analisados. Há um aumento dos

48

níveis dos transcritos de duas vezes em cercária quando comparada com verme adulto. Já em relação ao MTS-3,5 horas, verifica-se uma aumento de oito vezes em relação aos demais tempos de cultivo dos esquistossômulos, resultando em níveis basais de expressão dessas proteases.



Figura 17: Expressão relativa dos genes *Smsenp1 e Smsenp7* no desenvolvimento de *S. mansoni.* A expressão destes genes foi avaliada nos estágios de cercárias, esquistossômulos mecanicamente transformados (MTS-3,5 horas, MTS-1 dia, MTS-2 dias, MTS-3 dias, MTS-5 dias, MTS-7 dias) e vermes adultos. Como gene constitutivo foi utilizado α -tubulina e a expressão gênica relativa foi determinada pelo método do $2^{-\Delta Ct}$. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de Tukey com P<0,05 no programa GraphPad Prism. As diferenças estatísticas entre os estágios foram determinadas pelos sinais: * diferente de verme adulto, ** diferente de cercária e *** diferente de MTS-3,5 horas. Os resultados foram multiplicados por 10^2 .

Nas Figuras de 13 a 17, observou-se que os transcritos possuem uma tendência a uma expressão relativa em níveis mais altos nos estágios iniciais de esquistossômulos e cercária. Esta fase inicial de transformação de cercária em esquistossômulo representa uma fase importante para o parasito. Nesta fase, ocorre a troca de um ambiente com alto nível de oxigênio, representado pelo meio aquático onde vive as cercárias, para um meio rico em gás carbônico que é o plasma sanguíneo. Esta adaptação ao ambiente depende de mecanismos moleculares que são desencadeados por processos celulares distintos. Após a perda da cauda, a cercária passa por momentos de instabilidade onde sofre uma série de eventos a fim de adquirir novas características para a sobrevivência dentro do hospedeiro definitivo. Uma característica desta fase de transição é a capacidade de sobreviver sem uma transcrição de mRNA e uma tradução de proteína real (WILSON, 1979).

49

Este processo ainda pouco estudado evita que o parasito utilize um excesso de energia na produção destas moléculas para canalizar todo esforço para o remodelamento de sua estrutura no geral. No entanto, estes processos necessitam de mecanismos para os auxiliarem nesta estabilização.

4.2. Clonagem de SmUbc9, SmPIAS e SmRanBP2 em vetor pDEST17 pela tecnologia Gateway ${ m I\!R}$

Os iniciadores específicos para amplificar as ORFs correspondentes a *Smubc9, Smpias* e *Smranbp2* foram desenhados conforme descrito no item 3.4.2. Como a proteína SmUbc9, possui 166 resíduos de aminoácidos e uma massa molecular de 19.03 kDa, foram desenhados iniciadores para amplificar a proteína completa. Já para as proteínas SmPIAS e SmRanBP2, por apresentarem 1004 e 2026 resíduos de aminoácidos, respectivamente, foi adotada uma outra abordagem, clonar apenas uma porção do domínio. Os cDNAs foram obtidos por RT-PCR como descritos em item 3.2.4. A Figura 18 mostra que o produto da reação de PCR foi do tamanho esperado com pares de bases próximos a 400pb, 300pb e 501pb para *Smpias, Smranbp2* e *Smubc9*, respectivamente. A seguir, os produtos de PCR foram purificados, conforme item 3.4.3. Os resultados estão apresentados na Figura 19.



Figura 18: Análise dos produtos de RT- PCR correspondentes aos genes *Smpias, Smranbp2 e Smubc9*. Cerca de 10 μ L da reação de RT-PCR, realizada como descrito em Material e Métodos, foram analisados em gel de agarose 1,2%- TBE e corados com brometo de etídeo. (PM) padrão de pares de base; (1) SmPIAS; (2) SmRanBP2 e (3) SmUbc9. PM-1kb = padrão de pares de bases 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); os sítios attB aumentam em torno de 32 nucleotídeos.



Figura 19: Análise da purificação dos *amplicons* correspondentes aos genes *Smpias, Smranbp2* e *Smubc9* obtidos por RT-PCR. Cerca de 2 μ L da purificação, foram analisados em gel de agarose 1,2%- TBE e corados com brometo de etídeo. (PM) padrão de massa molecular em pb; (1) SmPIAS; (2) SmRanBP2 e (3) SmUbc9. PM-1kb = padrão de massa molecular *1 kb Plus DNA Ladder* (*Invitrogen*); os sítios attB aumentam em torno de 32 nucleotídeos.

Depois de purificados em gel de agarose, os produtos de PCR foram clonados em seus respectivos vetores segundo protocolo descrito no item 3.4.5. Primeiramente no vetor de entrada, pDONR[™]221 e , após extração do DNA plasmidial, fez-se a recombinação com o vetor de expressão pDEST[™]17. A verificação da inserção das sequências correspondente aos genes de *Smubc9*, *Smpias* e *Smranbp2* nos vetores foi realizada em gel de agarose 0,8%- TBE (Figura 20 A) e a confirmação das clonagens, por PCR a partir dos plasmídeos purificados (Figura 20 B). Através deste ensaio pode-se verificar que a clonagem foi realizada com sucesso. Em seguida, procedeu-se o sequenciamento dos clones obtidos, que confirmou a correta inserção dos fragmentos nos vetores pDEST17[™] (dados não mostrados).





Figura 20: Minepreparação de DNA plasmidial e confirmação da clonagem por PCR dos plasmídeos. Em (A) DNA plasmidial obtido de *E. coli* analisados em gel de agarose 0,8%- TBE, onde (PM) padrão de massa molecular em pb; (2) pDEST 17 + SmPIAS e (3) pDEST 17 + SmRanBP2, (4) pDEST 17 + SmUbc9. Em (B) RT-PCR de colônia em gel de agarose 1,2%- TBE, onde (PM) padrão de massa molecular em pb; (1) SmPIAS; (2) SmRanBP2 e (3) SmUbc9.

4.3. Obtenção de SmUbc9 e SmPIAS recombinantes

Os clones em pDEST17[™] foram expressos em cepa de *E.coli* linhagem Bl21(DE3)pLysE, produzindo as proteínas recombinantes (item 3.4.6). As células foram cultivadas em LB caldo acrescido de 100 mg/L de ampicilina e 25 mg/L de cloranfenicol. A indução foi realizada pela adição de 1 mM de IPTG. Após 3 horas de cultivo, as células foram recuperadas por centrifugação e lisadas. As proteínas solúveis e insolúveis foram separadas e as amostras de proteínas totais, solúveis e insolúveis foram analisadas em gel de poliacrilamida 12%. Como mostra a Figura 21, as proteínas recombinantes SmPIAS e SmUbc9 foram expressas na fração insolúvel em corpúsculos de inclusão. Como pode ser notado na Figura 21 a proteína SmRanBP2 não foi expressa.

As proteínas recombinantes foram purificadas em gel SDS-PAGE seguido de eluições em membranas de diálise conforme descrito no item 3.4.7. Amostras de 20 µL de cada fração eluída foram analisadas em gel SDS-PAGE 12%. A Figura 22 mostra as eluições obtidas nas purificações. Foi obtida uma única banda em cada
eluição, confirmando a purificação das proteínas. As proteínas purificadas SmPIAS e SmUbc9 foram utilizadas para produção de anticorpos em ratos.



Figura 21: Expressão de SmUbc9 e SmPIAS pela plataforma *Gateway*®. (1-PM) Massa molecular BenchMark (Invitrogen); (2,5,8) Extrato protéico total de *E. coli* antes da indução por IPTG 1 mM; (3,6,9) Fração de proteínas solúveis de *E. coli* induzidas por IPTG 1 mM; (4,7,10) Fração de proteínas insolúveis de *E. coli* induzidas por IPTG 1 mM. As frações são das proteínas SmPIAS, SmRanBP2 e SmUbc9, respectivamente. Cerca de 20 µL de cada fração foram analisados em SDS-PAGE 12% e corados com *coomassie blue*.



Figura 22: Purificação das proteínas recombinantes SmUbc9 e SmPIAS. Três eluições obtidas na purificação das proteínas SmPIAS e SmUbc9 Cerca de 20 µL de cada fração foram analisados em SDS-PAGE 12% e corados com *coomassie blue*. Legenda: proteína SmPIAS purificada (1,2,3- frações purificadas) e a proteína SmUbc9 purificada (4,5,6-frações purificadas, 7- padrão de massa molecular BenchMark- Invitrogen.).

Para confirmação da identidade das proteínas recombinantes, as bandas correspondentes às proteínas SmUbc9 e SmPIAS recombinantes foram cortadas do gel e submetidas à análise por espectrometria de massa. A busca de identidade no banco de dados do *Schistosoma mansoni* GeneDB foi realizada utilizando o *software* MASCOT. A Figura 23 mostra a análise realizada pelo *software* MASCOT no banco de dados disponível no NCBI, confirmando desta forma a identidade da proteína SmUbc9 recombinante com cobertura de 58%. Já para a proteína SmPIAS não foi possível a identificação, visto que foi expresso somente a porção correspondente ao

domínio, o qual representa somente uma pequena porção da proteína não se obtendo assim uma identidade representativa para identificação por MS.



Figura 23: Confirmação da identidade por espectrometria de massas. A proteína SmUbc9 recombinante foi comparada com a proteína SmUbc9 do banco de dados (Smp_103710), demonstrando uma identidade de 100% e cobertura de 58%. Em destaque, sublinhado e em vermelho, estão os peptídeos gerados pelo espectrofotômetro de massas.

4.4. Perfil de expressão de SmUbc9 em S. mansoni

Foi produzido um anticorpo policional anti-Ubc9 em ratos, utilizando-se a proteína recombinante. A imunização foi realizada conforme descrito em Materiais e Métodos. Após a segunda imunização, o soro dos ratos foi recuperado via punção cardíaca e testado. O reconhecimento do soro imune desta proteína contra um extrato protéico foi realizado em membrana de PVDF e revelado com NBT/BCIP.

O *Western blot* foi realizado com os extratos protéicos totais das fases de verme adulto, cercária e MTS-3,5 horas; 1; 2 e 3 dias. Foi observado na Figura 24 A, que o anticorpo reconhece uma proteína de tamanho aproximado de 20 kDa nas fases evolutivas analisadas. Densitometria foi realizada usando o programa *Gene Quantity* (Biorad) e a β-actina como proteína normalizadora do experimento (Figura 24 B). A análise estatística foi feita segundo protocolo descrito no item 3.3. Ao analisar o gráfico, observa-se que apesar das diferenças estatísticas verificadas, não há nenhuma diferença real (maior que duas vezes) no perfil de expressão da proteína SmUbc9.





4.5. Padrão de expressão de SmPIAS em esquistossômulos de 3,5 horas

Para averiguar o padrão de proteínas reconhecidas pelo o anticorpo anti-SmPIAS com os extratos protéicos totais de MTS-3,5 horas foi realizado Western *blot* como descrito em Materiais e Métodos no item 3.9. Conforme foi verificado na Figura 25, o anticorpo reconheceu várias proteínas com elevada massa molecular.



Figura 25: Perfil de SmPIAS em S. *mansoni.* Cerca de 50 µg de proteínas totais foram fracionados em gel de poliacrilamida 12%, transferidos para membrana de PVDF, incubados com anticorpo anti-PIAS de rato e revelado com NBT/BCIP.

4.6. Conjugados sumorilados diferencialmente expressos durante o ciclo de vida do parasito

Para realização do experimento de *Western Blot*, foi utilizado o anticorpo anti-SUMO1 humano (Santa Cruz, biotechnologies) com os extratos protéicos totais das fases de verme adulto, cercária e MTS-3,5 horas; 1; 2, 3, 5 e 7 dias como descrito em Materiais e Métodos no item 3.9. Conforme foi verificado na Figura 26, o anticorpo reconheceu várias proteínas, sugerindo a presença de vários conjugados sumorilados. Esse resultado sugere um perfil estágio-específico de proteínas sumoriladas nas fases evolutivas analisadas. Há proteínas similares que são sumoriladas, assim como, verifica-se a marcação de proteínas diferentes durante o desenvolvimento do parasito.



Figura 26: Perfil de proteínas sumoriladas em *S. mansoni.* Cerca de 50 µg de proteínas totais foram fracionados em gel de poliacrilamida 12%, transferidos para membrana de PVDF, incubados com anticorpo anti-SUMO de coelho e revelado com NBT/BCIP. Legenda: 1- verme adulto, 2- MTS-7d, 3- MTS-5d, 4- MTS-3d, 5- MTS-2d, 6- MTS-1 dia, 7- MTS-3,5 horas e 8- cercária .

5. Discussão

A modificação pós-traducional dependente de SUMO pode ser considerada como uma ferramenta celular versátil para modular tanto a função como a localização de uma proteína em virtualmente qualquer célula. Através da ação sequencial de enzimas do tipo E1, E2 e E3 são formadas ligações covalentes entre o resíduo de Gly, localizado no C-terminal de SUMO e um resíduo de Lys no alvo. Os alvos podem ser monosumorilados, multisumorilados (mais que um resíduo de Lys) ou polisumorilado (múltiplas moléculas de SUMO ligadas em tandem). Além disso, como o processo é reversível, a desconjugação de SUMO é dependente de proteases específicas (revisado por GEOFFROY & HAY, 2009).

Os alvos sumorilados desempenham funções celulares importantes como, por exemplo, regulação da transcrição, reparo do DNA, progressão do ciclo celular e resposta ao estresse. Entretanto, apesar de definidos os processos celulares em que SUMO participa, ainda permanecem por serem determinados os mecanismos moleculares pelos quais essas modificações regulam processos tão distintos como, por exemplo, reparo do DNA e resposta ao estresse (revisado por GARCÍA-DOMINGUEZ & REYES, 2009).

Em *S. mansoni*, esta via pode controlar aspectos importantes, relacionados com o complexo plano de desenvolvimento sofrido por esse parasito bem como a manutenção do parasitismo no hospedeiro vertebrado.

A primeira evidência da existência de SUMO em *S. mansoni* surgiu de experimentos de *Western blot*, utilizando anticorpo anti-ubiquitina e extratos totais obtidos de várias formas evolutivas do parasito. O reconhecimento de um padrão complexo de bandas sugeriu a existência de reações cruzadas com proteínas similares a ubiquitina, como, por exemplo, SUMO e NEDD8. Neste sentido, Cabral (2002), utilizando iniciadores degenerados baseado nas sequências de SUMO1 de *D. melanogaster* e *C.elegans* e a técnica de RT-PCR, clonou, sequenciou e analisou o padrão de expressão do gene ortólogo de *S. mansoni*, denominado *Smsmt3b*. Posteriormente, Cabral (2007) mostrou que a via de SUMO era formada por 9 membros, assim distribuídos: 2 genes para SUMO, 2 para E1, 1 para E2, 2 para E3 ligases e 2 para proteases, sugerindo que o sistema de sumorilação é conservado neste parasito. Além disso, resultados dessa tese demonstraram que os genes que codificam para as proteínas SmSMT3 e SmUBC9 apresentam todos os domínios conservados e que duas E3 ligases e duas UIps eram expressas em vermes adultos

e em esquistossômulos. Observaram também que o padrão de sumorilação é preferencialmente de proteínas nucleares não-histonas em vermes adultos.

Dando continuidade a essa investigação, este trabalho teve como objetivo geral, determinar o padrão de expressão dos genes: *Smsmt3c*, E1 ativadora (*Smaos1-Smuba2*), E2 conjugadora (*Smubc9*), E3 ligases (*Smpias* e *Smranbp2*) e proteases (*Smsenp1* e *Smsenp7*) durante a transição cercária a esquistossômulo. Como critério de avaliação dos níveis de expressão entre os estágios analisados, foi considerado como significativo uma diferença de duas vezes para inferir expressão diferencial com potencial biológico real para o parasito.

Como mostra a Figura 13, há um padrão de expressão diferencial para *Smsmt3c* durante o período de desenvolvimento dos esquistossômulos jovens. Vale a pena ressaltar que os iniciadores desenhados são específicos para este gene e amplificam uma região correspondente a codificadora do gene de *smt3c* ou *sumo1*.

Ao analisar a Figura 14, nota-se que o padrão de expressão comparando as duas subunidades é bastante similar, resultado esperado por serem constituintes da mesma enzima. A enzima ativadora de SUMO é bastante conservada em todos os organismos já analisados e sempre consiste de um heterodímero formado pelas duas subunidades: Aos1 e Uba2 (DOHMEN e cols., 1995, JOHNSON e cols., 1997). Além disso, como SUMO E1 apresenta homologia de sequência com E1 ativadora de ubiquitina e NEDD8, inicialmente foram realizadas análises comparativas entre as sequências para evidenciar regiões específicas nas ORFs de Aos1 e Uba2 para desta forma, minimizar a possibilidade dos iniciadores de amplificarem outros membros da família E1 de proteínas.

La Salle e colaboradores (2008) demonstraram uma expressão regulada temporalmente em células germinativas masculinas durante a espermatogênese para (SAE1-SAE2), demonstrando que os perfis de expressão dos constituintes da enzima são bastante semelhantes bem como o padrão obtido pela enzima E2. Esses dados corroboram os resultados obtidos neste trabalho.

Na Figura 15, verifica-se que o perfil de expressão do gene *Smubc9* foi muito semelhante aos genes *Smsmt3c* e *Smaos1* e *Smuba2*. Resultados anteriores demonstraram que o gene que codifica para *SmUbc9* é expresso em todas as fases do ciclo de vida do parasito e experimentos de Northern blot indicam que o parasito apresenta apenas um transcrito expresso de tamanho 1,32Kb (CABRAL, 2007).

Resultados de expressão do mRNA humano, também indicaram que o gene *hsUbc9* é expresso em vários tecidos humanos e apresenta um tamanho de 1,3Kb e está envolvido em processos de divisão celular. Desta forma foi especulado sobre a importância desse gene na diferenciação e viabilidade, pois se sabe que a proteína Ubc9 é importante para a progressão do ciclo celular da fase G2 para M, em leveduras. A mutação desse gene causa a acumulo de células mal formadas, possuindo apenas um núcleo (KOVALENKO e cols., 1995; SEUFERT e cols., 1995).

Apesar de apresentar uma estrutura similar a outras enzimas da família E2, que atuam na via de ubiquitina, Ubc9 é até o momento a única enzima conjugadora de SUMO descrita. Proteína Ubc9 pertence à família UBC (*Ub-conjugation enzyme catalytic*), e apresenta um domínio catalítico específico para a conjugação de SUMO aos seus numerosos substratos. Além disso, diversos relatam mostram que sistemas biológicos cujo gene *smubc9* é silenciado ocorre uma interrupção do ciclo celular o que reforça a hipótese da sumorilação de proteínas específicas para viabilidade celular (SEUFERT e cols., 1995; SCHWARZ e cols., 1998; CHEN e cols., 2004; JOHNSON e cols., 2004).

Os genes que codificam para SUMO E3 ligases *Smpias* e *Smranbp2* apresentam uma expressão diferencial durante o ciclo de via do parasito dentro do hospedeiro vertebrado, sugerindo que durante o desenvolvimento podem ser usadas diferentes plataformas de sumorilação para a estabilização de diferentes substratos (Figura 16).

O domínio *Miz Zinc finger* tem atividade ligase para a conjugação de SUMO aos substratos alvo e está envolvido no reparo do DNA e na organização cromossomal. A proteína Miz1(Msx interacting zinc finger) contém um motivo dedo de zinco e tem atividade especifica em ligação ao DNA, agindo como fator de transcrição que modula positivamente a expressão gênica. Assim, Miz1 se liga à proteína Msx2, acentuando a habilidade de se ligar ao DNA Desta forma foram desenhados oligonucleotídeos específicos que amplificavam a região de domínio Zf-Miz (HOCHSTRASSER e cols., 2001).

O domínio RING foi primeiramente descrito como sendo responsável pela dimerização de várias proteínas (JOAZEIRO & WEISSMAN, 2000). Depois, vários trabalhos foram publicados, que levaram a conclusão de que o domínio RING exercia um papel fundamental, mediando à transferência da ubiquitina aos

substratos alvo. De acordo com Hershko e Ciechanover (1998), as ubiquitina E3 ligases são enzimas que se ligam diretamente ou indiretamente aos substratos protéicos específicos e promove a transferência da ubiquitina de um intermediário ligado por ligação tiol-éster para a ligação amida com as proteínas ou cadeias de poliubiquitina.

Ao contrário dos domínios HECT de ubiquitina, que catalisam diretamente a ligação isopeptídica, o domínio RING, funciona como um adaptador (FANG e cols., 2003). O domínio RING acentua a ubiquitinação e contribui para dirigir a especificidade da ligação, embora não se saiba ainda, se RING funciona como uma simples ponte ou contribui alostericamente influenciando a enzima E2 (JACKSON & ELDRIDGE, 2002; LIMA e cols., 2002. PICKART e cols., 2001).

As proteínas do tipo Siz-PIAS possuem domínio RING bastante conservado e isso levou a interpretação de que essas proteínas podem funcionar como ligases. Experimentos de duplo-híbrido em levedura levaram a identificação de Siz-PIAS como interagindo com SUMO, e a semelhança do domínio RING de PIAS com o domínio das E3 ligases de ubiquitina, levaram a dedução que essas proteínas podem participar da via de sumorilação. Depois outros relatos confirmaram que SUMO e PIAS participam da modificação pós-traducional de fatores de transcrição, reprimindo a transcrição na periferia do núcleo (JACKSON e cols., 2001; HOCHSTRASSER e cols., 2001; VERGER e cols., 2003; GILL e cols., 2005).

Estudos indicam que a sumorilação de Sp3 dependente de PIAS e Ubc9 leva a regulação da atividade do fator transcricional, e desta forma reprimindo a expressão gênica. Outros fatores transcricionais como, por exemplo, o receptor de androgênio (AR), o co-ativador transcricional GRIP e as HDACs são todos modificados por SUMO via proteínas do tipo PIAS (SAPETSCHNIG e cols., 2002; ROSS e cols., 2002; SEELER & DEJEAN, 2003).

Estudos recentes reportaram a importância de PIAS não somente como SUMO ligase do tipo RING, como também funções relacionadas à associação nãocovalente com SUMO ou com DNA devido aos domínios SIM (*SUMO interaction motif*) e PIAS, respectivamente. Como E3 ligase sugerem que esta possa mediar a formação da cadeia de poli-SUMO, propiciando o reconhecimento por E3 ligase de ubiquitina dependente de SUMO (RNF4) e posterior degradação do substrato alvo. Esta ainda pode ser regulada por modificações pós-traducionais, tais como metilação e fosforilação. Estes estudos enfatizam a versatilidade dessa proteína e rede de mecanismos nos quais ela está envolvida (ativação/repressão da transcrição, modulação de proteínas, degradação), ressaltando sua importância biológica através de suas interações covalentes e não-covalentes. Assim, diversas funções dessa proteína são devido a sua capacidade de mediar e facilitar a formação de complexos protéicos ligados a SUMO (revisado por RYTINKI e cols., 2009). Portanto, a expressão de PIAS é importante também para identificação de proteínas que interagem com ela para inferência de possíveis funções adicionais, além da atuação como E3 ligase como já foi comprovada no parasito.

Visto que PIAS1 exerce um papel na diferenciação celular e no desenvolvimento, então os baixos níveis de expressão deste gene nos períodos estudados em relação aos vermes adultos, sugerem que este gene, pode participar no processo de diferenciação que o parasito sofre até o sétimo dia do seu desenvolvimento. Entretanto a detecção dos níveis de PIAS por *Western blot*, neste mesmo período de tempo estudado, poderá revelar a existência de tradução acoplada aos níveis de transcritos detectados neste estudo. Futuros experimentos envolvendo proteoma, imunoprecipitação e *Western blot* utilizando um anticorpo anti-PIAS, em culturas de esquistossômulos contribuirão na elucidação esta hipótese.

A proteína Ran é requerida para o transporte nuclear, controle do ciclo celular, formação das fibras do fuso mitótico. A modificação de RanGAP1 por SUMO1, promove a sua associação a RanBP2, uma proteína de 358 kDa, que está localizada na face citoplasmática do complexo do poro nuclear Outros estudos indicaram também que RanGAP1 e outras proteínas se tornam covalentemente ligados a SUMO1, de uma maneira bastante similar a ubiquitina. Pichler e colaboradores (2002) revelaram que a nucleoporina RanBP2 tem atividade SUMO E3 ligase e através da interação direta com a Ubc9, RanBP2 transfere SUMO1 para o substrato Sp100. O domínio E3 ligase tem 33 kDa de tamanho e não se assemelha ao domínio RING, presente nas E3 ligases do tipo PIAS (AZUMA e DASSO, 2002; YOKOYAMA e cols., 1995; MELCHIOR e cols., 2000).

O gene SmRanBP2 que codifica para RanBP2, apresenta um aumento real de transcrição em esquistossômulos de 3,5 horas e 3 dias de cultura *in vitro*, quando comparados a cercárias e vermes adultos, sugerindo que o transporte núcleo-

citoplasma mediado por SUMO seja importante tanto para os processos de migração, como para as mudanças morfológicas sofridas pelo verme nos primeiros dias de desenvolvimento, no interior do hospedeiro vertebrado (Figura 16).

O processo de diferenciação em células eucarióticas requer mudanças na maquinaria do transporte nuclear em resposta ao estímulo da própria diferenciação, bem como do crescimento. Estas mudanças ocorrem em paralelo com modificações críticas e estágio-especificas na localização de fatores de transcrição e também de proteínas que participam em processos de remodelamento de cromatina que no momento da diferenciação devem estar obrigatoriamente dentro do núcleo (revisado por HOGARTH e cols., 2005).

Embora SUMO modifique os seus substratos alvos através do conjunto E1-E2-E3 ligase, também é possível a interação direta de Ubc9 com o substrato alvo (SEELER & DEJEAN 2003). A expressão diferencial dos genes de *Smpias* e *Smranbp2* durante o ciclo de vida do parasito sugere que durante o seu desenvolvimento, *S. mansoni* pode utilizar diferentes plataformas de sumorilação.

Ao avaliar o perfil de expressão dos genes que codificam para as enzimas desumoriladoras SmSENP1 e SmSENP7, pode-se observar que exercem sua função principalmente nos estágios de cercária e MTS-3,5 horas, apresentando níveis basais nos MTS-1 dia a 7 dias (Figura 17). Os resultados obtidos até o momento sugerem uma expressão diferencial das SENPs durante o desenvolvimento.

As proteases desempenham um papel central na célula através da manutenção da integridade celular e regulação da expressão gênica (TAKEICHI e cols., 1991; GUMBINER e cols., 1996; REISS e cols., 2005).

As proteases de SUMO ou Ulps (*Ubiquitin-like protases*) foram denominadas SENPs (*Sentrin specific protease*) 1 a 7 em humanos. Várias isoformas de Ulps foram detectadas também em camundongos, e sabe-se que a isoforma de SENP2 desempenha papel fundamental na regulação do fator de transcrição Sp3, ao catalisar a reação de remoção de SUMO. Sendo a reação de sumorilação reversível e fortemente controlada durante o processo, ressaltando a importância de proteases específicas para a via de sumorilação (GILL e cols., 2005; GONG e cols., 2000; HANG & DASSO e cols., 2002; KIM e cols., 2000).

Diversos estudos indicam que a porção N-terminal dessas proteínas é quem determina a localização e, portanto, o reconhecimento dos seus respectivos substratos. As Ulps são definidas como cisteíno-proteases, atuando tanto no processamento de SUMO como no processo de desconjugação, clivando a ligação isospeptídica de substratos específicos. A sequência da proteína predita apresenta os resíduos de His, Cis e Asp do sítio catalítico conservados, pertencendo à classe das peptidases C-48, assim como as enzimas desubiquitinadoras (WATTS e cols., 2004).

Observa-se um perfil de expressão similar de todos os componentes da via de sumorilação durante os estágios analisados, altos níveis de transcritos em MTS-3,5 horas, seguido de uma diminuição acentuada da expressão em MTS-24 horas. Em conjunto estes resultados sugerem que esses genes são altamente expressos nesta fase devido ao estresse nutricional, osmótico e de temperatura no qual o parasito é submetido nas primeiras horas após a penetração no hospedeiro.

Estudos recentes demonstram que os componentes da via de sumorilação são induzidos por estresse osmótico e oxidativo, aumento de temperatura, hipóxia e sinalização da via de cálcio. A cascata de sinalização é disparada pela própria maquinaria de conjugação ou pela fosforilação dos alvos protéicos, portanto a via de sumorilação é regulada por outras vias de modificação pós-traducionais. A expressão de SUMO2 e SUMO3 é crítica para a sobrevivência da célula a estresse, principalmente devido ao aumento de temperatura. Hipóxia induz a expressão de SUMO1, modulando a função de HSF1 (fator de transcrição de choque térmico) que, por sua vez, media expressão gênica de proteínas de choque térmico em células expostas a elevadas temperaturas e outras condições de estresse. Em adição, hipóxia também induz a expressão de RSUME, proteína que aumenta a conjugação de SUMO aos substratos (LIU & SHUAI, 2008; TEMPÉ e cols., 2008; GOLEBIOWSKI e cols., 2009).

A expressão do gene *hsp70* que codifica uma proteína envolvida em resposta a estresse térmico apresenta um perfil semelhante ao obtido pela maquinaria de sumorilação, caracterizado por um aumento dos níveis dos transcritos durante as fases iniciais de desenvolvimento após transformação da cercária. Esta expressão estágio-específica do gene *hsp70* é regulado por dois mecanismos: estresse e um programa durante o desenvolvimento compartilhado por outros genes. A remoção da

cauda é suficiente para indução da transcrição de *hsp70* e a elevação da temperatura só aumenta o efeito, além disso, observaram que esta indução não é essencial para o desenvolvimento de esquistossômulos jovens, contudo é necessário para o desenvolvimento tardio. Os genes que codificam para miosina e paramiosina apresentam o mesmo perfil de expressão que *hsp70*. Isso deve ocorrer para todos os genes envolvidos com demanda de energia devido à inversão do metabolismo, visto que cercária é aeróbica e esquistossômulo e verme adulto são predominantemente anaeróbicos (STIREWALT, 1974; NEUMANN e cols., 1992; GROSSMAN e cols., 1990).

Estudos mais recentes também demonstraram a expressão diferencial de diversos transcritos durante essa fase de diferenciação do parasito. Análises identificaram que proteínas envolvidas na formação da membrana, na degradação de hemoglobina e na evasão do sistema imune são altamente expressas nesta transição, propiciando crescimento, desenvolvimento e reprodução do parasito. Assim como foi observada também nesta etapa uma diminuição dos genes relacionados com respiração aeróbica. Recente artigo demonstrou genes que são altamente expressos em MTS-3,5 horas e MTS-5 dias. Estes estão envolvidos em diversos processos biológicos, incluindo principalmente, maturação do tegumento, organização, desenvolvimento, adesão celular e resposta a estresse (revisado por HAN e cols., 2009; GOBERT e cols., 2010).

Além disso, o padrão de expressão altamente regulado e as diferenças observadas entre MTS-3,5 horas e MTS-7 dias, assim como entre MTS-7 dias e verme adulto podem estar relacionadas a modificações que resultam em remodelamento de cromatina.

Vale ressaltar que SUMO pode interagir com seus alvos naturais via formação de ligação covalente (ação sequencial de E1, E2 e E3) e não covalente via domínio SIM. Estes dados sugerem o papel de SUMO no estabelecimento da repressão da transcrição no contexto de atividade, localização e arquitetura de complexos repressores associados à cromatina (GARCÍA-DOMINGUEZ & REYES, 2009).

Durante o desenvolvimento de *C. elegans*, a modificação pós-traducional dependente de SUMO, exerce um papel importante relacionado à modificação das histonas, e também via modificação de fatores de transcrição levando a repressão transcricional. Diversos relatos em *S.mansoni* apontam para a importância dos

fatores de transcrição para o desenvolvimento, crescimento e diferenciação do parasito. Durante o desenvolvimento dos metazoários, o controle da expressão gênica implica na coordenação precisa entre ativação e a repressão de conjuntos de genes. Esses mecanismos envolvem numerosos fatores de transcrição que se ligam ao DNA, como por exemplo, a família dos receptores nucleares. Os receptores nucleares regulam a expressão gênica se ligando aos seus elementos de resposta correspondentes e recrutando proteínas associadas, desta forma ativando ou reprimindo a expressão gênica (ROBINSON-RECHAVI e cols., 2003; KUMAR e cols., 2004).

A subfamília dos receptores nucleares órfãos *fushi tarazu* (FTZ), desempenha papéis importantes no desenvolvimento e na diferenciação sexual dos vertebrados e invertebrados, sendo também detectado em *S. mansoni*, onde se observou, que enquanto os níveis do mRNA permaneciam praticamente constantes quando comparado com os estágios larvais e adulto, a proteína era mais abundante em adultos do que em miracídios, sugerindo uma regulação ao nível traducional (de MENDONÇA e cols., 2002).

Outra característica importante relacionada à função desse receptor está relacionada à ligação da proteína ao elemento de resposta monomérico SF1, o que sugere que essa interação em *Schistosoma* está relacionada com a regulação da transcrição durante o desenvolvimento, assim como ocorre, nos outros metazoários. É visto também que SmFTZ interage com o homólogo de RXR (Receptor X Retinoic), potencializando a atividade transcricional de SmFTZ (BERTIN, 2005). Relatos anteriores indicam que a via de sumorilação modifica RXRα (WU e cols., 2004). Em *S. mansoni,* o mRNA desse receptor esta presente em todas as fases do ciclo, porém apresenta elevados níveis em fases de miracídio e cercária, quando comparado com verme adulto. Em contraste, a proteína apresenta um alto nível de expressão na fase de esquistôssomulo, mesmo apresentando sequências PEST, que usualmente determina a meia vida curta das proteínas (de MENDONÇA e cols., 2000). Devido ao fato de SUMO prolongar a meia vida dos seus substratos alvo, neste caso, a meia vida do receptor pode ser prolongada para desempenhar suas funções na diferenciação e desenvolvimento do verme jovem para o verme maduro.

Ainda em relação ao controle da expressão gênica, o parasito apresenta as proteínas do tipo CBP (*Creb binding protein*) e p300 que são co-ativadores

transcricionais com atividade de histona acetilase, que modifica a cromatina, levando esta ao seu estado relaxado. Até o momento, sumorilação dessas proteínas está relacionada à atividade de reparo de DNA (MOHAN e cols., 2006; BERTIN e cols., 2006).

Para avaliar se o padrão protéico era similar a este perfil de expressão dos transcritos de toda a maquinaria de sumorilação observado, produzimos anticorpos a partir das proteínas recombinantes SmUbc9 e SmPIAS. A Figura 21 mostra que ambas foram obtidas na fração insolúvel do extrato total de *E. coli*, em corpos de inclusão e a Figura 22 mostra a eficiência da purificação das proteínas recombinantes. Como pode ser notado na Figura 21, a proteína SmRanBP2 não foi expressa, assim outras alternativas foram testadas como, alteração das concentrações do IPTG e do tempo de indução, bem como a adição de etanol. Contudo todas as tentativas se mostraram insuficientes para obteção da proteína. Com relação a proteína SmUbc9, a identificação foi realizada com sucesso, obtendo-se 58% de cobertura. *Western blot* utilizando anticorpos anti-Ubc9, mostrou que o perfil protéico é similar durante as fases avaliadas, apesar de apresentar diferenças estatísticas significativas, não resulta em uma diferença com real impacto biológico para o parasito (duas vezes).

Dados recentes revelaram mais de 100 genes no genoma de Arabidopsis que possam ser usados como normalizadores mais estáveis e expressos em níveis mais baixos que os tradicionais genes de referência, dentre eles destaca-se a proteína Ubc9 (CZECHOWSKI e cols., 2005), confirmando os resultados obtidos na Figura 24, que demonstra a expressão em níveis constitutivos da proteína Ubc9 no parasito. Além disso, nota-se que o anticorpo comercial assim como o anticorpo produzido no nosso laboratório reconheceu duas bandas. Isso era esperado visto que o anticorpo comercial foi produzido contra a porção N-terminal, que é justamente a porção mais conservada entre as diferentes E2 de ubiquitina-símile. Quando foi realizada a busca no NCBI, foram identificadas duas proteínas com pontuação significativa e com massa molecular parecidas, que podem ter sido reconhecidas pelo anticorpo. O aparecimento da banda inespecífica quando se utiliza o anticorpo produzido a partir de SmUbc9 pode ser devido ao fato de se tratar de um anticorpo policional e ter sido usado em uma titulação de 1:200.

Em relação SmPIAS expressa, apesar de não ter sido confirmada a identidade da proteína, devido à baixa homologia com o banco de dados, sugere-se, através do *Western blot*, que trata-se dessa E3 ligase (Figura 25). Ao analisar o perfil obtido utilizando o anticorpo produzido foi observada a presença de proteínas de elevada massa molecular correspondente aos valores esperados. Posterior tentativa de confirmação da proteína expressa será realizado através do espectro MS/MS.

Quando se compara as Figuras 15 e 24, observa-se um perfil de expressão diferencial do transcrito e da proteína, os níveis do transcrito variam significativamente durante a transição cercária a esquistossômulo, contudo os níveis protéicos não refletem essas variações, sugerindo um mecanismo de controle traducional nesta fase de diferenciação do parasito.

miRNAs são reguladores chaves de numerosas vias biológicas, incluindo diferenciação, desenvolvimento e oncogênese. A expressão gênica regulada por miRNAs ocorre através do direcionamento do complexo RISC a específicos mRNA alvo, entretanto o mecanismo exato dessa inibição ainda não foi completamente elucidado. Recentes estudos demonstraram que a regulação da expressão gênica mediada por miRNA pode ocorrer tanto a nível pós-transcrional (decaimento de RNA e sequestro de mRNA por *P-bodies*) como traducional. Quatro modelos matemáticos para regulação durante a etapa de tradução foram propostos, podendo atuar nas fases inicial e tardia da iniciação, na montagem do ribossomo e/ou na fase de elongação. Contudo, o mecanismo de ação dos miRNAs ainda não foi definido. Zinovyev e colaboradores (2010) formularam a hipótese de que efeitos na ação dos miRNAs só podem ser medidos e observados quando afeta um sistema dominante da maquinaria de tradução, que é susceptível a variações das condições experimentais, resultando em diferentes processos de regulação.

Em 1992 Blanton e Licate propuseram a participação de processos pós transcricionais influenciando no desenvolvimento de esquistossômulos jovens. Sendo assim, o mecanismo de silenciamento pós transcricional mediado pela via de miRNAs é um potencial mecanismo que pode auxiliar na explicação deste silenciamento gênico tão importante para a vida e adaptação do parasito ao novo ambiente.

Dados do nosso laboratório demonstraram a existência da via de miRNA em S.mansoni e que esta via é regulada durante o desenvolvimento do parasito (GOMES e cols., 2008). Vale ressaltar que os genes SmAgo1, SmAgo2, SmAgo3/4, SmExportina5.1/2, SmFmr1, SmTudor-SN, SmPasha SmDrosha1/2, е SmLoquacious, constituintes da maquinaria de miRNA em S. mansoni apresentam expressão diferencial durante as mesmas fases evolutivas estudadas neste trabalho. Pode-se observar um pico de expressão em MTS-3,5 horas, seguindo de uma queda dos níveis dos transcritos em MTS-1 dia. Futuras análises para verificar se alguns possíveis miRNAs identificados а durante transicão cercáriaesquistossômulos tem como prováveis alvos componentes da via de sumorilação serão realizadas.

Além disso, a desestabilização de mRNA e repressão da tradução são processos passíveis de regulação por miRNA que ocorrem de forma independente, porém controladas de forma similar (HENDRICKSON e cols., 2009). Wu e colaboradores (2009) demonstrou que a regulação de *Smubc9* em células cancerígenas é mediada por miRNA.

Considerando este dado, foi realizada uma busca por homologia no GeneDB (http://www.genedb.org/Homepage/Smansoni), porém não foi possível identificar um similar em *S. mansoni.* Entretanto, resultados preliminares sugerem que a região 3'UTR do gene *Smubc9* possui sequência estável (< -25 Kcal/mol), podendo indicar silenciamento mediado por miRNA. Novos experimentos serão realizados para comprovação desta hipótese. Assim, a expressão diferencial do transcrito e o perfil similar da proteína, resultando em uma queda da eficiência de tradução, sugerem que a regulação a nível traducional que resulta em decaimento dos níveis de RNA possa ser mediada por miRNA.

Por outro lado, as diferenças nos níveis de mRNA observadas também podem ser relacionadas a modificações epigenéticas que podem ser importantes no desenvolvimento e diferenciação durante o ciclo de vida do parasito. Fantappié e colaboradores (2008) demonstraram que a metilação do DNA, não ocorre em *S. mansoni*, sugerindo que modificações de histonas representam um mecanismo primário de controle da transcrição nestes platelmintos. Domínios N-terminais de histonas podem sofrer numerosas PTMs, incluindo acetilação, fosforilação, ubiquitinação e sumorilação. A acetilação de resíduos de lisina, particularmente nas

histonas H3 e H4, está geralmente associada com ativação transcricional e a deacetilação com repressão. Recentemente, foram caracterizadas algumas enzimas envolvidas na acetilação e deacetilação em *S. mansoni* (de MORAES e cols., 2004; BERTIN e cols., 2006; OGER e cols., 2008).

Observou-se também que em leveduras, a sumorilação compete com outras modificações, tais como ubiquitinação e acetilação. Entretanto em células de mamíferos, a expressão de histona acetil-transferase p300 aumenta a sumorilação de H4, sugerindo que acetilação facilita o processo de sumorilação. Resultados sugerem que sumorilação de histonas atua na repressão da transcrição através de recrutamento de proteínas e complexos repressores, além de atuar modulando a atividade de HDACs e transformando ativadores em repressores (SHIIO e cols., 2003; NATHAN e cols., 2006; GARCIA-DOMINGUEZ & REYES, 2009).

A metodologia de imunoprecipitação de cromatina (ChIP) já foi adaptada para avaliação da relação entre modificações de histonas e expressão gênica durante todo o ciclo de vida do parasito (CABY & PIERCE, 2009; COSSEAU e cols., 2009). Dessa forma, experimentos futuros de imunoprecipitação de cromatina serão realizados para verificação da contribuição de SUMO no controle da expressão gênica no parasito.

Através de experimentos utilizando o anticorpo anti-SUMO-1 humana, podemos verificar que a via de sumorilação está funcionalmente ativa no parasito. O anticorpo anti-SUMO-1 humano foi utilizado, devido à conservação da sequência de *S. mansoni* relacionado à proteína humana. Ao se comparar com o resultado obtido através do *Western blot* utilizando anticorpo anti-SUMO (Figura 25), observa-se níveis similares de conjugados sumorilados, não refletindo a diferença constatada durante a expressão do transcrito. Além disso, é possível verificar o perfil estágio-específico da proteína durante as fases evolutivas estudadas (Figura 13). Esses resultados analisados em conjunto sugerem que SUMO pode participar de mecanismos de regulação da expressão gênica durante toda a transição de cercária para verme adulto, visto que praticamente toda a proteína sintetizada encontra-se conjugada aos seus alvos protéicos, quase não sendo verificada a presença de SUMO livre nos extratos.

Portanto, a conservação, o perfil diferencial da expressão gênica dos componentes da via de sumorilação, e os conjugados sumorilados em *S. mansoni*,

podem sugerir o papel dessas proteínas na escolha das proteínas sumoriladas envolvidas no desenvolvimento do parasito. Assim, a identificação de possíveis alvos desta maquinaria, poderá ser um importante avanço para o conhecimento da biologia celular do parasito, assim como o desenvolvimento de novas abordagens funcionais para a terapêutica da esquistossomose, visto que nesta fase do ciclo, o parasito sofre intensas mudanças para o estabelecimento da infecção.

6. Conclusões

Os principais resultados obtidos neste trabalho foram:

- Alta expressão, seguida de uma queda vertiginosa em MTS-1d, durante a fase de desenvolvimento dos esquistossômulos de 3,5 horas, de todos os componentes do sistema de sumorilação, sugerindo que esta via de modificação pós-traducional é importante para a diferenciação de esquistossômulos jovens;
- Os anticorpos policionais produzidos a partir da proteína Ubc9 recombinante foram capazes de reconhecer a proteína, mostrando um padrão de expressão similar durante todas as fases evolutivas analisadas, sugerindo uma regulação a nível pós-transcricional;
- Padrão diferencial dos conjugados sumorilados em S. mansoni, sugerindo o papel dessas proteínas na escolha dos alvos protéicos que possivelmente possam estar envolvidos no desenvolvimento do parasito;

Em conjunto os resultados permitem concluir que os genes envolvidos na modificação pós-traducional dependente de SUMO em *S. mansoni* são diferentemente expressos. Assim, a identificação de possíveis alvos desta maquinaria, poderá ser um importante avanço para o conhecimento da biologia celular do parasito, assim como o desenvolvimento de novas abordagens funcionais para a terapêutica da esquistossomose, visto que nesta fase do ciclo, o parasito sofre intensas mudanças para o estabelecimento da infecção.

7. Perspectivas

S. mansoni é um modelo interessante por apresentar um bom exemplo onde sumorilação pode regular o proteoma de maneira estágio-específica. Isso permite uma rápida adaptação do parasito a ambientes tão distintos como a água e o interior dos hospedeiros contribuindo para o sucesso do parasitismo. Assim, futuros experimentos serão realizados para:

1) identificar os conjugados sumorilados expressos diferencialmente em verme adulto, cercária e MTS-3,5 horas; 1; 2; 3; 5 e 7 dias de cultivo *in vitro* por espectrometria de massa;

2) identificar as proteínas que interagem com SUMO no núcleo dos mesmos estágios analisados, através de imunoprecipitação de cromatina.

Além de se conhecer os alvos da via de sumorilação, podemos identificar também possíveis alvos da via de ubiquitinação, visto que existem muitos alvos que são comuns as duas vias de modificação.

8. Referências Bibliográficas

- AMARAL, R. S.; PORTO, M. A. S. (1994). Evolução e situação atual da esquistossomose no Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.7, p. 83-90.
- ANDREOU AM, TAVERNARAKIS N. (2009). SUMOylation and cell signalling. Biotechnol J.Dec;4(12):1740-52.
- ARAUJO, J. D. (1986). A pesquisa em esquistossomose no Brasil. In Modernos Conhecimentos sobre Esquistossomose Mansônica. Biblioteca da Academia Mineira de Medicina, v.14, p. 9-18.
- AZUMA Y, DASSO M. (2002). A new clue at the nuclear pore: RanBP2 is an E3 enzyme for SUMO1. *Dev Cell*.;2(2):130-1.
- BAILEY D, O'HARE P. (2002). Herpes simplex virus 1 ICP0 co-localizes with a SUMO specific protease. J Gen Virol.;83(12):2951-64.
- BERRIMAN M, HAAS BJ, LOVERDE PT, WILSON RA, DILLON GP, CERQUEIRA GC, et al. (2009). The genome of the blood fluke Schistosoma mansoni. Nature 460 (7253) 352-8.
- BERTIN B, CABY S, OGER F, SASORITH S, WURTZ JM, PIERCE RJ. (2005). The monomeric orphan nuclear receptor Schistosoma mansoni Ftz-F1 dimerizes specifically and functionally with the schistosome RXR homologue, SmRXR1. Biochem Biophys Res Commun.;327(4):1072-82.
- BERTIN B, OGER F, CORNETTE J, CABY S, NOEL C, CAPRON M, FANTAPPIE MR, RUMJANEK FD, PIERCE RJ. (2006). Schistosoma mansoni CBP/p300 has a conserved domain structure and interacts functionally with the nuclear receptor SmFtz-F1. Mol Biochem Parasitol.;146(2):180-91.
- BILHARZ, T. (1952). The centenary of the discovery of Bilharzia. The Journal of the Egyptian Medical Association, v. 35, p. 89-93.
- BLANTON, R.; LOULA, E.C.; PARKER, J. (1987). Two heat-induced proteins are associated with transformation of *Schistosoma mansoni* cercáriae to schistosomula. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84(24), 9011-9014.
- BLANTON, R.E., LICATE, L.S., (1992). Developmental regulation of protein synthesis in schistosomes. Mol. Biochem. Parasitol. 51, 201-208.

- BRAUN L, CANNELLA D, PINHEIRO AM, KIEFFER S, BELRHALI H, GARIN J, HAKIMI MA. (2009). The small ubiquitin-like modifier (SUMO)-conjugating system of *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol. Jan;39(1):81-90.
- BRINDLEY, P.J. (2005) The molecular biology of schistosomes. Trends in Parasitology, v.21, p. 533-536.
- BROCK HW, VAN LOHUIZEN M. (2001). The Polycomb group--no longer an exclusive club? Curr Opin Genet Dev.11(2):175-81.
- CABRAL FJ, GUERRA-SÁ R, RODRIGUES V. (2006). Transcriptional regulation of 19S lid and COP9 signalosome in *Schistosoma mansoni*. FASEB J. 20, p A79.
- CABRAL, F.J., PEREIRA, O.S., JR., SILVA, C.S., GUERRA-SA, R., RODRIGUES, V., (2008). Schistosoma mansoni encodes SMT3B and SMT3C molecules responsible for post-translational modification of cellular proteins. Parasitol Int 57, 172-178.
- CABRAL, F. (2007). Caracterização molecular da via de modificação pós-traducional de proteínas dependente de SUMO em *Schistosoma mansoni*. Tese de doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.
- CABRAL,F. (2002). Caracterização de um gene codificando para uma proteína SUMO- símili em *Schistosoma mansoni*. Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP.
- CABY S, PIERCE RJ. (2009). Quantitative chromatin immunoprecipitation (Q-ChIP) applied to *Schistosoma mansoni*. Mol Biochem Parasitol. Jul;166(1):77-80.
- CHEN Y. (2004). Molecular Mechanism of Sumoylation. Sumoylation. Molecular Biology and Biochemistry. Chapter 3. Edited by Van G. Wilson. Horizon Biosciences.
- CIECHANOVER A, SCHWARTZ AL (1998). The ubiquitin-proteasome pathway: the complexity and myriad functions of proteins death. Proc Natl Acad Sci U S A. 95(6):2727-30.
- CLEGG JA. (1965). In vitro cultivation of *Schistosoma mansoni*. Exp Parasitol. 16:133-47.
- COSSEAU C, AZZI A, SMITH K, FREITAG M, MITTA G, GRUNAU C. (2009). Native chromatin immunoprecipitation (N-ChIP) and ChIP-Seq of Schistosoma

mansoni: Critical experimental parameters. Mol Biochem Parasitol. Jul;166(1):70-6.

- COSTA-CRUZ, J.M.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; FERREIRA, A.W.; CAMARGO, COURA, J. R.; AMARAL, R. S. (2004). Epidemiological and control aspectes of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 99, p.13-19.
- COURA, J. R.; AMARAL, R. S. (2004). Epidemiological and control aspectes of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 99, p.13-19.
- COUX, O., TANAKA, K. and GOLDERG, A.L. (1998). Structure and functions of 20S and 26S proteasomes. Annu. Rev. Biochem. 65, 801-847.
- CRABTREE, J. E.; WILSON, R. A. (1980). Schistosoma mansoni: a scanning electron microscope study of the developing schistosomulum. Parasitology, v. 81, p. 553-564.
- CURWEN, R. S.; WILSON, R. A. (2003). A invasion of skin by schistosome cercarie: some neglected facts. Trends in parasitology, v. 19, p. 63-68.
- CZECHOWSKI T, STITT M, ALTMANN T, UDVARDI MK, SCHEIBLE WR. (2005).Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. Plant Physiol. Sep;139(1):5-17.
- DE MENDONCA RL, BOUTON D, BERTIN B, ESCRIVA H, NOEL C, VANACKER JM, CORNETTE J, LAUDET V, PIERCE RJ. (2002). A functionally conserved member of the FTZ-F1 nuclear receptor family from Schistosoma mansoni. Eur J Biochem.;269(22):5700-11.
- DE MORAES MACIEL R, DE SILVA DUTRA DL, RUMJANEK FD, JULIANO L, JULIANO MA, FANTAPPIÉ MR. (2004). Schistosoma mansoni histone acetyltransferase GCN5: linking histone acetylation to gene activation. Mol Biochem Parasitol. Jan;133(1):131-5.
- DEMARTINO, G. N.; SLAUGHTER, C. A. (1999). The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. The Journal of biological chemistry, v. 274, p. 22123-22126.
- DESTERRO, J.M., THOMSON, J., HAY, R.T., (1997). Ubch9 conjugates SUMO but not ubiquitin. FEBS Lett 417, 297-300.

- DOHMEN RJ, STAPPEN R, MCGRATH JP, FORROVA H, KOLAROV J, GOFFEAU A, VARSHAVSKY A. (1995). An essential yeast gene encoding a homolog of ubiquitin-activating enzyme. J Biol Chem. 270(30):18099-109.
- EL-SAYED NM, BARTHOLOMEU D, IVENS A, JOHNSTON DA, LOVERDE PT. (2004). Advances in schistosome genomics. Trends Parasitol. 20(4):154-7.
- FANG S, LORICK KL, JENSEN JP, WEISSMAN AM. (2003). RING finger ubiquitin protein ligases: implications for tumorigenesis, metastasis and for molecular targets in cancer. Semin Cancer Biol.;13(1):5-14.
- FANTAPPÍÉ MR, DE OLIVEIRA FM, DE MORAES MACIEL DOS SANTOS R, MANSURE JJ, FURTADO DR, DE ABREU DA SILVA IC, RUMJANEK FD. (2008). Control of transcription in Schistosoma mansoni: chromatin remodeling and other regulatory elements. Acta Trop. Nov-Dec;108(2-3):186-93.
- FRANCIS NJ, KINGSTON RE. (2001). Mechanisms of transcriptional memory. Nat Rev Mol Cell Biol. 2(6):409-21.
- GAN-ERDENE T, NAGAMALLESWARI K, YIN L,WU K,PAN ZQ,WILKINSON KD. (2003). Identification and characterization of DEN1, a deneddylase of the ULP family. J Biol Chem. 2003;278(31):28892-900.
- GARCIA-DOMINGUEZ, M., REYES, J. C., (2009). SUMO association with repressor complexes, emerging routes for transcriptional control. Biochim. Biophys. Acta, 1789, 451–459.
- GARCÍA-ESTRADA C, PÉREZ-PERTEJO Y, ORDÓÑEZ D, BALAÑA-FOUCE R, REGUERA RM. (2008). Characterization of the 5' region of the Leishmania infantum LORIEN/MAT2 gene cluster and role of LORIEN flanking regions in post-transcriptional regulation. Biochimie. Sep;90(9):1325-36.
- GEOFFROY MC, HAY RT. (2009). An additional role for SUMO in ubiquitin-mediated proteolysis. Nat Rev Mol Cell Biol. Aug;10(8):564-8.
- GHENDLER, Y.; ARNON, R.; FISHELSON, Z. (1994). *Schistosoma mansoni*: isolation and characterization of Smpi56, a novel serine protease inhibitor. Experimental parasitology, v. 78, p. 121-131.
- GILL G. (2005). SUMO changes Sox for developmental diversity. Mol Cell.;20(4):495-6.

- GIRAUD, M.F., DESTERRO, J.M., NAISMITH, J.H., (1998). Structure of ubiquitinconjugating enzyme 9 displays significant differences with other ubiquitinconjugating enzymes which may reflect its specificity for sumo rather than ubiquitin. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 54, 891-898.
- GOBERT GN, TRAN MH, MOERTEL L, MULVENNA J, JONES MK, MCMANUS DP, LOUKAS A., (2010). Transcriptional changes in *Schistosoma mansoni* during early schistosomula development and in the presence of erythrocytes. PLoS Negl Trop Dis., 9, 600.
- GOEBL MG, YOCHEM J, JENTSCH S, MCGRATH JP, VARSHAVSKY A, BYERS P. (1988). The yeast cell cycle gene CDC34 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. Science, 241(4871):1331-5.
- GOLDRING, O. L.; CLEGG, J. A.; SMITHERS, S. R.; TERRY, R. J. (1976). Acquisition of human blood group antigens by *Schistosoma mansoni*. Clinical and experimental immunology, v. 26, p. 181-187.
- GOLEBIOWSKI F, MATIC I, TATHAM MH, COLE C, YIN Y, NAKAMURA A, COX J, BARTON GJ, MANN M, HAY RT. (2009). System-wide changes to SUMO modifications in response to heat shock. Sci Signal. May 26;2(72).
- GOMES MS, CABRAL FJ, JANNOTTI-PASSOS LK, CARVALHO O, RODRIGUES V, BABA EH, SÁ RG. (2009). Preliminary analysis of miRNA pathway in *Schistosoma mansoni*. Parasitol Int. 58 (1):61-8.
- GONG, X. et al. (2003). Cdk5-mediated inhibition of the protective effects of transcription factor MEF2 in neurotoxicity-induced apoptosis. Neuron 38, 33– 46.
- GREGOIRE S., YANG X.J., (2005). Association with class IIa histone deacetylases upregulates the sumoylation of MEF2 transcription factors, Mol. Cell Biol. 25 2273–2287.
- GROSSMAN, Z., RAM, D., MARKOVICS, A, TARRAB-HAZDAI, R., LANTNER, F., ZIV, E. & SCHECHTER, I. (1990). Schistosoma mansoni: stagespecific expression of muscle specific genes, Expl. Parasitol. 70, 62-71.
- GRYSEELS B, POLMAN K, CLERINX J, KESTENS L. (2006). Human schistosomiasis. Lancet, v. 368, p. 1106-1118.
- GUERRA-SÁ, R.; CASTRO-BORGES, W.; EVANGELISTA, E. A. B.; KETTELHUT, I. C.; RODRIGUES, V. (2005). *Schistosoma mansoni*: Functional proteasomes

are required for development in the vertebrate host. Experimental Parasitology, v. 109, p. 228-236.

- GUMBINER BM. (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. Cell.;84(3):345-57.
- HAMMER E., HEILBRONN R., WEGER S., (2007). The E3 ligase Topors induces the accumulation of polysumoylated forms of DNA topoisomerase I in vitro and in vivo, FEBS Lett. 581 5418–5424.
- HAN ZG, BRINDLEY PJ, WANG SY, CHEN Z. (2009). Schistosoma genomics: new perspectives on schistosome biology and host-parasite interaction. Annu Rev Genomics Hum Genet. 10, 211-40.
- HANG J, DASSO M. (2002). Association of the human SUMO-1 protease SENP2 with the nuclear pore. J Biol Chem. 277(22):19961-6.
- HARROP R.; WILSON, R.A. (1993). Protein synthesis and release by cultured schistosomula of *Schistosoma mansoni*. Parasitology.107 (3), 265-274.
- HAS AL, SIEPMANN TJ. (1997). Pathways of ubiquitin conjugation. FASEB J.;11 (14): 1257-68.
- HEIDEKER J., PERRYJ.J.P., BODDYA M.N., (2009). Genome stability roles of SUMO-targeted ubiquitin ligases DNA. Repair 8 517–524.
- HENDRICKSON DG, HOGAN DJ, MCCULLOUGH HL, MYERS JW, HERSCHLAG D, FERRELL JE, BROWN PO. (2009). Concordant regulation of translation and mRNA abundance for hundreds of targets of a human microRNA. PLoS Biol. Nov;7(11):e1000238.
- HERSHKO A., CIECHANOVER A. (1998). The ubiquitin system. Annu Rev Biochem.;67: 425-479.
- HOCHSTRASSER M. (2001). SP-RING for SUMO: new functions bloom for a ubiquitin-like protein. Cell, 107(1):5-8.
- HOCKLEY, D. J. (1973). Ultrastructure of the tegument of *Schistosoma*. Advances in parasitology, v. 11, p. 233-305.
- HOCKLEY, D. J.; MCLAREN, D. J. (1973). *Schistosoma mansoni*: changes in the outer membrane of the tegument during development from cercária to adult worm. International journal for parasitology, v. 3, p. 13-25, 1973.

- HOFFMANN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. (1934). The sedimentation concentration method in schistosomiasis mansoni. The Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine, v. 9, p. 283-291.
- HOGARTH C, ITMAN C, JANS DA, LOVELAND KL. (2005). Regulated nucleocytoplasmic transport in spermatogenesis: a driver of cellular differentiation? Bioessays.;27(10):1011-25.
- HUANG X, HETFELD BK, SEIFERT U, KAHNE T, KLOETZEL PM, NAUMANN M, BECH-OTSCHIR D, DUBIEL W. (2005). Consequences of COP9 signalosome and 26S proteasome interaction. FEBS J.;272(15):3909-17.
- INIGUEZ-LLUHI JA, PEARCE D. (2000). A common motif within the negative regulatory regions of multiple factors inhibits their transcriptional synergy. *Mol* Cell Biol. 20(16):6040-50.
- ISSAR, N., ROUX E., MATTEI, D., SCHERF, A. (2008). Identification of a novel posttranslational modification in *Plasmodium falciparum*: protein sumoylation in different cellular compartments. Cellular Microbiology.
- ITAHANA Y, YEH ET, ZHANG Y. (2006). Nucleocytoplasmic shuttling modulates activity and ubiquitination-dependent turnover of SUMO-specific protease 2. Mol Cell Biol. 26(12):4675-89.
- JACKSON PK, ELDRIDGE AG. (2002). The SCF ubiquitin ligase: an extended look. Mol Cell.;9(5):923-5.
- JACKSON, PK.. (2001). NEW RING FOR SUMO: wrestling transcriptional responses into nuclear bodies with PIAS family E3 SUMO ligases. Genes Dev.;15: 3053-3058.
- JACOBS JJ, VAN LOHUIZEN M. (2002). Polycomb repression: from cellular memory to cellular proliferation and cancer. Biochim Biophys Acta. 1602(2):151-61.
- JENTSCH S. (1992). The ubiquitin conjugation system. Annu Rev Genet 1992;26:179-207.
- JENTSCH, S.; SCHLENKER, S. (1995). Selective protein degradation: a journey's end within the proteasome. Cell, v. 82, p. 881-884.
- JOAZEIRO CA, WEISSMAN AM. (2000). RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. Cell,;102(5):549-52.

- JOHNSON ES, (2004). Protein modification by SUMO.Annual Rev Biochem. Review. 73, 355-82.
- JOHNSON ES, GUPTA AA. (2001). An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. Cell. 106(6):735-44.
- JOHNSON ES, SCHWIENHORST I, DOHMEN RJ, BLOBEL G. (1997). The ubiquitin-like protein Smt3p is activated for conjugation to other proteins by an Aos1p/Uba2p heterodimer. EMBO J. 16(18):5509-19.
- KAGEY MH, MELHUISH TA, WOTTON D. (2003). The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. Cell. 113(1):127-37.
- KAHYO T, NISHIDA T, YASUDA H. (2001). Involvement of PIAS1 in the sumoylation of tumor suppressor p53. Mol Cell. 8(3):713-8.
- KANG, J., GOCKE, C.B. & YU, H. (2006). Phosphorylation-facilitated sumoylation of MEF2C negatively regulates its transcriptional activity. BMC Biochem. 7, 5.
- KAPP, K.; COUSTAU, C.; WIPPERSTEG, V.; JOURDANE, J.; KUNS, W.; GREVELDING, C. G. (2003). Transplantation of in vitro-generated Schistosoma mansoni mother sporocysts into Biomphalaria glabrata. Parasitology research, v. 91, p. 482-485.
- KATZ, N.; CIMERMAN, S.; CIMERMAN, B. (2003). Esquistossomose Medicina Tropical. São Paulo: Atheneu, p. 175-183.
- KAUL S, BLACKFORD JA, JR., CHO S, SIMONS SS, Jr. (2002). Ubc9 is a novel modulator of the induction properties of glucocorticoid receptors. J Biol Chem;277: 12541-9.
- KIM, K. I., BAEK, S. H., CHUNG, C. H. (2000). Versatile protein tag, SUMO: its enzymology and biological function, J. Cell. Physiol. 191: 257-268.
- KOVALENKO OV, PLUG AW, HAAF T, GONDA DK, ASHLEY T, WARD DC, RADDING CM, GOLUB EI. (1996). Mammalian ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 interacts with Rad51 recombination protein and localizes in synaptonemal complexes. Proc Natl Acad Sci U S A.;93(7):2958-63.
- KUMAR S., TAMURA K., NEI M. MEGA3: (2004). Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics 5:2, Article in press.

- KUREPA, J., WALKER, J. M., SMALLE, J., GOSINK, M.M., DAVIS,S.J., DURHAM, T.L., DONG-YUL, S., VIERSTRA, R.D. (2002). The small ubiquitin modifier (SUMO) protein modification system in Arabidopsis. Accumulation of SUMO -1 and 2 conjugates is increased by stress. J. Biol. Chem. 28: 6862-6872.
- LA SALLE S., SUN F., ZHANG X.D., MATUNIS M.J., HANDEL M.A., (2008). Developmental control of sumoylation pathway proteins in mouse male germ cells, Dev. Biol. 321 227–237.
- LACLETTE, J. P.; SHOEMAKER, C. B.; RICHTER, D.; ARCOS, L.; PANTE, N.; COHEN, C.; BING, D.; NICHOLSON-WELLER, A. (1992). Paramyosin inhibits complement C1. Journal of immunology, v. 148, p. 124-8.
- LANDY, A. (1989). Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda sitespecific recombination. Annu. Rev. Biochem., 58: 913-949.
- LAWSON, J. R; WILSON, R. A. (1980). Metabolic changes associated with the migration of the schistosomulum of *Schistosoma mansoni* in the mammal host. Parasitology, v. 81, p. 325-336.
- LEPTAK, C. L.; MCKERROW, J. H. (1997). Schistosome egg granulomas and hepatic expression of TNF-alpha are dependent on immune priming during parasite maturation. Journal of immunology, v. 158, p. 301-307.
- LI SJ, HOCHSTRASSER M. (2003). The Ulp1 SUMO isopeptidase: distinct domains required for viability, nuclear envelope localization, and substrate specificity. J Cell Biol. Mar 31;160(7):1069-81.
- LI, S.J. AND HOCHSTRASSER, M. (2000). The yeast ULP2 (SMT4) gene encodes a novel protease specifi c for the ubiquitin-like Smt3 protein. Mol. Cell. Biol. *20*, 2367-2377.
- LIMA CD. (2002). Bridging the gap between SCF and ubiquitin transfer. Structure.;10(6):741-2.
- LIN D, TATHAM MH, YU B, KIM S, HAY RT, CHEN Y. (2002). Identification of a substrate recognition site on Ubc9. J. Biol Chem. 277 (24): 21740-8.
- LIN DY, et al. (2006). Role of SUMO-interacting motif in Daxx SUMO modification, subnuclear localization, and repression of sumoylated transcription factors. Mol. Cell;24:341–354.

- LINDBO, J.A.; DOUGHERTY, W.G. (1992). Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts. Virology 189, 725-733.
- LIU LB, OMATAW, KOJIMA I, SHIBATA H. (2007). The SUMO conjugating enzyme Ubc9 is a regulator of GLUT4 turnover and targeting to the insulin-responsive storage compartment in 3T3-1 adipocytes. Diabetes; 56:1977-85.
- LIU, B; SHUAI, K. (2008). Regulation of the sumoylation system in gene expression. Current Opinion in Cell Biology, 20:288–293.
- LIU, Q., JIN, C., LIAO, X., SHEN, Z., CHEN, D.J., CHEN, Y., (1999a). The binding interface between an E2 (UBC9) and a ubiquitin homologue (UBL1). J Biol Chem 274, 16979-16987.
- LIU, Q., YUAN, Y.C., SHEN, B., CHEN, D.J., CHEN, Y., (1999b). Conformational flexibility of a ubiquitin conjugation enzyme (E2). Biochemistry 38, 1415-1425.
- LYAPINA S, COPE G, SHEVCHENKO A, SERINO G, TSUGE T, ZHOU C, WOLF DA, WEI N, SHEVCHENKO A, DESHAIES RJ. (2001). Promotion of NEDD-CUL1 conjugate cleavage by COP9 signalosome. Science. 292(5520):1382-5
- MAHAJAN, R. et al. (1997). A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. Cell. 88: 97-107.
- MAHAJAN, R.L.; DELPHIN, C.; GUAN, T.; GERACE, L. AND MELCHIOR, F. (1998). Molecular characterization of the SUMO-1 modification of RanGAP1 and its role in nuclear envelope association. J. Cell.Biol. 140: 259-270.
- MATHEW, R. C.; BOROS, D. L. (1986). Anti-L3T4 antibody treatment suppresses hepatic granuloma formation and abrogates antigen-induced interleukin-2 production in *Schistosoma mansoni* infection. Infection and immunity, v. 54, p. 820-826.
- MATUNIS M.J., COUTAVAS, E.,BLOBEL, G. (1998). A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran GTPase activating protein between the cytosol and the nuclear pore complex. J. Cell Biol. 135:1457-1470.
- MCKERROW, J. H.; SALTER, J. (2002). Invasion of skin by *Schistosoma* cercáriae. Trends in parasitology, v. 18, p. 193-195.

- MELCHIOR, F., (2000). SUMO--nonclassical ubiquitin. Annu Rev Cell Dev Biol 16, 591-626.
- MELCHIOR, F.; GEISS-FRIEDLANDER, R.; (2007). Concepts in sumoylation: a decade on. Nature Reviews Molecular Cell Biology 8, 947-956.
- MELO, A. L.; COELHO, P. M. Z.(2005) *Schistosoma mansoni* e a Doença. In. NEVES, D.P. Parasitologia Humana. 11 ed., São Paulo: Atheneu, p.193-212
- MENDOZA HM, SHEN LN, BOTTING C, LEWIS A, CHEN J, INK B, HAY RT.(2003). NEDP1, a highly conserved cysteine protease that deNEDDylates Cullins. J Biol Chem. 278(28):25637-43.
- MEULMEESTER E, KUNZE M, HSIAO HH, URLAUB H, MELCHIOR F.(2008). Mechanism & consequences for paralogspecific sumoylation of ubiquitinspecific protease 25. Mol. Cell;30:610–619.
- MOHAN RD, RAO A, GAGLIARDI J, TINI M. (2007). SUMO-1-dependent allosteric regulation of thymine DNA glycosylase alters subnuclear localization and CBP/p300 recruitment. Mol Cell Biol.;27(1):229-43.
- MOSSESSOVA E, LIMA CD. (2000). Ulp1-SUMO crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast. Mol Cell. 5(5):865-76.
- MUKHOPADHYAY, D., DASSO, M., (2007). Modification in reverse: the SUMO proteases. Trends Biochem Sci 32, 286-295.
- NATHAN,D., INGVARSDOTTIR, K., STERNER,D. E., BYLEBYL,G. R. *et al.*, (2006). Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shown dynamic interplay with positive-acting histone modifications. Genes Dev., *20*, 966–976.
- NEUMANN, S. (1992). Regulation of hsp70 gene expression during the life cycle of Schistosoma mansoni, Feinberg Graduate School, The Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel.
- NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M.; (2005). Parasitologia Humana, 11 ed, São Paulo, Atheneu.
- NISHIDA T, TANAKA H, YASUDA H. (2000). A novel mammalian Smt3-specific isopeptidase 1 (SMT3IP1) localized in the nucleolus at interphase. Eur J Biochem. 267(21):6423-7.
- NISHIOKA, M.; MIZUGUCHI, H.; FUJIWARA, S.; KOMATSUBARA, S; KITABAYASHI, M.; UEMURA, H.; TAKAGI, M.; IMANAKA, T. (2001). Long and accurate PCR with a mixture of KOD DNA polymerase and its exonuclease deficient mutant enzyme. J Biotechnol, v. 88, p. 141-149.
- OGER F, DUBOIS F, CABY S, NOËL C, CORNETTE J, BERTIN B, CAPRON M, PIERCE RJ. (2008). The class I histone deacetylases of the platyhelminth parasite Schistosoma mansoni. Biochem Biophys Res Commun. Dec 26;377(4):1079-84.
- OLIVEIRA GC, FRANCO G, VERJOVSKI-ALMEIDA S. (2008). The Brazilian contribution to the study of the *Schistosoma mansoni* transcriptome. Acta Tropica 108 (2-3) 179-182.
- ORLANDO V. (2003). Polycomb, epigenomes, and control of cell identity. Cell. 112(5):599-606.
- PARAENSE, W. L. (1986). Distribuição dos caramujos no Brasil. Modernos conhecimentos sobre Esquistossomose Mansônica no Brasil. Biblioteca da Academia Mineira de Medicina, v. 14, p. 117-128.
- PARIZADE, M.; ARNON, R.; LACHMANN, P. J.; FISHELSON, Z. (1994). Functional and antigenic similarities between a 94-kD protein of *Schistosoma mansoni* (SCIP-1) and human CD59. The Journal of experimental medicine, v. 179, p. 1625-1636.
- PEARCE SH, MERRIMAN TR (2006). Genetic progress towards the molecular basis of autoimmunity. 1: Trends Mol Med. 12(2):90-8.
- PEARCE, E. J.; HALL, B. F.; SHER, A. (1990). Host-specific evasion of the alternative complement pathway by schistosomes correlates with the presence of a phospholipase C-sensitive surface molecule resembling human decay accelerating factor. Journal of immunology, v. 144, p. 2751-2756.
- PICHLER, A., GAST, A., SEELER, J.S., DEJEAN, A., MELCHIOR, F., (2002). The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. Cell 108, 109-120.
- PICHLER, A., KNIPSCHEER, P., SAITOH, H., SIXMA, T.K., MELCHIOR, F., (2004). The RanBP2 SUMO E3 ligase is neither HECT- nor RING-type. Nat Struct Mol Biol 11, 984-991.

PICKART, C. M. (2001). Ubiquitin enters the new millenium. Mol. Cell;8:499-504.

- RAMALHO-PINTO, F.J.; GAZZINELLI, G.; HOPOÇOS, R.E.; MOTA-SANTOS, T.A.; FIGUEIREDO, E.A.; PELLEGRINO, J. (1974). Schistosoma mansoni: defined system for stepwise transformation of cercária to schistosomule in vitro Experimental Parasitology 36, 360-372.
- REISS K, MARETZKY T, LUDWIG A, TOUSSEYN T, DE STROOPER B, HARTMANN D, SAFTIG P. (2005). ;ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. EMBO J. 24(4):742-52.
- REY, L. (1991). Bases da Parasitologia Médica. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- ROBINSON-RECHAVI M, ESCRIVA GARCIA H, LAUDET V. (2003). The nuclear receptor superfamily. J Cell Sci.;116(4):585-6.
- ROSS S, BEST JL, ZON LI, GILL G. (2002). SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization. Mol Cell.;10(4):831-42.
- RYTINKI M M., KAIKKONEN S., PEHKONEN P., JA[°]A[°]SKELA[°]INEN T., PALVIMO J J. (2009). PIAS proteins: pleiotropic interactors associated with SUMO. Cell. Mol. Life Sci. 66:3029–3041.
- SACHDEV S, BRUHN L, SIEBER H, PICHLER A, MELCHIOR F, GROSSCHEDL R. (2001). PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. Genes Dev. 15(23):3088-103.
- SAITOH H, SPARROW DB, SHIOMI T, NISHIMOTO T, MOHUN TJ, DASSO M. (1998). Ubc9p and the conjugation of SUMO-1 to RanGAP1 and RanBP2. : Curr Biol. 1998;8(2):121-4.
- SAITOH H. (2004). Unraveling the SUMO-2/3 conjugation and deconjugation pathways. Sumoylation . Molecular Biology and Biochemistry. Chapter 6. Edited by Van G. Wilson, Horizon bioscience.
- SAITOH, H., HINCHEY, J., (2000). Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. J Biol Chem 275, 6252-6258.
- SAMBON LW. (1907). Remarks on *Schistosoma mansoni*. Am J Trop Med Hyg 10: 303-304.

- SAPETSCHNIG A, RISCHITOR G, BRAUN H, DOLL A, SCHERGAUT M, MELCHIOR F,SUSKE G. (2002). Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1. *EMBO J*.;21(19):5206-15.
- SATIJN DP, OLSON DJ, VAN DER VLAG J, HAMER KM, LAMBRECHTS C, MASSELINK H, GUNSTER MJ, SEWALT RG, VAN DRIEL R, OTTE AP.(1997). Interference with the expression of a novel human polycomb protein, hPc2, results in cellular transformation and apoptosis. Mol Cell Biol.;17(10):6076-86.
- SATIJN DP, OTTE AP. (1999). Polycomb group protein complexes: do different complexes regulate distinct target genes? Biochim Biophys Acta.;1447(1):1-16.
- SCHWARZ SE, MATUSCHEWSKI K, LIAKOPOULOS D, SCHEFFNER M, JENTSCH S. (1998). The ubiquitin-like proteins SMT3 and SUMO-1 are conjugated by the UBC9 E2 enzyme. Proc Natl Acad Sci U S A.;95(2):560-4.
- SEELER, J.S., DEJEAN, A., (2003). Nuclear and unclear functions of SUMO. Nat Rev Mol Cell Biol 4, 690-699.
- SEUFERT W; JENTSCH S; SOMMER T; REINS H.A. (1990). Ubiquitin conjugatin enzymes: novel regualtors of eukaryotic cells. Trends Biochem Sci;15(5):195-198.
- SEUFERT, W., FUTCHER, B., JENTSCH, S., (1995). Role of a ubiquitin-conjugating enzyme in degradation of S- and M-phase cyclins. Nature 373, 78-81.
- SHEN, L.N. et al. (2006) The structure of SENP1-SUMO-2 complex suggests a structural basis for discrimination between SUMO paralogues during processing. Biochem. J. 397, 279–288.
- SHER, A.; HALL, B. F.; VADAS, M. A. (1978). Acquisition of murine major histocompatibility complex gene products by schistosomula of *Schistosoma mansoni*. The Journal of experimental medicine, v. 148, p. 46-57.
- SHIIO,Y., EISENMAN, R.N., (2003). Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100, 13225–13230.
- SMITHERS SR, TERRY RJ. (1965). The infection of laboratory hosts with cercáriae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. Parasitology. 55 (4) :695-700.

- SNARY, D.; SMITH, M. A.; CLEGG, J. A. (1980). Surface proteins of Schistosoma mansoni and their expression during morphogenesis. European journal of immunology, v. 10, p. 573-575.
- SNOWDEN AW, ANDERSON LA, WEBSTER GA, PERKINS ND. (2000). A novel transcriptional repression domain mediates p21(WAF1/CIP1) induction of p300 transactivation. Mol Cell Biol. 20(8):2676-86.
- STADECKER, M. J. (1992). The role of T-cell anergy in the immunomodulation of schistosomiasis. Parasitology Today, v.8, p. 199-204.
- STIREWALT, M. A. (1974) *Schistosoma mansoni:* cercaria to schistosomule, Adv. Parasitol. 12, 11 5 182.
- STRUNNIKOV AV, ARAVIND L, KOONIN EV. (2001). Saccharomyces cerevisiae SMT4 encodes an evolutionarily conserved protease with a role in chromosome condensation regulation. Genetics. 158 (1): 95-107.
- TAKAGI, M.; NISHIOKA, M.; KAKIHARA, H.; KITABAYASHI, M.; INOUE, H.; KAWAKAMI, B.; OKA, M; IMANAKA, T. (1997). Characterization of DNA polymerase from Pyrococcus sp. Strain KOD1 and its application to PCR. Appl Environ Microbiol, v.63, p. 4504–4510.
- TAKAHASHI, Y., KAHYO, T., TOH, E. A., YASUDA, H., KIKUCHI, Y. (2001). Yeast UII1/Siz1 Is a Novel SUMO1/Smt3 Ligase for Septin Components and Functions as an Adaptor between Conjugating Enzyme and Substrates. J. Biol. Chem. 276:48973-48977.
- TAKEICHI M. (1991). Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*.;251(5000):1451-5.
- TANAKA, M.; HIRAI, H.; LOVERDE, P.T.; NAGAFUCHI, S.; FRANCO, G.R. SIMPSON, A.J.G.; PENA, S.D.J. (1995). Yeast artificial chromosome (YAC)based genome mapping of *Schistosoma mansoni*. Molecular and biochemical parasitology, v. 69, p. 41-51.
- TATHAM MH, KIM S, YU B, JAFFRAY E, SONG J, ZHENG J, RODRIGUEZ MS, HAY RT, CHEN Y. (2003). Role of an N-terminal site of Ubc9 in SUMO1, 2 e 3 binding and conjugation. Biochemistry. 42 (33): 9959-69.
- TATHAM, M. H., GEOFFROY, M. C., SHEN, L., PLECHANOVOVA, A. *et al.*, (2008). RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase required for arsenic-induced PML degradation. Nat. Cell Biol., *10*, 538–546.

- TEMPÉ D, PIECHACZYK M, BOSSIS G. (2008). SUMO under stress. Biochem Soc Trans. Oct;36(Pt 5):874-8.
- TONG H, HATEBOER G, PERRAKIS A, BERNARDS R, SIXMA TK. (1997). Crystal structure of murine/human Ubc9 provides insight into the variability of the ubiquitin-conjugating system. J Biol Chem.;272(34):21381-7.
- TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 76, p. 4350-4354.
- VALDEZ BC, HENNING D, PERLAKY L, BUSCH RK, BUSCH H. (1997). Cloning and characterization of Gu/RH-II binding protein. Biochem Biophys Res commun. 234 (2): 335-40.
- VAN HELLEMOND, J. J.; RETRA, K.; BROUWERS, J. F.; van BALKOM, B. W.; YAZDANBAKHSH, M.; SHOEMAKER, C. B.; TIELENS, A. G. (2006). Functions of the tegument of schistosomes: clues from the proteome and lipidome. International journal for parasitology, v. 36, p. 691-699.
- VERGER A, PERDOMO J, CROSSLEY M. (2003). Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. EMBO Rep. 4(2):137-42.
- VERJOVSKI-ALMEIDA S, LEITE LC, DIAS-NETO E, MENCK CF, WILSON RA. (2004). Schistosome transcriptome: insights and perspectives for functional genomics. Trends Parasitol. 20(7):304-8.
- VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; DEMARCO, R.; MARTINS, E.A.; et al (2003) Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. Nat.Genet. 35, 148-157.
- WANG LF, ZHU HD, MIAO SY, CAO DF, WU YW, ZONG SD, KOIDE SS. (1999). Molecular cloning and characterization of a novel testis-specific nucleoporinrelated gene. Arch Androl. 42(2):71-84.
- WATANABE TK, FUJIWARA T, KAWAI A, SHIMIZU F, TAKAMI S, HIRANO H, OKUNO S, OZAKI K, TAKEDA S, SHIMADA Y, NAGATA M, TAKAICHI A, TAKAHASHI E, NAKAMURA Y, SHIN S. (1996). Cloning, expression, and mapping of UBE2I, a novel gene encoding a human homologue of yeast ubiquitin-conjugating enzymes which are critical for regulating the cell cycle. Cytogenet Cell Genet. 72(1):86-9.

- WATTS, F. (2004). SUMO proteases. Sumoylation. Molecular biology and Biochemistry. Chapter 4. Edited by Van G. Wilson. Horizon Bioscience.
- WHO. (2008). Prevention and control of schistosomiasis and soiltransmited helminthiasis. Technical report series. Geneva: World Health Organization.

WILSON RA. (1979). Introdução à Parasitologia. Ed. EDUSP.

- WILSON, R. A. (1980). Introdução à Parasitologia. Tradução: Cláudio Santos Ferreira e Annete Silva Foronda. São Paulo; EPU; Ed. da Universidade de São Paulo.
- WILSON, R. A.; BARNES, P. E. (1974). The tegument of *Schistosoma mansoni*: observations on the formation, structure and composition of cytoplasmic inclusions in relation to tegument function. Parasitology, v. 68, p. 239-258.
- WILSON, R. A.; DRASKAU, T.; MILLER, P.; LAWSON, J. R. (1978). *Schistosoma mansoni*: the activity and development of the schistosomulum during migration from the skin to the hepatic portal system. Parasitology, v. 77, p. 57-73.
- WU F., ZHU S., DING Y., BECK WT., YUANMO Y., (2009). MicroRNA-mediated Regulation of Ubc9 Expression in Cancer Cells. Clin Cancer Res;15(5)March1.
- WU Q, LIN XF, YE XF, ZHANG B, XIE Z, SU WJ. (2004). Ubiquitinated or sumoylated retinoic acid receptor alpha determines its characteristic and interacting model with retinoid X receptor alpha in gastric and breast cancer cells. J Mol Endocrinol.;32(3):595-613.
- XU, Z. AND AU, S.W. (2005) Mapping residues of SUMO precursors essential in differential maturation by SUMO-specific protease, SENP1. Biochem. J. 386, 325–330.
- YANG SH, GALANIS A, WITTY J, SHARROCKS AD. (2006). An extended consensus motif enhances the specificity of substrate modification by SUMO. *EMBO J*. 25(21):5083-93.
- YEH ET, GONG L, KAMITANI T. (2000). Ubiquitin-like proteins: new wines in new bottles. Gene. 248(1-2):1-14.

- YOKOYAMA N, HAYASHI N, SEKI T, PANTE N, OHBA T, NISHII K, KUMA K, HAYASHIDA T, MIYATA T, AEBI U, et al. (1995). A giant nucleopore protein that binds Ran/TC4. Nature. 376(6536):184-8.
- YUCKENBERG, P. D.; POUPIN, F.; MANSOUR, T. E. (1987). *Schistosoma mansoni*: protein composition and synthesis during early development; evidence for early synthesis of heat shock proteins. Experimental parasitology, v. 63, p. 301-311.
- ZINOVYEV A, MOROZOVA N, NONNE N, BARILLOT E, HAREL-BELLAN A, GORBAN AN. (2010). Dynamical modeling of microRNA action on the protein translation process. BMC Syst Biol. Feb 24;4:13.

9. Anexos



Anexo 1: Figura mostrando os *plots* de amplificação referente à curva de eficiência para os genes *Smsmt3, Smaos1, Smuba2, Smubc9, Smpias, Smranbp2, Smsenp1* e *Smsenp7* do *S. mansoni*, utilizando diluição seriada de 4x de cDNA de cercária. Em X está demonstrado o valor dos ciclos de PCR e em Y os valor de Δ Rn. As intercessões da linha verde com as curvas indicam o CT da curva de amplificação. A sobreposição dos diversos *plots* de amplificação mostra que há grande sobreposição entre corridas diferentes para o mesmo mRNA analisado.



Anexo 2: Figura mostrando as curvas padrão referentes aos genes *Smsmt3, Smaos1, Smuba2, Smubc9, Smpias, Smranbp2, Smsenp1* e *Smsenp7* do *S. mansoni.* Em X estão demonstrados os valores de Log da concentração de cDNA e em Y os valores de C_T correspondes a cada diluição. À direita do gráfico estão representado os valores de *slope* e de coeficiente de linearidade.



Anexo 3: Figura mostrando as curvas de dissociação dos *iniciadores* específicos para os genes *Smsmt3, Smaos1, Smuba2, Smubc9, Smpias, Smranbp2, Smsenp1* e *Smsenp7* do *S. mansoni.* No eixo x está representado a temperatura de dissociação do *amplicon* gerado pela reação de PCR e no eixo Y a derivada do valor de emissão de fluorescência. A presença de um único pico mostra que provavelmente não há formação de dímeros durante os ciclos de amplificação.

Anexos