

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

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DO ESTRESSE OXIDATIVO**  
**EM *Schistosoma mansoni***

**Sergio Henrique da Silva**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, como requisito para a obtenção do título de doutor em ciências. Área de concentração: Bioquímica.

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

**Ribeirão Preto**

**2009**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

Silva, Sergio Henrique da.

Caracterização bioquímica do estresse oxidativo em *Schistosoma mansoni*; Ribeirão Preto, 2009.

138 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto /USP. Área de concentração: Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Vanderlei Rodrigues

1. Estresse oxidativo. 2. *Schistosoma mansoni*. 3. Proteoma.

***Este trabalho é dedicado a:***

***Minha esposa Izabela pelo imenso amor que nos une, pela cumplicidade, por sua sensibilidade.***

***Minha pequena Isis, por me mostrar o quanto vale a pena viver. Tudo na vida passou a fazer sentido desde que ela nasceu.***

***Minha mãe Esmeralda, que sempre fez tudo que estava ao seu alcance para que eu me tornasse um grande homem.***

## **Agradecimentos**

### **Ao Prof. Dr. Vanderlei Rodrigues**

Por ter confiado em mim. Pela sua paciência, permanecendo sempre tranqüilo diante das minhas opções. Pela experiência e conhecimento que é capaz de transmitir. Pelo companheirismo e carinho com que trata todos os que são acolhidos em seu laboratório.

### **Ao Prof. Dr. Olavo dos Santos Pereira Junior**

Por, além de ter desempenhado um papel importantíssimo no desenvolvimento deste trabalho, ser um grande amigo e uma pessoa excepcional. Parte do que sou, como pesquisador, devo a este grande companheiro.

### **Elenice**

Por ter sido uma grande amiga durante toda esta jornada e, acredito, para sempre. Obrigada por ser “eu” no laboratório quando não pude estar presente. Sempre serei grato por todo o apoio que recebi de você nos momentos mais difíceis.

### **Mara**

Por sempre estar disposta a ajudar nos trabalhos e em tudo. Agradeço pela amizade e pela companhia sempre agradável de todos os momentos. Assim como todos que passam por esse laboratório, levo você sempre no coração.

### **Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas**

Os que por lá passaram: Fernanda, Patrícia, Camila, Abenor, Carla e Renata. Os que lá estão: Enyara, Lizandra, Érika, Claudia e Wendel. Muito obrigado pela força que vocês fizeram para me ajudar a terminar este trabalho. Esta tese tem muitos autores e todos vocês estão entre eles. Agradeço pela amizade e pelas boas horas de conversa com todos.

### **Aos amigos do Laboratório de Fotobiologia e Genética de Microrganismos**

Fernanda, Stella, Ludmila, Érika, Gabi, Everaldo, Bruno, Tiago, Gilberto. Agradeço a todos vocês pela amizade e pelo apoio em todos os momentos difíceis que me ajudaram a superar.

### **Aos amigos da pós-graduação**

Pelo convívio no dia a dia. Pela amizade, pela troca de experiências.

### **Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia**

Pelo profissionalismo e pela atenção com que atendem aos pedidos e reclamações de nós alunos. Em especial, devo destacar os funcionários da secretaria, Ivone, Téia, Lucia e Ronaldo que sempre me ajudaram a resolver qualquer problema que apareceu.

### **Ao meu filho canino, Nick Henrique**

Agradeço a você meu filho por me dar forças para levantar a cada manhã. Por ser a razão que fazia com que o papai sempre buscasse progredir na vida, para que pudesse sempre oferecer um pouco mais a você. Pela companhia fiel que sempre tive quando eu estava estudando e sentia você deitado do meu lado. Por ter, mesmo sendo apenas preto, tornado este mundo muito mais colorido desde o momento em que entrou na minha vida até o momento em que me deixou. Não tenho como agradecer apenas com essas palavras, mas sim continuando a ser tudo o que me ensinou, para que um dia eu possa merecer ir para junto de você.

### **Aos amigos da ANP**

Pelo companheirismo e apoio para que eu pudesse finalizar este trabalho.

### **A todos os meus familiares e amigos**

Pelo carinho, incentivo, amizade. Sem o apoio dessas pessoas nada seria possível.

### **Ao CNPq, à FAPESP e FAEPA**

Pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

## Índice

### Abreviaturas

### Resumo

### Summary

<b>1 Introdução .....</b>	<b>14</b>
1.1 Esquistossomose: aspectos gerais .....	15
1.2 Esquistossomose: histórico .....	17
1.3 Biologia do <i>Schistosoma mansoni</i> .....	18
1.4 Respostas imunológicas dos hospedeiros.....	21
1.5 Estresse oxidativo e mecanismos celulares de tolerância .....	23
1.5.1 Espécies reativas de oxigênio .....	23
1.5.2 Estresse oxidativo .....	26
1.5.3 Visão geral dos sistemas antioxidantes .....	28
1.6 Proteólise mediada pelo proteossoma 26S durante o estresse oxidativo.....	31
1.7 O estresse oxidativo como um alvo terapêutico no tratamento da esquistossomose mansônica .....	35
1.7.1 Fotossensibilizadores e terapia fotodinâmica .....	36
<b>2 Objetivos .....</b>	<b>39</b>
2.1 Objetivo geral.....	40
2.2 Objetivos específicos .....	40
<b>3 Material e Métodos .....</b>	<b>42</b>
3.1 Manutenção do ciclo de vida de <i>S. mansoni</i> .....	43
3.2 Obtenção de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> .....	44
3.3 Tratamento de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> com peróxido de hidrogênio .....	44
3.4 Ensaio de viabilidade dos vermes expostos ao peróxido de hidrogênio .....	45
3.5 Quantificação de peróxido de hidrogênio no meio RPMI .....	45
3.6 Determinação do dano ao DNA de vermes submetidos ao estresse oxidativo .....	46
3.7 Obtenção do extrato protéico total de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> .....	48
3.8 Determinação da atividade proteolítica exógena .....	49

3.9 Eletroforese bidimensional dos extratos totais de vermes adultos submetidos ao estresse oxidativo .....	50
3.9.1 Focalização isoeletrica dos extratos proteicos.....	50
3.9.2 Redução e alquilação das proteínas <i>in gel</i> .....	51
3.9.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-Page).....	51
3.10 Análise das imagens .....	52
3.11 Digestão <i>in gel</i> e processamento dos peptídeos para espectrometria de massa ..	52
3.12 Identificação de proteínas por MALDI-MS/MS .....	53
3.12.1 Espectrometria de massa .....	53
3.12.2 Busca da identidade das proteínas analisadas por MALDI-MS/MS .....	54
3.13 Western Blot para a detecção de ubiquitinação em proteínas identificadas por MALDI-MS/MS.....	54
3.14 Avaliação da suscetibilidade de vermes adultos à fotossensibilização <i>in vitro</i> com azul de metileno. ....	56
3.15 Análises estatísticas.....	56
<b>4 Resultados.....</b>	<b>57</b>
4.1 Viabilidade de vermes adultos expostos ao peróxido de hidrogênio .....	58
4.2 Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio durante os tratamentos realizados.....	60
4.3 Quantificação de danos ao DNA de vermes adultos tratados e não tratados com peróxido de hidrogênio.....	61
4.4 Atividade proteolítica exógena de extratos de vermes adultos submetidos ao estresse oxidativo. ....	64
4.5 Expressão diferencial de proteínas durante o estresse oxidativo .....	66
4.6 Identificação de proteínas por MALDI-MS/MS .....	69
4.7 Detecção, por Western Blot, de ubiquitinação da proteína actina durante o estresse oxidativo em <i>S. mansoni</i> .....	71
4.8 Fotossensibilização de <i>S. mansoni</i> .....	72
<b>5 Discussão.....</b>	<b>76</b>
<b>6 Conclusões .....</b>	<b>99</b>
<b>7 Referências Bibliográficas.....</b>	<b>102</b>
<b>8 Anexo.....</b>	<b>115</b>



## ABREVIATURAS

ATP	Adenosina Trifosfato
Da	Daltons
DMSO	Dimetil sulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ERO	Espécie reativa de oxigênio
GPX	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona
HCl	Ácido clorídrico
HSP	Proteína de choque térmico (Heat Shock Protein)
MALDI	Matrix assisted laser desorption ionization
MS	Espectrometria de massa
MTT	(4,5-dimethyliazol-2-il)-2,5 difeniltetrazol
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NaOH	Hidróxido de sódio
NEM	N-etilmaleimida
8-oxo-G	8-Oxoguanina
PBS	Salina tamponada com fostato
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoreto
Prx	Peroxirredoxina
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Sítio AP	Sítioapurínico/apirimídico

SOD	Superóxido dismutase
TBS-T	Salina tamponada com Tris
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
WHO	Organização Mundial de Saúde (World Health Organization)

***Resumo***

O parasita *Schistosoma mansoni*, agente etiológico da esquistossomose mansônica, apresenta um complexo ciclo de vida, que envolve fases no interior do organismo de dois hospedeiros, além de fases de vida livre. Os hospedeiros reagem à infecção por diferentes mecanismos, porém, a liberação de espécies reativas de oxigênio aparentemente é o principal fator de estresse para o parasita. O objetivo deste trabalho foi, portanto, caracterizar a adaptação do parasita frente ao estresse oxidativo e determinar os efeitos resultantes da exposição a esta condição.

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que os vermes adultos de *S. mansoni* possuem uma grande tolerância ao estresse oxidativo, permanecendo viáveis mesmo em concentrações elevadas. As espécies reativas de oxigênio produzem diversos danos às biomoléculas presentes nas células do parasita, como pôde ser estimado pela quantificação dos danos oxidativos na estrutura do DNA. Para evitar conseqüências negativas desta exposição, as células de *S. mansoni* possuem um sistema antioxidante, responsável pela eliminação dos agentes oxidantes, como foi observado nos resultados apresentados.

A análise da expressão diferencial de proteínas mostrou diversas proteínas induzidas ou reprimidas durante os tratamentos. A análise por espectrometria de massa de alguns dessas proteínas identificou dois spots referentes à proteína actina, com massas moleculares diferentes. Isto sugere que a proteína actina de *S. mansoni* sofre modificações pós-traducionais mediante o estresse oxidativo com alteração de massa consistente com a adição de uma molécula de ubiquitina.

Como o estresse oxidativo pode produzir inúmeros efeitos deletérios sobre as células atingidas, propomos a aplicação da fotossensibilização, com formação de espécies reativas de oxigênio, para a eliminação de vermes adultos do parasita. Esse

estudo preliminar mostrou que a metodologia pode ser eficaz para o controle do parasita em diferentes ambientes.

Os resultados apresentados neste estudo descrevem os eventos gerais envolvidos no parasita durante o estresse oxidativo e permitem o melhor entendimento acerca dos processos utilizados para a sobrevivência no interior do organismo hospedeiro.

*Summary*

The parasite *Schistosoma mansoni*, the etiologic agent of schistosomiasis, has a complex life cycle, involving stages inside the body of two hosts, and free-living stages. The host defenses against the infection occur by different mechanisms, however, the release of reactive oxygen species is apparently the main factor of stress for the parasite. This work was therefore to characterize the adaptation of the parasite against oxidative stress and to determine the effects of exposure to this condition.

The results presented in this paper show that the adult worms of *S. mansoni* have a great tolerance to oxidative stress, remaining viable even at high concentrations. Reactive oxygen species affects various biomolecules in parasite cells, as was estimated by quantification of oxidative damage in the structure of DNA. To avoid negative consequences of this exposure, the cells of *S. mansoni* possess an antioxidant system, responsible oxidant for the elimination of agents, as observed in the results presented.

The analysis of differential expression of proteins showed several proteins induced or repressed during the treatments. The analysis by mass spectrometry of some of these proteins identified two spots for the protein actin, with different molecular weights. This suggests that the protein actin from *S. mansoni* undergo posttranslational changes due to oxidative stress, with mass variation consistent with the addition of a ubiquitin molecule.

As oxidative stress can induce numerous deleterious effects on the cells affected, we propose the use of photosensitization, with production of reactive oxygen species, for the elimination of adult worms of the parasite. This preliminary study showed that the methodology can be effective to control the parasite in different environments.

The results presented in this study describe the general events involved in the parasite during oxidative stress and allow a better understanding about the processes used for survival inside the host organism.

## ***1 Introdução***



## 1.1 Esquistossomose: aspectos gerais

O parasita *Schistosoma mansoni* é um dos causadores da esquistossomose ou bilharziose, uma doença milenar que afeta mais de 200 milhões de pessoas em todo o mundo, com outras 600 milhões expostas ao risco de infecção. A doença ocorre em 76 países, nos continentes africano, asiático e americano (WHO, 2004). Entre os indivíduos afetados, 10% apresentam um quadro severo da doença e mais da metade dos infectados apresentam algum sinal clínico. De acordo com esses dados, a esquistossomose é a segunda endemia parasitária do mundo, superada apenas pela malária em importância (ENGELS et al, 2002).

O gênero *Schistosoma* classifica-se no reino Animalia, sub-reino Metazoa, filo Platyhelminthes, classe Trematoda, sub-classe Digenea e família Schistosomatidae. Seis espécies do gênero *Schistosoma* são capazes de parasitar o homem: *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* e *S. malayensis*. Destas espécies, as três primeiras adaptaram-se melhor ao parasitismo de seres humanos (BRINDLEY, 2005; MELO & COELHO, 2005). Entre as espécies do gênero *Schistosoma* capazes de parasitar o homem, somente *S. mansoni* é encontrado no Brasil. A ocorrência do parasita em uma determinada localidade está condicionada à existência de hospedeiros suscetíveis, tanto vertebrados (definitivos) como invertebrados (intermediários). Três espécies de caramujos do gênero *Biomphalaria* são hospedeiros intermediários de *S. mansoni* na natureza: *B. glabrata*, *B. tengophila* e *B. straminae*. Outras duas espécies, *B. amazonica* e *B. peregrina*, são caracterizadas como hospedeiros intermediários potenciais, uma vez que podem ser infectadas experimentalmente (COURA e AMARAL, 2004).

A esquistossomose é uma doença assintomática em seu estágio inicial, porém, com graves efeitos em longo prazo. Caracterizada em sua fase crônica por sintomas

como anemia, diarreia e fortes dores abdominais, a patogenia se desenvolve a partir da postura de ovos pelo verme, formando granulomas no sistema porta-hepático do paciente. Os granulomas promovem a obstrução do fluxo sanguíneo, desencadeando uma hepatoesplenomegalia grave. Esse sintoma é responsável pelo inchaço abdominal característico nos pacientes, que faz com que esquistossomose receba a denominação popular de “barriga d’água” em algumas regiões brasileiras. Assim, essa parasitose constitui um grave problema de saúde pública nas regiões onde ocorre, comprometendo o desenvolvimento de crianças e reduzindo drasticamente a produtividade de adultos.

Mesmo com os números alarmantes de pessoas afetadas e o grave déficit orgânico dessa doença, ainda são pequenos os esforços no sentido do desenvolvimento de uma vacina e, até mesmo, de tratamentos medicamentosos mais eficazes no tratamento e na prevenção. Atualmente, o medicamento de escolha para o tratamento dessa infecção, em todo o mundo, é a quimioterapia com o praziquantel. No entanto, já existem relatos de linhagens resistentes a essa droga (FALLON, 1998) que podem comprometer seriamente o tratamento dessa doença dentro de um curto prazo. Em virtude das limitações apresentadas pelo tratamento medicamentoso da esquistossomose, a forma mais eficaz de controle ainda é o investimento em infraestrutura de saneamento básico, impedindo a contaminação de águas e, conseqüentemente, a continuidade do ciclo desse parasita (REY, 2002).

Diante desse cenário, o estudo da biologia básica e aplicada desse parasita é de extrema importância para compreendermos aspectos como os mecanismos utilizados pelo verme para a infecção, e a resistência frente ao sistema imune do hospedeiro. Como resultado, novas abordagens para o tratamento da esquistossomose poderão ser desenvolvidas.

## 1.2 Esquistossomose: histórico

A esquistossomose é uma doença que assola a humanidade desde a antiguidade. Este fato foi comprovado por achados de ovos de *Schistosoma* em múmias egípcias datadas de 3500 a.C. (AMARAL & PORTO, 1994).

A primeira constatação da existência desses parasitas em organismos humanos ocorreu em 1851. Thedor Bilharz, médico e biólogo alemão, durante uma autópsia no Egito, observou a presença de um verme nas veias mesentéricas de um camponês. O trematódeo encontrado ainda não era conhecido e foi denominado *Distomum haematobium*. Sabemos hoje que o verme encontrado era o *Schistosoma haematobium*, espécie comum naquela região. Anos após, Weiland (1858) sugeriu a denominação de *Schistosoma* para o gênero, uma vez que os machos apresentam uma fenda em seu corpo (schisto = fenda; soma = corpo) (ROLLINSON & SOUTHGATE, 1987).

No ano 1902, Patrick Manson examinou um homem inglês que havia vivido por vários anos nas Antilhas, e encontrou ovos com uma espícula lateral nas fezes desse paciente. Manson admitiu ter descoberto uma nova espécie do gênero *Schistosoma*, que anos após (1907) seria denominada por Sambon como *Schistosoma mansoni* em homenagem ao seu descobridor.

A primeira descrição de *Schistosoma mansoni* no Brasil foi realizada por Pirajá da Silva, após descrever 4 casos na Bahia, quase simultaneamente à descoberta da espécie, em 1908. As observações independentes de Pirajá da Silva contribuíram muito para a constatação de uma nova espécie de *Schistosoma*, embora a denominação dessa nova espécie tenha ficado a critério de Sambon (KATZ, 2008).

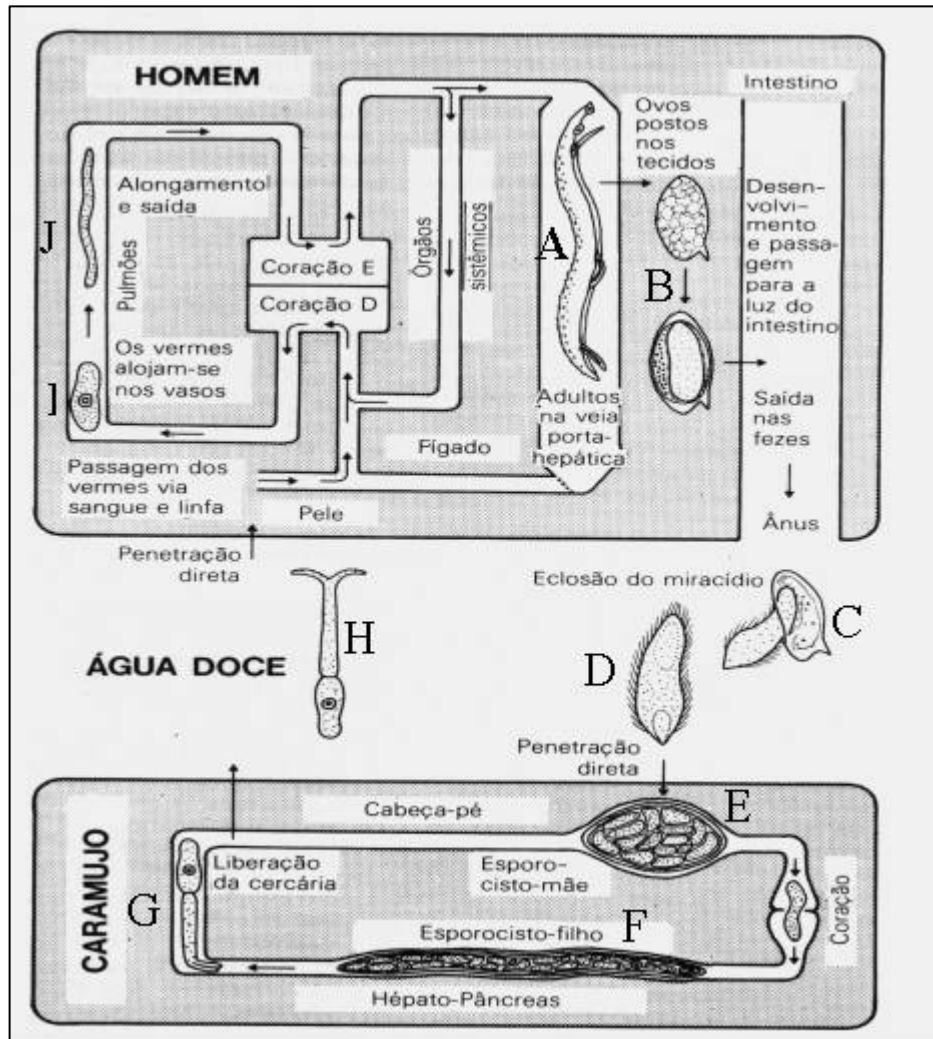
No Brasil, a esquistossomose foi provavelmente introduzida através dos portos de Salvador e Recife, com o tráfico de escravos africanos. Estabelecidos os primeiros focos, a doença dispersou-se inicialmente por contiguidade. Após alguns anos a doença

se disseminou pelo território brasileiro devido às migrações internas, impulsionadas pelos ciclos econômicos da borracha, do café e do ouro, sempre condicionados à existência de moluscos transmissores (ARAÚJO, 1986).

### **1.3 Biologia do *Schistosoma mansoni***

O parasita *Schistosoma mansoni* apresenta um ciclo biológico heteroxênico envolvendo dois hospedeiros (vertebrado e invertebrado) e diferentes fases de vida aquática. O ciclo de vida do parasita pode ser observado na Figura 1.

Os vermes adultos habitam o sistema porta-hepático de hospedeiros vertebrados, onde ocorre o pareamento de casais para a reprodução sexuada. Na fase adulta observamos um acentuado dimorfismo sexual que não pode ser notado em estágios larvais. O macho adulto apresenta coloração branca e mede, em média, 1 cm de comprimento. Na região anterior do corpo se distingue a ventosa oral e a ventosa ventral, também denominada de acetábulo. Na região posterior se encontra o canal ginecóforo, onde ocorre a fecundação das fêmeas. Seguindo a ventosa oral, encontra-se o esôfago, que se bifurca com o acetábulo para formar um único ceco que termina na extremidade posterior. Após o acetábulo encontram-se sete a nove massas testiculares que se abrem diretamente no canal ginecóforo através de um poro genital. No momento do acasalamento, os espermatozóides são lançados no canal ginecóforo, onde a fêmea está abrigada para a fecundação. As fêmeas medem cerca de 1,5 cm e apresentam uma coloração acinzentada escura e tegumento liso. Assim como os machos, apresentam a ventosa oral e o acetábulo na região anterior. Seguindo o acetábulo encontramos a vulva e o útero, alojando 1 a 2 ovos e o ovário. Na região posterior encontra-se o ceco e as glândulas vitelogênicas (REY, 2002).



**Figura 1.** Ciclo evolutivo do parasito *Schistosoma mansoni*. Durante o desenvolvimento, o parasita 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 de Wilson, 1980).

O pareamento de casais ocorre após a maturação sexual, entre 30 a 40 dias após a infecção e resulta na liberação de ovos embrionados no interior das veias mesentéricas. Uma fêmea adulta pode produzir aproximadamente 300 ovos por dia. Os ovos são imaturos no momento da postura e devem atingir a luz intestinal para que ocorra a sua maturação e eliminação juntamente com as fezes. O ovo do parasita mede

aproximadamente 150  $\mu\text{m}$  de comprimento e 60  $\mu\text{m}$  de largura. Seu formato é oval e apresenta na parte mais larga uma espícula voltada para trás. No momento em que as fezes atingem um ambiente aquático, após eliminação pelo hospedeiro, ocorre a ruptura da casca e a liberação de um miracídio. O estímulo para a eclosão dos ovos é primeiramente a hipotonicidade do meio aquático, mas também condições de temperatura e iluminação adequadas. Um miracídio apresenta medidas semelhantes às dos ovos, formato oval e tegumento recoberto de cílios responsáveis pela locomoção na água. Na porção posterior encontram-se as células germinativas que originarão os esporocistos. Na porção anterior observa-se o *terebratorium*, que possui funções sensoriais e de penetração. Os miracídios nadam ativamente na água por movimentos ciliares, orientados por fototropismo positivo. Assim os miracídios nadam para a superfície, local onde normalmente se localizam os moluscos hospedeiros. A penetração dos miracídios em moluscos *Biomphalaria* ocorre com a fixação no tegumento dos caramujos, através de glândulas adesivas. A ação das glândulas do *terebratorium* e os movimentos rotativos da larva fazem com que ocorra a penetração.

Após penetrarem no caramujo as larvas sofrem modificações morfológicas e originam um estágio proliferativo de reprodução assexuada, denominado esporocisto primário. Um esporocisto mede aproximadamente 1,5 mm de comprimento e 150  $\mu\text{m}$  de largura. Não possui um formato definido e possui em seu interior cerca de 150 a 200 células germinativas. A multiplicação dessas células germinativas dá origem a esporocistos secundários, que migram para o hepatopâncreas e ovotéstis do molusco. Nestes locais, cada esporocisto secundário é capaz de dar origem a um grande número de cercárias ou, ainda, a um esporocisto terciário. As cercárias apresentam duas porções, medindo 500  $\mu\text{m}$  no total: o corpo e a cauda. O corpo apresenta cutícula recoberta com pequenos espinhos e duas ventosas: oral e ventral. Possui um tubo digestivo, glândulas

cefálicas de adesão e de penetração, e o primórdio genital. A cauda mede 300 µm e possui uma bifurcação terminal. A liberação de cercárias no ambiente aquático ocorre devido a estímulos luminosos e de temperatura. Após serem liberadas as cercárias nadam ativamente na água através de movimentos vibratórios de sua cauda. Este estágio é o responsável pela infecção do hospedeiro mamífero, no qual penetra ativamente através da pele utilizando proteases.

Durante a penetração, a cercária perde a sua cauda e dá origem a um esquistossômulo que, se não for destruído pelo sistema imune do hospedeiro, atinge a circulação sanguínea. A partir do local da penetração os esquistossômulos são então transportados ao coração e aos pulmões. Após uma semana, os esquistossômulos já podem ser encontrados no sistema porta-hepático onde concluem o seu desenvolvimento na forma adulta.

#### **1.4 Respostas imunológicas dos hospedeiros**

A infecção pelo *Schistosoma mansoni* não é aceita de maneira passiva pelos organismos hospedeiros. Inúmeros mecanismos de defesa têm sido descritos, cuja função primária consiste na manutenção de níveis parasitários compatíveis com a sobrevivência do hospedeiro. Esses mecanismos de defesa, no entanto, raramente garantem a completa eliminação do parasita, que possui numerosos processos de evasão das respostas criadas pelos seus hospedeiros. Existem relatos de vermes adultos capazes de sobreviver por mais de 30 anos no organismo humano sem danos aparentes (CROSS et al, 2007).

No hospedeiro vertebrado podemos distinguir duas fases da infecção: a fase aguda, logo após o primeiro contato com o parasita; e a fase crônica, após um longo período de infecção sem tratamento (CALDAS et al, 2008). Alguns mecanismos

imunológicos para a proteção contra a infecção por *S. mansoni* diferem sensivelmente entre essas duas fases. A fase aguda é caracterizada pela disseminação de granulomas, principalmente no fígado, em resposta aos antígenos dos ovos. A formação dos granulomas é mediada por linfócitos T “helper” CD4+, com conseqüente infiltrado celular, constituindo-se de eosinófilos, neutrófilos, mastócitos, macrófagos e fibroblastos (METWALI et al, 1996). A resposta celular *in vitro* contra antígenos de ovos, em pacientes na fase aguda da esquistossomose, é extremamente elevada, quando comparada a pacientes em fase crônica (CALDAS et al, 2008; HAGAN, 1987). A mudança da infecção da fase aguda para a fase crônica é acompanhada de uma mudança nos níveis de algumas citocinas alterando o padrão predominante de Th1 para Th2 (PEARCE ET AL 1991; STADECKER et al, 2004). A resposta humoral (IgG, IgM e IgE) contra antígenos dos ovos é, aparentemente, equivalente em pacientes com esquistossomose aguda ou crônica em ambos as fases da infecção pelo *S. mansoni*. Outras formas do parasita, como esquistossômulos e vermes adultos também são reconhecidas por anticorpos, que podem ser citotóxicos na presença de células efetoras como eosinófilos e macrófagos.

Apesar de ser um tema pouco investigado, o molusco hospedeiro também possui mecanismos de defesa contra a infecção por *S. mansoni*. Após penetrar no tegumento do caramujo, os miracídios entram em diretamente em contato com a hemolinfa. Hemócitos, células presentes na hemolinfa, atuam como leucócitos fagocitadores típicos, encapsulando larvas de trematódeos como *S. mansoni* (BAYNE et al, 2001). O mecanismo utilizado pelos hemócitos aparentemente está relacionado com a produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio. Ao estudar linhagens de *B. glabrata* sensíveis e resistentes à infecção por *S. mansoni*, Hahn et al (2001) observaram um aumento expressivo na taxa de consumo de oxigênio em linhagens resistentes à



infecção. Esse aumento está relacionado com a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e é resultado da ativação de um complexo NADPH oxidase na membrana plasmática do fagócito (BAYNE et al, 2001). Adicionalmente, a inibição dessa enzima, aumenta a sensibilidade à infecção, o que sugere a importância desse processo na defesa do *B. glabrata* contra a infecção (HAHN et al, 2001).

### **1.5 Estresse oxidativo e mecanismos celulares de tolerância**

Apesar das diferenças apresentadas entre as células do sistema imunológico de moluscos e de vertebrados podemos destacar um mecanismo em comum: a grande produção de espécies reativas de oxigênio (KAZURA et al 1981; HAHN et al, 2001). Ao habitar os organismos de ambos os hospedeiros, o *S. mansoni* se expõe a grandes quantidades de EROs e, para sobreviver, possui um eficiente arsenal antioxidante.

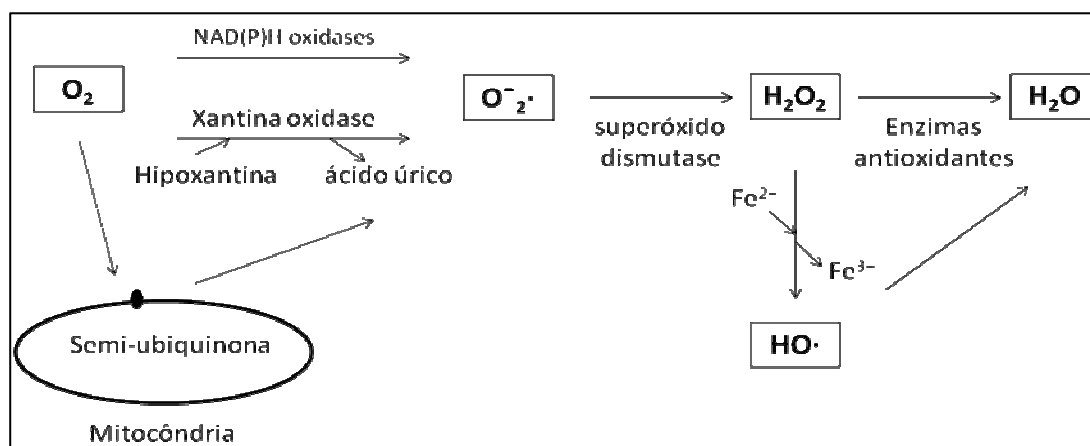
#### **1.5.1 Espécies reativas de oxigênio**

Organismos aeróbios necessitam de oxigênio para a síntese da maior parte de sua energia, na forma de ATP. No entanto, o oxigênio, através de diversos processos oxidativos, pode dar origem a uma série de intermediários reativos capazes de produzir sérios danos à célula (Tabela 1). Virtualmente, todos os tipos de células podem produzir EROs durante processos como respiração, metabolismo oxidativo de diversas moléculas ou ainda para proteção imunológica.

**Tabela 1.** Espécies reativas de oxigênio normalmente encontradas em sistemas biológicos

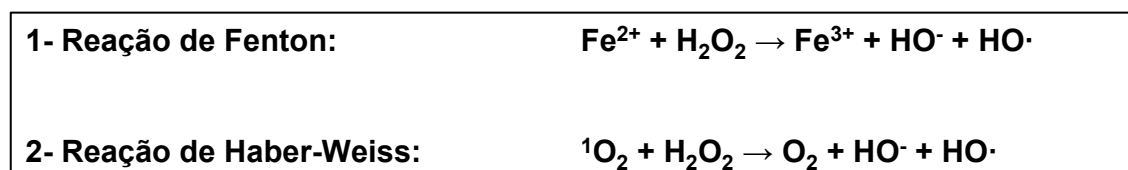
<b>Espécies reativas de oxigênio (EROs)</b>	
<b>Radicais</b>	<b>Não-radicais</b>
Superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )	Peróxido de Hidrogênio ( $H_2O_2$ )
Hidroxil ( $HO\cdot$ )	Ácido hipocloroso ( $HOCl$ )
Peroxil ( $RO_2\cdot$ )	Ácido hipobromoso ( $HOBr$ )
Alcoxil ( $RO\cdot$ )	Ozônio ( $O_3$ )
Hidroperoxil ( $HO_2\cdot$ )	Oxigênio singlete ( $^1O_2$ )

O mecanismo geral pelo qual as EROs são formadas em sistemas biológicos já está bem estabelecido (DRÖGE, 2002; VALKO et al, 2007; MURPHY, 2009) e se inicia com a redução do oxigênio molecular, em seu estado triplete ( $^3O_2$ ), resultando na formação ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) (Figura 2). Essa conversão pode ser mediada por diversos sistemas enzimáticos como NAD(P)H oxidases, xantina oxidase e citocromo p450, ou ainda ser produto de reações não-enzimáticas entre o oxigênio e moléculas “redox-reativas” como a semi-ubiquinona, componente da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. O ânion superóxido é extremamente reativo e, por isso, as células o convertem rapidamente a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), em uma reação catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) (FRIDOVICH, 1978, DRÖGE, 2002). Em tecidos biológicos, o ânion superóxido pode ainda ser convertido em uma reação não-enzimática a EROs não-radicalares, como peróxido de hidrogênio e oxigênio singlete ( $^1O_2$ )(KHAN, 1970). Apesar de sua elevada reatividade, a curta meia-vida do ânion superóxido o torna pouco relevante quando tratamos de organismos biológicos.



**Figura 2.** Vias de formação e de eliminação de espécies reativas de oxigênio. (Adaptado de DRÖGE, 2002).

Apesar de ser pouco reativo com os componentes celulares, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é normalmente considerado a mais importante ERO em sistemas biológicos, devido à sua abundância e à sua capacidade de formar intermediários reativos. Na presença de metais de transição reduzidos ou de oxigênio singlete, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode ser convertido no radical reativo hidroxila ( $\text{HO}\cdot$ ), conforme podemos observar nas reações de Fenton e de Harber-Weiss (Figura 3) (KEHRER, 2000; DRÖGE, 2002; IMLAY, 2008). Por fim, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode ser convertido em água por enzimas como catalase e glutathiona peroxidase (Figura 2).



**Figura 3.** Reações de formação do radical reativo hidroxila.

### 1.5.2 Estresse oxidativo

As concentrações de EROs em uma célula são estreitamente reguladas pelos diversos sistemas antioxidantes existentes, em níveis extremamente baixos. Uma alteração desse equilíbrio oxidorreduzidor, com aumento dos níveis de EROs, resulta em uma condição conhecida como estresse oxidativo. Devido à sua alta reatividade, uma elevação da concentração de EROs pode representar um grave problema para a integridade da célula. Praticamente todas as biomoléculas são alvos potenciais para EROs, com destaque para proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos.

Todos os grupamentos da molécula do DNA, incluindo o esqueleto de desoxirribose e as bases purínicas e pirimidínicas, podem reagir com EROs. A modificação de ácidos nucleicos possui um papel de destaque entre os danos celulares oxidativos, em virtude da função desta macromolécula na manutenção da informação genética dos diversos organismos. Nos eucariotos superiores, a complexidade da informação do genoma faz com que a modificação permanente do material genético, por agentes oxidantes, esteja associada a processos como mutagênese, carcinogênese e envelhecimento celular (VALKO et al, 2007; NAKABEPPU et al, 2006). Existem diferentes tipos de danos oxidativos possíveis, entre os quais o mais bem conhecido e abundante é a formação de 8-oxo-G (VALKO et al, 2007). Para evitar o comprometimento da informação contida no genoma, os danos produzidos por EROs devem ser corrigidos pelos diferentes mecanismos de reparo de DNA. Evidências mostram que os danos oxidativos na molécula do DNA são reparados principalmente pelo mecanismo de excisão de bases (DAVID et al, 2007). Pacientes com mutações no gene MYH, que codifica para proteínas da via de reparo por excisão de bases, aumentam a ocorrência de carcinomas com o padrão de mutação G:C – T:A, sugerindo a importância desta via de reparo para a correção de danos oxidativos (AL-TASSAN et

al, 2004). No processo de reparo, uma DNA-glicosilase específica remove a base danificada, originando um sítio AP. Esse sítio é processado por uma AP endonuclease e, por fim, a simples quebra é reparada pela ação de uma polimerase e uma ligase.

Além do DNA, os ácidos graxos poli-insaturados presentes nos fosfolipídios de membranas também são sensíveis à oxidação por EROs. A peroxidação dos ácidos graxos resulta na formação do radical peroxila ( $RO_2\cdot$ ) que, por sua vez, pode retirar um átomo de hidrogênio de outro ácido graxo, estabelecendo uma reação em cadeia. O hidroperóxido lipídico resultante é instável e pode se decompor em diversos metabólicos tóxicos como malondialdeído e 4-hidroxi-2-nonenal (VALKO et al, 2007). A danificação de membranas através da peroxidação de lipídios é um dos principais fatores de toxicidade das EROs podendo levar ao comprometimento da função celular e até à morte celular.

As proteínas constituem outro grupo de moléculas que podem ser modificadas por EROs. As cadeias laterais de todos os aminoácidos presentes em proteínas são suscetíveis a EROs, gerando inúmeros produtos oxidativos diferentes (SHACTER, 2000). No entanto, dois aminoácidos, cisteína e metionina, são especialmente suscetíveis à oxidação por conterem um grupo sulfidril ( $-SH$ ) (VALKO, 2007). Essas modificações oxidativas, dependendo da proteína atingida, podem levar a alterações na sua função, à fragmentação, à perda de conformação e ao aumento na suscetibilidade ao ataque proteolítico. Em geral, o destino de uma proteína oxidada é a degradação pelos sistemas proteolíticos celulares, principalmente, o proteassoma 26S. Algumas proteínas, no entanto, podem ser recuperadas por alguns sistemas enzimáticos capazes de reduzir as cadeias laterais oxidadas de alguns aminoácidos. A tioredoxina e a metionina sulfóxido-redutase são exemplos mais conhecidos de enzimas capazes de reparar

proteínas oxidadas, atuando, respectivamente, sobre resíduos de cisteína e metionina oxidados.

### **1.5.3 Visão geral dos sistemas antioxidantes**

Conforme citado anteriormente, as células possuem mecanismos antioxidantes, capazes de neutralizar as EROs formadas durante o seu metabolismo normal. O complexo sistema antioxidante é normalmente dependente de muitos fatores, tanto enzimáticos como não-enzimáticos, que podem remover ou impedir a formação de EROs celulares, além de minimizar os danos celulares.

Algumas enzimas são particularmente importantes na eliminação de EROs. Tanto em eucariotos como em procariotos, a metaloenzima superóxido dismutase (SOD) é a principal responsável pela conversão do ânion superóxido nas espécies menos reativas  $H_2O_2$  e  $O_2$ . Nos organismos eucariotos são descritas três isoformas: a mitocondrial, contendo manganês (Mn-SOD, SOD-2); a citosólica, contendo cobre ou zinco (SOD-1); e a extracelular, contendo também cobre e zinco (WASSMANN et al, 2004; JOHNSON e GIULIVI, 2005).

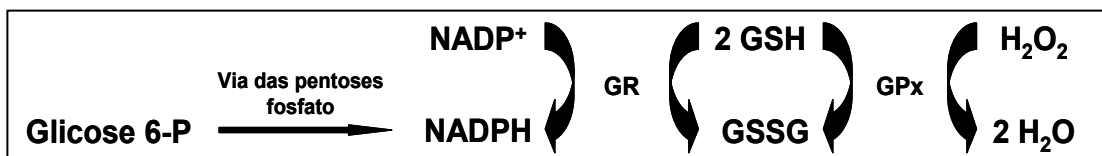
O  $H_2O_2$  resultante da ação da SOD é um importante sinalizador do estresse oxidativo, conforme descrito anteriormente. Como o acúmulo desta ERO pode desencadear a formação de radicais extremamente reativos, existe um complexo sistema enzimático responsável pela transformação do  $H_2O_2$  em espécies menos reativas. Na maioria dos organismos, a principal dessas enzimas é a catalase, uma heme-peroxidase capaz de transformar o  $H_2O_2$  em água e oxigênio molecular com grande eficiência. Essa enzima é encontrada principalmente nos peroxissomos e, em menor grau, no citoplasma das células da maioria dos organismos. No entanto, outras peroxidases também podem desempenhar um papel importante na detoxificação do  $H_2O_2$ . Entre essas enzimas

podemos destacar a seleno-proteína glutathiona peroxidase (GPx). Essa enzima cataliza a redução de peróxidos orgânicos e  $H_2O_2$  utilizando como substrato redutor o tri-peptídeo glutathiona. Durante a reação a glutathiona é convertida na sua forma dissulfeto, conforme pode ser observado na Figura 4. Recentemente, foi descoberto um novo grupo de peroxidases, chamadas de peroxirredoxinas (Prx). Essas enzimas possuem uma ou duas cisteínas em domínio N-terminal capazes de reduzir hidroperóxidos, como o  $H_2O_2$  (HOFMANN et al, 2002). A reação destas cisteínas com algum hidroperóxido produz um derivado do ácido sulfênico, que pode reagir com qualquer molécula contendo um grupamento  $-SH$  para formar pontes dissulfeto.

Em adição aos mecanismos antioxidantes enzimáticos, algumas moléculas de baixo peso molecular podem exercer um papel importante na eliminação de EROs. Nas células humanas e de animais, esses antioxidantes podem ser de origem endógena, como a glutathiona, a ubiquinona e alguns aminoácidos, ou serem adquiridos através da dieta, como o ácido ascórbico (vitamina C), carotenóides, flavonóides e  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) (VALKO et al, 2007; SEIFRIED et al, 2007).

A glutathiona (GSH) possui um papel central no controle do sistema antioxidante, muito além da sua ação direta sobre EROs. Entre as funções desse peptídeo no controle do estresse oxidativo podemos citar: 1- A glutathiona é um cofator para diversas enzimas que atuam na detoxificação de EROs, como as glutathionas peroxidases; 2- A glutathiona pode participar do transporte de aminoácidos através da membrana plasmática das células; 3- Atuar diretamente sobre EROs, eliminando-as; 4- Regenerar importantes moléculas antioxidantes, como o ácido ascórbico e o  $\alpha$ -tocoferol, tornando-os novamente ativos (MARSELLA et al, 2005). A glutathiona alterna entre as formas tiol, reduzida (GSH), e dissulfeto, oxidada (GSSG). A oxidação da GSH por EROs, formando GSSG, pode reduzir a disponibilidade celular desse peptídeo, reduzindo a

fração GSH/GSSG intracelular. A GSSG pode, no entanto, ser novamente reduzida à GSH através da reação catalisada pela enzima glutathiona redutase, a qual utiliza NADPH como substrato redutor (Figura 4). Diversos mecanismos de sinalização celular podem responder a variações intracelulares na fração tiol/dissulfeto permitindo a modulação dos sistemas antioxidantes. Um exemplo é a proteína bacteriana OxyR, a qual pode ser ativada tanto por  $H_2O_2$  como por alterações no estado redox da glutathiona (SLUND et al, 1999). Diversas proteínas regulatórias presentes em eucariotos também foram descritas serem sensíveis a variações no estado redox de tióis, entre as quais podemos citar as proteínas tirosino-fosfatases e o fator de transcrição NF- $\kappa$ B em células T humanas.



**Figura 4.** Ciclo “redox” da glutathiona e seu papel antioxidante. Durante a redução de EROs pela enzima glutathiona peroxidase, a glutathiona é convertida à sua forma dissulfeto (GSSG). O balanço tiol/dissulfeto é mantido pela ação da enzima glutathiona redutase (GR) que utiliza NADPH como substrato redutor na conversão de dissulfeto de glutathiona em glutathiona livre. (Adaptado de Circu & Yee Aw, 2008)

Em uma visão mais ampla, as defesas contra o agentes oxidantes envolvem diferentes processos celulares coordenados, objetivando: 1- Eliminar EROs formadas pelas células; 2- Prevenir a formação de EROs; 3- Reparar danos decorrentes da reação de EROs com estruturas celulares; 4- Conservar a viabilidade do organismo. Os sistemas de sequestrantes de EROs descritos anteriormente nesta seção, tem a função básica de proteção das células contra o estresse oxidativo, prevenindo a formação e eliminando as EROs no interior da célula. Mesmo com o eficiente sistema antioxidante



que as células possuem, as EROs inevitavelmente produzem danos sobre moléculas como DNA e proteínas, sendo necessário o seu reparo. Porém, durante o estresse oxidativo, o dano pode ser demasiadamente extenso para que ocorra o reparo, tornando a célula inviável. Nesse contexto, as defesas antioxidantes incluem ainda processos como a apoptose, evitando danos nas demais células de um organismo multicelular (DRÖGE, 2002).

### **1.6 Proteólise mediada pelo proteassoma 26S durante o estresse oxidativo**

Durante o estresse oxidativo, em eucariotos, a proteólise intracelular é um processo extremamente importante, tanto para a eliminação de proteínas oxidadas como para o controle da expressão gênica. Entre os diferentes mecanismos proteolíticos, o sistema dependente de ubiquitina-proteassoma é o mais importante na regulação de processos como o estresse oxidativo, devido à sua alta seletividade (CIECHANOVER, 2005).

A via proteolítica dependente de ubiquitina e proteassoma é formada por dois componentes principais: o sistema de ubiquitinação e um complexo protéico multicatalítico denominado proteassoma 26S (GLICKMAN & CIECHANOVER, 2002). Entende-se por sistema de ubiquitinação o grupo de enzimas e proteínas envolvidas na marcação de um substrato-alvo com uma ou mais moléculas de ubiquitina.

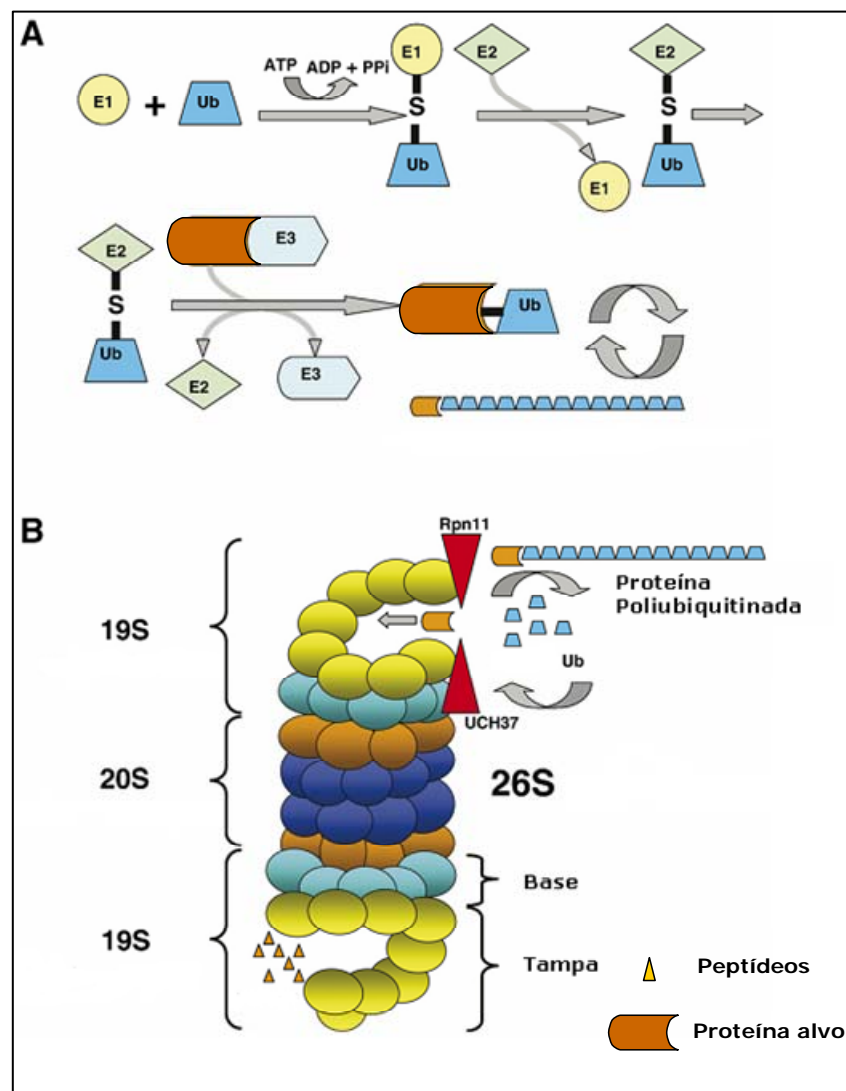
A ubiquitina é uma proteína extremamente conservada, constituída de 76 aminoácidos (8 kDa), e uma estrutura globular extremamente estável. A adição da molécula de ubiquitina a um substrato-alvo ocorre através de uma ligação isopeptídica entre o grupo  $\alpha$ -carboxilo do resíduo de glicina C-terminal e o grupo  $\epsilon$ -amino de algum resíduo de lisina da proteína modificada. A ligação isopeptídica pode ocorrer ainda

entre duas moléculas de ubiquitina permitindo a poli-ubiquitinação de substratos. Dos 7 resíduos de lisina presentes na sequência primária da ubiquitina, 3 permitem a formação de ligações isopeptídicas *in vivo*: Lys 29, Lys 48 e Lys 63 (HOFMANN & PICKART, 2001). As diferenças estruturais observadas entre essas 3 configurações de cadeias de poliubiquitina resultam na modulação de diversos eventos celulares, envolvendo ou não, a proteólise pelo proteassoma 26S (PICKART, 2001; SCHENELL & HICKE, 2003). As reações de conjugação com os substratos envolvem normalmente 3 etapas: 1- a ativação ATP-dependente do resíduo de glicina C-terminal da ubiquitina, catalisada pela enzima ativadora de ubiquitina (E1); 2- a transferência da molécula de ubiquitina ativada para uma enzima conjugadora de ubiquitina (E2) e; 3- ligação da ubiquitina ao substrato-alvo, através da ação de uma E2 ou de uma enzima ubiquitina ligase (E3) (Figura 5)(GLICKMANN & CIECHANOVER, 2002).

O proteassoma 26S, responsável pela degradação de proteínas ubiquitinadas, é um complexo proteolítico de 2.4 MDa composto de duas estruturas: um centro catalítico central (coeficiente de sedimentação 20S) e um ou dois elementos regulatórios denominados (coeficiente de sedimentação 19S) (Figura 5). O proteassoma 20S é uma estrutura cilíndrica com 28 subunidades dispostas em 4 anéis heptaméricos. Os anéis externos são compostos de subunidades  $\alpha$  e os internos de subunidades  $\beta$ . No interior dos anéis centrais, encontram-se três subunidades responsáveis pelas atividades catalíticas do proteassoma:  $\beta$ -1 (atividade peptidil pos-glutamil hidrolase),  $\beta$ -2 (atividade tripsina-símile) e  $\beta$ -5 (atividade quimiotripsina-símile)(GROLL & HUBER, 2004). Enquanto o proteassoma 20S possui atividade proteolítica, o complexo regulatório é responsável pelo reconhecimento, ligação, desenovelamento, deubiquitinação, e direcionamento dos substratos para a degradação. Esta estrutura é

composta de ao menos 17 subunidades e liga-se a uma ou ambas as extremidades do centro 20S, ajustando-se diretamente sobre os anéis  $\alpha$  (KOHLENER et al, 2001).

Proteínas oxidadas devem ser degradadas para evitar a formação de agregados envolvidos no envelhecimento celular. De fato, pode ser observado um aumento na atividade proteolítica intracelular em decorrência da exposição a agentes oxidantes (GRUNE et al, 1997). Sitte et al (1998) mostraram que, na presença do inibidor de proteassoma lactacistina, a eliminação de grupos oxidados das proteínas de fibroblastos não ocorria, indicando que esse processo é mediado principalmente pelo proteassoma. A degradação pelo proteassoma de proteínas oxidadas *in vitro*, no entanto, não mostra dependência de ATP, sugerindo que esse processo envolve a participação do centro catalítico 20S e não do complexo 26S como seria de se esperar (GRUNE, 2000). Em concordância com essa hipótese, Shang et al (1997), observaram um acúmulo de conjugados poliubiquitinados em células expostas ao estresse oxidativo, indicando uma inibição da atividade ATP-ubiquitina dependente do proteassoma. Reinheckel et al (2000) demonstraram que, de fato, mediante o estresse oxidativo sub-letal, a atividade do proteassoma 26S é reduzida por um período, sendo rapidamente recuperada.



**Figura 5.** Via proteolítica dependente de ubiquitina e proteassoma. A – Via de ubiquitinação ATP-dependente; B – Proteólise mediada pelo proteassoma 26S (Adaptado de Naujokat et al, 2007).

A ativação do proteassoma durante o estresse oxidativo ainda não está bem estabelecida. Recentemente, estudos sugerem que a degradação de proteínas oxidadas envolve a participação de um complexo formado pela proteína chaperona-símile HSP90 e o proteassoma 20S (SQUIER, 2006). No interior do núcleo celular, um outro mecanismo de ativação do proteassoma foi descrito. A proteína poli (ADP-ribose) polimerase 1 (PARP-1), um dos principais sensores celulares do estresse oxidativo,

pode associar-se ao proteassoma 20S, resultando na degradação seletiva de histonas oxidadas (BREUSING & GRUNE, 2008).

Além da degradação de proteínas oxidadas, diversos eventos regulatórios relacionados com o estresse oxidativo requerem a participação do proteassoma. Esses eventos incluem o controle do ciclo celular, a apoptose e a regulação transcricional (GLICKMANN & CIECHANOVER, 2002).

### **1.7 O estresse oxidativo como um alvo terapêutico no tratamento da esquistossomose mansônica**

Embora existam inúmeras iniciativas para o desenvolvimento de uma vacina contra o *S. mansoni*, esse objetivo ainda está distante de ser atingido. Os mecanismos de evasão do sistema imune deste parasita tornam as estratégias utilizadas até hoje impraticáveis contra ele. Portanto, o tratamento medicamentoso deve, a curto e médio prazos, continuar sendo a forma mais eficaz de combater a esquistossomose.

Recentemente, novas drogas contra o *S. mansoni* tem sido desenvolvidas, com diferentes mecanismos de ação. A indução do estresse oxidativo em vermes adultos tem sido considerada uma abordagem extremamente interessante para novas estratégias de tratamento. Essa indução pode ocorrer tanto pela inibição do sistema antioxidante de um organismo como pelo aumento da formação de EROs. Nesse contexto, a inibição de enzimas envolvidas na proteção antioxidante de *S. mansoni* tem sido considerada uma abordagem interessante para o tratamento medicamentoso da esquistossomose (SIMEONOV et al, 2008). A principal desvantagem do uso de inibidores enzimáticos no controle de agentes infecciosos é a possibilidade do desenvolvimento de resistência à droga. Diante deste cenário, a indução do estresse oxidativo pelo aumento da formação de EROs, via fotossensibilização, tem sido considerada uma estratégia promissora no

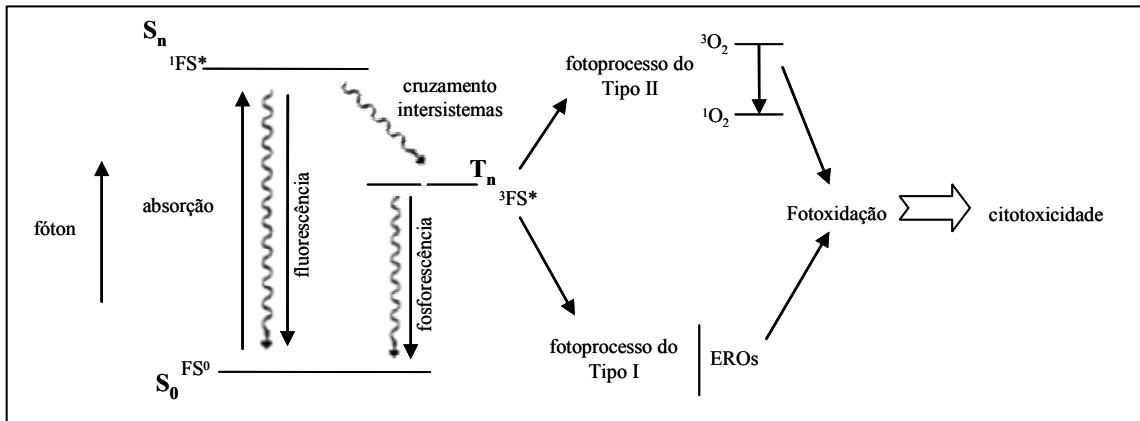
combate de diversas doenças que envolvem o risco de desenvolvimento de resistência à quimioterapia convencional como o câncer e doenças infecciosas (CAPELLA & CAPELLA, 2003; HAMBLIM & HASAN, 2004).

### **1.7.1 Fotossensibilizadores e terapia fotodinâmica**

Fotossensibilizadores são compostos atóxicos ou pouco tóxicos, inativos em seu estado fundamental, capazes de absorverem luz com comprimento de onda visível (400-700 nm). Ao absorver luz em um comprimento de onda apropriado, a molécula do fotossensibilizador é excitada, levando a uma série de transferências moleculares de energia que culminam com a produção de EROS como oxigênio singlete, ânion superóxido e o radical hidroxila. Embora o conceito de morte celular induzida pela interação entre luz e substâncias químicas seja conhecido há mais de um século, o interesse por fotossensibilizadores tem aumentado nos últimos anos e novos fotossensibilizadores estão sendo desenvolvidos em virtude do seu uso no tratamento de tumores e na fotoinativação de patógenos em diversos sistemas biológicos (TEGOS et al, 2005; GORMAN et al, 2006).

O termo terapia fotodinâmica foi usado pela primeira vez por fisiologistas alemães, no início do século XX, para descrever danos em tecidos vivos, provocados pela combinação de três fatores: fotossensibilizador, luz e oxigênio (STRAKHOVSKAYA et al, 2002). Conforme citado anteriormente, a administração do fotossensibilizador, seguida pela exposição das células ou tecidos a radiações com comprimentos de onda capazes de ativar a molécula fotossensibilizadora, que, na presença de oxigênio, pode matar ou inativar as células-alvo devido à formação de diversas espécies reativas de oxigênio (EROs) (KOCHEVAR et al., 1996).

Após exposição à luz, o fotossensibilizador pode absorver um fóton, passando de seu estado fundamental ( $FS^0$ ) para o estado excitado singlete ( $^1FS^*$ ). Esse estado tem um tempo de vida curto, da ordem de nanosegundos, o que dá à molécula pouco tempo para interagir com o meio circundante, limitando o seu raio de ação (HARRIS et al, 2006). O fotossensibilizador pode dissipar esta energia adicional de diversas maneiras. Ele pode retornar ao estado fundamental pela emissão da energia absorvida através de um processo radiativo (fluorescência) ou não radiativo (conversão interna ou relaxamento vibracional), em que a energia é perdida como calor para o meio circulante. Uma outra rota de desativação do estado  $^1FS^*$  envolve um processo não-radiativo, no qual a molécula do fotossensibilizador no estado excitado  $^1FS^*$  passa para um estado excitado triplete ( $^3FS^*$ ). Na presença de moléculas reativas, como oxigênio molecular e substratos ricos em oxigênio, o estado triplete pode desencadear reações fotodinâmicas com produção de um ou mais tipos de EROs. Existem dois tipos básicos de processos fotodinâmicos capazes de produzir EROs, que são conhecidos por fotoprocessos do Tipo I e do Tipo II. Ambos os processos requerem oxigênio para ocorrer. O fotoprocessos do Tipo I envolve reações de transferência de elétrons do estado triplete do fotossensibilizador, com a participação de um substrato, para produzir radicais iônicos que podem reagir com o oxigênio, produzindo espécies citotóxicas, como o ânion superóxido e radical hidroxila. O fotoprocessos do Tipo II envolve transferência de energia do estado triplete do fotossensibilizador para o oxigênio molecular, com nível basal de energia, produzindo o estado excitado oxigênio singlete (HARRIS et al, 2006). As etapas fotoquímicas e fotofísicas envolvidas na fotossensibilização estão representadas na figura 6.



**Figura 6.** Etapas fotoquímicas e fotofísicas envolvidas no processo de fotossensibilização (Diagrama de Jablonski).



## ***2 Objetivos***

## 2.1 Objetivo geral

O parasita *S. mansoni* possui um ciclo complexo envolvendo dois hospedeiros e fases de vida aquática. Durante os estágios em que habita organismos do homem e outros mamíferos, o estresse oxidativo gerado em resposta à infecção representa um dos principais fatores de agressão ao parasita, que por sua vez deve possuir uma maquinaria bioquímica de resposta a esta condição. Neste sentido, o objetivo geral deste trabalho foi caracterizar a dinâmica dos eventos biológicos e bioquímicos envolvidos na resposta de vermes adultos de *S. mansoni* ao estresse oxidativo. Adicionalmente também avaliamos a fotossensibilização como uma nova estratégia para o combate à esquistossomose.

## 2.2 Objetivos específicos

- 1 – Determinar a concentração de peróxido de hidrogênio capaz de produzir um dano sub-letal a vermes adultos de *S. mansoni*.
- 2 – Determinar a capacidade de depuração de vermes adultos após exposição a uma única dose de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- 3 – Quantificar o dano oxidativo ao DNA resultante de exposição sub-letal de vermes adultos ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- 4 – Analisar a atividade proteolítica exógena em vermes submetidos ao tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

5 – Investigar, por eletroforese bidimensional, o perfil de expressão de proteínas de vermes adultos após indução de estresse oxidativo com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

6 – Identificar as proteínas mais importantes envolvidas na resposta ao estresse oxidativo por espectrometria de massa.

7 – Investigar a modificação por ubiquitina em proteínas identificadas por espectrometria de massa.

8 – Avaliar a eficácia da fotossensibilização na eliminação de vermes adultos de *S. mansoni*.

### ***3 Material e Métodos***

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

O ciclo biológico do parasita *S. mansoni* é mantido rotineiramente no laboratório de biologia molecular de parasitas, localizado no Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. Resumidamente, a linhagem LE do parasita é utilizada em infecções seriadas em caramujos *B. glabrata* e camundongos das linhagens Swiss ou Balb/C pesando entre 20 e 30 gramas.

Para a obtenção de ovos de *S. mansoni*, as fezes de camundongos previamente infectados com 200 cercárias foram coletadas, entre 45 e 48 dias após a infecção, e utilizadas para purificação dos ovos de acordo com o método de Hoffmann (1934). Os ovos foram ressuspensos em água deionada e expostos à luz artificial (lâmpadas de 60 W) durante uma hora para eclosão dos ovos e liberação dos miracídeos. Aproximadamente 18 miracídeos foram coletados com uma pipeta de “Pasteur” e utilizados para infectar cada um dos moluscos da espécie *B. glabrata*. Essa infecção foi realizada durante um período de duas a três horas na presença de luz artificial (lâmpadas de 60 W) e temperatura aproximada de 28°C.

Após aproximadamente 40 dias de infecção, os moluscos foram expostos à luz visível (lâmpadas de 60 W) para que liberassem cercárias. Após a liberação, as cercárias foram transferidas para tubos de polipropileno de 50 mL (Corning, EUA), limpas e centrifugadas por 10 min, à 1500 g e à temperatura de 4°C (Eppendorf, Alemanha). As cercárias obtidas foram utilizadas para infectar artificialmente os camundongos. Aproximadamente 200 cercárias foram utilizadas para infectar cada roedor, por via subcutânea utilizando uma seringa de 1 mL e uma agulha de 0.8 mm.

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

Após aproximadamente 45 dias de infecção, os camundongos foram sacrificados e higienizados em etanol 70% (v/v) para perfusão asséptica. As cavidades abdominais e torácicas dos camundongos foram abertas e os vermes adultos, presentes no sistema porta-hepático, foram recuperados conforme o protocolo descrito por Smithers e Terry (1965). Após a perfusão, os vermes foram mantidos em meio RPMI (Invitrogen, EUA) pH=7.5, suplementado com 10% (v/v) soro fetal bovino (Gibco-BRL, EUA) e penicilina-streptomicina ( $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), no escuro. Os vermes obtidos foram imediatamente utilizados nos diferentes tratamentos empregados ou congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o uso.

### 3.3 Tratamento de vermes adultos de *S. mansoni* com peróxido de hidrogênio

Os vermes adultos obtidos através de perfusão asséptica foram utilizados para indução de estresse oxidativo por incubação com  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Aproximadamente 4 casais foram adicionados a cada poço de uma placa de cultura de células de poliestireno (TPP, EUA), contendo, por poço, 2 ml de meio RPMI (Invitrogen, EUA) pH=7.5, suplementado com 10% (v/v) soro fetal bovino (Gibco-BRL, EUA) e penicilina-streptomicina ( $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). Os vermes em cultura foram incubados por 24 h a  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  (v/v) e sob o abrigo da luz, sem a adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , para que o experimento não sofresse interferências do estresse resultante da perfusão. Após esse período de incubação, o estresse oxidativo foi induzido através da adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para uma concentração final entre 200 e  $1000 \mu\text{M}$ . Os vermes foram então incubados na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por 0 min (controle não-exposto), 30 min, 1 h ou 5 h, a  $37^{\circ}\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$ .

(v/v). Após as exposições os vermes foram retirados do meio, lavados e utilizados nos experimentos subseqüentes.

### **3.4 Ensaio de viabilidade dos vermes expostos ao peróxido de hidrogênio**

A viabilidade dos vermes adultos expostos aos diferentes tratamentos utilizados foi realizada através do método colorimétrico baseado na reação com o brometo de 3-(4,5-dimethyliazol-2-il)-2,5 difeniltetrazol (MTT) (NARE et al, 1991; GOLDBAUM et al, 2006). O reagente MTT é convertido, por mitocôndrias de células vivas, de um sal amarelo para um produto de formazan azul escuro, o qual pode ser quantificado por espectrofotometria. Para realizar o ensaio, casais provenientes de cada um dos tratamentos foram incubados por 30 min a 37°C com 100 µL de solução 1.2 M do reagente MTT em salina tamponada com fosfato (PBS). Foram adicionados controles de viabilidade positiva (Vermes não tratados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e negativa (vermes mortos por aquecimento durante 1 h a 70°C). Após esse período, o excesso dessa solução foi cuidadosamente removido e foram adicionados 200 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) e incubados por 1 h para a solubilização do produto de formazan. A viabilidade foi determinada através das leituras das absorbâncias em 575 nm das soluções resultantes do teste, utilizando solução de DMSO na calibração do espectrofotômetro (Shimadzu, Japão).

### **3.5 Quantificação de peróxido de hidrogênio no meio RPMI**

Após a perfusão asséptica, os vermes foram mantidos em meio RPMI a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> e ao abrigo da luz, por 24 h. Após esse período, foi adicionado H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ao meio de cultura (concentração final de 200 µM) e incubados nas mesmas condições por até

60 minutos. Durante as incubações, em intervalos de 10 minutos, foram coletadas alíquotas de 300  $\mu\text{L}$  do meio de cultura para determinação da concentração do  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

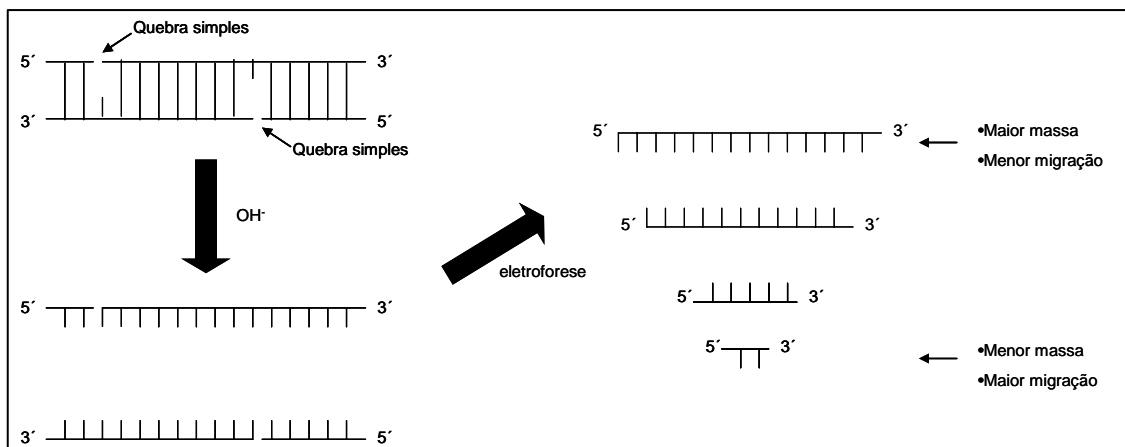
A quantificação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi realizada de acordo com o método descrito por Sunil e Narayana (2008) com modificações. Resumidamente, a cada uma das amostras coletadas (300  $\mu\text{L}$ ), foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de solução de iodeto de potássio 2% (m/v) e 100  $\mu\text{L}$  de solução de HCl 2 M. Em meio ácido, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode reagir com íons iodeto formando iodo molecular e água. Ao produto da reação, foram adicionados, em seguida, 50  $\mu\text{L}$  de solução 0.01% (m/v) de azul de toluidina e 200  $\mu\text{L}$  de acetato de sódio 2 M. Na presença de iodo, o corante azul de toluidina é mascarado, reduzindo a absorvância da solução. Como o decréscimo da absorvância é proporcional à quantidade de iodo, ele conseqüentemente reflete a concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  das amostras analisadas. O iodo formado foi então detectado pela leitura da absorvância em 628 nm. Uma alíquota coletada antes da adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi utilizada na calibração do espectrofotômetro (branco).

### **3.6 Determinação do dano ao DNA de vermes submetidos ao estresse oxidativo**

A quantificação dos danos oxidativos ao DNA de vermes adultos foi realizada de acordo com o método descrito por Sutherland et al (2006) com modificações. A técnica está baseada no princípio de que o dano ao DNA, resultante da exposição de EROs, pode resultar em quebras em uma das fitas da molécula do DNA. Isso pode ocorrer tanto diretamente pela oxidação do esqueleto de desoxirribose, como indiretamente através da ação de DNA glicosilases que participam do reparo por excisão de bases. Essas quebras tornam o DNA fragmentado, o que pode ser observado por eletroforese em um gel alcalino de agarose. Como resultado, o tamanho médio dos fragmentos de DNA em uma determinada amostra é inversamente proporcional à



migração no gel (Figura 7). Assim, a intensidade de dano em uma amostra pode ser estimada pela análise densitométrica dos géis obtidos.



**Figura 7.** Metodologia utilizada para a quantificação de danos oxidativos. A reação de EROs com moléculas de DNA produz diversas quebras simples. Após serem alcalinizadas, ocorre a separação da dupla fita do DNA resultando em diversos fragmentos de menor massa.

Resumidamente, cerca de 50 casais provenientes de cada um dos tratamentos descritos anteriormente, foram utilizados para a extração do DNA pelo método do DNazol (Invitrogen, EUA). Em seguida, as concentrações dos DNAs foram determinadas pela leitura da absorbância a 260/280 nm. Exatamente 5 µg do DNA de cada tratamento, diluídos em tampão de amostra alcalino (100mM NaOH, 4mM EDTA), foram aplicados ao gel alcalino de agarose 1% (m/v). A corrida eletroforética foi conduzida em tampão de alcalino (30 mM NaOH, 2 mM EDTA), por 3 h, a 0.3 V/cm<sup>2</sup>. Após a eletroforese, os géis foram neutralizados através de incubação por 30 minutos em solução de neutralização (0.5 M Tris-HCl, pH=7.4) e corados com solução de brometo de etídeo (1 µg/mL). Para evitar o excesso de brometo de etídeo, o que

comprometeria a qualidade das imagens, os géis foram descorados por 16 h em água deionizada.

As imagens dos géis foram adquiridas através de um fotodocumentador (Gel Doc, BioRad, EUA) utilizando o programa Quantity One (BioRad, EUA). As análises densitométricas foram realizadas neste mesmo programa e permitiram a determinação do tamanho médio dos fragmentos de DNA. Uma vez que a massa de DNA é diretamente proporcional à fluorescência do brometo de etídeo, é possível, determinar por densitometria a migração média dos fragmentos presentes no gel. O dano ao DNA foi estimado de acordo com a equação:

$$\Phi = (Lm_+)^{-1} - (Lm_0)^{-1}$$

Esta equação relaciona os tamanhos médios dos fragmentos de DNA de amostras expostas ( $Lm_+$ ) ou não ( $Lm_0$ ) ao estresse oxidativo. Os resultados foram expressos em quebras para cada 10 kb de DNA.

### **3.7 Obtenção do extrato protéico total de vermes adultos de *S. mansoni***

Para a obtenção dos extratos protéicos foram utilizados aproximadamente 50 casais. Após os diferentes tratamentos, os parasitas foram lavados através de adição de solução fisiológica. Após as lavagens os vermes foram transferidos para um microtubo, onde foram ressuspensos em 800  $\mu$ L do tampão de homogeneização [5 mM Tris-HCl, pH=8, glycerol 1% (m/v), 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 mM NEM and 0.1 mM MG132] em banho de gelo. Em seguida, os vermes foram lisados através de dois pulsos de 1 minuto em sonicador (21 kHz at 7  $\mu$ m amplitude), com intervalo de 1 minuto no gelo entre cada um. Este lisado, contendo as proteínas totais dos vermes, foi centrifugado por 30 minutos, a 12000 g e à 4°C, para a remoção de fragmentos celulares insolúveis. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro microtubo e

o precipitado foi descartado. Ao sobrenadante final foi adicionado glicerol para uma concentração final de 20%. Os extratos totais foram imediatamente utilizados ou estocados a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o uso.

Para os experimentos de eletroforese bidimensional, as proteínas totais presentes nos extratos obtidos foram precipitadas utilizando-se o Clean-Up Kit (GE Healthcare, Suécia). Para tanto, cerca de 500  $\mu\text{L}$  dos extratos foram tratados de acordo com o protocolo B do manual do fabricante. Ao final, o precipitado de proteínas foi ressuspensão em 50  $\mu\text{L}$  da solução de dissolução da amostra [7 M ureia, 2 M tiourea, CHAPS 4% (m/v)]. As concentrações de proteínas nos diferentes extratos foram determinadas utilizando-se o “BCA protein assay kit” (Pierce, EUA). O extrato purificado foi então imediatamente utilizado nos experimentos de eletroforese bidimensional ou estocado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **3.8 Determinação da atividade proteolítica exógena**

A atividade peptidásica do proteossoma presente na fração solúvel de vermes adultos foi determinada através da reação com o substrato fluorogênico Succinil-Leu-Leu-Val-Tyr-4-metil-cumaril-amida (SLLVT-MCA).

Nestes ensaios foram utilizadas 50  $\mu\text{g}$  de proteínas e 13  $\mu\text{M}$  do substrato SLLVT-MCA em tampão Tris-HCl, pH = 8.0,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, com ou sem ATP 5 mM. Os experimentos foram realizados em reações com volume final de 240  $\mu\text{L}$ , as quais foram incubadas por 60 min a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após este período de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 2 mL de etanol absoluto.

As leituras fluorimétricas foram realizadas nos comprimentos de onda de 380 nm (excitação) e 440 nm (emissão), em um espectrofluorímetro (Turner Quantech

Fluorometer). Os resultados obtidos foram expressos em unidades de fluorescência por  $\mu\text{g}$  de proteína total.

Os extratos utilizados foram provenientes de vermes adultos após tratamento com uma única dose de  $200 \mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . As atividades foram determinadas nos tempos 0 (controle), 30 min, 1 h e 5 h após a indução do estresse.

### **3.9 Eletroforese bidimensional dos extratos totais de vermes adultos submetidos ao estresse oxidativo**

#### **3.9.1 Focalização isoeletrica dos extratos protéicos**

Para a focalização isoeletrica, a primeira dimensão da eletroforese bidimensional, foram utilizadas  $250 \mu\text{g}$  de proteínas diluídas em tampão de reidratação [7 M ureia, 2 M tiourea, CHAPS 4% (m/v), 0,5% (m/v) de anfólitos carreadores, 40mM DTT e 0,002% (m/v) de azul de bromofenol 0,002%] para um volume final de  $250 \mu\text{L}$ . para cada fita de gel (Immobiline DryStrips, GE Healthcare, Suécia). As proteínas diluídas em tampão de reidratação foram transferidas para uma câmara apropriada juntamente com uma fita de isoeletrofocalização (strip) de 13 cm e um gradiente de pH não-linear de 3-11 (Immobiline DryStrips, GE Healthcare, Suécia). Para evitar evaporação da solução para o ambiente as strips foram cobertas com óleo mineral (Immobiline Coverfluid, GE Healthcare, Suécia) A reidratação das strips foi conduzida por incubação a  $20^\circ\text{C}$  por um período de 16 h.

Após a reidratação, as strips contendo as proteínas foram submetidas à focalização isoeletrica no sistema ETTAN IPGPhor (GE Healthcare, Suécia). Para isso as strips foram posicionadas no equipamento e cobertas com óleo mineral. O programa utilizado para a isoeletrofocalização consistia em: 500 V (0,5 kV/h), 1000 V (0,8 kV/h),

8000 V (11,3 kV/h) e 8000 V (4,4 kV/h). Após a focalização isoeétrica as strips foram utilizadas imediatamente ou estocadas a -80°C para uso posterior.

### **3.9.2 Redução e alquilação das proteínas *in gel***

Anteriormente à eletroforese em gel de poliacrilamida, as proteínas isoeletrofocalizadas foram reduzidas e alquiladas para que pudessem ser separadas pela massa molecular.

A reação de redução ocorreu na presença de tampão de equilíbrio de “strips” [20 mM Tris-HCl, pH 8,8, 6 M ureia, 30% (v/v) glicerol e 2% (m/v) SDS], contendo 1% de DTT, durante 15 minutos. Em seguida o processo de alquilação foi conduzido no tampão de equilíbrio de “strips” contendo 2,5% de iodoacetamida, também durante 15 minutos. Após estas etapas as “strips” foram imediatamente utilizadas para a eletroforese em gel de poliacrilamida, a segunda dimensão da eletroforese bidimensional.

### **3.9.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-Page)**

A eletroforese SDS-PAGE (SDS poliacrilamide gel electrophoresis) foi realizada no equipamento SE Ruby 600 (GE), com uma fonte EPS 601 Power Supply (GE). As strips equilibradas foram colocadas em contato com géis de poliacrilamida a 12,5% (m/v) e cobertas com o gel de concentração [0,5% (m/v) agarose type NA, 25 mM Tris mM, 192 mM glicina, 0,1% (m/v) SDS e 0,01% (m/v) azul de bromofenol]. A eletroforese foi realizada com o equipamento SE Ruby 600 (GE Healthcare, Suécia) em tampão de corrida [25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% (m/v) SDS], por 6 h, a 30 mA/gel. Para comparação da migração das proteínas, foi adicionado a cada um dos géis o marcador de massa molecular (BenchMark protein ladder, Invitrogen, EUA). Após

eletroforese, os géis foram corados pelo método da prata para análise das imagens. Os géis preparativos, utilizados para a identificação das proteínas por espectrometria de massa foram corados com o reagente Coomassie Blue G-250 (Sigma, Alemanha).

### **3.10 Análise das imagens**

Os géis corados foram escaneados a uma resolução de 300 dpi, em um ImageScanner II (GE Healthcare, Suécia), e as imagens digitalizadas foram utilizadas nas análises com o software ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare, Suécia). Para a análise cerca de 20 spots constitutivamente expressos nos diferentes tratamentos foram utilizados como referência para a comparação entre os diferentes géis. Os spots referentes às diferentes proteínas em cada tratamento foram identificados pelo programa e validados pela observação visual da imagem ampliada. As imagens dos géis de cada tratamento foram comparadas para identificar os spots diferencialmente expressos. Neste trabalho, foram analisadas apenas as diferenças qualitativas entre os diferentes tratamentos, embora outras proteínas possa ser diferencialmente expressas em termos quantitativos.

### **3.11 Digestão *in gel* e processamento dos peptídeos para espectrometria de massa**

Para a digestão das bandas correspondentes às proteínas de interesse, o gel foi primeiramente adaptado sobre um transiluminador para facilitar a visualização das proteínas. Em seguida os “spots” referentes às proteínas diferencialmente expressas foram retirados do gel manualmente e transferidas individualmente para microtubos de 1.5 mL e submetidas ao processo de digestão *in gel*.

A digestão das proteínas *in gel* foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Shevchenko et al (1996). Os spots de proteínas foram lavados 3 vezes com 200µL

de solução 25mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 50% (v/v) acetonitrila, pH=8, sob agitação, por 10 minutos. Entre cada uma dessas lavagens os fragmentos de géis foram incubados por 15 minutos sem agitação. Em seguida, os fragmentos foram lavados com 200 $\mu\text{L}$  de água Milli-Q e desidratados por incubação com 100 $\mu\text{L}$  de 100% acetonitrila (v/v) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Após esta etapa, os fragmentos de géis foram secos em um concentrador a vácuo (Eppendorf, Alemanha).

Os fragmentos de géis secos foram reidratadas com 10 $\mu\text{L}$  de solução de Tripsina (20ng/mL)(Promega, USA), em 25mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (pH=8), durante 10 minutos a  $-4^\circ\text{C}$ . Em seguida, foi adicionada solução 25mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (pH=8) até cobrir os spots, e incubada, sob agitação, a  $37^\circ\text{C}$  por 16 h.

O sobrenadante da digestão, contendo os peptídeos, foi transferido para novos tubos e os resíduos no gel foram extraídos com duas lavagens com 30 $\mu\text{L}$  de solução 50% acetonitrila (v/v) e 5% ácido trifluoroacético (v/v) sob agitação por 30 minutos. A solução de peptídeos foi concentrada em um concentrador à vácuo para que seu volume fosse reduzido a entre 5 e 10  $\mu\text{L}$ .

### **3.12 Identificação de proteínas por MALDI-MS/MS**

#### **3.12.1 Espectrometria de massa**

A identificação das proteínas por espectrometria de massa foi realizada no laboratório do Prof. Dr. Gilberto B. Domont, da Universidade Federal do Rio de Janeiro. As amostras foram adicionadas na proporção 1:1 com a solução de matriz (5 mg/mL ácido  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinâmico em 50% (v/v) acetonitrila, 0,1% (v/v) ácido trifluoroacético]. Um microlitro desta solução foi aplicado a cada poço de uma placa de Maldi e secadas ao ar ambiente para a análise. As análises foram conduzidas em um

espectrômetro de massa Maldi TOF-TOF ABI 4700 (Applied Biosystems, EUA). As análises de MALDI-MS/MS foram realizadas por fragmentação do íon precursor, utilizando N<sub>2</sub> como o gás de colisão a  $2.8 \times 10^{-6}$  torr. Os picos referentes aos peptídeos gerados pela autólise da tripsina (massas 842,5 e 2211,1 Da) e a mistura de calibração 1 ou 2 (Sequazyme Peptide Mass Standard Kit, PerSeptive Biosystems, EUA) foram utilizados como padrões de calibração interna e externa, respectivamente.

### **3.12.2 Busca da identidade das proteínas analisadas por MALDI-MS/MS**

Para a busca da identidade das proteínas com os espectros obtidos, foi utilizado o programa Mascot versão 2.1 (<http://www.matrixscience.com>) utilizando o banco de dados NCBI nr. Foram toleradas diferenças de 0,2 Da entre as massas teóricas e as obtidas pelos espectros de MS/MS e somente um sítio de não-clivagem para a tripsina (“miss-cleavage”). Os parâmetros de alteração de massa resultantes de carbamidometilação de cisteínas e oxidação de metioninas também foram considerados. Os espectros que não apresentaram homologia significativa foram novamente analisados contra um banco de dados de ESTs de *S. mansoni*. A identificação foi considerada positiva para as análises que resultaram em um “MOWSE score” superiores a 100.

### **3.13 Western Blot para a detecção de ubiquitinação em proteínas identificadas por MALDI-MS/MS**

A determinação de substratos modificados pela adição de uma molécula de ubiquitina foi realizada através de western blot de géis bidimensionais. A eletroforese foi realizada conforme descrito no item 3.9. Após a corrida eletroforética, o gel foi preparado para a transferência de acordo com o método descrito por Towbin et al



(1979). Inicialmente, o gel foi colocado na solução de transferência (25 mM Tris-HCl, pH=8.3, 0.192 M glicina, 20% (v/v) etanol absoluto) por aproximadamente 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 V, a 4°C.

Após o término da transferência, a membrana de NC foi submetida ao *immunoblot*. Para isto foi bloqueada por incubação com leite em pó desnatado 5% (m/v), diluído em tampão TBS-T [0.02 M Tris-HCl, pH= 7.4, 0.16 M NaCl, 0,1% (v/v) Tween 20] por 60 minutos, sob agitação e a temperatura ambiente. Após o bloqueio, a membrana foi incubada sob agitação com o anticorpo primário para a detecção de conjugados ubiquitinados (Anti-mouse IgG, clone FK2, Biomol, EUA), durante 3 horas a 4°C. O anticorpo utilizado pode reconhecer conjugados poli e mono-ubiquitinados, mas não a ubiquitina livre. A diluição do anticorpo primário utilizada foi de 1:10000 em solução de TBS-T contendo 2,5% de albumina bovina sérica e 0,01% de azida sódica. O anticorpo foi então retirado e a membrana lavada três vezes com solução de TBS-T, por 15 min. Após as lavagens, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-IgG ligado à peroxidase (anti-IgG de camundongo, diluição de 1:5000 em TBS-T) durante 1 hora a temperatura ambiente. Após a incubação com o anticorpo secundário, as membranas foram novamente lavadas três vezes em solução TBS-T, por 15 minutos, para a remoção do anticorpo secundário não-ligado. A visualização da ligação dos anticorpos à membrana foi realizada utilizando-se o kit de Quimioluminescência Amplificada (ECL, GE Healthcare, Suécia), seguido de revelação com filme autoradiográfico (Hyperfilm ECL), com 1 minuto de exposição, em câmara escura.

### 3.14 Avaliação da suscetibilidade de vermes adultos à fotossensibilização *in vitro* com azul de metileno.

Após a perfusão os vermes foram incubados em meio RPMI, pH=7.5, suplementado com 10% (v/v) soro fetal bovino (Gibco-BRL, EUA) e penicilina-streptomicina (100 µg ml<sup>-1</sup>) a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, durante 24 horas. Após esse período, Um casal de vermes adultos foi transferido para cada um dos poços de uma placa de cultura de células de poliestireno (TPP, USA), contendo a solução de azul de metileno (C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>3</sub>S, Sigma, Alemanha) diluída em salina tamponada com fosfato (PBS). As concentrações finais de azul de metileno utilizadas foram 1, 10, 50, 100, 200 e 500 µg/mL. Em seguida, os vermes foram pré-incubados com a solução do fotossensibilizador por 30 minutos para permitir a absorção da droga. Após esse período, os vermes foram separados em dois grupos, onde um foi lavado para a remoção do excesso de fotossensibilizador e o outro não. Os vermes foram então irradiados utilizando-se um sistema de fibra óptica acoplada a um laser de diodo (Eagle, Quantum Tech, Brasil), calibrado para dose de 10 j/cm<sup>2</sup>, operando em comprimento de onda fixo (λ=675 nm) e irradiância de 56 mW/cm<sup>2</sup>. Após as irradiações, o meio de cultura de todos os tratamentos foram trocados por meio fresco, sem a droga, e os vermes foram incubados por 24 h a 37°C e 5%CO<sub>2</sub>. A viabilidade dos vermes submetidos aos tratamentos descritos foi determinada pelo método do MTT, conforme descrito no item 3.4.

### 3.15 Análises estatísticas

Os dados obtidos pelas replicatas dos diferentes experimentos deste trabalho 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.

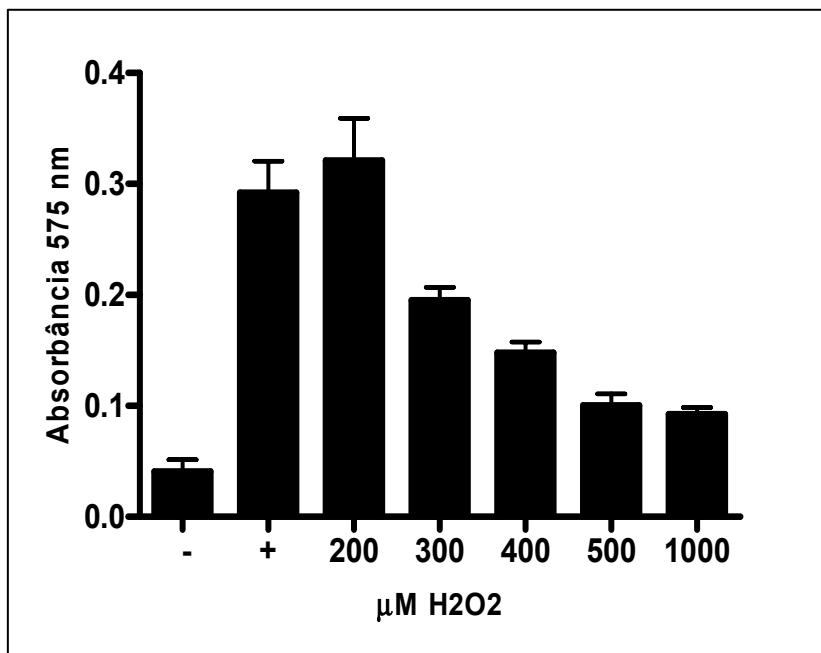
## ***4 Resultados***

#### 4.1 Viabilidade de vermes adultos expostos ao peróxido de hidrogênio

Os testes de viabilidade de vermes adultos expostos a diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio foram realizados para que pudéssemos determinar a dose capaz de produzir um dano sub-letal, após uma única exposição. Neste trabalho, denominamos de dose sub-letal a maior concentração inicial de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que não resultou em redução estatística da viabilidade dos vermes tratados, após análise pelo método do reagente MTT. Este experimento foi realizado em triplicata e os resultados podem ser observados na Figura 8.

Os resultados deste experimento mostram que a maior dose de peróxido de hidrogênio testada que não alterou a viabilidade de vermes em cultura, após 24 h, foi a de 200 µM. Isso pode ser observado pela inexistência de diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre a absorbância apresentada por vermes expostos a esta concentração, e não-tratados (+). Doses maiores, a partir de 300 µM podem tornar os vermes parcialmente ou totalmente inviáveis. A comparação de vermes expostos a doses acima de 500 µM com vermes mortos (-) não mostrou diferença estatística, indicando que estas doses são letais para *S. mansoni*. A partir deste momento a dose utilizada nos demais experimentos foi de 200 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

A dose sub-letal também foi avaliada através da visualização da morfologia de vermes expostos ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Vermes mortos apresentam-se dispostos na forma de espiral característica. De acordo com essa particularidade é possível a comparação da disposição dos vermes em meio tratados e não-tratados. Como podemos observar na Figura 9, vermes tratados com 1000 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> são extremamente lesados e a morte pode ser observada visualmente por microscopia. Os vermes não-tratados, ou tratados com 200 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, no entanto, apresentam morfologia normal.



**Figura 8.** Teste de viabilidade com o reagente MTT de vermes adultos submetidos ao diferentes doses de peróxido de hidrogênio. Casais de vermes foram tratados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em concentrações de 200, 300, 400, 500 e 1000 μM. A viabilidade foi comparada à de vermes vivos não-tratados (+) e vermes mortos (-) por exposição ao calor (70°C) por 1 h.

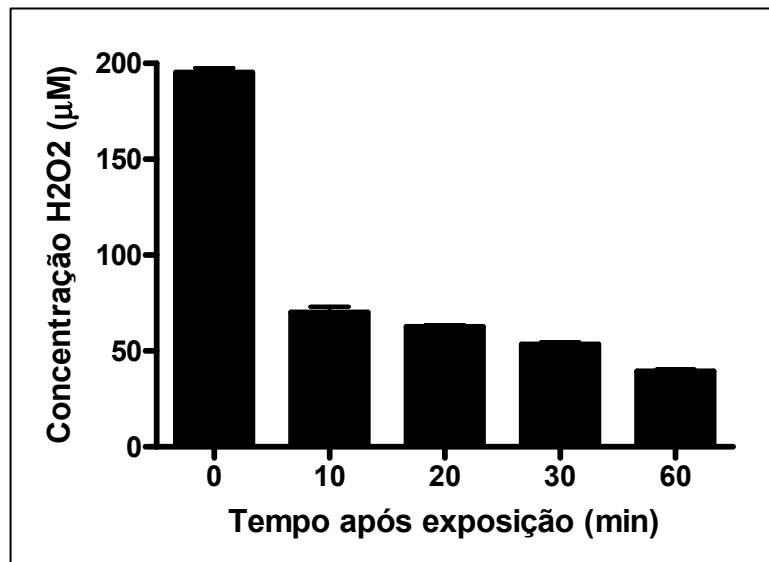


**Figura 9.** Microscopia (4X) de vermes incubados ou não com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (A) Vermes não tratados; (B) Vermes tratados com 200 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (concentração sub-letal); Vermes tratados com 1000 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (concentração letal).

#### 4.2 Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio durante os tratamentos realizados

A determinação da concentração de peróxido de hidrogênio foi realizada para que fosse possível a estimativa da função dos sistemas antioxidantes do parasita, responsáveis pelo combate a EROs como o  $H_2O_2$ . As concentrações desta ERO foram determinadas após 0, 10, 20, 30 e 60 minutos após a administração da dose.

A Figura 10 mostra que a concentração de  $H_2O_2$  diminui acentuadamente no início do tratamento. Enquanto no tempo inicial (0) a concentração é próxima a 200  $\mu M$ , 10 minutos após foram detectados aproximadamente 70  $\mu M$  de  $H_2O_2$ , ou seja, apenas 35% da inicial. Após esse período pode ser observada uma redução constante e menos acentuada que nos primeiros minutos do tratamento.



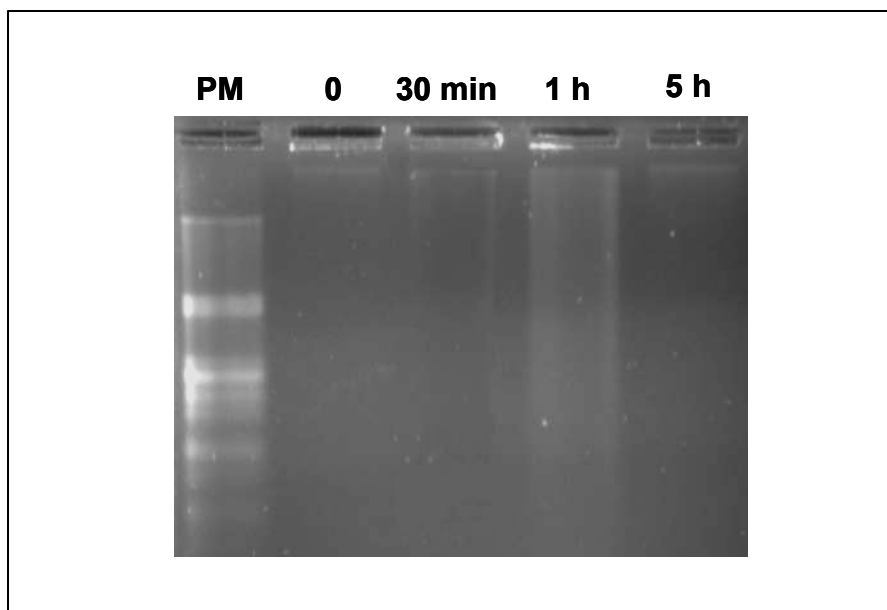
**Figura 10.** Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio no meio de cultura durante os experimentos realizados. Após a administração da dose de 200  $\mu M$  de  $H_2O_2$ , os vermes foram incubados e alíquotas do meio de cultura foram retiradas após 0, 10, 20, 30 e 60 minutos de incubação, as quais foram utilizadas para a quantificação do  $H_2O_2$ .

### **4.3 Quantificação de danos ao DNA de vermes adultos tratados e não tratados com peróxido de hidrogênio**

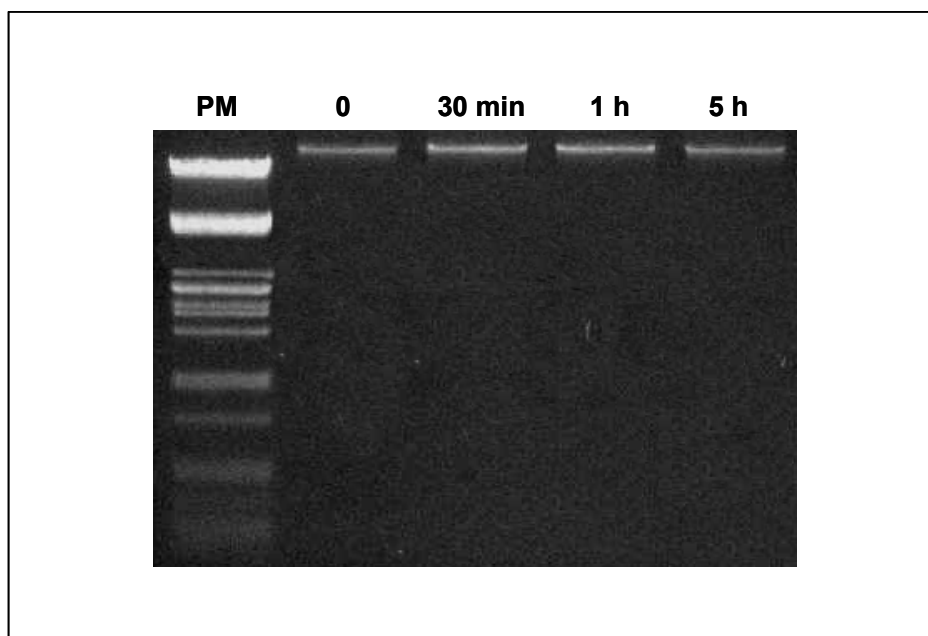
Para obtermos uma estimativa dos danos aos vermes resultantes da exposição ao  $H_2O_2$ , realizamos a quantificação de danos ao DNA pelo método de Sutherland et al (1996). O estresse oxidativo foi induzido pelo tratamento de vermes adultos com 200  $\mu M$  de  $H_2O_2$  seguido de incubação por 30 minutos, 1 e 5 horas. As incubações de vermes por diferentes períodos de tempo após a indução do estresse foram realizadas para que fosse possível a observação temporal da formação de danos e a capacidade de reparo.

A técnica utilizada baseia-se no princípio que o DNA danificado por agentes oxidantes sofre clivagens em diversos pontos da sua cadeia. Os fragmentos gerados por essas clivagens podem ser resolvidos em géis de agarose sob condições alcalinas. Na Figura 11 podemos observar um gel alcalino de agarose mostrando o DNA de vermes adultos submetidos ou não ao estresse oxidativo.

Com a visualização do gel é evidente o aumento da fragmentação do DNA após o tratamento com o agente oxidante. O DNA não-incubado com  $H_2O_2$  (0) apresentou uma banda definida referente à molécula íntegra. Essa fragmentação é mais intensa no DNA obtido de vermes incubados por 1 h após a indução do estresse oxidativo. A fragmentação observada após 5 h de incubação é menor, podendo ser comparada à observada no tempo 0. A diferença na fragmentação observada entre os diferentes tratamentos poderia ser devida a quebras decorrentes do processo de extração de DNA. Para excluir essa possibilidade, os DNAs utilizados neste experimento foram analisados também em gel neutro de agarose 1% (m/v), conforme pode ser observado na Figura 12. A ausência de fragmentação sob essas condições valida os resultados obtidos para quantificação de danos.



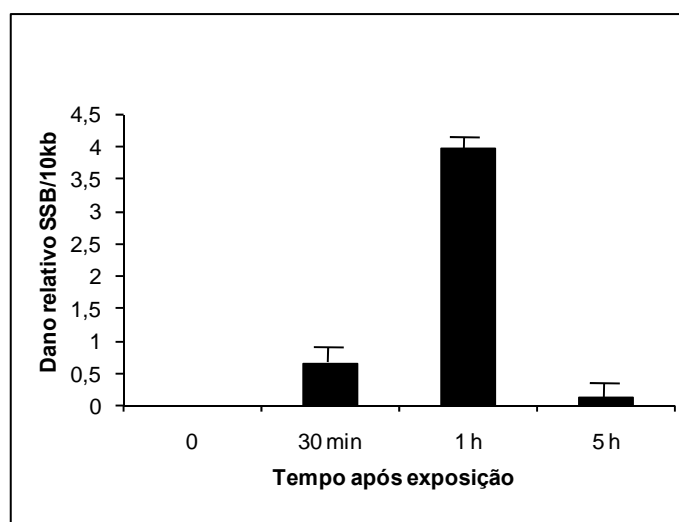
**Figura 11.** Gel de agarose alcalino corado com brometo de etídeo utilizado na quantificação de danos ao DNA de vermes adultos. Após a indução de estresse oxidativo com 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , o dano ao DNA foi visualizado após 0, 30 min , 1 e 5 h de incubação.



**Figura 12.** Gel de agarose neutro corado com brometo de etídeo mostrando a ausência de fragmentação do DNA após a extração. Após a indução de estresse oxidativo com 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , o dano ao DNA foi visualizado após 0, 30 min , 1 e 5 h de incubação.



Para que pudéssemos quantificar o dano ao DNA de vermes submetidos a tratamento com  $H_2O_2$  foi realizada uma análise densitométrica para a determinação do tamanho médio dos fragmentos gerados. A determinação desta variável nos permitiu determinar o número de quebras simples na estrutura do DNA, relativo ao controle não-danificado, conforme descrito no item 3.6. A variação da intensidade de dano ao DNA pode ser observada na Figura 13.



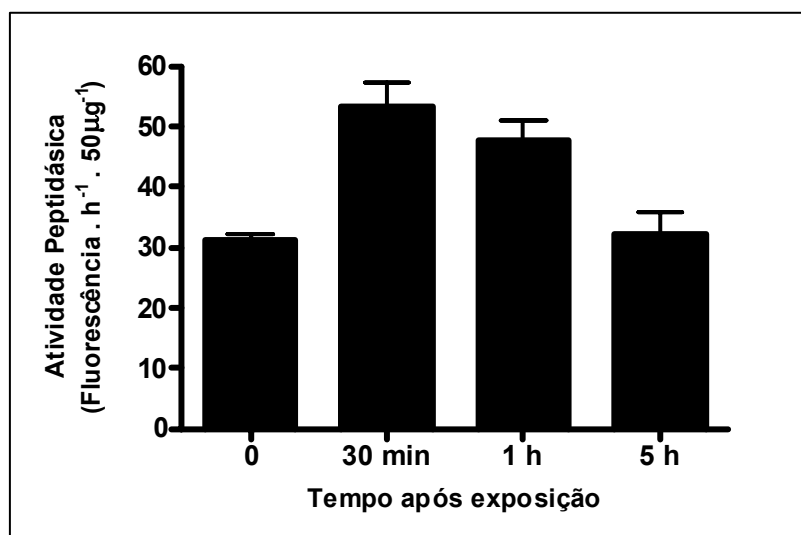
**Figura 13.** Intensidade de dano ao DNA em vermes expostos ao  $H_2O_2$ . As análises mostram as intensidades de danos ao DNA de vermes incubados por 0, 30 min, 1 e 5 h, relativas ao de vermes não incubados (0).

As análises mostraram que o dano ao DNA de vermes incubados com  $H_2O_2$  aumenta durante o período de tratamento. Isso pode ser observado após 30 minutos de incubação com o agente oxidante, onde foram detectados aproximadamente 0,5 quebras para cada 10 kb de DNA. Esse valor aumenta drasticamente 1 h após o tratamento, momento no qual foram detectados aproximadamente 4 quebras em cada 10 Kb de DNA. A formação do dano, no entanto, é revertida 5 horas após a exposição, quando

são observados níveis de dano menores que 0,2 quebras para cada 10 kb de DNA genômico.

#### 4.4 Atividade proteolítica exógena de extratos de vermes adultos submetidos ao estresse oxidativo.

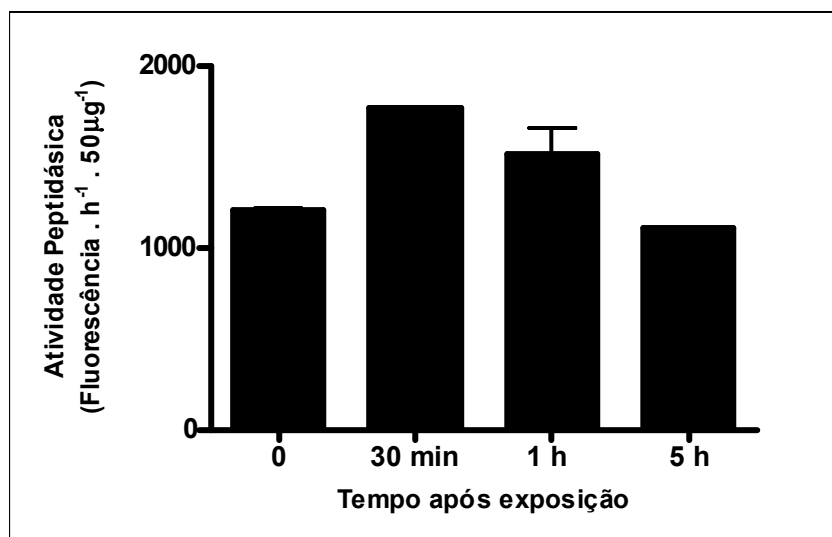
A proteólise intracelular desempenha um papel fundamental no controle do estresse oxidativo. Para estimarmos a importância deste processo na adaptação ao estresse realizamos a determinação da atividade do proteossoma dependente de ATP através da clivagem do substrato sintético fluorogênico Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA. A atividade peptidásica dos extratos de vermes adultos incubados com  $H_2O_2$  está representada na Figura 14.



**Figura 14.** Atividade peptidásica exógena do proteossoma 20S, em extratos totais de vermes adultos incubados com  $H_2O_2$  por 0, 30 min, 1 e 5 h. A atividade foi determinada através da reação com o substrato fluorogênico Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA.

A atividade peptidásica do proteassoma 20S (independente de ATP) mostrou um aumento estatisticamente significativo 30 minutos após a exposição ao  $H_2O_2$  ( $P < 0,05$ ). A partir de 1 hora após a exposição há uma oscilação não-significativa, porém a atividade ainda é elevada em relação ao controle não incubado com  $H_2O_2$ . Em 5 horas, os níveis de fluorescência são comparáveis aos observados no controle.

O perfil de atividade do proteassoma 26S (ATP-dependente) observado foi semelhante ao apresentado pelo centro catalítico 20S, conforme mostra a Figura 15. A atividade aumenta significativamente após o início do estresse. De 30 min a 1 h após o início do estresse podemos observar uma elevada atividade peptidásica ATP-dependente nos extratos protéicos, quando comparados ao controle ( $P < 0,05$ ). Da mesma forma que a atividade ATP-independente, não é possível se distinguir as atividades apresentadas pelos tempos 0 (controle) e 5 horas.

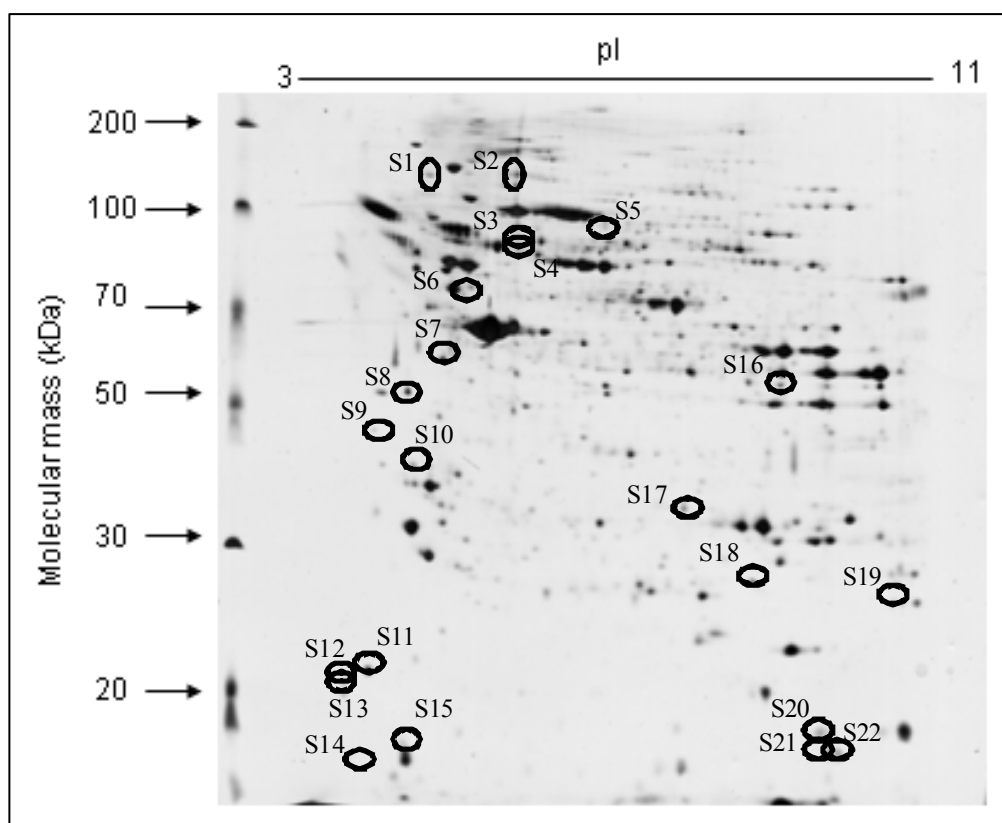


**Figura 15.** Atividade peptidásica exógena do proteassoma 26S, em extratos totais de vermes adultos incubados com  $H_2O_2$  por 0, 30 min, 1 e 5 h. A atividade foi determinada através da reação com o substrato fluorogênico Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA na presença de 5 mM de ATP.

#### 4.5 Expressão diferencial de proteínas durante o estresse oxidativo

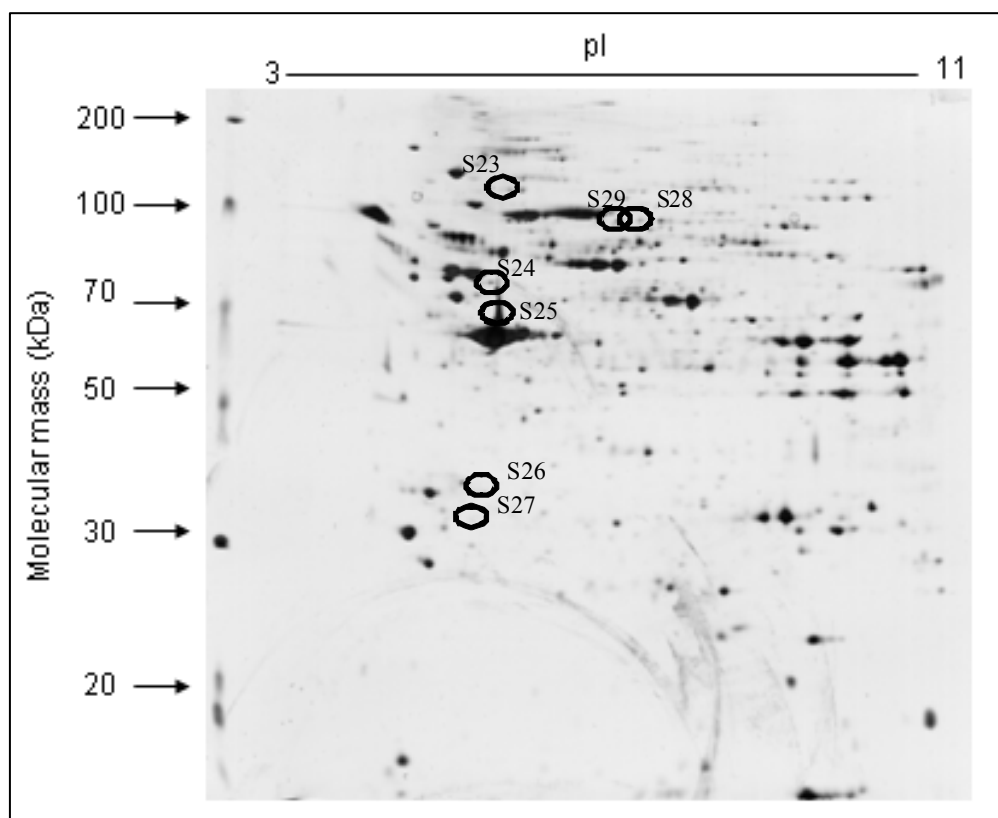
Para identificar as proteínas diferencialmente expressas durante o processo de estresse oxidativo foi utilizada a técnica de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida 12,5% (m/v). Os extratos protéicos foram obtidos de vermes adultos incubados por 0, 30 minutos, 1 e 5 h após o tratamento com  $H_2O_2$  200  $\mu$ M.

Os extratos protéicos obtidos de vermes adultos não-incubados com  $H_2O_2$  (tempo 0) apresentaram aproximadamente 427 spots referentes a diferentes proteínas e/ou isoformas. Nas análises realizadas foram encontradas 22 proteínas expressas exclusivamente em células não-submetidas ao estresse. Os spots encontrados em géis bidimensionais obtidos de vermes não-tratados podem ser observados na Figura 16.



**Figura 16.** Gel de poliacrilamida bi-dimensional 12,5% (m/v), corado pelo método da prata, mostrando proteínas totais de vermes adultos não-incubados com  $H_2O_2$ . As proteínas circunscritas (S1-S22) têm as suas expressões reprimidas após o início do estresse oxidativo.

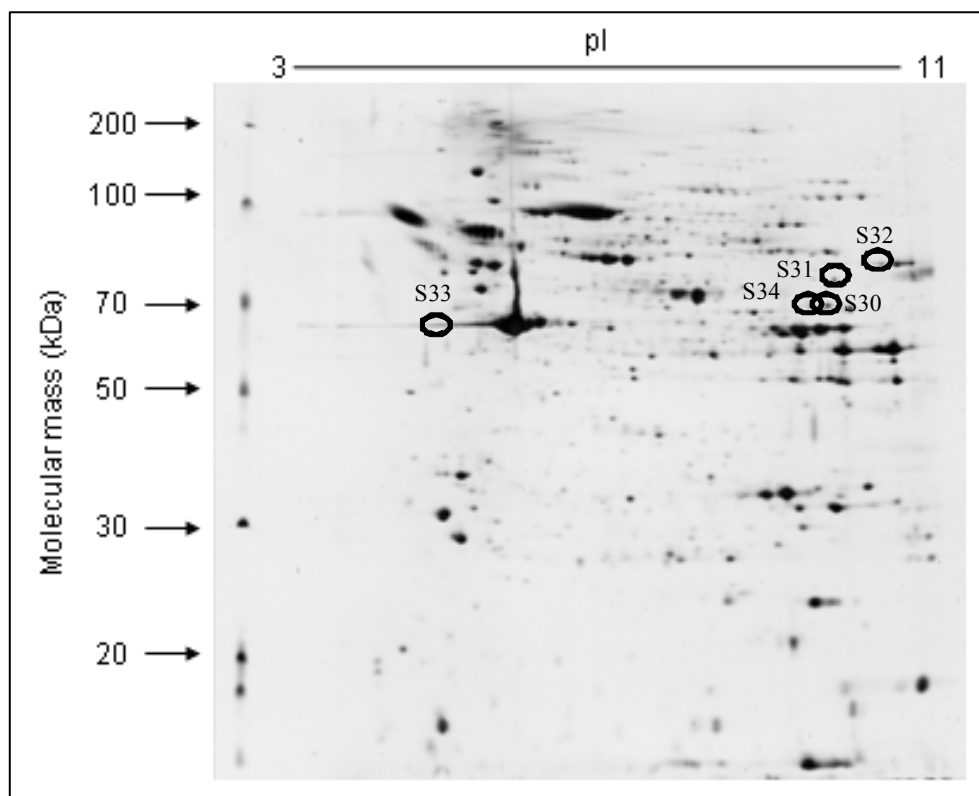
Os extratos protéicos obtidos a partir de vermes incubados por 30 minutos após a indução do estresse puderam ser observados 369 spots referentes a proteínas e/ou isoformas. Neste período de incubação já podemos observar a indução de 7 proteínas não encontradas em vermes não-tratados (S23-S29). Os resultados da análise em gel bidimensional de vermes adultos incubados por 30 minutos após a indução do estresse oxidativo podem ser observados na Figura 17.



**Figura 17.** Gel de poliacrilamida bi-dimensional 12,5% (m/v), corado pelo método da prata, mostrando proteínas totais de vermes adultos incubados por 30 minutos após a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As proteínas circuladas (S23-S29) tem a sua expressão no início do estresse oxidativo.

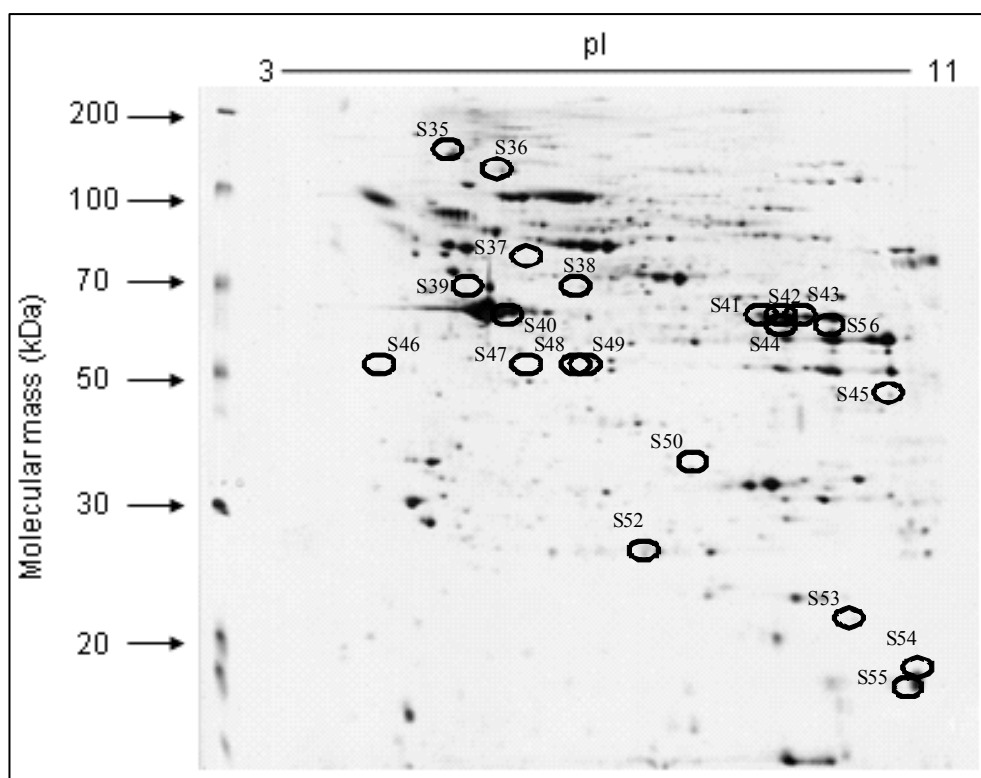
Em vermes incubados durante 1 hora a partir da indução do estresse oxidativo puderam ser identificadas aproximadamente 418 proteínas e/ou isoformas. Destas proteínas, aproximadamente 5 têm sua expressão iniciada a partir deste período e não

podem ser encontradas em vermes adultos não-tratados (S30-S34). Os resultados da análise em gel bidimensional de vermes adultos incubados por 1 hora após a indução do estresse oxidativo podem ser observados na Figura 18.



**Figura 18.** Gel de poliacrilamida bi-dimensional 12,5% (m/v), corado pelo método da prata, mostrando proteínas totais de vermes adultos incubados por 1 hora após a adição de  $H_2O_2$ . As proteínas circuladas (S30-S34) são expressas no decorrer do estresse oxidativo.

A análise da expressão de proteínas obtidas de vermes adultos incubados por 5 horas após a indução do estresse oxidativo resultou em aproximadamente 417 proteínas observadas em gel bidimensional. Foram identificadas 21 proteínas diferencialmente expressas quando comparadas ao verme não-tratado (S35-S56). Os resultados da análise em gel bidimensional de vermes adultos incubados por 5 horas após a indução do estresse oxidativo podem ser observados na Figura 19.



**Figura 19.** Gel de poliacrilamida bi-dimensional 12,5% (m/v), corado pelo método da prata, mostrando proteínas totais de vermes adultos incubados por 5 horas após a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As proteínas circuladas (S34-S55) têm a sua expressão iniciada no decorrer do estresse oxidativo.

#### 4.6 Identificação de proteínas por MALDI-MS/MS

Dentre as proteínas diferencialmente expressas encontradas nos géis bidimensionais obtidos, 10 foram analisadas através de espectrometria de massa para que fossem identificadas. As proteínas escolhidas para serem analisadas por serem expressas abundantemente em um dos tempos de incubação utilizado neste trabalho.

Os spots escolhidos para esta análise foram S11, S22, S24, S25, S29, S30, S32, S41, S42 e S43. No entanto, conforme podemos observar na Tabela 2, apenas os spots S24 e S25 foram identificados com sucesso, apresentando homologia com a proteína actina de moluscos do gênero *Pecten sp* (gi|224305).

**Tabela 2.** Proteínas identificadas por MALDI-MS/MS

Spot	Mm/pI	MS and/or MSMS	Mascot Score/Ion Score	Peptídeos identificados (ion score individual)	Número de acesso da sequência	Descrição da proteína
S11	-	-	-	-	-	No match
S22	-	-	-	-	-	No match
S24	41.5/5.3	MS and MSMS	/117	IWHHTFYNELR (30) TTGIVLDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILR (28) SYELPDGQVITIGNER (59)	gi 224305	Actina
S25	41.5/5.3	MS and MSMS	/326	IWHHTFYNELR (65) VAPEEHPVLLTEAPLNPK (46) TTGIVLDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILR (46) SYELPDGQVITIGNER (85) DLYANTVLSGGTTMFGIADR (84)	gi 224305	Actina
S29	-	-	-	-	-	No match
S30	-	-	-	-	-	No match
S32	-	-	-	-	-	No match
S41	-	-	-	-	-	No match
S42	-	-	-	-	-	No match
S43	-	-	-	-	-	No match

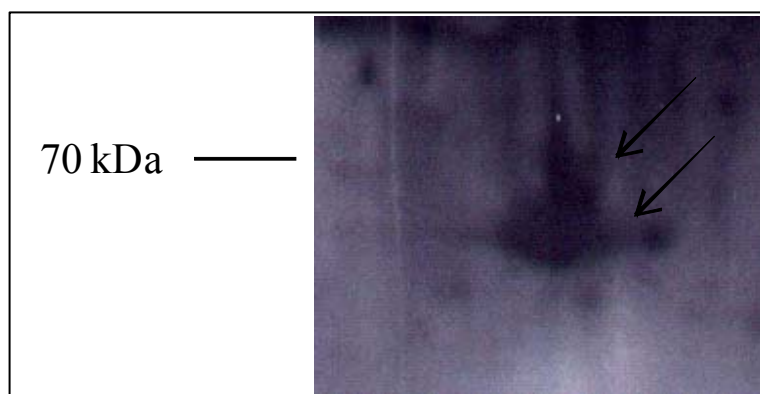
A busca por proteínas homólogas à actina de *Pecten sp.*, em banco de dados de *S. mansoni* apresentou duas sequências com alto grau de identidade: Actina-2 (e-value=0.0) e Actina-1 (e-value=0.0). O alinhamento entre as três sequências de aminoácidos mostrou todos os resíduos são idênticos ou extremamente conservados, como pode ser observado na Figura 20. A identificação nas sequências dos peptídeos sequenciados por MALDI-MS/MS mostrou que a proteína de *S. mansoni* obtida é provavelmente a Actina-2.





utilizando um anticorpo monoclonal anti-ubiquitina conjugada, capaz de se ligar à ubiquitina conjugada, mas não à livre.

A detecção de conjugados ubiquitinados surpreendentemente mostrou que ambos os spots analisados são modificados por ubiquitina, conforme podemos observar na Figura 21. Com isso o aumento de massa molecular pode ser reflexo da ligação de moléculas de ubiquitina adicionalmente à actina já modificada. Inúmeros outros spots referentes a proteínas ubiquitinadas puderam ser observados nas membranas tratadas com anticorpo anti-ubiquitina.



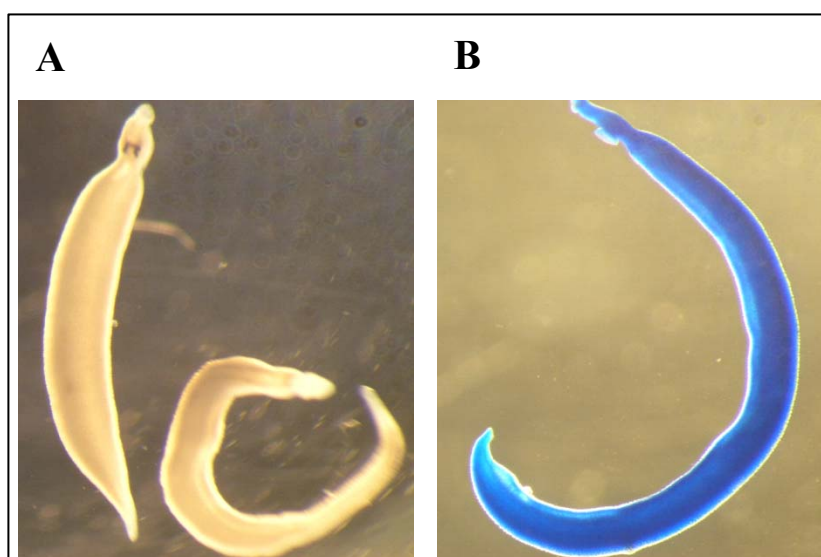
**Figura 21.** Western blot utilizando anticorpo anti-ubiquitina conjugada, e revelado por quimioluminescência. Os extratos obtidos de vermes incubados por 1 hora após a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### 4.8 Fotossensibilização de *S. mansoni*

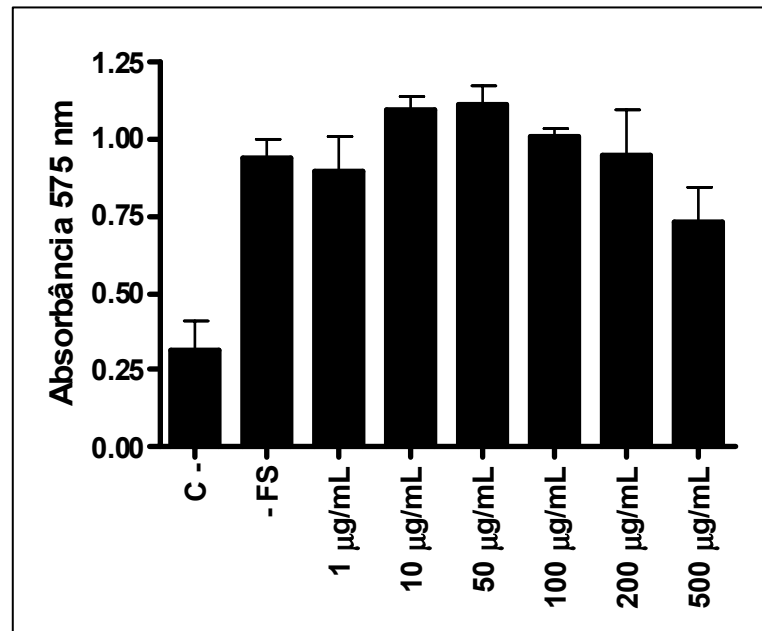
Os fotossensibilizadores são drogas que têm sido utilizadas recentemente no tratamento de diversas doenças infecciosas. Devido ao mecanismo de ação incomum, envolvendo a formação de espécies reativas de oxigênio, resultando em um estresse oxidativo induzido. Por isso, a próxima etapa deste trabalho foi a avaliação do potencial da fotossensibilização na eliminação de vermes adultos de *S. mansoni*.

O fotossensibilizador utilizado foi o azul de metileno, um composto fenotiazínico extensivamente estudado. Para determinar a concentração ideal para o teste, realizamos um experimento utilizando o fotossensibilizador nas seguintes concentrações: 1, 10, 50, 100, 200 e 500  $\mu\text{g/ml}$ . Conforme podemos observar na Figura 22, vermes incubados com 200  $\mu\text{g/ml}$  de azul de metileno absorvem intensamente o fotossensibilizador.

Apesar da intensa absorção do fotossensibilizador pelos vermes em solução, não foi detectado uma redução significativa na sua viabilidade. Nenhuma das concentrações utilizadas foi capaz de eliminar os vermes adultos, como podemos observar na Figura 23.

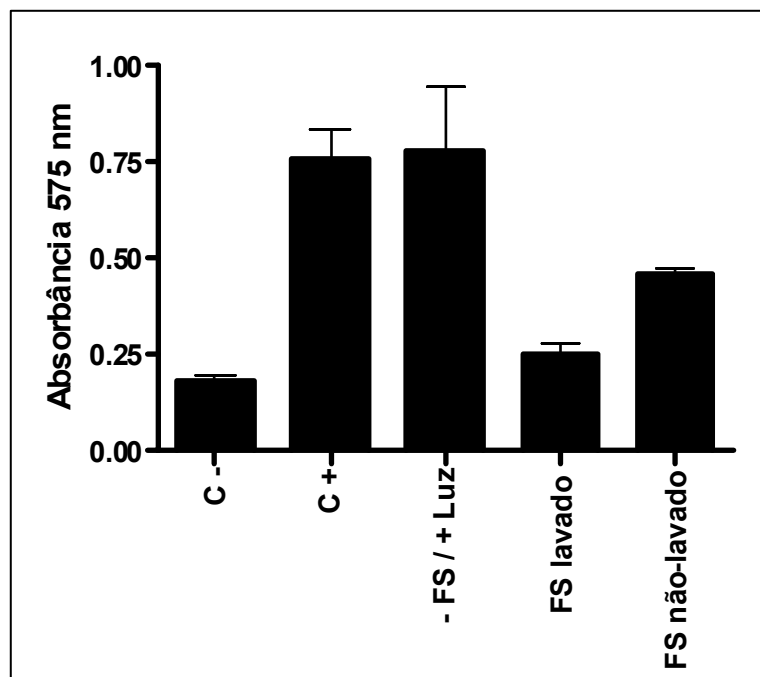


**Figura 22.** A absorção de azul de metileno pelo *S. mansoni*. Os vermes adultos em cultura foram (A) foram incubados por 30 minutos em 200  $\mu\text{g/ml}$  de azul de metileno. Após lavagem com PBS podemos observar a intensa coloração dos vermes pelo fotossensibilizador (B), sem alteração na viabilidade.



**Figura 23.** Eficácia da fotossensibilização com azul de metileno para a eliminação de vermes adultos de *S. mansoni*. Os vermes foram incubados por 30 minutos com concentrações de fotossensibilizador variando entre 1 e 500 µg/ml. A viabilidade foi comparada com a de vermes mortos (C -) e vermes não tratados com a droga (-FS).

Esta ineficiência observada na fotossensibilização de vermes adultos de *S. mansoni* poderia ser decorrente do excesso do fotossensibilizador no meio de cultura, impedindo a penetração da luz. Para observar se este efeito poderia estar ocorrendo, realizamos um experimento em que o excesso da droga foi removido através de lavagem. Vermes tratados com a droga e lavados apresentaram uma queda significativa na viabilidade quando comparados com vermes não-lavados, como podemos observar na Figura 24. A exposição à luz de vermes não incubados com o fotossensibilizador não reduziu a viabilidade de vermes, mostrando que somente a combinação luz e fotossensibilizador pode eliminar vermes adultos



**Figura 24.** Efeito da lavagem do meio na fotossensibilização de *S. mansoni*. A viabilidade de vermes fotossensibilizados com azul de metileno foi determinada após a remoção do excesso da droga do meio. A viabilidade foi comparada com vermes não lavados, e vermes não tratados.

## ***5 Discussão***

Durante o seu complexo ciclo de vida, o parasita *S. mansoni* é submetido a diferentes condições, muitas das quais são extremamente desfavoráveis à sua sobrevivência. Para que possa sobreviver a estas condições, o organismo deve adaptar-se a estas condições, modulando a expressão gênica para o controle de diversos processos celulares (EL-ANSARY, 2003). O ambiente possui inúmeros fatores que podem desencadear uma condição de estresse celular, entre os quais podemos citar variações térmicas, de luminosidade, osmóticas, nutricionais entre inúmeros outros fatores. Além dos fatores de estresse encontrados nos diferentes ecossistemas, organismos parasitas ainda sofrem a ação de elementos produzidos pelos seus hospedeiros. Entre os diferentes processos utilizados pelos hospedeiros para a defesa contra organismos invasores, o estresse oxidativo é um mecanismo comum tanto em mamíferos como em moluscos (KAZURA et al 1981; HAHN et al, 2001). O constante desafio de se manter vivo em um ambiente extremamente desfavorável, porém nutricionalmente rico como o encontrado por *S. mansoni*, resultou na seleção evolutiva de diversos processos capazes de reparar os danos resultantes, evitar a formação e eliminar as espécies reativas de oxigênio. Desta forma, vermes adultos são capazes de sobreviver por muitos anos no interior do sistema vascular de seres humanos sem que sejam danificados ou eliminados pelo hospedeiro (CROSS et al, 2007).

Na maioria dos organismos, o sistema antioxidante é composto pela enzima superóxido dismutase, com consequente eliminação do  $H_2O_2$  formado catalisada principalmente por três grupos de enzimas: as catalases, as glutatona peroxidases e as peroxirredoxinas. Em *S. mansoni*, apesar dos níveis da enzima superóxido dismutase serem abundantes, não foram encontradas catalases, e apenas níveis reduzidos de glutatona peroxidases (MKOJI et al, 1988; MEI & LoVERDE, 1997). Desta forma, a eliminação do  $H_2O_2$  em *S. mansoni* é aparentemente mediada majoritariamente por

peroxirredoxinas (SAYED et al, 2006). Além do papel descrito das peroxirredoxinas na eliminação do  $H_2O_2$ , algumas outras proteínas com atividade antioxidante foram descritas neste parasita, e algumas destas foram destacadas como possíveis alvos para a quimioterapia da esquistossomose. Apesar de proteínas e sistemas enzimáticos terem sido identificados e estudados com certo grau de detalhamento, poucas informações acerca de fundamentos básicos da resistência de *S. mansoni* ao estresse oxidativo estão disponíveis. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi o estudo de características gerais do estresse oxidativo em *S. mansoni* incluindo a determinação de doses máximas toleradas, do dano a macromoléculas, a determinação dos danos resultantes e a identificação de fatores protéicos envolvidos na adaptação ao estresse.

Ao iniciar os estudos, partimos do princípio que os danos sobre as macromoléculas e as respostas adaptativas celulares seriam diretamente proporcionais a intensidade do estresse submetido. Desta forma, quanto maior a concentração de  $H_2O_2$  utilizada, maior seria o efeito biológico que poderíamos detectar, facilitando as análises que realizaríamos posteriormente. Apesar do tratamento de vermes com altas concentrações de  $H_2O_2$  ser extremamente desejável em nosso trabalho, a redução de viabilidade em decorrência de uma dose excessiva poderia comprometer as análises bioquímicas devido à perda de funções, decorrentes de um dano celular intenso. Por esse motivo, a primeira etapa deste trabalho foi a determinação da dose subletal de  $H_2O_2$  em *S. mansoni*. Neste trabalho, consideramos como subletal a maior concentração utilizada que não reduziu a viabilidade de vermes adultos em cultura, quando comparados a vermes não-tratados com o  $H_2O_2$  e mantidos em cultura. Nas condições avaliadas, determinamos que a dose subletal em *S. mansoni* foi obtida quando os vermes em cultura foram tratados com  $H_2O_2$  na concentração inicial de 200  $\mu M$ . Considerando a metodologia utilizada para a determinação da viabilidade, devemos ressaltar que a



viabilidade foi estimada em termos de atividade bioquímica mitocondrial somente 24 h após o tratamento. Apesar da maioria dos experimentos realizados terem sido conduzidos por períodos inferiores a 5 horas, a atividade metabólica mitocondrial pode permanecer mesmo algumas horas após a morte celular induzida pelo estresse oxidativo. Após a perda de suas funções metabólicas, uma célula morta não é mais capaz de recuperar a sua atividade, permitindo assim a análise da viabilidade após esse período. Mkoji et al (1988) analisaram a viabilidade de vermes adultos e esquistossômulos após exposição a diferentes sistemas geradores de EROs. Neste estudo foi observado que o estágio de esquistossômulo apresenta sensibilidade elevada (> 95% mortalidade) em comparação a vermes adultos (aproximadamente 2% mortalidade), mediante exposição a  $H_2O_2$  0,25 M. com, respectivamente. Esses dados reforçam os valores encontrados pelos experimentos realizados neste trabalho, onde analisamos a viabilidade com o objetivo de determinar a dose subletal. Durante uma infecção, as concentrações de  $H_2O_2$  liberadas por células do sistema imune humano atingem valores em torno de 50  $\mu M$  (ROOT et al, 1975). Este valor é muito inferior às concentrações letais encontradas para vermes adultos de *S. mansoni*, o que justifica, ao menos parcialmente, a dificuldade do organismo em combater esta infecção. Devemos observar ainda que os resultados obtidos durante este trabalho refletem somente exposições agudas. As respostas adaptativas decorrentes de exposições prolongadas provavelmente seriam muito diferentes das observadas em nossos estudos e simularia uma situação mais próxima à encontrada no interior do hospedeiro, onde a exposição a EROs oriundas das células de defesa do hospedeiro são constantemente liberadas. Apesar das desvantagens da exposição aguda, optamos por utilizar esta metodologia devido à dificuldade de se obter concentrações constantes de em  $H_2O_2$  cultura. A simulação de uma exposição crônica ao  $H_2O_2$  pode ser realizada pela adição de glicose e

da enzima glicose oxidase ao meio de cultura (FERNANDES et al, 2006). Esta enzima catalisa a oxidação da glicose a gluconolactona, em uma reação que resulta na formação de  $H_2O_2$  como subproduto (WONG et al, 2008). Através desta abordagem é possível a manutenção de uma concentração constante de  $H_2O_2$  em torno de  $100 \mu M$ , no meio de cultura contendo níveis adequados de glicose. No entanto, como o nosso propósito foi analisar as respostas de vermes submetidos ao estresse oxidativo subletal, essa abordagem não pode ser utilizada, uma vez que as concentrações atingidas são baixas. Como ainda não se conhecem métodos que permitam a obtenção de altas concentrações de  $H_2O_2$  de maneira constante, utilizamos exposições agudas baseadas em uma única dose em todos os experimentos deste trabalho.

A variação da concentração de  $H_2O_2$  ao longo dos tratamentos é uma variável extremamente importante em experimentos como os realizados neste trabalho, onde a indução do estresse oxidativo foi realizada após a administração de uma única dose de  $H_2O_2$ . Apesar de, no tempo inicial do tratamento, a concentração de  $H_2O_2$  ser conhecida, a ação dos sistemas antioxidantes e a reação com macromoléculas celulares faz com que esse valor tenda a reduzir no transcorrer do experimento. Para que fosse possível a estimativa da variação da concentração de  $H_2O_2$  nos experimentos realizados, foi necessária a determinação do tempo de meia-vida desta molécula na cultura dos tratamentos.

Como pode ser observado na seção 4.2, a concentração de  $H_2O_2$  decresce rapidamente nos primeiros minutos do tratamento (aproximadamente 65% de redução em apenas 10 minutos). Curiosamente, no intervalo entre 10 e 60 minutos de incubação, a redução da concentração de  $H_2O_2$  é significativamente menor que nos primeiros minutos (aproximadamente 50% de redução durante 50 minutos). Se considerarmos a meia-vida do  $H_2O_2$  durante o experimento, o tempo é muito menor nos primeiros

minutos do que nos seguintes. O perfil hiperbólico do consumo de  $H_2O_2$  do meio de tratamento de vermes adultos pode ser explicado por diversas hipóteses. A primeira é uma possível difusão inicial de parte das moléculas de  $H_2O_2$  de acordo com o seu gradiente de concentração. Desta forma, como a concentração de  $H_2O_2$  no interior dos vermes é próxima a 0 M, grande parte das moléculas circundantes no meio de cultura seria prontamente absorvida por difusão simples. Apesar da grande barreira física imposta pelo tegumento heptalaminar de vermes adultos de *S. mansoni*, pequenas moléculas podem difundir-se livremente para o interior dos vermes. Assim, após a difusão de parte das moléculas de  $H_2O_2$  para os tecidos do parasita, o maior volume ocupado poderia ser responsável pela diluição deste agente químico e, conseqüentemente, pela redução da sua concentração no meio de cultura circundante. No entanto, o efeito da difusão provavelmente não é suficiente para produzir uma redução da concentração de  $H_2O_2$  da magnitude observada, tendo em vista o pequeno volume ocupado pelos vermes em relação ao meio de cultura. De qualquer forma, porém, este efeito pode ser responsável, ao menos parcialmente, pela intensa redução inicial da concentração de  $H_2O_2$  observada. A segunda hipótese que poderia explicar essa diferença no consumo de  $H_2O_2$  é uma possível saturação do sistema antioxidante pelo excesso de EROs. Há uma forte correlação entre os níveis de grupamentos tiol intracelulares e o potencial antioxidante das células (WINTERBOURN & HAMPTON, 2008). Uma possibilidade seria, portanto, uma saturação da capacidade de redução dos grupamentos tiol oxidados, limitando assim a resposta antioxidante. Ao reagir com uma ERO, os grupamentos tiol são oxidados a dissulfeto (-S-S-) e para que possam reagir novamente devem ser novamente reduzidos. Em *S. mansoni*, a enzima tioredoxina glutathiona redutase é a principal responsável pela manutenção dos tióis antioxidantes intracelulares, reduzindo os cisteínas da glutathiona e de peroxiredoxinas oxidadas

(ALGER & WILLIAMS, 2002; SHARMA et al, 2009). Em uma situação hipotética, em que a concentração de substratos oxidados excede a capacidade catalítica desta enzima, poderia haver uma limitação do consumo de  $H_2O_2$  como observado neste trabalho. Neste caso, no início do experimento os grupamentos estariam quase que completamente reduzidos permitindo a pronta reação com EROs, justificando a intensa resposta nos primeiros minutos. Como não foi possível a determinação de tióis reduzidos neste trabalho, esta hipótese deve ser tratada como uma simples especulação. Uma terceira hipótese a ser considerada seria a perda de atividade da enzima devido ao dano resultante, embora essa possibilidade seja improvável. Como a cinética de consumo de  $H_2O_2$  depende de diversas variáveis, é provável que o efeito observado seja devido a uma combinação de dois ou mais fatores conhecidos ou não. Diferentemente das condições impostas neste trabalho, os vermes adultos estão constantemente expostos ao estresse em seu habitat natural, o que possivelmente induz a um aumento da síntese de proteínas antioxidantes. No entanto, somente com experimentos posteriores será possível determinar a taxa de consumo de  $H_2O_2$  de vermes adultos tanto em cultura como no sistema porta-hepático do hospedeiro.

A condição de estresse oxidativo é inevitavelmente relacionada a danos em diversas biomoléculas celulares. As conseqüências do dano resultantes da reação de lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos com EROs estão bem descritas em diversos modelos experimentais. A compartimentalização intracelular, no entanto, torna moléculas como lipídeos e proteínas mais suscetíveis a reagir com EROs presentes no meio extracelular, quando comparados com ácidos nucleicos. Como as moléculas de ácido nucleico, sobretudo o DNA, são localizadas principalmente no interior do núcleo celular, a possibilidade de dano é muito menor do que em moléculas presentes na superfície celular. Espécies reativas de oxigênio como o  $H_2O_2$ , que possuem uma

reatividade moderada, podem difundir-se até o núcleo produzindo dano a esta macromolécula. Assim, em um tratamento com o esta espécie reativa de oxigênio, a determinação do dano ao DNA ofereceria uma estimativa do dano relativo em todas as macromoléculas celulares.

Diversas metodologias têm sido empregadas para a determinação de danos à estrutura do DNA. Para organismos unicelulares ou cuja obtenção de células isoladas é simples, a metodologia mais utilizada é o “teste de cometa”. Esta técnica consiste na determinação de clivagens na estrutura do DNA, através de uma metodologia que envolve a aplicação de células intactas a uma lâmina contendo uma fina camada de gel de agarose (SINGH et al, 1988). As células imobilizadas em gel são então rompidas e o DNA nuclear exposto é separado por eletroforese em condições alcalinas (pH superior a 13). Esta metodologia foi utilizada para determinar o dano produzido por diferentes agentes químicos ao DNA de *S. mansoni* (SILVA et al, 2007). A utilização desta abordagem para análise da genotoxicidade em *S. mansoni* é extremamente difícil em virtude da dificuldade de obtenção de células isoladas em quantidades adequadas para a realização do teste. Por esse motivo, foi necessária a utilização de uma abordagem diferente para a determinação de danos ao DNA de *S. mansoni* neste trabalho. A abordagem utilizada neste trabalho foi a separação eletroforética do DNA, obtido de vermes tratados em diferentes condições, em gel alcalino, seguida análises densitométricas das imagens obtidas, conforme descrito por Sutherland et al (2006). Esta metodologia baseia-se na migração diferencial dos fragmentos gerados pelo dano induzido em gel de agarose alcalino. Assim, um dano intenso produz uma maior fragmentação do DNA e conseqüentemente reduz o tamanho médio das moléculas. Esta metodologia foi utilizada com sucesso na determinação da intensidade de danos em

diferentes modelos experimentais como vegetais, fungos filamentosos e células humanas (BENNETT et al, 2008; CHELICO et al, 2005; HIDEEMA et al, 1997).

Utilizando esta metodologia, foram analisadas as integridades de DNAs obtidos de vermes tratados com  $H_2O_2$  por diferentes períodos de incubação, conforme descrito anteriormente. Os resultados mostraram que o tratamento oxidante resultou em um aumento no número de quebras na molécula de DNA de vermes adultos tratados com  $H_2O_2$ . Nas condições utilizadas neste trabalho, a formação do dano ao DNA de vermes adultos pôde ser observada 30 minutos após a adição do agente oxidante. Uma hora após a adição do agente oxidante a intensidade do dano atingiu o maior valor entre os obtidos nos diferentes tratamentos empregados neste trabalho. Este período observado entre a administração da dose e o desenvolvimento do dano ao DNA possivelmente é devido ao tempo necessário para a difusão da droga até o núcleo celular. Assim, é provável que o dano a proteínas e a lipídeos possa ser observado antes do dano ao DNA, em condições semelhantes às empregadas neste trabalho. Sayed et al (2006) determinaram o dano a proteínas e lipídeos de vermes adultos de *S. mansoni* cujo gene Prx1 (peroxiredoxina-1) havia sido silenciado. Neste trabalho, foi demonstrado que os substratos oxidados, lipídeos e proteínas, são acumulados com a inibição deste sistema antioxidante de *S. mansoni*. No entanto, como as condições de tratamento empregadas foram diferentes das utilizadas neste trabalho, não foi possível determinar a dinâmica da formação de danos destas biomoléculas durante o estresse oxidativo em vermes adultos. Cabe ressaltar que o dano identificado em um determinado momento, em uma análise *in vivo*, é o resultado do balanço entre a ação da espécie reativa de oxigênio e dos sistemas de reparo celulares. Desta forma, analisamos a intensidade do dano ao DNA de vermes adultos cinco horas após a administração de  $H_2O_2$ . Neste intervalo de tempo, a intensidade de dano foi reduzida a níveis próximos dos encontrados em células não

tratadas, sugerindo que há uma intensa atividade de reparo de DNA em vermes adultos, capaz de recuperar a integridade celular em poucas horas.

Apesar de, recentemente, alguns genes envolvidos no reparo de DNA terem sido descritos e estudados, existem poucas informações sobre este processo em *S. mansoni*. Silva et al (2007) analisaram a expressão dos genes SmRad 23 e SmRad4, envolvidos na via de reparo por excisão de nucleotídeos, em vermes tratados e não-tratados com diferentes agentes capazes de produzir dano ao DNA, incluindo o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Neste estudo, foram observadas variações nos níveis destes transcritos, relacionadas com a regulação de diferentes processos celulares, como o controle do ciclo celular, proteólise, além do reparo do DNA. Outra via de reparo de DNA descrita em *S. mansoni* é a fotoreativação de dímeros de pirimidina provocada pela radiação UVB (RUELAS et al, 2007). Esse processo parece ser o principal mecanismo responsável pela correção dos danos foto-oxidativos resultantes da exposição à radiação solar, nos estágios de vida livre deste parasita. Além destes processos, foram identificados genes relacionados a outras vias de reparo de DNA em *S. mansoni*. Silva et al (2006), analisaram a expressão dos transcritos SmUbc13, SmMms2 e SmRad6, responsáveis pelo reparo pós-replicativo de DNA. A existência de transcritos conservados destes genes permite supor a existência desta via de tolerância a danos no DNA neste parasita. Além dos citados anteriormente, um gene de *S. mansoni* denominado IMP4 também foi descrito participar de eventos relacionados ao reparo de DNA após tratamento com agente alquilante MMS (Metil-metanossulfonato) (FURTADO et al, 2007). Como pudemos observar, o conhecimento acerca do reparo de DNA em *S. mansoni* são extremamente limitados e, portanto, novos estudos são necessários para que possamos conhecer a relevância de cada um dos mecanismos utilizados.

Estudos anteriores mostraram a importância do complexo proteolítico proteassoma no desenvolvimento das fases intra-hospedeiro deste parasita. Guerra-Sá et al (2005), observaram que a inibição do proteassoma com a droga MG-132 reduziu o número de parasitas que atingiram o estágio de esquistossômulo em sua fase pulmonar e, conseqüentemente, o número de vermes adultos. Como a exposição a EROs nestes estágios é muito elevada quando comparada com estágios de vida livre, é provável que o aumento na atividade do proteassoma esteja relacionado, ao menos em parte, ao controle do estresse oxidativo e de seus efeitos sobre as biomoléculas. Para determinar a importância deste complexo proteolítico durante o estresse oxidativo, a atividade peptidásica do proteassoma foi estimada durante os tratamentos realizados neste trabalho. Tanto a atividade peptidásica ATP-dependente como independente foram estimuladas no início do estresse retornando aos níveis iniciais 5 horas após a administração da dose de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Os resultados mostram uma semelhança no perfil de atividades peptidásicas dependente e independente de ATP. Com isso, a modulação da resposta proteolítica ao estresse oxidativo é devida, aparentemente, a um aumento na expressão de subunidades proteassomais. De acordo com os resultados, a importância do complexo 26S parece ser secundária à participação peptidásica do centro 20S. Shringarpure et al (2003) observaram que a conjugação de ubiquitina não é necessária para a degradação de proteínas oxidadas, sugerindo que a degradação dessas proteínas é mediada de maneira ATP independente pelo proteassoma 20S. Concordando com essa hipótese, foi observado um aumento na expressão de genes que codificam para diversas subunidades que compõe o centro 20S, durante o estresse oxidativo e no período de recuperação conseqüente (COSTA et al, 2007). Assim o proteassoma 20S é aparentemente o principal responsável pela degradação de proteínas oxidadas, justificando o aumento



observado durante o período de estresse induzido nos experimentos realizados neste trabalho. No entanto, além do aumento da atividade da partícula 20S, foi ainda observado um aumento da atividade do proteassoma 26S (ATP dependente). Apesar de ser impossível avaliar, com os experimentos realizados, a real contribuição do sistema ubiquitina-dependente durante o estresse oxidativo de *S. mansoni* é possível que o aumento da atividade do proteassoma 26S seja consequência do aumento de partículas 20S que podem formar complexos com partículas regulatórias 19S.

Qualquer adaptação a uma condição de estresse, de qualquer origem, envolve necessariamente modificações bioquímicas, como alteração na expressão de transcritos, modificações pós-traducionais de proteínas entre outros eventos. Técnicas de análise de transcritos e de proteínas em larga escala têm sido amplamente utilizadas para a determinação de genes e proteínas com funções importantes nas respostas bioquímicas a diversos estímulos, incluindo o estresse oxidativo. Em *S. mansoni*, ainda são relativamente poucos estudos envolvendo análises bioquímicas globais. Aragon et al (2008) analisaram a expressão de transcritos de *S. mansoni* submetidos a estresse oxidativo e térmico através de “microarrays”. Neste trabalho, foram observados 1001 transcritos com expressão aumentada em comparação à de vermes não tratados, entre os quais foram detectados genes como superóxido dismutase e glutathione peroxidases. Abordagens globais para estudo da expressão gênica também tem sido aplicadas para a identificação de genes envolvidos em outros processos celulares como, por exemplo, o desenvolvimento e a adaptação durante o ciclo de vida e a diferenciação sexual de vermes (JOLLY et al, 2007; VERMEIRE et al, 2006; FITZPATRICK et al, 2005).

Apesar do grande conhecimento adquirido através de abordagens genômicas e transcriptômicas, é conhecido que nem sempre a expressão de um determinado gene está associada com a presença da proteína codificada pelo mesmo. Diversos eventos

pós-transcricionais podem impedir a tradução ou modificar a proteína expressa, gerando inúmeras possibilidades de produtos resultantes da expressão de um transcrito. Assim, uma análise proteômica pode trazer informações mais confiáveis sobre o estado de uma célula mediante determinada condição como, por exemplo, em situações de estresse. Abordagens proteômicas têm sido utilizadas para o estudo de diferentes processos e proteínas de *S. mansoni* (VAN HELLEMOND et al, 2007; VERJOVSKI-ALMEIDA & DEMARCO, 2008). No entanto, nenhum estudo baseado em técnicas de proteoma foi realizado para identificar proteínas importantes na adaptação ao estresse neste organismo. Por isso, um dos objetivos deste trabalho foi a identificação de proteínas diferencialmente expressas durante a adaptação ao estresse oxidativo.

Entre as metodologias atualmente existentes para estudos de proteoma, as abordagens mais relevantes consistem na resolução de extratos de proteínas em géis de poliacrilamida bidimensionais ou através de cromatografia bidimensional, ambas seguidas de identificação por espectrometria de massa (GRAVES & HEYSTED, 2002). A escolha entre uma destas metodologias deve levar em conta o objetivo da análise e o custo da análise. A eletroforese em gel bidimensional é uma metodologia interessante para análises proteômicas diferenciais, como a realizada neste trabalho, pois permite a comparação de extratos de diferentes tratamentos e restringe o universo de proteínas para um número menor, contendo somente as diferencialmente expressas. Os experimentos realizados neste trabalho tiveram o objetivo de comparar o perfil de expressão de proteínas em vermes não-expostos ao estresse oxidativo com o de vermes tratados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por diferentes períodos de tempo. Esses experimentos tiveram os seguintes objetivos: 1- Determinar proteínas cuja expressão é induzida ou reprimida em razão do estresse oxidativo subletal e; 2- Determinar a dinâmica da expressão para

determinar proteínas importantes no início, no transcorrer e no final da resposta ao estresse oxidativo.

A indução do estresse oxidativo promove tanto a indução como a repressão da expressão de algumas proteínas. Podemos imaginar que as proteínas reprimidas durante o estresse oxidativo provavelmente constituam fatores regulatórios de processos antagônicos aos relacionados às respostas antioxidantes, de preservação da viabilidade celular ou de reparo de biomoléculas. De maneira análoga, as proteínas induzidas durante o estresse oxidativo possivelmente apresentam relação com a resposta antioxidante, ou de reparo de moléculas ou mesmo fatores regulatórios como fatores de transcrição entre outros. Evidentemente, essas informações acerca das prováveis funções das proteínas diferencialmente expressas por *S. mansoni* durante o estresse oxidativo são meramente especulativas e necessitam de um estudo mais aprofundado para serem confirmadas. No entanto, Kültz (2003), ao analisar o proteoma de diversos organismos durante situações de estresse celular, observou que as proteínas diferencialmente expressas durante o estresse celular são relacionadas a diversos processos celulares, principalmente com o controle da tradução e da síntese de proteínas. Isso sugere que a célula, durante uma situação de estresse, expressa uma série de proteínas regulatórias capaz de modificar a estrutura ou função de enzimas, receptores e outros fatores celulares.

As análises dos géis bidimensionais permitiram a observação de aproximadamente 50 proteínas diferencialmente expressas por vermes adultos de *S. mansoni* mediante o tratamento com 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . É importante ressaltar que neste trabalho apenas foram consideradas diferencialmente expressas as proteínas qualitativamente diferentes entre os tratamentos e o controle, ou seja, expressas somente por vermes não-tratados ou somente por vermes tratados. Como as diferenças

quantitativas entre os diferentes tratamentos não foi determinada é provável que o número de proteínas diferencialmente expressas durante o estresse oxidativo seja muito superior ao observado neste trabalho.

Uma das informações que puderam ser obtidas a partir dos géis de poliacrilamida bidimensionais obtidos foi a dinâmica da expressão de proteínas. Enquanto a síntese de algumas proteínas é induzida rapidamente, outras somente podem ser observadas em períodos tardios de adaptação antioxidante. Essas proteínas de síntese tardia eventualmente podem permanecer na célula mesmo após o término do estresse, constituindo uma defesa residente contra espécies reativas de oxigênio. A permanência destas proteínas após o estresse é consistente com o modelo de “firewall” antioxidante descrito por LoVerde (1998). Evidentemente, as observações realizadas neste trabalho não podem ser aplicadas para vermes em condições naturais, no sistema vascular de hospedeiros vertebrados. No organismo do hospedeiro a exposição de vermes a espécies reativas de oxigênio é constante e, nesta situação, o término do estresse não ocorre. As proteínas diferencialmente expressas observadas neste trabalho, portanto, provavelmente são constantemente expressas ou reprimidas em uma situação natural. Essa observação, no entanto, não torna os resultados observados menos importantes, uma vez que essas proteínas são, de fato, induzidas pelo estímulo do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Uma questão importante a ser observada é se as proteínas induzidas pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presentes no término do estresse estariam atuando sobre o reparo de estruturas previamente danificadas. A observação do perfil de dano ao DNA nos permitiu determinar que ao término do estresse o DNA de vermes adultos de *S. mansoni* apresentam níveis de dano similares ao de vermes não tratados. Mesmo considerando que, 5 horas após o tratamento oxidante dos vermes, o dano ao DNA seja desprezível, isso não exclui a possibilidade do reparo de outras moléculas serem conduzidos mais lentamente, ou

mesmo que os fatores de reparo de DNA sejam estáveis e permaneçam presentes por um longo período de tempo.

Entre as proteínas diferencialmente expressas observadas nos diferentes tratamentos, 10 foram selecionadas para identificação por espectrometria de massa. Essas proteínas foram selecionadas por apresentarem expressão abundante, o que tornaria a análise mais simples. O nível de dano às proteínas é uma variável importante, mas que não pôde ser calculada neste trabalho. É possível que a presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resulte na modificação de diferentes resíduos de aminoácidos presentes nas proteínas, alterando assim, a massa ou a carga dos peptídeos obtidos durante a digestão com tripsina, previamente à identificação por MALDI-MS/MS. Diferentes tipos de modificação resultante da ação de espécies reativas de oxigênio foram descritas, das quais podem ser destacadas as formações de dissulfetos em resíduos de cisteína, de sulfóxidos em metioninas e de carbonilas em diversos aminoácidos (SHACTER, 2000). Por esse motivo, a identificação de proteínas oxidadas por espectrometria de massa pode ser extremamente difícil e com baixo rendimento. De fato, das 10 proteínas analisadas, somente 2 foram identificadas com sucesso. As proteínas S24 e S25 foram identificadas como similares à proteína actina de *Pecten sp*, apresentando um escore elevado de 117 e 326, respectivamente. A busca por sequências em bancos de dados de genes e transcritos *S. mansoni* revela a existência de duas variantes da proteína actina, denominadas actina-1 e actina-2. Para determinar qual destas variantes correspondia à sequência obtida, foi realizado um alinhamento entre as três sequências: a de *Pecten sp* obtida e a das duas presentes em *S. mansoni*. O alinhamento mostrou a extensa similaridade entre as três sequências, porém com diferenças pontuais na sequência primária das proteínas. As diferenças observadas nas regiões cobertas pelos peptídeos

identificados por espectrometria de massa permitiram determinar que ambas as proteínas analisadas, S24 e S25, correspondem à actina-2 de *S. mansoni*.

A presença de dois spots em gel bidimensional identificados como a proteína actina-2 é associada à ocorrência de modificações pós-traducionais. No caso específico desta proteína era extremamente provável que esses dois spots poderiam corresponder a isoformas da mesma proteína, o que foi confirmado pela identificação por espectrometria de massa. As duas isoformas apresentam o mesmo ponto isoelétrico, variando apenas em sua massa após o início do estresse oxidativo. A proteína de menor peso molecular apresenta massa e *pI* próximos aos valores teóricos obtidos na literatura. A outra isoforma, no entanto, manteve o mesmo *pI*, porém com uma massa aproximadamente 10 Da maior. Diversos tipos de modificações podem alterar o *pI* ou a massa de uma proteína, produzindo diferentes spots referentes a uma mesma proteína (GRAVES & HAYSTEAD, 2002; LEWIS et al, 2000). Entre as modificações mais comumente encontradas em proteínas podemos citar as fosforilações, as alquilações, ubiquitinações e fragmentações.

A próxima etapa foi, portanto, a determinação de qual modificação poderia ser a observada na proteína actina 2. Como a mudança de massa observada foi coerente com a adição de uma molécula de ubiquitina, a primeira hipótese a ser avaliada foi a ocorrência de uma monoubiquitinação da proteína actina-2. A análise foi então conduzida com um anticorpo anti-conjugados ubiquitinados, o que revelou de fato que a proteína em questão estava conjugada à ubiquitina. Surpreendentemente, a isoforma de menor massa molecular também mostrou reatividade com o anticorpo, o que provavelmente significa que ambas as isoformas apresentam-se modificadas. Assim, é possível que, durante o estresse oxidativo, a proteína actina-2 previamente ubiquitinada possa ou receber uma molécula de ubiquitina adicional, ou ser modificada pela adição

de um grupamento diferente capaz de alterar a sua massa conforme observado. Os experimentos realizados não permitem determinar exatamente a modificação pós-traducional em questão, porém, sugerem fortemente que ocorre a ligação de uma molécula de ubiquitina às demais moléculas de ubiquitina conjugadas à actina-2 via ligação isopeptídica. A monoubiquitinação da proteína actina durante o estresse oxidativo foi previamente descrita no vegetal *Phaseolus vulgaris*, aumentando a estabilidade dos microfilamentos de actina (DANTÁN GONZÁLEZ et al, 2001).

A existência de diferentes isoformas de actinas em vermes adultos de *S. mansoni* foi observada previamente (ABBAS & CAIN, 1989). Devido à extensa similaridade observada, as funções das proteínas codificadas por estas duas sequências são aparentemente redundantes (OLIVEIRA & KEMP, 1995). Apesar de não se conhecer exatamente as funções destas proteínas em *S. mansoni*, as actinas foram relacionadas a processos como o reparo e a manutenção da integridade do tegumento de vermes adultos (LINDER & THORS, 1992). Durante o estresse oxidativo induzido *in vitro* ou naturalmente, o tegumento do parasita é, provavelmente, a principal estrutura danificada por espécies reativas de oxigênio. Considerando esta hipótese, é compreensível que ocorram modificações pós-traducionais em moléculas de actina permitindo a modulação de suas funções durante o estresse oxidativo.

Sayed et al (2006) observaram que as proteínas actina e albumina são, em termos quantitativos, os principais alvos da oxidação durante o estresse em *S. mansoni*. Deve ser destacado o fato que ambas as proteínas estão associadas, a princípio, com uma função mais estrutural do que regulatória. Uma hipótese que poderia justificar a oxidação exacerbada destas proteínas seria a abundância destas proteínas no tegumento do parasita, porção que medeia o contato com espécies reativas de oxigênio proveniente do meio externo. No estudo citado, a proteína identificada como actina apresentou uma

massa molecular estimada de 85 kDa, superior à massa molecular das isoformas identificadas no presente trabalho. No entanto, como pode ser observado, a proteína actina sofre modificações pós-traducionais durante o estresse, como a ubiquitinação, que podem produzir isoformas com massa molecular maior. Como no referido trabalho o estresse foi induzido pelo silenciamento do gene de uma peroxiredoxina, diferente do tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a diferença de massa observada nas isoformas de actina pode ser devida a uma infinidade de fatores. No entanto, a diferença do tempo de incubação de estresse dos dois estudos (5 dias contra 5 horas) parece ser uma hipótese interessante, já que a ubiquitinação é um processo complexo e regulado, envolvendo a participação de diferentes enzimas, que pode desenvolver-se em um período de tempo prolongado. Essa hipótese, porém, não deve ser tomada como fato, uma vez que diversos fatores diferenciaram os tratamentos empregados nos dois estudos. O que pode ser destacado é a importância da modificação pós-traducional para o parasita durante uma situação de estresse oxidativo.

A participação de proteínas estruturais na resposta ao estresse oxidativo é um processo relativamente pouco estudado. Sayed et al (2006) observaram que duas proteínas estruturais, albumina e actina, são, em termos quantitativos, os principais alvos da modificação por espécies reativas de oxigênio. A princípio, o papel destas proteínas na proteção contra ao estresse oxidativo é basicamente o de um agente sequestrante de radicais e espécies reativas. Isto faz sentido se observarmos que estas proteínas se localizam principalmente nas proximidades do tegumento do parasita. A reação imediata das EROs com estas moléculas presentes em abundância nas porções superficiais reduz o risco de danos graves em outras estruturas importantes e mais sensíveis. Dados da literatura sugerem que o gene que codifica para a albumina expressa por *S. mansoni* tenha sido adquirido por transferência horizontal do hospedeiro



para o verme (WILLIAMS et al, 2006; DEMARCO et al, 2007). Diferentemente da albumina, o papel da proteína actina na resposta ao estresse oxidativo aparentemente é muito mais complexo, pois foram descritos diferentes tipos de modificação capazes de modular sua função. Os dados disponíveis, no entanto, não permitem a determinação dos eventos desencadeados pela modificação da actina durante o estresse oxidativo.

Como pôde ser observado anteriormente, as enzimas do sistema antioxidante do parasita *S. mansoni* são fundamentais para a sobrevivência do parasita no interior dos organismos hospedeiros e, por isso, tem sido considerados sítios interessantes para intervenção quimioterápica. Recentemente, diferentes inibidores destas enzimas têm sido testados e apresentaram eficácia na eliminação de vermes adultos de *S. mansoni* (SIMENOV et al, 2008; LEA et al, 2008). Apesar da descoberta destas prováveis drogas, o tratamento da esquistossomose ainda é baseado na quimioterapia com a praziquantel, a qual apresenta desvantagens como a probabilidade do desenvolvimento de resistência e a ineficácia contra as formas larvais.

A inibição de enzimas responsáveis pela eliminação de espécies reativas de oxigênio resulta na indução de estresse oxidativo nas células do parasita. O bloqueio da atividade de uma destas enzimas reduz a eficiência do sistema antioxidante do parasita, aumentando a tempo de meia vida de EROs e, conseqüentemente, os seus níveis intracelulares. O efeito bioquímico observado pode ser comparado a uma situação onde ocorre a formação excessiva de EROs, exceto pela atividade reduzida da enzima inibida. Para o uso de inibidores como drogas esquistossomicidas, as diferenças existentes entre as enzimas do hospedeiro e de *S. mansoni* devem ser exploradas para que se obtenham inibidores específicos para o parasita. Entre as desvantagens do uso de inibidores químicos no combate a infecções, uma das principais é a possibilidade de desenvolvimento de resistência ao tratamento. Qualquer tratamento quimioterápico

convencional é suscetível à perda de eficácia em decorrência do surgimento de resistência ao fármaco utilizado. Alternativamente à abordagem quimioterápica convencional, podemos obter um estresse oxidativo, semelhante ao desenvolvido pela inibição de enzimas antioxidantes, através da estimulação da formação de EROs através de agentes químicos e físicos.

Diante do contexto exposto, a terapia fotodinâmica vem sendo considerada uma abordagem interessante no tratamento de diversas doenças, infecciosas ou não, como cânceres e infecções microbianas (ORTH et al, 2000; HAMBLIM & HASAN, 2004; TRIESSCHEIJM et al, 2006). Resumidamente, a terapia fotodinâmica consiste na administração de uma molécula, inócua em seu estado fundamental, capaz de ser excitada por meio de uma fonte luminosa, na presença de oxigênio, gerando produtos altamente reativos, como espécies reativas de oxigênio. Como não existe nas células um alvo molecular específico para o dano desencadeado por EROs, é extremamente improvável o desenvolvimento de resistência ao tratamento através dos mecanismos comumente encontrados na quimioterapia convencional. A terapia fotodinâmica ainda é uma abordagem pouco explorada para o controle de doenças parasitárias. Os estudos acerca da fotossensibilização de parasitas ainda está restrito aos processos de descontaminação de água e de materiais biológicos (SANTUS et al, 1998; SÖKMEN et al, 2008). Neste trabalho, foi avaliada a eficácia da fotossensibilização na eliminação de vermes adultos de *S. mansoni*.

O fotossensibilizador escolhido para os experimentos deste trabalho foi da classe dos fenotiazínicos, o azul de metileno. Este fotossensibilizador, por sua simplicidade, é um protótipo para experimentos de fotossensibilização, embora seja pouco utilizado na prática clínica em virtude da baixa seletividade celular (WAINWRIGHT et al, 1997). A fonte de luz utilizada foi um laser de diodo com comprimento de onda fixo de 670 nm.

Inicialmente foram avaliadas diferentes concentrações do fotossensibilizador para determinar a que teria maior probabilidade de ser efetiva contra vermes adultos. Surpreendentemente, nenhuma das concentrações empregadas foi capaz de reduzir a viabilidade dos vermes devido à fotossensibilização. A pequena redução da viabilidade observada em vermes tratados com 500 µg/ml de azul de metileno é devida provavelmente à toxicidade do fotossensibilizador em altas concentrações. O excesso de fotossensibilizador no meio de tratamento, durante a exposição à luz, pode ser responsável por um efeito semelhante a um sombreamento, onde moléculas do fotossensibilizador nas camadas mais superficiais do meio impedem a penetração da luz nas camadas mais profundas, onde estão localizados os vermes no tratamento realizado. Outras hipóteses para a baixa eficiência da fotossensibilização com altas concentrações da droga são a possibilidades de formação de agregados ou de uma auto-inativação do fotossensibilizador.

Para eliminar a possibilidade de perda de eficiência por excesso de fotossensibilizador, os experimentos foram então realizados após a remoção do excesso da droga do meio de tratamento. A remoção do excesso da droga não reduz a concentração efetiva que é absorvida pelo verme, conforme pôde ser evidenciado pela visualização da coloração azul nos vermes. Nestas condições, os resultados mostraram uma redução significativa da viabilidade de vermes expostos à combinação luz + fotossensibilizador. Diferentemente, vermes expostos somente à luz ou somente à droga não apresentaram viabilidade reduzida. Isso sugere que provavelmente o processo responsável pela eliminação dos vermes é a fotossensibilização, uma vez que os agentes isoladamente não foram capazes de eliminar o parasita.

O objetivo destes experimentos foi apenas a avaliação do potencial da fotossensibilização na eliminação de vermes adultos *in vitro*. O sucesso da aplicação

desta abordagem de tratamento *in vivo*, no entanto, é dependente de uma série de fatores o que impede a previsão da relevância da fotossensibilização no tratamento da esquistossomose. Um dos fatores que devem ser levados em consideração é a procura por fotossensibilizadores que apresentem uma seletividade maior pelas células-alvo, ou seja, que sejam absorvidas preferencialmente pelo parasita. A falta de especificidade da droga pode aumentar consideravelmente a toxicidade e assim, impedir o uso terapêutico. Novas fontes de luz, com maior penetração nos tecidos e menor efeito biológico também devem ser pesquisadas, para que seja possível a excitação da droga sem que sejam produzidos danos aos tecidos do hospedeiro (LUKSIENE, 2003; ORTEL et al, 2009). Novos estudos devem ser realizados para que esta abordagem possua alguma aplicação prática no tratamento da esquistossomose. No entanto, esta abordagem pode ser muito interessante se for utilizada no controle ambiental de formas larvais do parasita. Apesar dos resultados preliminares obtidos neste trabalho, estudos adicionais deverão ser conduzidos para padronização das condições ideais para o uso prático desta metodologia para controle do parasita.

## ***6 Conclusões***

- 1) A dose de peróxido de hidrogênio sub-letal para o tratamento de vermes adultos *in vitro* é de 200  $\mu\text{M}$ . Este valor é superior aos níveis desta espécie reativa de oxigênio gerado comumente pelos organismos hospedeiros.
- 2) Os níveis de peróxido de hidrogênio no meio de cultura contendo vermes adultos declinam rapidamente no início do experimento, porém mais lentamente nos períodos mais prolongados do tratamento. Isto sugere que os vermes adultos possuem sistemas capazes de manter as concentrações de EROs em valores compatíveis com a viabilidade do parasita
- 3) A exposição sub-letal ao peróxido de hidrogênio resulta em um aumento na frequência de danos ao DNA de *S. mansoni*. Nos períodos mais tardios do tratamento, porém, esse dano é quase que completamente reparado, o que sugere que o parasita é capaz de se recuperar após um estresse sub-letal.
- 4) A atividade proteolítica exógena em extratos protéicos de *S. mansoni* é aumentada durante o estresse oxidativo. Tanto as atividades ATP dependente e independente foram aumentadas, o que sugere que esta atividade proteolítica aparenta ser resultado de um aumento no número de proteassomas e não da modulação por grupamentos reguladores ativação do mesmo.
- 5) Diversas proteínas apresentam expressão diferencial durante o estresse oxidativo. Entre estas proteínas, foi identificada a proteína albumina, expressa em abundância por vermes adultos, a qual é modificada pós-traducionalmente durante o tratamento.

- 6) A proteína albumina apresenta-se conjugada a moléculas de ubiquitina. O resultado desta modificação, no entanto, não pode ser determinado neste trabalho
  
- 7) O estresse oxidativo induzido por fotossensibilização é capaz de eliminar vermes adultos *in vitro*. Apesar de ainda não ser possível utilizar esta metodologia *in vivo*, este resultado destaca uma abordagem alternativa que, com estudos adicionais, pode ser utilizada para eliminação de focos ambientais do parasita.

## ***7 Referências Bibliográficas***



ABBAS, M. K.; CAIN, G. D. Analysis of isoforms of actin from *Schistosoma mansoni* by two-dimensional gel electrophoresis. **Parasitology Research**, v. 76, p. 178-180, 1989.

ALGER, H. M.; WILLIAMS, D. L. The disulfide redox system of *Schistosoma mansoni* and the importance of a multifunctional enzyme, thioredoxin glutathione reductase. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 121, p. 129-139, 2002.

AL-TASSAN, N.; EISEN, T.; MAYNARD, J.; BRIDLE, H.; SHAH, B.; FLEISCHMANN, C.; SAMPSON, J. R.; CHEADLE, J. P.; HOULSTON, R. S. Inherited variants in MYH are unlikely to contribute to risk of lung carcinoma. **Human genetics**, v. 114, p. 207-210, 2004.

AMARAL, R. S; PORTO. M. A. S. Evolução e situação atual da esquistossomose no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 27 (Supl. III), p. 73-90, 1994.

ARAGON, A. D.; IMANI, R. A.; BLACKBURN, V. R.; CUNNINGHAM, C. Microarray based analysis of temperature and oxidative stress induced messenger RNA in *Schistosoma mansoni*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 162, p. 134-141, 2008.

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.

BAYNE, C. J.; HAHN, U. K.; BENDER, R. C. Mechanisms of molluscan host resistance of parasite strategies for survival. **Parasitology**, v. 123, p. 159-167, 2001.

BENNETT, P.; ISHCHENKO, A. A.; LAVAL, J.; PAAP, B.; SUTHERLAND, B. M. Endogenous DNA damage clusters in human hematopoietic stem and progenitor cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, p. 1352-1359, 2008.

BREUSING, N.; GRUNE, T. Regulation of proteasome protein degradation during the oxidative stress and aging. **Biological Chemistry**, v. 389, p. 203-209, 2008.

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

CALDAS, I. R.; CAMPI-AZEVEDO, A. C.; OLIVEIRA, L. F. A.; SILVEIRA, A. M. S.; OLIVEIRA, R. C.; GAZINELLI, G. Human schistosomiasis mansoni: Immune responses during acute and chronic phases of the infection. **Acta tropica**, v. 108, p. 109-117, 2008.

CAPELLA, M. A.; CAPELLA, L. S. A light in multidrug resistance: photodynamic treatment of multidrug resistant tumors, *Journal of Biomedical Science*, v. 10, p. 361-366, 2003.

CHELICO, L.; HAUGHIAN, J. L.; WOYTOWICH, A. E.; KHACHATOURIANS, G. G. Quantification of ultraviolet-C irradiation induced cyclobutane pyrimidine dimers and their removal in *Beuveria bassiana* conidiospore DNA. **Mycologia**, v. 97, p. 621-627, 2005.

CIECHANOVER, A. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and proteasome. **Nature Reviews of Molecular Cell Biology**, v. 6, p. 79-87, 2005.

CIRCU, M.; YEE AW, T. Glutathione and apoptosis. **Free Radical Research**, v. 42, p. 689-706, 2008.

COSTA, V.; QUINTANILHA, A.; MORADAS-FERREIRA, P. Protein oxidation, repair mechanisms and proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. **IUBMB Life**, v. 59, p. 293-298, 2007.

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

CROSS, J. H.; VIEIRA, P.; MIRANDA, H. P.; CERQUEIRA, M.; DE LOURDES DELGADO, M.; COELHO, H.; ANTUNES, D.; CORREIA DA COSTA, J. M. Latent schistosomiasis in portuguese soldiers. **Military medicine**, v. 172, p. 144-146, 2007.

DÁNTAN-GONZALEZ, E.; ROSENSTEIN, Y.; QUINTO, C.; SÁNCHEZ, F. Actin Monoubiquitylation is induced in plants in response to pathogens and symbionts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, p. 1267-1273, 2001.

DAVID, S. S.; O'SHEA, V. L.; KUNDU, S. Base-excision repair of oxidative DNA-damage. **Nature**, v. 447, p. 941-950, 2007.

DeMARCO, R.; MATHIESON, W.; DILLON, G. P.; WILSON, R. A. Schistosome albumin is of host, not parasite, origin. **International Journal for Parasitology**, v. 37, p. 1201-1208, 2007.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47-95, 2002

EL-ANSARY, A. Biochemical and immunological adaptation in *Schistosoma* parasitism. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology**, v. 136, p. 227-243, 2003.

ENGELS, D.; CHITSULO, L.; MONTRESOR, A., SAVIOLI, L. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. **Acta Tropica**, v. 82, p. 139-146, 2002.

FALLON P.G. *Schistosoma* resistance to praziquantel, **Drug Resistance Updates**, v. 1, p. 236-241, 1998.

FERNANDES, R.; RAMALHO, J.; PEREIRA, P. Oxidative stress upregulates the ubiquitin proteasome pathway in retinal endothelial cells. **Molecular Vision**, v. 12, p. 1526-1535, 2006.

FITZPATRICK, J. M.; JOHNSTON, D. A.; WILLIAMS, G. W.; WILLIAMS D. J.; FREEMAN, T. C.; DUNNE, D. W.; HOFFMANN, K. F. An oligonucleotide microarray for transcriptome analysis of *Schistosoma mansoni* and its application/use to investigate gender-associated gene expression. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 141, p. 1-13, 2005.

FRIDOVICH, I. The biology of oxygen radicals. **Science**, v. 201, p. 875-880, 1978.

FURTADO, C.; REGIS-DA-SILVA, C. G.; PASSOS-SILVA, D. G.; FRANCO, G. R.; MACEDO, A. M.; PENA, S. D. J.; MACHADO, C. R. *Schistosoma mansoni*: The IMP4 gene is involved in DNA repair/tolerance after treatment with alkylating agent methyl methane sulfonate. **Experimental Parasitology**. v. 116, p. 25-34, 2007.

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

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.

GORMAN, S. A.; BROWN, S. B.; GRIFFITHS, J. Overview of synthetic approaches to porphyrin, phthalocyanine, and phenothiazine photosensitizers for photodynamic therapy. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v.25, p.71-108, 2006.

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

GROLL, M.; HUBER, R. Inhibitors of the eukaryotic 20S proteasome core particle: a structural approach. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1695, p. 33-40, 2004.

GRUNE, T. Oxidative stress, aging and the proteasomal system. **Biogerontology**, v. 1, p. 31-40, 2000.

GRUNE, T.; REINHECKEL, T.; DAVIES, K. J. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. **FASEB journal**, v. 11, p. 526-534, 1997.

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

HAGAN, P. The human immune response to *Schistosoma* infection. In. **The biology of Schistosomes: From genes to latrines**. Academic Press, Londres, 1987.

HAMBLIM, M. R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 3, p. 436-450, 2004.

HAHN, U. K.; BENDER, R. C.; BAYNE, C. J. Killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*: role of reactive oxygen species. **Journal of Parasitology**, v. 87. p.292-299, 2001.

HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 3, p. 436-450, 2004.

HARRIS, F.; CHATFIELD, L. K.; PHOENIX, D. A. Phenothiazinium based photosensitizers-photodynamic agents with a multiplicity of cellular targets and clinical applications. **Current Drug Targets**, v.6, p.615-627, 2006.

HIDEMA, J.; KUMAGAI, T.; SUTHERLAND, J. C.; SUTHERLAND, B. M. Ultraviolet B-sensitive rice cultivar deficient in cyclobutyl pyrimidine dimer repair. **Plant Physiology**, v. 113, p. 39-44, 1997.

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.

HOFMANN, B.; HECHT, H. J.; FLOHÉ, L. Peroxiredoxins, **Biological Chemistry**, v. 383, p. 347-364, 2002.

HOFMANN, R. M.; PICKART, C. M. *In vitro* assembly and recognition of Lys-63 polyubiquitin chains. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 27936-27943, 2001.

IMLAY, J. A. Superoxide and hydrogen peroxide. **Annual Reviews of Biochemistry**, v. 77, p. 755-776, 2008.

JOHNSON, F.; GIULIVI, C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. **Molecular aspects of medicine**, v. 26, p. 340-352, 2005.

JOLLY, E. R.; CHIN, C. S.; MILLER, S.; BAHGAT, M. M.; LIM, K. C.; DERISI, J.; MCKERROW, J. H. Gene expression patterns during adaptation of a helminth parasite to different environmental niches. **Genome Biology**, v. 8, R65, 2007.

KATZ, N. The discovery of Schistosomiasis in Brazil. **Acta Tropica**, v. 108, p. 69-71, 2008.

KAZURA, J. W.; FANNING, M. M.; BLUMER, J. L.; MAHMOUD, A. A. F. Role of cell-generated hydrogen peroxide in granulocyte-mediated killing of schistosomula of

*Schistosoma mansoni* in vitro. **Journal of Clinical Investigations**, v. 67, p. 93-102, 1981.

KEHRER, J. P. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicology**, v. 149, p. 43-50, 2000.

KHAN, A.U. Singlet Molecular Oxygen from Superoxide Anion and Sensitized Fluorescence of Organic Molecules. **Science**, v. 168, p. 476-477, 1970.

KOCHEVAR, I. E.; LAMBERT, C. R.; LYNCH, M. C.; TEDESCO, A. C. Comparison of photosensitized plasma membrane damage caused by singlet oxygen and free radicals. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1280, p.223-230, 1996.

KOHLER, A.; CASCIO, P.; LEGGETT, D. S.; WOO, K. M.; GOLDBERG, A. L.; FINLEY, D. The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. **Molecular Cell**, v. 7, p. 1143-1152, 2001.

KÜLTZ, D. Evolution of the cellular stress proteome: from monophyletic to ubiquitous function. **Journal of the Experimental Biology**, v. 206, p. 3119-3124, 2003.

LEA, W. A.; JADHAV, A.; RAI, G.; SAYED, A. A.; CASS, C. L.; INGLESE, J.; WILLIAMS, D. L.; AUSTIN, C. P.; SIMENOV, A. A 1,536-well-based kinetic HTS assay for inhibitors of *Schistosoma mansoni* thioredoxin glutathione reductase. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 6, p. 551-555, 2008.

LEWIS, T. S.; HUNT, J. B.; AVELINE, L. D.; JONSCHER, K. R.; LOUIE, D. F.; YEH, J. M.; NAHREINI, T. S.; RESING, K. A.; AHN, N. G. Identification of novel MAP kinase pathway signaling targets by functional proteomics and mass spectrometry. **Molecular Cell**, v. 6, p. 1343-1354, 2000.

LINDER, E.; THORS, C. *Schistosoma mansoni*: praziquantel-induced tegumental lesion exposes actin of surface spines and allows binding of actin depolymerizing factor, gelsolin. **Parasitology**, v. 105, p. 71-79, 1992.

LOVERDE, P. T. Do antioxidants play a role in *Schistosoma* host-parasite interactions? **Parasitology Today**, v. 14, p. 284-289, 1998.

LUKSIENE, Z. Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment. **Medicina**, v. 39, p. 1137-1150, 2003.

MARSELLA, R.; BENEDETTO, R.; VARI, R.; FILESI, C.; GIOVANNINI, C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, p. 577-586, 2005.

MEI, H.; LoVERDE, P. T. *Schistosoma mansoni*: the developmental regulation and immunolocalization of antioxidant enzymes. **Experimental Parasitology**, v. 86, p. 69-78, 1997.

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.

METWALI, A.; ELLIOT, D.; BLUM, A. M.; LI, J.; SANDOR, M.; LYNCH, R.; NOBENTRAUTH, N.; WEINSTOCK, J. V. The granulomatous response in murine *Schistosomiasis mansoni* does not switch to Th1 in IL-4-deficient C57BL/6 mice. **Journal of Immunology**, v. 157, p. 4546-4553, 1996.

MKOJI, G. M.; SMITH, J. M.; PRICHARD, R. K. Antioxidant systems of *Schistosoma mansoni*: correlation between susceptibility to oxidant killing and the levels of scavengers of hydrogen peroxide to oxygen free radicals. **International Journal for Parasitology**. v. 18, p. 661-666, 1988.

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochemical Journal**, v. 417, p. 1-13, 2009.

NAKABEPPU, Y.; SAKUMI, K.; SAKAMOTO, K.; TSUCHIMOTO, D.; TSUZUKI, T.; NAKATSU, Y. Mutagenesis and carcinogenesis caused by the oxidation of nucleic acids. **Biological Chemistry**, v. 387, p. 373-379, 2006.

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. **Biochemical 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.

- OLIVEIRA, G. C.; KEMP, W. M. Cloning of two actin genes from *Schistosoma mansoni*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 75, p. 119-122, 1995.
- ORTEL, B.; SHEA, C. R.; CALZAVARA-PINTON, P. Molecular mechanisms of photodynamic therapy. **Frontiers in Bioscience**, v. 14, p. 4257-4172, 2009.
- ORTH, K.; BECK, G.; GENZE, F.; RUCK, A. Methylene blue mediated photodynamic therapy in experimental colorectal tumors in mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 57, p. 186-192, 2000.
- PEARCE, E. J.; CASPAR, P.; GRZYCH, J. M.; LEWIS, F. A.; SHER, A. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 173, p. 159-166, 1991.
- PICKART, C. M. Mechanism underlying ubiquitination. **Annual Reviews of Biochemistry**, v. 70, p. 503-533, 2001.
- REINHECKEL, T.; GRUNE, T.; DAVIES, K. J. A. The measurement of protein degradation in response to oxidative stress. **Methods in Molecular Biology**, v. 99, p. 49-60, 2000.
- REY, L. **Bases da parasitologia Médica**. 2ªed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2002.
- ROLLINSON, D.; SOUTHGATE, V. R. **The genus *Schistosoma*: a taxonomic appraisal**. Academic press: 1-49, 1978.
- ROOT, R. K.; METCALF, J.; OSHINO, N.; CHANCE, B. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release from human granulocytes during phagocytosis. I. Documentation, quantitation, and some regulating factors. **Journal of Clinical Investigations**, v. 55, p. 945-955, 1975.
- RUELAS, D. S.; KARENTZ, D.; SULLIVAN, J. T. Sublethal effects of ultraviolet b radiation on miracidia and sporocysts of *Schistosoma mansoni*: intramolluscan development, infectivity and photoreactivation. **Journal of Parasitology**, v. 93, p. 1303-1310, 2007.



SANTUS, R.; GRELLIER, P.; SCHRÉVEL, J.; MAZIÈRE, J. C.; STOLTZ, J. F. Photodecontamination of blood components: advantages and drawbacks. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 18, p. 299-308, 1998.

SAYED, A. A.; COOK, S. K.; WILLIAMS, D. L. Redox balance mechanisms in *Schistosoma mansoni* rely on peroxiredoxins and albumin and implicate peroxiredoxins as novel drug targets. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 17001-17010, 2006.

SHANG, F.; GONG, X.; TAYLOR, A. Activity of ubiquitin-dependent pathway in response of oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 23086-23093, 1997.

SCHENELL, J. D.; HICKE, L. Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 35857-35860, 2003.

SEIFRIED, H. E.; ANDERSON, D. E.; FISHER, E. I.; MILNER, J. A. A review of interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, p. 567-579, 2007.

SHACTER, E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. **Drug metabolism reviews**, v. 32, p. 307-326, 2000.

SHARMA, M.; KHANNA, S.; BULUSU, G.; MITRA, A. Comparative modeling of thioredoxin glutathione reductase from *Schistosoma mansoni*: a multifunctional target for antischistosomal therapy. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 27, p. 665-675, 2009.

SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrilamide gels. **Analytical chemistry**, v. 68, p. 850-858, 1996.

SHRINGARPURE, R.; GRUNE, T.; MEHLHASE, J.; DAVIES, K. J. Ubiquitin conjugation is not required for survival during stationary phase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 311-318, 2003.

SILVA, C. S.; SILVA, S. H.; PEREIRA-JUNIOR, O. S.; CABRAL, F. J.; COSTA-CRUZ, J. M.; RODRIGUES, V. *Schistosoma mansoni*: gene expression of the nucleotide excision repair factor 2 (NEF2) during the parasite life cycle, and in adult worms after exposure to different DNA-damaging agents. **Acta Tropica**, v. 104, p. 52-62, 2007.

SILVA, S. H.; PEREIRA-JUNIOR, O. S.; SILVA, C. S.; BRIGATTO, O. M.; MACEDO, E.; RODRIGUES, V. Characterization of the gene expression related to the process of DNA damage tolerance in *Schistosoma mansoni*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101 (Supl. 1), p. 157-160, 2006.

SIMEONOV, A.; JADHAV, A.; SAYED, A. A.; WANG, Y.; NELSON, M. E.; THOMAS, C. J.; INGLESE, J. I.; WILLIAMS, D. L.; AUSTIN, C. P. Quantitative high-throughput screen identifies inhibitors of the *Schistosoma mansoni* redox cascade. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, e127, 2008.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SITTE, N.; MERKER, K.; GRUNE, T. Proteasome-dependent degradation of oxidized proteins in MRC-5 fibroblasts. **FEBS letters**, v. 440, p. 399-402, 1998.

SLUND, F.; ZHENG, M.; BECKWITH, J.; STORZ, G. Regulation of transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. **Proceedings of National Academy of Sciences of USA**, v. 96, p. 6161-6165, 1999.

SMITHERS, S. R.; TERRY, R. J. Infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and recovery of adult worms. **Parasitology**, v. 55, p. 695-700, 1965.

SÖKMEN, M.; DEGERLI, S.; ASLAN, A. Photocatalytic disinfection of *Giardia intestinalis* and *Acanthamoeba castellanii* cysts in water. **Experimental Parasitology**, v. 119, p. 44-48, 2008.

SQUIER, T. C. Redox modulation of cellular metabolism through targeted degradation of signaling proteins by the proteasome. **Antioxidants and Redox signaling**, v. 8, p. 217-228, 2006.

STADECKER, M. J.; ASAH, H.; FINGER, E.; HERNANDEZ, H. J.; RUTITZKY, L. I.; SUN, J. The immunobiology of Th1 polarization in high pathology schistosomiasis. **Immunological Reviews**, v. 201, p. 168-179, 2004.

STRAKHOVSKAYA, M. G.; ZHUKHOVITSKII, V. G.; MIRONOV, A. F.; SEREGIN, A. M.; STRANADKO, E. F.; RUBIN, A. B. Fungicidal activity of khlorin photosensitizers. **Doklady. Biochemistry and Biophysics**, v.384, p.155-158, 2002.

SUNIL, K.; NARAYANA, B. Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide in water and cream samples. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 81, p. 422-426, 2008.

SUTHERLAND, B. M.; BENNETT, P. V.; SUTHERLAND, J. C. DNA damage quantitation by alkaline gel electrophoresis. **Methods in Molecular Biology**, v. 314, p. 251-273, 2006.

TEGOS, G. P.; DEMIDOVA, T. N.; ARCILA-LOPEZ, D.; LEE, H.; WHARTON, T.; GALI, H.; HAMBLIN, M. R. Cationic fullerenes are effective and selective antimicrobial photosensitizers. **Chemistry & Biology**, v.12, p.1127-1135, 2005.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

TRIESSCHEIJM, M.; BAAS, P.; SCHELLENS, J. H.; STEWART, F. A. Photodynamic therapy in oncology. **Oncologist**, v. 11, p. 1034-1044, 2006.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal and physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VAN HELLEMOND, J. J.; VAN BALKOM, B. W.; TIELENS, A. G. *Schistosoma* biology and proteomics: progress and challenges. **Experimental Parasitology**, v. 117, p. 267-274, 2007.

VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; DEMARCO, R. Current developments on *Schistosoma* proteomics. **Acta Tropica**, v. 108, p.

VERMEIRE, J. J.; TAFT, A. S.; HOFFMANN, K. F.; FITZPATRICK, J. M.; YOSHINO, T. P. *Schistosoma mansoni*: DNA microarray gene expression profiling during the miracidium-to-mother sporocyst transformation. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 147, p. 39-47, 2006.

WAINWRIGHT, M.; PHOENIX, D. A.; MARLAND, J.; WAREING, D. R. A.; BOLTON, F. J. A study of photobactericidal activity in the phenothiazinum series. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 19, p. 75-80, 1997.

WASSMANN, S.; WASSMANN, K.; NICKENIG, G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. **Hipertension**, v. 44, p. 381-386, 2004.

WILLIAMS, D. L.; SAYED, A. A.; RAY, D.; McARTUR, A. G. *Schistosoma mansoni* albumin, a major defense against oxidative damage, was acquired by lateral gene transfer from a mammalian host. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 150, p. 359-363, 2006.

WILSON, R. A.; LAWSON, J.R. An examination of the skin phase of schistosomose migration using hamster cheek pouch preparation. **Parasitology**, v. 80, n. 2, p. 257-266, 1980.

WINTERBOURN, C. C.; HAMPTON, M. B. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, p. 549-561, 2008.

WONG, C. M.; WONG, K. H.; CHEN, X. D. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, p. 927-938, 2008.

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

***8 Anexo***

**Biochemical characterization of the oxidative stress in *Schistosoma mansoni***Sergio Henrique da Silva<sup>a</sup>, Olavo dos Santos Pereira-Junior<sup>b</sup>, Lizandra GuidiMagalhães<sup>a</sup>, Vanderlei Rodrigues<sup>a\*</sup>.

<sup>a</sup>-Department of Biochemistry and Immunology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

<sup>b</sup>-Center for Agrarian Sciences, Department of Zootechny, Federal University of Espírito Santo, Alegre, Espírito Santo, Brazil.

**Keywords:** *Schistosoma mansoni*, oxidative stress, photosensitization

\*Corresponding Author: Dr. Vanderlei Rodrigues

Department of Biochemistry and Immunology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo. Av Bandeirantes, 3900, 14049-900, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

Tel.: +55 16 3602 3235; fax: +55 16 3633 6840.

e-mail address: vrodrigu@fmrp.usp.br

## Summary

*Schistosoma mansoni* has a complex life cycle, living in water and in vertebrate and invertebrate hosts. One of the most important stress factors to this parasite is the oxidative stress generated by both worm metabolism and host immune system. In the present report, we showed a general characterization of *S. mansoni* adult worms exposed to hydrogen peroxide. This characterization included the determination of the sub-lethal dose, estimation of DNA damage produced by the oxidizing agent, and the determination of the differential protein expression profile across the response to the oxidative stress. We observed that both damage and cells response increase in the first hour but decrease 5 h after exposure to the oxidizing agent, indicating the rapid response against stress.

## Introduction

*Schistosoma mansoni* is one of the causative agents of schistosomiasis, a severe disease which affects 250 million people in the tropical and subtropical areas of the world [1]. Currently, praziquantel is the single drug used for the treatment of this parasitosis, however, some cases of resistance are emerging recently [2]. Thus, research on this parasite biology is very important to the development of new therapeutic approaches.

In the course of their life cycle, these parasites are exposed to different stress from physical and chemical sources. In the free-living stages, these stresses may be resultant from exposure to chemical pollutants present in water environment, variations in temperature and solar radiation [3,4,5]. Otherwise, in adult worms, the most relevant stress factor is probably the reactive oxygen species (ROS) released by host immune system and by its own aerobic metabolism. Consistent with this hypothesis, in infection-resistant snails, miracidium is rapidly eliminated by a process that results in the increase of oxygen consumption rate, indicating a role for the oxidative stress on the defense mechanism in resistant snails [6]. Further evidence is provided by description of high levels of transcripts to antioxidant enzymes in adult worms [7], suggesting the need to adapt to an intense exposure to ROS at this stage. Adult worms live up to 30 years in the definitive host organism, and thus, they must show antioxidant mechanisms to preserve the integrity of their cells and survive to the oxidative burst generated.

ROS are released by many cellular processes from *S. mansoni* and its hosts, as aerobic respiration, immune defense and other oxidative pathways [8]. The general mechanism of ROS production in biological organisms is well established and consists in the reduction of a triplet-state oxygen ( $^3\text{O}_2$ ) to give a highly reactive superoxide anion ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) [9,10]. This radical is rapidly converted into hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) by an



enzymatic mechanism, involving the enzyme superoxide dismutase (SOD) [11], and non-enzymatic processes, with co-production of singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ) [12]. Thus, hydrogen peroxide and its sub-products are probably the most important ROS in biological systems, and directly affects different groups of biomolecules found in cells, as lipids, proteins and nucleic acids.

The mechanisms which cells respond to oxidative stress are as diverse as molecular targets affected. The response involves the regulation of protein expression and consists in events as repair or substitution of damaged molecules, recovery of redox balance, cell cycle control and apoptosis. Some of these processes were described in *S. mansoni*. A number of genes linked to DNA repair and DNA damage tolerance were identified in *S. mansoni* and some of them were described to be regulated upon exposure to  $\text{H}_2\text{O}_2$  and other DNA damaging agents [13,14,15]. A number of proteins induced by treatment with  $\text{H}_2\text{O}_2$  and the role of antioxidant enzymes as glutathione peroxidases (GP) and peroxiredoxins (Prx) was described in *S. mansoni* [16,17]. Despite these works, the global profile of proteins induced or repressed by  $\text{H}_2\text{O}_2$  treatment in *S. mansoni* remains unclear.

To increase the knowledge about the different pathways involved in the response to oxidative damage in *S. mansoni*, we conduct a large scale study to identify proteins induced or repressed under treatment with  $\text{H}_2\text{O}_2$ . We also determined the extent of the damage to their cells and the dynamics of the process across the period after the exposure to a sub-lethal dose of  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Data presented in this work shows the high capacity of parasite tolerance to oxidative stress generated by the host during the infection.

## Material and Methods

*Parasites.* The LE strain of *Schistosoma mansoni* was maintained by successive passage through *Biomphalaria glabrata* snails and BALB/c mice. Briefly, eggs were obtained from livers of infected mice, which were homogenized and digested with trypsin for 3 h at 37°C. Then, eggs were collected by sedimentation and washed with physiological solution, according to Ashton et al 2001 [22]. Miradia were released from eggs by exposure to artificial light for 1 h in distilled water, and then used to infect *Biomphalaria glabrata* snails. Cercariae were obtained from infected snails by exposure to artificial light and used to infect BALB/c mice to develop adult worms. Adult worms of both sexes were recovered by hepatic perfusion of 58 days-infected mice, under aseptic conditions, and submitted to further treatments.

*In vitro H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment.* *S. mansoni* adult worms were cultured on RPMI 1640 medium (Gibco-BRL) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and penicillin-streptomycin (100 µg ml<sup>-1</sup>) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>, under dark conditions. After 24 h of incubation, oxidative stress was induced by addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to a final concentration in the range of 200 to 1000 µM. Worms were incubated for 0 (non-exposed control), 30 minutes, 1 and 5 h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>, under dark conditions. After incubation, subsequent experiments were performed, or the worms were frozen in liquid nitrogen.

*Viability tests.* The worms treated with different H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations were incubated in the dark for 24 h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. The viability was accessed by reaction with the 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide reagent (MTT), as described by Mosmann 1983 [23] and modified by James et al 2007 [24]. MTT is converted, from a yellow salt to a dark blue formazan product, by the mitochondria of living cells. A couple of worms were incubated with 100 µl MTT reagent (1,2 M in PBS solution) for 30 minutes at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. As negative

controls, couples of adult worms incubated for 1 h at 70°C. The formazan product was extracted from worms by washing with 200  $\mu$ l of DMSO for 1 h at room temperature. The viability was accessed by measure of absorbance at 575 nm.

*Determination of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration in RPMI medium.* After treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, worms were incubated for 1 h. During this period, aliquots were collected after 10, 20, 30 and 60 minutes to quantify the oxidant concentration across the experiment. The concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was estimated by the reduction of iodide method as described by Sunil and Narayana, 2006 [25].

*DNA damage measure.* The DNA damage measure was conducted through the method described by Sutherland, 2006 [26]. Briefly, this method consists in an alkaline electrophoresis of DNA from different treatments followed by a densitometric analysis of their fragmentation. Thus, an increase in the damage results in a decrease in the average of mass of DNA fragments in a treatment. The worms on RPMI 1640 medium (37°C and 5% CO<sub>2</sub>) were exposed to 200  $\mu$ M of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and rapidly frozen in liquid nitrogen after 0, 30 min, 1 and 5 hours of incubation. The DNA of these samples was extracted with DNAzol reagent according to the manufacturer instructions (Invitrogen). Exactly 5  $\mu$ g of DNA obtained from each treatment was applied in 1% alkaline agarose gels to perform the damage quantitation. Gels were stained with ethidium bromide and the images were used in a densitometric analysis using the software Quantity One (Bio-Rad).

The pattern of fragmentation resulted in a plot of intensity against migration across the gel. The average length of the fragments (<sup>a</sup>L) were determined and used to estimate the number of strand breaks to each treatment. Results were expressed in breaks per unit length of DNA, which represents the relative frequency of strand breaks ( $\Phi$ ). The equation of relative frequency of strand breaks is  $\Phi = (^aL_+)^{-1} - (^aL_0)^{-1}$ , where

(<sup>a</sup>L<sub>+</sub>) and (<sup>a</sup>L<sub>0</sub>) represents respectively the average length of fragments from exposed or non-exposed samples.

*Bidimensional electrophoresis.* Frozen worms, obtained after oxidant treatment for different times, were transferred to 0.8 ml of a homogenization buffer (5mM Tris-HCl, pH 8, glycerol 1%, EDTA 1 mM, PMSF 1mM, NEM 10mM and MG132 0,1 mM), on ice. A lisate of worms was produced by sonication (2 × 1 min/burst , 21 kHz at 7 μm amplitude), with 1 min of interval on ice to prevent overheating. Cellular debris was removed from samples by centrifugation for 30 min at 10,000 × g, 4°C. The supernatant containing soluble proteins was collected and quantified with Bradford reagent. The proteins present in crude extract were then precipitated using the Clean-up Kit according to instructions from manufacturer (GE Healthcare). The proteins in the pellet were dissolved in an isoelectrofocusing solution (urea 7M, thiourea 2M, CHAPS 4%, IPG buffer 3-11 NL 0,5%, DTT 40 mM and Bromophenol Blue 0,002%).

Exactly 250 μg of proteins from each treatment was applied to 13 cm Immobiline drystrips in a non-linear pH gradient of 3-11 (GE Healthcare) to isoelectrofocusing and incubated for 16 h at 20°C. The run for focusing was conducted in a ETTAN IPGPhor system (GE Healthcare) and consists in the following steps: 500 V (0,5 kV/h), 1000 V (0,8 kV/h), 8000 V (11,3 kV/h) and 8000 V (4,4 kV/h). The strips focused was equilibrated by washing in a SDS-equilibration solution (Tris-HCl 50mM pH 8,8, Urea 6M, Glicerol 30% and SDS 2%) containing 1% DTT for 15 min, and subsequently washed in the SDS-equilibration solution containing 2,5% of iodoacetamide for 15 min. The strips were then applied to a 12,5% polyacrilamide gel to perform the second separation by SDS-Page electrophoresis. After runs, gels were stained by colloidal commassie and the images were acquired using the Imagescanner

(GE healthcare). The images were analyzed in the software ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare).

*Identification of proteins by Maldi MS/MS.* The spots obtained from 2-D gels were excised and treated as described by Shevchenko, 2006 [27]. Briefly, the gel spots were destained with three washes in 200  $\mu$ l of 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  and 50% acetonitrile (v/v) (pH=8) solution. The gel pieces were then washed in sterile water and dehydrated by incubation with 100% acetonitrile. The dried gels were rehydrated with 10  $\mu$ l of trypsin (Promega) solution in 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (pH=8) and incubated for 16 h at 37°C. After incubation, the peptides were extracted from gels by successive washes with 50% acetonitrile, 5% TFA. The volume from samples were concentrated to approximately 10  $\mu$ l and used in Maldi-MS/MS experiments. The mass spectrometry was conducted in a Maldi Q-TOF Premier (Waters) spectrometer. The calibration was performed with a polyethyleneglicol solution. The samples were applied in Maldi plates in a 1:1 solution with a matrix (5 mg/ml  $\alpha$ -cyano-4-hydroxyninnaminic acid in 50% acetonitrile, 0,1% TFA).

*Western blot.* The 2-D gels were obtained as previously described. The proteins were transferred to nitrocellulose membranes into a wet system by 100 V for 1 h at 4°C. The antibody used in this experiment was a 1:10000 dilution of an anti-ubiquitin conjugates antibody (Anti-mouse IgG, clone FK2, Biomol, EUA). The visualization was accessed by chemiluminescence using an ECL kit (GE Healthcare, Suécia) followed through revelation by autoradiography.

## Results

*Determination of the sub-lethal dose of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.* The viability assay with the MTT reagent was conducted to determine the sub-lethal concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to *S. mansoni* adult worms. The results showed in Figure 1, represents the viability of worms exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at concentrations of 200, 300, 400, 500 and 1000 µM. The viability tests were performed after 24 h of culture, to allow the repair of damage in live worms. The maximum dose of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> that produces no decline in the viability, when compared with non-treated worms, is 200 µM. Higher concentrations, up to 300 µM showed a significant decrease in viability in comparison to controls (p<0.05). The complete reduction of viability was obtained at doses of 500 and 1000 µM, which reduced the survival to values similar to-killed worms.

*Concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> across the treatments.* The concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was accessed in the times of 0, 10, 20, 30 and 60 min after the addition of the oxidant into de medium. The concentration decreases strongly during the first 10 minutes, as may be observed in the Figure 2. After this period, the concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decreases more slowly probably due to the antioxidant activities of the worm cells.

*Intensity of the DNA damage in exposed worms.* The DNA damage is an important parameter to measure the oxidative status of the cells. The intensity of DNA damage was estimated by the number of single strand breaks (SSB), which is directly produced by action of ROS. The frequency of breaks increases to approximately 0.6 SSB/10kb, 30 min after exposure (Figure 3). The maximum intensity of DNA damage was obtained 1 hour after exposure, when it was observed approximately 4 SSB/10kb. Five hours after exposure, the damage decreased to approximately 0,1 SSB/10kb, an intensity similar to the obtained in non-treated worms.

*Proteomic analysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated worms.* The determination of variations in protein expression profile in response of a stress is important to understand the biochemical mechanisms involved in adaptive processes. To access this information we separate the proteins of crude extracts by bidimensional electrophoresis. The results are showed in Figure 4. The profile of bi-dimensional gels shows a number superior to 50 proteins differentially expressed during the response of oxidative stress. In this work, only the qualitative differences were considered. The number of spots observed along the different times of incubation did not change significantly. The spots S24 and S25 were analyzed by MALDI MS/MS and both proteins were identified as *S. mansoni* actin (gi. 1703114). The positioning of the spots on the gel suggests that the albumin is altered during oxidative stress by posttranslational modifications. The molecular mass difference showed in the gel was compatible with the addition of one molecule of ubiquitin. To prove this hypothesis, we have conducted a western blot analysis for the identification of the ubiquitinated proteins. Interestingly, the Figure 5 shows that both forms of actin identified in this work were ubiquitinated.

## **Discussion**

The capacity of *S. mansoni* to survive for a prolonged period in blood vessels indicates the existence of complex mechanisms of resistance against stress factors of this environment. This study was conducted to characterize the general biology of worms during state of stress which includes the determination of its capacity of resistance, the effects on the cell and biochemical pathways triggered to counteract the damage.

We suppose that if cellular responses are proportional to the stress that it is submitted, the metabolic alterations in sub-lethal exposures to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> should be more

intense than during physiological conditions, in the blood vessels of its host. Mkoji et al [18] have determined the survival of adult worms and schistosomula to different ROS concentrations. However, because the aim of our study was to determine changes at the protein level, the values found previously should not be considered sub-lethal. Then, the parameter used to determine this concentration was the mitochondrial activity measured by the MTT test, and the sub-lethal concentration was the largest that did not produce significant reduction in the viability. Our results showed the sub-lethal concentration of 200  $\mu\text{M}$ , which was used in all experiments of this work. This value is right for an acute exposure of couples of *S. mansoni*, because the  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration probably decreases during the time after exposure. We were unable to determine the sub-lethal concentration for chronic exposures, since the maintenance of a stable sub-lethal concentration for prolonged periods in culture is very difficult mainly because of the activity of the antioxidant machinery. Stable production of  $\text{H}_2\text{O}_2$  can be obtained by the addition of glucose/glucose oxidase to the culture medium, but the concentration generated (100  $\mu\text{M}$ ) [28] does not reach the level of the sub-lethal dose.

The  $\text{H}_2\text{O}_2$  treatment of any cell was able to produce effects on different biomolecules. In addition of the extensive damage caused in lipids and proteins, ROS were described affects the DNA molecule inducing the formation of different types of injury [29]. The oxidative damage may be repaired by both base excision repair (BER)[30] and nucleotide excision repair (NER), which results in the formation of single strand breaks. The number of breaks was used to determine the intensity of DNA damage to *S. mansoni* cells after treatment. We considered this value a representation of the extension of all harmful effects of the oxidative stress. Our results showed a great increase on DNA damage after addition of  $\text{H}_2\text{O}_2$ . After treatment with a sub-lethal dose of  $\text{H}_2\text{O}_2$  the oxidative damage raises during the first hour. The time required for the



absorption of  $H_2O_2$  is possibly the cause of the gradual increase in DNA damage from the time of exposure until 1 hour of the exposure. Five hours after exposure to a single dose of  $H_2O_2$  the damage has decreased to the initial levels. There are two hypotheses to explain the DNA damage decrease after this period. The first is the end of the stress, due to antioxidant activities that remove the  $H_2O_2$ , stopping the damage. The second is the induction of synthesis of DNA repair enzymes, which elevates repair activity. The pre-treatment of the nematode *C. elegans* with oxidizing agents is associated with an increase of resistance to exposure to ionizing radiation [31]. This is an evidence of the repair enzymes induction which also may occur in *S. mansoni*. Anyway, the results show that DNA stability is essential to *S. mansoni*, since it has evolved an efficient DNA repair system capable of restoring the genome integrity few hours after a sub-lethal exposure. The determination of the  $H_2O_2$  during the treatment shows a rapid decrease at the beginning of the experiment, which may be due to the absorption by the worm cells. Thus, these data suggest a time required for the diffusion of the drug from the media to the nucleus of the worm cells, where occurs the effects observed in this work.

The protein expression during the oxidative stress shows a number of proteins found exclusively in  $H_2O_2$ -treated worms changes during the period after treatment. The proteome seems to be well controlled, and some proteins are found exclusively in early or late oxidative stress response. The proteins differentially expressed are being identified by MALDI-MS/MS to reveal the processes activated by  $H_2O_2$  treatment. The dynamic of the expression profile suggests that some proteins are expressed in advanced periods of the treatment. The permanence of these proteins after stress indicates the presence of an “antioxidant firewall” as proposed by Sayed et al, 2006. The protein actin is observed to be posttranslationally modified during the oxidative stress. The role

of structural proteins in the adaptation of the stress is poorly understood. Sayed et al (2006) have shown that albumin and actin are the major oxidized proteins in *S. mansoni* during oxidative stress. Relative abundance and subcellular localization of these proteins suggest the role of a scavenger of ROS. Nevertheless, the occurrence of different actin isoforms probably is related to a more specific regulatory function. The results showed in this work do not allow us to describe the roles of modifications in the actin molecule, although shows a great importance during the adaptation to oxidative stress of *S. mansoni*.

### **Acknowledgements**

This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ). We acknowledge Elenice A. Macedo and Olinda Mara Brigatto for the technical support and Dr. Ana Patrícia Yatsuda for the cooperation with 2-D electrophoresis.

### **References**

[1]World Health Organization. Division of Control of Tropical Disease TDR Strategic Direction: Schistosomiasis. [www.who.int/diseases/schisto/files](http://www.who.int/diseases/schisto/files), 2002.

[2]P.G. Fallon, Schistosome resistance to praziquantel, *Drug Resist Updat* **1** (1998) 236-241.

[3]S.K. Prah, C. James, The influence of physical factors in the survival and infectivity of miracidia of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* I. Effect of temperature and ultra-violet light, *J. Helminthol* **51** (1977) 73-85.

[4]J.R. Coelho, F.S. Bezerra, The effects of temperature change on the infection rate of *Biomphalaria glabrata* with *Schistosoma mansoni*, Mem Inst Oswaldo Cruz **101** (2006) 223-224.

[5]D.S. Ruelas, D. Karentz, J.T. Sullivan, Sublethal effects of ultraviolet b radiation on miracidia and sporocysts of *Schistosoma mansoni*: intramolluscan development, infectivity and photoreactivation, J. Parasitol., **93** (2007) 1303-1310.

[6]U.K. Hahn, R.C. Bender, C.J. Bayne, Killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*: role of reactive oxygen species, J. Parasitol., **87** (2001) 292-299.

[7]H. Mei, P.T. LoVerde, *Schistosoma mansoni*: the developmental regulation and immunolocalization of antioxidant enzymes, Exp. Parasitol., **86** (1997) 69-78.

[8]J.W. Kazura, M.M. Fanning, J.L. Blumer, A.A.F. Mahmoud, Role of cell-generated hydrogen peroxide in granulocyte-mediated killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* in vitro, J. Clin. Invest., **67** (1981) 93-102.

[9]I. Fridovich, Biological effects of the superoxide radical, Arch. Biochem. Biophys., **247** (1986) 1-11.

[10]W. Dröge, Free radicals in the physiological control of cell function, Physiol. Rev., **82** (2002) 47-95.

[11]I. Fridovich, The biology of oxygen radicals, Science, **201** (1978) 875-880.

[12]A.U. Khan, Singlet Molecular Oxygen from Superoxide Anion and Sensitized Fluorescence of Organic Molecules, Science, **168** (1970) 476-477.

[13]S.H. Silva, O.S. Pereira-Júnior, C.S. Silva, O.M. Brigatto, E. Macedo, V. Rodrigues, Characterization of the gene expression related to the process of DNA damage tolerance in *Schistosoma mansoni*, Mem. Inst. Oswaldo Cruz **101** (Sup. 1) (2006) 157-160.

[14]C.S Silva, S.H. Silva, O.S. Pereira-Júnior, F.J Cabral, J.M. Costa-Cruz, V. Rodrigues, *Schistosoma mansoni*: gene expression of the nucleotide excision repair factor 2 (NEF2) during the parasite life cycle, and in adult worms after exposure to different DNA-damaging agents, *Acta Trop.*, **104** (2007) 52-62.

[15]C. Furtado, C.G. Regis-da-Silva, D.G. Passos-Silva, G.R. Franco, A.M. Macedo, S.D. Junho Pena, C.R. Machado, *Schistosoma mansoni*: the IMP4 gene is involved in DNA repair/tolerance after treatment with alkylating agent methyl methane sulfonate, *Exp. Parasitol.* **116** (2007)25-34.

[16]A.A. Sayed, S.K. Cook, D.L. Williams, Redox balance mechanisms in *Schistosoma mansoni* rely on peroxiredoxins and albumin and implicate peroxiredoxins as novel drug targets, *J. Biol. Chem.*, **281** (2006) 17001-17010.

[17]U.E. Zelck, B. Von Janowsky, Antioxidant enzymes in intramolluscan *Schistosoma mansoni* and ROS-induced changes in expression, *Parasitology*, **128** (2004) 493-501.

[18]G.M. Mkoji, J.M. Smith, R.K. Prichard, Antioxidant systems in *Schistosoma mansoni*: correlation between susceptibility to oxidant killing and the levels of scavengers of hydrogen peroxide and oxygen free radicals, *Int. J. Parasitol.*, **18** (1988) 661-666.

[19]T.J. Dougherty, C.J. Gomer, B.W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbely, J. Moan, Q. Peng, Photodynamic therapy, *J. Natl. Cancer Inst.*, **90** (1998) 889-905.

[20]M. Wainwright, Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT), *J. Antimicrob. Chemother.*, **42** (1998) 13-28.

[21]M. Wainwright, The use of dyes in modern biomedicine, *Biotech. and Histochem.*, **78** (2003) 147-155.

[22]P.D. Ashton, R. Harrop, B. Shah, R.A. Wilson, The schistosome egg: development and secretions, *Parasitology*, **122** (2001) 329-338.

[23]T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods*, **65** (1983) 55-63.

[24]C.E. James, M.W. Davey, A rapid colorimetric assay for the quantitation of the viability of free-living larvae of nematodes in vitro, *Parasitol. Res.* **101** (2007) 975-980.

[25] K. Sunil, B. Narayana. Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide in water and cream samples, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **81** (2008) 422-426.

[26]B.M. Sutherland, P.V. Bennett, J.C. Sutherland, DNA damage quantitation by alkaline gel electrophoresis, *Methods Mol. Biol.*, **314** (2006) 251-273.

[27]A. Shevchenko, H. Tomas, J. Havlis, J.V. Olsen, M. Mann, In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes, *Nat. Protoc.*, **1** (2006) 2856-2860.

[28]R. Fernandes. J. Ramalho, P. Pereira, Oxidative stress upregulates ubiquitin proteasome pathway in retinal endothelial cells, *Mol. Vis.*, **12** (2006) 1526-1535.

[29]M.S. Cooke, M.D. Evans, M. Dizdaroglu, J. Lunec, Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease, *FASEB J.*, **17** (2003) 1195-1214.

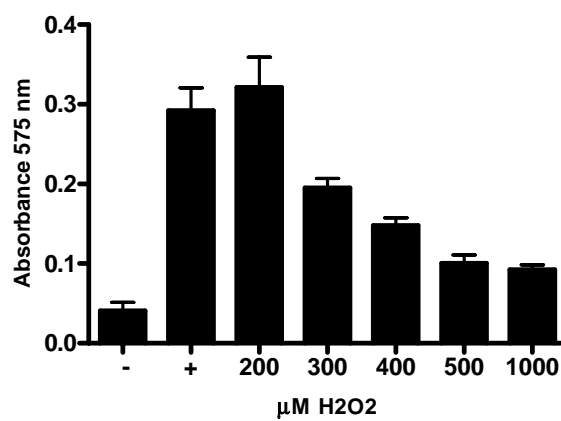
[30]D.O. Zharkov, Base excision DNA repair, *Cell. Mol. Life Sci.*, **65** (2008) 1544-1565.

[31]S. Yanase, P.S. Hartman, A. Ito, N. Ishii, Oxidative stress pretreatment increases the X-radiation resistance of the nematode *Caenorhabditis elegans*, *Mutat. Res.*, **426** (1999) 31-39.

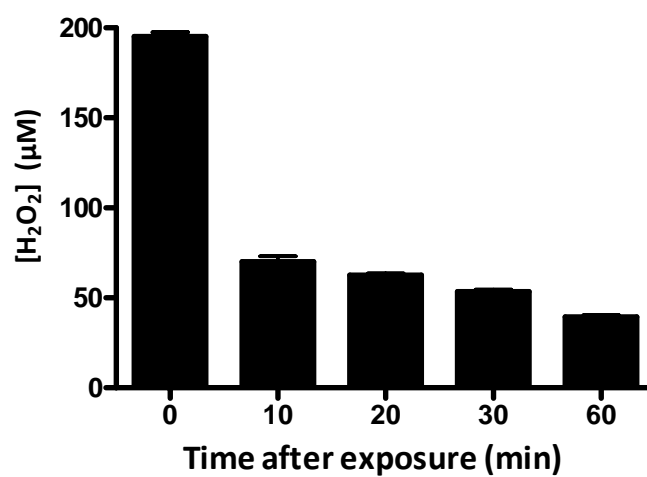
[32]A. Simenov, A. Jadhav, A.A. Sayed, Y. Wang, M.E. Nelson, C.J. Thomas, J. Inglese, D.L. Williams, C.P. Austin, Quantitative High-Throughput Screen Identifies Inhibitors of the *Schistosoma mansoni* Redox Cascade, PLoS Negl. Trop. Dis., **2** (2008) 1-9.

[33]D.L. Williams, A.A. Sayed, D. Ray, A.G. McArthur, *Schistosoma mansoni* albumin, a major defense against oxidative damage, was acquired by lateral gene transfer from a mammalian host, Mol. Biochem. Parasitol., **150** (2006) 359-363.

**Figure 1.** Viability of worms determined by the MTT test. The worms were incubated with different concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and after treatment with the MTT reagent, the formation of formazan product was detected by reading its absorbance at 575 nm. The viability was compared to alive (+) and heat-killed worms (-).

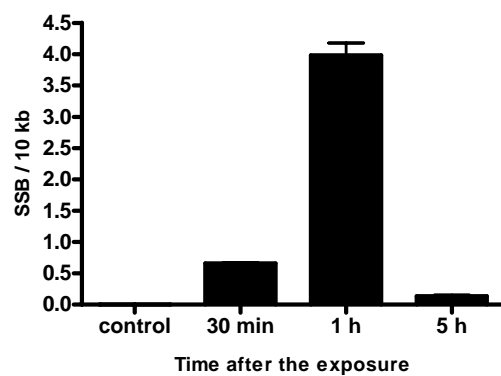


**Figure 2.** Determination of  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration in the medium during the experiments conducted. After administration of a single dose of  $200 \mu\text{M}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$  the worms were incubated and aliquots were collected after 0, 10, 20, 30 and 60 minutes. These aliquots were used to determination of  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration.

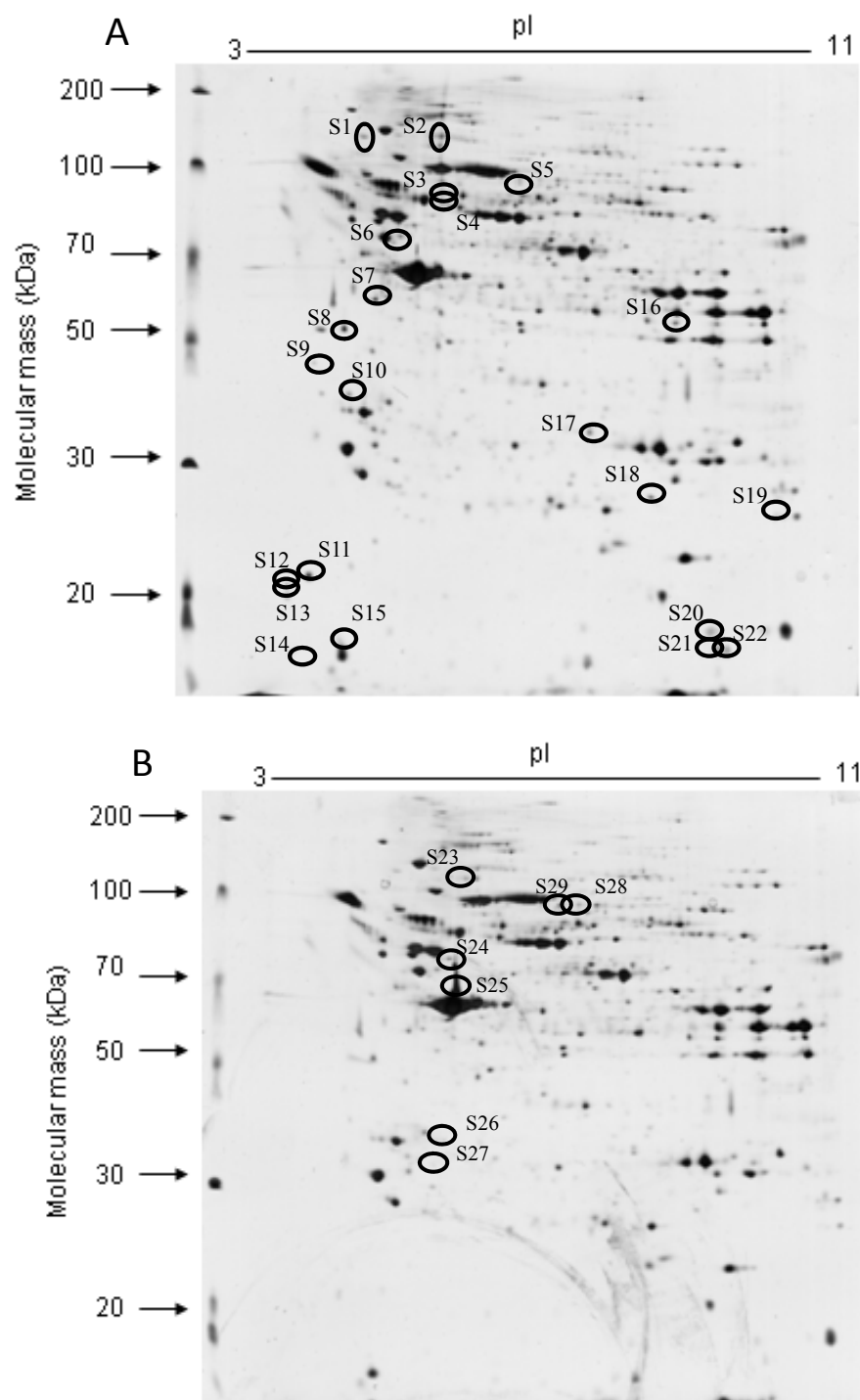


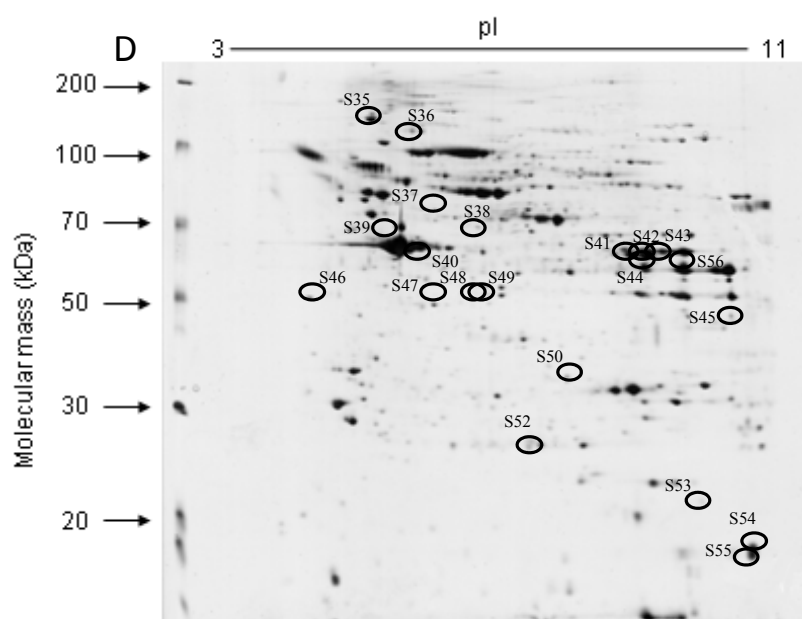
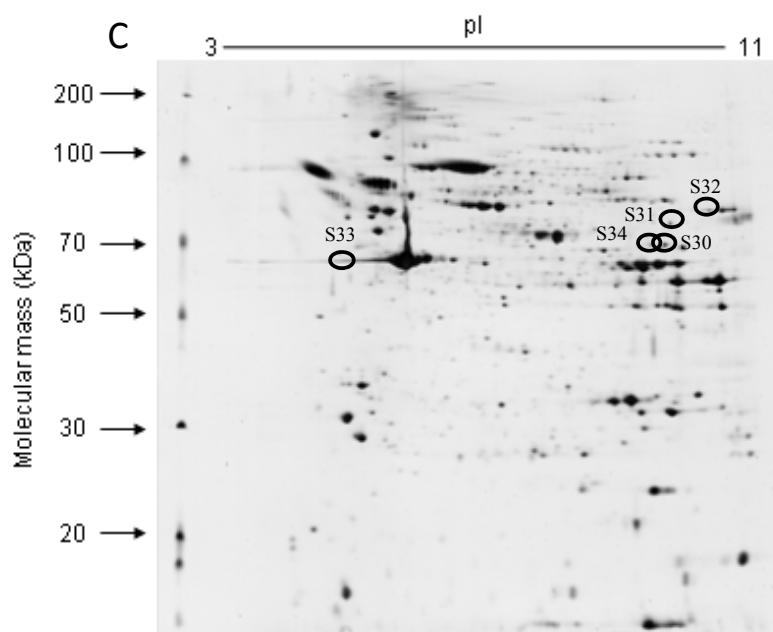


**Figure 3.** Determination of DNA damage after a sub-lethal dose of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The damage was measured during the response to the oxidative stress in *S. mansoni* adult worms.

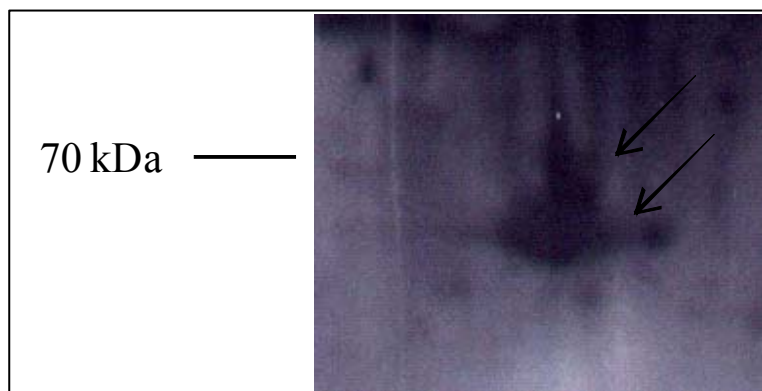


**Figure 4.** Bidimensional gels showing the protein expression profile after 0 (A), 30 min (B), 1h (C) and 5 h (D) after a sub-lethal exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.





**Figure 5.** Western blot using a anti-ubiquitin conjugate antibody, and revealed by chemiluminescence. The extract was obtained from worms incubated for 1 h after addition of  $H_2O_2$ . The image shows the presence of different actin isoforms modified by ubiquitination.



# 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](#)