

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**

**INFLUÊNCIA DE MEDIADORES QUÍMICOS E FÍSICOS NA MODELAGEM  
ESTRUTURAL E FUNCIONAL DO PROTEASSOMA DE *Schistosoma mansoni***

**Érika Bueno de Carvalho Moreira**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção de título de Mestre em Ciências. Área de Bioquímica.

**Orientador: Prof. Dr. Vanderlei Rodrigues**

**Ribeirão Preto - 2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

### FICHA CATALOGRÁFICA

Moreira, Érika Bueno de Carvalho.

Influência de mediadores químicos e físicos na modelagem estrutural e funcional do proteossoma de *Schistosoma mansoni*. – Ribeirão Preto, 2008.

122p., il., 30cm

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós Graduação em Bioquímica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2008.

1. *Schistosoma mansoni*. 2. Proteossoma. 3. Modulação

**Dedico este trabalho aos meus pais Jair e Ana Lúcia que para mim são como um espelho de amor, respeito, honestidade e conduta.**

**Aos meus irmãos Ennio e Ellen, por sempre estarem presentes me dando apoio, compreensão, amizade e carinho.**

**À minha sobrinha, Ana Cláudia, meu mais sincero amor.**

**Ao meu amor, Pedro, meu querido e sempre companheiro.**

## **Agradecimentos**

### **Dr. Vanderlei Rodrigues,**

primeiramente obrigada pela chance que me deu quando o procurei e, também por proporcionar com a convivência diária, exemplos de força, profissionalismo, bom senso e curiosidade de cientista...

### **Dr. Olavo dos Santos Pereira Júnior,**

como é difícil lhe agradecer... bem, vou tentar... Obrigada, meu grande amigo, pelos ensinamentos, pelo apoio, atenção e incentivo incondicionais.

### **Elenice,**

obrigada por ter sido além de grande amiga e companheira de trabalho, como uma mãe para mim desde que a conheci.

### **Mara,**

além do cuidado com o ciclo, nossa fonte de estudos, obrigada... por sempre nos contagiar com seu alto astral.

### **Amigos do laboratório de Biologia Molecular de Parasitas,**

aos que já não fazem mais parte da equipe, mas que conheci no laboratório; Fernanda, Renata, Patrícia, Camila, Ana Carolina e Abenor. E aos que estão presentes atualmente; Carla, Cláudia, Enyara, Lizandra e Sérgio, obrigada pela paciência, pelos ensinamentos, pela força e motivação. Vocês são meus irmãos de coração.

### **À amiga Camila,**

que não trabalha mais conosco, mas que, felizmente, está sempre presente. Muito obrigada, pelo carinho, pela atenção, amizade, companheirismo e trocas de experiências.

### **Aos colegas de trabalho de outros laboratórios,**

Lúcia, Wander, Isa, Aninha, Wendy, Amanda, Sílvia, Neuza, Mila, Denise, Vinícius, Daniel, Roenick... por estarem sempre dispostos a ajudar quando precisei, o meu muito obrigada.

**Aos amigos da pós-graduação,**

em especial aos departamentos de Bioquímica, Imunologia e Biologia Celular, pelo excelente convívio e pelo prazer de trocarmos conhecimentos.

**À secretaria da Bioquímica,**

Ivone, Lúcia, Téia e Ronaldo, pelo auxílio e atenção sempre que precisei meus sinceros agradecimentos.

**Ao Dr. Vítor Dias Galban,**

Pelas caronas à SBBq e pelo auxílio com alguns probleminhas que surgiram na área da computação.

**Ao professor,**

Dr. Luís Carlos Navegantes, por ter me cedido o composto IBMX, utilizado em grande parte de meu trabalho.

**Aos professores,**

Dra. Maria Cristina Barrera, Dr. Eurico Arruda Neto, Dra. Enilza Maria Espreáfico, Dr. Celso Rodrigues Franci e Dra. Maria Luíza Paçó Larson, que contribuíram disponibilizando o uso de equipamentos e/ou reagentes para a realização deste trabalho.

**Aos meus familiares e amigos,**

obrigada hoje e sempre por todo carinho e incentivo.

***Schistosoma mansoni***

por tanto nos intrigar e, desta forma, nos proporcionar a fonte de muitas perguntas e também, é claro, de algumas importantes descobertas...

**Ao CNPq, FAPESP e FAEPA,**

pelo apoio que depositam na ciência brasileira, meus agradecimentos e, com certeza, os de muitos outros cientistas.

Enfim,

Agradeço a todos que direta ou indiretamente me ajudaram a chegar até aqui.

## **SUMÁRIO**

## SUMÁRIO

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>i</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>iv</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>vi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Schistosoma mansoni</i> .....	2
1.2 Ciclo de vida de <i>S. mansoni</i> .....	3
1.3 Transcriptoma e Genoma de <i>Schistosoma mansoni</i> .....	7
1.4 Sistema Proteolítico Ubiquitina – Proteassoma .....	8
1.5 Proteassoma: biogênese, estrutura e funções .....	12
1.6 Modulação do Proteassoma.....	19
1.6.1 Modulação do Proteassoma sob efeitos químicos .....	22
1.6.1.1. Modulação sob efeito do inibidor da atividade peptidásica do proteassoma (MG-132).....	22
1.6.1.2. Modulação sob efeito de IBMX (3-isobutil-1- metilxanina).....	24
1.6.2 Modulação do Proteassoma sob efeitos físicos .....	25
1.6.2.1. Modulação sob condições de estresse térmico .....	25
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>
2.1 Objetivo Geral.....	29
2.2 Objetivos Específicos.....	29
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
3.1 Manutenção do ciclo de vida de <i>S. mansoni</i> em laboratório.....	31
3.2 Obtenção da fase de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> .....	31
3.3 Obtenção da fase de ovos de <i>S. mansoni</i> .....	32
3.4 Obtenção da fase de esporocistos de <i>S. mansoni</i> .....	32
3.5 Obtenção de esquistossômulos.....	33
3.6 Extração de RNA total das diferentes fases evolutivas de <i>S. mansoni</i> .....	34



3.7	Quantificação de RNA .....	36
3.8	Síntese dos oligonucleotídeos iniciadores.....	36
3.9	Transcrição reversa de RNA total - RT- PCR.....	37
3.10	Reação de polimerase em cadeia (PCR) .....	38
3.11	Densitometria .....	39
3.12	Análise estatística.....	39
3.13	Purificação do produto de PCR.....	39
3.14	Clonagem em vetor de seqüenciamento.....	40
3.15	Obtenção de DNA plasmidial .....	40
3.16	Seqüenciamento das amostras obtidas .....	41
3.17	Análise das seqüências obtidas .....	42
3.18	Cultivo <i>in vitro</i> de vermes adultos: efeitos químicos na modulação do proteassoma.....	42
3.18.1	Análise da expressão do gene SmPOMP sob efeito do inibidor da atividade peptidásica do proteassoma (MG-132) em parasitos adultos mantidos <i>in vitro</i> .....	42
3.18.2	Avaliação <i>in vitro</i> das condições fisiológicas de vermes adultos sob o efeito químico de IBMX (3-isobutil-1-metilxantina).....	43
3.18.3	Análise da reversibilidade de IBMX na ovoposição de vermes adultos cultivados <i>in vitro</i> .....	44
3.18.4	Análise da expressão do gene SmPOMP sob efeito de IBMX.....	44
3.18.5	Atividade proteolítica exógena do extrato bruto de vermes adultos sob efeito de IBMX.....	45
3.18.6	Ensaio de viabilidade dos parasitos sob efeito de IBMX .....	46
3.19	Cultivo <i>in vitro</i> de vermes adultos: efeitos físicos na modulação do proteassoma.....	47
3.19.1	Análise da expressão do gene SmPOMP sob condições de estresse térmico.....	47
3.19.2	Atividade proteolítica exógena do extrato bruto de vermes adultos sob condições de estresse térmico.....	48
3.19.3	Ensaio de viabilidade dos parasitos sob condições de estresse térmico .....	48
3.20	Western blot para detecção de proteassomas 20S e proteínas poli-ubiquitinadas.....	49
3.20.1	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) ....	49
3.20.2	Western blot .....	49

<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>51</b>
4.1 Validação dos oligonucleotídeos iniciadores .....	52
4.2 Análise da expressão do gene SmPOMP nas diferentes fases do ciclo de vida de <i>S. mansoni</i> .....	55
4.3 Efeitos químicos na modulação do proteassoma.....	57
4.3.1 Análise da expressão do gene SmPOMP sob efeito do inibidor da atividade peptidásica do proteassoma (MG-132) em parasitos adultos mantidos <i>in vitro</i> .....	57
4.4 Avaliação <i>in vitro</i> das condições fisiológicas de vermes adultos sob o efeito químico de IBMX (3-isobutil-1-methylxanthine) .....	59
4.4.1 Viabilidade dos parasitos.....	59
4.4.2 Estimativa da ovoposição <i>in vitro</i> .....	61
4.4.3 Análise da reversibilidade da ovoposição de vermes adultos cultivados <i>in vitro</i> na presença de IBMX.....	62
4.4.4 Análise da expressão do gene SmPOMP sob efeito de IBMX.....	63
4.4.5 Atividade proteolítica exógena do proteassoma em extrato bruto de vermes adultos sob efeito de IBMX .....	65
4.4.6 Detecção de subunidades do proteassoma 20S em extrato bruto de vermes adultos sob efeito de IBMX.....	66
4.4.7 Detecção de proteínas poli-ubiquitinadas em extrato bruto de vermes adultos sob efeito de IBMX.....	67
4.4.8 Ensaio de viabilidade dos parasitos sob efeito de IBMX .....	68
4.5 Efeitos físicos na modulação do proteassoma.....	70
4.5.1 Análise da expressão do gene SmPOMP sob condições de estresse térmico... 70	
4.5.2 Atividade proteolítica exógena do extrato bruto de vermes adultos sob condições de estresse térmico.....	72
4.5.3 Detecção do proteassoma 20S em extrato bruto de vermes adultos submetidos a condições de estresse térmico .....	73
4.5.4 Detecção de proteínas ubiquitinadas em extrato bruto de vermes adultos submetidos a condições de estresse térmico .....	74
4.5.5 Ensaio de viabilidade dos parasitos sob condições de estresse térmico .....	75
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>77</b>

<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>91</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>94</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>116</b>

## **ABREVIATURAS**

---

ATP	Adenosina Trifosfato
AMPc	Adenosina Monofosfato cíclica
CTAB	Brometo de Hexadeciltrimetilamônio
CP	Complexo Proteolítico
cDNA	DNA complementar
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DTT	Dithiothreitol
DBAMPc	Dibutiril - AMPc
DEPC	Dietilpirocarbonato
EPA	Ácido eicosapentaenóico
ESTs	Expressed Sequence Tags
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
HSF	Fatores de transcrição de choque térmico
HSP	Proteínas de choque térmico
IBMX	Isobutil-metilxantina
mRNA	RNA mensageiro
ONSA	Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis
ORESTES	Open Reading Frame Expression Sequence Tag
ORF	Open Read Frame
pb	Pares de Bases
POMP	Proteína de Maturação do Proteassoma
PIP	Fator indutor de proteólise
RP	Partícula Regulatória
Rpn	Regulatory Particle Non-ATPase
Rpt	Regulatory Particle Triple A protein
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
SFB	Soro Fetal Bovino
Sm	<i>Schistosoma mansoni</i>
TE	Tampão de Eluição
TFB	Transformation Buffer
Tris	Tris[hidroximetil]aminometano
TPP II	Complexo Tripeptidil peptidase II
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral- $\alpha$

NF- $\kappa$ B	Fator de transcrição nuclear
UV	Ultravioleta
XGal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Beta-D-Galactopyranoside
WHO	Organização Mundial de Saúde

**RESUMO**

---

A modelagem estrutural e funcional do sistema proteolítico ubiquitina-proteassoma apresenta diversas vias de alterações em vários sistemas biológicos, as quais são influenciadas especialmente pelas condições biológicas, químicas e físicas do ambiente.

No presente estudo, foi analisada a expressão gênica de SmPOMP, nos diferentes estágios de desenvolvimento de *Schistosoma mansoni*, já que esta proteína é demonstrada como uma clássica participante da modelagem estrutural do proteassoma, assim como o efeito químico provocado pelo inibidor da atividade peptidásica do proteassoma (MG-132) e do IBMX conhecido inibidor de vias de sinalização mediadas pelo AMPc. Avaliamos também os efeitos desencadeados por condições de estresse térmico, na modulação do proteassoma.

Nossos resultados demonstraram uma expressão diferencial de SmPOMP durante as fases do ciclo biológico de *S. mansoni*, sugerindo que a montagem de novos proteassomas seja requerida de acordo com necessidades celulares específicas. Além disso, foi observado um aumento na expressão de SmPOMP sob efeito do inibidor do proteassoma MG-132, como uma resposta compensatória à inibição. Sob o efeito de IBMX foi observado em cultivo *in vitro* de vermes adultos, um aumento na motilidade e a inibição da ovoposição e, com relação à modulação, foi demonstrada uma diminuição da atividade do proteassoma e um concomitante aumento na expressão de SmPOMP. Frente ao estresse térmico a expressão de SmPOMP se mostrou de forma diferencial. A atividade exógena do proteassoma parece aumentada quando comparada ao controle negativo tratado com MG-132.

A partir desses resultados passamos a identificar e caracterizar moléculas e mecanismos possivelmente envolvidos na modulação do proteassoma de *S. mansoni*, bem como uma adaptação do próprio parasito frente às condições físicas e químicas impostas pelo ambiente externo.



## **SUMMARY**

The structural and functional modulation from proteolytic system ubiquitin-proteasome presents various modification pathways in several biological systems, which are especially influenced by biological, chemical and physical conditions from environment.

In the present study, it was analyzed gene expression of SmPOMP, in the different developmental stages of *Schistosoma mansoni*, since this protein is demonstrated as a classical participant in structural and functional modulation from proteasome, such as the chemical effect promoted through proteasome peptidasic activity inhibitor (MG-132) and IBMX, known inhibitor of signaling pathways mediated for cAMP. Furthermore, it was evaluated the effects caused by thermic stress conditions in proteasome modulation.

Our results have showed a differential expression of SmPOMP during *S. mansoni* life cycle, suggesting that the assembly of new proteasomes be required according to specific cellular needs. Moreover, it was observed an increased expression of SmPOMP in the presence of proteasome inhibitor MG-132 like a compensatory response to the inhibition. Under IBMX effect, it was observed in *S. mansoni* adult worms cultivated *in vitro*, an increase in parasite motility and inhibition of oviposition and, relating to modulation, it was shown a decrease in proteasome activity and a concomitant increase in SmPOMP expression. In front of thermic stress, SmPOMP has presented a differential expression. Proteasome exogenous activity seems to be increased when compared to the negative control treated with MG-132.

From these results, we have identified and characterized molecules and mechanisms possibly involved in *S. mansoni* proteasome modulation, as well an adaptation from parasite in the presence of physical and chemical conditions imposed through environment.

## **1. INTRODUÇÃO**

### 1.1. *Schistosoma mansoni*

O encontro de ovos de *Schistosoma* em múmias egípcias e chinesas datadas de 3.500 antes de Cristo mostra o quanto antiga é a esquistossomose (AMARAL & PORTO, 1999)

O gênero *Shistosoma* foi descrito, primeiramente por Bilharz em 1852 e posteriormente, em 1858 assim foi denominado por Weinland, uma vez que o macho possui uma fenda no corpo (schisto=fenda; soma=corpo), sendo a denominação da espécie *Schistosoma mansoni* dada em 1907, por Sambon. Estudos realizados na mesma época por Manuel Augusto Pirajá da Silva, na Bahia, quando estava fazendo numerosos exames de fezes e necropsias, contribuíram muito, confirmando que o *S. mansoni* habitava as veias mesentéricas e que se tratava de uma espécie distinta.

O gênero *Schistosoma* pertence ao reino Animalia, sub-reino Metazoa, filo Platyhelminthes, classe Trematoda, subclasse Digenea, família Schistosomatidae. As espécies de importância epidemiológica em medicina humana são: *Schistosoma haematobium* (Bilhartz, 1852), *Schistosoma japonicum* (Katsurada, 1904), *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907), *Schistosoma intercalatum* (Fischer, 1934), e *Schistosoma mekongi* (Voge, Brickner & Bruce, 1978), sendo as três primeiras as que melhor se adaptaram ao parasitismo humano (BRINDLEY, 2005; MELO & COELHO, 2005).

Esta doença apresenta ampla distribuição geográfica, consistindo uma das parasitoses humanas mais difundidas pelo mundo. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO), mais de 200 milhões de pessoas são afetadas em todo o mundo e estima-se que mais de 1,53 milhões de pessoas estão incapacitadas devido à doença (WHO, 2004 e CHITSULO et al., 2006).

O parasita *S. mansoni*, causador da Esquistossomose mansônica, popularmente conhecida como "Barriga d'água", "Xistose" ou "Mal do Caramujo", encontrou no Brasil

condições favoráveis à sua transmissão, constituindo então, em um importante problema de saúde pública, especialmente nas regiões nordeste e sudeste do país (KATZ, 2003; MELO & COELHO, 2005).

Acredita-se que a introdução desta helmintíase no território brasileiro tenha ocorrido durante tráfico de escravos originários da África, tendo início, portanto, em Recife e Salvador (ARAÚJO, 1986; PARAENSE, 1986; COURA & AMARAL, 2004). A migração de indivíduos dessas áreas endêmicas contribuiu para a disseminação desta parasitose em áreas até então indenes, onde as precárias condições sanitárias favoreceram o contato de fezes de indivíduos infectados com hospedeiros intermediários susceptíveis (ARAÚJO, 1986; PARAENSE, 1986; AMARAL & PORTO, 1994).

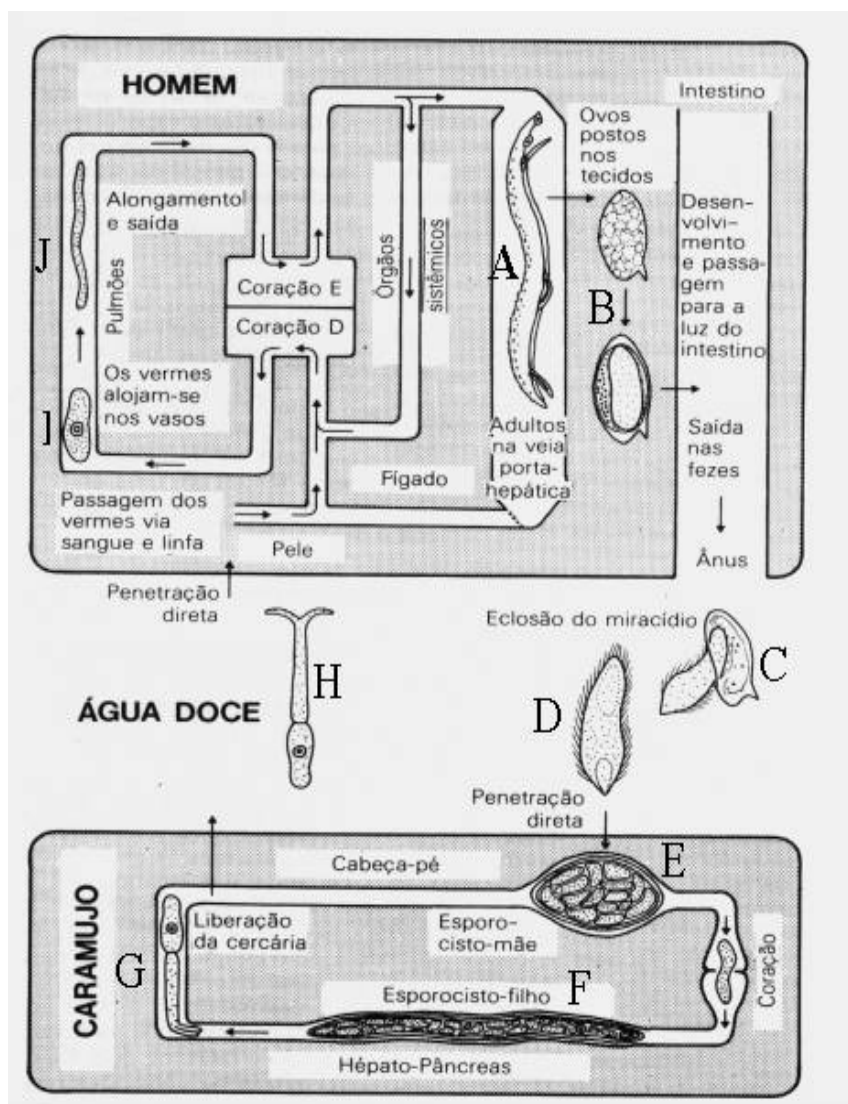
Populações de caramujos, densidade de cercárias e o contato dos humanos com a água, demonstram fortes variações temporais e espaciais, resultando em uma distribuição focal da infecção em países, regiões e vilarejos (GRYSEELS, et al., 1988).

## 1.2. Ciclo de vida de *S. mansoni*

O ciclo biológico de *S. mansoni* é do tipo heteroxênico, com acentuado dimorfismo sexual, diferentes estágios de desenvolvimento e duas formas larvais aquáticas.

Como pode ser observado na **Figura 1** o ciclo ocorre quando os ovos dos vermes adultos são eliminados com as fezes humanas para o meio ambiente, onde eclodem devido a fatores como temperatura, luz intensa e oxigenação da água, liberando a forma larval denominada de miracídio. Esses nadam livremente até encontrar um hospedeiro intermediário susceptível. No Brasil, os hospedeiros intermediários de maior interesse são os caramujos das espécies: *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea*. Dentre as de maior importância epidemiológica, *B. glabrata* é a que se destaca (COURA &

AMARAL, 2004; MELO & COELHO, 2005). Os mecanismos envolvidos no reconhecimento do caramujo, de acordo com alguns relatos, são controlados por dois tipos de respostas. Primeiro, o miracídio responderia a estímulos físicos do ambiente e, segundo os estímulos químicos originados pelo molusco (KAPP, et al., 2003). Após a penetração, os miracídios desenvolvem-se em esporocistos mãe e, por multiplicação de células germinativas, produzem esporocistos filhos. Estes, por sua vez, migram pelo sistema hemolinfático até atingirem o hepatopâncreas e gônadas do hospedeiro intermediário, onde por reprodução assexuada, originam as formas de vida livre, conhecidas como cercárias, aproximadamente 30 dias após a infecção. Normalmente, as cercárias são eliminadas durante o dia, nos períodos de maior luminosidade. Ao alcançarem a pele do hospedeiro, se fixam e, devido à presença de proteases presentes nas glândulas pré-acetabulares e sub tegumentares, penetram através da epiderme e derme (GONZALES, 1989). Depois de penetrarem à pele, as cercárias perdem a cauda e algumas horas depois, completam sua metamorfose transformando-se em esquistossômulos. Os esquistossômulos através da circulação sanguínea atingem os pulmões, o coração e o sistema porta-hepático, onde ocorrem maturação e acasalamento de vermes adultos e, conseqüentemente, a ovoposição (NEVES, 2005). Alguns ovos permanecem na circulação, podendo atingir órgãos, como os pulmões, medula óssea, rim, baço, coração, e especialmente o fígado. Os demais se movem progressivamente até atingir o lúmen intestinal, sendo eliminados junto às fezes (WILSON, 1980).



**Figura 1.** Ciclo de vida do parasito *Schistosoma mansoni*. Durante o desenvolvimento, o parasito sofre profundas modificações morfológicas e bioquímicas, passando por estágios aquáticos e no interior de seus hospedeiros invertebrados e vertebrados. **A.** vermes adultos, **B.** ovos, **C.** eclosão dos ovos, **D.** miracídeo, **E.** esporocisto mãe, **F.** esporocisto filho, **G.** cercária (liberação), **H.** cercária, **I.** esquistossômulo, **J.** esquistossômulo (cinco-sete dias) (Adaptado) (Wilson, 1980).

Os componentes de maior patogenicidade na esquistossomose são os ovos, depositados em grandes quantidades nos capilares da submucosa do intestino ou presentes na circulação sanguínea (KATZ, 2003). Os ovos liberam antígenos solúveis, e por isso ao se fixarem em tecidos, como o fígado e intestino, desencadeiam uma reação inflamatória granulomatosa ao seu redor, podendo resultar em fibrose, hipertensão portal, varizes esofagianas ou retais, hemorragia e óbito. A fase inicial da formação do granuloma é caracterizada por uma grande migração de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos em torno da região de necrose causada pelo ovo. Com o tempo esta área de necrose desaparece, havendo produção de colágeno e fibrosamento (COSTA-CRUZ et al., 1994; MELO & COELHO, 2005). A severidade dos sintomas pode ser relatada através de ambas, intensidade da infecção e resposta imune individual (GRYSEELS, e Cols; 2006).

Por recomendação da WHO, o tratamento da população com praziquantel é atualmente, o principal componente dos programas nacionais de controle (WHO, 2002). O objetivo principal é reduzir a morbidade, diminuindo a intensidade de infecção. Várias estratégias podem ser aplicadas, incluindo o tratamento em massa, a descoberta de casos ativos e o tratamento de grupos de risco. Vinte anos de experiência têm mostrado que o tratamento baseado na população é fácil, seguro e efetivo. A sustentabilidade é, entretanto um requerimento chave para o controle baseado em quimioterapia (WHO, 2002; MAGNUSSEN, 2003).

O advento da tecnologia do DNA recombinante e o progresso do nosso entendimento sobre a resposta imune têm trazido avanços na possibilidade em se desenvolver uma vacina efetiva (DUNNE, et al., 1995).



### 1.3. Transcriptoma e Genoma de *Schistosoma mansoni*

A partir da iniciativa do Programa de Pesquisas em Doenças Tropicais da Organização Mundial de Saúde e de outras agências de fomento, vários grupos vêm estudando de forma sistemática o genoma de *S. mansoni*, expandindo cada vez mais seu conhecimento (JOHNSTON, 1997).

A produção das ESTs (*Expressed Sequence Tags*), que são sequências parciais de DNA complementar (cDNAs), com cerca de 150-600 pb, obtidas das extremidades 5' e 3' e a produção de ORESTES (*Open Reading Frame Expressed Sequence Tags*), que são seqüências parciais de cDNA com cerca de 150-800 pb, correspondentes à região central dos transcritos, têm mostrado serem métodos relativamente simples e rápidos tanto para descobrir novos genes (FRANCO, et al., 1995; HILLIER, et al., 1996; DIAS-NETO, et al., 2000) como para examinar o padrão de expressão gênica, incluindo a identificação de genes diferencialmente expressos (LEE, et al., 1995; MANGER, et al., 1998).

Utilizando a metodologia de ORESTES, Verjovski e colaboradores em 2003, geraram 163.000 ESTs provenientes de bibliotecas representativas dos seis estágios de desenvolvimento do parasita. Essas seqüências resultaram em 31,000 *contigs* e a estimativa da existência de aproximadamente 14,000 genes no genoma do parasito, sendo que 92% destes possuem seqüências depositadas nos bancos de dados públicos (VERJOVSKI, et al., 2003). Essas informações abriram perspectivas para o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos com o desenvolvimento, evasão do sistema imune, organização tecidual, sinalização, dimorfismo sexual, interação com os hospedeiros e a identificação de novos genes que codificam para proteínas candidatas a vacinas e potenciais alvos para a descoberta de novas drogas (VERJOVSKI, et al., 2003).

*S. mansoni* apresenta um genoma estimado em  $2 \times 10^8$  pb, organizado em oito pares de cromossomos sendo sete pares autossômicos e um par de cromossomos sexuais. Os machos são homogaméticos (ZZ) e as fêmeas heterogaméticas (ZW) (TANAKA, 1995). Apesar do sexo deste parasito ser determinado pelos cromossomos, o completo desenvolvimento da fêmea, sua maturação sexual e ovoposição são dependentes do contínuo pareamento com o verme macho (WERNER KUNZ, 2001).

Considerando que este parasita possui um ciclo biológico complexo, associado a mudanças morfológicas, fisiológicas e bioquímicas imagina-se que seu genoma possa manter um padrão de expressão gênica diferencial. Além dos genes constitutivos existem grupos gênicos regulados por mecanismos de estresse (osmótico, térmico ou oxidativo) e regulados durante o desenvolvimento do parasito, através de seus distintos estágios evolutivos (ROLLINSON & SOUTHGATE, 1987).

#### **1.4. Sistema Proteolítico Ubiquitina – Proteassoma**

As células possuem múltiplos sistemas proteolíticos associados a complexos mecanismos regulatórios que juntos asseguram a seletividade de substratos alvo. Desta forma, a homeostase celular é mantida (LECKER et al., 2006). As taxas de síntese e degradação de proteínas em cada célula devem ser balanceadas precisamente, pois uma pequena redução na síntese ou uma pequena aceleração na degradação das mesmas pode resultar, por exemplo, em perda de massa do organismo (MITCH, et al., 1996).

Em todos os tecidos, a maioria das proteínas intracelulares é degradada pelo sistema ubiquitina – proteassoma. Entretanto, proteínas extracelulares e algumas proteínas de superfície celular são capturadas por endocitose e degradadas nos lisossomos. Estas organelas contêm várias proteases, incluindo catepsinas B, H e D. Algumas proteínas citosólicas são

degradadas através da fusão de vacúolos autofágicos aos lisossomos. Outro processo proteolítico citosólico, presente em células de mamíferos, é o sistema dependente da ativação por  $\text{Ca}^{2+}$  e independente de ATP, que envolve cisteíno proteases, chamadas calpaínas (ROCK, et al., 1994, GOLL, et al., 2003).

O processo proteolítico dependente ubiquitina-proteassoma desempenha papel fundamental em diversos mecanismos durante a vida e morte celular, degradando rapidamente proteínas cuja meia-vida deve ser curta e proteínas danificadas ou com conformação incorreta (CIECHANOVER & SCHWARTZ, 1998).

Em helmintos, estudos têm demonstrado que as proteases desempenham papel crítico na virulência, uma vez que elas estão envolvidas na interação parasito-hospedeiro, facilitando a invasão de tecidos e permitindo a nutrição assim como a sobrevivência do parasito, atuando, também, no mecanismo de evasão à resposta imune (TRAP & BOIREAU, 2000).

Durante o desenvolvimento de *S. mansoni*, já está bem definida a participação de diversas proteases em etapas críticas de sua biologia, tais como, na maturação dos ovos, nos mecanismos de penetração das cercárias no hospedeiro vertebrado, na nutrição dos parasitos e, nos mecanismos de imunorresistência ao hospedeiro (SALTER et al., 2000).

A via ubiquitina-proteassoma usa uma complexa maquinaria enzimática para degradar proteínas. Esta funciona em dois passos: o substrato protéico é marcado pela adição covalente de uma cadeia de poli-ubiquitina e, então, o substrato poli-ubiquitinado é degradado por um complexo proteolítico de 2500kDa, chamado de proteassoma 26S. Este complexo mutienzimático é encontrado em todas as células eucarióticas (COUX, TANAKA & GOLDBERG, 1996; BOCHTLER et al., 1999; NAUJOKAT et al., 2007).

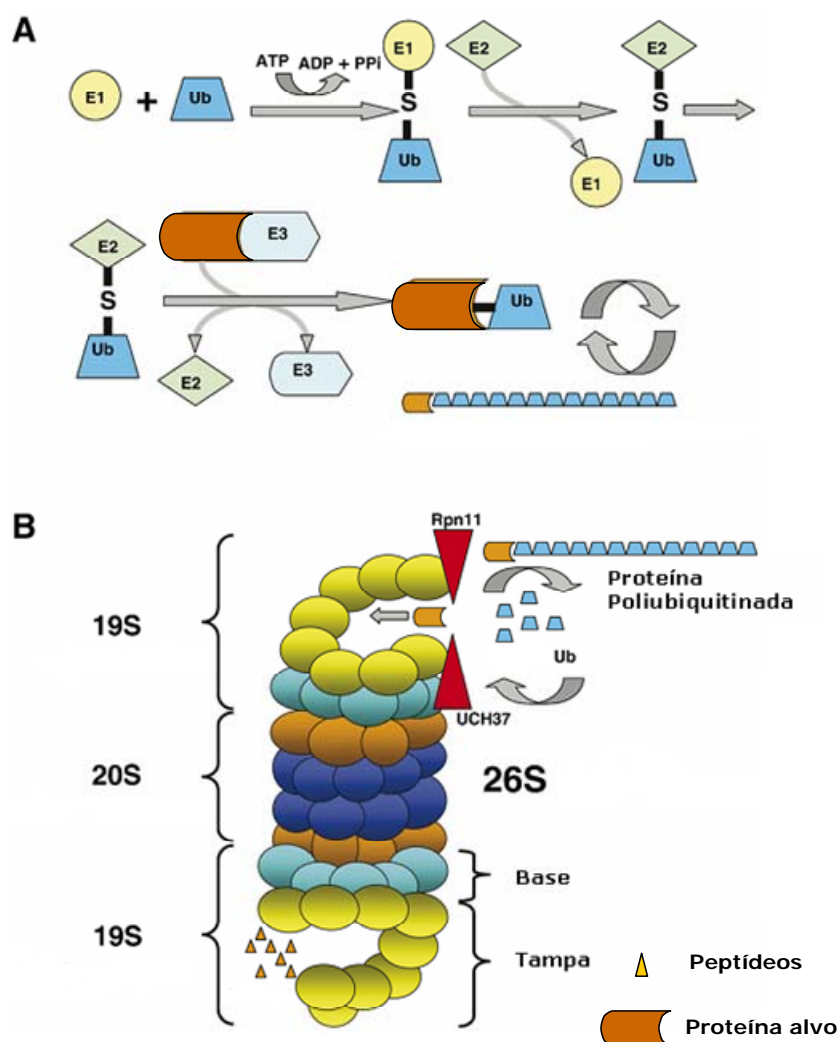
O reconhecimento da alteração funcional de proteínas, por meio de ligação covalente de um polipeptídeo, representou um dos maiores avanços conceituais dentro da biologia celular (FANG & WEISSMAN, 2004). A ubiquitina (Ub) é um polipeptídeo constituído de 76

aminoácidos (8kDa), que apresenta uma estrutura globular firmemente empacotada, sendo estável em ampla faixa de pH (1 a 13), e suportando temperaturas de até 80°C. Esta possui uma seqüência de aminoácidos considerada uma das mais bem conservadas entre todos os organismos eucariotos (OZKAYNAK et al., 1984).

Inúmeros eventos celulares dependentes de ubiquitina já foram caracterizados, como: tráfego intracelular de proteínas, reparo do DNA, endocitose, proteólise celular via lisossomo e proteólise celular via proteassoma 26S, sendo este o evento mais bem caracterizado de todos (WEISSMAN, 2001; PICKART, 2001; DUPRE et al., 2004). A ubiquitinação ocorre quando um resíduo específico de lisina, na superfície do substrato protéico, é covalentemente ligado à região C-terminal de uma molécula de ubiquitina. Os substratos podem ser modificados por monoubiquitinação, que consiste na ligação de apenas uma molécula de ubiquitina em um ou mais de seus resíduos de lisina, ou poliubiquitinados. Na poliubiquitinação (poliUb), cadeias de ubiquitinas são montadas no substrato via formação de uma ligação isopeptídica entre um resíduo de lisina de uma ubiquitina anterior com o resíduo de glicina 76 (Gly<sup>76</sup>) da próxima ubiquitina. A ligação das moléculas de ubiquitina ao substrato, e a ligação dessas moléculas entre si, são eventos dependentes de energia (ATP), e ocorrem por intermédio de passos enzimáticos altamente regulados (PICKART, 2001; MILLER & GORDON, 2005). O destino dos substratos poliubiquitinados está relacionado ao resíduo de lisina que irá participar na formação das cadeias de Ubiquitina, como por exemplo, a poliUb, via resíduo de Lys<sup>63</sup> está relacionada, dentre outras, à função de reparo do DNA após a replicação. A proteólise via proteassoma 26S, ocorre quando os substratos são poliubiquitinados (mínimo de 4 Ubs) via resíduo de Lys<sup>48</sup> (PICKART, 2002; YANG & YU, 2003; FANG & WEISSMAN, 2004; PICKART, 2004). Três componentes enzimáticos são requeridos para ligar as cadeias de ubiquitina nas proteínas designadas à degradação: E1 (enzima ativadora de ubiquitina), E2 (enzima conjugadora de ubiquitina) e E3 (enzima de ligação). A E3 é a enzima chave do

processo, pois reconhece o substrato protéico e catalisa a transferência da Ub ativada a ele. A descoberta da Ub e a bioquímica de sua conjugação aos substratos protéicos culminaram no Prêmio Nobel de Química em 2004 a Avram Hershko, Aaron Ciechanover, e Irwin Rose (<http://nobelprize.org/chemistry/laureates/2004>).

As proteínas poliubiquitinadas são então reconhecidas e degradadas pelo proteassoma 26S (**Figura 2**) (CIECHANOVER & SCHWARTZ, 1998; PICKART, 2000; PICKART & EDDINS, 2004; WALTERS et al., 2004; NAUJOKAT et al., 2007).



**Figura 2.** Esquema da via Ubiquitina-Proteassoma. **A.** Ubiquitinação. **B.** Montagem do Proteassoma 26S (Adaptado) (Naujokat et al., 2007).

### 1.5. Proteassoma: biogênese, estrutura e funções.

O proteassoma 26S possui uma estrutura de 2.4 MDa composta de dois subcomplexos: o centro catalítico, chamado de 20S, e um elemento regulatório, chamado de PA700 ou partícula regulatória 19S (PICKART & COHEN, 2004; DeMARTINO & GILLETTE, 2007).

O proteassoma 20S é uma estrutura cilíndrica de aproximadamente 700 kDa, semelhante a um barril (12nm x 15nm), que consiste de 28 subunidades, sendo composto por quatro anéis heptaméricos, sendo dois anéis externos  $\alpha$  e dois internos  $\beta$ , onde, cada um contendo sete diferentes subunidades organizadas em  $\alpha 1-7 \beta 1-7 \beta 1-7 \alpha 1-7$  (HERSHKO & CIECHANOVER, 1998; TANAKA & CHIBA, 1998). Os sítios ativos se encontram dentro dos anéis do tipo  $\beta$ , sendo que as subunidades do complexo 20S de eucariotos responsáveis pela atividade catalítica são:  $\beta 1$  (atividade peptidil pós-glutamil hidrolase ou *caspase-like*),  $\beta 2$  (atividade tripsina-símile), e  $\beta 5$  (atividade quimiotripsina-símile) (GROLL et al., 1997; GROLL & HUBER, 2004).

A estrutura do proteassoma 26S de células eucarióticas é mais complexa do que o das arqueobactérias. O proteassoma primitivo de *Thermoplasma acidophilum* possui a mesma estrutura quaternária, porém apresenta somente duas subunidades diferentes  $\alpha$  e  $\beta$ , sendo que todas as subunidades  $\alpha$  são idênticas e todas as subunidades  $\beta$  são idênticas ( $\alpha 7 \beta 7 \beta 7 \alpha 7$ ), porém, ao contrário do complexo 20S dos eucariotos, todas as subunidades  $\beta$  são cataliticamente ativas (HERSHKO & CIECHANOVER, 1998; PAUGAM et al., 2003).

O proteassoma 20S tem como característica estrutural um centro catalítico ativo formado por subunidades  $\beta$  ativas com um resíduo de treonina em sua porção N-terminal, atuando como nucleófilo ativo (BRANNIGAN et al., 1997). A entrada de substratos no centro catalítico é coordenada, principalmente pelos anéis  $\alpha$ , prevenindo a destruição de proteínas que não foram destinadas à degradação (BAUMEISTER et al., 1998). Para garantir este

mecanismo as subunidades  $\beta$  são sintetizadas como formas precursoras, contendo pró-peptídeos na porção N-terminal justapostos aos resíduos de treonina dos sítios ativos, que continuam inativos até a completa formação do 20S. Estas subunidades precursoras, ou seja, contendo os pró-peptídeos são detectadas em complexos 15 e 16S de mamíferos e são ausentes no proteassoma maduro (FRENTZEL et al., 1994; YANG et al., 1995). Desta forma, a montagem do proteassoma 20S acontece de maneira ordenada e regulada (MURATA, 2006).

Os passos gerais de montagem do proteassoma 20S eucariótico seguem como em arqueobactérias, já que existe homologia de estrutura e seqüência entre eles. Então, a formação dos anéis  $\alpha$  é considerada o passo inicial, seguido do arranjo das subunidades  $\beta$  nos anéis  $\alpha$ , formando um complexo intermediário que consiste de um anel  $\alpha$ , um anel  $\beta$ , e Ump1 (proteína acessória da maturação do 20S). A dimerização de dois complexos precursores completa a maturação, acompanhada pela remoção dos pró-peptídeos das subunidades  $\beta$ . Entretanto, o mecanismo detalhado de montagem do proteassoma eucariótico difere consideravelmente, refletindo um aumento na complexidade e necessidade de uma correta montagem das 14 diferentes subunidades. Para tanto os eucariotos necessitam do auxílio de algumas chaperonas específicas ao proteassoma que se associam apenas aos complexos precursores (MURATA, 2006).

Estudos têm identificado moléculas que agem como heterodímeros, denominadas PAC1 (Chaperona 1 de montagem do proteassoma) e PAC2 (Chaperona 2 de montagem do proteassoma). Análises de extratos de células de mamíferos, por centrifugação em gradiente de glicerol, mostraram que o pico do heterodímero PAC1-PAC2 coincidiu com o pico das subunidades  $\alpha$  e a posterior purificação deste complexo revelou que ele continha todas as subunidades  $\alpha$  e nenhuma subunidade  $\beta$ , com um tamanho de aproximadamente 230 kDa. O

heterodímero (PAC1-PAC2) também é importante, prevenindo a formação de duplos  $\alpha$ -anéis, como demonstrado em estudos com nocaute para PAC1 ou PAC2.

Em trabalhos realizados com células tratadas com inibidor do proteassoma, PAC1 – PAC2 ficaram acumuladas nos proteassomas 20S, indicando que o complexo PAC é degradado pelo proteassoma 20S recém-formado (HIRANO et al., 2005; YANG et al., 1995). Atualmente, ortólogos de PAC1 e PAC2 podem ser encontrados em leveduras, onde são chamadas de Poc1 e Poc2. E, recentemente, foram descritas também PAC3 e PAC4 (ainda não caracterizada), como homólogas funcionais dos fatores Poc3 e Poc4 de leveduras, formando pares e atuando em diferentes estágios da montagem do complexo 20S (TALLEC et al., 2007).

Outro fator que desempenha papel fundamental na maturação do centro catalítico 20S é a proteína denominada de Ump1 (**Figura 3**), caracterizada primariamente em leveduras, sendo que os estudos prévios têm demonstrado que a deleção de Ump1 resulta em dramática redução da atividade do proteassoma 26S nesse organismo. Ump1 faz parte do complexo intermediário 16S sendo imediatamente degradada pelo proteassoma 20S após sua maturação (RAMOS et al, 1998).

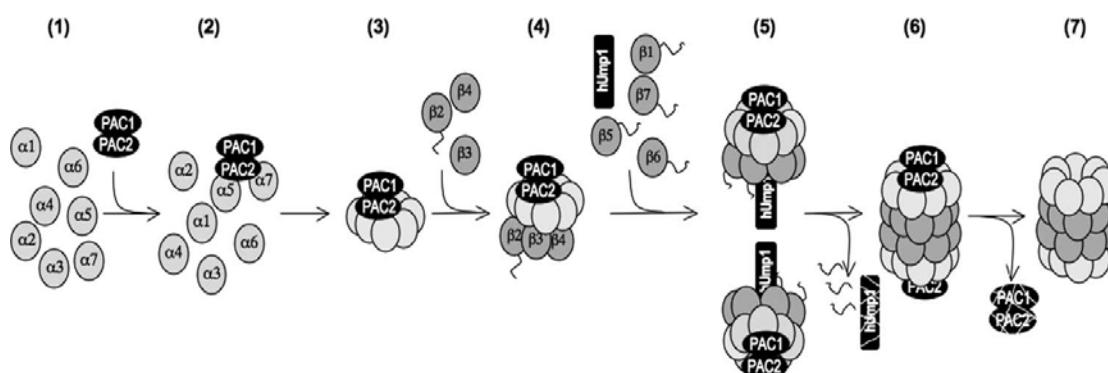
Durante o processo de biogênese do 20S, uma das funções de Ump1 é a inibição da dimerização estável de complexos precursores antes da incorporação de todas as  $\beta$ -subunidades. Ump1 é a proteína responsável pela correta ordem dos eventos de montagem do complexo 20S (LI et al., 2007). Em eucariotos, os pró-peptídeos de algumas subunidades do proteassoma 20S, têm sido designados com “chaperonas intramoleculares” (CHEN & HOCHSTRASSER, 1996; ZÜHL et al., 1997). Particularmente, o pró-peptídeo da subunidade  $\beta$ 5, auxilia o alinhamento dos precursores, estabilizando o dímero durante a clivagem das  $\beta$ -subunidades precursoras e também auxilia no re-arranjo conformacional que dá origem aos proteassomas 20S maduros (GROLL et al., 1999).



Em mamíferos, uma proteína homóloga a Ump1 foi caracterizada, sendo denominada de POMP (proteína de maturação do proteassoma) (WITT et al., 2000). Análise em banco de dados também revelou a presença de homólogos para Ump1 em ratos, camundongos, *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana*, dentre outras espécies de eucariotos (BURRI et al., 2000).

Análises Bioquímicas têm demonstrado que homólogos de Ump1 são associados apenas a complexos precursores, mas não com o proteassoma 20S maduro (GRIFFIN et al., 2000; BURRI et al., 2000), sendo seu tempo de meia-vida correlacionado com o tempo de meia vida do precursor 16S (FRENTZEL et al., 1994).

O gene codificando para POMP, em camundongos, é expresso em vários tecidos, incluindo fígado e timo (GRIFFIN et al. 2000), sendo que os níveis de RNA mensageiro, em humanos e camundongos são induzidos após tratamento com interferon  $\gamma$ , sugerindo que a expressão de POMP é diferencialmente regulada (WITT et al., 2000; BURRI et al., 2000).



**Figura 3.** Esquema da montagem do proteassoma assistida por proteínas auxiliares. (1) Síntese das  $\alpha$  - subunidades, (2) Ligação de PAC1 e PAC2 em algumas  $\alpha$  - subunidades, (3) Formação de um  $\alpha$  - anel, (4) Formação do complexo 13S, (5) Formação do proteassoma precursor, com o auxílio das  $\beta$ -subunidades e de Ump1, (6) Dimerização dos complexos precursores com a ajuda de Ump1, clivagem dos pró-peptídeos das  $\beta$ -subunidades e degradação de Ump1, (7) Degradação de PAC1 e PAC2 pelo proteassoma 20S recém formado (Adaptado) (Murata, 2006).

Proteassomas 20S em células de mamíferos podem estar presentes como proteassomas padrão (ou constitutivos) quando associados ao complexo regulatório 19S ou como imunoproteassomas quando associados ao complexo PA28 (ou 11S). A formação dos imunoproteassomas é induzida por IFN- $\gamma$  ou TNF- $\alpha$ , onde as subunidades  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 e  $\beta$ 5 são substituídas por suas homólogas  $\beta$ 1i/LMP2,  $\beta$ 2i/MECL1 e  $\beta$ 5i/LMP7 (KRUGER et al., 2001; KRUGER et al., 2003; GROETTRUP et al., 2001). No caso do imunoproteassoma, é bem descrita sua participação no processamento de antígenos a serem apresentados juntos com as proteínas do MHC de classe I, após indução por interferon  $\gamma$  (RECHSTEINER et al., 2000).

Em ambos os tipos de proteassoma a Proteína de Maturação do Proteassoma (POMP) é requerida para a completa maturação do complexo 20S (BURRI et al., 2000; GRIFFIN et al., 2000; WITT et al., 2000).

De acordo com Heink e colaboradores, quando estimulada por IFN- $\gamma$ , POMP é mais expressa e se liga ao pró-peptídeo  $\beta$ 5i mais eficientemente do que ao  $\beta$ 5, acelerando a biogênese dos imunoproteassomas quando comparados aos proteassomas 20S constitutivos (HEINK et al., 2005).

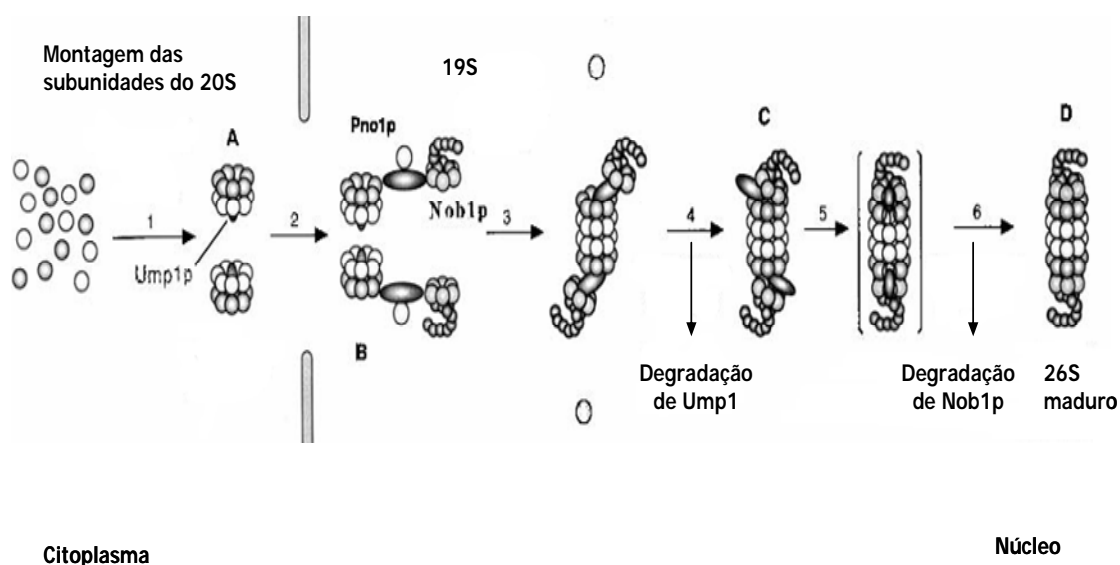
Em 2005, Chen e colaboradores, utilizando a técnica de RNA interferente (RNAi) para a proteína de maturação do proteassoma em leveduras, obtiveram uma grande diminuição nos níveis de sua expressão, sendo observado nessas condições, uma forte diminuição na atividade do proteassoma, seguido de um aumento na oxidação de proteínas. Estudos também têm demonstrado que a inibição do proteassoma 26S de mamíferos reflete diretamente no aumento do mRNA para POMP, bem como o aumento da expressão da proteína. Esses dados sugerem que um dos mecanismos compensatórios à inibição do proteassoma é a tentativa do organismo em sintetizar mais complexos proteolíticos 20S, para suprir as necessidades celulares (MEINERS et al., 2003; NAUJOKAT et al., 2007).

Enquanto o proteassoma 20S fica responsável pela atividade proteolítica, o complexo regulatório 19S contribui com outras funções, como por exemplo, a ativação do complexo 20S, o reconhecimento de substratos protéicos alvos da degradação, o desenovelamento do substrato, a quebra das cadeias de ubiquitina, e o auxílio na abertura do poro por onde os substratos entram para atingirem a partícula 20S (DEVERAUX et al., 1994). Este complexo de aproximadamente 900 kDa, é composto por 17 subunidades, cuja montagem detalhada ainda não foi elucidada. A associação do complexo 19S ao centro catalítico 20S para formar o proteassoma 26S é dependente de ATP e reversível (ARENDRT et al., 1997; GORBEA et al., 2000; GLICKMAN et al., 2000). O complexo 19S pode ser dividido em dois subcomplexos denominados de base e tampa. A base é formada por três subunidades não ATPásicas (RPN1, RPN2 e RPN10) e seis subunidades ATPásicas (RPT 1 a RPT6) (RUBIN et al., 1998; BRAUN et al., 1999; GLICKMAN & RAVEH, 2005). Já a “tampa”, é formada por oito subunidades não ATPásicas (RPN3, RPN5, RPN6, RPN7, RPN8, RPN9, RPN11 e RPN12). Outro componente do complexo 19S é a subunidade não ATPásica RPN10, que serve de ponto de ligação entre os subcomplexos e que, dentre outras funções foi a primeira subunidade caracterizada como sendo capaz de reconhecer substratos poliubiquitinados (DEVERAUX et al., 1994).

O proteassoma é ativado por complexos que se ligam às extremidades das subunidades  $\alpha$  do 20S. O ativador melhor descrito é o complexo regulatório 19S (ou PA700), citado anteriormente. Em contraste ao 19S, outros dois complexos protéicos conservados, PA28 (também conhecido como 11S) e PA200, são capazes de se ligarem especificamente e ativar o proteassoma 20S, sendo que estes não reconhecem proteínas ubiquitinadas (HILL e Cols, 2002; USTRELL e Cols, 2002; RECHSTEINER & HILL, 2005). As propriedades bioquímicas do PA28 e do PA200 já são descritas, mas seus papéis biológicos ainda não foram completamente elucidados. Investigações têm demonstrado que o PA28 e o PA200 funcionam normalmente em complexos misturados, nos quais um proteassoma 20S pode estar

ligado em uma extremidade pelo 19S e na extremidade oposta ou pelo PA28 ou pelo PA200, podendo funcionar, desta forma, como adaptadores de “proteassomas híbridos” (USTRELL et al., 2002; TANAHASHI et al., 2000; RECHSTEINER & HILL, 2005; LECKER et al., 2006). Um outro fato de grande importância é que o estímulo celular com interferon- $\gamma$  não induz apenas a expressão das imunsubunidades  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  e  $\beta 5i$  do proteassoma 20S, mas também as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  do complexo PA28, onde a utilização de antígenos virais demonstrou que o complexo PA28 estimula a apresentação de epítomos virais, sem afetar o processo de renovação celular de proteínas (GROETTURP et al., 1996). Então, acredita-se que a principal função desse complexo seja auxiliar o processamento de antígenos pelo proteassoma 20S, para serem apresentados via MHC de Classe I (KLOETZEL et al., 2004).

Da mesma forma que proteínas acessórias auxiliam a maturação do proteassoma 20S, já são descritas algumas proteínas envolvidas na formação do complexo 26S, como por exemplo, Nob1. Esta proteína associa-se a Pno1p e à partícula regulatória 19S. Quando este complexo é ligado ao 20S, Nob1p é internalizada e degradada pelo recém formado proteassoma 26S (TONE & TOH-e, 2006). O esquema ilustrado na **Figura 4**, representa um dos múltiplos caminhos descritos na montagem do complexo 26S.



**Figura 4.** Esquema da função de Nob1p na biogênese do proteassoma (Adaptado) (Tone & Toh-e, 2006).

Pelo que foi exposto acima, podemos perceber que a degradação de proteínas via proteassoma 26S é um complexo evento que envolve vários passos, dentre eles, a poliubiquitinação do substrato alvo (via lisina 48), formação do 26S pela união entre os complexos 20S e 19S, reconhecimento do substrato pelo 26S, seu desenovelamento, sua translocação para o interior do 20S, a retirada da cauda de poliubiquitina, para que esta possa ser reutilizada em novos processos de ubiquitinação e por fim, a clivagem dos substratos alvo na câmara central do complexo 20S.

### **1.6 Modulação do proteassoma**

O proteassoma 26S, embora geralmente considerado uma única entidade de estrutura invariante e dedicada função, existe como um grupo heterogêneo que possui diferentes características funcionais. Além disso, as células podem regular a função do proteassoma em resposta a mudanças fisiológicas, alterando o número total de proteassomas (LECKER et al., 2006) ou alterando a composição de suas subunidades (GLICKMAN & RAVEN, 2005).

A maioria das células eucarióticas contém múltiplas proteínas que se ligam diretamente nos anéis  $\alpha$  externos do proteassoma 20S como formas alternativas ao complexo regulatório 19S, modificando, desta forma, sua função e regulação (SCHMIDT et al., 2005).

Como visto no item 1.5, como ativadores do proteassoma, podemos citar o complexo regulatório 19S (PA700), o complexo PA28 (ou 11S) e o PA200. Os papéis biológicos de PA28 e PA200 não são tão conhecidos quanto os do PA700, embora suas atividades bioquímicas e sua conservação evolucionária sugiram importantes papéis na fisiologia celular e em várias outras funções (RECHSTEINER & HILL, 2005).

Além de complexos ativadores e inibidores, muitas proteínas associadas ao proteassoma possuem funções intrínsecas ao complexo 26S, incluindo a ligação da cadeia de

poliubiquitina, a des-ubiquitinação, e a desnaturação do substrato. Estas funções atribuídas diretamente ao proteassoma podem ser suplementadas ou contraídas por proteínas reversivelmente associadas. Por exemplo, estudos de deleção genética de ambas Rpn10 e Rad23 (proteínas associadas à ligação de cadeias de poliubiquitina) demonstraram que proteínas celulares são levadas ao proteassoma por muitos caminhos e que estas distinções não são bem descritas, mas representam um importante e complexo elemento de regulação do proteassoma (MADURA 2004).

A complexidade da regulação na biossíntese da ubiquitina provavelmente reflete seus vários papéis na biologia celular, e a necessidade de um preciso controle em seus níveis, colaborando com a homeostase celular. O papel crucial na circulação de ubiquitina pelo proteassoma é enfatizado por um mutante de levedura do gene *UBP6*, que codifica uma enzima des-ubiquitinadora associada ao proteassoma. Na ausência desta proteína, a meia-vida da ubiquitina é dramaticamente reduzida. A abundância celular de Ubp6 é sensível aos níveis de ubiquitina celular: sob condições de depleção de ubiquitina, Ubp6 aumenta, e quando os níveis de ubiquitina são restaurados, os níveis de Ubp6 retornam ao estado basal. O aumento na regulação, da expressão de ubiquitina dependente de Ubp6 resulta em maior eficiência na reciclagem de ubiquitina pelo proteassoma (HANNA et al., 2007).

Este efeito parece ser mediado pelo fator de transcrição Rpn4 e pode refletir uma resposta à ação inibitória de Ubp6 na atividade do proteassoma. Este fator age na transcrição geral de subunidades do proteassoma por interação com seqüências PACE (Elemento Controle Associado ao Proteassoma) comuns aos genes do proteassoma (XIE & VARSHAVSKY, 2001). Hanna e colaboradores definiram que Rpn4 não é necessária ao aumento dos níveis de Ubp6 em resposta à diminuição do conteúdo de ubiquitina celular, sugerindo um caminho transcricional alternativo para a regulação dos níveis de ubiquitina. Então, estes dados revelam uma regulação geral nos níveis de proteassoma, alterados por

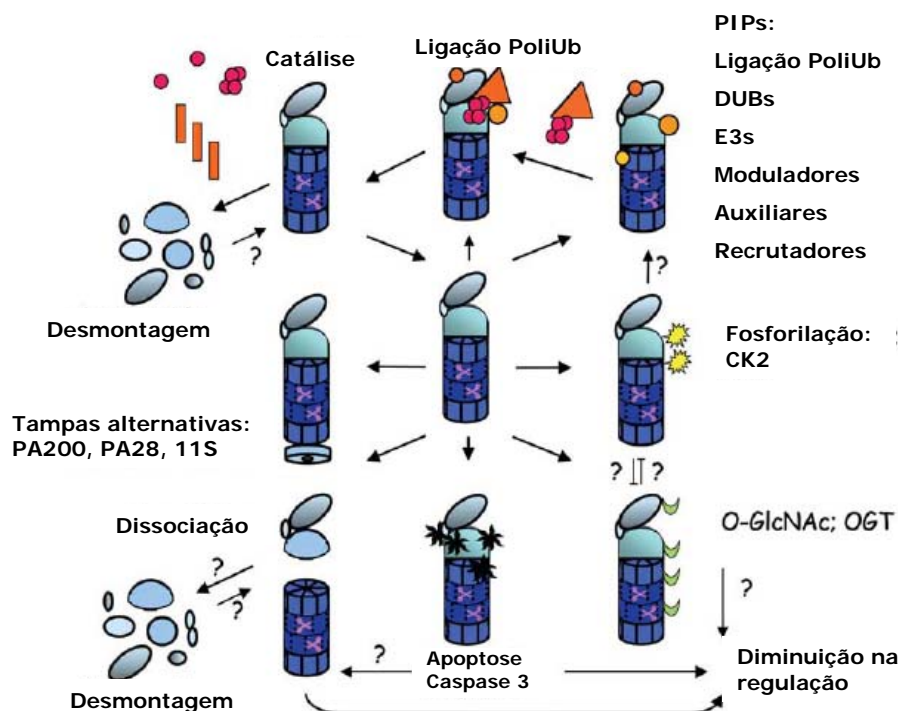
estresse do proteassoma ou de ubiquitina, revelando se tratar de um complexo altamente adaptável (DeMARTINO & GILLETTE, 2007).

Inibidores do proteassoma (como por exemplo, MG-132, lactacistina e epoxomicina) têm sido utilizados também em sua modulação, funcionando como poderosas ferramentas na descoberta de funções chave do complexo ubiquitina-proteassoma (KISSELEV & GOLDBERG, 2001).

Em adição à regulação transcricional e o controle do processo de montagem, proteassomas maduros são também diretamente modificados em resposta ao estresse ambiental (GLICKMAN & RAVEH, 2005). Os componentes do proteassoma não são degradados, são desmontados e re-montados com a retomada da proliferação celular. Os níveis do proteassoma aumentam em resposta ao estresse em longo prazo, como por exemplo, quando expostos à temperaturas ligeiramente elevadas e a baixos níveis de aminoácidos análogos, condições propícias ao crescimento celular, mas que necessitam do proteassoma para a remoção de proteínas danificadas (GLICKMAN & RAVEH, 2005).

Estudos também têm sido realizados em células expostas a elevadas condições oxidativas, onde foram detectados baixos níveis da atividade proteassomal. Esta perda de função do proteassoma não foi correlacionada com os baixos níveis de todas as subunidades proteassomais, mas com numerosas modificações de suas subunidades (CARRARD et al., 2003; SHRINGARPURE et al., 2003).

Outras modificações podem ocorrer também como, por exemplo, através de fosforilação, *O*- glicosilação e clivagem de subunidades do proteassoma por caspases, demonstrando, a plasticidade do proteassoma. Um esquema representativo destas modificações pode ser observado na **Figura 5**.



**Figura 5.** Plasticidade do Proteassoma. Os proteassomas são estruturas maleáveis com configurações dinâmicas e que atuam sob a interação de várias proteínas. As alterações na atividade, especificidade e localização do proteassoma, acontecem de acordo com as necessidades celulares (Adaptado) (Glickman & Raveh, 2005).

### 1.6.1. Modulação do proteassoma sob efeitos químicos

#### 1.6.1.1. Modulação sob efeito do inibidor da atividade peptidásica do proteassoma (MG-132)

A identificação e o uso de inibidores sintéticos e biológicos da atividade proteolítica têm principalmente contribuído para a identificação de funções essenciais do proteassoma 26S em vários processos e vias metabólicas em células eucarióticas (GROLL & HUBER, 2004; GACZYNSKA & OSMULSKI, 2005).

O efeito de inibidores do proteassoma, tais como MG-132 e lactacistina, em parasitas têm sido descrito em *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba invadens* (MAKIOKA et al., 2002), *Leishmania mexicana* (ROBERTSON, 1999), *Trypanosoma cruzi* (de DIEGO et al., 2001),

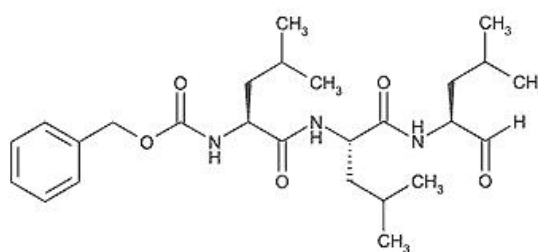


*Trypanosoma brucei* (NKEMGU-NJINKENG et al., 2002), *Plasmodium berguei* (GANTT et al., 1998) e *Toxoplasma gondii* (SHAW e et al., 2000).

Com o auxílio dos inibidores MG-115 e MG-132, recentemente foi demonstrado por nosso grupo de pesquisa, que o sistema ubiquitina-proteassoma representa um importante papel na biologia de *S. mansoni*, e que inibidores do proteassoma podem ser utilizados como importantes ferramentas no estudo dos mecanismos moleculares utilizados pelo parasito durante seu desenvolvimento no hospedeiro vertebrado (GUERRA-SÁ et al., 2005).

Em células de mamíferos, Krüger e colaboradores evidenciaram uma coordenada regulação de mRNAs correspondentes às subunidades do proteassoma 26S, bem como um aumento na biogênese de novos proteassomas quando estas foram expostas aos inibidores MG-132 e lactacistina (MEINERS et al., 2003).

Dessa forma, o proteassoma um complexo sofisticado e altamente organizado pode sofrer modificações em resposta à inibição de sua atividade. Estas modificações constituem de mecanismos adaptativos que permitem a sobrevivência de células eucarióticas a efeitos letais da inibição do proteassoma e estabelecem um fenótipo hiperproliferativo e resistente a apoptose. A fórmula estrutural do inibidor do proteassoma (MG-132), utilizado neste trabalho, segue abaixo na **Figura 6**.



**Figura 6:** Fórmula estrutural do inibidor do proteassoma Carbobenzoxy-L-leucil-L-leucil-L-Leucinal (MG-132)

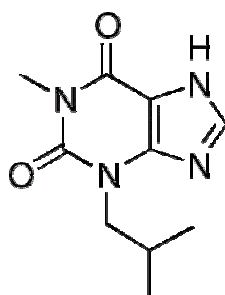
### 1.6.1.2. Modulação sob efeito de IBMX (3-isobutil-1-methylxanthine)

Xantinas são bases purínicas, existentes no músculo, na urina, em vários outros órgãos e em algumas plantas. Elas possuem três isômeros: teofilina (1-3 dimetil-xantina), cafeína (1-3-7 trimetil-xantina) e teobromina (3-7 dimetil-xantina), que podem ser encontrados em chás, no café e no chocolate, respectivamente. A teofilina foi identificada pela primeira vez em folhas do chá *Thea sinensis*, no século XIX e sintetizada em 1921. Seus derivados sintéticos incluem aminofilina, pentoxifilina (PTX), enprofilina, difilina e IBMX (3-isobutil 1-metilxantina), sendo o último, o alvo de nosso trabalho.

O composto IBMX é destacado por ser um potente inibidor da enzima fosfodiesterase e, como consequência desta inibição há um aumento nos níveis celulares de AMPc e GMPc, ativando desta forma, proteínas quinases reguladas por nucleotídeos cíclicos (GRAHAM et al., 1999).

O AMP cíclico (AMPc) é um segundo mensageiro que normalmente funciona em vias de transdução de sinal, traduzindo um estímulo extracelular em uma resposta celular específica. Quando, por exemplo, um hormônio se liga ao seu receptor no complexo adenilato ciclase na membrana da célula, a enzima é ativada e ATP é convertido em AMPc. O AMPc causa, então, a ativação da proteína quinase dependente de AMPc ou proteína quinase A (PKA) que fosforila um fator de transcrição como o CREB (fator de ligação do elemento resposta ao AMPc) que regula a expressão de genes com um CRE (elemento resposta ao AMPc) em seus promotores (MCKNIGHT, 1991). Uma diminuição na regulação do nível de AMPc ocorre quando o mesmo é degradado pela enzima fosfodiesterase (PDE).

A estimulação da via do AMPc pode ser feita utilizando seus análogos ou com ativadores da adenilato ciclase como, por exemplo *forskolin*, em combinação com inibidor da enzima AMPc- fosfodiesterase, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) (MONTAGUE & COOK, 1971). A fórmula estrutural de IBMX, a xantina utilizada neste trabalho, é mostrada na **Figura 7**.



**Figura 7:** Fórmula estrutural de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX)

A identificação e caracterização de moléculas de transdução de sinais são essenciais para elucidar as interações parasita-hospedeiro em *S. mansoni* bem como a biologia do parasito. Proteínas tirosina quinases (PTKs) são importantes moléculas na comunicação intra e intercelular, bem como na sobrevivência de eucariotos, representando um importante papel em processos de transdução de sinais (HANKS et al., 1988). Essas participam de mecanismos celulares que controlam vários processos biológicos, tais como, adesão, re-organização do citoesqueleto, migração, desenvolvimento e diferenciação celular. Portanto o estudo das PTKs pode revelar estratégias que possam ser utilizadas para identificar novos candidatos a drogas (BAHIA et al., 2006).

## **1.6.2. Modulação do proteassoma sob efeitos físicos**

### **1.6.2.1. Modulação sob condições de estresse térmico**

A resposta biológica à hipertermia é muito complexa. O aquecimento afeta muitos processos celulares, como o funcionamento das membranas e a síntese e degradação de proteínas e macromoléculas (RIJN & BERG, 1996).

Estudos prévios demonstraram que elevadas temperaturas estimulam a degradação protéica em músculos esqueléticos ou em culturas de miotúbulos de ratos (BARACCOS et al., 1984; MORITA et al., 1996). Esse fato ocorre tanto na degradação de proteínas de vida longa, quanto nas de vida curta e, é descrito ser dependente de energia e proteassoma (LUO et al., 2000).

O sistema ubiquitina-proteassoma parece ser o responsável pela maior parte da degradação protéica miofibrilar em várias condições catabólicas incluindo, câncer, diabetes, obesidade, defeitos renais e queimaduras (LECKER et al., 1999). Embora diferentes sinais extracelulares estejam envolvidos, é possível que eventos de sinalização intracelular sejam os mesmos em todas as condições catabólicas.

As células são capazes de desenvolver mecanismos eficazes para contornar as mais diversas condições e modificações provocadas pelo ambiente externo como, por exemplo, a termotolerância adquirida pela resistência a elevadas temperaturas (HENLE & DETHLEFSEN, 1978; KREGEL, 2002). A expressão da termotolerância é relacionada ao aumento da síntese das proteínas de choque térmico (HSPs) (LANDRY et al., 1982). Essas proteínas desempenham um importante papel em vários processos celulares, nomeadamente na atrofia, ao ligar-se a proteínas inativas ou mal formadas e ao prevenir a sua agregação, promovendo assim a renaturação das mesmas (FEHRENBACH & NORTHOFF, 2001; GABAI & SHERMAN, 2002; LI et al., 2000; NAITO et al., 2000) e protegendo as células de estímulos indutores de morte celular (GABAI & SHERMAN, 2002; LI et al., 2000). As HSPs são altamente conservadas entre as espécies e são caracterizadas por um rápido aumento na sua expressão quando as células são expostas a condições de estresse como, por exemplo, aumento da temperatura, hipoxia, isquemia, privação de glucose, contato com metais pesados ou venenos metabólicos (FEHRENBACH & NORTHOFF, 2001; OISHI et al., 2001).

Uma das mais rápidas mudanças que ocorre em células expostas à hipertermia é o aumento no nível de cAMP (CALDERWOOD et al., 1985; KIANG et al., 1991; LIN et al., 1978). Mas, muitos estudos são necessários para melhor elucidar seu papel em resposta ao choque térmico, considerando que a hipertermia provoca danos celulares em correlação com o processo de indução de HSPs ( RIJN & BERG, 1996).

Há um grande interesse nos mecanismos celulares utilizados pelos organismos em enfrentar possíveis transtornos na homeostase celular, pelo que foi acima exposto, podemos perceber que o sistema proteolítico proteassoma 26S tem grande importância na manutenção desta homeostase celular, uma vez que ele está relacionado a processos vitais, tais como progressão do ciclo celular, metabolismo, transcrição de genes estágio específico, reparo do DNA, apresentação de antígenos via MHC de classe I, transdução de sinais, respostas ao estresse, processos inflamatórios, desenvolvimento, desordens neurológicas e câncer (WOLF & HILL, 2004).

A partir de estudos realizados em nosso laboratório, principalmente através de análises bioquímicas, GUERRA-SÁ e colaboradores demonstraram as primeiras evidências da presença e importância deste sistema de degradação em *S. mansoni*.

Neste sentido, este estudo poderá contribuir para a elucidação de alguns mecanismos moleculares do proteassoma de *S. mansoni*, bem como uma adaptação do próprio parasito frente às condições de estresse causadas pelo ambiente externo.

## **2. OBJETIVOS**

## 2.1. Objetivo Geral

- A modelagem estrutural e funcional do sistema proteolítico proteassoma apresenta diversas vias de alterações em vários sistemas biológicos, as quais são influenciadas especialmente pelas condições biológicas, químicas e físicas do ambiente. Neste sentido, neste trabalho procuramos avaliar a influência química do MG-132, clássico inibidor da atividade peptidásica do proteassoma e do IBMX conhecido inibidor de vias de sinalização mediadas pelo AMPc. Procuramos também avaliar os efeitos desencadeados pelas condições de estresse térmico, na modulação do proteassoma de *Schistosoma mansoni*.

## 2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a expressão do gene SmPOMP, clássico participante da modelagem estrutural do proteassoma, durante as fases evolutivas de verme adulto, esporocisto, cercária, esquistossômulo e ovos de *S. mansoni*.
- Analisar a expressão do gene SmPOMP sob o efeito do inibidor da atividade peptidásica do proteassoma (MG-132) em parasitas adultos mantidos *in vitro*.
- Avaliar as condições fisiológicas (ovoposição, pareamento e motilidade), a expressão do gene SmPOMP, a atividade proteolítica exógena, os níveis de proteassomas 20S e substratos poli-ubiquitinados bem como a viabilidade de parasitas mantidos *in vitro* sob efeito de IBMX.
- Analisar a expressão do gene SmPOMP, a atividade proteolítica exógena, os níveis de proteassomas 20S e substratos poli-ubiquitinados e também a viabilidade dos parasitas sob condições de estresse térmico.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**



### 3.1. Manutenção do ciclo de vida de *S. mansoni* em laboratório

Neste trabalho foi utilizada a linhagem LE de *S. mansoni*, que é mantida rotineiramente no laboratório de Biologia Molecular de Parasitas do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (USP).

O ciclo biológico do parasito é mantido em laboratório, utilizando moluscos da espécie *B. glabrata*, como hospedeiros intermediários, e camundongos Swiss e BALB/c, como hospedeiros definitivos. Os ovos de *S. mansoni*, presentes nas fezes de camundongos das linhagens Swiss ou Balb/C previamente infectados com o parasito são recolhidos pelo método de Hoffmann (HOFFMANN et al., 1934) e expostos por aproximadamente 1 hora sob luz, para a liberação dos miracídios. Os miracídios (cerca de 10 a 18) foram utilizados para infectar o hospedeiro intermediário, os caramujos da espécie *B. glabrata*, que após 38 a 43 dias liberaram a forma infectante do parasito, as cercárias, que por sua vez infectarão o hospedeiro vertebrado. As cercárias são inoculadas nos camundongos via subcutânea e após aproximadamente 45 dias os vermes adultos são recuperados do sistema porta-hepático por perfusão (SMITHERS & TERRY, 1965).

### 3.2. Obtenção da fase de vermes adultos de *S. mansoni*

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

### 3.3. Obtenção da fase de ovos de *S. mansoni*

Além dos ovos terem sido obtidos pelo método de Hoffmann, eles também foram provenientes de fígado de camundongos após 45 dias de infecção com o parasito *S. mansoni*.

Cerca de dez fígados foram coletados durante perfusão e homogeneizados em 200 mL de solução pH 8,3 contendo 1.79 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.09 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, e 20 mg de tripsina (Invitrogen). O homogeneizado foi incubado em banho-maria a 37°C durante 3 horas e posteriormente, os ovos foram recuperados por duas peneiras de malhas metálicas de 0.30 e 0.180 milímetros em solução de NaCl a 0.9%. (Castro-Borges, 2005).

### 3.4. Obtenção da fase de esporocistos de *S. mansoni*

A fase de esporocistos foi obtida do hepatopâncreas de moluscos *B. glabrata* após 38 a 43 dias de infecção com o parasito *S. mansoni*. Para este procedimento, somente os moluscos que liberaram primariamente quantidade satisfatória de cercárias foram utilizados.

Após a liberação de cercárias, dois ou três moluscos foram colocados separadamente em 3mL de água e submetidos à nova liberação por mais meia hora, sendo que de dez em dez minutos a água foi trocada. Uma alíquota da água foi sempre observada com o auxílio de microscópio de luz invertida (Leitz, Diavert), para se verificar a quantidade de cercárias ainda liberadas pelo *Biomphalaria*. Este procedimento foi adotado para garantir o mínimo de cercárias na preparação dos esporocistos.

Em seguida, os moluscos foram lavados em água corrente e mortos por esmagamento entre duas placas de Petri. Com o auxílio de duas pinças, os fragmentos da casca foram retirados do corpo do molusco e a região do hepatopâncreas (porção terminal do corpo do parasita) separada. Em seguida, o hepatopâncreas foi rapidamente analisado em microscópio

de luz invertida (Leitz, Diavert), para verificar a presença de esporocistos. Os hepatopâncreas que se mostraram positivos foram imediatamente submetidos à extração de RNA ou congelados a  $-70^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso. Como controle negativo foi utilizado hepatopâncreas de caramujos não infectados pelo *S. mansoni*.

A utilização do hepatopâncreas mostrou ser um método bastante eficiente para a obtenção indireta da fase evolutiva de esporocistos deste parasito, uma vez que a grande maioria dos esporocistos maduros se encontra nessa região do caramujo.

### **3.5. Obtenção de esquistossômulos transformação mecânica de cercárias em esquistossômulos**

Inicialmente 150 a 200 mil cercárias, foram colocadas em béquer de 250mL previamente mergulhado em gelo e deixadas por duas horas para decantar. Transcorrido este período, o sobrenadante foi aspirado e descartado cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta. As cercárias presentes no fundo do béquer foram transferidas para tubos tipo *falcon* de 15 mL, ressuspensas em 10 mL de água deionada e deixadas em gelo por 10 minutos. O processo de lavagem com água deionada e descarte do sobrenadante foi repetido por três vezes. Posteriormente a água foi retirada e foram adicionados 6 mL de meio RPMI 1640 (Invitrogen). Para a transformação mecânica de cercárias em esquistossômulos, estas foram agitadas em vortex (Tecnal TE 089) sob velocidade máxima, durante 90 segundos para a indução do rompimento da cercária em corpo cercariano/cauda (Ramalho-Pinto et al., 1974). Em seguida, o material foi transferido para uma garrafa estéril de 50mL e o volume completado para 30mL com meio RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado com 20  $\mu\text{M}$  of HEPS, pH 7.4, penicilina cristalina G (1000 UI/mL), estreptomicina (1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e 10% de soro fetal bovino (Gibco) (procedimento realizado em fluxo laminar). A suspensão (corpo

cercariano e cauda) foi incubada por três horas em atmosfera de CO<sub>2</sub> 5% (estufa de CO<sub>2</sub>). Após o período de incubação, aproximadamente 28 mL do sobrenadante foi aspirado e descartado; e os 2 mL restantes foram distribuídos em tubos tipo *ependorf* de 2 mL. Posteriormente, para a remoção das caudas, 1 mL de meio RPMI 1640 foi adicionado em cada *ependorf* contendo os esquistossômulos e estes sofreram repetidas lavagens (seis a sete) com meio RPMI, com um intervalo de quatro minutos entre cada lavagem, para sedimentação dos esquistossômulos. Após cada sedimentação, uma alíquota foi examinada em microscópio de luz invertida (Leitz, Diavert), para acompanhar o processo de separação esquistossômulo/cauda. Depois de retiradas as caudas, os esquistossômulos foram imediatamente recuperados por centrifugação (centrifuga 5417R-ependorf/ 1000g / 1minuto / 4°C) e estocados a -70°C até o momento do uso (HARROP & WILSON, 1993).

### **3.6. Extração de RNA total das diferentes fases evolutivas de *S. mansoni***

De posse do material biológico necessário: vermes adultos, ovos, cercárias, esquistossômulos, hepatopâncreas de caramujos infectados (com 40 dias de infecção como fonte de esporocistos) e hepatopâncreas de caramujos não infectados (como controle), iniciamos a extração do RNA total, como descrito a seguir:

As diferentes fases evolutivas do parasito *S. mansoni*, foram homogeneizadas em politron ( JK IKA LABOR TECHNIK ULTRA TURRAX T8) com 1,0 mL de Trizol LS (Invitrogen), até completa solubilização. Em seguida, a mistura foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente para permitir a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas.

Decorrido este intervalo o extrato foi passado em uma seringa de 1 mL com agulha de 26G (13 x 4.5) por 3 vezes para que ocorresse a quebra do DNA e então, foi adicionado à

mistura 200µL de clorofórmio. As amostras foram agitadas vigorosamente em *vortex* (tecnal TE 089) por 10 segundos e incubados à temperatura ambiente durante 5 minutos. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 12000 x g por 15 minutos a 4°C (centrífuga 5417R-ependorf). Após esta etapa de centrifugação, a mistura separou-se em uma fase inferior (fase fenol-clorofórmio), interfase e fase aquosa superior incolor. Neste processo, o DNA fica retido na interfase, as proteínas na fase orgânica, enquanto o RNA permanece exclusivamente na fase aquosa. A fase aquosa foi transferida para um tubo de poliestireno estéril (tipo *ependorf*) e ao RNA foi adicionado aproximadamente 500 µL de etanol 70% em água previamente tratada com dietilpirocarbonato (DEPC), o tubo foi vagarosamente invertido por três vezes e incubado à temperatura ambiente por 15 minutos. Após esta fase de separação com Trizol LS (Invitrogen) o RNA foi submetido a ligação, lavagem e eluição com o auxílio do sistema “Purelink™ Micro-to-Midi Total RNA Purification System”(Invitrogen). Aproximadamente 700 µL da amostra foram transferidos para uma coluna com membrana de sílica e centrifugados a 12.000 x g por 2 minutos, o volume foi descartado e o restante da amostra foi submetido ao mesmo processo, para que o RNA ficasse ligado à coluna. Posteriormente, foi realizada a lavagem pela adição de 700 µL de Tampão de lavagem I e centrifugação a 12.000 x g por 2 minutos. A coluna foi colocada em um novo tubo e então, adicionados 500 µL de Tampão de lavagem II (acrescido de etanol 70%, conforme especificações do fabricante) e centrifugadas a 12.000 x g por 2 minutos, este procedimento foi realizado por 2 vezes. A coluna foi colocada em um tubo tipo *ependorf* para a eluição do RNA, onde foram adicionados 30 µL de água livre de RNase. Após 5 minutos de incubação, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 2 minutos, a coluna foi desprezada e o precipitado final foi seco a vácuo (*speed vac*), depois ressuspenso em 15 µL de água tratada com DEPEC e estocado a -70°C até o momento do uso. Uma alíquota do material foi avaliada em gel de agarose-formaldeído a 1%, para verificar a qualidade do RNA.

### 3.7. Quantificação de RNA

As concentrações de RNA foram estimadas a partir da medida de absorvância a 260nm em espectrofotômetro (Eppendorf Biophotometer 8,5mm). Uma unidade de absorvância a 260nm corresponde aproximadamente a 40 µg/mL de RNA. O grau de pureza da preparação foi estimado através da relação entre as leituras a 260 e 280nm. As preparações foram consideradas boas, quando o valor da razão  $A=260/280$  variava entre 1,8-2,2.

### 3.8. Síntese dos oligonucleotídeos iniciadores

A sequência da Proteína de Maturação do Proteossoma (SmPOMP), com número de acesso SM C706480.1, foi obtida do banco de dados do projeto “Transcriptoma do *Schistosoma mansoni*” (VERJOVSKI-ALMEIDA e Cols., 2003). Com base na sequência idealizamos os oligonucleotídeos iniciadores com o auxílio do programa Generunr, para amplificar a suposta matriz de leitura aberta (ORF) predita do gene a ser estudado.

Na tabela abaixo, estão representadas as temperaturas de ligação, tamanho esperado, em pares de bases dos fragmentos amplificados e os oligonucleotídeos iniciadores correspondentes à SmPOMP e à Alfa-Tubulina que foi utilizada durante todo o trabalho, como controle interno.

Gene	N° de acesso	Oligonucleotídeos iniciadores	Temperatura de ligação	Produto esperado
<b>POMP</b>	SMC	ATGTACACTGGTTTAGGCGA	47°C	403
<b>Ump-1</b>	706480.1	AAAGACCAAGTTTATGCTCC		
<b>Alfa-tubulina</b>	M80214*	CGTATTCGCAAGTTGGCTGACCA	60°C	377
		CCATCGAAGCGCAGTGATGCA		

\*Webster J, Seta K A, Chung S C, Mansur T E. A cDNA encoding on alfa-tubulin from *Schistosoma mansoni*. Mol Biochem Parasitol 1992; 51: 169-170.

### 3.9. Transcrição reversa de RNA total - RT- PCR

Para sintetizar o DNA complementar (cDNA) do gene que supostamente codifica para a Proteína de Maturação do Proteassoma (POMP) nos diferentes estágios evolutivos do parasita *S. mansoni*, foi utilizada a técnica de RT-PCR. Neste procedimento, inicialmente foi sintetizada a fita simples de cDNA, utilizando o kit *ThermoScript RT-PCR System* (INVITROGEN), e como iniciador oligo (dT), como resumidamente descrito abaixo:

Foi utilizado 1µg de RNA total obtido a partir de parasitas e suas formas intermediárias, iniciador oligo (dT) 50pmol, dNTP's 10mM e água livre de RNase, para um volume final de 12µL. Esta mistura foi incubada por 5 minutos a 65°C, seguido de banho de gelo por 3 minutos. Em seguida foram adicionados tampão 5X e enzima transcriptase reversa, DTT 0,1 M, RNAout 40 u/µL e água livre de RNase. Posteriormente, a amostra foi transferida para um termociclador, sendo incubada por 60 minutos a 50°C. Após este intervalo de tempo, a reação foi interrompida por incubação a 85°C por 5 minutos. Como passo

seguinte, foi adicionada à amostra 1µL de RNase H, seguido de incubação por 20 minutos a 37°C. Após este período as amostras foram imediatamente utilizadas ou estocadas a -20°C até o momento do uso.

### **3.10. Reação de polimerase em cadeia (PCR)**

Para amplificação do transcrito que supostamente codifica para Proteína de Maturação do *Proteasoma* analisada neste trabalho, foi adotado o seguinte procedimento. Em tubo *ependorf* de 200µL foi adicionada a mistura de reação para um volume final de 50µL. Os componentes utilizados na reação de amplificação são: água (RNase livre), tampão para Taq DNA Polimerase, MgCl<sub>2</sub> 50mM, iniciadores genes específicos direto e reverso 10mM, dNTPs 10mM, cDNA e Taq DNA Platinum 5u/mL (Invitrogen).

Após a adição de todos os componentes reacionais, a amostra foi incubada em termociclador de acordo com a seguinte estratégia de amplificação: um passo inicial de 94°C por três minutos, seguido de 35 ciclos dimensionados em desnaturação a 94°C por um minuto; emparelhamento dos oligonucleotídeos iniciadores por 1 minuto e meio a 47 ou 60°C, extensão da enzima a 72°C por 1 minuto e meio. Como última etapa, a reação foi mantida por um tempo adicional de seis minutos a 72°C. Ao final da reação o termociclador ficava a temperatura constante de 4°C (47°C, quando o produto a ser amplificado era referente à SmPOMP, e 60° quando era alfa-tubulina).

Após o término da reação, uma alíquota de 10µL de cada amostra foi analisada em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo (0,5mg/mL) em presença de luz ultravioleta (transiluminador UVis-20 - Hoefer). O tamanho dos fragmentos foi verificado por comparação com padrão de peso molecular de 100 pares de bases (INVITROGEN).



### **3.11. Densitometria**

Para a análise densitométrica dos transcritos que codificam para a Proteína de Maturação do Proteassoma, e para  $\alpha$ -Tubulina (padrão interno) foi utilizado o programa *Image Kodak Digital Science 1*

### **3.12. Análise estatística**

Os resultados obtidos pela densitometria foram comparados pela análise de variância *one-way* seguida pela determinação da significância das diferenças entre os grupos (Tukey). O nível crítico fixado foi de 5% ( $P < 0,05$ ) para se admitir uma diferença de valores estatisticamente significantes.

### **3.13. Purificação do produto de PCR**

Alíquotas de 30 a 40  $\mu$ L das reações de amplificação foram aplicadas em gel de agarose 1,5%, seguidas de coloração com brometo de etídio (0,5mg/mL). Em seguida o gel foi exposto em luz ultravioleta (transiluminador Uvis-20), e um pequeno bloco de agarose (200 a 300mg) contendo o fragmento de interesse foi retirado, com o auxílio de um bisturi. Após este procedimento, o fragmento de interesse foi extraído do bloco de agarose com o auxílio do kit GFX PCR (Amersham) de acordo com o boletim técnico do fabricante, com exceção da última etapa onde as amostras foram recuperadas em 25  $\mu$ L de tampão de eluição.

### 3.14. Clonagem em vetor de sequenciamento

Os fragmentos de cDNA devidamente purificados foram ligados em vetor de sequenciamento pGEMT *easy* (Promega), de acordo com especificações do fabricante. Cerca de 5,0µL das reações de ligação foram utilizados nos procedimentos de transformação. Nestes experimentos utilizamos células competentes preparadas pelo método descrito por HANAHAN (1985).

O plasmídeo foi introduzido em bactéria competente *E. coli* da linhagem DH5α, através de choque térmico (90 segundos a 42°C; 3 minutos em banho de gelo). Em seguida a bactéria foi mantida sob agitação em meio SOC (SOB enriquecido com glicose) a 200 rpm e 37°C, por 1h e 30 min. Decorrido este intervalo, a suspensão bacteriana foi espalhada em meio LB/ampicilina contendo X-GAL (20µL/mL), para fazermos uma prévia seleção dos plasmídeos com inserto (colônias brancas) e sem inserto (colônias azuis) e mantidas em estufa durante uma noite a 37°C.

### 3.15. Obtenção de DNA plasmidial

Uma alíquota de uma colônia positiva foi inoculada em 5mL de LB/ampicilina (100mg/mL) e incubada a 37°C sob agitação constante de 200 rpm por 16 horas. Após a incubação, 1,5mL da suspensão bacteriana foi transferida para tubo *eppendorf* estéril e centrifugada a 12.000g por 1 minuto, e o sobrenadante foi desprezado. Este procedimento foi repetido mais duas vezes. Portanto, a quantidade recuperada em cada *eppendorf* ao final desse processo foi equivalente a 4,5mL de suspensão bacteriana. Em seguida, as bactérias foram ressuspensas em 400µL de tampão STET (glicose 8%, triton X-100 0,1%, EDTA 50mM, Tris-HCl 50mM, pH 8,0). A esta suspensão foram adicionados 10mL de lisozima (50mg/mL).

Os tubos foram agitados em vortex por 10 segundos, incubados 5 minutos a temperatura ambiente e deixados por 45 segundos a 95°C para inativar a lisozima. Após este período, os tubos foram centrifugados a 12.000g por 10 minutos e o *pellet* retirado com o auxílio de um pequeno bastão de madeira. Ao sobrenadante, foram adicionados 10mL uma solução de CTAB 5% (brometo de amônio de trimetil acetil). Os tubos foram invertidos por 5 vezes e centrifugados a 12.000g por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspense em 600mL de NaCl 1,2M. Em seguida, o DNA plasmidial foi precipitado com a adição de 750mL de etanol 100%. A mistura foi vigorosamente agitada em vortex por 10 segundos e o DNA recuperado por centrifugação a 12.000g por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e o precipitado lavado com 800mL de etanol 70%. Após nova centrifugação a 12.000 por 5 minutos, o sobrenadante foi novamente removido e o precipitado seco a vácuo (*Speed-vac*). O precipitado seco foi ressuspense em 25µL de TE (HCl 10mM pH 8,0 e EDTA 0,1mM). De forma semelhante à descrita na seção 3.9, uma alíquota do DNA plasmidial foi utilizada para estimar sua concentração. Outra alíquota foi visualizada em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio. Os plasmídios assim obtidos foram estocados a -20°C até o momento do uso.

### 3.16. Seqüenciamento das amostras obtidas

Para realizar o seqüenciamento dos cDNAs, utilizamos a técnica do término do crescimento da cadeia, inicialmente desenvolvida por SANGER et al, 1997. As reações de seqüenciamento foram realizadas utilizando o kit *Big-Dye Terminator (Applied Biosystems)*, de acordo com as instruções do fabricante e as reações, analisadas no seqüenciador automático de DNA, ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied-Biosystems). Os plasmídeos

foram seqüenciados nas direções “direta” e “reversa” com o auxílio dos oligos iniciadores M13 universal (S) ou M13 reverso (AS).

### **3.17. Análise das seqüências obtidas**

As seqüências obtidas foram submetidas à busca de homologia com nucleotídeos e aminoácidos com o auxílio dos algoritmos BLASTn e BLASTx, respectivamente ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Também foi utilizado o algoritmo PFAM ([www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/](http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/)), para identificar os domínios conservados nas seqüências preditas de aminoácidos, o programa BLAST2 ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) e ClustalW ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)) para auxiliar no alinhamento das seqüências de nucleotídeos e aminoácidos preditas e o programa BOX Shade ([bioweb.pasteur.fr](http://bioweb.pasteur.fr)), que auxiliou na caracterização de identidade e similaridade das seqüências preditas de aminoácidos.

### **3.18. Cultivo *in vitro* de vermes adultos: efeitos químicos na modulação do proteassoma**

#### **3.18.1. Análise da expressão do gene SmPOMP sob efeito do inibidor da atividade peptidásica do proteassoma (MG-132) em parasitas adultos mantidos *in vitro***

Parasitas recuperados por perfusão do sistema porta-hepático, como descrito por SMITHERS & TERRY (1965), foram transferidos para placas de cultivo na proporção de um casal de parasitas para 2 mL meio RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado com 20 µM de HEPS, pH 7.4, ampicilina (100 mg/mL), estreptomicina (100 mg/mL) e 10% de soro fetal bovino (Gibco), e mantidos a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

O inibidor do proteassoma Carbobensoxi-L-leucil-L-leucil-L-Leucinal (MG-132) foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) e esterilizado em filtro de 0,45  $\mu\text{m}$ , sendo em seguida adicionado a placa de cultivo para uma concentração final de 60  $\mu\text{M}$ .

Amostras de aproximadamente 16 casais de vermes adultos foram cultivadas para cada intervalo de tempo requerido no experimento. Estes parasitas permaneceram em cultivo com o inibidor do proteassoma (MG-132), por 2hs, 6hs, 12hs e 24hs.

Como controle, amostras sem MG-132, apenas com DMSO foram cultivadas da mesma forma e separadas nos mesmos intervalos de tempo. A seguir, os parasitos foram mantidos à  $-70^{\circ}\text{C}$  para posterior análise da expressão de SmPOMP, através da técnica de RT-PCR semiquantitativo.

### **3.18.2. Avaliação *in vitro* das condições fisiológicas de vermes adultos sob o efeito químico de IBMX (3-isobutil-1-methylxanthine)**

Parasitas recuperados de camundongos Balb/C ou Swiss experimentalmente infectados, como descrito anteriormente, foram transferidos para placas de cultivo na proporção de um casal de parasitas para 2 mL de meio RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado com 20  $\mu\text{M}$  de HEPS, pH 7.4, ampicilina (100 mg/mL), estreptomicina (100 mg/mL) e 10% de soro fetal bovino (Gibco), mantidos a  $37^{\circ}\text{C}$ , em atmosfera contendo 5% de  $\text{CO}_2$ . Os experimentos foram realizados em quadruplicata para diferentes concentrações de IBMX (3-isobutil-1-metilxantina): 40  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$ , 80  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 120  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ , e 500  $\mu\text{M}$ . Também foram feitos grupos controle, ou seja, vermes adultos cultivados em RPMI suplementado como descrito acima, porém sem a adição da xantina.

A cultura foi monitorada com o auxílio de microscópio invertido (Leitz, Diavert), por sete dias, para avaliarmos as condições fisiológicas dos parasitos (viabilidade, motilidade, pareamento e ovoposição) sob o efeito desta xantina.

### **3.18.3. Análise da reversibilidade da ovoposição de vermes adultos cultivados *in vitro* na presença de IBMX**

Casais de vermes adultos recuperados do sistema porta-hepático como descrito no item 3.2, foram transferidos para placas de cultivo com 35mm de diâmetro (35X10-NUNC, Denmark) na proporção de um casal para 2 mL de meio RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado com 20  $\mu$ M de HEPS, pH 7.4, ampicilina (100 mg/mL), estreptomicina (100 mg/mL) e 10% de soro fetal bovino (Gibco). Neste experimento, também realizado em quadruplicata, IBMX (3-isobutil-1-metilxantina) foi adicionado na cultura nas concentrações de 40  $\mu$ M e 80  $\mu$ M. Como controles negativos, foram utilizados vermes adultos cultivados *in vitro*, sem IBMX.

Os parasitos permaneceram sob o efeito de IBMX por um período de 24 h, quando então, o meio de cultivo foi substituído (inclusive o meio do grupo controle) por um meio RPMI novo tamponado da mesma forma que o anterior, porém livre de IBMX. A cultura foi monitorada e a ovoposição analisada com o auxílio de microscópio invertido (Leitz, Diavert), por um período de seis dias.

### **3.18.4. Análise da expressão do gene SmpPOMP sob efeito de IBMX**

Parasitas recuperados por perfusão asséptica, como descrito no item 3.2, foram transferidos para placas de cultivo com 35 mm de diâmetro (35X10-NUNC, Denmark) na

proporção de um casal para 2 mL de meio RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado com 20  $\mu$ M de HEPS, pH 7.4, ampicilina (100 mg/mL), estreptomicina (100 mg/mL) e 10% de soro fetal bovino (Gibco). Estes foram divididos em três grupos de 16 casais cada. O primeiro grupo, o controle, foi apenas mantido no meio de cultura, ao segundo grupo, foi adicionado 80  $\mu$ M de IBMX e ao terceiro, 200  $\mu$ M de IBMX, estes foram mantidos a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> por 3 dias. A seguir, os parasitos foram coletados e mantidos à -70°C para posterior análise da expressão de SmPOMP, através da técnica de RT-PCR semiquantitativo.

### **3.18.5. Atividade proteolítica exógena do extrato bruto de vermes adultos sob efeito de IBMX**

#### **Preparo do extrato bruto**

Foi utilizado um volume do tampão de homogeneização (Tris-HCl 5mM pH 8,0, glicerol 1%, EDTA 1mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 1mM, PMSF 1mM, e DTT 1mM), correspondendo a 3 vezes o peso úmido dos parasitas. O material foi homogenizado em sonicador (Vibra Cell™ Sonics & Materials INC DANBURY CT USA) em 2 pulsos de 15 segundos e então centrifugado por 30 minutos a 10000 x g a 4°C (Eppendorf 5417R). O precipitado foi descartado, enquanto o sobrenadante foi novamente centrifugado por 60 minutos a 40000 x g (em ultracentrífuga Beckman Optima™ XL-100K). Ao sobrenadante final foi adicionado glicerol para uma concentração final de 20%, este foi aliqotado e armazenado a -70°C. A concentração protéica presente no extrato, foi determinada segundo o método de Pierce (BCA™ Protein Assay Kit), exatamente como descrito pelo fabricante.

### **Medida da atividade proteolítica exógena**

Para a determinação da atividade peptidásica do proteossoma presente na fração citosólica de vermes adultos, foi utilizado o substrato fluorogênico Succinil-Leu-Leu-Val-Tyr-4-metil-cumaril-amida (SLLVT-MCA).

Nestes ensaios foram utilizadas 50µg de proteínas, e 13µM do substrato fluorogênico. O tampão utilizado foi Tris-HCl 50mM pH8,0 e MgCl<sub>2</sub> 10mM, na presença ou ausência de ATP 5mM. O experimento foi realizado para um volume final de 240µl para cada extrato, seguido de incubação por 60 minutos a 37°C, sendo interrompido pela adição de 2mL de etanol.

As leituras fluorimétricas foram realizadas nos comprimentos de onda de 380nm (excitação) e de 440nm (emissão) em espectrofluorímetro (TURNER Quantech<sup>TM</sup> Fluorometer), e os resultados expressos em unidades de fluorescência por µg de proteína total.

Os extratos utilizados foram: controle negativo (extrato bruto de vermes adultos tratados com MG-132 a 60µM), controle positivo (extrato de vermes adultos cultivados *in vitro* apenas em RPMI) e extratos de vermes adultos tratados com IBMX na concentração de 80 µM e 200 µM. Todos os extratos descritos acima foram obtidos através de culturas que permaneceram a 37°C em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub>, por um período de três dias.

#### **3.18.6. Ensaio de viabilidade dos parasitos sob efeito de IBMX**

O ensaio de quantificação colorimétrica baseado no “3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide” (MTT) (NARE e Cols, 1991; GOLDBAUM e Cols, 2006) foi utilizado para verificar a viabilidade dos parasitos. Casais de vermes adultos tratados em diferentes concentrações de IBMX, por três dias foram transferidos da placa de cultivo para



uma placa de 96 poços contendo 100µl de tampão fosfato salina (PBS) com 0.5 mg MTT/ml, e mantidos por 30 minutos a 37°. Posteriormente, a solução foi cuidadosamente removida e foram adicionados 200µl de dimetil sulfóxido (DMSO), no qual permaneceram por 1 hora. A absorbância foi lida em 550 nm; e DMSO foi utilizado como branco da reação. Como controle negativo, foi verificada a viabilidade de parasitas mortos a 56° C por 30 minutos e como controle positivo foram utilizados casais cultivados *in vitro* sem a adição de IBMX.

### **3.19. Cultivo *in vitro* de vermes adultos: efeitos físicos na modulação do proteassoma**

#### **3.19.1. Análise da expressão do gene SmPOMP sob condições de estresse térmico**

Vermes adultos recuperados do sistema porta-hepático como descrito por SMITHERS & TERRY (1965), foram subdivididos em grupos de aproximadamente 16 casais, e transferidos para tubos tipo *ependorf* contendo 1ml de meio RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado com 20 µM de HEPS, pH 7.4, ampicilina (100 mg/mL), estreptomicina (100 mg/mL) e 10% de soro fetal bovino (Gibco).

Os parasitos foram a seguir, submetidos às seguintes condições de temperatura: 4°C, 25°C, 37°C, 42°C e 47°C, nas quais permaneceram por um período de 2 horas e em seguida, mantidos à -70°C. Também foi feito um grupo controle, no qual os parasitos recém-recuperados foram diretamente congelados em nitrogênio líquido e mantidos à -70°C. Posteriormente, o nível de expressão de SmPOMP foi avaliado sob este tipo de estresse físico, através da técnica de RT-PCR semiquantitativo .

### **3.19.2. Atividade proteolítica exógena do extrato bruto de vermes adultos sob condições de estresse térmico**

O preparo do extrato bruto e a medida da atividade proteolítica foram feitos conforme descrito no item 3.18.5. Entretanto, os extratos utilizados foram obtidos através de parasitas submetidos às seguintes condições de temperatura: 4°C, 25°C, 37°C, 42°C e 47°C, nas quais permaneceram por um período de 2 horas. Como controle negativo, utilizamos um extrato bruto de vermes adultos cultivados *in vitro* e tratados com MG-132 na concentração de 60µM por um período de três dias e como controles positivos parasitos que não sofreram estresse térmico.

### **3.19.3. Ensaio de viabilidade dos parasitos sob condições de estresse térmico**

O ensaio de quantificação colorimétrica baseado no “3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide” (MTT) (NARE et al., 1991; GOLDBAUM et al., 2006) foi utilizado para verificar a viabilidade dos parasitas. Casais de vermes adultos submetidos às seguintes temperaturas: 4°C, 25°C, 37°C, 42°C e 47°C foram transferidos para uma placa de 96 poços contendo 100µl de tampão fosfato salina (PBS) com 0.5 mg MTT/ml, e mantidos por 30 minutos a 37°. Posteriormente, a solução foi cuidadosamente removida e foram adicionados 200µl de dimetil sulfóxido (DMSO), no qual permaneceram por 1 hora. A absorbância foi lida em 550 nm; e DMSO foi usado como branco da reação. Como controle negativo, foi verificada a viabilidade de parasitas mortos a 56° C por 30 minutos, e como controle positivo parasitas que não sofreram estresse térmico.

### **3.20. Western blot para detecção de proteassomas 20S e proteínas poli-ubiquitinadas**

#### **3.20.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE)**

As amostras foram preparadas a partir de extratos brutos de vermes adultos obtidos como descrito no item 3.18.5 e 3.19.2. Foram utilizadas 15 µg de proteínas e aproximadamente 5 µl de tampão da amostra (solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 4%, 125mM de Tris-HCl, glicerol 20%, 100mM de DTT, azul de bromofenol 2% e pH 6,8 ajustado com 1M de HCl).

A eletroforese em gel de SDS-PAGE foi realizada de acordo com método descrito por Laemmli (1970). As amostras foram aquecidas a 100°C por 5 minutos e aplicadas em sistema de gel largo (modelo Protean II Cell-BioRad) de acrilamida:bisacrilamida com 1,0 mm de espessura, gel de separação de 12%. Na lateral do gel foi aplicado padrão de peso molecular da Fermentas (170-11 kDa). As corridas eletroforéticas foram realizadas em cubas de acrílico contendo tampão de corrida (25 mM de Tris-HCl pH 8,3, 115mM de glicina, SDS 0,1%), sob voltagem de 120 Volts, durante 1 hora e 30 minutos.

#### **3.20.2. Western blot**

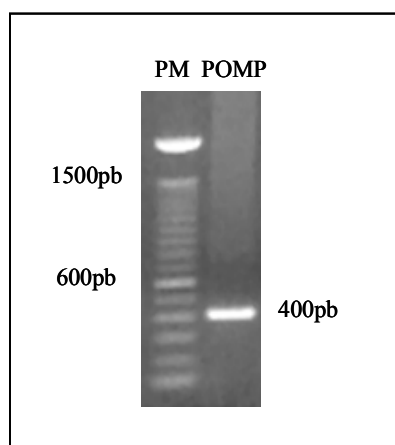
Após a corrida eletroforética, o gel foi preparado para a transferência (BioRad Trans-Blot) de acordo com o método descrito por Towbin et al., 1979. Inicialmente, o gel foi colocado na solução de transferência (25 mM de Tris-HCl, 0,192M de glicina, 20% etanol absoluto, pH 8,3) por cerca de 20 minutos. Após a montagem do sistema de transferência, as proteínas presentes no gel de poliacrilamida foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (NC), sendo o processo de transferência realizado durante 1 hora sob voltagem

fixa de 100 Volts a 4°C. Após o término da transferência, a membrana de NC foi submetida à *immunoblot*. Para isto foi incubada por 60 minutos, sob agitação, à temperatura ambiente com leite desnatado em pó 5%, diluído em TBS-T (0,02M de Tris-HCl, 0,16M de NaCl, 0,1% Tween 20). Após o bloqueio, a membrana foi incubada *overnight* a 4°C com anticorpos primários para a detecção de proteassoma 20S (anticorpo de camundongo anti-subunidades  $\alpha$  do proteassoma de humano –PW8195 / BIOMOL) e proteínas poli-ubiquitinadas (anticorpo de camundongo anti-ubiquitina de humano- clone FK1- PW8805 / BIOMOL). As diluições dos anticorpos primários foram realizadas em solução de TBS-T contendo 2,5% de albumina bovina sérica e 0,01% de azida sódica e utilizadas as seguintes razões dos anticorpos: 1:3000 e 1:2000, para detecção de proteassoma 20S e proteínas poli-ubiquitinadas, respectivamente. O anticorpo foi então retirado e a membrana devidamente lavada com solução de TBS-T, posteriormente incubada durante 1 hora à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário anti-IgG ligado à peroxidase (anti-IgG de camundongo, diluição de 1:5000 em TBS-T), no caso do proteassoma e, anti-IgM ligado à peroxidase (anti-IgM de camundongo, diluição de 1:5000), no caso das proteínas poli-ubiquitinadas. Após a lavagem das membranas para remoção do excesso de anticorpo secundário não ligado, a membrana foi revelada com filme autoradiográfico (Hyperfilm ECL), na ausência de luz, 1 minuto após a adição de partes iguais dos reagentes do Kit de Quimioluminescência Amplificada (ECL, Amersham).

## **4. RESULTADOS**

#### 4.1. Validação dos oligonucleotídeos iniciadores

Para confirmar se os oligonucleotídeos iniciadores, iriam direcionar a amplificação do gene SmPOMP, foram realizadas amplificações do transcrito na fase evolutiva de vermes adultos. Como observado na **Figura 8**, o transcrito amplificado foi de aproximadamente 400pb.



**Figura 8.** Gel de agarose 1.5% referente ao RT-PCR do gene SmPOMP obtido na fase de verme adulto de *S. mansoni*. PM – peso molecular; SmPOMP – Proteína de Maturação do proteossoma (aproximadamente 400 pb)

Posteriormente, o transcrito foi clonado e seqüenciado, como descrito em material e métodos e as seqüências obtidas foram analisadas em Chromas Lite, sendo que todas que apresentaram baixa qualidade foram descartadas. Para a identificação da provável região codificadora, as seqüências obtidas após o sequenciamento foram submetidas à análise utilizando o algoritmo ORF finder ([www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html)). O primeiro resultado da análise das seqüências, foi a constatação de que o tamanho do fragmento amplificado, estava de acordo com o tamanho esperado do produto, como descrito em material e métodos.

O próximo passo seria confirmar a identidade dos transcritos, desta forma, as seqüências foram submetidas à busca de homologia em banco de dados ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), com o auxílio do algoritmo BLASTX. Essas análises demonstraram

que o transcrito, é homólogo ao gene que codifica para Proteína de Maturação do Proteassoma, de outros organismos. A **Figura 9**, mostra a seqüência predita de 408 pares de bases (pb) provenientes do transcrito SmPOMP com os oligonucleotídeos iniciadores alinhados.

1	<b>ATGTACACTGGTTTAGGCGA</b> TGTAATTGGTTCTACTGTATGGTCAAGTGCAGAAGCATCATCATTGGCTG	70
71	CAATCCCAGGGTCTAAAGTGAAGATTCAACTAACTTTCCACATCCAGTAGCTGAATCACTTGCAAAAATT	140
141	TGGTAAAGCAGCTGAAAAAGCGAATAGAATGAGAGTTTTAGCTTCTACTCAAGGTTTACATGCACCATTA	210
211	CGTCTATCTATGGAACAACATATAATGCAACGTATTCAACCACGTCTACCTGGTTTATATTCTTATCATC	280
281	CTTTAGCTAGTCAATTAATGGGAGTTTAGATGAGATAGATATAGCTGACTTTATAAATCCTGCGGAAGA	350
351	TTCTGAAACCGTTGGAATGCCCAATTGATGAT <b>GGAGCATAAACTTGGTCTTTTGTAA</b>	408

**Figura 9.** Seqüência de 408 pares de bases (pb) provenientes do transcrito que codifica para SmPOMP. Oligo Sense: **5'ATGTACACTGGTTTAGGCGA3'** e oligo Antisense: **5'AAAGACCAAGTTTATGCTCC 3'**

Para confirmar a identidade das seqüências de aminoácidos preditas de SmPOMP, as seqüências também foram analisadas em banco de dados que permitem a identificação de domínios conservados numa seqüência primária de aminoácidos. Neste caso, utilizamos a base de dados do algoritmo Pfam ([www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/](http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/)), onde constatamos a presença de um único domínio, denominado UMP1, no fragmento gênico de SmPOMP, que se inicia no 5º aminoácido e tem fim no 135º aminoácido, como pode ser observado na **Figura 10**.

```
MYTGLGDVIGSTVWSSAEASSLAAIPGSKVEDSTNFPHPVAESLAKFGKAAEKANRMRVLASTQGLHAPL
RLSMEQHIMQRIQPRLPGLYSYHPLASQLNGSLDEIDIADFINPAEDSETVGMPQLMMEHKLGLL*
```

**Figura 10.** Seqüência de aminoácidos predita de SmPOMP, destacando o domínio UMP1.

A sequência de aminoácidos predita referente ao fragmento gênico de SmPOMP em *S.mansoni*, foi alinhada com os respectivos ortólogos com o auxílio dos programas CLUSTALW ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)) e Boxshade ([www.biowed.pasteur.fr](http://www.biowed.pasteur.fr)), com a intenção de identificar aminoácidos conservados e idênticos, como pode ser observado na **Figura 11**.

```

PMPsm -----MYTGLGDVIGSTVWS--SAEASSLA--AIPGSK-VEDSTNFPH
PMPsj MSGNNKMLQPEFAVRPLLYTGLGDVVGSTVWS--SKQASSLA--AIPGSN-VTDSTNFPH
PMPts -----MESGNTFKLSRNEFGLVSAMYNGLA--ANRGLISEVDAVAAPH
PMPmm -----MNARGLGSELKDSIPVAELSASGPFESHDL--LRKGFSCVKNELLP SH
PMPrn -----MNARGLGSQKDSIPVTELSASGPFESHDL--LRKGFSCVKNELLP SH
PMPhs -----MNARGLGSELKDSIPVTELSASGPFESHDL--LRKGFSCVKNELLP SH
PMPdm -----MYQPSLKVQPAE---VSVLNATGRVG-----MPTANCLN-QLAHVH
PMPsp -----MKIVPDVEPAAEVSGNFKVSVLEPSIPAVHR-----VENKH
PMPsc -----MNIVPQDTFKSQVSTQDKSVLSSAVPSLPDTLRQEGGAVPLSTQLNDRH
PMPat -----MESQKKIAHEIIGGMKNDALRFGLHG-----VKSDILRSH

PMPsm PVAESLAKFGKAAEKANRMRVLASTQGLHAPLRLSMEQHIMQRIQP-RLPGLYSYHPLAS
PMPsj PVAESLAKYGKAAERANRMKVLTSAGLHGPLRLSMEQRIMRRIQP-RLPGLYSHHPLAS
PMPts PAAAAEAQRGEAAQRMQSMRVLIRSTQGLHAPLRLAMEERVMERMAP-RLPGIYTHHPLAA
PMPmm PLELSEKNFQLNQDKMN-FSTLRNIQGLFAPLKLQMEFKAVQQVH--RLPFLPSSNLSLD
PMPrn PLELSEKNFQLNQDKMN-FSTLRNIQGLFAPLKLQMEFKAVQQVQ--RLPFLPSSNLSLD
PMPhs PLELSEKNFQLNQDKMN-FSTLRNIQGLFAPLKLQMEFKAVQQVQ--RLPFLSSNLSLD
PMPdm RLRDSELNNEHQYNRN-MQMLRNHEGLGVPLKMGMERFAARQVG--RLPFLSSSNFMDD
PMPsp PLESRLKNWEAQQQQIR-LDSMRRIYGLHEPVVREMEQKLASQSSR-PLALGGSANFHLD
PMPsc PLESTLKNWETTORQO-MEQYRQIFGIAEPMKRTMEMEIVNRTDFNPLSTNG--SIHRD
PMPat PLETAYESGKQSQEEMK-RRVITHTYGAALPLKMDLDRQILSRFQR-PPGPIPSSMLGLE

PMPsm QLNGSLDEIDIADFINPA---EDSETVGMPLMMEHKLGLL-----135
PMPsj QLSGSLDEIDVADFINPA---EDSESVGMPLMMEHKLGLL-----152
PMPts QLSGALDTIDFCIDILNSP---EDAEMVSPHLLMERQQGIL-----138
PMPmm IILRGNDETIGFEDILNDP---SQSELMGEPHVMVEHKLGLL-----141
PMPrn IILRGNDETIGFEDILNDP---SQSELMGEPHMMVEYKLGLL-----141
PMPhs VILRGNDETIGFEDILNDP---SQSEVMGEPHLMVEYKLGLL-----141
PMPdm VLTGRCDSIGFEDFMNLP---ENSEHMRQPHAVVEKSLGIYQ-----134
PMPsp IILANREAVLDETDIYAAP----IPLPTYQNEMAIRYGL-----129
PMPsc IILNKECSTIDWEDVYPGTGLQASTMVGDDVHSKIIEKQLGI-----148
PMPat VYTCALDNFGFEDYLNDPR-ESETLKPVDFFHHGMEVRLGLLSKGPASPSFM-141

```

**Figura 11.** Alinhamento das sequências preditas de aminoácidos da Proteína de Maturação do Proteossoma (POMP) provenientes de diferentes organismos (Sm - *Schistosoma mansoni*; Sj - *Schistosoma japonicum*; Ts - *Taenia solium*; Mm - *Mus musculus*; Rt - *Rattus norvegicus*; Hs - *Homo sapiens*; Dm - *Drosophila melanogaster*; Sp - *Schizosaccharomyces pombe*; Sc - *Saccharomyces cerevisiae*; At - *Arabidopsis thaliana*). As caixas em preto indicam os aminoácidos idênticos e as caixas em cinza indicam os aminoácidos conservados. Programa utilizado: Boxshade ([www.biowed.pasteur.fr](http://www.biowed.pasteur.fr)).



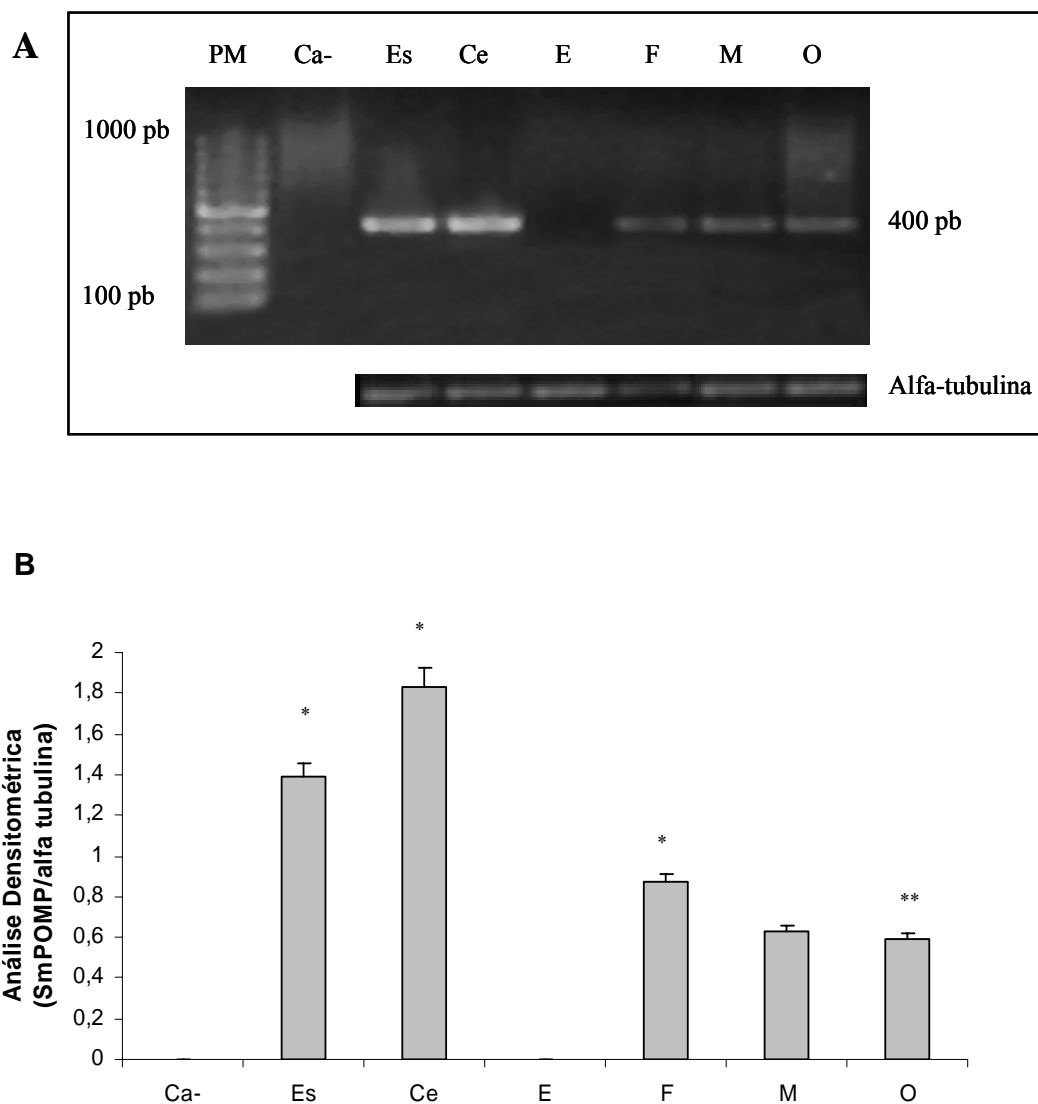
#### 4.2. Análise da expressão do gene SmPOMP nas diferentes fases do ciclo de vida de *S. mansoni*

Neste experimento, foi investigada a expressão de SmPOMP nos estágios de desenvolvimento do parasita, com a finalidade de evidenciar a existência ou não de uma possível expressão diferencial estágio específica durante o ciclo de vida do parasita.

Então, a partir do RNA total de vermes adultos (fêmeas e machos), esquistossômulos de 3 horas, cercárias, ovos, esporocistos (caramujos infectados), caramujos não infectados (controle negativo) e oligonucleotídeos gene-específicos, os respectivos cDNAs foram sintetizados, utilizando a técnica de RT-PCR, conforme descrito em material e métodos. Após a amplificação, os produtos do PCR, foram analisados em gel de agarose 1,5%.

Como pode ser observado na **Figura 12**, a análise da expressão do gene SmPOMP, revelou a presença de um único transcrito, de aproximadamente 400 pb, em todas as fases analisadas.

Utilizando como método comparativo a fase evolutiva de vermes adultos machos, a expressão de SmPOMP apresentou uma diferença estatisticamente significativa entre as demais fases do ciclo. Os valores correspondentes às análises densitométricas se encontram no **Anexo 2** e são resultados de no mínimo três experimentos independentes.



**Figura 12. Perfil de expressão de SmPOMP durante o ciclo de vida de *S. mansoni*.**

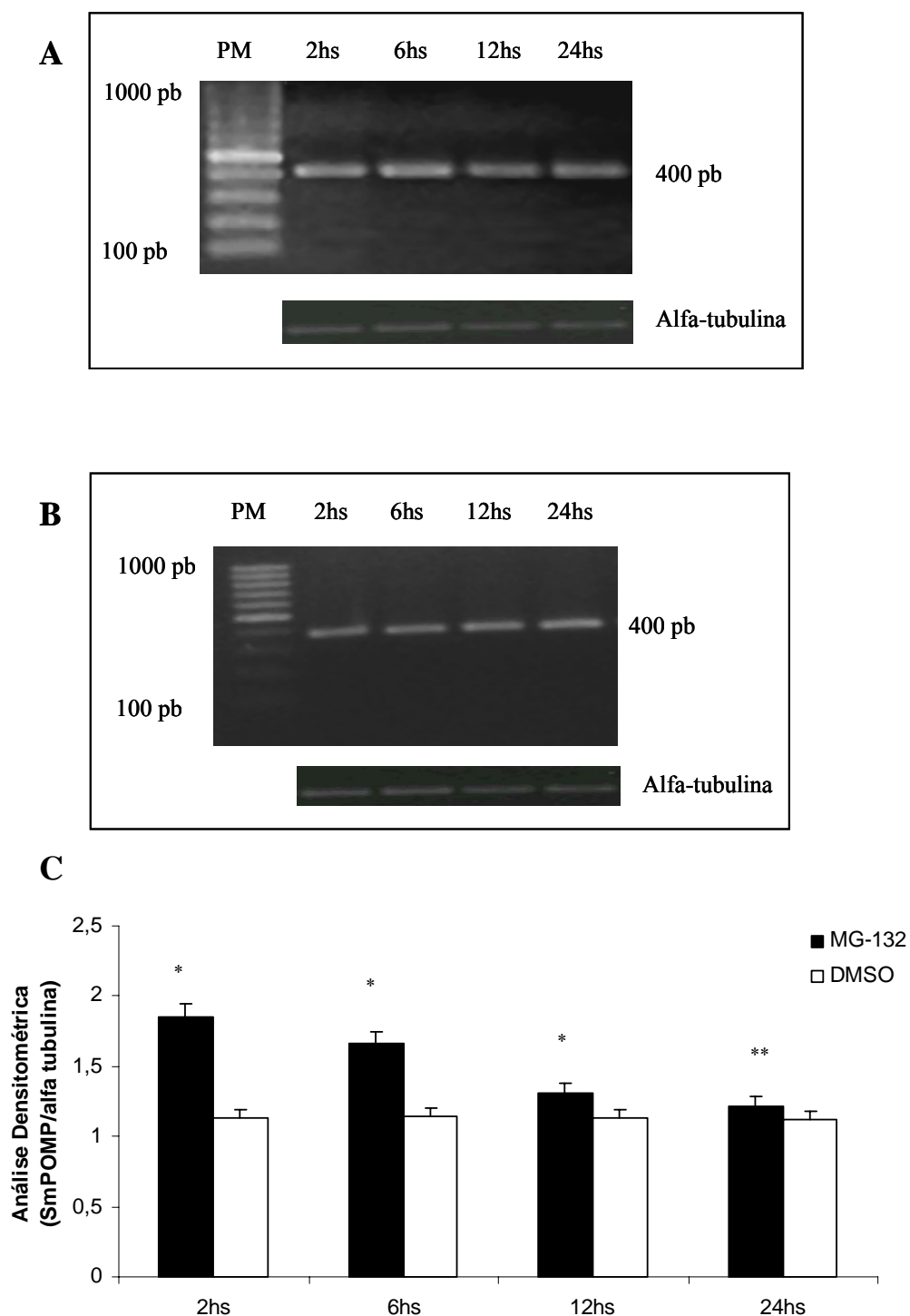
**A.** RT-PCR do RNAm codificador para SmPOMP. Cerca de 10 $\mu$ l de cada preparação foram aplicados em gel de agarose 1,5% e o gel corado com brometo de etídeo. Abreviaturas: Peso Molecular 100pb (PM); caramujo não infectado (Ca-); esporocisto (Es); cercária (Ce); esquistossômulos (E); fêmea (F); macho (M); ovos (O) e como controle interno: alfa-tubulina. **B.** Análise densitométrica para SmPOMP, tomando a alfa-tubulina como controle interno (\*  $P < 0.001$ ) e (\*\*  $P < 0.010$ ), utilizando como método comparativo a fase evolutiva de vermes adultos machos.

### 4.3. Efeitos químicos na modulação do proteassoma

#### 4.3.1 Análise da expressão do gene SmPOMP sob efeito do inibidor da atividade peptidásica do proteassoma (MG-132) em parasitas adultos mantidos *in vitro*

Parasitas recuperados via perfusão do sistema porta-hepático, como descrito por SMITHERS & TERRY (1965), foram transferidos para placas de cultivo na proporção de um casal de parasitas para 2 mL meio RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado como descrito em material e métodos. O inibidor do proteassoma, MG-132 (previamente dissolvido em DMSO) foi adicionado a placa de cultivo para uma concentração final de 60  $\mu\text{M}$ , pois nesta concentração foi observado que os parasitas estavam viáveis.

A expressão de SmPOMP foi analisada nos intervalos de 2, 6, 12 e 24 horas com o inibidor e como controle, amostras sem MG-132, apenas com DMSO foram cultivadas da mesma forma e analisadas nos mesmos intervalos de tempo. A **Figura 13** mostra uma expressão diferencial e estatisticamente significativa ( $P < 0.001$ ) da SmPOMP entre os tempos de cultivo dos grupos tratados com MG-132 quando comparados ao controle tratado apenas com DMSO e aparentemente, esta expressão é diminuída de modo tempo-dependente, como já descrito por MEINERS e Cols, 2003. Pode-se observar também que não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os tempos de cultivo do grupo controle tratado apenas com DMSO ( $P > 0,05$ ). Os valores das análises densitométricas se encontram no **Anexo 3** e são resultados de no mínimo três experimentos independentes.



**Figura 13. Perfil de expressão de SmPOMP em relação ao MG-132 (60 $\mu$ M).** **A-** RT-PCR do RNAm codificador para SmPOMP. Cerca de 10 $\mu$ l de cada preparação foram aplicados em gel de agarose 1,5% e o gel corado com brometo de etideo. Abreviaturas: Peso Molecular 100pb (PM); Tempo de exposição ao MG-132 (2hs, 6hs, 12hs e 24hs); **B-** Controles tratados com DMSO e Controle interno: alfa – tubulina. **C-** Análise densitométrica para SmPOMP, tomando a alfa-tubulina como controle interno (\*P<0.001) e (\*\*P<0.01)

#### 4.4. Avaliação *in vitro* das condições fisiológicas de vermes adultos sob o efeito químico de IBMX (3-isobutil-1-methylxanthine)

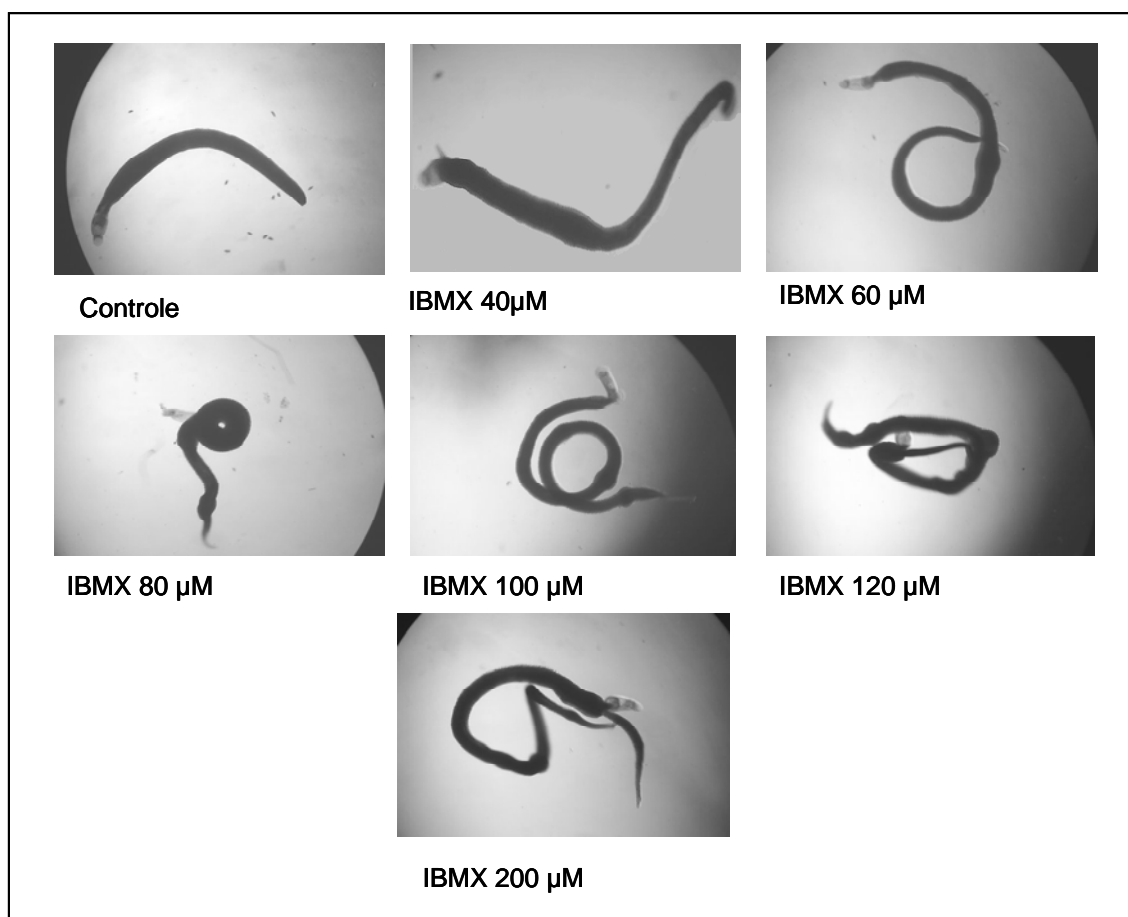
##### 4.4.1. Viabilidade dos parasitos

Parasitas recuperados do sistema porta-hepático, foram transferidos para placas de cultivo na proporção de um casal de parasitas para 2 mL de meio RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado como descrito em material e métodos. O composto IBMX foi adicionado na cultura em diferentes concentrações: 40  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$ , 80  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 120  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ , e 500  $\mu\text{M}$ . Controles negativos foram feitos sem a adição da xantina.

A cultura foi monitorada com o auxílio de microscópio invertido (Leitz, Diavert). Nos grupos tratados na concentração de 500  $\mu\text{M}$ , os parasitas estavam vivos mas, esta concentração foi descartada de nossos estudos posteriores já que os casais se separaram logo nas primeiras horas de cultivo.

Foi observado que após 2 horas da adição do IBMX, houve nítido aumento na motilidade dos parasitos, proporcional à concentração do IBMX, como pode ser observado na

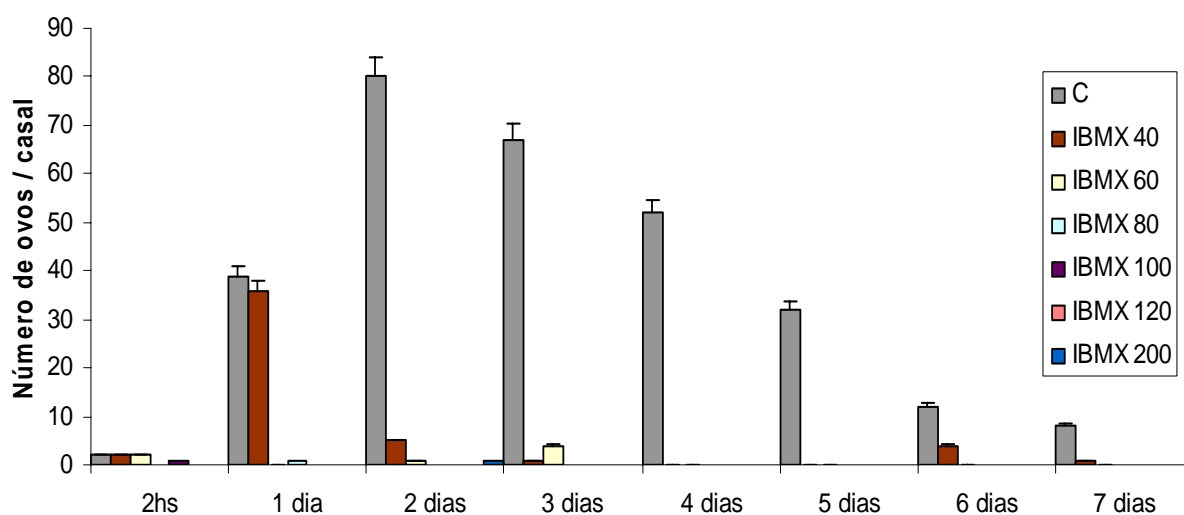
**Figura 14.**



**Figura 14.** Representação da perda da estabilidade (aumento da motilidade) do casal de parasitos cultivados *in vitro* na presença do IBMX. A perda da estabilidade é proporcional à concentração da droga.

#### 4.4.2. Estimativa da ovoposição *in vitro*

Já na **Figura 15**, podemos observar uma diferença estatisticamente significativa ( $P < 0.001$ ) entre parasitos tratados quando comparados ao controle, exceto nas concentrações de 40  $\mu\text{M}$  e 60  $\mu\text{M}$ , do intervalo de 2 h, onde  $P > 0.05$ . Podemos observar também que a concentração de 40  $\mu\text{M}$  começa a inibir a ovoposição a partir do segundo dia, enquanto as outras concentrações utilizadas inibem logo no primeiro dia, devido a este fato, apenas no primeiro dia há uma diferença significativa entre as concentrações de IBMX e, a partir do segundo dia o mesmo não ocorre ( $P > 0.05$ ). Estes valores se encontram no **Anexo 4** e são resultados de no mínimo três experimentos independentes.



**Figura 15.** Análise da ovoposição de vermes adultos cultivados *in vitro* na presença de IBMX nas seguintes concentrações: 40 $\mu\text{M}$ , 60 $\mu\text{M}$ , 80 $\mu\text{M}$ , 100 $\mu\text{M}$ , 120 $\mu\text{M}$  e 200 $\mu\text{M}$ ; por um período de 2hs até sete dias ( $P < 0.001$ ).

#### 4.4.3. Análise da reversibilidade da ovoposição de vermes adultos cultivados *in vitro* na presença de IBMX

De acordo com o experimento anterior, IBMX inibe a ovoposição sem ocorrer a separação dos casais de parasitos cultivados *in vitro*, a partir deste resultado decidimos avaliar se a inibição da ovoposição com o IBMX seria definitiva ou poderia ocorrer a recuperação da ovoposição com a retirada da droga (reversibilidade da inibição da ovoposição). Então, casais de vermes adultos recuperados do sistema porta-hepático como já descrito, foram transferidos para placas de cultivo na proporção de um casal para 2 mL de meio RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado como descrito em material e métodos. IBMX foi adicionado na cultura nas concentrações de 40  $\mu\text{M}$  e 80  $\mu\text{M}$  e também foram feitos controles negativos sem a adição da xantina.

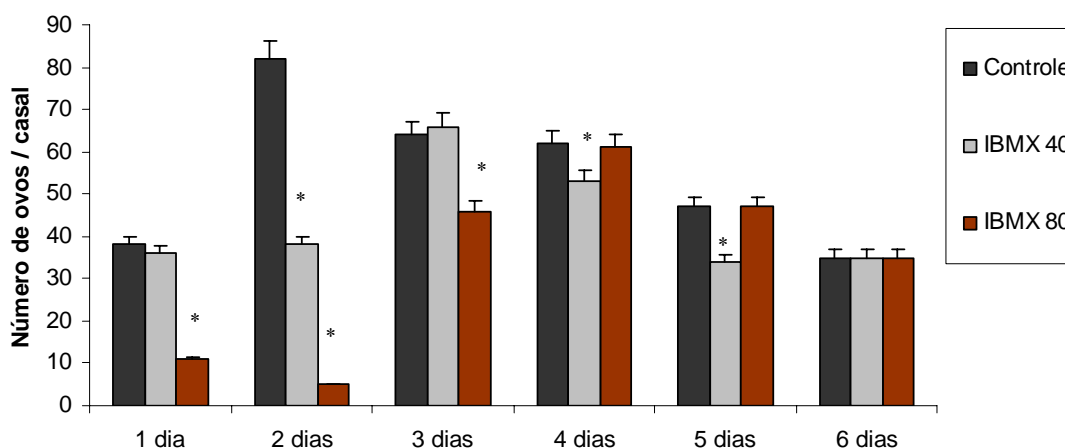
Os parasitos permaneceram sob o efeito de IBMX por um período de 24h, quando então, o meio de cultivo foi substituído (inclusive o meio do grupo controle) por um meio novo tamponado da mesma forma que o anterior, porém livre de IBMX. A cultura foi monitorada e a ovoposição analisada com o auxílio de microscópio invertido (Leitz, Diavert).

De acordo com a **Figura 16**, podemos observar a inibição da ovoposição, proporcional à concentração de IBMX no primeiro e ainda no segundo dia efeito este, mais proeminente na concentração de 80  $\mu\text{M}$ , de acordo com o resultado anterior. Entretanto, a partir do terceiro dia a ovoposição se normaliza entre os três grupos, indicando a reversibilidade da inibição provocada por IBMX.

Podemos notar também que não há diferença estatisticamente significante entre o controle e IBMX 40  $\mu\text{M}$  no primeiro e no terceiro dia, o mesmo ocorre entre o controle e IBMX 80  $\mu\text{M}$  no quarto e no quinto dia. Em todos os outros intervalos há uma diferença significante (\* $P < 0.001$ ), exceto no sexto dia; onde a ovoposição estabiliza ( $P > 0.05$ ). Estes



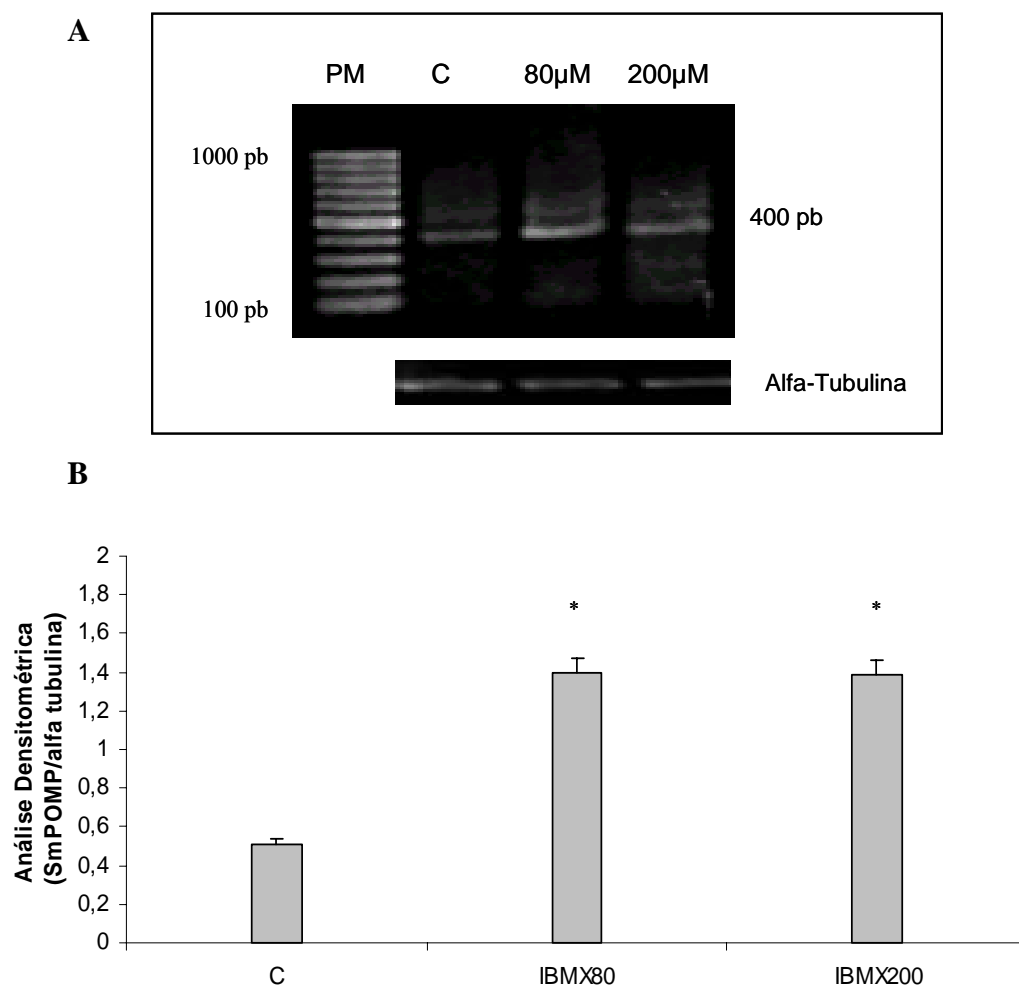
valores se encontram no **Anexo 5** e são resultados de no mínimo três experimentos independentes.



**Figura 16. Efeito reversível de IBMX na ovoposição de vermes adultos.** Vermes adultos foram cultivados *in vitro* na presença de IBMX (40 $\mu$ M e 80 $\mu$ M) ou ausência (controle) por 24hs. Após esse período o meio de cultivo foi substituído por um meio sem IBMX e a ovoposição foi acompanhada por um período de seis dias (\* $P < 0.001$ ).

#### 4.4.4. Análise da expressão do gene SmpPOMP sob efeito de IBMX

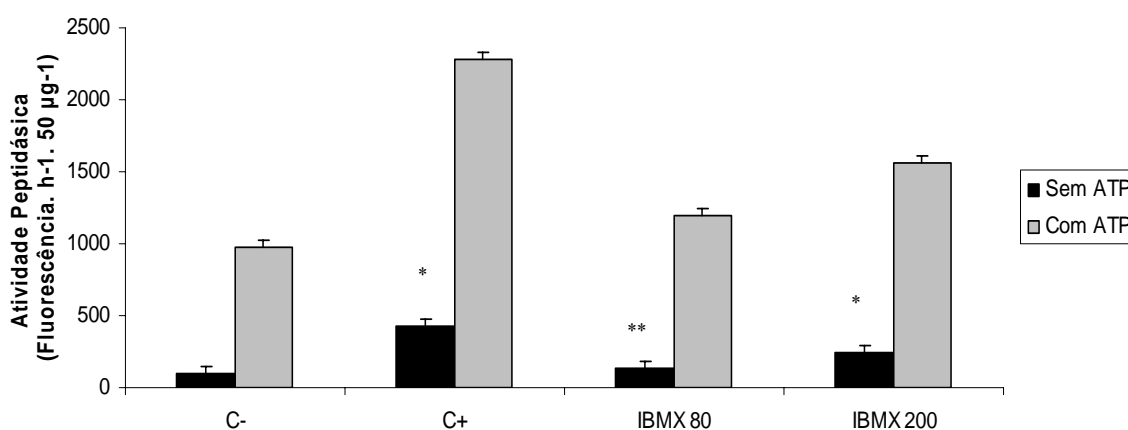
Parasitas recuperados por perfusão asséptica, como já descrito, foram transferidos para placas de cultivo na proporção de um casal para 2 mL de meio RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado como descrito em material e métodos. IBMX foi adicionado na cultura nas concentrações de 80  $\mu$ M e 200  $\mu$ M e também foram feitos controles negativos sem a adição da xantina. A cultura foi mantida a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> por 3 dias. Os parasitos foram coletados e mantidos à -70°C para posterior análise da expressão de SmpPOMP. De acordo com a **Figura 17**, podemos observar, um aparente aumento na expressão de SmpPOMP nos grupos tratados quando comparados ao controle ( $P < 0.001$ ). Porém, não há uma diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos tratados com IBMX ( $P > 0.05$ ). Os valores das análises densitométricas se encontram no **Anexo 6** e são resultados de no mínimo três experimentos independentes.



**Figura 17. Perfil de expressão de SmPOMP em vermes adultos tratados com IBMX. A.** RT-PCR do RNAm codificador para SmPOMP. Cerca de 10µl de cada preparação foram aplicados em gel de agarose 1,5% e o gel corado com brometo de etídeo. Abreviaturas: Peso Molecular 100pb (PM); Controle (C); concentrações de IBMX (80 e 200µM); Controle interno: alfa-tubulina. **B.** Análise densitométrica para SmPOMP, tomando a alfa-tubulina como controle interno (\* P<0.001).

#### 4.4.5. Atividade proteolítica exógena do proteassoma em extrato bruto de vermes adultos sob efeito de IBMX

A partir dos dados anteriores, nossa próxima meta seria avaliar como estaria a atividade do proteassoma frente ao estresse químico provocado por IBMX nas concentrações de 80 $\mu$ M e 200 $\mu$ M. Para tanto, utilizamos como substrato o peptídeo sintético Suc-Leu-Leu-Val-Tyr—MCA, para avaliar a atividade proteolítica do proteassoma. Como controle negativo utilizamos extrato bruto de vermes adultos tratados com MG-132 a 60 $\mu$ M, e como controle positivo extrato de vermes adultos cultivados *in vitro* sem o inibidor. Conforme demonstrado pela **Figura 18**, a atividade do proteassoma nos extratos tratados com IBMX está diminuída em relação ao controle sem o inibidor e semelhante ao tratado com MG-132, sugerindo uma diminuição na atividade do proteassoma. Os dados obtidos são estatisticamente significantes para todas as amostras (\* $P < 0.001$ ), quando comparados ao controle sem inibidor. O mesmo não ocorre entre o MG-132 (60 $\mu$ M) e o IBMX 80 $\mu$ M (\*\* $P > 0.05$ ). Foi também observado um aumento significativo e proporcional na atividade proteolítica do proteassoma após adição de ATP. Os valores utilizados se encontram no **Anexo 7** e são resultados de no mínimo três experimentos independentes.

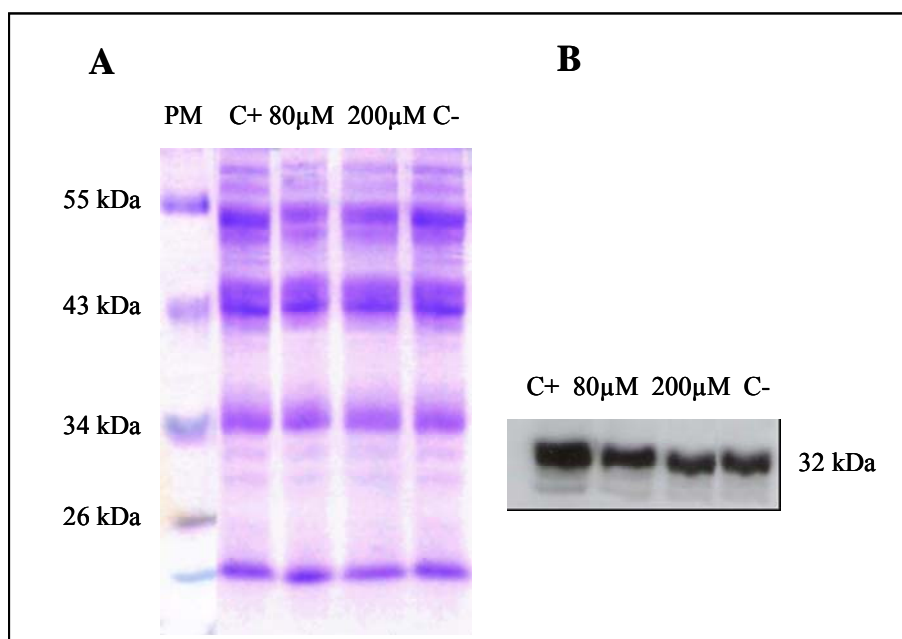


**Figura 18. Atividade exógena do proteassoma em extrato bruto de vermes adultos.** Representação da atividade peptidásica sobre o substrato SUC-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA (Fluorescência. h-1. 50 $\mu$ g-1) sob o efeito de IBMX, nas concentrações de 80 $\mu$ M e 200 $\mu$ M. Abreviaturas: C-: Controle negativo (vermes adultos cultivados *in vitro* na presença de MG-132 60 $\mu$ M), C+: Controle positivo (vermes adultos cultivados *in vitro* na ausência de IBMX), (\* $P < 0.001$ ) e (\*\* $P > 0.05$ ).

#### **4.4.6. Detecção de subunidades do proteassoma 20S em extrato bruto de vermes adultos sob efeito de IBMX**

Uma vez que foi observada uma redução na atividade do proteassoma nos extratos brutos de vermes adultos cultivados *in vitro* na presença de IBMX, o presente trabalho passou a investigar as alterações que poderiam estar ocorrendo nos componentes deste sistema proteolítico. Desta maneira, após a corrida eletroforética, as proteínas presentes no gel de poliacrilamida foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e esta, foi submetida à *immunoblot* com anticorpo de camundongo anti-subunidades  $\alpha$  do proteassoma de humano (BIOMOL) para detecção de proteassoma 20S, sendo o resultado deste estudo apresentado na **Figura 19**.

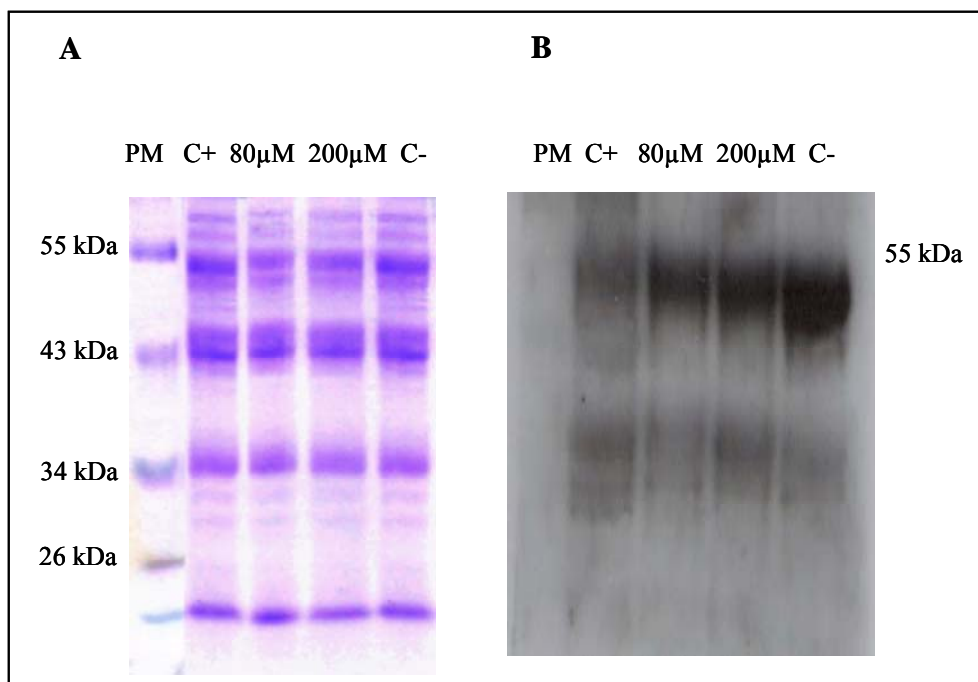
Foi observada uma diminuição no conteúdo protéico do proteassoma 20S nos extratos tratados com IBMX, tanto em 80 $\mu$ M quanto em 200 $\mu$ M, quando comparados ao controle positivo. Porém, o mesmo não ocorre entre os extratos tratados e o controle negativo tratado com MG-132.



**Figura 19. Western blotting do proteassoma 20S em extrato bruto de vermes adultos cultivados *in vitro* na presença ou ausência de IBMX.** **A.** Gel de poliacrilamida 12%, corado com *Comassie blue*, correspondente a 15µg de proteínas do extrato bruto de vermes adultos cultivados na presença ou ausência de IBMX. **B.** Detecção dos níveis protéicos do proteassoma 20S por *western blot* com o uso do anticorpo de camundongo anti-subunidades  $\alpha$  do proteassoma humano e revelado conforme descrito em material e métodos. Abreviaturas: C+: controle positivo (vermes adultos cultivados *in vitro* na ausência de IBMX), vermes adultos cultivados *in vitro* na presença de IBMX (80µM e 200µM), C-: controle negativo (vermes adultos cultivados *in vitro* na presença de MG-132 60µM).

#### 4.4.7. Detecção de proteínas poli-ubiquitinadas em extrato bruto de vermes adultos sob efeito de IBMX

Um outro ponto investigado relacionado à via ubiquitina -proteassoma, foi em relação às proteínas poli-ubiquitinadas. Da mesma forma que o experimento anterior, as proteínas presentes no gel de poliacrilamida foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e submetidas à *immunoblot*. Nesse caso, o anticorpo utilizado direciona apenas a detecção de proteínas poli-ubiquitinadas (BIOMOL). De acordo com a **Figura 20**, podemos observar um aumento nos níveis de proteínas poli-ubiquitinadas nos extratos tratados com IBMX (em ambas as concentrações) e no controle negativo quando os comparamos ao controle positivo (ou seja, com os vermes adultos cultivados na ausência dessa xantina).

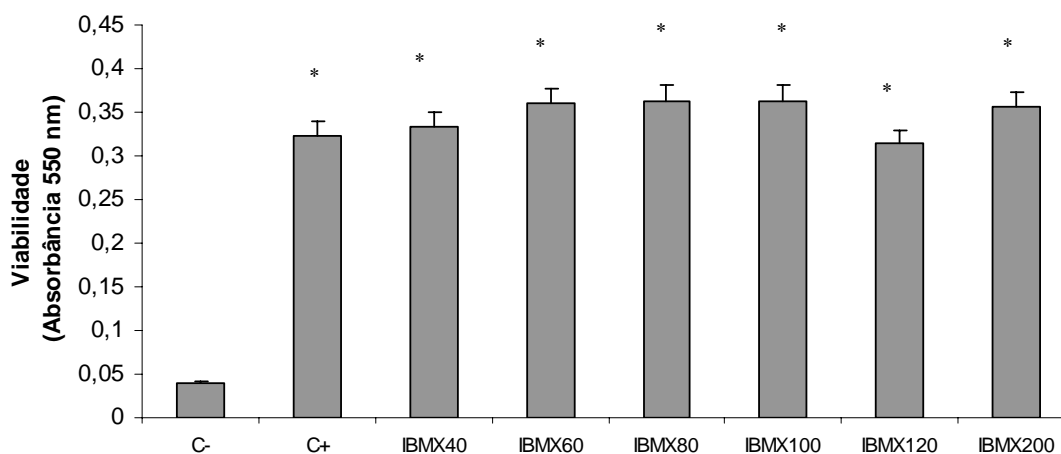


**Figura 20. Western blotting de proteínas ubiquitinadas em extrato bruto de vermes adultos cultivados *in vitro* na presença ou ausência de IBMX.** A. Gel de poliacrilamida 12%, corado com *Comassie blue*, correspondente a 15µg de proteínas do extrato bruto de vermes adultos cultivados na presença ou ausência de IBMX. B. Detecção dos níveis protéicos de proteínas poli-ubiquitinadas por *western blot* com o uso do anticorpo de camundongo anti-ubiquitina de humano e revelado conforme descrito em material e métodos. Abreviaturas: C+: controle positivo (vermes adultos cultivados *in vitro* na ausência de IBMX), vermes adultos cultivados *in vitro* na presença de IBMX (80µM e 200µM), C-: controle negativo (vermes adultos cultivados *in vitro* na presença de MG-132 60µM).

#### 4.4.8. Ensaio de viabilidade dos parasitos sob efeito de IBMX

O ensaio de quantificação colorimétrica baseado no “3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide” (MTT) foi utilizado para verificar a viabilidade dos parasitos. Foram utilizados casais de vermes adultos tratados em diferentes concentrações de IBMX (40 µM ,60 µM ,80 µM ,100 µM ,120 µM,e 200µM ). Como controle negativo, foi verificada a viabilidade de parasitas mortos pelo calor a 56° C por 30 minutos e como controle positivo foram utilizados casais cultivados sem adição de IBMX. A absorbância foi lida em 550 nm; e DMSO foi utilizado como branco da reação. Então, de acordo com os resultados apresentados na **Figura 21**, podemos notar que IBMX não interfere na viabilidade dos parasitos, quando comparados com ambos os controles: negativo e positivo. As diferenças são estatisticamente

significantes apenas entre o controle negativo e os tratamentos ( $*P<0.001$ ), o que não ocorre entre os tratamentos e entre o controle positivo ( $P>0.05$ ). Estes valores se encontram no **Anexo 8** e são resultados de no mínimo três experimentos independentes.



**Figura 21. Ensaio de viabilidade dos vermes adultos sob efeito de IBMX.** Representação da viabilidade dos parasitos pelo ensaio do MTT, sob efeito de IBMX, nas seguintes concentrações: 40 $\mu$ M, 60 $\mu$ M, 80 $\mu$ M, 100 $\mu$ M, 120 $\mu$ M e 200 $\mu$ M; em absorbância de 550 nm ( $*P<0.001$ ). Abreviaturas: C-: Controle negativo (vermes adultos mortos a 56°C), C+: Controle positivo (vermes adultos não tratados).

## 4.5. Efeitos físicos na modulação do proteassoma

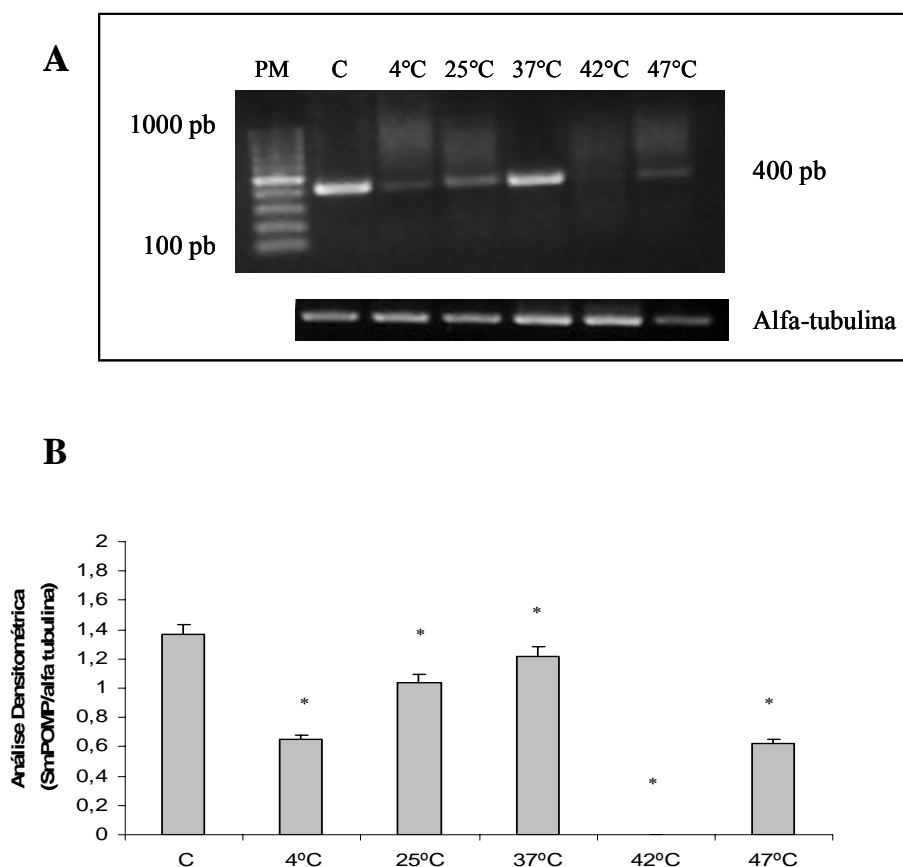
### 4.5.1. Análise da expressão do gene SmPOMP sob condições de estresse térmico

Vermes adultos recuperados do sistema porta-hepático como descrito por SMITHERS & TERRY (1965), foram transferidos para tubos tipo *ependorf* contendo 1ml de meio RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado como descrito em material e métodos.

Os parasitos foram a seguir, submetidos às seguintes condições de temperatura: 4°C, 25°C, 37°C, 42°C e 47°C, nas quais permaneceram por um período de 2 horas. Também foi feito um grupo controle, que foi diretamente congelado, após a perfusão, em nitrogênio líquido e mantidos à -70°C para uso posterior.

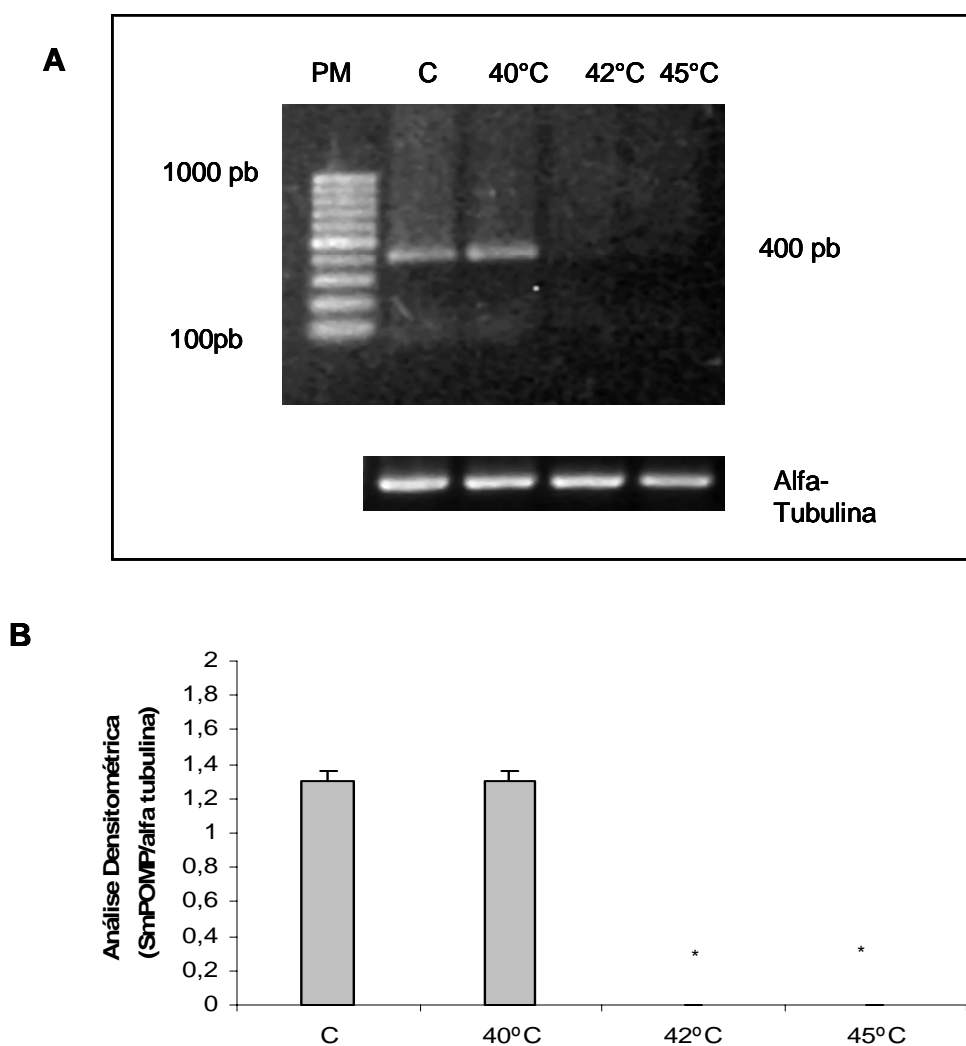
Com o propósito de avaliar o nível de expressão de SmPOMP sob este tipo de estresse físico, foi realizada a técnica de RT-PCR semiquantitativo, tendo sido observada na **Figura 22** uma expressão diferencial deste gene quando comparado ao controle (\* $P < 0.001$ ), exceto entre 4°C e 47°C, onde não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa ( $P > 0.05$ ). Os valores da análise densitométrica se encontram no **Anexo 9** e são resultados de no mínimo três experimentos independentes.





**Figura 22. Perfil de expressão de SmPOMP em vermes adultos submetidos a condições de estresse térmico. A.** RT-PCR do RNAm codificador para SmPOMP. Cerca de 10 $\mu$ l de cada preparação foram aplicados em gel de agarose 1,5% e o gel corado com brometo de etídeo. Abreviaturas: Peso Molecular 100pb (PM); C: Controle; Temperaturas (4°C, 25°C, 37°C, 42°C e 47°C); Controle interno: alfa-tubulina. **B.** Análise densitométrica para SmPOMP, tomando a alfa-tubulina como controle interno (\* $P < 0.001$ ).

Para tentar entender a variação que ocorre na expressão de SmPOMP entre 42°C e 47°C, fizemos um novo experimento nas mesmas condições descritas anteriormente no item 4.5.1. Entretanto, os vermes adultos foram submetidos à 40°C, 42°C e 45°C. Como podemos observar na **Figura 23**, em 40°C houve expressão de SmPOMP, semelhante ao controle ( $P > 0.05$ ). Porém em 42°C e 45°C novamente não podemos observar a expressão de SmPOMP (\* $P < 0.001$ ). Os valores da densitométrica se encontram no **Anexo 12** e são resultados de no mínimo três experimentos independentes.



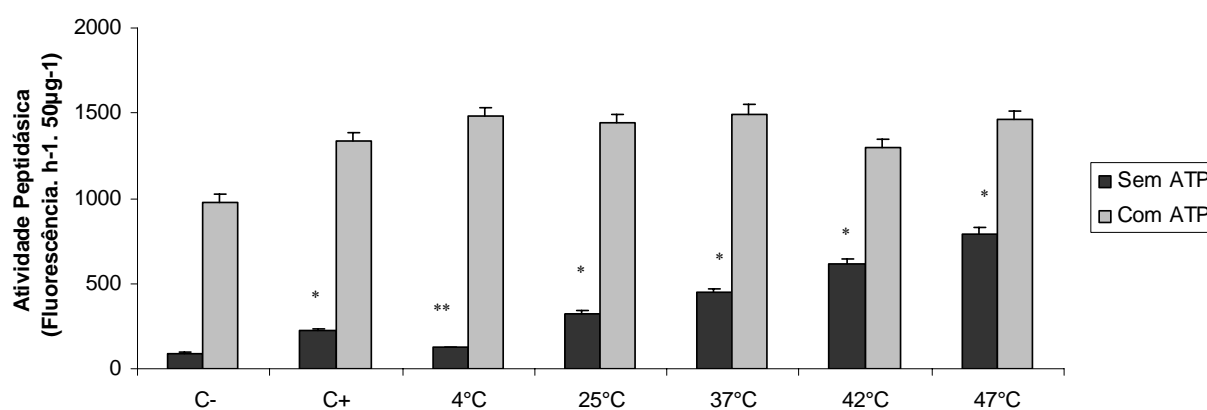
**Figura 23. Perfil de expressão de SmPOMP em vermes adultos submetidos a condições de estresse térmico.** **A.** RT-PCR do RNAm codificador para SmPOMP. Cerca de 10 $\mu$ l de cada preparação foram aplicados em gel de agarose 1,5% e o gel corado com brometo de etídeo. Abreviaturas: Peso Molecular 100pb (PM); C: Controle; Temperaturas (40°C, 42°C, 45°C); Controle interno: alfa-tubulina. **B.** Análise densitométrica para SmPOMP, tomando a alfa-tubulina como controle interno (\*P<0.001).

#### 4.5.2. Atividade proteolítica exógena do extrato bruto de vermes adultos sob condições de estresse térmico

Nosso próximo objetivo foi investigar como estaria a atividade do proteassoma frente ao estresse físico, causado pelas mesmas temperaturas descritas no experimento anterior, utilizando como substrato o peptídeo sintético Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA. Como controle

negativo, utilizamos um extrato bruto de vermes adultos cultivados *in vitro* e tratados com MG-132 a 60 $\mu$ M.

Podemos observar na **Figura 24**, que a atividade do proteassoma, nos extratos sem adição de ATP aumenta com o aumento da temperatura, quando comparados ao controle negativo tratado com MG-132. Estes dados são estatisticamente significantes (\* $P < 0.001$ ), exceto entre controle negativo e 4°C (\*\* $P > 0.05$ ). Estes valores se encontram no **Anexo 10** e são resultados de no mínimo três experimentos independentes.

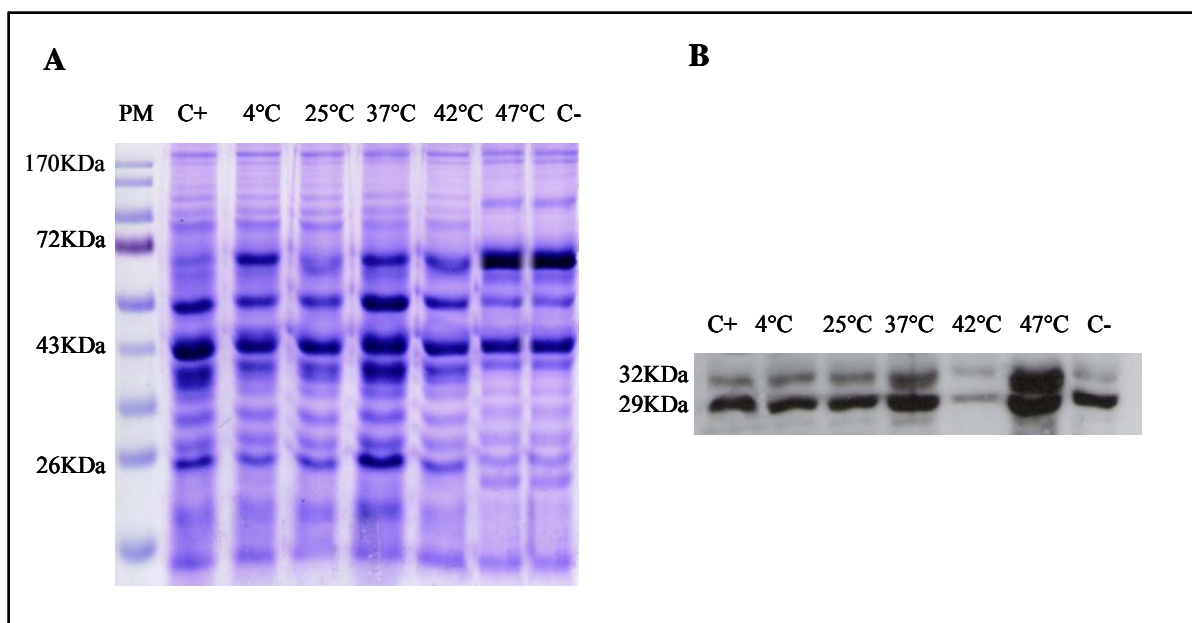


**Figura 24. Atividade exógena do proteassoma em extrato bruto de vermes adultos.** Atividade peptidásica sobre o substrato SUC-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA (Fluorescência. h-1. 50 $\mu$ g-1) em extrato de vermes adultos submetidos ao estresse térmico (\* $P < 0.001$ ) e (\*\* $P > 0.05$ ). Abreviaturas: C-: Controle negativo (vermes adultos cultivados *in vitro* na presença de MG-132 60 $\mu$ M), C+: Controle positivo (vermes adultos congelados logo após a perfusão), Temperaturas (4°C, 25°C, 37°C, 42°C e 47°C).

#### 4.5.3. Detecção do proteassoma 20S em extrato bruto de vermes adultos submetidos a condições de estresse térmico

Proteínas provenientes de extratos brutos de vermes adultos submetidos a condições de estresse térmico foram transferidas do gel de poliacrilamida, após a corrida eletroforética para uma membrana de nitrocelulose e submetidas à *immunoblot* com anticorpo de camundongo anti-subunidades  $\alpha$  do proteassoma de humano (BIOMOL) para detecção de

proteassoma 20S. De acordo com a **Figura 25**, podemos observar um aumento nos níveis protéicos correspondente ao aumento da temperatura, exceto em 42°C e controle negativo tratado com MG-132 60µM.

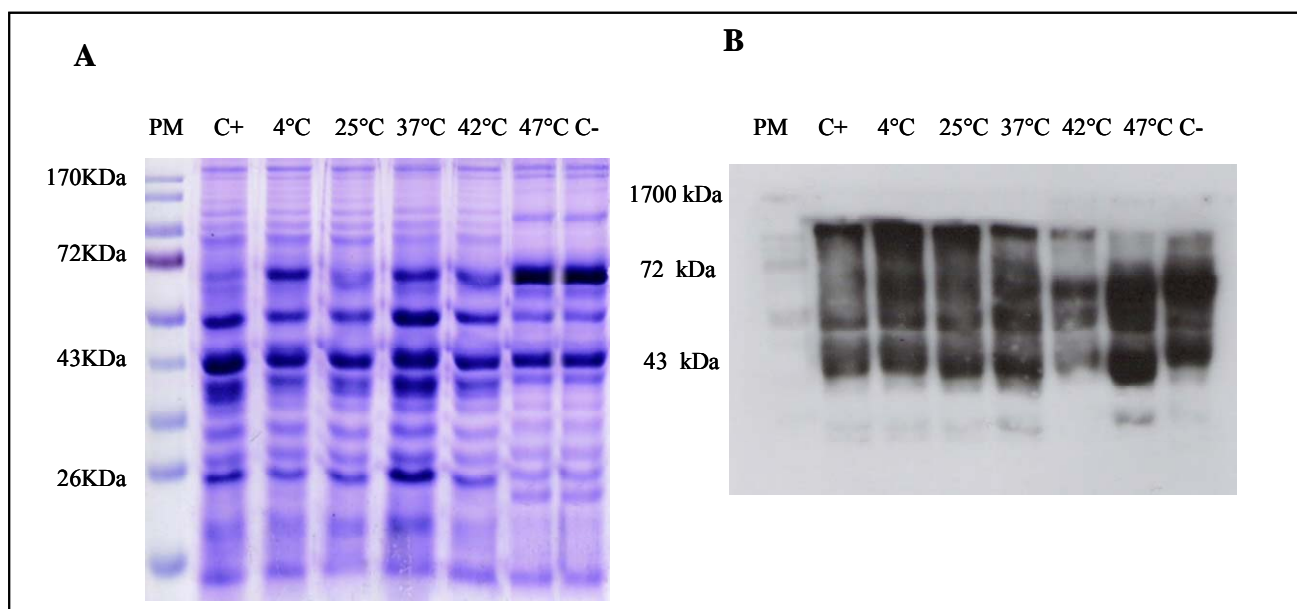


**Figura 25. Western blotting do proteassoma 20S em extrato bruto de vermes adultos submetidos a condições de estresse térmico. A.** Gel de poliacrilamida 12%, corado com *Comassie blue*, correspondente a 15µg de proteínas do extrato bruto de vermes adultos submetidos a condições de estresse térmico. **B** Detecção dos níveis protéicos do proteassoma 20S por *western blot* com o uso do anticorpo de camundongo anti-subunidades  $\alpha$  do proteassoma de humano e revelado conforme descrito em material e métodos. Abreviaturas: C+: controle positivo (vermes adultos congelados logo após a perfusão), Temperaturas nas quais os vermes adultos foram submetidos (4°C, 25°C, 37°C, 42°C, 47°C), C-: controle negativo (vermes adultos cultivados *in vitro* na presença de MG-132 60µM).

#### 4.5.4. Detecção de proteínas ubiquitinadas em extrato bruto de vermes adultos submetidos a condições de estresse térmico

Seguindo a mesma técnica do experimento anterior, as proteínas dos extratos brutos submetidos às condições de estresse térmico, depois de transferidas para a membrana de nitrocelulose foram submetidas à *immunoblot* com anticorpo primário para a detecção de proteínas poli-ubiquitinadas (BIOMOL). Conforme demonstrado pela **Figura 26**, podemos observar um aumento nos níveis de proteínas poli-ubiquitinadas proporcional ao aumento da

temperatura, exceto em 42°C. Podemos observar também um acúmulo de substratos poli-ubiquitinados no controle negativo, tratado com MG-132 60µM, o que já era esperado.

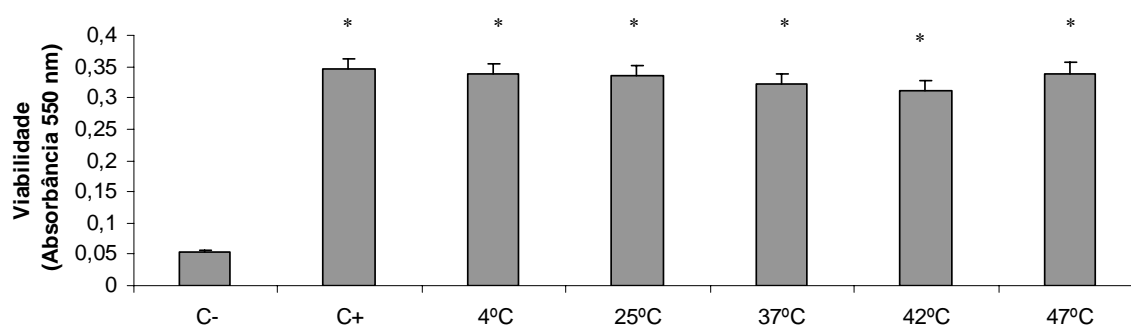


**Figura 26. Western blotting de proteínas ubiquitinadas em extrato bruto de vermes adultos submetidos a condições de estresse térmico. A.** Gel de poliacrilamida 12%, corado com *Comassie blue*, correspondente a 15µg de proteínas do extrato bruto de vermes adultos submetidos a condições de estresse térmico **B.** Detecção dos níveis de proteínas poli-ubiquitinadas por *western blot* com o uso do anticorpo primário de camundongo que reconhece proteínas poli-ubiquitinadas de humano e revelado conforme descrito em material e métodos. Abreviaturas: C+: controle positivo (vermes adultos congelados logo após a perfusão), Temperaturas nas quais os vermes adultos foram submetidos (4°C, 25°C, 37°C, 42°C, 47°C) C-: controle negativo (vermes adultos cultivados *in vitro* na presença de MG-132 60µM).

#### 4.5.5. Ensaio de viabilidade dos parasitos sob condições de estresse térmico

O ensaio de quantificação colorimétrica baseado no “3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide” (MTT) foi utilizado para verificar a viabilidade dos parasitos. Casais de vermes adultos foram submetidos às seguintes temperaturas: 4°C, 25°C, 37°C, 42°C e 47°C, por duas horas. Como controle negativo, foi verificada a viabilidade de parasitas mortos a 56° C por 30 minutos, e como controle positivo parasitas que não sofreram estresse térmico. A absorbância foi lida em 550 nm e DMSO foi usado como branco da reação.

Como pode ser observado na **Figura 27**, podemos notar que as condições de temperatura usadas não interferem na viabilidade dos parasitos, quando comparados com os controles negativo e positivo. As diferenças são estatisticamente significantes apenas entre o controle negativo e as temperaturas ( $*P<0.001$ ), o que não ocorre entre as temperaturas e entre o controle positivo ( $**P>0.05$ ). Estes valores se encontram no **Anexo 11** e são resultados de no mínimo três experimentos independentes.



**Figura 27. Ensaio de viabilidade em vermes adultos submetidos ao estresse térmico.** Viabilidade de vermes adultos pelo ensaio do MTT, sob efeito de estresse térmico em absorbância de 550 nm. ( $*P<0.001$ ). Abreviaturas: C-: Controle negativo (vermes adultos mortos a 56°C), C+: Controle positivo (vermes adultos que não sofreram estresse térmico), Temperaturas (4°C, 25°C, 37°C, 42°C e 47°C).

## **5. DISCUSSÃO**

Durante seu complexo ciclo de vida, o *S. mansoni* sofre inúmeras modificações estruturais e metabólicas, as quais devem ser altamente coordenadas visando a adaptação do parasito ao meio ambiente. Tais adaptações dependem de uma série de alterações na expressão gênica, permitindo dessa forma o controle de uma variedade de processos celulares (WILSON & LAWSON, 1980; EL-ANSARY, 2003; WU et al., 2006).

Estudos realizados em nosso laboratório, onde o sistema ubiquitina-proteassoma em *S. mansoni* foi caracterizado demonstraram sua importância durante o desenvolvimento deste parasito (GUERRA-SÁ et al., 2005). Dando continuidade a esta e outras investigações do papel desempenhado pelo complexo proteassoma no desenvolvimento do parasito, iniciamos estudos sobre a modelagem estrutural e funcional do proteassoma frente a diferentes agentes estressantes. Estes estudos foram iniciados pela análise da proteína de maturação do proteassoma, a qual constitui dentre outras proteínas um marcador molecular da montagem e desmontagem do proteassoma em outros sistemas biológicos.

A sequência da Proteína de Maturação do Proteassoma (SmPOMP), com número de acesso SM C706480.1, foi obtida a partir do banco de dados do projeto “Transcriptoma do *Schistosoma mansoni*” (VERJOVSKI-ALMEIDA et al., 2003). E com base nessa sequência foram idealizados os oligonucleotídeos iniciadores responsáveis pela amplificação do mRNA correspondente a esta proteína.

O fragmento obtido dessas amplificações foi clonado, seqüenciado e sua seqüência analisada em banco de dados, como descrito em material e métodos.

Através da análise de sua seqüência de aminoácidos podemos concluir que a proteína SmPOMP apresenta um único domínio (UMP1) que se inicia no 5º aminoácido e tem fim no 135º aminoácido, como pode ser observado na Figura 10. Ainda, em relação à seqüência de aminoácidos, e de acordo com a Figura 10, pode-se notar que este domínio é bem conservado entre diferentes organismos (ver figura 11).



A escolha desta proteína como marcador da montagem e desmontagem do proteassoma foi baseada em sua importante função em coordenar a ordem dos eventos de montagem do centro catalítico 20S (RAMOS et al., 1998; LI et al., 2007), bem como por participar de mecanismos compensatórios à inibição do proteassoma na tentativa do organismo em sintetizar mais complexos proteolíticos 20S, para suprir as necessidades celulares (MEINERS et al., 2003; NAUJOKAT et al., 2007).

Como mostra a figura 12, nossas análises revelaram que a expressão do gene SmPOMP seguiu um padrão diferencial durante as diferentes fases evolutivas de *S. mansoni*. Entretanto, em esquistossômulos cultivados *in vitro* por 3 h aparentemente, não houve expressão, o que provavelmente pode acontecer ao longo de seu desenvolvimento, já que em vermes adultos, tanto em machos, quanto em fêmeas SmPOMP está presente. Este é um fato que com certeza passaremos a investigar em nossos estudos posteriores.

Como visto em estudos anteriores, a POMP está presente apenas em complexos precursores e, é imediatamente degradada após a completa montagem da partícula 20S, então, podemos dizer que ela estará presente apenas quando houver a necessidade de sintetizar novos proteassomas. Baseando nestas considerações, podemos sugerir que a biossíntese de novos proteassomas pode estar ocorrendo na maioria das fases evolutivas de *S. mansoni*, porém em diferentes níveis, ou seja, de acordo com as necessidades celulares específicas (GRIFFIN et al., 2000; BURRI et al., 2000).

Dados na literatura descrevem a existência de sub-populações de proteassomas tanto durante um mesmo estágio de vida, provavelmente realizando funções tecido-específicas, quanto atuando em eventos de mudança de fase, onde provavelmente eles estariam participando na regulação de inúmeras vias de sinalizações responsáveis ao crescimento (CARDOZO et al., 1995; HAASS & KLOETZEL, 1989; HUTSON et al., 1997; YUAN et al., 1996).

Dentro desta linha de investigação, sabe-se que a contínua inibição do proteassoma, em células eucarióticas, pode desencadear mecanismos adaptativos que incluem o aumento na expressão de suas subunidades, aumento da atividade proteolítica, alterada montagem de seus subcomplexos bem como a expressão de um complexo protease oligomérico denominado tripeptidil peptidase II (TPP II), que parcialmente compensa uma prejudicada função do proteassoma (NAUJOKAT et al., 2007).

Estes fatos acima descritos foram comprovados por estudos onde foi demonstrada uma coordenada regulação de mRNAs correspondentes às subunidades do proteassoma 26S, um aumento na expressão protéica das subunidades  $\beta 1$ ,  $\alpha 6$  e Rpt2, bem como um aumento na expressão de POMP, refletindo na biogênese de novos proteassomas em células musculares de ratos, quando expostas por 6 e 8 hs aos inibidores MG-132 e lactacistina, que são alvos da atividade quimotripsina. Nesse mesmo trabalho também foi observado que o aumento na expressão das subunidades ( $\beta 1$ ,  $\alpha 6$  e Rpt2) foi dose-dependente, com uma maior expressão em 4hs, 6hs, e 12hs de exposição ao MG-132, sendo que em 24hs essa expressão começa a diminuir (MEINERS et al., 2003).

Os dados obtidos por Meiners e seus colaboradores vão de encontro aos nossos resultados apresentados na figura 13, que demonstram um aumento na expressão de SmPOMP nas amostras cultivadas na presença de MG-132, quando comparado às amostras controle cultivadas apenas na presença de DMSO. Também podemos notar que esse aumento da expressão é tempo dependente, onde a acentuada expressão pode ser observada em 2hs e 6hs de exposição ao inibidor e, a partir de 12hs ela começa a diminuir, sendo que em 24hs ela fica bem próxima ao controle tratado apenas com DMSO.

Essas modificações aparentemente, constituem um mecanismo de controle adaptativo que permite as células eucarióticas sobreviverem aos efeitos da inibição do proteassoma e estabelecerem um fenótipo hiperproliferativo e resistente a apoptose. Porém, pouco é

conhecido sobre como funcionam os mecanismos sensoriais que as células de eucariotos utilizam para regular os níveis de proteassoma frente a sua inibição (NAUJOKAT, et al., 2007). Em leveduras, entretanto, o aumento na expressão de subunidades proteassomais em resposta a inibição pode ser explicado pela atividade do fator de transcrição Rpn4, específico ao proteassoma, cujo ortólogo ainda não foi identificado em eucariotos superiores (MANNHAUPT et al., 1999; OWSIANIK et al., 2002). O fato das células de mamíferos responderem de maneira similar à inibição do proteassoma sugere que exista um ortólogo funcional da Rpn4, mas este ainda não foi descoberto.

Recentemente, foi demonstrado que o MG-132 induz uma disfunção mitocondrial e apoptose em oligodentrócitos, mas não em astrócitos, que pode estar relacionado ao fato de que os astrócitos têm alta capacidade em enfrentar o estresse oxidativo. Simultaneamente, a inibição proteassomal leva a um aumento nas HSPs. A rápida produção das mesmas após o estresse é um importante passo na prevenção da má formação e agregação protéica. Essas proteínas dão apoio à degradação protéica por marcar proteínas para o caminho ubiquitina-proteassoma, mas sua indução ou associação com corpos de inclusão pode ser observada em várias doenças neurodegenerativas, indicando que este sistema é defeituoso. O prejudicado funcionamento do proteassoma tem sido conectado a processos de envelhecimento e desordens neurodegenerativas. Então, o uso de inibidores do proteassoma pode nos fornecer valiosas ferramentas na descoberta dos mecanismos moleculares utilizados pelas células em condições de estresse, mas seu uso terapêutico como, por exemplo, no tratamento do câncer, necessita ser melhor avaliado (GOLDBAUM et al., 2006).

Ainda em relação ao papel de agentes químicos na montagem e desmontagem do proteassoma, investigamos a participação do IBMX. Como já descrito anteriormente, o IBMX é destacado por ser um potente inibidor da enzima fosfodiesterase e, como consequência desta

inibição há um aumento nos níveis celulares de AMPc, ativando desta forma, proteínas quinases reguladas por nucleotídeos cíclicos.

Para avaliar os efeitos que o IBMX poderia causar em vermes adultos de *S. mansoni*, casais foram cultivados *in vitro* sob diferentes concentrações dessa xantina. Esse cultivo nos permitiu observar algumas mudanças nas condições fisiológicas dos parasitos. A primeira mudança observada foi em relação ao aumento na motilidade dos parasitos, que aconteceu após 2hs da adição da xantina quando comparados aos grupos controles sem IBMX. Através das fotos que podem ser observadas na figura 14, esse nítido aumento na motilidade ocorreu de maneira dose-dependente.

Em mamíferos, um aumento na concentração de cálcio intracelular ( $Ca^{2+}$ ) é requerido para iniciar a contração muscular que acontece ou pela entrada de cálcio extracelular pelos canais iônicos na membrana plasmática ou pela liberação dos estoques de cálcio intracelular (HORIWITZ et al., 1996). O mecanismo de liberação de cálcio intracelular é controlado através de canais regulados pelo receptor ryanodine (RyR) localizados na membrana do retículo sarcoplasmático (FABIATO, 1983; HENZI & MACDERMOTT, 1992).

Em estudos realizados em *Fasciola hepática*, por GRAHAM e colaboradores em 1999, foi examinado o papel do cálcio extracelular, testando o efeito de bloqueadores conhecidos dos canais de  $Ca^{2+}$  de mamíferos. Também foi investigada a liberação de  $Ca^{2+}$  dos estoques internos sensíveis a ryanodine. O uso de cafeína demonstrou um efeito excitatório em músculos estriados de *Fasciola*, independente da ação dos estoques de cálcio. Porém, esse efeito parece ser dependente do aumento os níveis da AMPc pela inibição da enzima fosfodiesterase (WILLIAMS & JARVIS, 1988).

As enzimas responsáveis pela síntese de AMPc a partir de ATP (adenilato ciclase) e sua hidrólise a 5'-AMP (fosfodiesterase) já foram identificadas em *F. hepática* (MANSOUR

& MANSOUR, 1977; MANSOUR et al., 1960) e em *S. mansoni* (HIGASHI et al., 1973). A presença dessas enzimas sugere a existência de vias de sinalização mediadas pelo AMPc.

Em *Fasciola*, o AMPc potencializado por IBMX, *forskolin* e 8-BrAMPc mimetizou a ação excitatória da cafeína nos músculos estriados. Essas informações muito contribuíram sobre o conhecimento de um controle coordenado do movimento do parasito. Pois a motilidade é requerida na nutrição, reprodução e manutenção do verme no hospedeiro, sendo esse um ideal alvo de quimioterapias. Então, o entendimento dos mecanismos de contração acoplados à excitação é requerido para avaliar possíveis diferenças (como por exemplo, tipos de receptores e canais iônicos) entre parasito e hospedeiro, facilitando a manipulação de novos anti-helminhos (GRAHAM et al., 1999).

A comparação de *F. hepática* e *S. mansoni* é de grande interesse, pois ambos são trematódeos digenéticos. Trabalhos envolvendo a motilidade em *S. mansoni* sugerem que as contrações espontâneas sejam dependentes do cálcio extracelular (FETTERER et al., 1980; PAX et al., 1978; WOLDE MUSSIE et al., 1982). Esses estudos são consistentes com os dados obtidos em *Fasciola* e *B. cândida*, onde todos os três vermes se mostraram sensíveis aos bloqueadores dos canais de  $Ca^{2+}$  utilizados em mamíferos e suas contrações parecem depender da entrada de  $Ca^{2+}$  extracelular (via canais de cálcio) (KEENAN & KOPOWITZ, 1984).

Estudos realizados por MATSUYAMA e colaboradores em 2004, sugerem que os miracídios (formas larvais de *S. mansoni*) possuam osmoreceptores em sua superfície e que o AMPc é um segundo mensageiro de grande importância envolvido nesse sistema de transdução de sinais.

O estudo de nucleotídeos cíclicos é de grande interesse, já que são descritos envolvidos na transformação e desenvolvimento de vários parasitas helmintos (ZAVRAS & ROBERTS, 1985; KAWAMOTO et al., 1986, 1989; PROUDFOOT et al., 1993).

Um achado interessante neste trabalho foi em relação à ovoposição de casais de *S. mansoni* cultivados *in vitro* durante 7 dias. De acordo com a figura 15, podemos observar uma diferença estatisticamente significante entre parasitos tratados com diferentes concentrações de IBMX quando comparados ao controle. Podemos observar que a partir de 40  $\mu$ M de IBMX, começa a inibição da ovoposição a partir do segundo dia de cultivo, enquanto as outras concentrações utilizadas inibiram logo no primeiro dia. É de grande importância ressaltar que todos os parasitos estavam acasalados (Fig. 14) e viáveis (Fig. 21), durante todo o tempo de cultivo, sendo o primeiro relato da inibição da ovoposição sem a separação dos casais de parasitas e mantendo a sua viabilidade.

Diante desses resultados, perguntamos se esse efeito inibitório da ovoposição com IBMX seria definitivo ou poderia ser reversível. Para responder essa questão fizemos uma nova cultura, utilizando apenas as concentrações de 40 $\mu$ M e 80 $\mu$ M de IBMX, já que o efeito das outras concentrações na ovoposição foi semelhante. Os casais permaneceram sob o efeito da xantina por um período de 24hs, quando então, todo o meio de cultivo foi substituído (incluindo o meio do grupo controle) por um meio novo tamponado da mesma forma que o anterior, porém livre de IBMX. Os resultados apresentados na figura 16 mostram que a inibição da ovoposição, nos grupos tratados com IBMX, no primeiro e ainda no segundo dia, foi mais proeminente na concentração de 80  $\mu$ M. Entretanto, a partir do terceiro dia a ovoposição se normaliza entre os três grupos (controle sem IBMX, 40 $\mu$ M e 80 $\mu$ M), indicando uma provável reversibilidade da inibição da ovoposição com o IBMX.

É bem conhecido que a maioria das ações das catecolaminas no metabolismo de glicogênio e lipídeos em vários tecidos, incluindo o muscular, sejam exercidas através de  $\beta$ -adrenoceptores controlando o aumento no nível de AMPc intracelular e subsequente ativação de específicas proteínas quinases.

O sistema proteolítico dependente de ubiquitina e ATP pode também estar envolvido na ação das catecolaminas, o que é sugerido por estudos onde a hiperativação desse sistema que ocorre em músculos esqueléticos de ratos marcados por tumores, seja efetivamente reduzida por clenbuterol (seletivo  $\beta_2$ -agonista) (COSTELLI et al., 1995) e pentoxifilina (derivada de xantinas) (COMBARET et al., 1999).

Estudos realizados por NAVEGANTES e colaboradores em 2001, mostraram que a atividade proteolítica em músculos esqueléticos de ratos é marcadamente diminuída por DBAMPc (dibutiril-AMPc) e IBMX (isobutilmetilxantina), que ocorre devido a um aumento nos níveis intracelulares de AMPc. Nenhum efeito adicional na proteólise foi observado quando clenbuterol e DBAMPc ou IBMX foram incubados juntos, sugerindo que a ação inibitória do  $\beta_2$ -adrenoceptor na proteólise de músculos esqueléticos seja mediada por AMPc. Com base nesta hipótese, tem sido mostrado que a administração diária de pentoxifilina, derivada de xantinas, previne a atrofia muscular e contém o aumento da degradação protéica muscular em ratos marcados por sarcoma Yoshida (COMBARET et al., 1999). Esses resultados sugerem que as catecolaminas inibam a proteólise de músculos esqueléticos por ativar proteínas quinases dependentes de AMPc, que inativam por fosforilação sistemas proteolíticos musculares (NAVEGANTES et al., 2001).

Com a intenção de avaliar a modulação do proteassoma em *S. mansoni* sob efeito de IBMX, primeiramente foi realizada a estimativa da expressão de SmPOMP (proteína clássica participando na modelagem estrutural do proteassoma) utilizando cDNA, a partir do RNA de parasitos tratados com IBMX nas concentrações de 80 $\mu$ M e 200 $\mu$ M. Os resultados da figura 17 mostram um aumento da expressão de SmPOMP nos grupos tratados com IBMX (80 e 200 $\mu$ M) quando comparados ao controle. Esse aumento na expressão de SmPOMP poderia ser explicado pela diminuição nos níveis de subunidades  $\alpha$  do proteassoma (ver Figura 19),

---

indicando um provável mecanismo compensatório à inibição do proteassoma provocada por essa xantina, como observado na Figura 18.

Concomitante à diminuição nos níveis de proteassomas 20S ocorre um aumento nos níveis de proteínas poli-ubiquitinadas (ver figura 20). Uma possível explicação desses fatos seria a inibição da atividade do proteassoma provocada por IBMX (ver figura 18). Esses dados nos fornecem evidências de que esta xantina pode estar agindo tanto a nível transcricional (por exemplo, atuando na expressão de enzimas da via de ubiquitinação) quanto traducional, inibindo de alguma forma, a qual nós ainda não podemos comprovar a via ubiquitina-proteassoma.

Diante dos resultados obtidos com o IBMX, seria interessante ampliar a investigação da possível existência de uma via de sinalização mediada por AMPc nos eventos relacionados com a ovoposição, bem como com a participação direta ou indireta do sistema proteolítico ubiquitina-proteassoma em *S. mansoni*.

Em estudos realizados por LUO e colaboradores em 2000, foi testado o papel de diferentes vias de proteólise na degradação de proteínas de vida longa e de vida curta em culturas de miotúbulos dependente de temperatura. Eles observaram que quando as células foram cultivadas em diferentes temperaturas, de 37 a 41°C, a degradação de ambas as classes de proteínas aumentou, com um efeito mais pronunciado em 41°C e que com o uso de bloqueadores específicos da proteólise esta degradação foi independente de mecanismos lisossomais e mediados por cálcio, mas dependente de energia e proteassoma.

As mudanças na atividade do proteassoma 26S provocadas por hipertermia, podem envolver mecanismos moleculares ou re-composição de suas subunidades.

Estudos realizados por MORITA e colaboradores em 1996, utilizando miotúbulos C2C12, demonstraram que o aumento da proteólise sob efeito da hipertermia está associado



ao aumento da atividade do proteassoma 26S, mas esse efeito não foi associado ao aumento nos níveis de mRNA e proteínas correspondentes às subunidades do proteassoma.

Em *S. mansoni*, avaliamos a expressão de SmPOMP sob diferentes condições de temperatura, conforme demonstrado na figura 22, onde podemos observar uma expressão diferencial deste gene. A expressão de SmPOMP aumenta proporcionalmente ao aumento da temperatura, exceto em 42°C, alcançando um nível máximo de expressão a 37°C. Intrigados com esse resultado, decidimos avaliar a expressão em 40°C, 45°C e novamente em 42°C. Então de acordo com a Figura 23, podemos notar que em 42°C, realmente não há expressão de SmPOMP, bem como em 45°C e, em 40°C há uma expressão semelhante ao controle.

Com relação à atividade do proteassoma em condições de estresse térmico, podemos observar na figura 24, que a atividade basal do proteassoma nos extratos sem adição de ATP aumenta com o aumento da temperatura, sendo que o mesmo não ocorre quando ATP é adicionado. Este fato pode estar ocorrendo de forma semelhante aos estudos de Davies, nos quais proteassomas 20S purificados, de células de mamíferos, são capazes de degradar proteínas oxidadas na ausência de ATP e ubiquitina *in vitro*, enquanto proteassomas 26S purificados (com ou sem ATP/ubiquitina) exibem pouca habilidade em degradar proteínas modificadas oxidativamente (DAVIES, 2001).

Por outro lado, os níveis protéicos correspondentes às subunidades do proteassoma 20S parecem aumentar de forma dependente ao aumento da temperatura (ver figura 25), exceto em 42°C e no controle negativo tratado com MG-132 60µM, como já esperado. O mesmo perfil pode ser observado quanto às proteínas poli-ubiquitinadas (figura 26), contrário ao que acontece no caso do estresse químico provocado por IBMX, como já discutido anteriormente. De acordo com os dados obtidos, uma provável hipótese seria a de que o estresse térmico estaria atuando a nível transcricional, possivelmente ativando a transcrição de enzimas pertencentes ao sistema de ubiquitinação.

De acordo com estudos realizados por Fujimuro e colaboradores em 1997, o nível de proteínas citoplasmáticas poli-ubiquitinadas e histonas H2A ubiquitinadas de células HeLa aumenta e diminui, respectivamente em resposta ao estresse térmico. Esse acúmulo de proteínas poli-ubiquitinadas induzido pelo choque térmico é causado por uma ativação do sistema de ubiquitinação ao invés da inativação do proteassoma 26S, pois a atividade do último, mesmo na presença de ATP, parece inalterada após o choque térmico (FUJIMURO et al., 1997).

Ainda nos trabalhos de Fujimuro e colaboradores, o nível de proteínas poli-ubiquitinadas em células HeLa expostas à 42°C demonstrou uma quantidade limitada de proteínas poli-ubiquitinadas, diferente ao que foi observado em células expostas a 43°C, onde houve um forte acúmulo desses conjugados (FUJIMURO et al., 1997).

Vale ressaltar que a ubiquitina é uma proteína altamente conservada e amplamente distribuída entre os eucariotos (RECHSTEINER, 1988 & HOCHSTRASSER, 1996) e que seu gene possui um promotor de choque térmico que é expresso em células eucarióticas, por exemplo, em fibroblastos de galinha (BOND et al., 1985, 1988) e em leveduras (FINLEY et al., 1987 & TANAKA et al., 1988).

Em nossos resultados o ponto mais intrigante é a respeito da temperatura de 42°C, o qual vamos explorar em experimentos futuros, já que esse ponto se mostrou diferente dos demais.

Não podemos deixar de ressaltar também que em todas as condições de estresse térmico utilizadas em nosso trabalho, inclusive em 42°C, os parasitos estavam viáveis, conforme observado na Figura 27.

Embora diferentes estímulos sejam provavelmente responsáveis pela indução do complexo ubiquitina-proteassoma em diferentes estados catabólicos, há uma hipótese na qual, vias de sinalização intracelulares possam levar a uma ativação transcricional de subunidades

do proteassoma e outros componentes deste sistema. Evidências deste processo foram obtidas pela habilidade do EPA (ácido eicosapentaenóico) em atenuar a degradação protéica e o complexo ubiquitina-proteassoma durante períodos de jejum agudo em camundongos (WHITEHOUSE & TISDALE, 2001).

O exato mecanismo de indução desse complexo protéico em hipertermia ainda não foi esclarecido. Existem certas similaridades em outros casos de atrofia muscular, particularmente, no que diz respeito ao papel do fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B. Nesse sistema, a ligação nuclear de NF- $\kappa$ B em seqüências alvo no DNA, induzem o sistema ubiquitina-proteassoma e conseqüentemente a degradação protéica, que ainda podem ser induzidos por TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral  $\alpha$ ) (LI & REID, 2000) e PIF (fator indutor de proteólise) (WHITEHOUSE & TISDALE, 2003), bem como por espécies reativas de oxigênio (LI et al., 1998).

Podemos observar a partir do que foi discutido anteriormente que, o aumento na proteólise dependente de temperatura pode ser controlado por diferentes mecanismos regulatórios, mas o mecanismo bioquímico da ativação do proteassoma 26S mediante a hipertermia, ainda não foi esclarecido. Existem, entretanto, alguns fatores que podem contribuir para a ativação do proteassoma 26S como, por exemplo, atividade de proteínas quinases (SATOH et al., 1995), concentração intracelular de cálcio (KAWAHARA & YOKOSAWA, 1995) e fatores relacionados a proteínas em geral (DEMARTINO et al., 1996), porém as mudanças provocadas por esses fatores devem ser melhor investigadas.

Um possível envolvimento do AMPc em resposta à hipertermia foi considerado em vários estudos, já que o aumento de seus níveis é uma das mais rápidas mudanças que ocorre em células expostas a elevadas temperaturas (CALDERWOOD et al., 1985; KIANG et al., 1991; LIN et al., 1978). Estudos têm mostrado que drogas que são conhecidas por aumentar o nível de AMPc causam uma termosensibilização, enquanto a inibição da proteína quinase

dependente de AMPc causa uma termoproteção e previne a termosensibilização mediada por AMPc (RIJN & BERG, 1996).

A resposta ao estresse térmico ou choque térmico é um fenômeno universal e as proteínas de choque térmico (HSPs) representam importante função de defesa a nível celular (FEDER & HOFMANN 1999; SREEDHAR & CSERMELY, 2004; KATSCHINSKI, 2004). A síntese das HSPs é altamente regulada por fatores de transcrição de choque térmico (HSFs) a nível transcricional (MORIMOTO, 1998). Os efeitos citoprotetores das HSPs foram primeiramente atribuídos a sua atividade chaperona, que minimizam a proteotoxicidade induzida pela acumulação de proteínas desnaturadas e mal formadas após o estresse (KATSCHINSKI, 2004). Os HSFs têm importante função na manutenção da homeostase celular, incluindo a regulação do ciclo celular, proliferação celular e mecanismos de morte celular (PIRKKALA et al., 2001; KATSCHINSKI, 2004; SREEDHAR & CSERMELY, 2004; SREEDHAR et al., 2006).

## **6. CONCLUSÕES**

- Os resultados obtidos nos levam a acreditar que o diferente padrão de transcrição do gene SmPOMP, possa estar relacionado com a formação, regulação e disponibilidade espaço-temporal de diferentes sub-populações de proteassomas, sugerindo um mecanismo auxiliar na regulação da proteólise durante o desenvolvimento de *S. mansoni*.
  
- O aumento observado na expressão de SmPOMP em vermes adultos cultivados *in vitro* na presença de MG-132 sugere sua importância em mecanismos compensatórios à inibição do proteassoma, no intuito de sintetizar mais complexos proteolíticos 20S, para suprir as necessidades celulares.
  
- Foi observado que o IBMX, conhecido inibidor de vias de sinalização mediadas pelo AMPc, atuou de forma a inibir a ovoposição de parasitos cultivados *in vitro*, e seu efeito foi demonstrado ser reversível.
  
- O aumento na expressão de SmPOMP em vermes adultos cultivados *in vitro* na presença de IBMX, simultaneamente à diminuição da atividade exógena do proteassoma, similar à quimiotripsina, sob a mesma condição de estresse demonstram novamente um mecanismo compensatório a uma possível inibição do proteassoma.
  
- O uso do IBMX como indutor de estresse químico revelou a existência de uma possível via de sinalização mediada pelo AMPc na manutenção da ovoposição *in vitro* do parasito, podendo envolver direta ou indiretamente a participação do proteassoma neste evento biológico.

- De acordo com nossos resultados, também podemos observar que concomitante à diminuição nos níveis de proteassomas 20S ocorre um aumento nos níveis de proteínas poli-ubiquitinadas nos extratos tratados com IBMX, sugerindo novamente, uma possível inibição da atividade do proteassoma provocada por essa xantina.
  
- As condições de estresse térmico, utilizadas no decorrer do trabalho, provocaram uma expressão diferencial de SmPOMP e simultâneo aumento na atividade exógena do proteassoma, similar à quimiotripsina, quando comparados ao controle negativo, tratado com MG-132.
  
- Ainda em relação ao estresse térmico, podemos constatar que os níveis protéicos correspondentes às subunidades do proteassoma 20S parecem aumentar de forma dependente ao aumento da temperatura, exceto em 42°C e no controle negativo tratado com MG-132. E, quanto às proteínas poli-ubiquitinadas o mesmo perfil pode ser observado, sugerindo, desta forma, um controle a nível transcricional, possivelmente ativando a transcrição de enzimas pertencentes ao sistema de ubiquitinação.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



AMARAL, R.S. PORTO, M.A.S. Evolução e situação atual da esquistossomose no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*, v.7, Suppl.III, p.83-90,1994.

ARAÚJO, J.D. A pesquisa em esquistossomose no Brasil. In Modernos Conhecimentos sobre Esquistossomose Mansônica. *Biblioteca da Academia Mineira de Medicina*, v.14, p. 9-18, 1986.

ARENDET, C.S.; HOCHSTRASSER, M. Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.94, p. 7156-7161, 1997.

BAHIA, D.; ANDRADE, L.F.; LUDOLF, F.; MORTARA, R.A.; OLIVEIRA, G. Protein tyrosine kinases in *Schistosoma mansoni*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.101, p. 137-143, 2006).

BAJOREK, M.; FINLEY, D.; GLICKMAN, M.H. Proteasome disassembly and downregulation is correlated with viability during stationary phase. *Curr.Biol*, v.13, p. 1140-44, 2003.

BARACCOS, V.E.; WILSON, E.J.; GOLDBERG, A.L. Effects of temperatura on protein turnover in isolated rat skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, v. 246, p. 125-130, 1984.

BAUMEISTER, W.; WALZ, J.; ZUHL, F.; SEEMQLLER, E. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease, *Cell*, v.92, p. 367-380, 1998.

BOCHTLER, M.; DITZEL, L.; GROLL, M.; HUBER, R. The proteasome. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, v.28, p. 295-317, 1999.

BOND, U.; AGELL, N.; HAAS, A.L.; REDMAN, K.; SCHLESINGER, M.J. Ubiquitin in stressed chicken embryo fibroblasts. *J. Biol. Chem*, v. 263, p. 2384-2388, 1988.

BOND, U.; SCHLESINGER, M.J. Ubiquitin is a heat shock protein in chicken embryo fibroblasts. *Mol. Cell.Biol*, v. 5, p. 949-956, 1985.

BRANNIGAN, J.A.; DODSON, G.; DUGGLEBY, H.J.; MOODY, P.C.; SMITH, J.L.; TOMCHICK, D.R.; MURZIN, A.G. A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. *Nature*, v. 7, p. 644, 1995.

BRAUN, B.C.; GLICKMAN, M.; KRAFT, R.; DAHLMANN, B.; KLOETZEL, P.M.; FINLEY, D. The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat. Cell Biol*, v.1, p. 221-226, 1999.

BRINDLEY, P.J. The molecular biology of schistosomes. *Trends in Parasitology*, v. 21, n. 11, p. 533-536, 2005.

BURRI, L.; HOCKENDORFF, J.; BOEHM, U.; KLAMP, T.; DOHMEN, J.R.; LÉVY, F. Identification and characterization of a mammalian protein interacting with 20S proteasome precursors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 97, p.10348-10353, 2000.

CALDERWOOD, S.K.; STEVENSON, M.A.; HAHN, G.M. Cyclic AMP and heat shock response in Chinese hamster ovary cells. *Biochem. Biophys Res Comm*, v. 126, p. 911-916; 1985.

CARDOZO, C.; ELEUTERI, A.M.; ORLOWSKY, M. Differences in catalytic activities and subunit pattern of multicatalytic proteinase complexes (proteasomes) isolated from bovine pituitary, lung, and liver. Changes in LMP7 and the component necessary for expression of the chymotrypsin-like activity. *Journal of Biological Chemistry*, v. 270, p. 22645-22651, 1995.

CARRARD, G.; DIEU, M.; RAES, M.; TOUSSAINT, O.; FRIGUET, B. Ubiquitin of agein on proteasome structure and function in human lymphocytes. *Int.J.Biochem. Cell. Biol*, v. 35, p.728-739, 2003

CHEETHAM, G.M.T. Novel protein kinases and and molecular mechanisms of Autoinhibition. *Science*, v. 14, p.700-705, 2004.

CHEN, P.; HOCHSTRASSER, M. Autocatalytic subunit processing couples active site formation in the 20S proteasome to completion of assembly, *Cell*, v. 86, p. 961-972, 1996.

CHEN, Q.; DING, Q.; THORPE, J.; DOHMEN, R.J.; KELLER, J.N. RNA interference toward UMP1 induces proteasome inhibition in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for protein oxidation and autophagic cell death. *Free Radic.Biol.Med.* Jan 15, v. 38, n.2, p. 226-34, 2005.

CIECHANOVER, A.; SCHWARTZ, A.L. The ubiquitin-proteasome pathway: the complexity and myriad functions of proteins death. *Proc.Natl Acad Sci USA*, v. 95, n.6, p. 2727-30, 1998.

COMBARET, L.; RALLIÈRE, C.; TAILLANDIER, D.; TANAKA, K.; ATTAIX, D. Manipulation of the ubiquitin-proteasome pathway in cachexia: pentoxifylline suppresses the activation of 20S and 26S proteasomes in muscles from tumor-bearing rats. *Mol Biol Rep*, v. 26, p. 95-101, 1999.

CORELLA, D.; GUILLÉN, M.; HERNANDEZ, J.M.; HERNANDEZ, Y.J. Effects of polyamine levels on the degradation of short-lived and long-lived proteins in cultured L-132 human lung cells. *Biochem J*, v. 334, p. 367-375, 1998.

COSTA-CRUZ, J.M.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; FERREIRA, A.W.; CAMARGO, M.E.; BRITO, T.; SILVA, L.C. *Schistosoma mansoni* circulating polysaccharide and protein antigens recognized by sheep antisera in patients with different clinical forms of schistosomiasis before and after treatment. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 36, n. 4, p. 321-325, 1994.

COSTELLI, P.; GARCIA-MARTINEZ, C.; LLOVERA, M.; CARBÓ, N.; LÓPEZ-SORIANO, F.J.; AGELL, N.; TESSITORE, L.; BACCINO, F.M.; ARGILÉS, J.M. Muscle protein waste in tumor-bearing is effectively antagonized by  $\beta_2$ -adrenergic agonist (clenbuterol). Role of the ATP-Ubiquitin dependent proteolytic pathway. *J Clin Invest*, v. 95, p. 2367-2372, 1995.

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

COUX, O.; TANAKA, K.; GOLDBERG, A.L. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem*, v. 65, p. 801-847, 1996.

DAVIES, K.J.A. Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie*, v.83, p.301-310, 2001.

DE DIEGO, J.L.; KATZ, J.M.; MARSHALL, P.; GUTIERREZ, B.; MANNING, J.E.; NUSSENZWEIG, V.; GONZALEZ, J. The ubiquitin-proteasome pathway plays an essential role in proteolysis during *Trypanosoma cruzi* remodeling. *Biochemistry*, v. 40, p. 1053-1062, 2001.

DEMARTINO, G. N.; GILLETTE, T. G. Proteasome: Machines for All Reasons. *Cell*, v.18, p. 659-62, 2007.

DEMARTINO, G.N.; PROSKE, R.J.; MOOMAW, C.R.; STRONG, A.A.; SONG, X.; HISAMATSU, H.; TANAKA, K.; SLAUGHTER, C.A. Identification, purification, and characterization of a PA700-dependent activator of the proteasome. *J Biol Chem*, v. 271, p. 3112-3118, 1996.

DEVERAUX, Q.; USTRELL, C.; PICKART, C.; RECHSTEINER, M. A 26S protease subunit tha binds ubiquitin conjugates. *J Biol Chem*, v. 269, p. 7059-7061, 1994.

DEVERAUX, Q.;USTRELL, C.;PICKART, C.;RECHSTEINER, M. A 26S protease subunit tha binds ubiquitin conjugates. *J Biol Chem*, v. 269, p. 7059-7061, 1994.

DIAS-NETO, E. Shotgun sequencing of the human transcriptome with ORF expressed sequence tags. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 97, p. 3491-3496, 2000.

DUNNE, D. W.; HAGAN, P.; ABATH, F. G. C. Prospects for immunological control of schistosomiasis. *The Lancet*, v. 345, p. 1488-92, 1995.

DUPRE, S.; URBAN-GRIMAL, D.; HAGUENAUER-TSAPIS, R. Ubiquitin and endocytic internalization in yeast and animal cells. *Biochim Biophys Acta*, v. 1695, n.1-3, p. 89-111, 2004.

ENGELS, D.; NAHIMANA, S.; GRYSEELS, B. Comparasion of the direct faecal smear and two thick smear techniques for the diagnosis of intestinal parasitic infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 90, p. 523-25, 1996.

ESSER, C.; ALBERTI, S.; HOHFELD, J. (Coorporation of molecular chaperones with the ubiquitin-proteasome system. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1695, p.171-188, 2004.

FABIATO, A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol*, v. 245, p. 1-14, 1983.

FANG, S.; WEISSMAN, A.M. A field guide to ubiquitylation. *Cell Mol Life Sci*, v.61, p. 1546-1561, 2004.

FEDER, M.F.; HOFMANN, G.E. Heat shock proteins, molecular chaperones and the stress response. Evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol*, v. 61, p. 243-282, 1999.

FEHLKER, M.; WENDLER, P.; LEHMANN, A.; ENENKEL, C. Blm3 is part of nascent proteasomes and is involved in a late stage of nuclear proteasome assembly. *EMBO Rep*, v.4, p. 959-963, 2003.

FEHRENBACH, E.; NORTHOFF, H. Free radicals, exercise, apoptosis, and heat shock proteins. *Exerc Immunol. Rev*, v. 7, p. 66-89, 2001.

FETTERER, R.H.; PAX, R.A.; BENNETT, J.L. Praziquantel, potassium and 2,4-dinitrophenol: analysis of their action on the musculature of *Schistosoma mansoni*. *Eur J Pharmacol*, v.64, p. 31-38, 1980.

FINLEY, D.; ÖZKAYNAK, E.; VARSHAVSKY, A. The yeast poly-ubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and other stresses. *Cell*, v. 48, p. 1035-1046, 1987.

FRANCO, G.R.; ADAMS, M.D.; BENTO SOARES, M.; SIMPSON, A.J.G.; VENTER, J.C.; PENA, S.D.J. Identification of new *Schistosoma mansoni* genes by EST strategy using a directional cDNA library. *Gene*, v. 152, p. 141-147, 1995.

FRENTZEL, S.; PESOLD-HURT, B.; SEELING, A.; KLOETZEL, P.M. 20S proteasomes are assembled via distinct precursor complexes. Processing of LMP2 and LMP7 proproteins takes place in S preproteasome complex. *J.Mol. Biol.*, v. 236, p. 975-81, 1994.

FUJIMURO, M.; SAWADA, H.; YOKOSAWA, H. Dynamics of ubiquitin conjugation during heat-shock response revealed by using a monoclonal antibody specific to multi-ubiquitin chains. *Eur. J. Biochem.*, v. 249, p. 427-433, 1997.

GABAI, V.L.; SHERMAN, M.Y. Inited review: Interplay between molecular chaperones and signaling pathways in survival of heat shock. *J Appl Physiol*, v. 92, p. 1743-1748, 2002.

GACZYNSKA, M.; OSMULSKI, P.A. Small-molecule inhibitors of proteasome activity. *Methods Mol. Biol.*, v. 301, p. 3-22, 2005.

GANTT, S.M.; MYUNG, J.M.; BRIONES, M.R.; LI, W.D.; COREY, E.J.; OMURA, S.; NUSSENZWEIG, V.; SINNIS, P. Proteasome inhibitors block development of *Plasmodium* *ssp.* *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 42, p. 2731-2738, 1998.

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

GLICKMAN, M.H.; RAVEH, D. Proteasome plasticity. *FEBS Letters*, v. 579, p. 3214-3223, 2005.

GLICKMAN, M.H.; RUBIN, D.M.; LARSEN, C.N.; SCHMIDT, N.; FINLEY, D. The regulatory particle of the yeast proteasome *In: Bioscience USA*, p. 71-90, 2000.

GOLDBAUM, O.; VOLLMER, G.; LANDSBERG, C.R. Proteasome inhibition by MG-132 induces apoptotic cell death and mitochondrial dysfunction in cultured rat brain oligodendrocytes but not in astrocytes. *GLIA*, v. 53, p. 891-901, 2006.

GOLDBERG, A.L.; ROCK, K. Not just research tools - proteasome inhibitors offer therapeutic promise. *Nature*, v. 8, p. 338-340, 2002.

GOLL, D.E.; THOMPSON, V.F.; LI, H.; WEI, W.; CONG, J. The calpain system. *Physiol Rev*, v. 83, p. 731-801, 2003.

GONZALEZ, E. Schistosomiasis, cercarial dermatitis, and marine dermatitis. *Dermatol Clin*, v. 7, n.2, p. 291-300, 1989.

GORBEA, G.; RECHSTEINER, M. The mammalian regulatory complex of the 26S proteasome, *Bioscience*, p. 91-128, 2000.

GRAHAM, M.K.; MCGEOWN, J.G.; FAIRWEATHER, I. Ionic mechanisms underlying spontaneous muscle contractions in liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Ajpregu Physiol*, p. 374-383, 1999.

GRIFFIN, T.A.; SLACK, J.P.; MCCLUSKEY, T.S.; MONACO, J.J.; COLBERT, R.A. Identification of proteasemlin, a mammalian homologue of the yeast protein, Ump1p, that is required for normal proteasome assembly. *Mol. Cell Biol. Res. Commun*, v. 3, p. 212-217, 2000.

GROETTURP, M.; KRAFT, R.; KOSTKA, S.; STANDERA, S.; STOHWASSER, R.; KLOETZEL, P.M. A third interferon-gamma-induced subunit exchange in the 20S proteasome. *Eur J Immunol*, v. 26, p. 863-869, 1996.

GROLL, M.; DITZEL, L.; LÖWE, J.; STOCK, D.; BOCHTLER, M.; BARTUNIK, H.D.; HUBER, R. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution *Nature*, v. 386, p. 463-471, 1997.

GROLL, M.; HEINEMEYER, W.; JAGER, S.; ULLRICH, T.; BOCHTLER, M.; WOLF, D.H.; HUBER, R. The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: a mutational and crystallographic study. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, v. 96, p. 10976-10983, 1999.

GROLL, M.; HUBER, R. Inhibitors of the eukaryotic 20S proteasome core particle: a structural approach. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1695, p. 33-44, 2004.

GRONOSTAJSKI, R.M.; PARDEE, A.B.; GOLDBERG, A.L. The ATP dependence of the degradation of short- and long-lived proteins in growing fibroblasts. *J Biol Chem*, v. 206, p. 3344-3349, 1985.

GROPPER, R.; BRANDT, R.A.; ELIAS, S.; BEARER, C.F.; MAYER, A.; SCHWARTZ, A.L.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin-activating enzyme, E1, is required for stress-induced lysosomal degradation of cellular proteins. *J Biol Chem*, v. 266, p. 3602-3610, 1991.

GRYSEELS, B.; NKULIKYNKA, L. The distribution of *Schistosoma mansoni* in the Rusizi plain (Burundi). *Ann Trop Med Parasitol*, v. 82, p. 581-90, 1988.

GRYSEELS, B.; POLMAN, K.; CLERINX, J.; KESTENS, L. Human schistosomiasis. *Lancet*, v. 368, p. 1106-18, 2006.

GROPPER, R.; BRANDT, R.A.; ELIAS, S.; BEARER, C.F.; MAYER, A.; SCHWARTZ, A.L.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin-activating enzyme, E1, is required for stress-induced lysosomal degradation of cellular proteins. *J Biol Chem*, v. 266, p. 3602-3610, 1991.

GROETTRUP, M.; KHAN, S.; SCHWARZ, K.; SCHMIDTKE, G. Interferon-gamma inducible exchanges of 20S proteasome active site subunits: why? *Biochimie*, v. 83, n.3-4, p. 367-72, 2001.

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, n.4, p. 228-236, 2005.

HAASS, C.; KLOETZEL, P.M. The *Drosophila* proteasome undergoes changes in its subunit pattern during development. *Experimental Cell Research*, v. 180, p. 243-252, 1989.

HALL-ANGERAS, M.; ANGERAS, U.; HASSELGREN, P.O.; FISHER, J.E. Effects of elevated temperature on protein breakdown in muscle from septic rats. *Am J Cell Physiol*, v. 258, p. 589-592, 1990.



HANAHAH, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, v. 166, n. 4, p. 557-580, 1983.

HANKS, S.K.; QUINN, A.M.; HUNTER, T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, v. 241, p. 42-52, 1988.

HANNA, J.; MEIDES, A.; ZHANG, D.P.; FINLEY, D. A Ubiquitin Stress Response Induces Altered Proteasome Composition. *Cell*, v. 129, p. 747-759, 2007.

HEINK, S.; LUDWIG, D.; KLOETZEL, P.M.; KRUGER, E. IFN-gamma-induced immune adaptation of the proteasome system is an accelerated and transient response. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, v. 102, p. 9241-9246, 2005.

HENLE, K.J.; DETHLEFSEN, L.A. Heat fractionation and thermotolerance: a review. *Cancer Res*, v.38, p. 1843-1851; 1978.

HENZI, V.; MACDERMOTT, A.B. Characteristics and function of  $Ca^{2+}$  and inositol 1,4,5-triphosphate-releasable stores of  $Ca^{2+}$  in neurons. *Neuroscience*, v. 46, p. 251-273, 1992.

HERSHKO, A.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem*, v. 67, p. 425-479, 1998.

HIGASHI, G.I.; KREINER, P.W.; KEIRNS, J.J.; BITENSKY, M.W. Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in *Schistosoma mansoni*. *Life Sci*, v. 13, p. 1211-1220, 1973.

HILL, C.P.; MASTERS, E.I.; WHITBY, F.G. The 11S regulators of 20S proteasome activity, *Curr. Top. Microbiol. Immunol*, v. 268, p. 73-89, 2002.

HILLIER, L.D.; LENNON, G.; BECKER, M. Generation and analysis of 280.000 human expressed sequence tags. *Genome Res*, v. 6, p. 807-828, 1996.

HIRANO, Y.; HENDIL, K.B.; YASHIRODA, H.; IEMURA, S.; NAGANE, R.; HIOKI, Y.; NATSUME, T.; TANAKA, K.; MURATA, S. A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Nature*, v. 437, p. 1381-1385, 2005.

HOCHSTRASSER, M. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu. Rev. Genet*, v. 30, p. 405-439, 1996.

HOFFMANN, W.A.; PONS, J.A.; JANER, J.L. The sedimentation concentration method in schistosomiasis mansoni. *The Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine*, v. 9, p. 283-291, 1934.

HOROWITZ, A.; MENICE, C.B.; LAPORTE, R.; MORGAN, K.G. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev*, v. 76, p. 967-1003, 1996.

HUTSON, M.R.; RHODES, M.R.; KIRBY, M.L. Differential expression of a proteasomal subunit during chick development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 234 p. 216-223, 1997.

IMAI, J.; MARUYA, M.; YASHIRODA, H.; YAHARA, I.; TANAKA, K. The molecular chaperone Hsp90 plays a role in the assembly and maintenance of the 26S proteasome. *EMBO J*, v. 22, p. 3557-3567, 2003.

JONHSTON, D.A.J. The WHO/UDP/World Bank Schistosoma mansoni Initiative: *Current Status*. *Parasitol. Today*, v. 13, p. 45-46, 1997.

KAPP, K.; COUSTAU, C.; WIPPERSTEG, V.; JOURDANE, J.; KUNS, W.; GREVELDING, C.G. Transplantation of in vitro-generated *Schistosoma mansoni* mother sporocysts into *Biomphalaria glabrata*. *Parasitol Res*, v. 91, n.6, p. 482-485, 2003.

KATSCHINSKI, D.M. On heat and cells and proteins. *News Physiol Sci*, v. 19, p. 11-15, 2004.

KATZ, N. Esquistossomose. In. CIMERMAN, S.; CIMERMAN, B. *Medicina Tropical*. São Paulo: Atheneu, p. 175-183, 2003.

KAWAHARA, K.; YOKOSAWA, H. *Dev Biol*, v. 166, p. 623-633, 1994.

KEENAN, L.; KOOPOWITZ, H. Ionic basis of action potentials in identified flatworm neurons. *J Comp Physiol*, v. 155, p. 197-208, 1984.

KIANG, J.G.; WU, Y.Y.; LIN, M.C. Heart treatment induces an increase in intracellular cyclic AMP content in human epidermoid A-431 cells. *Biochem. J*, v. 276, p. 683-689; 1991.

KISSELEV, A.F.; GOLDBERG, A.L. Proteasome inhibitors: From research tools to drug candidates. *Chem. Biol*, v. 8, p. 739-758, 2001.

KLOETZEL, P.M. The proteasome and MHC class I antigen processing. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1695, n. 1-3, p. 225-233, 2004.

KREGEL, K.C. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol*, v. 92, p. 2177-2186, 2002.

KRÜGER, E.; KLOETZEL, P.M.; ENENKEL, C. 20S proteasome biogenesis. *Biochimie*, v. 83, p. 289-93, 2001.

KRUGER, E.; KUCKELKORN, U.; SIJTS, A.; KLOETZEL, P.M. The components of the proteasome system and their role in MHC class I antigen processing. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol*, v. 148, p. 81-104, 2003.

LANDRY, J.; BERNIER, D.; CHRÉTIEN, P.; NICOLE, L.M.; TANGUAY, R.M.; MARCEAU, N. Synthesis and degradation of heat shock proteins during development and decay of thermotolerance. *Cancer Res*, v. 42, p. 2457-2461; 1982.

LECKER, S.H.; GOLDBERG, A.L.; MITCH, W.E. Protein Degradation by the Ubiquitin-Proteasome Pathway in Normal and Disease States. *J. Am. Soc. Nephrol*, v. 17, p. 1807-1819, 2006.

LECKER, S.H.; SOLOMON, V.; MITCH, A.L.; GOLDBERG, A.L. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Nutr*, v. 129, p. S227-S237, 1999.

LEE, K.W.; SHALABY, K.A.; MEDHAT, A.M.; SHI, H.; YANG, Q.; KARIM, A.M.; LOVERDE, P.T. *Schistosoma mansoni*: characterization of the gene encoding Sm23, an integral membrane protein. *Exp Parasitol*, v. 80, n.1, p. 155-8, 1995.

LI, C.Y.; LEE, J.S.; KO, Y.G.; KIM, J.I.; SEO, J.S. Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *J Biol Chem*, v. 275, n.32, p. 25665-25671, 2000.

LIN, P.S.; KWOCK, L.; HEFTER, K.; WALLACH, D.F.H. Modification of rat thymocyte membrane properties by hyperthermia and ionizing radiation. *Int J Radiat Biol*, v. 33, p. 371-382; 1978.

LI, Y.P.; REID, M.B. NF- $\kappa$ B mediates the protein loss induced by TNF- $\alpha$  in differentiated skeletal muscle myotubes. *Am J Physiol*, v. 279, p. 1165-1170, 2000.

LI, Y.P.; SCHWARTZ, R.J.; WADDELL, I.D.; HOLLOWAY, B.R.; REID, M.B. Skeletal muscle myotubes undergo protein loss and reactive oxygen-mediated NF- $\kappa$ B activation in response to tumor necrosis factor- $\alpha$ . *FASEB J*, v. 12, p. 871-880, 1998.

LUO, G.J.; SUN, X.; HASSELGREN, P.O. Hyperthermia stimulates energy-proteasome-dependent protein degradation in cultured myotubes. *Am J Physiol*, v. 278, p.R749-R756, 2000.

MACHIDA, K.; MAYER, B.J.; NOLLAU, P. Profiling the global tyrosine phosphorylation state. *Mol Cell Proteomics*, v. 2, p. 215-233, 2003.

MADURA, K. Rad23 and Rpn10: perennial wallflowers join the melee. *Trends Biochem.Sci*, v. 29, p. 637-640, 2004.

MAGNUSSEN, P. Treatment and re-treatment strategies for schistosomiasis control in different epidemiological settings: a review of 10 years' experiences. *Acta Trop. May*, v. 86, n. 2-3, p. 243-54, 2003.

MAKIOKA, A.; KUMAGAI, M.; OHTOMO, H.; KOBAYASHI, S.; TAKEUCHI, T. Effect of proteasome inhibitors on the growth, encystation, and excystation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. *Parasitology Research*, v. 88, p. 454-459, 2002.

MANGER, I.D.; HEHL, A.; PARMLEY, S.; SIBLEY, L.D.; MARRA, M.; HILLIER, L.; WATERSON, R.; BOOTHROYD, J.C. Expressed sequence tag analysis of the bradyzoite stage of *Toxoplasma gondii*: identification of developmentally regulated genes. *Infect Immun. Apr*, v. 66, n.4, p. 1632-7, 1998.

MANNHAUPT, G.; SCHNALL, R.; KARPOV, V.; VETTER, I.; FELDMANN, H. Rpn4 acts as a transcription factor by binding to PACE, a nonamer box found upstream of 26S proteasomal and other genes in yeast. *FEBS Lett*, v. 450, p. 27-34, 1999.

MANSOUR, T.E.; MANSOUR, J.M. Phosphodiesterase in the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Biochem Pharmacol*, v. 26, p. 2325-2330, 1977.

MANSOUR, T.E.; SUTHERLAND, E.W.; RALL, T.W.; BUEDING, E. The effect of serotonin (5-hydroxytryptamina) on the formation of adenosine 3',5'-phosphate by tissue particles from the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *J Biol Chem*, v. 235, p. 466-470, 1960.

MATSUYAMA, H.; TAKAHASHI, H.; WATANABE, K.; FUJIMAKI, Y.; AOKI, Y. The involvement of cyclic adenosine monophosphate in the control of Schistosoma miracidium cilia. *J Parasitol*, v. 90, p. 8-14, 2004.

MCKNIGHT, G.S. Cyclic aMP second messenger systems. *Curr. Opin. Cell Biol*, v. 3, p. 213-217, 1991.

MEINERS, S.; HEYKEN, D.; WELLER, A.; LUDWIG, A.; STANGL, K.; KLOETZEL, P.M.; KRÜGER, E. Inhibition of proteasome activity induces concerted expression of proteasome genes and de novo formation of Mammalian proteasomes. *J.Biol.Chem*, v. 278, p. 21517-21525, 2003.

MELO, A.L.; COELHO, P.M.Z. *Schistosoma mansoni* e a Doença. In. NEVES, D.P. *Parasitologia Humana*. 11 ed, São Paulo: Atheneu, p. 193-212, 2005.

MILLER, J.; GORDON, C. The regulation of proteasome degradation by multi-ubiquitin chain binding proteins. *FEBS Letters*, v. 579, p. 3224-3230, 2005.

MITCH, W.E.; GOLDBERG, A.L. Mechanisms of muscle wasting: The role of the ubiquitin-proteasome system. *N Engl J Med*, v. 225, p. 1897-1905, 1996.

MONTAGUE, W.; COOK, J.R. The role of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate in the regulation of insulin release by isolated rat islets of Langerhans. *Biochem. J*, v. 122, p. 115-120, 1971.

MORIMOTO, R.I. Regulation of heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev*, v. 12, p. 3788-3796, 1998.

MORITA, S.; TSUJINAKA, T.; YANO, M.; EBISUI, C.; MORIMOTO, T.; FUJITA, J.; OGAWA, A.; TANIGUCHI, M.; SHIOSAKI, H.; MONDEN, M. Temperature-dependent enhancement of proteolysis in C2C12 myotubes in association with activation of 26S proteasome. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 228, p. 813-818, 1996.

MOTT, K.E.; DESJEUX, P.; MONCAYO, A.; RANQUE, P.; DE RAADT, P. Parasitic diseases and urban development. *Bull World Health Organ*, v. 68, p. 691-98, 1990.

MURATA, S. Multiple Chaperone-Assisted Formation of Mammalian 20S Proteasomes. *IUBMB Life*, v. 58, n.5-6, p. 344-348, 2006.

NAITO, H.; POWERS, S.K.; DEMIREL, H.A.; SUGIURA, T.; DODD, S.L.; AOKI, J. Heat stress attenuates skeletal muscle atrophy in hindlimb-unweighted rats. *J Appl Physiol*, v. 88 n.1, p. 359-363, 2000.

NARE, B.; SMITH, J.M.; PRICHARD, R.K. Differential effects of oltipraz and its oxy-analogue on the viability of *Schistosoma mansoni* and the activity of glutathione *s*-transferase. *Biochem. Pharmacology*, v. 42, p. 1287-1292, 1991.

NAUJOKAT, C.; FUCHS, D.; BERGES, C. Adaptative modification and flexibility of the proteasome system in response to proteasome inhibition. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1773, p. 1389-1397, 2007.

NAVEGANTES, L.C.C.; RESANO, N.M.Z.; MIGLIORINI, R.H.; KETTELHUT, I.C. Role of adrenoceptors and cAMP on the catecholamine-induced inhibition of proteolysis in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 280, p. 663-668, 2001.

NEVES, D.P.; MELO, A.L.; GENARO, O.; LINARDI, P.M. *Parasitologia Humana, 11ª edição, Atheneu Editora, 2005.*

NKEMGU-NJINKENG, J.; ROSENKRANZ, V.; WINK, M.; STEVERDING, D. Antitrypanosomal activities of proteasome inhibitors. *Antimicrobial Agents and chemotherapy*, v. 46, p. 2038-2040, 2002.

OISHI, Y.; ISHIHARA, A.; TALMADGE, R.J.; OHIRA, Y.; TANIGUCHI, K.; MATSUMOTO, H.; ROY, R.R.; EDGERTON, V.R. Expression of heat shock protein 72 in atrophied rat skeletal muscles. *Acta Physiol Scand*, v. 172, n.2, p. 123-130, 2001.

OKZAYNAK, E.; FINLEY, D.; VARSHAVSKY, A. The ubiquitin gene: head-to-tail repeats encoding a polyubiquitin precursor protein. *Nature*, v. 312, p. 663-666, 1984.

OWSIANIK, G.; BALZI, I.L.; GHISLAIN, M. Control of 26S proteasome expression by transcription factors regulating multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, v. 43 p. 1295-1308, 2002.

PARAENSE, W.L. Distribuição dos caramujos no Brasil. Modernos conhecimentos sobre Esquistossomose Mansonica no Brasil. *Biblioteca da Academia Mineira de Medicina*, v. 14, p. 117-128, 1986.

PAUGAM, A.; BULTEAU, A.L.; DUPOUY-CAMET, J.; CREUZET, C.; FRIGUET, B. Characterization and role of protozoan parasite proteasomes. *Trends in Parasitology*, v. 19, n.2, p.55-59, 2003.

PAX, R.; BENNETT, J.L.; FETTERER, R. A benzodiazepine derivative and praziquantel: effects on musculature of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol*, v. 304, p. 309-315, 1978.

PICKART, C.M.; COHEN, R.E. Proteasome and their kin: proteases in the machine age. *Nat Rev*, v. 5, p. 177-187, 2004.

PICKART, C.M. DNA repair: right on target with ubiquitin. *Nature*, v. 419, p. 120-121, 2002.

PICKART, C.M.; EDDINS, M.J. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, v. 1695, n.1-3, p. 55-72, 2004.

PICKART, C.M. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*, v. 70, p. 503-533, 2001.

PICKART, C.M. Ubiquitin in chains. *Trends Biochem. Sci*, v. 25, p. 544-548, 2000.

PIRKKALA, L.; NYKANEN, P.; SISTONEN, L. Roles of the heat shock transcriptional factors in regulation of heat shock response and beyond. *FASEB J*, v. 15, p. 1118-1131, 2001.

RAMOS, P.C.; HÖCKENDORFF, J.; JOHNSON, E.S.; VARSHAVSKY, A.; DOHMEN, R.J. Ump1p is required for proper maturation of the 20S proteasome and becomes its substrate upon completion of the assembly. *Cell*, v. 92, p. 489-499, 1998.

RECHSTEINER, M.; HILL, C.P. Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. *Cell Biology*, v. 15, p. 27-33, 2005.

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

RECHSTEINER, M. Ubiquitin. *Plenum Press, NY*, 1988.



RIJN, J.V.; BERG, J.V.D. Effect of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate and inhibition of protein kinase a on heat sensitivity in H35 hepatoma cells. *Int J Radiation Oncology Biol Phys*, v. 35, n° 2, p.313-319, 1996.

ROBERTSON, C.D. The *Leishmania mexicana* proteasome. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 103, p. 49-60, 1999.

ROCK, K.L.; GRAMM, C.; ROTHSTEIN, L.; CLARK, K.; STEIN, R.; DICK, L.; HWANG, D.; GOLDBERG, A.L. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*, v. 78, p. 761-771, 1994.

RODRIGUES, V.; CHAUDHRI, M.; KNIGHT, M.; MEADOWS, H.; CHAMBERS, A.E.; TAYLOR, W.R.; KELLY, C.; SIMPSON, A.J.G. Predict structure of a major *Schistosoma mansoni* eggshell protein. *Mol Biochem Parasitol*, v. 32, p. 7-13, 1989.

ROLLINSON, D.; SOUTHGATE, V.R. The genus *Schistosoma*: a taxonomic appraisal. *Academic Press*, p. 1-49, 1987.

RUBIN, C.M.; GLICKMAN, M.H.; LARSEN, C.N.; DHARUVAKUMAR, S.; FINLEY, D. Active site mutants in the six regulatory particle ATPases reveal multiple roles for ATP in the proteasome. *EMBO J*, v. 17, p. 4909-4919, 1998.

SALTER, J.P.; LIM, K.C.; HANSELL, E.; HSIEH, I.; MCKERROW, J.H. Schistosomose invasion of human skin and degradation of dermal elastin are mediated by a single serine protease. *J Biol Chem*, v. 275, n.277, p. 38667-38673, 2000.

SAMBON, L.W. Remarks on *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg*, v. 10, p. 303-304, 1907.

SATOH, K.; NISHIKAWA, T.; YOKOSAWA, A.H. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 213, p. 7-14, 1995.

SCHMIDT, M.; HANNA, J.; ELSASSER, S.; FINLEY, D. Proteasome-associated proteins: regulation of a proteolytic machine. *Biol. Chem*, v. 386, p. 725-737, 2005.

SCHMIDTKE, G.; SCHMIDT, M.; KLOETZEL, P.M. Maturation of mammalian 20S proteasome: purification and characterization of 13S and 16S proteasome precursor complexes. *J. Mol. Biol*, v. 268, p. 95-106, 1997.

SHAW, K.; HE, C.Y.; ROOS, D.S.; TILNEY, L.G. Proteasome inhibitors block intracellular growth and replication of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*, v. 121, p. 35-47, 2000.

SHRINGAPURE, R.; GRUNE, T.; MEHLHASE, J.; DAVIES, K.J.A. Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome. *J. Biol. Chem*, v. 278, p. 311-318, 2003.

SMITH, H.J.; KHAL, J.; TISDALE, M.J. Downregulation of ubiquitin-dependent protein degradation in murine myotubes during hyperthermia by eicosapentaenoic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 332, p. 83-88, 2005.

SREEDHAR, A.S.; CSERMELY, P. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy. A comprehensive review. *Pharm Ther*, v. 101, p. 227-257, 2004.

SREEDHAR, A.S.; DEEPU, O.; ABHISHEK, A.; SRINIVAS, U.K. Heat shock transcription factors: a comprehensive review; in stress response: a molecular biology approach (eds) Amere S Sreedahr and Usha K Srinivas ( *Research Signpost ISBN:81-308-0109-4*) (in press), 2006.

TALLEC, B.L.; BARRAULT, M.B.; COURBEYRETTE, R.; GUÉROIS, R.; KERGOAT, M.C.M.; PEYROCHE, A. 20S Proteasome Assembly Is Orchestrated by Two Distinct Pairs of Chaperones in Yeast and in Mammals. *Mol. Cell*, v. 27, p.660-674, 2007.

TANAHASHI, N. Hybrid proteasomes. Induction by interferon- $\gamma$  and contribution to ATP-dependent proteolysis. *J. Biol. Chem*, v. 275, p.14336-14345, 2000.

TANAKA, K.; CHIBA, T. The proteasome: a protein-destroying machine. *Genes Cells*, v. 3, n.8, p. 499-510, 1998.

TANAKA, K.; MATSUMOTO, K.; TOH-E, A. Dual regulation of the expression of the polyubiquitin gene cyclic AMP and heat shock in yeast. *EMBO J.* v. 7, p. 495-502, 1988.

TANAKA, M.; HIRAI, H.; LOVERDE, P.T.; NAGAFUCHI, S.; FRANCO, G.R.; SIMPSON, A.J.G.; PENA, S.D.J. Yeast artificial chromosome (YAC) – based genome mapping of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol*, v. 69, p. 41-51, 1995.

TONE, Y.; TOH-E, A. Nob1p is required for biogenesis of the 26S proteasome and degraded upon its maturation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Development*, v. 16, p. 3142-3157, 2006.

TRAP, C.; BOIREAU, P. Proteases in helminthic parasites. *Vet.Res*, v. 31, n.5, p. 461-71, 2000.

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

VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; DEMARCO, R.; MARTINS, E.A.; GUIMARAES, P.E.; OJOPI, E.P.; PAQUOLA, A.C.; PIAZZA, J.P.; NISHIYAMA, M.Y.J.R.; KITAJIMA, J.P.; ADAMSON, R.E.; ASHTON, P.D.; BONALDO, M.F.; COULSON, P.S.; DILLON, G.P.; FARIAS, L.P.; GREGORIO, S.P.; HO, P.L.; LEITE, R.A.; MALAQUIAS, L.C.; MARQUES, R.C.; MIYASATO, P.A.; NASCIMENTO, A.L.; OHLWEILER, F.P.; REIS, E.M.; RIBEIRO, M.A.; SA, R.G.; STUKART, G.C.; SOARES, M.B.; GARGION, I.C.; KAWANO, T.; RODRIGUES, V.; MADEIRA, A.M.; WILSON, R.A.; MENCK, C.F.; SETUBAL, J.C.; LEITE, L.C.; DIAS-NETO, E. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. *Nat Genet*, v. 35, n. 2, p. 148-157, 2003.

XIE, Y.; VARSHAVSKY, A. RPN4 is a ligand, substrate, and transcriptional regulator of the 26S proteasome: a negative feedback circuit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 98, p. 3056-3061, 2001.

WALTERS, K.J.; GOH, A.M.; WANG, Q.; WAGNER, G.; HOWLEY, P.M. Ubiquitin family proteins and their relationship to the proteasome: a structural perspective. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1695, n. 1-3, p. 73-87, 2004.

WEISSMAN, A.M. Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 2, p. 169-179, 2001.

WERNER, K. *Schistosoma* male-female interaction: induction of germ-cell differentiation. *Trends in Parasitol*, v.17, n.5, p. 227-231, 2001.

WHITEHOUSE, A.S.; SMITH, H.J.; DRAKE, J.L.; TISDALE, M.J. Mechanism of attenuation of skeletal muscle protein catabolism in cancer cachexia by eicosapentaenoic acid. *Cancer Res*, v. 61, p.3604-3609, 2001.

WHITEHOUSE, A.S.; TISDALE, M.J. Increased expression of the ubiquitin-proteasome pathway in murine myotubes by proteolysis-inducing factor (PIF) is associated with activation of the transcription factor NF-kB. *Br J Cancer*, v. 89, p. 1116-1122, 2003.

WHO EXPERT COMMITTEE. Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis. *Technical report series*. Geneva: World Health Organisation, 2002.

WILSON, R.A. Introdução à Parasitologia. Tradução: Cláudio Santos Ferreira e Annete Silva Foronda. São Paulo; EPU; Ed. da Universidade de São Paulo, 1980.

WITT, E.; ZANTOPF, D.; SCHIMIDT, M.; KRAFT, R.; KLOETZEL, P.M.; KRUGER, E. Characterization of the newly identified human Ump1 homologue POMP and analysis of LMP7 ( $\beta 5i$ ) incorporation into 20S proteasomes, *J. Mol.Biol*, v. 301, p. 1-9, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, TDR strategic direction for research: schistosomiasis. WORLD HEALTH ORGANIZATION, Geneva Switzerland, 2004.

YANG, Y.; FRÜH, K.; AHN, K.; PETERSON, P.A. In vivo assembly of the proteasomal complexes, implications for antigen processing. *J. Biol. Chem*, v. 270, p. 27687-27694, 1995.

YANG, Y.; YU, X. Regulation of apoptosis: the ubiquitous way. *FASEB Journal*, v. 17, p. 790-799, 2003.

YUAN, X.; MILLER, M.; BELOTE, J.M. Duplicated proteasome subunit genes in *Drosophila melanogaster* encoding testes-specific isoforms. *Genetics*, v. 144 p. 147-157, 1996.

ZÜHL, F.; SEEMÜLLER, E.; GOLBIK, R.; BAUMEISTER, W. Dissecting the assembly pathway of the 20S proteasome. *FEBS Lett*, Nov 24, v. 418, n. 1-2, p. 189-94, 1997.

## **8. ANEXOS**

### Seqüência inteira de SmPOMP – 590 nucleotídeos

1	TCCCTGTTTCGACCATTAATGTACACTGGTTTTAGGCGATGTAATTGGTTCT	50
51	ACTGTATGGTCAAGTGCAGAAGCATCATCATTGGCTGCAATCCCAGGGTC	100
101	TAAAGTGGGAAGATTCAACTAACTTTCCACATCCAGTAGCTGAATCACTTG	150
151	CAAAATTTGGTAAAGCAGCTGAAAAAGCGAATAGAATGAGAGTTTTAGCT	200
201	TCTACTCAAGGTTTACATGCACCATTACGTCTATCTATGGAACAACATAT	250
251	AATGCAACGTATTCAACCACGTCTACCTGGTTTATATTCTTATCATCCTT	300
301	TAGCTAGTCAATTAATGGGAGTTTAGATGAGATAGATATAGCTGACTTT	350
351	ATAAATCCTGCGGAAGATTCTGAAACCGTTGGAATGCCCAATTGATGAT	400
401	GGAGCATAAACTTGGTCTTTTGTAATGACAATTGGTTTTCTCGAATTGA	450
451	ATGAAACAGTCAGTCTTTCTTGAAACTATTATTACAAAAGAAATAATAA	500
501	TGAAATACATTGTCCTACCATCTTTGTATTACCAATAATGNTCTCAATAT	550
551	CATTTTGTAGAANATAAAAATGACAAATATATATTTTAAC	590

**Tabela 1.** Análise do domínio conservado de SmPOMP, evidenciado pelo algoritmo Pfam ([www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/](http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/)).

Domínio	Início	Fim	E-value
<u>UMP1</u>	5	135	3.7e-30

**UMP1** [135 residues]

**Tabela 2.** Análise da expressão do gene SmPOMP nas diferentes fases do ciclo de vida de *S. mansoni*.

Ciclo	Densitometria POMP	Densitometria do controle ( $\alpha$ -tubulina)	Relação POMP / $\alpha$ -tubulina
C-	0	0	0
C+	98,25	70,34	1,39
Ce	110,00	60,00	1,83
E	0	35,93	0
F	35,12	40,31	0,87
M	38,00	60,00	0,63
O	41,00	69,00	0,59

Abreviaturas: caramujo não infectado (C-); esporocisto (C+); cercária (Ce); esquistossômulos (E); fêmea (F); macho (M); ovos (O).

**Tabela 3.** Análise da expressão do gene SmPOMP sob efeito do inibidor da atividade peptidásica do proteossoma (MG-132) em parasitos adultos mantidos *in vitro*

Tempo de cultivo MG-132	Densitometria POMP	Densitometria Alfa-tubulina	Relação POMP / Alfa-tubulina
2 hs	89.22	48.17	1.85
6 hs	81.09	48.70	1.66
12 hs	55.13	42.07	1.31
24 hs	52.36	42.82	1.22

Concentração utilizada: MG-132 (60 $\mu$ M)

Tempo de cultivo DMSO	Densitometria POMP	Densitometria Alfa-tubulina	Relação POMP / Alfa-tubulina
2 hs	62.88	55.40	1.13
6 hs	59.96	52.26	1.14
12 hs	61.00	53.80	1.13
24 hs	62.00	55.16	1.12



**Tabela 4.** Avaliação *in vitro* da ovoposição de vermes adultos sob o efeito químico de IBMX (3-isobutil-1-methylxanthine).

Concentrações	2hs	1 dia	2 dias	3 dias	4 dias	5 dias	6 dias	7 dias
<b>C</b>	2	39	80	67	52	32	12	8
<b>IBMX 40<math>\mu</math>M</b>	2	36	5	1	0	0	4	1
<b>IBMX 60 <math>\mu</math>M</b>	2	0	1	4	0	0	0	0
<b>IBMX 80 <math>\mu</math>M</b>	0	1	0	0	0	0	0	0
<b>IBMX 100<math>\mu</math>M</b>	1	0	0	0	0	0	0	0
<b>IBMX 120<math>\mu</math>M</b>	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>IBMX 200<math>\mu</math>M</b>	0	0	1	0	0	0	0	0

C: controle positivo, vermes adultos cultivados *in vitro* na ausência de IBMX.

**Tabela 5.** Análise da reversibilidade de IBMX na ovoposição de vermes adultos cultivados *in vitro*.

Concentrações	1 dia	2 dias	3 dias	4 dias	5 dias	6 dias
<b>Controle</b>	38	82	64	62	47	35
<b>IBMX 40</b>	36	38	66	53	34	35
<b>IBMX 80</b>	11	5	46	61	47	35

Controle: sem adição de IBMX

**Tabela 6.** Análise da expressão do gene SmPOMP sob efeito de IBMX

<b>Concentrações</b>	<b>Densitometria POMP</b>	<b>Densitometria do controle (<math>\alpha</math>-tubulina)</b>	<b>Relação POMP / <math>\alpha</math>-tubulina</b>
<b>Controle</b>	28,77	56,27	0,51
<b>IBMX 80 <math>\mu</math>M</b>	55,71	39,58	1,40
<b>IBMX 200 <math>\mu</math>M</b>	48,66	35,00	1,39

Controle: sem adição de IBMX

**Tabela 7.** Atividade proteolítica exógena do extrato bruto de vermes adultos sob efeito de IBMX.

<b>Concentrações</b>	<b>Extrato bruto (U Fluorescência)</b>	<b>Extrato bruto + ATP (U Fluorescência)</b>
<b>C-</b>	92	974
<b>C+</b>	430	2276
<b>IBMX 80</b>	129	1190
<b>IBMX 200</b>	240	1560

C-: controle negativo, vermes adultos cultivados na presença de MG-132 (60 $\mu$ m).

C+: controle positivo, vermes adultos sem adição de inibidores.

**Tabela 8.** Ensaio de viabilidade dos parasitos sob efeito de IBMX

Concentrações	Absorbância 550 nm
C-	0.040
C+	0.323
40 $\mu$ M	0.333
60 $\mu$ M	0.360
80 $\mu$ M	0.363
100 $\mu$ M	0.363
120 $\mu$ M	0.314
200 $\mu$ M	0.356

C-: vermes mortos pelo calor 56°C

C+: vermes cultivados sem adição de IBMX

**Tabela 9.** Análise da expressão do gene SmPOMP sob condi es de estresse térmico

Condi�es de Temperatura	Densitometria POMP	Densitometria do controle ( $\alpha$ -tubulina)	Rela�o (POMP / $\alpha$ - tubulina)
C	128,39	93,70	1.37
4°C	48,14	74,67	0.65
25°C	67,09	64,46	1.04
37°C	115,13	94,63	1.22
42°C	0	88,77	0
47°C	46,28	74,30	0.62

C: controle, vermes adultos congelados   -70°C, logo após perfusão.

**Tabela 10.** Atividade proteolítica exógena do extrato bruto de vermes adultos sob condi es de estresse térmico

Condi�es de Temperatura	Extrato bruto (U Fluoresc�ncia)	Extrato bruto + ATP (U Fluoresc�ncia)
C-	92	974
C+	220	1339
4°C	125	1479
25°C	326	1442
37°C	450	1497
42°C	611	1297
47°C	788	1465

C-: controle negativo, vermes adultos cultivados na presença de MG-132 (60 $\mu$ m).

C+: controle positivo, vermes adultos que não foram submetidos a estresse térmico

**Tabela 11.** Ensaio de viabilidade dos parasitos sob condições de estresse térmico

<b>Condições de Temperatura</b>	<b>Absorbância 550 nm</b>
<b>C-</b>	0.053
<b>C+</b>	0.346
<b>4°C</b>	0.337
<b>25°C</b>	0.336
<b>37°C</b>	0.321
<b>42°C</b>	0.311
<b>47°C</b>	0.339

C-: vermes mortos pelo calor 56°C

C+: vermes adultos que não foram submetidos a estresse térmico

**Tabela 12.** Análise da expressão do gene SmPOMP sob condições de estresse térmico

<b>Condições de Temperatura</b>	<b>Densitometria POMP</b>	<b>Densitometria do controle (<math>\alpha</math>-tubulina)</b>	<b>Relação (POMP / <math>\alpha</math>-tubulina)</b>
<b>C</b>	129,32	94,40	1.37
<b>40°C</b>	128,36	93,70	1.37
<b>42°C</b>	0	93,68	0
<b>45°C</b>	0	93,59	0

C: controle, vermes adultos congelados à -70°C, logo após perfusão.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)