

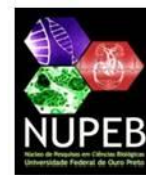
LEANDRO SIMÕES DIAS

**ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE SUBUNIDADES
CONSTITUINTES DO PROTEASSOMA 26S EM FASES LARVAIS E ADULTAS DO
Schistosoma mansoni.**

Ouro Preto – MG, março de 2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS



ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE SUBUNIDADES
CONSTITUINTES DO PROTEASSOMA 26S EM FASES LARVAIS E ADULTAS DO
Schistosoma mansoni.

AUTOR: Leandro Simões Dias

ORIENTADOR: Prof. Dr. William de Castro Borges

COORIENTADOR: Profa. Dra. Renata Guerra de Sá

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

Ouro Preto – MG, março de 2013

D541a

Dias, Leandro Simões.

Análise do perfil de expressão de subunidades constituintes do proteossoma 26S em fases larvais e adultas do *Schistosoma mansoni* [manuscrito] / Leandro Simões Dias. - 2013.

108f.: il., color; tabs.; mapas.

Orientador: Prof. Dr. William de Castro Borges

Co-orientadora: Profa. Dra. Renata Guerra de Sá.

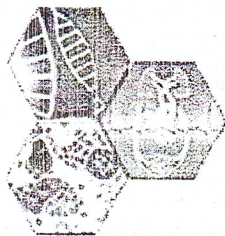
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto.
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em
Ciências Biológicas.

Área de concentração: Bioquímica Estrutural e Biologia Molecular.

1. *Schistosoma mansoni* - Teses. 2. Eletroforese bidimensional -
Teses. 3. Clonagem - Teses. I. Borges, William de Castro. II. Sá, Renata
Guerra de. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 602.7:577.212

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br



Universidade Federal de Ouro Preto
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

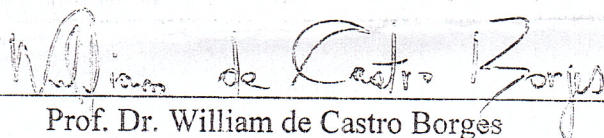


Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

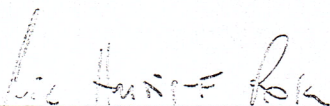
“Análise do perfil de expressão de subunidades constituintes do Proteossoma 26S em fases larvais e adultas do *Schistosoma mansoni*”

Aos quatorze dias do mês de Março de 2013, às 09:00, na Sala Multimídia do ICEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação do aluno Leandro Simões Dias. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pelo candidato e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por APROVAR o candidato. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

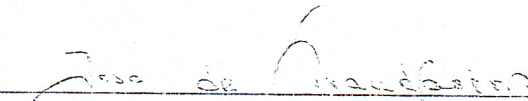
Membros da Banca Examinadora:



Prof. Dr. William de Castro Borges
Presidente



Prof. Dr. Luiz Henrique Rosa
Examinador (UFMG)



Prof. Dr. Ieso de Miranda Castro
Examinador (UFOP)

DATA DA DEFESA: 14/03/2013

Este trabalho foi realizado no LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR (LBBM) E NO LABORATÓRIO DE ENZIMOLOGIA E PROTEÔMICA (LEP) – ICEB/NUPEB/UFOP, com auxílio da Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

Dedico esta dissertação aos meus pais, que são as pessoas mais importantes da minha vida. Obrigado por tudo que fizeram e fazem por mim; obrigado pelo amor, pela paciência nos dias de desabafo e por serem os melhores pais que alguém pode ter. Agradeço muito à Deus pelo presente que me deu quando nasci que foi ter pais tão especiais. **AMO MUITO VOCÊS!**

“Um dos maiores prazeres da vida é fazer aquilo que um dia duvidaram que você não seria capaz!”

Anônimo

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por ser minha luz, minha base, meu conforto e meu amor incondicional.

Às **minhas irmãs, Maria Eduarda e Lívia Maria** por serem mais que irmãs.

Obrigada por mesmo longe fazerem-se presente em minha vida e torná-la mais feliz.

Ao **Profa. Dra. Renata Guerra cota de Sá**, pela confiança depositada durante o desenvolvimento do mestrado e iniciação científica. Obrigado pela orientação, carinho, paciência, esforço e por todo o aprendizado durante todos esses anos. Sou muito grato a você!

Ao **Prof. Dr. William de Castro Borges**, pela orientação e por todos os ensinamentos. Obrigado por ser sempre solícito, paciente e disposto a colaborar para a finalização deste trabalho.

Aos amigos/irmãos da gloriosa **República Os Bartira**, por fazerem parte do meu crescimento pessoal e minha formação profissional nesses 7 anos vividos em Ouro Preto. Aos **Bartiras Cascão e A.A** pela amizade durante a convivência diária na república.

Àos colegas de trabalho Victor, Leandro Nerso, Matheus Gomes, Léo pipeta, Roenick, Lula, André, Thalita, Tripa, Agua Mole, Nathália Barbosa, Lorrán, Karina Silva, Nayara Martino, Listerine, Roberta D`Angelo sempre muito dispostos a ajudar e contribuir para a conclusão deste trabalho. Obrigado pelos conselhos e por toda a ajuda.

Agradeço também a todos do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBBM).

Aos **Técnicos Ezequiel Pereira, Eduardo e José Henrique Braga Fortes**, muito obrigado por toda a ajuda e conselhos.

Aos **laboratórios do NUPEB**, pela permissão e ajuda no uso de diversos aparelhos.

Por fim, agradeço a todos que de qualquer maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas	xiii
Lista de figuras	xvi
Lista de tabelas	xviii
Resumo	xix
Abstract	xx

1. Introdução

1.1. Aspectos gerais da Esquistossomose.....	2
1.2. Ciclo biológico do parasito <i>Schistosoma mansoni</i>	4
1.3. Modificação pós-traducional de proteínas – Ubiquitinação.....	7
1.4. A via proteolítica intracelular dependente de ubiquitina-proteassoma.....	10
1.5. Rpn10: Subunidade da partícula regulatória 19S importante na marcação de substratos poliubiquitinados.....	18

2. Objetivos

3.1. Objetivo geral.....	23
3.2. Objetivos específicos.....	23

3. Materiais e métodos

3.1. Obtenção das fases do parasito <i>Schistosoma mansoni</i>	
3.1.1.Obtenção de ovos e miracídeos.....	25
3.1.2.Obtenção de cercárias e transformação mecânica em esquistossômulos.....	26
3.1.3.Obtenção de vermes adultos.....	27
3.2. Extração de RNA total de <i>S. mansoni</i>	27
3.3. Obtenção dos cDNAs - RT-PCR.....	28
3.4. Purificação dos produtos de PCR.....	30
3.5. Preparação de bactérias cálcio-competentes.....	30
3.6. Transformação de bactérias cálcio-competentes.....	31
3.7. PCR de colônia.....	31
3.8. Expressão em sistema heterólogo de proteínas recombinantes.....	32
3.8.1. Clonagem e Expressão de proteínas recombinantes em <i>Escherichia coli</i>	32
3.8.2. Indução da expressão de proteínas recombinantes através de IPTG.....	35
3.8.3. Purificação de proteínas recombinantes através de coluna de Ni-NTA.....	36
3.8.4. Obtenção de antisoro policlonal.....	37

3.9. Análise do nível de expressão da proteína Rpn10 e suas possíveis isoformas durante o ciclo de vida do parasito <i>S. mansoni</i>	
3.9.1. Preparação do extrato protéico de <i>Schistosoma mansoni</i> : ovos, miracídios, cercárias, esquistossômulos (3,5 horas) e vermes adultos.....	37
3.9.2. SDS-PAGE.....	38
3.9.3. Eletroforese bidimensional (2-D SDS-PAGE).....	39
3.9.4. Ensaio de <i>Western blot</i> 1D através de revelação por peroxidase (Quimioluminescência).....	40

4. Resultados

4.1. Expressão em sistema heterólogo de proteínas recombinantes.....	43
4.1.2. Obtenção do cDNA para Alfa7 e Rpn10 (C-terminal).....	43
4.1.3. Clonagem e expressão das proteínas recombinantes em <i>E. coli</i>	44
4.1.4. Purificação da proteína heteróloga Rpn10 (inteira).....	47
4.2. Produção de anticorpos policlonais específicos contra SmRpn10 (inteira) em camundongos.....	48
4.3. Perfil Proteômico da proteína Rpn10 (inteira).....	49
4.3.1. Extrato total das diferentes fases de desenvolvimento do <i>Schistosoma mansoni</i>	49
4.3.2. Perfil eletroforético bi-dimensional da subunidade Rpn10 da partícula regulatória 19S nas fases de ovos, miracídios, cercárias, esquistossômulos (3,5 horas) e vermes adultos do parasito <i>Schistosoma mansoni</i> utilizando o anticorpo anti-Rpn10 total.....	51

4.3.3. Expressão da proteína SmRpn10 em extratos protéicos de ovos, miracídios, cercárias, esquistossômulos (3,5 horas) e vermes adultos utilizando o anticorpo anti-Rpn10 total.....	55
5. Discussão.....	57
6. Conclusão.....	68
7. Referências Bibliográficas.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP – *Adenosine diphosphate*

ATP – *Adenosine triphosphate*

ATPásicas - *Regulatory particle of triple-ATPase*

BCA – *Bicinchoninic Acid*

cDNA - DNA complementar

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CSN- Cop 9 Signalosome

CP – Proteassoma 20S

ESTs - *Expressed Sequence Tags*

DTT – Ditioneitol

E1 – Enzimas ativadoras

E2 – Enzimas conjugadoras

E3 – Enzimas ligases

IEF - Isoeletrofocalização

kDa – KiloDaltons

mA – Miliampere

MDa – MegaDaltons

MG115 – Cbz-Leu-Leu-norvalinal

MG132 – Cbz-Leu-leucinal

MPTs – Modificações pós-traducionais

Ni-NTA - (Ni⁺⁺-nitrilo-tri-acetic-acid).

ORESTES - *Open Reading Frame Expressed Sequence Tags*

PA – *Proteasome activator*

PA700 - *Proteasome Activator 700 kDa*

PBS – Tampão fosfato salino

pI – Ponto isoeletrico

PI31 – *Protein inhibitor of 31 kDa*

PVDF – *Polyvinylidene Fluoride*

qRT-PCR – *Quantitative real-time PCR*

RP – Particula regulatória 19S

Rpn – *Regulatory particle non-ATPase*

Rpt – *Regulatory particle of triple-ATPase*

RT-PCR Reverse - *Transcription-Polymerase Chain Reaction*

SDS – Dodecil sulfato de sódio

Sm - *Schistosoma mansoni*

Tris – Tris-(hidroximetil)-aminometano

UAF – Unidades arbitrárias de fluorescência

UIM - Domínio de ligação à ubiquitina

Ub – Ubiquitina

UV – Ultravioleta

V – Volts

WHO – *World Health Organization*

µl - Microlitro

Aminoácido	Abreviatura	Símbolo
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Aspartato	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamato	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição mundial da Esquistossomose.....	4
Figura 2: Ciclo biológico do parasito <i>S. mansoni</i>	5
Figura 3: Processos celulares dependentes da ubiquitinação.....	9
Figura 4: Estrutura do proteassoma 20S em eucariotos.....	12
Figura 5: A via proteolítica intracelular dependente de ubiquitina-proteassoma.....	14
Figura 6: Quantidade relativa das diferentes formas do proteassoma 20S encontradas no citosol de células <i>HeLa</i>	16
Figura 7: Mecanismo proposto de reconhecimento de substratos poliubiquitinados....	19
Figura 8: Representação esquemática do proteassoma 26S.....	20
Figura 9: Mapa do vetor de entrada pDONR™221 (Invitrogen).....	33
Figura 10: Mapa do vetor pDEST™17 (Invitrogen).....	34
Figura 11: Análise dos produtos de RT- PCR correspondentes aos transcritos para Alfa 7 e Rpn10 (C-terminal).....	43
Figura 12: Análise dos produtos de PCR de colônia correspondentes aos genes (A)Alfa 7 e (B)Rpn10 (C-terminal).....	44
Figura 13: Expressão das proteínas recombinantes Alfa 7 e Rpn10.....	45
Figura 14: Região codificadora do transcrito para a Rpn10.....	46

Figura 15: Expressão da proteína recombinante Rpn10 inteira.....	47
Figura 16: Purificação da proteína heteróloga Rpn10 (inteira) por cromatografia de afinidade.....	48
Figura 17: Soro antiRpn10 dos camundongos testado contra a proteína recombinante Rpn10.....	49
Figura 18: Extrato bruto fracionado em SDS-PAGE gel 12%. 1- ovos 2- miracidios, 3- cercárias 4- esquistossômulos (3,5 horas) 5- verme Adulto (Hamster) 6- verme Adulto (camundongo).....	51
Figura 19: Eletrofore bidimensional 2D no estágio de Ovos.....	52
Figura 20: Eletrofore bidimensional 2D no estágio de Miracídios.....	52
Figura 21: Eletrofore bidimensional 2D no estágio de Cercárias.....	53
Figura 22: Eletrofore bidimensional 2D no estágio de Esquistossômulos.....	53
Figura 23: Eletrofore bidimensional 2D no estágio de Verme adulto(Hamster).....	54
Figura 24: Eletrofore bidimensional 2D no estágio de Verme adulto(Camundongo).....	54
Figura 25: Reatividade do anticorpo frente a Rpn10.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores sintetizados para amplificação do gene Alfa7 e Rpn 10 (C-terminal).....29

Tabela 2: Anticorpo primário utilizado na metodologia de *Western blot* com sua diluição de uso, e respectivo anticorpo secundário e proteína detectada.....41

Resumo

Análises pós genômicas têm propiciado avanços significativos sobre a biologia do parasito *Schistosoma mansoni*. Particularmente, experimentos de transscissômica em larga escala apontaram genes essenciais, ligados a vias de degradação proteica intracelular, com expressão diferencial ao longo do ciclo de vida do parasito. Tais achados corroboram com as marcantes alterações fenotípicas observadas após a penetração no hospedeiro vertebrado e o extenso remodelamento corporal necessário para a instalação e maturação do verme adulto no sistema porta-hepático. A presente investigação objetivou determinar o perfil de expressão de subunidades constituintes do proteossoma 26S, em fases larvais e adultas do verme. Neste intuito, oligonucleotídeos específicos para amplificação parcial das subunidades Rpn10 e alfa 7 foram confeccionados. Após a extração de RNA total de vermes adultos seguido de RT-PCR, observou-se amplificação de produtos de aproximadamente 251 e 753 pb, de massas moleculares esperadas para os amplicons relacionados às subunidades Rpn10 e alfa 7, respectivamente. Os produtos de amplificação foram purificados do gel e clonados utilizando o sistema Gateway®. Novos ciclos de amplificação demonstraram a obtenção de plasmídeos recombinantes para as duas subunidades. Entretanto, experimentos de expressão heteróloga em bactérias BL21 não permitiram a detecção e purificação das subunidades alfa 7 e Rpn10 recombinantes no lisado celular. Como proposta alternativa, utilizou-se o plasmídeo PET28a® recombinante contendo a região codificadora da subunidade Rpn10 de *S. mansoni*, gentilmente cedido pela Dra. Enyara Rezende Moraes (Laboratório de Biologia Molecular de Parasitos - Universidade de São Paulo). Após transformação em BL21, seleção de clones recombinantes e indução com IPTG, análises por SDS-PAGE e coloração do gel por Coomassie revelaram a expressão de

uma proteína recombinante de massa molecular em torno de 55 kDa. Uma preparação de Rpn10 em alto grau de homogeneidade foi obtida após purificação por afinidade em resina de níquel. Anticorpos policlonais anti-SmRpn10 recombinante foram gerados em camundongos *Swiss* e utilizados para avaliação do perfil de expressão de Rpn10 em extratos solúveis de cercárias, esquistossômulos (de 3h e 3 dias), vermes adultos, ovos e miracídeos. A partir de eletroforese bidimensional, utilizando separação isoelétrica em gel de gradiente linear (pH 3-10) e *Western blotting*, foram detectadas 3 isoformas para Rpn10 em todos os estágios investigados. Essas apresentaram aumento de expressão no estágio de cercária, o qual foi novamente confirmado por *Western blotting* 1D comparando as fases analisadas. Este achado refere-se ao primeiro relato da existência de isoformas para a subunidade Rpn10 constituinte do proteossoma 26S e agrega diversidade ao perfil de subpopulações possíveis e alternativas deste complexo proteolítico em *S. mansoni*.

Abstract

Post-genomic analyses have allowed significant advances towards understanding the biology of the human parasite *Schistosoma mansoni*. In particular, large scale transcriptome experiments highlighted essential genes related to proteolytic pathways exhibiting differential expression profiles throughout the parasite's life cycle. Such findings corroborate with the marked phenotypic alterations observed after penetration into the vertebrate host and the extensive body remodeling required for maturation of the adult stage in the hepatic portal system. The present investigation aimed to determine the expression profile of 26S proteasome constituent subunits in both larvae and adult stages. Specific oligonucleotides were first designed for amplification of the subunits Rpn10 and alpha 7. After RNA extraction from adult worms and RT-PCR, amplification products at the expected molecular size (~250 and 750 bp) related to Rpn10 and alpha 7 subunits, respectively, were obtained. The amplification products were purified from the agarose gel and cloned using the Gateway® system. New amplification cycles demonstrated the production of recombinant plasmids for the two subunits under investigation. However, heterologous expression in *Escherichia coli* (BL21 strain) did not allowed detection and purification of the respective recombinant proteins from cell lysates. As an alternative, the PET28a® recombinant plasmid containing the full length Rpn10 subunit of *S. mansoni* was kindly provided by Dr. Enyara R. Morais (Laboratório de Biologia Molecular de Parasitos – Universidade de São Paulo) and employed in this study. After transformation of BL21 *E. coli* cells, selection of recombinant clones and induction of expression using IPTG, SDS-PAGE analysis revealed the expression of a recombinant protein exhibiting molecular mass around 55 kDa. A homogenous fraction of His-tagged recombinant Rpn10 was obtained

after its purification from the cell lysate using a nickel column. Polyclonal antibodies anti-Rpn10 were raised in *Swiss* mice and used for evaluation of the expression profile of this subunit in soluble extracts from cercariae, 3h schistosomula, adult worms, eggs and miracidia. A two dimensional gel approach (2-DE), using linear pH3-10 gradient for the first dimension, coupled to Western blotting revealed the existence of at least 3 isoforms for Rpn10 subunit in all investigated stages. Such isoforms exhibited up-regulation in the cercariae, which was later confirmed by a comparative 1D Western blotting experiment. To our knowledge, this finding refers to the first report for the existence of Rpn10 isoforms and contributes adding further complexity to alternative possibilities of 26S proteasome assembly in *S. mansoni*.

Introdução

1. Introdução

1.1 Aspectos gerais da Esquistossomose

A primeira descrição dos aspectos clínicos da esquistossomose mansônica ocorreu em 1847 (KATZ., 2003). Após cinco anos, o mesmo parasito passou a ser conhecido no Egito, daí a denominação bilharziose usada em alguns países (AMARAL e PORTO., 1994). A hipótese da existência de duas espécies de *Schistosoma* responsáveis pela parasitose no homem foi proposta pelo médico inglês Patrick Manson quarenta anos depois. Atualmente se tem registros de muitas outras: *S. japonicum* (esquistossomose japonesa), *S. haematobium*, (esquistossomose hematúria, vesical ou urinária), *S. intercalatum* (esquistossomose intestinal, típica de países da África Central), *S. mekongi* (esquistossomose intestinal, comum no vale do rio Mekong, no Laos e Camboja), *S. bovis*, *S. mattheei* e *S. rodhaini* (esquistossomosomas de animais que, eventualmente, parasitam o homem na África) e *S. mansoni* (esquistossomose mansônica, única espécie de interesse médico para a saúde pública brasileira) (KATZ., 2003).

A espécie *Schistosoma mansoni*, existente no Brasil, foi descrita pelo inglês Sambon em 1907, sua nomeação é uma homenagem a Manson. Logo após essa descrição, o brasileiro Pirajá da Silva identificou como uma nova espécie encontrada na Bahia e a chamou de *Schistosoma americanum*. Mais tarde soube-se que Sambon já havia feito a sua descrição, mas a pequena quantidade de vermes estudados suscitou dúvidas em relação à validade do trabalho. Com as observações de Pirajá da Silva as dúvidas taxonômicas foram sanadas. Ele realizou uma série de autópsias de casos

humanos de onde foram retirados vermes, além de numerosos exames de fezes (KATZ., 2003).

As primeiras áreas endêmicas da esquistossomose mansônica, no Brasil, ocorreram na região Nordeste e no estado de Minas Gerais. A partir de então, a doença se disseminou pelo país. Na região Sudeste, focos isolados surgiram no Rio de Janeiro, Espírito Santo e em São Paulo. O norte do Paraná, no Sul do país, também se tornou uma área endêmica. Outros três focos da doença foram descritos, recentemente, em mais dois estados sulinos: dois em Santa Catarina e um no Rio Grande do Sul (WHO., 2010; KATZ., 2003).

Trabalhos realizados pela Organização Mundial da Saúde apontam a esquistossomose como uma doença de alto impacto em relação ao número de pessoas afetadas e incapacitadas. Na maioria dos casos observam-se infecções crônicas especialmente em populações de países de baixa renda, devido a grande falta de saneamento básico tornando um sério problema de saúde pública, econômico e social (WHO., 2010). Considerada uma das mais relevantes doenças helmínticas, a esquistossomose é popularmente conhecida como xistose, doença do caramujo ou bilharziose. O agente etiológico dessa parasitose é um trematódeo do gênero *Schistosoma*, família Schistosomatidae, classe Trematoda e sub-classe Digenea, o *Schistosoma mansoni*. Essa doença acomete milhões de pessoas, e predomina no continente africano (Figura 1). Acima de 25 milhões de pessoas no Brasil vivem em áreas endêmicas e 2,5 milhões apresentam sintomas da doença (CARVALHO *et al.*, 2008).

caramujos, através de sua hemocele e tomá-los como hospedeiro intermediário. As respostas que medeiam os mecanismos envolvidos no reconhecimento do caramujo incluem: 1) o miracídio responderia a estímulos físicos do ambiente e, 2) os estímulos químicos originados pelo hospedeiro invertebrado (KAPP *Et al.*, 2003).

Os moluscos do gênero *Biomphalaria* representam um importante papel do ponto de vista epidemiológico (THOMAS *Et al.*, 2000). A suscetibilidade ou resistência ao parasitismo é uma característica condicionada geneticamente, podendo variar de acordo com o tamanho e idade dos caramujos de forma que os jovens mostram-se mais suscetíveis (RICHARDS e MERRIT., 1972; RICHARDS., 1984; GRAHAM., 2003). Nos tecidos dos moluscos os miracídios vão se transformar em esporocistos primários e secundários, e então após um período de 30 dias, as células germinativas dos esporocistos secundários se desenvolverão em cercárias de cauda bifurcada.

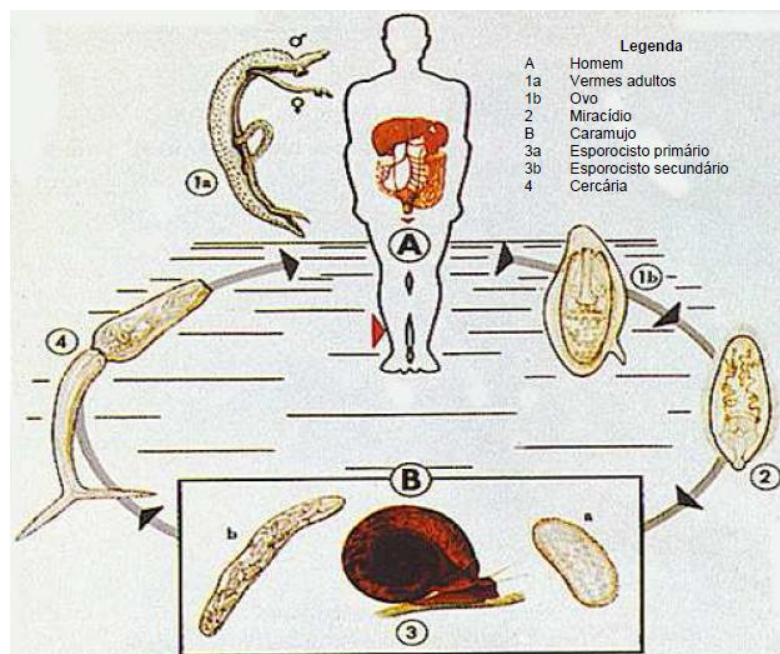


Figura 2: Ciclo biológico do parasito *S. mansoni*. A – Homem, 1 a – Vermes adultos, 1 b – Ovo, 2 – Miracídio, B – Caramujo, 3 a – Esporocisto primário, 3 b – Esporocisto secundário, 4 – Cercária. Fonte: BAYER, 1988.

Em condições ideais de luz e temperatura, as cercárias são liberadas na água e nadam ativamente até encontrarem um hospedeiro vertebrado. Ao encontrar o hospedeiro definitivo, as cercárias penetram ativamente na pele perdendo sua cauda. Os mecanismos que estariam envolvidos na penetração das cercárias pela epiderme e derme humana seriam através da ação lítica, devido à presença de proteases presentes nas glândulas pré-acetabulares e sub-tegumentares, e também pela ação mecânica (GONZÁLES., 1996). A partir deste momento ocorre a transformação em esquistossômulos os quais por meio da corrente sanguínea migram atingindo coração, pulmão e por fim o fígado onde alcançam a maturidade sexual e o acasalamento dos *parasitos* machos e fêmeas completando desse modo o ciclo de vida do parasito (REY., 1991; NEVES *et al.*, 2002).

Acompanhado por intensas alterações bioquímicas e morfológicas, o ciclo de vida do *S. mansoni* é descrito como complexo. O *S. mansoni* apresenta em seu genoma características que permitem garantir um padrão diferencial de expressão gênica (HU *et al.*, 2004). Espera-se, então, que além dos genes constitutivos, existam genes regulados por estresse osmótico ou oxidativo durante as diferentes fases do parasito, mantendo um padrão de proteínas estágio-específica (HU *et al.*, 2004).

O genoma com aproximadamente 14.000 genes foi estimado por VERJOVSKI *et al.* (2003), por meio do sequenciamento de 163.586 *ESTs* provindas de bibliotecas de cDNAs de verme adulto e de minibibliotecas de *ORESTES* (*Open Reading Frame Expressed Sequence Tags*), sequências parciais expressas de cDNA com 150-800 pb referentes às regiões centrais dos transcritos, de seis fases de desenvolvimento do parasito.

Tendo como embasamento os experimentos com *Escherichia coli*, (Simpson *et al.*, 1982) estimou que o genoma de *S. mansoni* era de 270 Mb, separado em oito pares

de cromossomos, sete dos oito pares foram descritos como autossômicos e um par como cromossomos sexuais, sendo os machos homogaméticos (ZZ) e as fêmeas heterogaméticas (ZW). No entanto, a análise do genoma do *S. mansoni* e estudos recentes de sequenciamento, demonstraram que o genoma de *S. mansoni* é de cerca de 363 Mb, sendo identificados 11.809 prováveis genes codificando 13.197 transcritos (BERRIMAN *et al.*, 2009).

O projeto genoma e transcriptoma além da identificação de novos genes que codificam para proteínas candidatas a vacinas e potenciais alvos para novas drogas abriu novas perspectivas para uma melhor compreensão da biologia do *S. mansoni* (VERJOVSKI *et al.*, 2003; VERJOVSKI *et al.*, 2004; BERRIMAN *et al.*, 2009). Os dados dos projetos genoma e transcriptoma do *S. mansoni* foram depositados no website <http://www.schistodb.net/schistodb20/>.

1.2. Modificação pós-traducional de proteínas - Ubiquitinação

Modificações pós-traducionais (MPTs) são processos que mudam as propriedades das proteínas por clivagem proteolítica ou por adição de um grupo químico a um ou mais aminoácidos. Estas modificações podem determinar a atividade, a localização, e interações com outras proteínas. Na sinalização, por exemplo, cascatas de quinases são ativadas e/ou desativadas pela adição e/ou remoção reversíveis de grupos fosfatos. Outro exemplo é a ubiquitinação de ciclinas no ciclo celular que corresponde à marcação de proteínas para a degradação. (SEO, J e LEE, K-J., 2004).

A ubiquitinação de proteínas é uma modificação pós-traducional que ocorre em todas as células eucariotas, regulando a estabilidade, a atividade e / ou localização de proteínas solúveis e transmembrana em tipos de células diferentes. Por apresentar um papel de regulação da meia vida de proteínas chaves em células eucarióticas, a via

proteolítica intracelular dependente de ubiquitina-proteassoma tem mostrado exercer importantes funções em vários processos celulares, tais como, o reparo do DNA (JENTSCH., 1992), controle do ciclo celular (GOEBL *et al.*, 1988) e resposta ao estresse (SEUFER *et al.*, 1990).

A via de ubiquitinação refere-se a um grupo de proteínas e enzimas cuja função primária compreende a marcação de um substrato protéico com uma ou mais moléculas de ubiquitina. A ubiquitina é uma proteína conservada, durante a evolução das espécies, possuindo massa molecular estimado de 8000 Da, com 76 resíduos de aminoácidos. A proteólise citoplasmática associada ao proteassoma tem relação com a poliubiquitinação da lisina 48 (K48) da ubiquitina como pode ser visto na **figura 3**. As proteínas monoubiquitinadas na lisina 29 (K29) da ubiquitina sustentam relação com a modulação de receptores de superfície na endocitose (CIECHANOVER e SCHWARTZ., 1988).

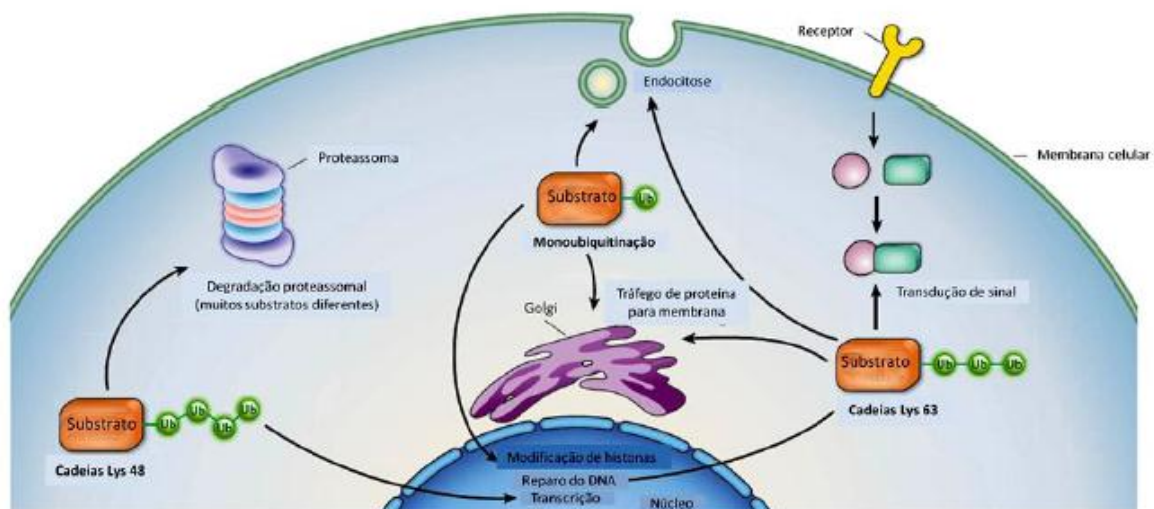


Figura 3: Processos celulares dependentes da ubiquitinação. Cadeias de ubiquitina K-48 ligadas são mais comumente associadas com a degradação mediada pelo proteassoma. Cadeias de ubiquitina ligadas a K-63 participam da transdução de sinal, tráfego de proteínas para a membrana, endocitose e reparo do DNA. A monoubiquitinação substrato-específica regula todos esses processos bem como a transcrição gênica modulada pela cromatina. Adaptado de (HOCHSTRASSER., 2009).

O processo de marcação não está necessariamente condicionado à degradação pelo proteassoma. Sabe-se atualmente que somente as proteínas conjugadas com um número igual ou maior do que quatro moléculas de ubiquitina são direcionadas à degradação pelo proteassoma (PICKART., 2001).

As proteínas, nas células eucariotas, são sujeitas a uma ampla variedade de modificações pós-traducionais, que aumentam grandemente a diversidade funcional e a dinâmica do proteoma. Entre os sistemas que modificam proteínas, a ligação da ubiquitina a substratos alvos é o exemplo mais estudado de modificação pós-traducional (HERSHKO; CIECHANOVER., 1998).

1.3. A via proteolítica intracelular dependente de ubiquitina-proteassoma

A homeostase celular depende da expressão de um conjunto de genes e das modificações pós-traducionais das proteínas, que por sua vez responde às condições ambientais (WILKINS *et al.*, 1996). O proteoma está intimamente associado ao turnover protéico, definido como o estado dinâmico de equilíbrio entre os processos de síntese e degradação de proteínas. A síntese é descrita pela transcrição do DNA a RNA mensageiro acoplado a tradução a proteínas, enquanto a degradação envolve diferentes vias de proteólise, realizada por um grupo heterogêneo de enzimas denominadas proteases (TURK., 2006; JUNG *et al.*, 2009).

Os sistemas proteolíticos celulares são compostos por mecanismos complexos que regulam e asseguram a degradação seletiva de substratos alvo. Tratando-se de tal complexidade o mecanismo referido deve ser estritamente regulado para evitar descontrole na proteólise das células (HARGROVE e SCHMIDT., 1989).

É sabido, que as células eucarióticas possuem ao menos três importantes vias proteolíticas, as quais podem atuar de maneira coordenada e cooperativa (DONALD e JUDITH., 1995). A via lisossomal possui enzimas proteolíticas, denominadas catepsinas, localizadas no interior do lisossomo, descrita como uma rota segregada (isolada) para degradação proteica (GUHA e PADH., 2008). Um segundo grupo enzimático, composto por micro e macro calpaínas, trata-se de uma via intracelular para degradação das proteínas do citoesqueleto, e fatores de transcrição, diretamente responsivas a alterações nos níveis de cálcio intracelular (MYKLES., 1998; DARGELOS *et al.*, 2008). A proteólise executada pelo proteassoma é composta por uma partícula central (proteassoma 20S) e várias proteínas reguladoras capazes de modificar a atividade e a especificidade do complexo (GLICKMAN e CIECHNOVER., 2002; JUNG *et al.*, 2009).

Ao longo dos anos o proteassoma recebeu diferentes nomes (ARRIGO *et al.*, 1988). A atual nomenclatura remete à sua natureza proteolítica e particulada. O proteassoma é encontrado em todas as células eucarióticas (VOGES *et al.*, 1999) e em diferentes espécies de arqueias (RIVETT., 1993) e bactérias (TAMURA *et al.*, 1995), e é encontrado tanto no citoplasma quanto no núcleo, chegando a representar 1% das proteínas totais de uma célula (COUX *et al.*, 1996). Quando no citoplasma, a degradação pelo sistema proteassomal é a mais importante entre as vias de proteólise correspondendo à diversos processos: degradação de proteínas oxidadas e/ou danificadas, regulação da meia-vida proteica, regulação do ciclo celular, expressão gênica, stress, reposta imune, carcinogênese, reparo de DNA (JUNG *et al.*, 2009).

Com massa molecular aproximada de 700-750 kDa, o proteassoma é formado por múltiplas subunidades de 19 a 36 kDa, podendo possuir partículas ligadas em suas terminações, regulando assim sua função. (PETERS., 1994). A nomenclatura 20S

refere-se ao coeficiente de sedimentação desta partícula central isolada (HOUGH *et al.*, 1987). Sua estrutura cilíndrica foi descoberta por meio de estudos de microscopia eletrônica e cristalografia de raio-X, que indicam diâmetro aproximado de 10 nm e comprimento de 16 nm. Cada um dos quatro anéis do proteassoma 20S possuem sete subunidades, no poro central passam as proteínas totalmente desenoveladas para, então, serem degradadas. As 7 subunidades dos anéis periféricos são denominadas de tipo alfa, enquanto os dois anéis centrais possuem 7 subunidades do tipo beta, configurando um arranjo $\alpha\beta\beta\alpha$ (**figura 4**) (LOWE *et al.*, 1995; BAUMEISTER *et al.*, 1998).

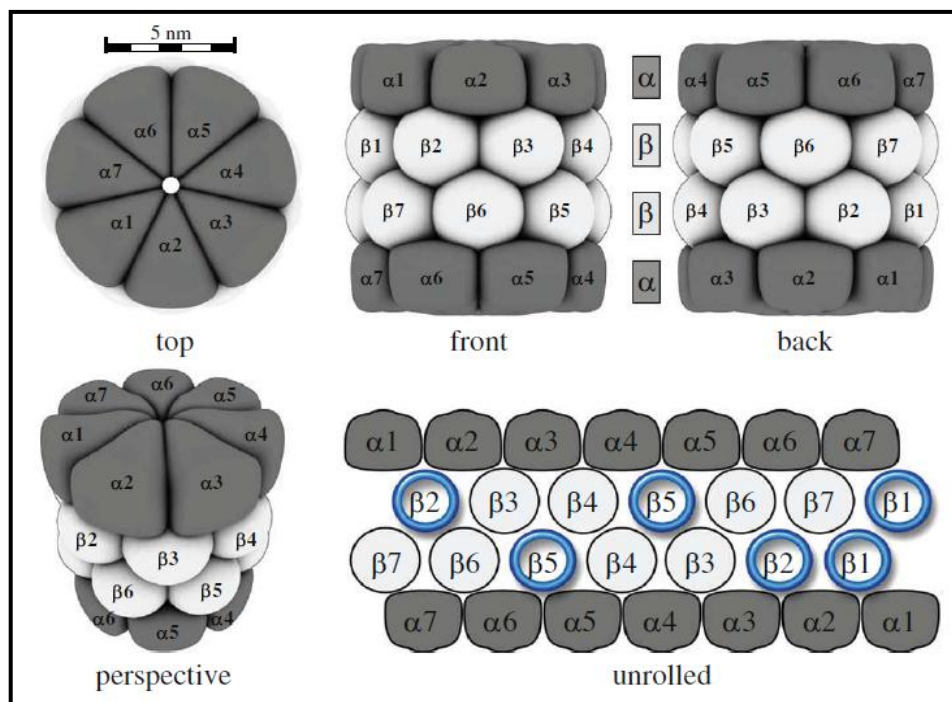


Figura 4: Estrutura do proteassoma 20S em eucariotos. Os quatro anéis heptaméricos superpostos mantêm a estrutura cilíndrica ou o núcleo catalítico do proteassoma 20S. Os anéis periféricos são compostos de 7 subunidades α e os dois centrais por 7 subunidades β , formando seu arranjo característico $\alpha\beta\beta\alpha$. Em azul, as subunidades catalíticas β_1 , β_2 e β_5 responsáveis pelas atividades proteolíticas semelhantes às enzimas caspase, tripsina e quimotripsina, respectivamente. Fonte: JUNG *et al.*, 2009.

As subunidades α são responsáveis por controlar a ligação de partículas regulatórias ao proteassoma 20S e por conservar a estrutura em forma de cilindro. Em eucariotos o proteassoma 20S possui três de suas subunidades β ligadas às atividades

catalíticas, sendo as atividades proteolíticas, semelhantes às de caspase (peptidil-glutamil hidrolase), tripsina e quimotripsina, realizadas pelas subunidades $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$, que clivam ligações peptídicas após o C-terminal de aminoácidos ácidos, básicos e hidrofóbicos, respectivamente. Cabe a cadeia lateral do resíduo de treonina aminoterminal (Thr-1) das subunidades β atuar como o nucléofilo no ataque catalítico ao carbono carbonil da ligação peptídica, sendo os sítios ativos localizados nas subunidades proteolíticas $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$ (KLOETZEL., 2001). As subunidades proteolíticas degradam em pequenas sequências de 3 a 15 aminoácidos tanto proteínas quanto peptídeos. Amino e carboxipeptidases presentes no citosol atuam sobre estes oligopeptídeos, e aminoácidos são reciclados para o meio celular (TANAKA., 2009).

O mecanismo de ubiquitinação é dependente de energia e ocorre por intermédio da ação em série de três classes de enzimas: enzima ativadora de ubiquitina (E1), enzima conjugadora de ubiquitina (E2) e enzima de ligação (E3), representado na **figura 5**. A enzima de ligação é considerada enzima chave, devido à sua função de reconhecimento do substrato protéico e catálise da transferência da Ub ativada ligada ao substrato.

Para ser degradado pelo proteassoma o substrato tem que ser antes poliubiquitinado. Relacionado a este processo, dois eventos moleculares são descritos: primeiro os componentes da porção regulatória 19S do proteassoma 26S são responsáveis pelo reconhecimento de regiões específicas nas moléculas de ubiquitina, seguido pela atuação de um grupo de seis ATPases localizados na base da porção regulatória, responsável pelo desenovelamento ATP dependente. Logo a proteína é direcionada ao proteassoma 20S (PASSMORE e BARFORD., 2004).

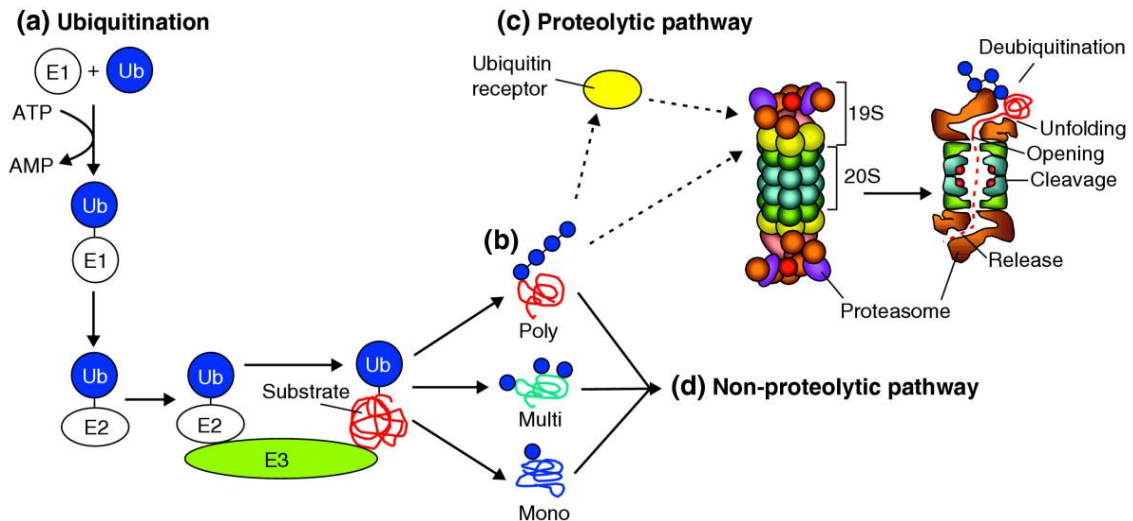


Figura 5: A via proteolítica intracelular dependente de ubiquitina-proteassoma. Depois de uma ativação ATP-dependente da glicina C-terminal de uma molécula de ubiquitina (Ub) por E1, a Ub é transferida para E2, e, finalmente, após a ligação do complexo E2-ubiquitina a E3, a Ub é transferida diretamente para um resíduo de lisina do substrato alvo (A) ou primeiramente para E3 e desta para o substrato (B). O substrato poliubiquitinado com ao menos quatro moléculas de Ub é reconhecido e degradado pelo proteassoma 26S. Fonte: adaptado de HOELLER e DIKIC., 2009.

Diversos reguladores relacionados ao controle de reconhecimento e a degradação das proteínas-alvo surgiram ao longo do processo evolutivo (JUNG *et al.*, 2009). O complexo denominado 19S ou PA700 trata-se do regulador de proteassoma com melhores registros e relatos na literatura (*Proteasome Activator 700 kDa*) (DEMARTINO *et al.*, 1994). O proteassoma 26S, encontrado apenas em eucariotos, é formado pelo proteassoma 20S associado aos complexos 19S e possui massa molecular aproximada de 2.0-2.5 MDa, com um coeficiente de sedimentação entre 26-30S. Este complexo enzimático é responsável pela degradação de substratos alvos marcados com a proteína ubiquitina (Ub).

Para fins de simplificação, dividiu-se o complexo 19S em dois subcomplexos denominados base e tampa. Cada um dos subcomplexos possuem subdivisões, sendo a base formada por seis subunidades ATPásicas (*Regulatory particle of triple-ATPase* – Rpt1-Rpt6) e quatro subunidades não-ATPásicas (*Regulatory particle non-ATPase* – Rpn1, Rpn2, Rpn10 e Rpn13), possuindo basicamente três funções: reconhecimento, desenovelamento de proteínas poliubiquitinadas e abertura do anel α externo. O complexo tampa possui ao menos nove subunidades não-ATPásicas (Rpn3, Rpn5-Rpn9, Rpn11, Rpn12 e Rpn15) em sua composição. É considerado responsável pela desubiquitinação de proteínas capturadas e, logo, pela reciclagem das moléculas de ubiquitina (TANAKA., 2009; LASKER *et al.*, 2012).

As partículas 11S ou PA28 são importantes reguladores do proteassoma 20S, que se ligam aos anéis α , aumentando a taxa de proteólise de proteínas desenoveladas de forma independente de ATP (RECHSTEINER *et al.*, 2000). Os reguladores PA28 são descritos como complexos heterogêneos de seis ou sete subunidades (cadeias α e β) ou complexos homogêneos de sete subunidades (cadeia γ). A distribuição intracelular é diferenciada, sendo a de PA28 $\alpha\beta$ preferencialmente localizada no citoplasma, enquanto que a de PA28 γ é de localização nuclear. O regulador PA28 $\alpha\beta$ associado ao proteassoma 20S está presente na apresentação de antígenos via MHC de classe I, formando o imunoproteassoma, complexo PA28 $\alpha\beta$ -20S-PA28 $\alpha\beta$. Na formação de tal complexo, as subunidades β ativas são substituídas por outras equivalentes (β 1i, β 2i e β 5i) induzidas por sinais celulares como o INF- γ e TNF- α (RIVETT *et al.*, 2001; LIN *et al.*, 2005). Em relação ao PA28 γ os dados científicos ainda não tornam sua função biológica compreendida por completo, porém há estudos que o relacionam com a regulação do ciclo celular e apoptose (RECHSTEINER e HILL., 2005).

A estrutura proteassoma híbrido refere-se ao caso em que o proteassoma 20S esta ligado em uma extremidade com a partícula 19S (TANAHASHI *et al.*, 2000). Sabe-se que o complexo está envolvido com o processamento de antígenos e eficiência da taxa de proteólise, contudo sua função exata ainda é desconhecida (HENDIL *et al.*, 1998). A **figura 6** ilustra as quantidades relativas do proteassoma 20S associado a seus reguladores encontrados no citosol de células *HeLa* (TANAHASHI *et al.*, 2000), mostrando a dinâmica e a heterogeneidade dos processos de regulação.

A partícula PA200 é uma dos mais recentes ativadores do proteassoma 20S encontrados, com massa molecular de 200 kDa, é encontrada exclusivamente nos núcleos celulares. A função deste regulador esta associado com o reparo do DNA (USTRELL *et al.*, 2002).

Ao contrário das definições até agora apresentadas sobre reguladores, o PI31 (*Protein Inhibitor of 31 kDa*) é descrito como um inibidor endógeno do proteassoma 20S (CHU-PING *Et al.*, 1992). É um regulador rico em prolina, servindo como um modulador seletivo do proteassoma, mediando as vias de processamento de antígeno via MHC de classe I e a maturação dos precursores do imunoproteassoma (ZAISS *et al.*, 2002).

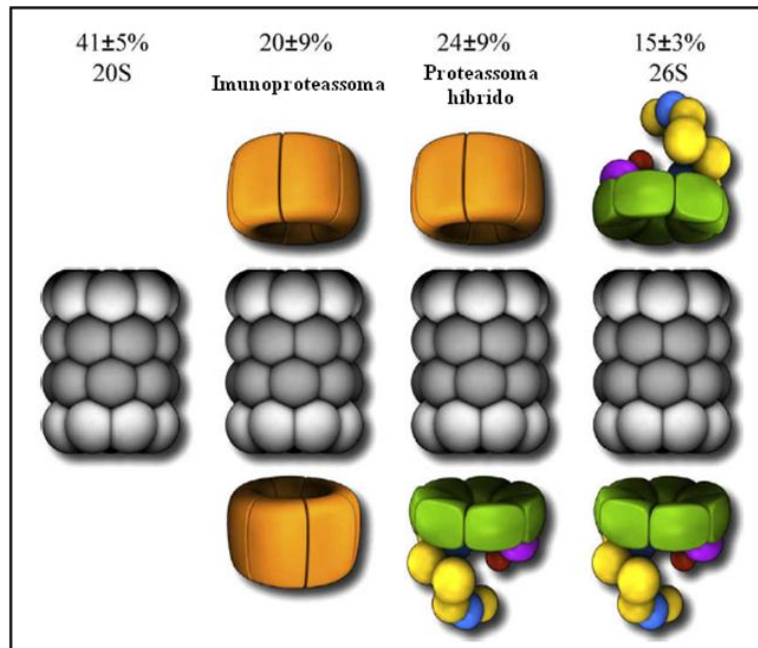


Figura 6: Quantidade relativa das diferentes formas do proteassoma 20S encontradas no citosol de células *HeLa* (TANAHASHI *Et al.*, 2000). Fonte: Adaptado de JUNG *Et al.*, 2009.

As primeiras evidências sobre o proteassoma do *S. mansoni* foram descritas por GUERRA-SÁ *et al.* (2005), em cercárias e vermes adultos deste parasito, e em seus trabalhos são encontradas todas as atividades proteolíticas mais bem caracterizadas do proteassoma, com enfoque maior voltado para a atividade semelhante à quimotripsina. Essas atividades foram analisadas com auxílio de inibidores, como o MG-132, onde a epoximicina e a lactacistina, apresentaram, em baixas concentrações, uma inibição aproximada de 90%. Os perfis de atividades proteolíticas e inibição do proteassoma de *Schistosoma mansoni* e eucariotos se aproximam, porém se difere em parasitos protozoários (GUERRA-SÁ *et al.*, 2005). O grupo também demonstrou a importância da via dependente de ubiquitina-proteassoma durante o desenvolvimento no hospedeiro vertebrado, a partir de cercárias tratadas com inibidores clássicos do proteassoma (MG132 e MG115) que tiveram um número menor de esquistossômulos recuperados do pulmão quando comparados com cercárias que não inibiam o proteassoma (Leupeptina).

O envolvimento da via dependente de ubiquitina-proteassoma, assim, mostrou-se relacionado em outras etapas do ciclo biológico, como no desenvolvimento dos ovos eliminados pelo parasito (MATHIESON *et al.*, 2011).

Trinta e uma sequências homólogas foram identificadas a partir da comparação do genoma completo deste parasito, por meio do uso de ferramentas de genômica e proteômica para a caracterização do proteassoma em *Schistosoma mansoni* (NABHAN *et al.*, 2007; CASTRO-BORGES *et al.*, 2007). As sequências gênicas das subunidades do proteassoma de leveduras e humanos, das quais 14 são referentes às subunidades α e β , indicam que a organização estrutural do proteassoma 20S é similar entre as demais espécies. A abundância do proteassoma são expressas de maneiras diferentes dependendo da forma evolutiva do parasito, tal observação procedeu pela análise de algumas dessas subunidades por qRT-PCR (*quantitative real-time PCR*) (NABHAN *et al.*, 2007).

A partir de um protocolo desenvolvido por CASTRO-BORGES *et al.* (2007), o proteassoma 20S do verme adulto foi purificado de forma eficaz e o estudo por meio das técnicas de eletroforese bidimensional e espectrometria de massas do proteassoma isolado possibilitou a caracterização das subunidades α e β . Tais subunidades possuem diversidade de isoformas, provavelmente vinda de uma série de modificações pós-traducionais. Outra abordagem desenvolvida pelo mesmo grupo mostrou perfis distintos para a subunidade α do proteassoma quando comparado cercárias e vermes adultos.

1.4. Rpn10: Subunidade da partícula regulatória 19S importante na marcação de substratos poliubiquitinados.

Em células eucarióticas, a ubiquitinação de proteínas desempenha um papel-chave na regulação de diversos processos celulares (GLICKMAN e CIECHANOVER., 2002; GOLDBERG., 2003). A função primária do processo de ubiquitinação é a marcação da proteína alvo com os monômeros de ubiquitina (GLICKMAN e CIECHANOVER., 2002).

As células contêm uma variedade de proteínas que se ligam de forma não covalente a Ub ou através de vários domínios de ligação distintos a Ub (HICKE *et al.*, 2005). Muitas destas proteínas têm sido relatadas por se tornarem ubiquitinadas nas células ou *in vitro*, porém deleção ou mutação de domínios de Ub suprime a ubiquitinação destas (HICKE *et al.*, 2005; WOELK *et al.*, 2006).

S5a/Rpn10 é uma proteína de ligação principal a ubiquitina que se liga preferencialmente em cadeias de poli-Ub (**figura 7**) (DEVERAUX *et al.*, 1994). Encontra-se como uma subunidade do proteassoma 26S, mas ao contrário de outras subunidades do proteassoma, S5a existe predominantemente como uma proteína livre no citoplasma (ou seja, não incorporado ao proteassoma) (VAN NOCKER., 1996; RUBIN *et al.*, 1997). S5a contém dois domínios de cerca de 15 aminoácidos (UIMs) responsáveis pela sua afinidade com as cadeias de ubiquitina (YOUNG *et al.*, 1998; FU *et al.*, 1998).

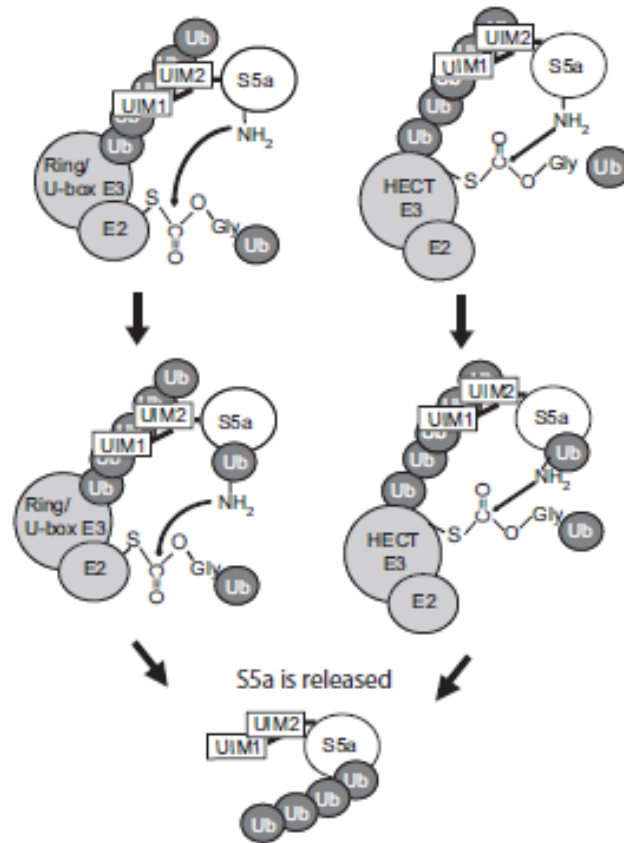


Figura 7: Mecanismo proposto de reconhecimento de substratos poliubiquitinados. S5a se liga a ubiquitina para o crescimento da cadeia na E3 que é ubiquitinada devido a sua proximidade com o tioéster altamente reativo da ubiquitina. Fonte: Adaptado de TOMOAKI UCHIKI *et al.*, 2009.

Relatos na literatura descrevem diversas nomenclaturas para a subunidade Rpn10, **figura 8**, tais como Mbp1, Mcb1, Sun1, Pus1, ASF1, p54, S5a. Em levedura, o homólogo de S5a/Rpn10, é encontrada em duas formas, como subunidade do proteassoma 26S e como proteína livre além de ser necessária para a degradação de um subconjunto de proteínas celulares pelo proteassoma (VERMA., 2004; ELSASSER., 2004; VAN NOCKER *et al.*, 1996; WILKINSON *et al.*, 2000).

Relatos bioquímicos demonstram que, o domínio C-terminal da Rpn10 e seus homólogos em outros eucariotos ligados nas cadeias de ubiquitina *in vitro* foram observados, porém esta região da Rpn10 é dispensável *in vivo* (FU *et al.*, 1998). A

eliminação dos 61 aminoácidos da porção N-terminal da Rpn10 produz fenótipos compatíveis aos de uma deleção completa (KIRKPATRICK *et al.*, 2006). Através de uma deleção da porção N-terminal da Rpn10 mostrou-se que esta proteína se associa com a base da partícula regulatória 19S, e que seu domínio N-terminal desempenha um papel na manutenção da integridade estrutural do complexo regulatório 19S.

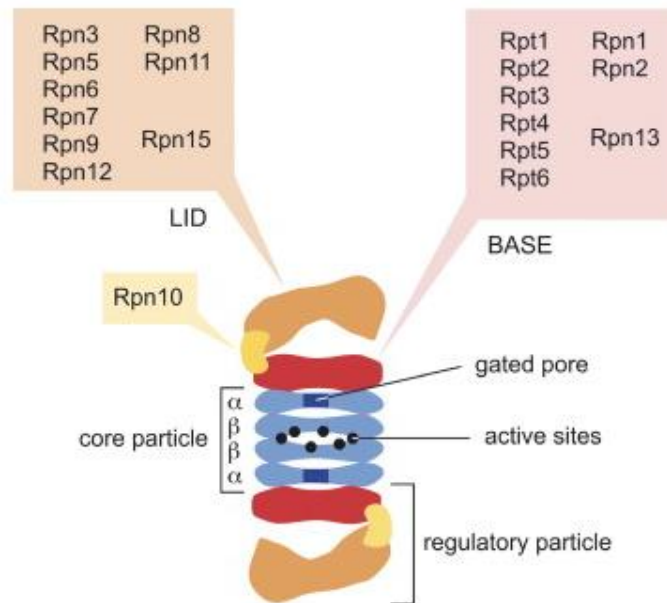


Figura 8: Representação esquemática do proteassoma 26S. O proteassoma 26S é composto por um núcleo catalítico (*core particle*) e duas partículas regulatórias, como indicado. A partícula regulatória pode ser dividida em tampa e base. A base contém 6 ATPases (Rpt1-6), e 3 subunidades não ATPase. A tampa contém 6 proteínas com domínio PCI (Rpn3, Rpn5-7, Rpn9, e Rpn12), 2 com domínio MPN (Rpn8 and Rpn11), e uma proteína adicional, Rpn15. Fonte: Adaptado de HICKE., 2005.

A proteína FAT10 da família da ubiquitina têm como alvo proteínas para degradação pelo proteassoma, de forma independente da ubiquitina. Foi demonstrado que a FAT10 e NUB1L atuam juntas com o proteassoma 26S para iniciar a proteólise. RANI *et al.* (2012) identificou a subunidade Rpn10 do proteassoma como o receptor para FAT10, enquanto NUB1L pode ligar-se a Rpn10 e Rpn1/S2 e, FAT10 e NUB1L interagem com o domínio Rpn10 via vWA (fator de van Willebrand relacionado à adesão de plaquetas). A Deleção de Rpn10 provocou um acúmulo de FAT10-conjugados em células humanas. Dessa forma foi possível sugerir que o domínio de

vWA Rpn10 atua tanto como um receptor para a ubiquitina como para proteínas do proteassoma 26S e com isso a proteólise com FAT10 é mediada de forma eficiente pelo proteassoma 26S (RANI *et al.*, 2012).

Nota-se que o reconhecimento específico de substratos poliubiquitinados encaminhados à degradação é de grande importância para o controle da proteólise intracelular via proteassoma 26S. Este importante complexo proteolítico está relacionado com o desenvolvimento do *Schistosoma mansoni*, sendo de grande interesse para o entendimento dos processos bioquímicos, associados com a biologia do parasito, na esquistossomose. Dessa forma, é importante um melhor entendimento da subunidade Rpn10 do complexo regulatório 19S do *Schistosoma mansoni* e seu papel no desenvolvimento do parasito.

Objetivos

2. Objetivos

Objetivo Geral

- Determinar o perfil de expressão das subunidades alfa 7 e Rpn 10 constituintes do proteassoma 26S em fases larvais e adultas do *Schistosoma mansoni*.

Objetivos específicos

- Amplificar por RT-PCR os transcritos codificadores para as subunidades alfa 7 (Proteassoma 20S) e Rpn10 (Partícula regulatória 19S);
- Clonar em sistema de expressão Gateway®;
- Selecionar clones e induzir expressão;
- Purificar as proteínas recombinantes via cromatografia de afinidade;
- Imunizar camundongos para obtenção de anticorpos policlonais;
- Analisar a expressão da proteína Rpn10 do proteassoma 26S por *western blotting* e eletroforese bi-dimensional utilizando extratos totais de fases adultas e larvais do parasito;

3 - Materiais e Métodos

Ética em experimentação animal

Todos os experimentos com camundongos das linhagens *Swiss* ou *Balb/c*, destinados à obtenção de material biológico do parasito *Schistosoma mansoni*, foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEUA/UFOP) com protocolo no. 2011/55.

3.1. Obtenção das fases do parasito *Schistosoma mansoni*

3.1.2. Obtenção de ovos e miracídios

Cerca de 10 fígados de camundongos infectados, após aproximadamente 40 - 45 dias, foram coletados durante perfusão e homogenizados em 200 mL de tampão fosfato (0,06 M de Na₂HPO₄, 0,0033 M de KH₂PO₄, pH 8,3), seguido da adição de 2mg de tripsina (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). O homogeneizado foi incubado por 3 horas em banho-maria a 37°C. Posteriormente, os ovos foram recuperados por meio de ciclos de peneiração sucessiva em tamis de 300 e 180 µm, lavados em salina e armazenados a -70°C até o momento de uso. Alternativamente, os ovos obtidos foram transferidos para uma placa de Petri contendo cerca de 10 mL água mineral. Após cerca de 30 min de exposição à luz as larvas eclodidas foram recuperadas do sobrenadante e armazenadas a -70°C até o momento de uso.

3.1.3. Obtenção de cercárias e transformação mecânica em esquistossômulos

Para induzir a liberação das cercárias, caramujos infectados foram expostos à iluminação artificial em banho de água a 26°C por 1 h. As cercárias foram então coletadas e armazenadas a -70°C ou submetidas à transformação mecânica em esquistossômulos. Conseguiu-se a transformação seguindo o método descrito por HARROP e WILSON. (1993). Para que houvesse sedimentação, as cercárias foram incubadas por 2 h em um béquer de vidro de 100 mL. Com uma pipeta *Pasteur* o sobrenadante foi dispensado e o sedimento com as cercárias foi transferido para um tubo do tipo (*Falcon*) de 15 mL. Posteriormente, as cercárias foram ressuspensas em 10 mL de água deionada autoclavada e incubadas em gelo por 10 min. Por três vezes lavou-se e descartou-se o sobrenadante, para que somente após as repetições 5 mL de meio RPMI (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) fossem adicionados. As cercárias foram agitadas vigorosamente em vortex por 90 segundos sob velocidade máxima para a indução da separação entre cauda e corpo cercariano. Para retirada das caudas, separou-se 5mL contidos no tubo *Falcon* em tubos *Eppendorf* de 1 mL que foram submetidas a sucessivas lavagens com meio RPMI 1640, entre cada lavagem esperavam-se 4 minutos, para sedimentação dos corpos cercarianos (esquistossômulos) e remoção das caudas no sobrenadante. Os esquistossômulos presentes no sedimento foram levados para uma garrafa de cultura estéril de 50 mL e o volume foi completado para 20 mL com meio RPMI 1640 suplementado com 25 µM de HEPES (pH 7,5), antibióticos (100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina), 10% de soro fetal bovino (Gibco, Carlsbad, CA, EUA) e incubados por 3 horas e 30 minutos a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% CO₂. Decorrido o tempo necessário, o sobrenadante foi

descartado; o restante foi armazenado em *Eppendorf* sendo mantido a -70°C até o momento do uso.

3.1.4. Obtenção de vermes adultos

Os parasitos adultos foram recuperados por meio da perfusão do sistema porta-hepático de camundongos após 40-45 dias de infecção, em condições descritas por (SMITHERS e TERRY., 1965).

3.2. Extração de RNA total de *S. mansoni*

Extratos totais de *S. mansoni* foram homogeneizados utilizando um homogeneizador tipo Politron (Homogeneizador ultra 80) em 1 mL de TRIzol® Reagent (Invitrogen™) com a sequência de 3 pulsos de 1 minuto cada, acompanhados de banho de gelo de um minuto. Foram acrescentados 200 µL de clorofórmio (*Sigma - St. Louis, MO, USA*), após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente a mistura foi então homogeneizada com o uso de um vórtex por 1 minuto, acompanhado de uma incubação em banho de gelo durante 25 minutos. Posteriormente, centrifugou-se a 4°C , por 12 minutos, a 12000g. Foram acrescentados 600 µL de etanol 95% v/v à fase aquosa e a mistura foi transferida para a coluna de ligação, tipo *spin basket*, juntamente com o kit SV total RNA *Isolation System* - Promega™. Centrifugou-se a amostra durante 2 minutos a 12000g e o líquido restante no tubo coletor foi descartado. Em seguida, adicionou-se 600 µL de solução de lavagem (SV RNA Wash Solution) e centrifugou-se novamente a 12000g, por 2 minutos. Para garantir que não houvesse contaminação por DNA genômico as amostras de RNA foram tratadas com DNase, e para isso foi

preparada então, uma mistura com 40 µL de “yellow core buffer”, 5 µL MnCl₂ 0,09M e 5 µL de DNase, que foi aplicada sobre a membrana do *spin basket* e incubado por 25 minutos a temperatura ambiente. Logo após foram adicionados 200 µL de “SV DNase Stop Solution” responsáveis por inibir a atividade enzimática da DNase. A amostra passou por centrifugação a 12000g, por 2 minutos e descartou-se o líquido contido no tubo coletor. Posteriormente, adicionaram-se 600 µL e, em seguida, 250 µL de solução de lavagem (SV RNA Wash Solution), acompanhada de centrifugação a 12000g por 2 minutos. Transferiu-se o *spin basket* para um tubo de eluição, e adicionou-se 80 µL de água livre de nucleases, o obtido foi centrifugado a 12000g por 2 minutos. As amostras foram mantidas a -70°C até o momento do uso.

A quantificação e avaliação da pureza do RNA total extraído foram determinados por espectrofotometria, por meio do aparelho NanoVue® (GE) pela absorção a 260 nm e pelas relações entre os comprimentos de onda 260/280 e 260/230. A qualidade das preparações foi avaliada em gel de agarose 1,2%/ TBE – formamida.

3.3. Obtenção dos cDNAs - RT-PCR

A fim de conseguir imediata obtenção do cDNA dupla fita e amplificação por PCR para os genes Alfa7 e Rpn10 (C-terminal) direcionado à clonagem, colocou-se, para um volume de 25 µL, uma mistura de reação, composta por (RNase livre); tampão 10xPCR; MgCl₂ 50 mM; 10 µM dos iniciadores forward e reverse (Tabela 1) com os adaptadores attB; 10 mM de dNTPs; fita simples do cDNA e 5U/µL enzima Platinum Taq® (Sinapse), em um tubo *Eppendorf*. Colocou-se o que foi anteriormente preparado no termociclador (*Biocycler*, version 3.2) e a reação de amplificação abrangeu 30 ciclos descritos por uma etapa de desnaturação a 95°C por 1 minuto; 1 minuto de anelamento

para cada gene (tabela 1) e 1 minuto e 30 segundos de extensão a 72°C. Confirmou-se a amplificação em gel de agarose 1,2%, seguida de coloração com brometo de etídeo.

SmRpn10 F	SmRpn10 R
5`GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG GCTTCATGTCTCAGGAAGCTACGATC3`	5`GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGG GTCCTTATAATCCTGCCCTTTGGCTCCA3`
Tamanho do Amplicon	
251 pb	
Temperatura de anelamento	
52°C	
SmAlfa7 F	SmAlfa7 R
5`GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCA GGCTTCATGTGCGACAAAATATGATAGG3`	5`GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGG TCCTTACAATGCTGCGGCTGCTTC3`
Tamanho do Amplicon	
753 pb	
Temperatura de anelamento	
45°C	

Tabela 1: Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores sintetizados para as amplificações dos genes Alfa7 e Rpn 10 (C-terminal). Forward (F) e Reverse (R).

3.4. Purificação dos produtos de PCR

Para evitar prováveis sequências amplificadas e retirar os iniciadores que possuem os sítios de recombinação attB e que competem pelo sítio attP do vetor, tornando a clonagem dos insertos uma tarefa mais dificultosa, faz-se a purificação dos produtos de amplificação.

Transferiu-se para um novo tubo do tipo *Eppendorf* o produto resultante da reação de PCR e então adicionou-se 10% do volume inicial de acetato de sódio 3 M pH 7,0 e 2,5 vezes do volume de etanol absoluto. Em seguida a mistura foi incubada durante 30 minutos a -20°C e posteriormente, centrifugada a 10000g por 5 minutos. O precipitado foi lavado com etanol 70%. Utilizando 20 µL de água milli-Q estéril ressuspendeu-se o DNA. A pureza dos DNAs e a quantificação foram definidas por meio da absorção no UV a 260 nm e pelas relações feitas pelo aparelho NanoVue® (GE) entre os comprimentos de onda 260/280 e 260/230 e, por fim, a qualidade das preparações foi avaliada em gel de agarose 1,2%.

3.5. Preparação de bactérias cálcio-competentes

Para o preparo de bactérias cálcio-competentes, foi utilizado o método de CaCl₂ descrito por (SAMBROOK *et al.*, 2001). Colônias de *E. coli* das cepas DH5α e B121 (DE3) foram inoculadas em 5,0 mL de meio LB contendo o antibiótico apropriado. A cultura foi incubada a 37 °C por 16 horas sob agitação constante de 200 rpm. Um volume de 1 mL desta cultura foi transferido para 100 mL de meio LB. As células foram incubadas a 37 °C sob as mesmas condições de agitação até alcançar a fase de crescimento exponencial (D.O.600 de 0,3 a 0,5).

Em seguida a cultura foi incubada em banho de gelo por 30 minutos e posteriormente centrifugado a 3000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspendido em 10 mL de tampão PIPES e novamente centrifugado a 3000g à 4°C por 10 minutos. Esta etapa foi seguida de banho de gelo por 30 minutos e centrifugação à 2000g, 4°C por 10 minutos. O *pellet* foi ressuspendido em 1,2 mL de tampão PIPES e estocado em alíquotas de 200 µL à -70°C até a etapa de transformação.

3.6. Transformação de bactérias cálcio-competentes

Reações de ligação foram incubadas com 100 µL da suspensão de *E. coli* cálcio-competentes por 30 minutos no gelo. Após esse período, as células foram submetidas ao choque térmico pela incubação a 42 °C por 90 segundos, seguido de incubação de 2 minutos no gelo e posterior adição de 1 mL de meio LB para incubação sob agitação constante de 200 rpm a 37 °C por uma hora. Alíquotas de 100 µL e 300 µL foram espalhadas em meio LB-ágar adicionado de antibiótico (meio seletivo) de acordo com a resistência conferida pelo vetor utilizado na transformação de bactérias e incubadas a 37 °C por 16 horas. As colônias crescidas nessas condições foram analisadas por PCR de colônia conforme descrito no item a seguir.

3.7. PCR de colônia

Após o crescimento em meio seletivo, cada colônia foi coletada e misturada em 10µL de água deionizada, sendo utilizado 1µL dessa suspensão para cada reação de PCR. Foram acrescentados aos tubos de PCR os reagentes e os oligonucleotídeos

iniciadores que anelam com regiões que flanqueiam o fragmento de DNA a ser amplificado, em um volume final de reação de 25µL. A reação de PCR foi realizada com 30 ciclos descritos por uma etapa de desnaturação a 95°C por 1 minuto; 1 minuto de anelamento para cada gene (tabela 1) e 1 minuto e 30 segundos de extensão a 72°C.

3.8. Expressão em sistema heterólogo de proteínas recombinantes

3.8.1. Clonagem e Expressão de proteínas recombinantes em *Escherichia coli*

As reações de amplificações do gene Alfa7 e Rpn10 (C-terminal) foi realizada através da técnica de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores desenhados com auxílio do programa *Gene Runner* (Version 3.05) utilizando como referência as sequências depositadas no banco de dados GeneDB (<http://www.genedb.org/Homepage/Smansoni>). O tamanho do *Amplicon* para cada um dos genes Alfa7 e Rpn10 continham 753 e 251 pares de bases respectivamente (Tabela 1).

A clonagem do fragmento correspondente aos genes Alfa7 e Rpn10 (C-terminal) na Plataforma Gateway® foi possível através da ligação *attB*, que são responsáveis pela recombinação com a sequência *attP* presente no vetor de entrada pDONR™221 (Plataforma Gateway® - Invitrogen) com o auxílio do mix enzimático BP Clonase™II (INVITROGEN) originando um sítio *attL*. O mapa deste vetor está ilustrado na **figura 9**. Dessa forma, 150 fmol dos produtos de PCR purificados foram incubados com 150 ng do vetor pDONR221 adicionado com a enzima BP Clonase por 2 horas a 25 °C, diluído em tampão TE pH 8.0 (INVITROGEN).

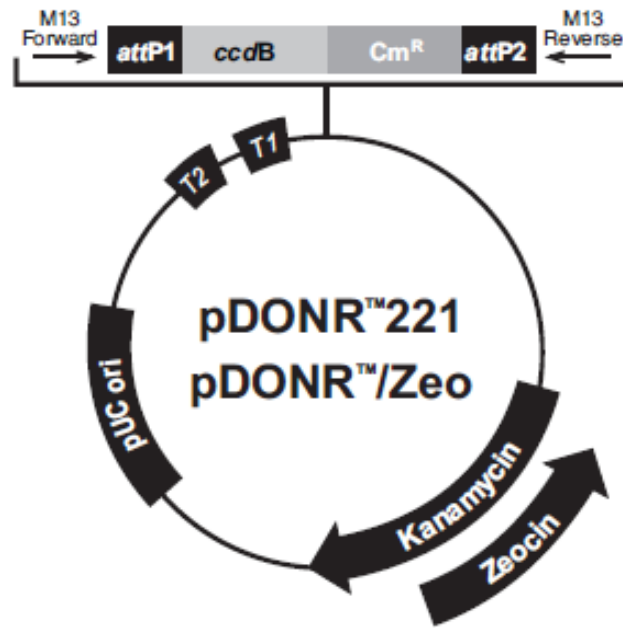


Figura 9: Mapa do vetor de entrada pDONR™221 (Invitrogen). pUC ori: origem de replicação de alta cópia. *attP1/attP2*: sequência de 200 bp presente no pDNOR para recombinação com sítio *attB* presente no produto PCR. *ccdB*: gene que permite seleção negativa do pDNOR, interferindo na DNA girase de *E. coli*, que é substituído após recombinação com o sítio *attB* do produto de PCR. *Kanamycin*: gene de resistência à canamicina. *CmR*: gene de resistência ao cloranfenicol. T1/T2: terminadores de transcrição. M13 *Forward* e *Reverse*: Oligonucleotídeos iniciadores do vetor (FONTE: Catálogo Gateway® Tecnologia Invitrogen).

Bactérias *E. coli* cálcio competentes da linhagem DH5 α foram transformadas com os plasmídeos clonados como descrito em materiais e métodos (3.6) a fim de propagá-los. Os plasmídeos clonados foram purificados utilizando o kit *QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)*, conforme o manual do fabricante. Em seguida utilizados como molde nas reações de PCR de colônia para confirmação das clonagens utilizando os oligonucleotídeos iniciadores da sequência para Alfa7 e Rpn10 (Domínio C-terminal).

Os clones (Alfa7 e Rpn10 (Domínio C-terminal)) foram utilizados para recombinação com outro vetor, por possuir sequências que facilitam a recombinação do fragmento clonado, o vetor pDONR™221, possui diversos vetores de destino. No presente trabalho foi utilizado o vetor pDEST™17 para expressão de proteínas recombinantes,

gerando elevados níveis de proteínas que trazem consigo uma identificação que remete à seis resíduos seguidos de histidina na extremidade amino - terminal, intimamente ligado à purificação da proteína por meio de coluna Ni-NTA (Ni⁺⁺-*nitrilo-tri-acetic-acid*). A purificação é realizada devido à grande afinidade de ligação entre as proteínas recombinantes que contêm esta identificação, o que torna possível a purificação mesmo em condições desnaturantes (CROWE; MASONE; RIBBE., 1995). O mapa do vetor pDESTTM17 está ilustrado na **figura 10**.

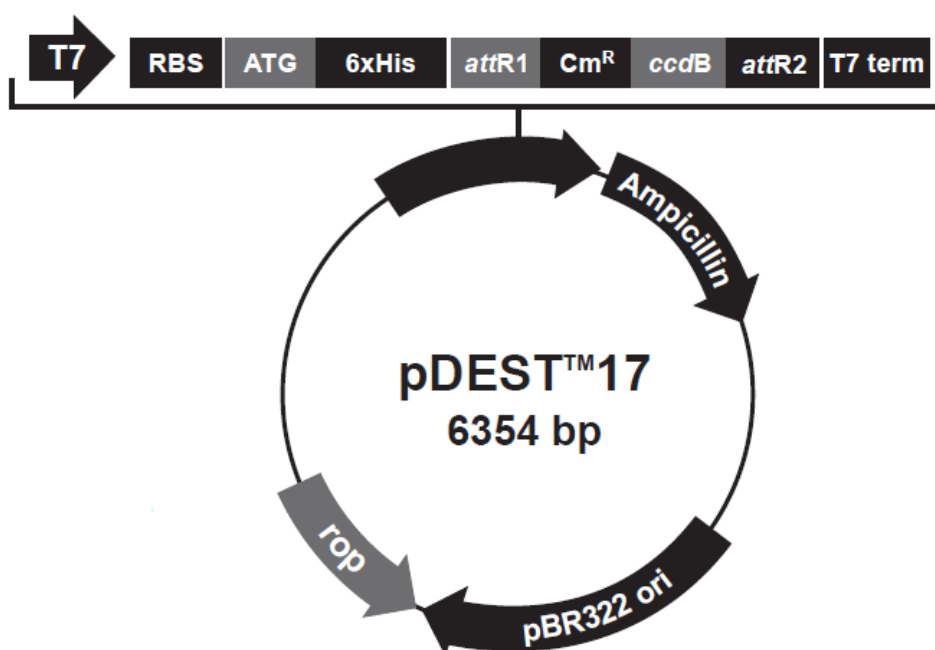


Figura 10: Mapa do vetor pDEST™17 (Invitrogen) de expressão de genes em bactérias. T7: Promotor de T7 RNA Polimerase. RBS: Região de ligação ao ribossomo. ATG: Códon de início. 6xHis: Etiqueta de histidinas N-terminal. sítios *attR* (*attR1* e *attR2*): região de recombinação LR com vetor de entrada pDNOR. CmR : gene de resistência ao cloranfenicol. *Ampicillin*: gene de resistência à ampicilina. *ccdB*: gene que permite seleção negativa do pDEST™17. T7 term: região de término da transcrição (FONTE: Catálogo Gateway® Technology Invitrogen).

Os genes Alfa7 e Rpn10 (C-terminal) clonados em pDONR, foram transferidos para o vetor pDEST™17, conforme o manual do fabricante. Após a reação de recombinação, bactérias *E. coli* B121 (DE3) cálcio-competente foram transformadas, conforme descrito no item (3.6) e incubadas por 16 horas a 37 °C em meio LB-ágar adicionado de 100 µg/mL de ampicilina, resistência conferida pelo vetor pDEST™17.

Após a obtenção de colônias isoladas, estas foram selecionadas para análise por PCR de colônia, item 3.7, utilizando os iniciadores da sequência para Alfa7 e Rpn10 (C-terminal) para a verificação da clonagem em vetor pDESTTM17.

Após a verificação da clonagem por PCR, as colônias correspondentes foram inoculadas em 1 mL de meio LB suplementado com 100 µg/mL de ampicilina e em seguida incubadas a 37 °C durante 16 horas sob agitação constante de 200 rpm. Passado o período de incubação, a cultura foi submetida à centrifugação a 10.000 x g por 1 minuto a 4 °C e a minipreparação do plasmídeo foi realizada através do kit *QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)*, conforme o fabricante. Os Plasmídeos purificados foram utilizados para transformação de *E. coli* da cepa BI21 (DE3) cálcio-competente, apropriada para a expressão de proteínas recombinantes através de indução por IPTG.

3.8.2. Indução da expressão de proteínas recombinantes através de IPTG.

Diversas colônias de *E. coli* da cepa BI21 (DE3) transformada com o clone pDEST TM17 Alfa7 e pDEST Rpn10 (C-terminal) foram inoculadas em 1 mL de meio LB adicionado de 100 µg/mL de ampicilina e incubada a 37 °C sob agitação constante de 200 rpm durante 16 horas. Após o período de incubação, 1mL destas culturas foram transferidos para 100 mL de meio LB adicionado de 100 µg/mL de ampicilina. As células permaneceram incubadas a 37 °C sob as mesmas condições de agitação até atingir a D.O.600 de 0,6 e foi então adicionado 1 mM de IPTG à cultura e a incubação prosseguiu por mais 2, 3 e 4 horas nas mesmas condições. Para o controle da indução de expressão dos genes, foi também mantida uma cultura nas mesmas condições, mas sem adição de IPTG (cultura não induzida). Células destas culturas foram sedimentadas a

15.000 x g por 10 minutos a 4 °C, lavadas com PBS 1X e suspensas em tampão de amostra para proteínas.

Para análise de solubilidade da proteína recombinante, células da cultura induzida foram sedimentadas a 15.000 x g por 10 minutos a 4 °C, lavadas com PBS e suspensas em tampão de sonicação. As células foram lisadas por sonicação através de 5 ciclos de potência 5 por 15 segundos com intervalos de 2 minutos no gelo seguido de centrifugação a 6.000 x g por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante (fração de proteínas solúveis) foi separado e adicionado tampão para amostra de proteínas. Todos os extratos proteicos foram desnaturados por aquecimento a 100 °C por 5 minutos.

Como não houve expressão da proteína recombinante Alfa7 e Rpn10 (Domínio C-terminal) utilizou-se uma metodologia alternativa. Através de um plasmídeo clonado em vetor de expressão pET28a gentilmente cedido pela Dra Enyara R Moraes (Laboratório de Biologia Molecular de Parasitos - Universidade de São Paulo), na qual continha a região codificadora para a proteína Rpn 10 (inteira) realizamos a expressão da proteína recombinante como descrito em matérias e métodos para os genes Alfa 7 e Rpn10 (C-terminal) (3.8.1), e assim prosseguimos com os experimentos.

3.8.3. Purificação de proteínas recombinantes através de coluna de Ni-NTA.

A resina utilizada para a purificação da proteína Rpn10 (inteira) expressa foi a *Ni Sepharose™ High Performance* (GE Healthcare). À solução contendo a Rpn10 (inteira) foi adicionado imidazol na concentração final de 60 mM, ou seja, a coluna foi pré-equilibrada com 40 mL de tampão de lise (60mM imidazol, 50mM NaH₂PO₄ , 400mM NaCl, 4mM PMSF e Triton X 1% pH 8.0). Após aplicação da amostra, a proteína retida na resina é eluída pelo aumento da quantidade de imidazol do tampão

(300 mM). Essa quantidade superior de imidazol permite, por competição, a liberação da proteína ligada à coluna. A amostra recolhida foi submetida ao SDS-PAGE 12% e o gel corado em *coomassie blue*.

3.8.4. Obtenção de antisoro policlonal

A proteína recombinante Rpn10 (inteira) purificada foi utilizada para produção de antisoro específico em camundongos da linhagem *Swiss*. O manuseio dos animais estava de acordo com as normas e foram aprovados pelo Comitê de ética da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Cerca de 10 µg de proteína por camundongo foi emulsionada com o seguinte adjuvante: 40 mg/ml hidróxido de alumínio + 40 mg/ml hidróxido de magnésio para otimizar a imunogenicidade. Realizou-se três inoculações via intraperitoneal em condições semelhantes, intercaladas por um período de 15 dias entre elas.

3.9. Análise do nível de expressão da proteína Rpn10 e suas possíveis isoformas durante o ciclo de vida do parasito *S. mansoni*

3.9.1. Preparação do extrato protéico de *Schistosoma mansoni*: ovos, miracídios, cercárias, esquistossômulos (3,5 horas) e vermes adultos

Prepararam-se extratos de proteínas totais dos estágios de ovos, miracídios, cercárias, esquistossômulos (3,5 horas) e vermes adultos. No tampão A (Tris-HCl

100mM pH 7,5; DTT 1mM, 1X Inibidor de Proteases – Sigma) os parasitos foram homogeneizados. O material foi brevemente sonificado e centrifugado a 40.000g por 60 minutos e utilizando o kit *QuantiPro BCA assay (Sigma-Aldrich)*, como ilustrado no boletim técnico do fabricante, determinou-se a concentração protéica. Utilizou-se uma solução padrão de soro albumina bovina a 100 µg/mL em diversas diluições para a construção da curva padrão.

3.9.2. SDS-PAGE

Assim como descrito por (LAEMMLI., 1970), as proteínas foram fracionadas em gel de SDS-PAGE 12%. Na proporção 1:1 as alíquotas do extrato total foram diluídas em tampão de amostra de proteína (T.A 4X: 0,16 M Tris-HCl pH 6.8; SDS 4%; -mercaptoetanol 10%; Glicerol 24%; azul de bromofenol 0,02%) e fervidas por 5 minutos. Logo após, as amostras foram aplicadas no gel de poliacrilamida juntamente com o padrão de massa molecular (*PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder – Fermentas*). A amperagem foi regulada em 20 mA, durante a corrida.

Após eletroforese utilizou-se o método do *coomassie blue* para coloração do gel. Assim, incubou-se os géis por aproximadamente 2 horas à temperatura ambiente neste corante e, a seguir, foram descorados com solução descorante (Metanol 4%; Ácido Acético 7,5%) por 2 horas, para a visualização das proteínas.

3.9.3. Eletroforese bidimensional (2-D SDS-PAGE)

Trinta μg de proteínas de todos os extratos foram solubilizadas em tampão de reidratação contendo DTT a 1% e anfólitos pH 3-10 para a preparação de géis bidimensionais. Em sarcófagos (*Strip Holder* 7 cm, GE Healthcare) acondicionaram as amostras para a incorporação das proteínas no gel de primeira dimensão (*Immobiline DryStrip Gels* 7cm; pH 3-10 Linear, GE Healthcare). Em temperatura de 20°C a 50 $\mu\text{A/gel}$ ocorreu a etapa de isoeletrofocalização (IEF) no equipamento *Ettan IPGphor III* (GE Healthcare) seguindo o seguinte protocolo: reidratação por 12 horas; 300V durante 30 minutos; 1000V por 30 minutos e 8000V por 3 horas. As proteínas presentes nos géis de primeira dimensão foram, então, submetidas à redução com 1% de DTT em solução de equilíbrio (uréia 6M; Tris-HCl pH 8.8 1.5M; glicerol 30%; SDS 2%; azul de bromofenol 1%) e, posteriormente, alquiladas com iodoacetamida (IAA) a 4% em solução de equilíbrio.

Utilizou-se gel de acrilamida/bisacrilamida a 10% para a separação das proteínas por massa molecular (segunda dimensão). Posicionou-se o gel de primeira dimensão e o mesmo foi fixado no gel de segunda dimensão com solução de agarose 1% a quente em tampão de eletroforese. A eletroforese ocorreu por cerca de 2 horas à 200 V e 20 mA/gel. A coloração do gel foi realizada pela solução de *coomassie blue* G 250 por 2 horas e o mesmo foi descorado em solução A (etanol 40%, ácido acético 7%) por 30 minutos e, em seguida, em solução B (etanol 10%, ácido acético 7%) durante a noite. As imagens dos géis foram conseguidas com o uso do scanner *ImageScanner III* (GE 24 healthcare)..

3.9.4. Ensaio de *Western blot* 1D através de revelação por peroxidase (Quimioluminescência)

Para a detecção da proteína Rpn10 realizou-se a técnica de *western blotting* (Towbin *et al.*, 1979). Aproximadamente 10 µg das frações das diferentes fases do *S. mansoni* foram submetidas à eletroforeses em gel de poliacrilamida 12% e transferidas para membranas de PVDF (*Polyvinylidene Fluoride*) (Invitrogen) a 200 mA em tampão Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, etanol 20% e SDS 0,02% sob refrigeração por duas horas. As membranas foram, então, bloqueadas durante a noite em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5, Tween-20 0,3% e leite em pó desnatado 5%, sendo posteriormente lavadas por três vezes com Tris-HCl 10 mM pH 7,5. Em seguida, a membrana foi mantida sob agitação por 30 minutos em tampão *immunoblotting* (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, *Tween-20* 0,013% e leite em pó desnatado 5%). Foi adicionado soro contendo anticorpos policlonais anti-Rpn10 (tabela 2), produzidos conforme descrito no item 3.8.4, ao tampão *immunoblotting* (1:2000), reagindo por 3 horas à temperatura ambiente. Decorrido o tempo descrito, por três vezes as membranas foram lavadas com Tris-HCl 10 mM pH 7,5 e levadas à incubação por 2 horas com tampão *immunoblotting* contendo o anticorpo secundário (tabela 2) anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:5000) (Sigma Aldrich, EUA). Lavou-se as membranas com (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, *Tween-20* 0,5%, NaCl 5M) e o produto da reação enzimática foi detectado por quimioluminescência, através do kit ECL *western blotting* (Amersham Biosciences) seguindo as instruções do fabricante. A exposição foi feita em filme Kodak durante 1 minuto e a revelação feita na ausência de luz, em solução de revelação seguido de lavagem por 1 minuto em água e 1 minuto em solução de fixação. Os tempos de revelação foram padronizados para cada experimento.

Anticorpo primário	Proteína alvo	Anticorpo secundário
Anti-Rpn10 (1:2000)	Proteína Rpn10	Anti-IgG mouse (1:5000)

Tabela 2: Anticorpo primário utilizado na metodologia de *western blot* com sua diluição de uso, e respectivo anticorpo secundário e proteína detectada.

Resultados

4. Resultados

4.1. Expressão em sistema heterólogo de proteínas recombinantes

4.1.2. Obtenção do cDNA para Alfa7 e Rpn10 (C-terminal)

Os cDNAs para Alfa 7 e Rpn10 foram obtidos por RT-PCR como descritos em Materiais e Métodos 3.3. A **figura 11** mostra o padrão de bandas obtidos na reação de PCR com *amplicon* apresentando 753pb e 251pb para os transcritos codificadores de Alfa 7 (Proteassoma 20S) e Rpn10 (Partícula regulatória 19S), respectivamente. Os produtos de PCR foram purificados para eliminação dos dímeros de primers que poderiam ser clonados no vetor no lugar dos genes de interesse, uma vez que possuem sítios attB.

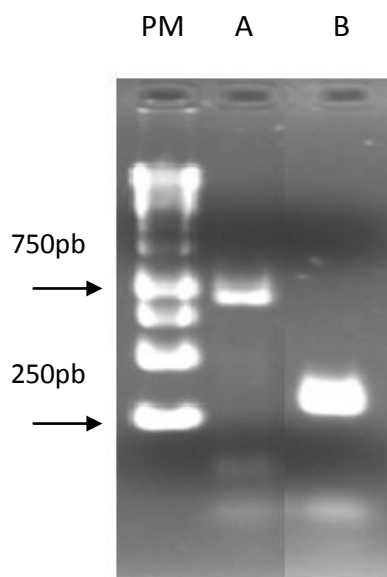


Figura 11: Análise dos produtos de PCR correspondentes aos transcritos para Alfa 7 e Rpn10 (C-terminal). Cerca de 10 μ L da reação de PCR, foram analisados em gel de agarose 1,2% - TBE e corados com brometo de etídeo. (PM) Padrão de massa molecular em pb; (A) Alfa 7 e (B) Rpn10 (C-terminal).

4.1.3. Clonagem e expressão das proteínas recombinantes em *E. coli*

Depois de purificados, os produtos de PCR foram clonados primeiramente no vetor de entrada, pDONRTM221 e, após extração do DNA plasmidial, fez-se a recombinação com o vetor de expressão pDESTTM17. Dessa forma realizou-se a expressão das proteínas recombinantes Alfa 7 e Rpn10 (C-terminal) em células competentes de *E. coli*, linhagem BL21(DE3) transformada com o vetor de expressão recombinado (pDEST17 + Alfa7/ pDEST17 + Rpn10(C-terminal)). A verificação da qualidade das extrações plasmidiais foi realizada em gel de agarose 0,8% e a confirmação das clonagens, por PCR de colônia (3.7), como pode ser visto na **figura 12**.

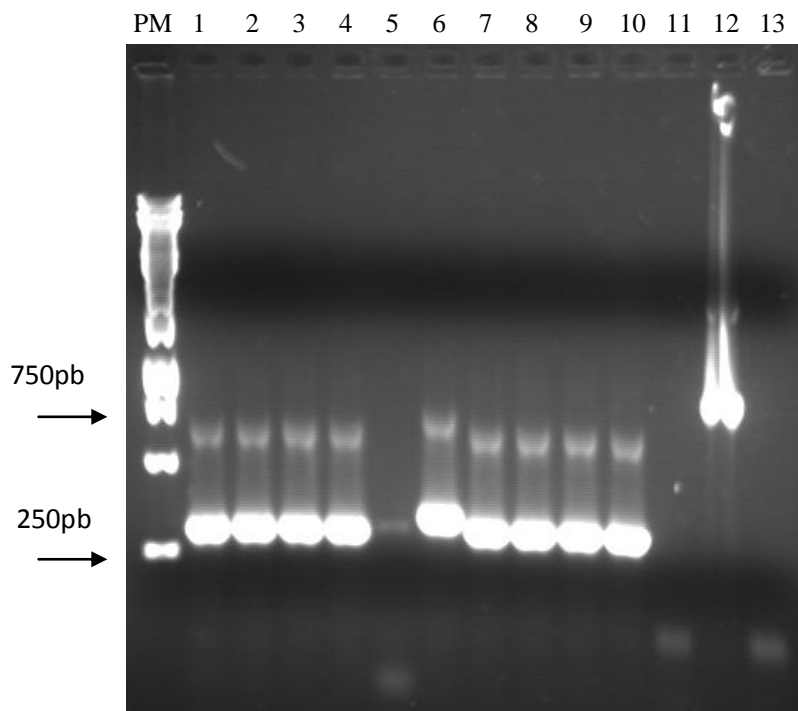


Figura 12: Análise por PCR de colônia dos genes Alfa 7 e Rpn10 (C-terminal) recombinados com o vetor de expressão pDESTTM17. Cerca de 10 μ L da reação de PCR, foram analisados em gel de agarose 1,2%- TBE e corados com brometo de etídeo. (PM) Padrão de massa molecular em pb; Rpn10 (C-terminal) (1 a 10) e Alfa 7 (11 a 13).

Em seguida 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 os tempos de cultivo 2, 3 e 4 horas, as células foram recuperadas por centrifugação e lisadas. As amostras de proteínas totais, foram analisadas em gel de poliacrilamida 12%. Como demonstra a **figura 13**, não houve indução de expressão das proteínas recombinantes nos genes Alfa 7 e Rpn10 (C-terminal).

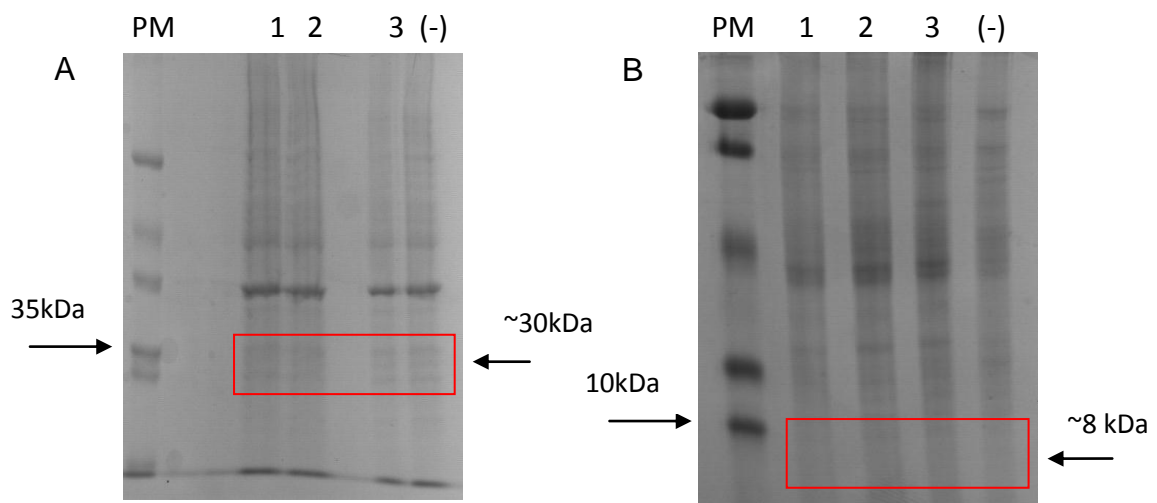


Figura 13: Expressão das proteínas recombinantes Alfa 7 e Rpn10. Em (A) expressão da proteína recombinante alfa 7. (PM) Peso molecular *Page Ruler™ Prestained Protein Ladder*; (1) (2) e (3) Extrato protéico total de *E. coli* após indução por IPTG 1 mM; (-). Extrato protéico total de *E. coli* antes da indução por 1 mM IPTG; Cerca de 20 µL de cada fração foram analisados em SDS-PAGE 12% e corados com *coomassie blue*. Em (B) expressão da proteína recombinante Rpn10 (C-terminal). (PM) Peso molecular *BenchMark* (Invitrogen); (1)(2) e (3) Extrato protéico total de *E. coli* após indução por IPTG 1 mM; (-). Extrato protéico total de *E. coli* antes da indução por 1 mM IPTG; Cerca de 20 µL de cada fração foram analisados em SDS-PAGE 12% e corados com *coomassie blue*.

Como não houve detecção de expressão das proteínas recombinantes para a subunidade Rpn10 (C-terminal) da partícula regulatória 19S e da Alfa 7 (proteassoma 20S) como pode ser visto na eletroforese em gel de poliacrilamida (**figura 13**) utilizou-se uma metodologia alternativa. Através do plasmídeo clonado em vetor de expressão pET28a cedido pela Dra. Enyara R Moraes (Laboratório de Biologia Molecular de Parasitos - Universidade de São Paulo) contendo a região codificadora do transcrito para Rpn10 (inteira) (**figura 14**) realizou-se a expressão da proteína recombinante.

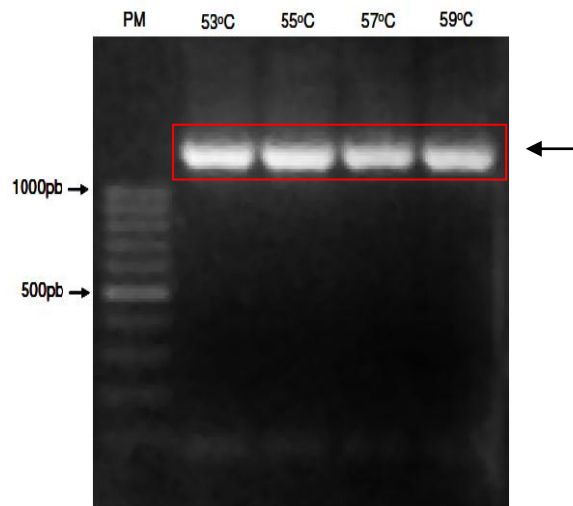


Figura 14: Região codificadora do transcrito para a Rpn10 (inteira). A seta indica a região codificadora do transcrito para a Rpn10(inteira) em quatro diferentes temperaturas. (Fonte: Tese de doutorado Enyara Moraes, 2009).

Como partimos do clone com a sequência predita da proteína Rpn10 (inteira) clonada em vetor de expressão pET28a realizou-se uma transformação bacteriana, como descrito em materiais e métodos (3.6). Em seguida para a expressão heteróloga da proteína Rpn10 (inteira) utilizou-se o mesmo protocolo que o empregado na tentativa de obtenção das proteínas alfa 7 e Rpn10 (C-terminal). A expressão da proteína recombinante Rpn10 (inteira) pode ser visualizada em gel preparativo 12% como demonstrado na **figura 15**.

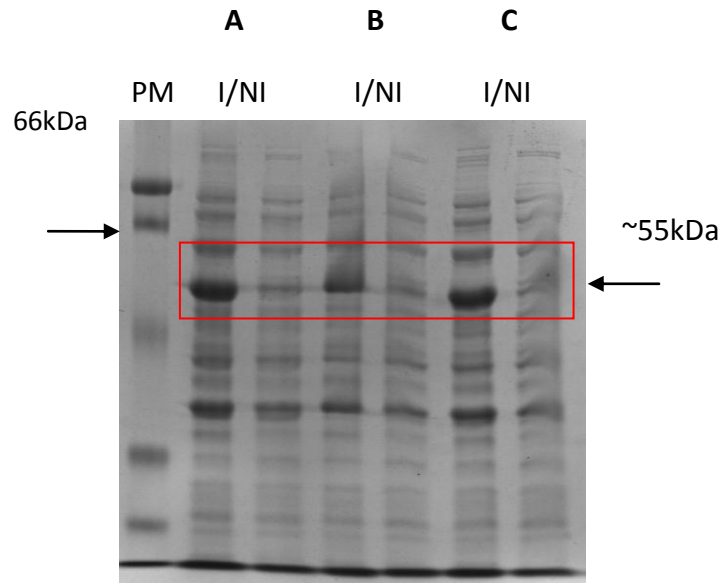


Figura 15: Expressão da proteína recombinante Rpn10 (inteira). Em (A), (B) E (C) expressão da proteína recombinante Rpn10 inteira. (PM) Peso molecular *Page Ruler™ Prestained Protein Ladder*; (A), (B) e (C) Extrato protéico total de *E. coli* induzido ou não(I/NI) durante os tempos de 2, 3 e 4 horas de indução. Extrato protéico total de *E. coli* após indução por 1 mM IPTG; Cerca de 20 μ L de cada fração foram analisados em SDS-PAGE 12% e corados com *coomassie blue*.

4.1.4. Purificação da proteína heteróloga Rpn10 (inteira)

Para a proteína recombinante Rpn10 (inteira), sua purificação foi analisada em gel SDS-PAGE 12% seguido de eluições em membranas de diálise. Amostras de 20 μ L de cada fração eluída foram analisadas em gel preparativo SDS-PAGE 12%. Primeiramente a proteína recombinante foi purificada por coluna de afinidade *Ni Sepharose™ High Performance* conforme descrito em materiais e métodos 3.8.3. A proteína Rpn10 (inteira) purificada, **figura 16**, foi utilizada para produção de anticorpos policlonais anti-Rpn10 em camundongos *swiss*.

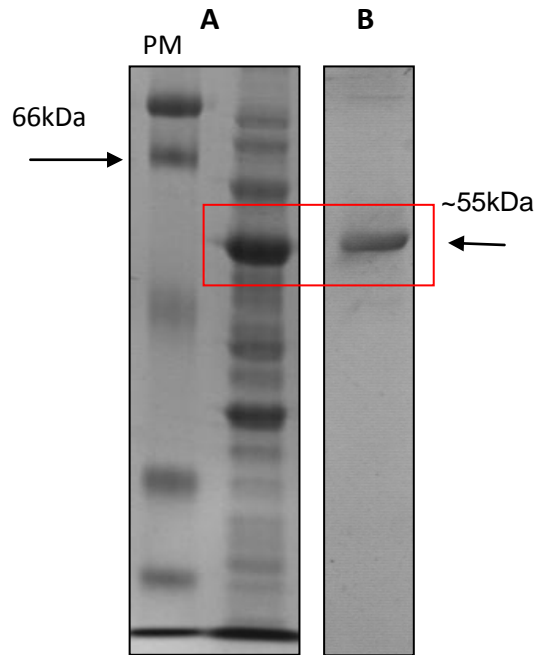


Figura 16: Purificação da proteína heteróloga Rpn10 (inteira) por cromatografia de afinidade. Gel de poliacrilamida 12% corado com *comassie blue*. Em A o Peso molecular (PM) e a proteína recombinante expressa. Em B, a proteína recombinante purificada com resina de níquel. A seta apontando para a figura B indica a proteína Rpn10 (inteira) purificada. O marcador de peso molecular utilizado foi *Page Ruler™ Prestained Protein Ladder*.

4.2 - Produção de anticorpos policlonais específicos contra SmRpn10 (inteira) em camundongos

Para a produção de um anticorpo policlonal anti-Rpn10 em camundongos, utilizou-se a proteína de fusão his-Rpn10. A imunização realizou-se com esta proteína eluída que demonstrou um perfil eletroforético semelhante ao mostrado na **Figura 16** e injetou-se nos camundongos conforme descrito em materiais e métodos (3.8.4). Após a terceira imunização, o soro dos camundongos foi recuperado e testado contra a proteína recombinante Rpn10 como demonstrado na **figura 17**. A figura mostra além da proteína recombinante Rpn10 outras bandas de menor massa molecular, provavelmente resultante de clivagem proteolítica da Rpn10 recombinante.

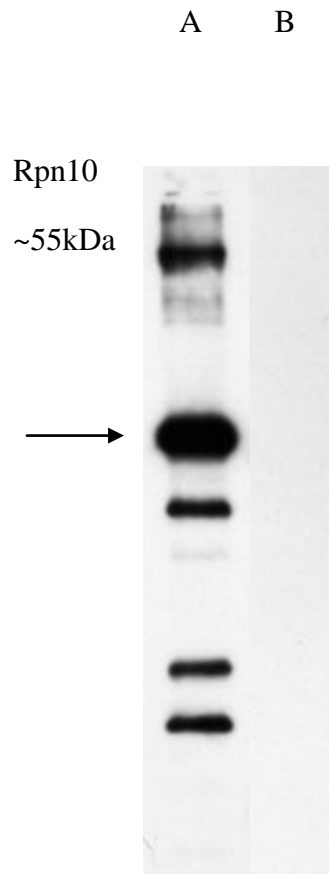


Figura 17: Soro antiRpn10 dos camundongos contra a proteína recombinante Rpn10. A - proteína recombinante Rpn10. B - Soro controle.

4.3. Perfil Proteômico da proteína Rpn10 (inteira)

4.3.1. Extrato total das diferentes fases de desenvolvimento do *Schistosoma mansoni*

A **Figura 18** demonstra uma análise por SDS-PAGE 12% dos extratos utilizados para cada fase analisada durante o ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*. Este experimento contou com uma análise densitométrica que permitiu a obtenção de quantidades equivalentes de proteínas para todos os extratos analisados. Observa-se a qualidade dos extratos pela integridade das bandas reveladas pelo *coomassie blue* R-

250. Posteriormente, foram preparadas membranas para avaliar os níveis protéicos da SmRpn10 utilizando-se a metodologia de *western blotting*.

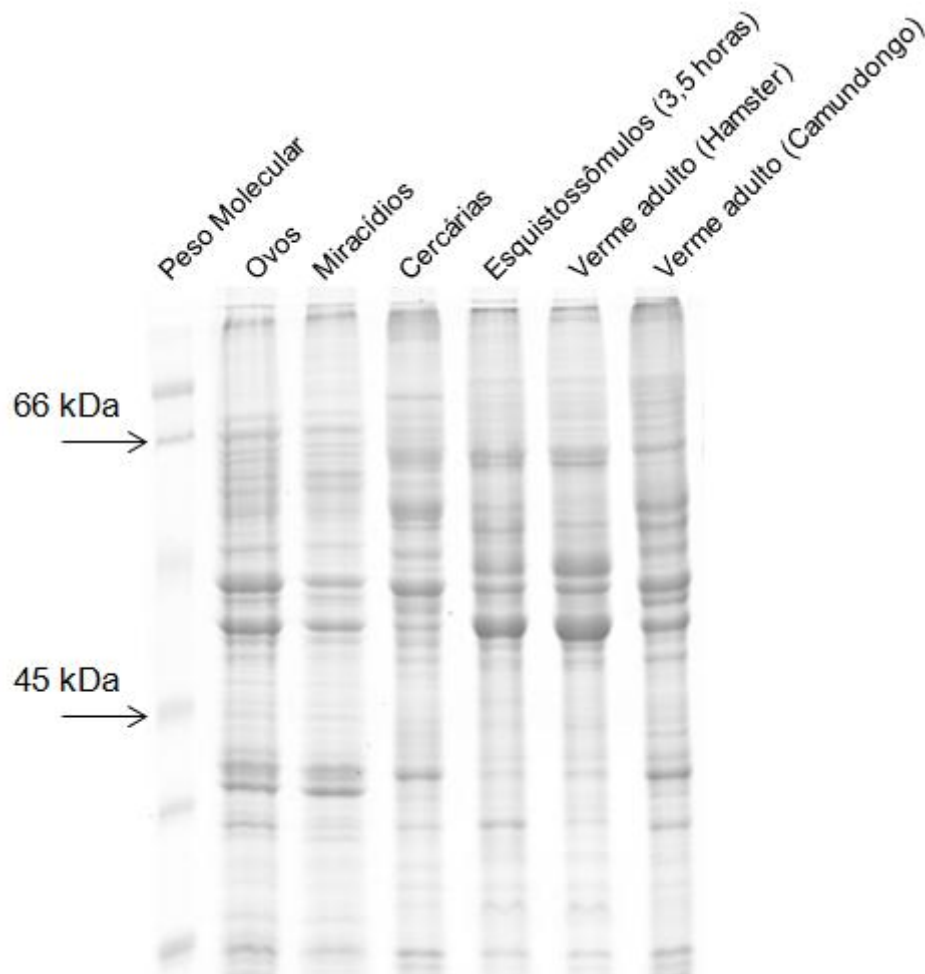


Figura 18: Extrato bruto fracionado em SDS-PAGE gel 12%. 1- ovos 2- miracidios, 3- cercárias 4- esquistossômulos (3,5 horas) 5- verme Adulto (Hamster) 6- verme Adulto (camundongo). 15µg de proteínas do extrato bruto (Materiais e Métodos 3.2.3) foram fracionados em SDS-PAGE 12% e visualizados pelo *coomassie blue* R-250. (PM) O marcador de peso molecular utilizado foi *Page Ruler™ Prestained Protein Ladder*.

4.3.2. Perfil eletroforético bi-dimensional da subunidade Rpn10 da partícula regulatória 19S nas fases de ovos, miracídios, cercárias, esquistossômulos (3,5 horas) e vermes adultos do parasito *Schistosoma mansoni* utilizando o anticorpo anti-Rpn10 total.

Realizou-se uma eletroforese bidimensional para análise do perfil de reatividade do anticorpo anti-Rpn10 nas diferentes fases do parasito. Correu-se um gel contendo 30µL dos extratos protéicos, que em seguida foram transferidos para a membrana de PVDF usando anticorpo IgG total anti-Rpn10 (1:2000) como descrito em materiais e métodos (3.9.3). Como podemos observar nas diferentes fases de desenvolvimento houve predominância de pelo menos três isoformas da proteína Rpn10 (inteira). Os géis 2D (**figuras 19 a 24**), demonstraram ponto isoeletrico experimental para a proteína Rpn10 similar ao teórico em uma faixa de pH ácida. Todos os *blottings* para cada fase analisada mostrou marcações diferentes e características além das isoformas da proteína Rpn10, que acompanhou algumas possíveis bandas encontradas na análise unidimensional anteriormente realizada. Outra característica importante quanto ao gel 2D que chamou bastante atenção foi quanto a intensidade das isoformas da proteína Rpn10 durante o estágio de cercárias. Este experimento por sua vez acompanhou nossa análise unidimensional demonstrando que em ambas as técnicas a expressão da proteína em cercárias sempre esteve maior.

Ponto Isoelétrico

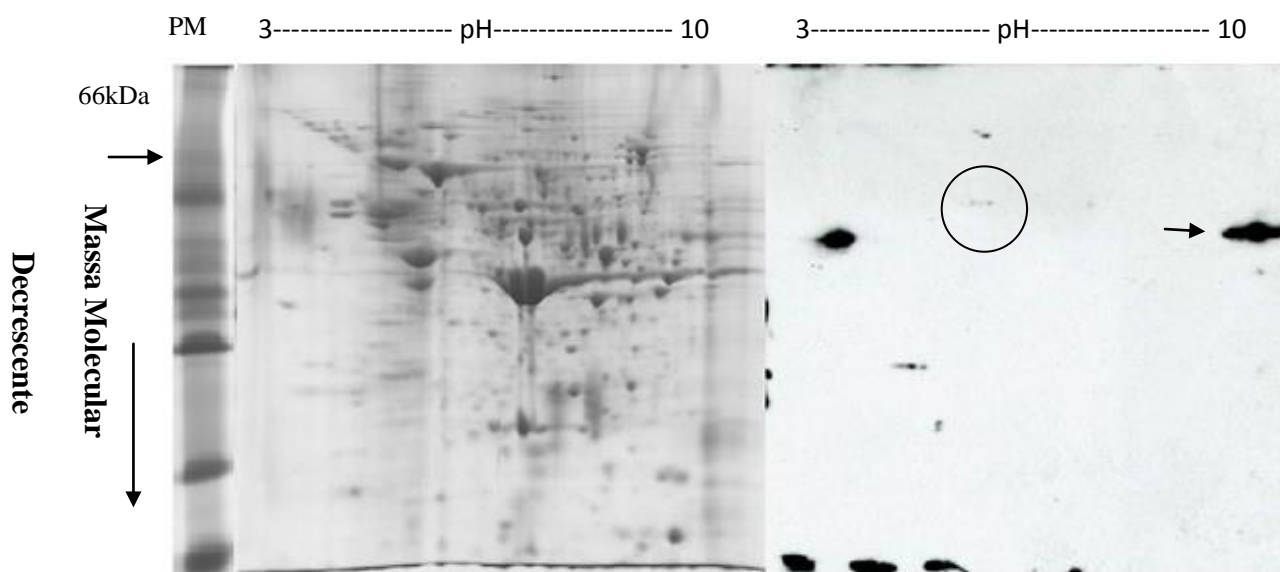


Figura 19: Eletroforese bidimensional 2D no estágio de ovos. A seta indica a proteína Rpn10 recombinante. O círculo representa as isoformas da proteína Rpn10 em extrato de ovos. (PM) Padrão de peso molecular.

Ponto Isoelétrico

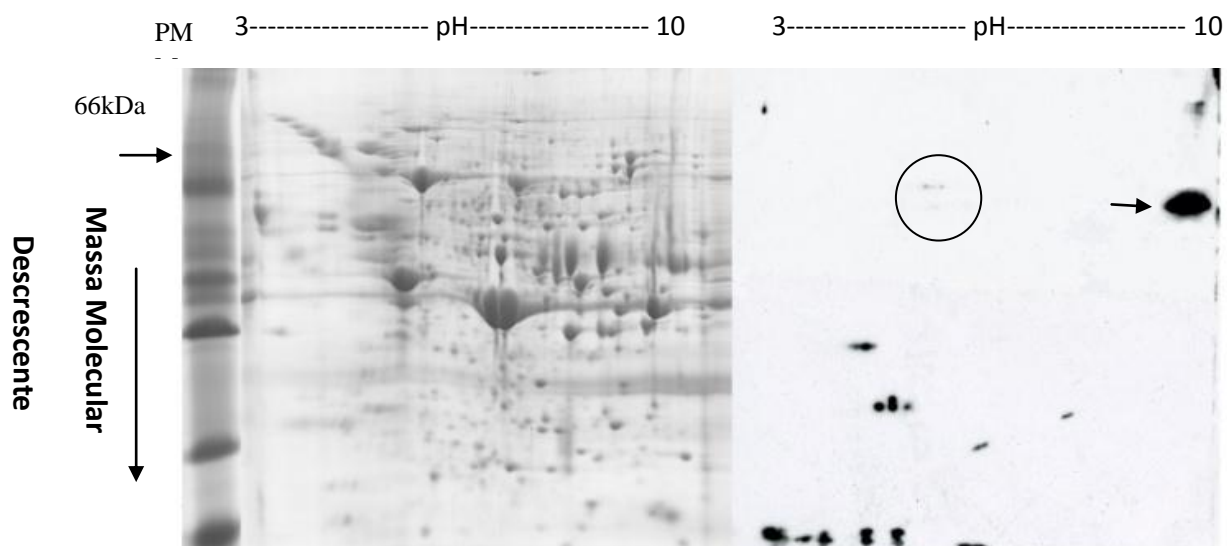


Figura 20: Eletroforese bidimensional 2D no estágio de miracídios. A seta indica a proteína Rpn10 recombinante. O círculo representa as isoformas da proteína Rpn10 em extrato de miracídios. (PM) Padrão de peso molecular.

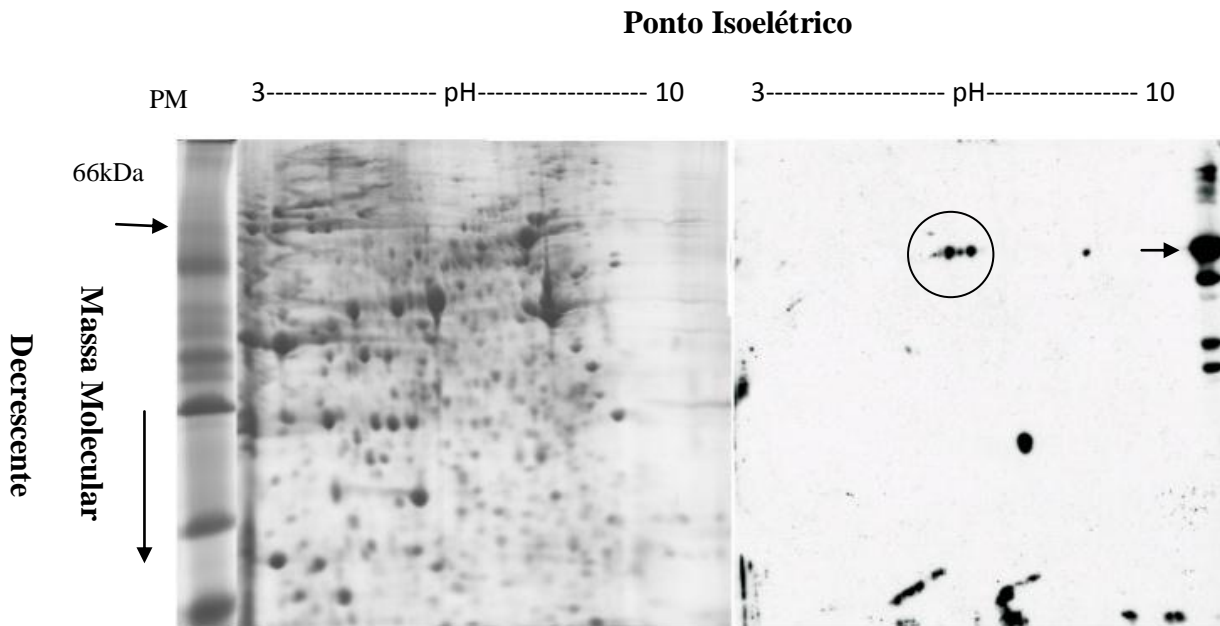


Figura 21: Eletrofore bidimensional 2D no estágio de cercárias. A seta indica a proteína Rpn10 recombinante. O círculo representa as isoformas da proteína Rpn10 em extrato de cercárias. (PM) Padrão de peso molecular.

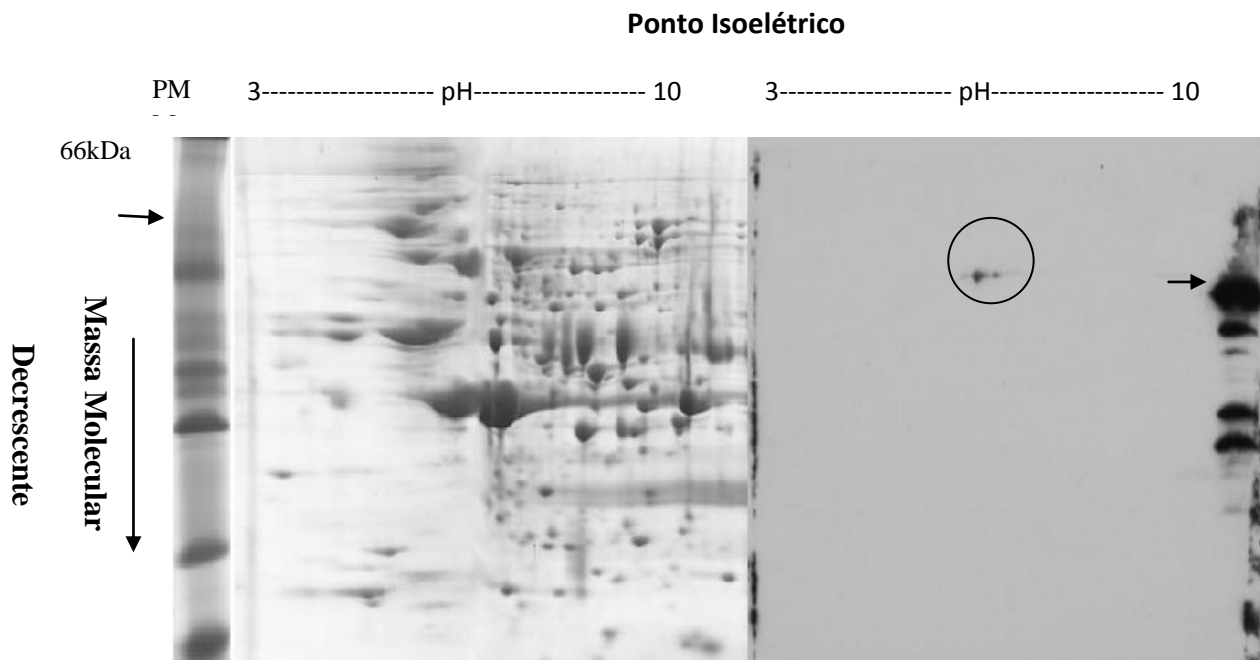


Figura 22: Eletrofore bidimensional 2D no estágio de esquistossômulos de 3,5 horas. A seta indica a proteína Rpn10 recombinante. O círculo representa as isoformas da proteína Rpn10 em extrato de esquistossômulos de 3,5 horas. (PM) Padrão de peso molecular.

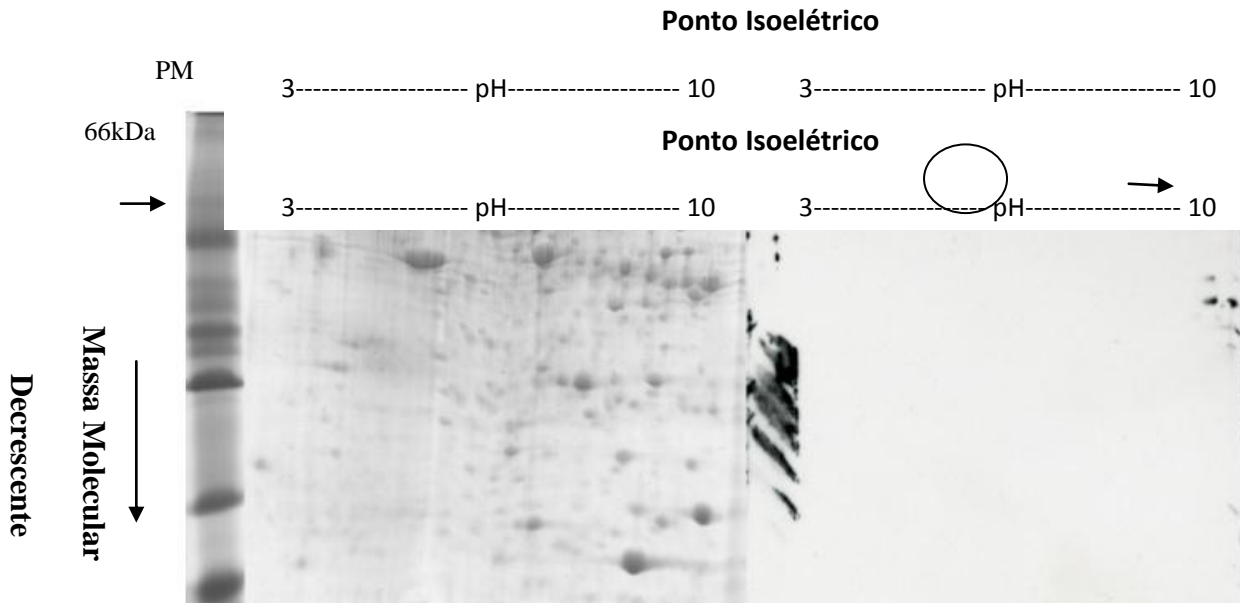


Figura 23: Eletrofore bidimensional 2D no estágio de vermes adultos (Hamster). A seta indica a proteína Rpn10 recombinante. O círculo representa as isoformas da proteína Rpn10 em extrato de vermes adultos. (PM) Padrão de peso molecular.

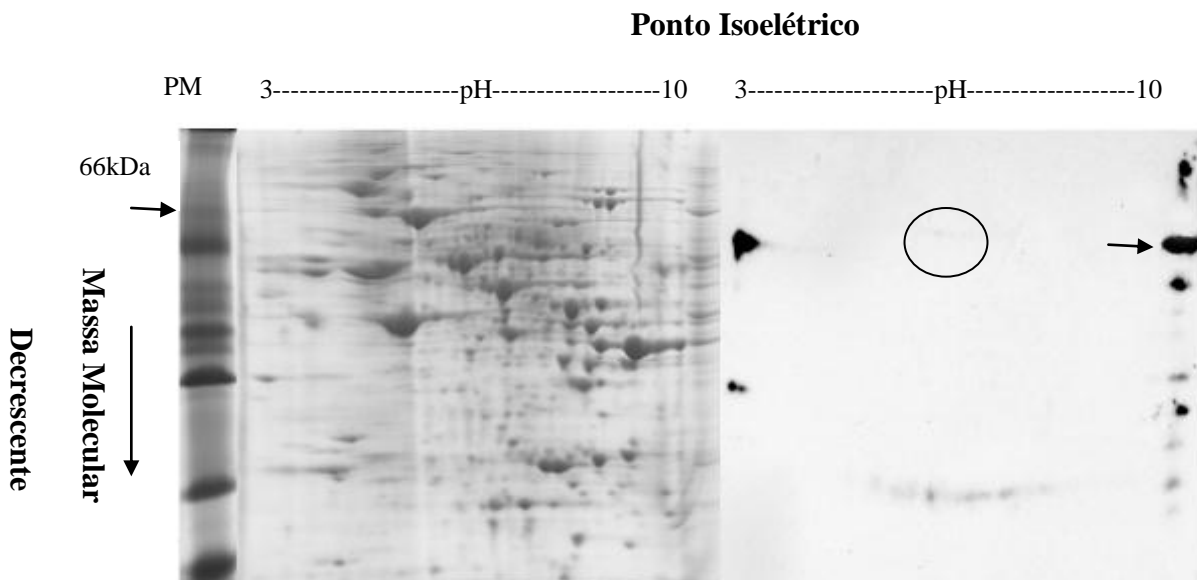


Figura 24: Eletrofore bidimensional 2D no estágio de vermes adultos (Camundongo). A seta indica a proteína Rpn10 recombinante. O círculo representa as isoformas da proteína Rpn10 em extrato de vermes adultos. (PM) Padrão de peso molecular.

4.3.3. Expressão da proteína SmRpn10 em extratos protéicos de ovos, miracídios, cercárias, esquistossômulos (3,5 horas) e vermes adultos utilizando o anticorpo anti-Rpn10 total.

Partiu-se de um *imunoblotting* para análise do perfil de reatividade do anticorpo anti-Rpn10 nas diferentes fases evolutivas do parasito. Correu-se um gel contendo 10µL dos extratos protéicos, fez-se a transferência para a membrana de PVDF e procedeu-se o *imunoblotting* usando um anticorpo IgG total anti-Rpn10 (1:2000) como descrito no item 3.9.4. Como podemos observar na **Figura 25**, o *imunoblotting* revela o perfil de reatividade do anticorpo Rpn10 (inteira). O anticorpo purificado reconhece uma proteína de tamanho aproximado de 55 kDa em praticamente todas as fases analisadas. Os mesmos extratos não revelam nenhuma marcação quando incubados apenas com o anticorpo secundário excluindo assim, a possibilidade de interações inespecíficas (dado não mostrado). A figura ainda mostra a presença de bandas de baixo peso molecular em praticamente todas as fases analisadas.

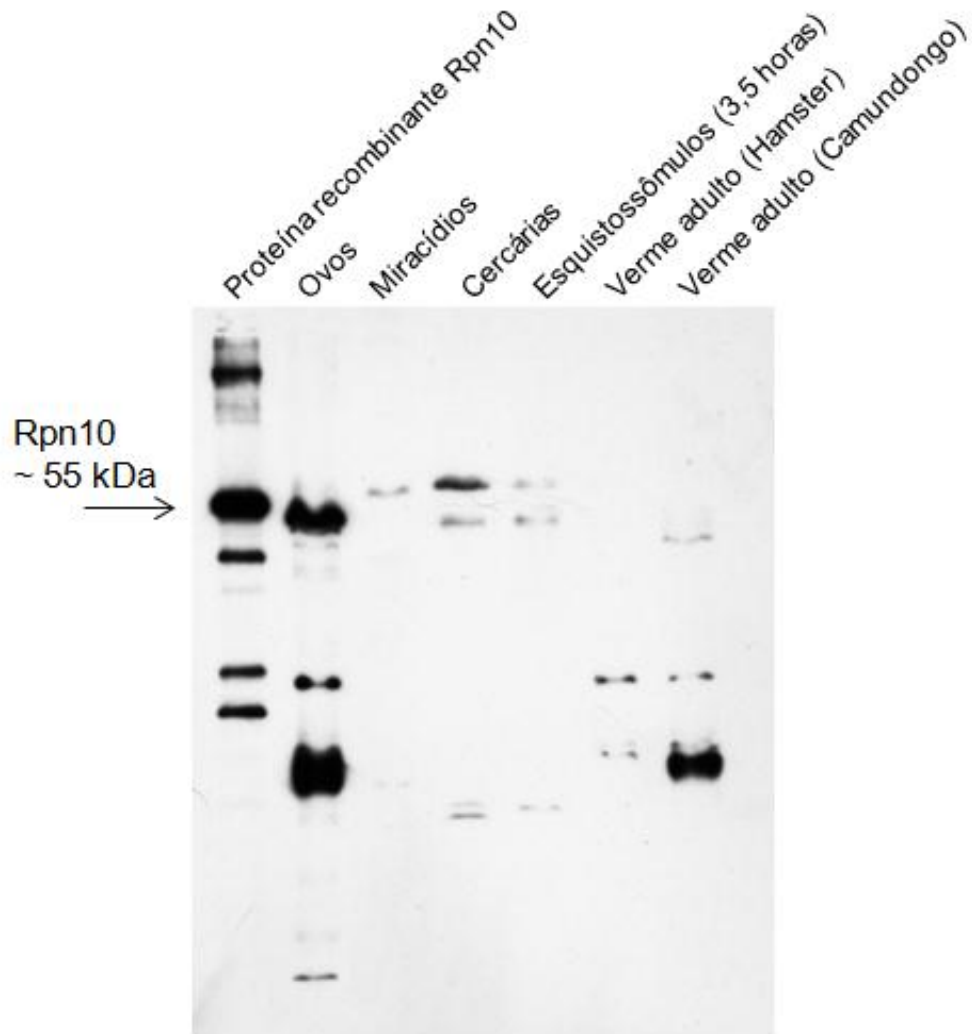


Figura 25: Reatividade do anticorpo frente a Rpn10. 10 μ g de proteínas do extrato bruto foram fracionados em SDS-PAGE 12% e transferidos para uma membrana de PVDF como descrito em materiais e métodos 3.9.4. (1) - Reatividade do antisoro anti-Rpn10 frente a recombinante Rpn10 purificada;(2) – Reatividade do antisoro anti-Rpn10 frente a extrato solúvel de ovos do *S. mansoni*;(3) – Reatividade do antisoro anti-Rpn10 frente a extrato solúvel de miracídeos do *S. mansoni*;(4) - Reatividade do soro controle frente a extrato solúvel de cercárias do *S. mansoni*;(5) – Reatividade do antisoro anti-Rpn10 frente a extrato solúvel de esquistossômulos de 3,5 horas do *S. mansoni*;(6) – Reatividade do antisoro anti-Rpn10 frente a extrato solúvel de vermes adultos (Hamster) do *S. mansoni*;(7) - Reatividade do soro controle frente a extrato solúvel de vermes adultos (Camundongo) do *S. mansoni*.

Discussão

5. Discussão

O proteassoma é composto de uma partícula central (CP, ou partícula 20S) e seus reguladores (RP, 19S, ou PA700) (GLICKMAN *et al*, 1998). O CP é um complexo em forma de barril, que contém vários sítios ativos proteolíticos que enfrentam seu interior. A RP reconhece e transloca substratos alvo para a CP, no entanto há vários fatores envolvidos no recrutamento de proteínas voltado para o RP do proteassoma. A primeira abordagem do presente trabalho partiu da expressão em sistema heterólogo bacteriano de uma subunidade do proteassoma 20S (alfa7) e da porção C-terminal de uma subunidade da partícula regulatória 19S (Rpn10). O estudo tem como objetivo geral caracterizar subunidades específicas do proteassoma 26S a nível proteômico para um maior entendimento do o ciclo de vida do *S. mansoni*.

GUERRA-SÁ *et al.*, (2005) iniciaram os primeiros estudos sobre a importância da via dependente de ubiquitina-proteassoma durante o desenvolvimento do *S. mansoni* no hospedeiro vertebrado. O grupo demonstrou que inibidores específicos do proteassoma reduziram o número de esquistossômulos recuperados do pulmão sugerindo o quão fundamental é o proteassoma durante o ciclo de vida do parasito. Em um ensaio paralelo o mesmo grupo demonstrou o comportamento do sistema proteolítico na presença de ATP/ATP+Ubiquitina/ATP+Ubiquitina+MG132. Notou-se que a proteólise endógena em vermes adultos foi aproximadamente doze vezes maior na presença de ATP e vinte vezes maior com ATP e Ubiquitina sugerindo que o sistema ubiquitina-proteassoma é altamente regulado por ATP e ubiquitina. Uma outra abordagem realizada em relação a proteólise endógena em cercárias, demonstrou níveis menores quando comparado com vermes adultos. Em suma esta baixa atividade

proteolítica dependente de ubiquitina em extratos de cercárias poderia estar ligada a regulação diferencial do complexo durante o estágio de cercárias.

MATHIESON *et al.*, (2011) demonstrou a relação da via dependente de ubiquitina-proteassoma envolvida em outras etapas do ciclo biológico do *S. mansoni*, como no desenvolvimento dos ovos eliminados pelo parasito. O grupo observou que o proteassoma 20S foi mais expresso em ovos não totalmente desenvolvidos comparados aos desenvolvidos. A mesma análise foi realizada para um ensaio de atividade do proteassoma em que o mesmo resultado foi observado. Além disso o PI31 (BOTELHO-MACHADO, C *et al.*, 2010), que atua como um inibidor endógeno do proteassoma 20S, é altamente conservado no parasito sendo expresso em seus diferentes estágios biológicos.

Continuando os estudos do proteassoma 26S em *S. mansoni* a fim de obter informações sobre a expressão e conservação de subunidades RPTs do proteassoma 26S, OLAVO *et al.*, (2007) investigou o padrão de expressão das subunidades Rpts da partícula regulatória 19S nas diferentes fases do ciclo de vida do parasito. Por meio do isolamento de RNA total e RT-PCR a partir de esporocistos, cercárias, esquistossômulos, vermes adultos e ovos, esse grupo demonstrou que as subunidades SmRpts não são expressas em todas as fases analisadas durante o ciclo de vida do *S. mansoni*. ENYARA R. MORAIS (tese de doutorado, 2009), demonstrou por meio de análises de transcrição do gene que codifica para SmRpn10 um perfil diferencial de expressão entre as fases de vermes adultos, ovos, cercárias e esquistossômulos. Os níveis de transcritos que codificam para SmRpt1, 2 e 6 que não foram detectados em cercárias por RT-PCR foram ainda investigadas pela abordagem de *Northern blot*. Essas subunidades não foram expressas quando comparado sua expressão no estágio de verme adulto. Este resultado confirma os achados de (GUERRA-SÁ *et al.*, 2005), que em

cercárias o proteassoma submetido ao tratamento com inibidor MG-132 conduziu à acumulo de substratos ubiquitinados, resultando na redução do número de esquistossômulos recuperados do pulmão no hospedeiro mamífero. O baixo nível de transcrição das subunidades ATPase demonstrado também corroboram com o baixo índice de proteólise encontrado em extratos de cercárias (GUERRA-SÁ *et al.*, 2005).

Finalmente, a hipótese de que a presença dos transcritos SmRpt1, SmRpt2 e SmRpt6 em esquistossômulos, mas não em cercárias, e a presença de SmRpt5 apenas em esquistossômulos, sugere um conjunto diferencial dos processos de manutenção do complexo proteolítico 26S, o que pode estar relacionado com o reconhecimento seletivo e degradação de substratos de proteínas nos estágios iniciais de desenvolvimento de *S. mansoni* hospedeiro vertebrado. A diversidade de subunidades do proteassoma em *S. mansoni*, bem como outros reguladores do proteassoma como SmPI31 (BOTELHO-MACHADO, C *et al.*, 2010), certamente contribui para as taxas de degradação de proteínas que pode refletir nos processos metabólicos e alterações morfológicas indispensáveis para o desenvolvimento do parasito.

No presente trabalho os cDNAs para cada transcrito foram obtidos e em seguida clonados utilizando um sistema de clonagem desenvolvido pela Invitrogen denominado Gateway®. A confirmação da clonagem foi feita por PCR de colônia. Realizou-se ensaios com as enzimas de restrição *BamHI* e *EcoRI*, porém os resultados não foram conclusivos. O resultado negativo na tentativa de expressão deve-se a dificuldades metodológicas associadas com o tempo de indução de IPTG x concentração de IPTG. A expressão de proteínas recombinantes é controlada pelo ajuste da concentração de IPTG com o seu melhor tempo de indução, e por isso mais experimentos precisam ser realizados para padronizar o tempo ideal e a concentração de IPTG para ambos os genes. A metodologia alternativa encontrada para poder entender a expressão de

subunidades do complexo 19S ao longo do desenvolvimento do *S. mansoni*, a nível proteômico, baseou-se na indução de expressão da proteína recombinante do plasmídeo clonado em vetor pET28a cedido pela Dra Enyara R Moraes contendo a região codificadora para a proteína Rpn10 (inteira). A expressão da proteína recombinante Rpn10 com indução por 1mM de IPTG pode ser confirmado em gel preparativo 12%. Após a purificação da proteína SmRpn10, esta apresentou alto grau de homogeneidade e tamanho de aproximadamente 55 kDa.

Um aspecto crucial da via ubiquitina-proteassoma é a regulação da interação entre substratos poliubiquitinados e o proteassoma (FINLEY., 2009). Uma falha deste mecanismo de reconhecimento pode levar à disfunção do proteassoma e à acumulação de proteínas, eventos observados em patologias múltiplas (CIECHNOVER e BRUNDIN., 2003).

A Rpn10/S5a desempenha um papel no reconhecimento de conjugados ubiquitinados por meio de motivos de interação com a ubiquitina - UIMs (DEVERAUX *et al.*, 1994, VAN NOCKER *et al.*, 1996 e FU *et al.*, 1998). Análises de bioinformática demonstraram que a proteína Rpn10 de *S. mansoni* apresentam 3 UIMs distribuídos ao longo da região codificadora. A Rpn10 medeia o direcionamento para o proteassoma de ciclina B1, Sic1, GIC2, e GCN4 (VERMA *et al.*, 2004, HANNA *et al.*, 2006 e SEONG *et al.*, 2007). A mutação de RPN10 produz uma diminuição na capacidade proteolítica do proteassoma (ELSASSER *et al.*, 2004 e VERMA *et al.*, 2004) e é letal em rato (HAMAZAKI *et al.*, 2007).

ENYARA R. MORAIS (tese de doutorado, 2009), com a caracterização molecular e funcional da proteína Rpn10, sugeriu que o anticorpo produzido foi aparentemente específico, e demonstrou o reconhecimento da proteína SmRpn10 pelos anticorpos policlonais anti-Rpn10 totais somente no extrato protéico total de ovos. No

presente trabalho com a perspectiva de obter anticorpos policlonais altamente específicos contra a proteína Rpn10 utilizou-se estratégias específicas. A primeira foi a adsorção com extrato de *E. coli* sem indução com IPTG para tornar a preparação mais específica, e a segunda estratégia foi utilizar o seguinte adjuvante: 40 mg/ml hidróxido de alumínio + 40 mg/ml hidróxido de magnésio para otimizar a imunogenicidade. Logo, a produção de anticorpos policlonais anti-Rpn10 em camundongos após a purificação da proteína, confirma que o anticorpo produzido é altamente específico e foi demonstrado o reconhecimento da proteína SmRpn10 de aproximadamente 55 kDa pelos anticorpos policlonais anti-Rpn10 em praticamente todas as fases analisadas.

Uma segunda abordagem do trabalho parte de uma análise bidimensional da proteína Rpn10 (inteira) durante o ciclo de vida do parasito. O *immunoblotting* realizado com o anticorpo anti-Rpn10 revelou a marcação de pelo menos três isoformas da proteína Rpn10 (inteira) na altura de aproximadamente 55 kDa em todas as fases analisadas. O perfil característico destas isoformas durante os estágios analisados demonstra a especificidade do anticorpo reconhecendo a proteína predita com ponto isoelétrico experimental próximo ao teórico em uma faixa de pH ácida. Dessa forma, este resultado corrobora aos obtidos por (CASTRO-BORGES *et al.*, 2007), que obtendo sucesso na purificação do proteassoma 20S de verme adulto fez uso das técnicas de eletroforese bidimensional e espectrometria de massa do proteassoma isolado possibilitando a caracterização das subunidades α e β . Tais subunidades possuem diversidade de isoformas, provavelmente vinda de uma série de modificações pós-traducionais. Outra abordagem desenvolvida pelo mesmo grupo mostrou perfis distintos para a subunidade α do proteassoma quando comparado cercárias e vermes adultos sugerindo que o proteassoma exibia montagens alternativas durante as fases adultas do verme.

Um aspecto importante que chamou atenção na análise bidimensional foi quanto a maior intensidade observado em cercárias, uma vez que, acompanhou a análise unidimensional demonstrando que teve um maior nível de expressão dessa proteína em ambas as técnicas utilizadas. Durante experimentos de *microarray* comparativo de fases larvais SOPHIE *et al.*, (2011) demonstrou níveis de expressão de transcritos relacionados a via de ubiquitina-proteassoma aumentados em cercárias. Das 97 cisteínas-proteases anotadas no genoma de *S. mansoni*, 35% foram detectadas como diferencialmente expressa neste estudo. Notou-se que elas foram amplamente alto-regulados em cercárias e esquistossômulos de 3 dias. Nos primeiros 3 dias após a transformação em esquistossômulos, ocorre a remodelação do corpo envolvendo o desaparecimento completo de glândulas acetabulares (25% do volume do corpo), e reposicionamento da musculatura do esquistossômulo. O grupo sugere que a extensa remodelação que envolve o parasito está ligada a alta-regulação de genes que codificam para proteínas envolvidas na apoptose, autofagia, ou degradação de proteínas por via do sistema ubiquitina-proteassoma. Duas calpains, oito catepsinas, e duas endopeptidases foram mais altamente transcritas nos esquistossômulos do que em cercárias, no entanto cinco calpains, quatro catepsinas e duas enzimas desubiquitinadoras e subunidades do proteassoma, foram mais altamente transcritas em cercárias. O estudo destaca que um número maior de transcrições de certas proteínas tem sua expressão aumentada de acordo com o estágio e necessidade celular do parasito, tais como resposta ao estresse ou seu próprio metabolismo.

Uma terceira e última abordagem do trabalho foi realizar uma análise unidimensional comparativa da proteína SmRpn10 durante o ciclo de vida do parasito, e assim quantificar o nível de expressão da proteína Rpn10 do proteassoma 26S. A presença de uma banda de alta intensidade de tamanho correspondente ao da Rpn10 em

ovos neste *blot* pode estar relacionado ao grande acúmulo de substratos poliubiquitinados que ocorre nesta fase como mostrado por (CASTRO-BORGES., 2005). Uma maior expressão desta proteína nesta fase seria importante para direcionar os substratos ao proteassoma para a degradação. Neste *blot* não houve marcação na fase de vermes adultos da proteína Rpn10, isto pode ser devido à baixa expressão desta nestes estágios ficando abaixo do limite de detecção do *western blot* com revelação por quimioluminescência.

Como os anticorpos anti-Rpn10 são policlonais reconheceram diferentes epitopos da proteína, as demais marcações no *blot* provavelmente são proteínas que possuem epitopos semelhantes aos da Rpn10 como, por exemplo, proteínas que possuem o domínio UIM, domínio este altamente conservado. Sugerimos também que porções da proteína Rpn10 poderia ter sofrido degradação proteolítica. Outro dado observado neste trabalho foi quanto a produção de anticorpos contra o extrato bacteriano. Por mais que a purificação da proteína Rpn10 tenha sido eficaz houve marcações de baixa intensidade no *blot* que pode ser confirmado por meio da incubação com extrato da própria bactéria utilizada na expressão da proteína recombinante. Deste modo sugerindo que além da produção da proteína recombinante Rpn10 houve ainda resposta contra o extrato bacteriano de *E. coli* utilizado. Como o estágio de vermes adultos utilizado neste trabalho foram provenientes de infecções em camundongos, e sabendo que o parasito apresenta anticorpos específicos aderidos a sua superfície como demonstrado por CARDOSO *et al.*, (2008) a subclasse de imunoglobulina G é produzida no soro de camundongos imunizados com a proteína Sm29 e esta produção se inicia após a primeira imunização. Fez-se necessário descartar a hipótese de algumas das marcações fossem cadeias leves e pesadas de igG particularmente nas fases de vermes adultos e ovos. Para verificar a presença de IgGs no soro dos camundongos,

incubou-se apenas com o anticorpo secundário demonstrando apenas na fase de ovos uma marcação de baixo peso molecular e dessa forma excluindo a hipótese de que as outras marcações presentes nos outros estágios fossem IgGs.

NABHAN *et al.*, (2007) continuando os estudos a cerca do proteassoma 26S em *S. mansoni* realizaram três diferentes abordagens: (1) Análise bioinformática do proteassoma 20S e subunidades do 19S em *Schistosoma mansoni*; (2) Avaliação dos níveis de expressão de mRNA de várias subunidades do proteassoma em cercárias, esquistossômulos e vermes adultos utilizando a técnica de PCR em tempo real; (3) RNA de interferência (RNAi) para uma subunidade específica do 19S, SmRPN11/POH1. A análise confirmou que o proteassoma é abundantemente expresso em cercárias de vida livre. Níveis elevados da atividade peptidásica do 20S foram observados em cercárias, e a análise por RT-qPCR demonstrou níveis ainda maiores de expressão das subunidades do 19S em cercárias do que qualquer outra fase analisada, incluindo vermes adultos corroborando com nossos resultados uma vez que, a análise unidimensional mostrou um acúmulo diferencial de expressão no estágio de cercárias.

Após a transformação em esquistossômulos, NABHAN *et al.*, (2007) demonstrou uma diminuição nos níveis de expressão de todas as subunidades do proteassoma. Este resultado acompanhou nossas análises a cerca da proteína Rpn10 as quais mostraram uma diminuição na sua expressão após a transformação em esquistossômulos. Este grupo demonstrou que os esquistossômulos recém-transformados exibiam as subunidades do proteassoma em média 3 a 6 vezes níveis mais baixos de RNAm quando comparado com cercárias de vida livre. Durante os primeiros dias de desenvolvimento dos esquistossômulos os níveis de expressão mantiveram-se baixos e aumentou novamente após 6 a 9 dias de cultura. No entanto, foi observado que o nível de expressão das subunidades do complexo 19S foram menores que as subunidades do

20S analisadas. Dessa forma sugere-se que pode haver montagens alternativas destes dois complexos durante o desenvolvimento precoce do parasito. Na última abordagem realizada pelo grupo foi feito um silenciamento gênico a partir da técnica de RNA de interferência inibindo a expressão gênica do alvo SmRPN11/POH1, uma das subunidades mais conservadas do complexo 19S. Os resultados demonstraram que uma diminuição no alvo SmRPN11/POH resultou em mortes significativas de esquistossômulos, indicando que esta subunidade do complexo 19S é essencial para a viabilidade do parasito. Estes resultados levantaram uma série de questões interessantes a cerca da regulação do proteassoma 26S e seu papel no desenvolvimento do *S. mansoni*.

GUERRA-SÁ *et al.*, (2005), avaliou se inibidores do proteassoma acumularia conjugados ubiquitinados em extratos de cercárias. Com adição de inibidores do proteassoma houve um acúmulo de bandas de alto peso molecular reconhecidas pelo anticorpo anti-ubiquitina utilizado no ensaio. Portanto a inibição do proteassoma causou um acúmulo de conjugados ubiquitinados. No presente trabalho também foi observado um acúmulo diferencial da proteína Rpn10 em extratos de cercárias. Estes dados sugerem que há de fato um aumento diferencial da proteína Rpn10 em cercárias, que foi confirmado com a característica da proteína em reconhecer conjugados poliubiquitinados independente do proteassoma 20S.

Em suma o presente estudo revela através de técnicas como análise unidimensionale análise bidimensional perfis de isoformas característicos em todas as fases analisadas durante o ciclo de vida do *S. mansoni*. O trabalho ainda destaca por ambas as técnicas utilizadas um maior nível de expressão da proteína Rpn10 durante o estágio de cercárias. Finalmente, este achado refere-se ao primeiro relato da existência de isoformas para a subunidade Rpn10 constituinte do proteassoma 26S e estas análises

corroboram com os resultados obtidos por CASTRO-BORGES., 2007; GUERRA-SÁ., 2005 agregando diversidade ao perfil de subpopulações possíveis e alternativas deste complexo proteolítico durante o ciclo de vida do *S. mansoni*.

Pouco se sabe sobre as subunidades do proteassoma 26S durante o ciclo de vida do parasito, fato que deve ser investigado através de mais experimentos, o que nos permitirá conhecer um pouco mais sobre esta proteína e conseqüentemente o desenvolvimento do *S. mansoni*.

Conclusão

6. Conclusão

A partir dos dados obtidos com este trabalho podemos concluir que:

- A subunidade Rpn10 do proteassoma 26S de *S. mansoni* apresentou perfil diferencial de expressão em estágios larvais e adultos do verme;
- O estágio de cercária apresentou maior expressão de Rpn10 em concordância com análise prévia da abundância do transcrito nesta fase;
- Análise por eletroforese bidimensional revelou a existência de isoformas para a subunidade Rpn10 em todos os estágios investigados;
- Associada à grande diversidade molecular observada para as subunidades alfa e beta do proteassoma 20S, as isoformas de Rpn10 observadas neste trabalho sugerem a existência de formas alternativas do complexo proteolítico proteassoma 26S em *S. mansoni*.

_____ *Referências Bibliográficas*

7 - Revisão Bibliográfica

AMARAL, R. S., PORTO, M. A. S. Evolução e situação atual da esquistossomose no Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.7, p. 83-90, 1994.

ARRIGO, A. P., TANAKA, K., GOLDBERG, A. L., e WELCH, W. J (1988). Identity of the 19S 'prosome' particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome), Nature 331, 192-194.

BAUMEISTER, W., WALZ, J., ZUHL, F., e SEEMULLER, E (1998). The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease, Cell 92, 367-380.

BERRIMAN M., HASS BJ., LOVERDE PT., WILSON RA, DILLON GP, CERQUEIRA GC (2009). The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. Nature 460 (7253) 352-8.

BOTELHO-MACHADO, C., F. J. CABRAL., C. S. SOARES., E. B. C. MOREIRA., E. R. MORAIS., CL. G. MAGALHÃES., M. S. GOMES., R. GUERRA-SÁ, J. C. ROSA, R. RULLER, R. J. WARD, V. RODRIGUES. Characterization and mRNA expression analysis of PI31, an endogenous proteasome inhibitor from *Schistosoma mansoni*. Parasitol Res (2010) 107:1163–117

CARVALHO, O.S., COELHO, P.M.Z., LENZI, H.L. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008. p.1123.

CASTRO-BORGES, W. Diversidade do Proteassoma 26S e perfil de ubiquitinação durante o desenvolvimento do *parasito Schistosoma mansoni*: Uma abordagem proteômica. Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, 2005.

CASTRO-BORGES, W., *et al* (2007). The 20S proteasome of *Schistosoma mansoni*: A proteomic analysis. *Proteomics* 2007, 7, 1065–1075.

CIECHANOVER A., BRUNDIN P. The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron*. 2003; 40:427–446. [PubMed: 14556719].

CIECHANOVER A., SCHWARTZ AL (1998). The ubiquitin-proteasome pathway: the complexity and myriad functions of proteins death. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95(6):2727-30.

CHU-PING, M., SLAUGHTER, C. A., e DEMARTINO, G. N (1992). Purification and characterization of a protein inhibitor of the 20S proteasome (macropain), *Biochim Biophys Acta* 1119, 303-311.

COUX, O., TANAKA, K., GOLDBERG, A. L. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annual review of biochemistry*, v. 65, p. 801-847, 1996.

CROWE, J., MASONE, BS., RIBBE, J. (1995). One-step purification of recombinant proteins with the 6xHis tag and Ni-NTA resin. *Mol Biotechnol.* 1995 Dec;4(3):247-58.

DARGELOS, E., POUSSARD, S., BRULE, C., DAURY, L., e COTTIN, P (2008). Calcium-dependent proteolytic system and muscle dysfunctions: a possible role of calpains in sarcopenia, *Biochimie* 90, 359-368.

DEMARTINO, G. N., MOOMAW, C. R., ZAGNITKO, O. P., PROSKE, R. J., CHU-PING, M., AFENDIS, S. J., SWAFFIELD, J. C., e SLAUGHTER, C. A (1994). PA700, an ATP-dependent activator of the 20 S proteasome, is an ATPase containing multiple members of a nucleotide-binding protein family, *J Biol Chem* 269, 20878-20884.

DEVERAUX, Q., USTRELL, C., PICKART, C., RECHSTEINER, M. A. 26S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *The Journal of biological chemistry*, v. 269, p. 7059-7061, 1994.

DONALD, V., JUDITH, V. (1995). *Biochemistry, John Wiley & Sons 2 Ed*, 1264 p.

ELSASSER, S., CHANDLER-MILITELLO, D., MÜLLER, B., HANNA, J., FINLEY, D. Rad23 and Rpn10 serve as alternative ubiquitin receptors for the proteasome. *The Journal of biological chemistry*, v. 279, p. 26817-26822, 2004.

ENYARA R. MORAIS. Clonagem, expressão e caracterização molecular e funcional da subunidade Rpn10 do proteossoma de *Schistosoma mansoni*. Tese de doutorado apresentada na – Universidade de São Paulo no ano de 2009).

FINLEY, D. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu Ver Biochem*. 2009; 78:477–513. [PubMed: 19489727].

FU, H., SADIS, S., RUBIN, D. M., GLICKMAN, M., VAN NOCKER, S., FINLEY, D., VIERSTRA, R. D. Multiubiquitin chain binding and protein degradation are mediated by distinct domains within the 26 S proteasome subunit Mub1. *The Journal of biological chemistry*, v. 273, p. 1970-1981, 1998.

GLICKMAN, M. H., RUBIN, D. M., COUX, O.; WEFES, I., PFEIFER, G., CJEKA, Z.; BAUMEISTER, W., FRIED, V. A., FINLEY, D. A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9 signalosome and eIF3. *Cell*, v. 94, p. 615-623, 1998.

GLICKMAN, M. H., CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiological reviews*, v. 82, p. 373-428, 2002.

GOEBL MG., YOCHER 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.

GOLDBERG, A. L (2003). *Nature* 426, 895–899

GONZÁLEZ, J., RAMALHO-PINTO FJ., FREVERT U., GHISO J., TOMLINSON S., SCHARFSTEIN J., COREY EJ., NUSSENZWEIG, V (1996) Proteasome activity is required for the stage-specific transformation of a protozoan parasite. *J Exp Med.* 84(5):1909-1918.

GRAHAM, AL (2003). Effects of snail size age on the prevalence and intensity of avian Schistosoma infection: Relating laboratory to field studies. *Journal of parasitology.* V. 89, n. 3, p. 458-463, 2003.

GUERRA-SÁ, R., CASTRO-BORGES, W., EVANGELISTA, E. A. B., KETTELHUT, I. C., RODRIGUES, V. Schistosoma mansoni: Functional proteasomes are required for development in the vertebrate host. *Experimental Parasitology*, v. 109, p. 228-236, 2005.

HARGROVE, J. L., e SCHMIDT, F. H (1989). The role of mRNA and protein stability in gene expression, *FASEB J* 3, 2360-2370.

GUHA, S., e PADH, H. (2008). Cathepsins: fundamental effectors of endolysosomal proteolysis, *Indian J Biochem Biophys* 45, 75-90.

HANNA J., HATHAWAY NA., TONE Y., CROSAS B., ELSASSER S., KIRKPATRICK DS., LEGGETT DS., GYGI SP., KING RW., FINLEY D. Deubiquitinating enzyme Ubp6 functions noncatalytically to delay proteasomal degradation. *Cell*. 2006; 127:99–111. [PubMed: 17018280]

HARGROVE, J. L., e SCHMIDT, F. H (1989). The role of mRNA and protein stability in gene expression, *FASEB J* 3, 2360-2370.

HARROP, R., WILSON, R. A. Protein synthesis and release by cultured schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*, v. 107, p. 265-274, 1993.

HENDIL, K. B., KHAN, S., e TANAKA, K. (1998). Simultaneous binding of PA28 and PA700 activators to 20 S proteasomes, *Biochem J* 332 (Pt 3), 749-754.

HERSHKO, A., CIECHANOVER, A. The ubiquitin system. *Annual review of biochemistry*, v. 67, p. 425-479, 1998. Hicke, L., Schubert, H. L., and Hill, C. P. (2005) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 610–621.

HICKE, L., SCHUBERT, H. L., e HILL, C. P. (2005). *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 610–621

HOCHSTRASSER, M (2009). Origin and Function of Ubiquitin-like Protein Conjugation. *Nature* 2009 March 26; 458(7237): 422. doi:10.1038/nature07958.

HOELLER D., DIKIC I (2009). Targeting the ubiquitin system in cancer therapy. *Nature*. 2009 Mar 26;458(7237):438-44. doi: 10.1038/nature07960.

HOUGH, R., PRATT, G., e RECHSTEINER, M. (1987). Purification of two high molecular weight proteases from rabbit reticulocyte lysate, *J Biol Chem* 262, 8303-8313.

HU W., BRINDELY JP., MCMANUS PD., FENG Z., GUANG-HA Z (2004). *Schistosome* transcriptome: new insights into the parasite and schistosomiasis. *Trends in Molecular Medicine*. 10:218-225.

JENTSCH, S. (1992). *Annu. Rev. Genet* 26, 179–207.

JUNG, T., CATALGOL, B., e GRUNE, T. (2009). The proteasomal system, *Mol Aspects Med* 30, 191-296.

KAPP K., COUSTAU C., WIPPERSTEG V., JOURDANE J., KUNS W., GREVELDING CG (2003). Transplantation of in vitro-generated *Schistosoma mansoni* mother sporocysts into *Biomphalaria glabrata*. *Parasitology research* 91:482-485.

KATZ, N. *Esquistossomose Medicina Tropical*. São Paulo: Atheneu, p. 175-183, 2003. HOTEZ, P.J.; FERRIS, .T. The antipoverty vaccines. *Vaccine*, v.26, 24, n.31-32, p.5787-99, 2006.

KIRKPATRICK, D. S., HATHAWAY, N. A., HANNA, J., ELSASSER, S., RUSH, J., FINLEY, D., KING, R. W., and GYGI, S. P. (2006). *Nat. Cell Biol.* 8, 700–710.

KLOETZEL, P. M. (2001). Antigen processing by the proteasome, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 179-187.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.

LASKER, K., FORSTER, F., BOHN, S., WALZTHOENI, T., VILLA, E., UNVERDORBEN, P., BECK, F., AEBERSOLD, R., SALI, A., and BAUMEISTER, W. (2012). Molecular architecture of the 26S proteasome holocomplex determined by an integrative approach, *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 1380-1387.

LIN, S. Y., CHEN, W. Y., LEE, F. Y., HUANG, C. J., e SHEU, W. H. (2005) Activation of ubiquitin-proteasome pathway is involved in skeletal muscle wasting in a rat model with biliary cirrhosis: potential role of TNF-alpha, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288, E493-501.

LOWE, J., STOCK, D., JAP, B., ZWICKL, P., BAUMEISTER, W., and HUBER, R. (1995). Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution, *Science* 268, 533-539.

MATHIESON, W., CASTRO-BORGES, W., e WILSON, R. A. (2011). The proteasome-ubiquitin pathway in the *Schistosoma mansoni* egg has development- and morphology-specific characteristics, *Mol Biochem Parasitol* 175, 118-125.

MYKLES, D. L. (1998). Intracellular proteinases of invertebrates: calcium-dependent and proteasome/ubiquitin-dependent systems, *Int Rev Cytol* 184, 157-289.

NABHAN JOSEPH F., FOUAD EL-SHEHABI., NICHOLAS PATOCKA., PAULA RIBEIRO. The 26S proteasome in *Schistosoma mansoni*: Bioinformatics analysis, developmental expression, and RNA interference (RNAi) studies, *Experimental Parasitology* 117 (2007) 337–347.

NEVES, D.P (2002). *Parasitologia Humana*. 11 ed., São Paulo: Atheneu, p.193-212.

PASSMORE, L. A., BARFORD, D. Getting into position: the catalytic mechanisms of protein ubiquitylation. *The Biochemical journal*, v. 379, p. 513-525, 2004.

PEREIRA-JÚNIOR, O. S., CAMILA S., SILVA, WILLIAM CASTRO-BORGES., RENATA GUERRA-SÁ., FERNANDA J. CABRAL., SÉRGIO H. SILVA., CLÁUDIA S. SOARES, ENYARA R. MORAIS, ÉRIKA B. C. MOREIRA, LIZANDRA G., MAGALHÃES, FABIANA M. de PAULA., VANDERLEI RODRIGUES. Identification of ATPase subunits (RPT1-6) transcripts of the *Schistosoma mansoni* 19S proteasome and analysis of their changes in the expression profile during the parasite life cycle

PETERS, J. M. (1994). Proteasomes: protein degradation machines of the cell, *Trends Biochem Sci* 19, 377-382.

PICKART, C.M. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annual review of biochemistry*, v. 70, p. 503-533, 2001.

RANI N., AICHEM A., SCHMIDTKE G., KREFT SG, GROETTRUP M (2012). FAT10 and NUB1L bind to the VWA domain of Rpn10 and Rpn1 to enable proteasome-mediated proteolysis. *Nature Communications* 3, Article number:749.

RECHSTEINER M., REALINI C, USTRELL V (2000). The proteasome activator 11S REG (PA28) and class I antigen presentation. *Biochem J* 345: 1-15.

RECHSTEINER, M., e HILL, C. P. (2005). Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors, *Trends Cell Biol* 15, 27-33.

REY, L (1991). *Bases da Parasitologia Médica*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

RICHARD CS., MERRIT JR, JAMES W. Genetic factors in the susceptibility of juvenile *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. USA., v. 21, number 4, p. 425-434, julho de 1972.

RICHARD, SC. Influence of snail age on genetic variations in susceptibility of *B. glabrata* for infection with *S. mansoni*. *Malacologia*, v. 25, numero 2, p. 493-502, 1984.

RIVETT, A. J. (1993). Proteasomes: multicatalytic proteinase complexes, *Biochem J* 291 (Pt 1), 1-10.

RIVETT, A. J., BOSE, S., BROOKS, P., e Broadfoot, K. I. (2001). Regulation of proteasome complexes by gamma-interferon and phosphorylation, *Biochimie* 83, 363-366.

RUBIN, D. M., VAN NOCKER, S., GLICKMAN, M., COUX, O., WEFES, I., SADIS, S., FU, H., GOLDBERG, A., VIERSTRA, R., and FINLEY, D. (1997). *Mol. Biol. Rep.* 24, 17–26.

SAMBROOK, J., MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 4nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SEONG KM., BAEK JH., AHN BY., YU MH, KIM J. Rpn10p is a receptor for ubiquitinated Gcn4p in proteasomal proteolysis. *J Mol Cells.* 2007; 24:194–199.

SEO, J. e LEE, K J. (2004). Post -translational Modifications and their biological functions: proteomica nalysis and systematic approaches. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 37, 55-44.

SIMPSON AJ., SHER A, MCCUTCHAN TF (1982). The genome of *Schistosoma mansoni*: Isolation of DNA, its size, bases and repetitive sequences. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 6:125–137.

SEUFERT, W., JENTSCH S; SOMMER T; REINS H.A. (1990). Ubiquitin – conjugatin enzymes: novel regulators of eukaryotic cells. *Trends Biochem Sci;* 15(5): 195-198.

SMITHERS SR., TERRY RJ (1965). The infection of laboratory hosts with cercárie of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adults worms. *Parasitology*. 55 (4): 695-700.

SOPHIA J. PARKER-MANUEL., ALASDAIR C. IVENS, GARY P. DILLON, R. ALAN WILSON. (2011). Gene Expression Patterns in Larval *Schistosoma mansoni* Associated with Infection of the Mammalian Host. *Plos One*.

TAMURA, T., NAGY, I., LUPAS, A., LOTTSPEICH, F., CEJKA, Z., SCHOOF, G., TANAKA, K., DE MOT, R., and BAUMEISTER W. (1995). The first characterization of a eubacterial proteasome: the 20S complex of *Rhodococcus*, *Curr Biol* 5, 766-774.

TANAHASHI, N., MURAKAMI, Y., MINAMI, Y., SHIMBARA, N., HENDIL, K. B., and TANAKA, K. (2000). Hybrid proteasomes; Induction by interferon-gamma and contribution to ATP-dependent proteolysis, *J Biol Chem* 275, 14336-14345.

TANAKA, K. (2009). The proteasome: overview of structure and functions, *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85, 12-36.

THOMAS F *et al.*, 2000. Parasites and host life-history traits implications for community ecology and species co-existence. *International journal of parasitology*. V. 30, p. 669-674, 2000.

TOMOAKI UCHIKI., HYOUNG TAE KIM, BO ZHAI, STEVEN P. GYGI, JENNIFER A. JOHNSTON, JOHN P. O'BRYAN e ALFRED L. GOLDBERG (2009). The Ubiquitin-interacting Motif Protein, S5a, Is Ubiquitinated by All Types of Ubiquitin Ligases by a Mechanism Different from Typical Substrate Recognition. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* VOL. 284, NO. 19, pp. 12622–12632, May 8, 2009. transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354.

TURK, B (2006). Targeting proteases: successes, failures and future prospects, *Nat Rev Drug Discov* 5, 785-799.

VAN NOCKER, S., SADIS, S.; RUBIN, D. M.; GLICKMAN, M.; FU, H.; COUX, O.; WEFES, I.; FINLEY, D. & VIERSTRA, R. D. The multiubiquitin-chain-binding protein Mub1 is a component of the 26S proteasome in *Saccharomyces cerevisiae* and plays a nonessential, substrate-specific role in protein turnover. *Molecular and cellular biology*, v. 16, p. 6020–6028, 1996.

VERMA, R., OANIA, R.; GRAUMANN, J.; DESHAIES, R. J. Multiubiquitin chain receptors define a layer of substrate selectivity in the ubiquitin-proteasome system. *Cell*, v. 118, p. 99-110, 2004.

VERJOVSKI-ALMEIDA S., DEMARCO R, MARTINS EA, SÁ RG, RODRIGUES V, *Et al.* (2003). Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. *Nat Genet.* 35(2):148-57.

VERJOVSKI-ALMEIDA S, LEITE LC, DIAS-NETO E, MENCK CF, WILSON RA. (2004). Schistosome transcriptome: insights and perspectives for functional genomics. *Trends in Parasitology.* 20(7):304-308.

VOGES, D., ZWICKL, P., e BAUMEISTER, W. (1999). The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis, *Annu Rev Biochem* 68, 1015-1068.

USTRELL, V., HOFFMAN, L., PRATT, G., e RECHSTEINER, M. (2002). PA200, a nuclear proteasome activator involved in DNA repair, *EMBO J* 21, 3516-3525.

WHO (2010). Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. First WHO report on neglected tropical diseases, Geneva - World Health Organization.

WILKINS, M. R., PASQUALI, C., APPEL, R. D., OU, K., GOLAZ, O., SANCHEZ, J. C., YAN, J. X., GOOLEY, A. A., HUGHES, G., HUMPHERY-SMITH, I., WILLIAMS, K. L., and HOCHSTRASSER, D. F. (1996). From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis, *Biotechnology (N Y)* 14, 61-65.

WILKINSON, K. D. Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. *Seminars in cell & developmental biology*, v. 11, p. 141-148, 2000.

WOELK, T., OLDRINI, B., MASPERO, E., CONFALONIERI, S., CAVALLARO, E., DI FIORE, P. P., and POLO, S. (2006). *Nat. Cell Biol.* 8, 1246–1254.

YOUNG, P., DEVERAUX, Q.; BEAL, R.E.; PICKART, C.M.;RECHSTEINER, M.Characterization of two polyubiquitin binding sites in the 26S protease subunit 5a. *The Journal of biological chemistry*, v. 273, p. 5461-5467, 1998.

ZAISS, D. M., STANDERA, S., KLORTZEL, P. M., and SIJTS, A. J. (2002). PI31 is a modulator of proteasome formation and antigen processing, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14344-14349. Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms, *Nature* 415, 389-395.