

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Geral

Programa de Pós-Graduação em Genética

O papel da via de sinalização p38 MAPK no desenvolvimento do
Schistosoma mansoni (Platyhelminthes:Trematoda) e na proteção contra
o estresse oxidativo

Por

Lívia das Graças Amaral Avelar
Orientador: Guilherme Oliveira
Co-orientadora: Laila Alves Nahum

Belo Horizonte
Agosto de 2013

Lívia das Graças Amaral Avelar

**O papel da via de sinalização p38 MAPK no desenvolvimento do
Schistosoma mansoni (Platyhelminthes:Trematoda) e na proteção
contra o estresse oxidativo**

Tese apresentada ao curso de pós-graduação em Genética do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, com vistas à obtenção do Título de Doutor em Genética.

Área de concentração: Genômica e Bioinformática.

Orientador: Guilherme Oliveira.
Centro de Pesquisas René Rachou -
FIOCRUZ

Co-orientadora: Laila Alves Nahum
Centro de Pesquisas René Rachou -
FIOCRUZ

Belo Horizonte

2013

Agradecimentos

Ao Dr. Guilherme Corrêa de Oliveira, pela oportunidade, orientação, confiança e aprendizado ao longo de anos de iniciação científica, mestrado e doutorado;

À Dra. Laila Alves Nahum, pelo exemplo de profissionalismo, por todos os ensinamentos, incentivos e imensurável dedicação;

À Dra. Angela Volpini, por me conceder a co-orientação de estudantes de iniciação científica;

À Dra. Marina Mourão, pela valiosa contribuição no planejamento dos experimentos e interpretação dos resultados;

Às minhas queridas alunas, Mercedes, Assmaa e Larissa, agradeço por toda a dedicação, apoio e admiração. Espero ter contribuído para a formação de vocês! Sem vocês, teria sido muito mais difícil!

À Dra. Rosiane Pereira da Silva, pela gratificante experiência do trabalho em equipe;

À Dra. Neusa Araújo, pela parceria na realização dos ensaios *in vivo*;

À Dra. Ana Carolina Alves de Mattos, pela parceria nos ensaios de infecção dos caramujos;

À Mariana de Oliveira do CEBio, pelas contribuições na edição de imagens;

Ao Dr. José Roberto Machado, à Dra. Renata Neves e à Dra. Michele Silva, pela hospitalidade, e valiosa contribuição nos estudos morfométricos e morfológicos dos vermes adultos;

Ao Dr. Paulo Pimenta por ter permitido o uso do aparelho confocal do seu laboratório e ao Rafael Pimenta e à Ana Cristina Vita, pela ajuda na manipulação do equipamento e obtenção das imagens;

Agradeço as Plataformas de Sequenciamento, de PCR em tempo Real e Proteômica do Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para a Saúde (PDTIS), em especial a Elis, Mariana, Fernanda Barbosa, Rosiane e Maíra, pelos inúmeros auxílios prestados;

Ao CPqRR-Fiocruz/MG, à UFMG e às agências financiadoras (CAPES-FAPEMIG-CNPq-NHI/ Fogarty International Center), pela oportunidade de crescimento científico;

À Mary, secretária da pós-graduação em Genética, sempre sorridente e disposta à ajudar;

À Márcia, secretária do LPCM, pelas inúmeras contribuições e soluções para os problemas do dia-a-dia;

À Joyce e Rosana, membros da Qualidade e Biossegurança do laboratório, pelo excelente serviço prestado e pela disponibilidade em ajudar. Também gostaria de agradecer à Kênia pela organização e limpeza;

Ao Laboratório de Malacologia do CPqRR-Fiocruz/MG, em especial as funcionárias Sueleny e Dilcia, sempre sorridentes na execução de todas as tarefas. Não posso deixar de prestar

os meus agradecimentos à Dra. Liana Jannotti Passos, que sempre atendeu as minhas
| requisições dos parasitos com extrema boa vontade;

À equipe do Biotério e Central de Esterilização pela ajuda e colaboração sempre que
necessário;

Aos meus queridos colegas de laboratório agradeço pela amizade, incentivo, trabalho em
equipe e excelentes momentos de descontração;

À banca examinadora por ter aceitado o convite para avaliar e ajudar a finalizar esse
trabalho.

Sumário

1 Introdução	15
1.1 A esquistossomose	15
1.2 O <i>S. mansoni</i> : características adaptativas e ciclo biológico	17
1.3 O "universo" quinase	21
1.3.1 Proteína quinases eucarióticas	21
1.3.2 O quinoma de <i>S. mansoni</i>	22
1.3.3 Sinalização celular no desenvolvimento de <i>S. mansoni</i>	23
1.3.4 Sinalização molecular mediada por p38 MAPK	24
1.4 Estudo funcional de genes do <i>S. mansoni</i>	26
2 Objetivos	30
2.1 Objetivo geral	30
2.2 Objetivo específicos	30
3 Metodologia	31
3.1 Seleção dos alvos moleculares	31
3.2 Desenho de iniciadores específicos dos alvos moleculares	31
3.3 Amplificação, clonagem e sequenciamento	32
3.4 Síntese de dsRNA	36
3.5 Ensaio <i>in vitro</i>	36
3.5.1 Obtenção das cercárias e transformação em esquistossômulos	36
3.5.2 Exposição dos esquistossômulos aos dsRNAs	37
3.5.3 Triagem de fenótipos	37
3.6 Extração e tratamento de RNA total	38
3.7 Síntese de cDNA	39
3.8 Ensaio de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)	39
3.9 Curva de sobrevivência na presença de SB 203580	40
3.10 Ensaio <i>in vivo</i>	41
3.11 Morfometria e morfologia dos vermes adultos	41
3.12 Cinética do desenvolvimento dos vermes adultos e ovos	42
3.13 Infecção de moluscos	43
3.14 Avaliação do efeito de estresse oxidativo	43
3.14.1 Curva de sobrevivência na presença de H ₂ O ₂	43
3.14.2 Experimento de estresse oxidativo	44
3.14.3 Neutralização do estresse oxidativo	45
3.14.4 Detecção dos níveis de transcritos após estresse oxidativo	45

3.15 <i>Docking</i> molecular	45
4 Resultados e Discussão	47
4.1 Alvos selecionados e correção do modelo do gene	47
4.2 Análises fenotípicas do silenciamento de Smp38 e SmMAP3K-1.....	51
4.3 Estudo dos níveis de transcritos após exposição à dsRNA	58
4.4 Papel biológico de Smp38 frente ao sistema imune do hospedeiro	64
4.5 Papel biológico de Smp38 frente ao estresse oxidativo	87
4.6 Interação proteína-ligante	95
5 Conclusão	100
6 Anexos	101
7 Referências Bibliográficas	104

Lista de Figuras

Figura 1: Distribuição global da esquistossomose	16
Figura 2: Ciclo biológico do <i>S. mansoni</i>	20
Figura 3: Via de sinalização MAPK predita em <i>S. mansoni</i>	25
Figura 4: Maquinaria de silenciamento gênico por RNAi	28
Figura 5: Organização genômica e proteica de Smp38	50
Figura 6: Representação dos dsRNAs sintetizados	52
Figura 7: Mortalidade dos esquistossômulos expostos à dsRNA	54
Figura 8: Imagens de esquistossômulos tratados com dsRNA	55
Figura 9: Área dos esquistossômulos após tratamento com dsRNAs	57
Figura 10: Níveis de transcritos de SmMAP3K-1 pós-dsRNA	59
Figura 11: Níveis de transcritos de Smp38 pós-dsRNA	61
Figura 12: Níveis de transcritos de MAPKs em amostras silenciadas	63
Figura 13: Níveis de transcritos de Smp38 pré-infecção dos camundongos	65
Figura 14: Número de vermes adultos recuperados pós-silenciamento	66
Figura 15: Número de ovos recuperados pós-silenciamento	67
Figura 16: Níveis de transcritos de Smp38 em vermes adultos	68
Figura 17: Análises morfométricas de vermes adultos	71
Figura 18: Microscopia confocal a laser de vermes machos	73
Figura 19: Microscopia confocal a laser de vermes fêmeas	74
Figura 20: Cinética da maturação dos vermes pós-silenciamento	77
Figura 21: Cinética da maturação dos ovos pós-silenciamento	79
Figura 22: Avaliação da viabilidade dos miracídios pós-silenciamento	81
Figura 23: Níveis de transcritos de Smp38 em miracídios	82
Figura 24: Curva de sobrevivência dos esquistossômulos pós-SB 203580	83
Figura 25: Número de vermes adultos recuperados pós-SB 203580	84
Figura 26: Número de ovos recuperados pós-SB 203580	85
Figura 27: Mortalidade dos parasitos pós-SB 203580 durante sete dias	86
Figura 28: Mortalidade dos esquistossômulos silenciados pós-H ₂ O ₂	88
Figura 29: Mortalidade dos esquistossômulos inibidos pós-H ₂ O ₂	89
Figura 30: Neutralização de estresse oxidativo pós-H ₂ O ₂	90
Figura 31: Níveis de transcritos de Smp38 e SmGCL pós-H ₂ O ₂	92
Figura 32: Via de sinalização hipotética p38 MAPK em <i>S. mansoni</i>	94
Figura 33: <i>Docking</i> molecular entre 3ITZ e SB 203580	97
Figura 34: Identificação dos sítios de ligação entre 3ITZ e SB 203580.....	98

Figura 35: Alinhamento entre as sequências proteicas de 3ITZ e de Smp38 .. **99**

Lista de Quadros e Tabelas

Quadro 1: Alvos moleculares silenciados em <i>S. mansoni</i>	29
Quadro 2: Lista de iniciadores	34
Tabela 1: Classificação das proteína quinases	22
Tabela 2: Morfologia dos vermes adultos observada pós-silenciamento	69

Lista de abreviaturas

aa - aminoácido.

AMPC - adenosina monofosfato cíclica.

APS - persulfato de amônio.

ATP - adenosina trifosfato.

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*, ferramenta básica de busca de alinhamento local.

cDNA - DNA complementar.

CDS - sequência codificante.

CMGC - Cyclin-Dependent- (CDK), Mitogen-Activated- (MAPK), Glycogen-Synthase- (GSK) And CDK-Like Kinases.

CO₂ - dióxido de carbono.

CPqRR - Centro de Pesquisa René Rachou.

DALYs - *Disability Adjusted Life Years*, anos de vida ajustados por incapacidade.

DEPC - dietilpirocarbonato.

DNA - ácido desoxirribonucléico.

DNAse - desoxirribonuclease.

dNTP - desoxirribonucleosídeo trifosfato.

dsRNA - *double stranded RNA*, RNA dupla fita.

DTT - dithiothitol.

E - exon.

EDTA - etileno diamino tetra-acetato.

EST - *expressed sequence tags*, etiquetas de sequência expressa.

ERK - Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase.

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz.

g - gramas.

GCL - glutamato cisteína ligase.

GDP - guanosina difosfato.

GenBank - banco de dados de sequências moleculares.

GO - *gene ontology*, ontologia gênica.

GSH - glutationa.

GTP - guanosina trifosfato.

HF- *high fidelity*, alta fidelidade.

hs - horas.

I - intron.

Il - interleucina.

JNK - C-Jun N-Terminal Kinase.

Kb - quilobase, 10^3 bases.

Kcal - quilocaloria.

kDa - quilodalton.

L - litro.

LE - cepa de *S. mansoni* Luiz Evangelista.

MAPKs - *Mitogen-Activated Protein Kinases*, proteína quinases ativadas por mitógenos.

MAP2K - map-quinase-quinase.

MAP2K-1 - map-quinase-quinase, grupo STE, família STE 7, subfamília MEK1.

MAP2K-2 - map-quinase-quinase, grupo STE, família STE 7, subfamília MEK2.

MAP2K-4 - map-quinase-quinase, grupo STE, família STE 7, subfamília MEK4.

MAP2K-7 - map-quinase-quinase, grupo STE, família STE 7, subfamília MEK7.

MAP3K - map-quinase-quinase-quinase, grupo STE.

Mb - megabase, 10^6 bases.

MCT - Ministério da Ciência e Tecnologia.

min - minutos.

mg - miligrama.

MKK3 - Map-quinase-quinase, grupo STE, família STE 7, subfamília MEK3.

MKK6 - Map-quinase-quinase, grupo STE, família STE 7, subfamília MEK6.

mM - milimolar.

mm - milímetros.

mRNA - RNA mensageiro.

nM - nanomolar.

NCBI - *National Center of Biotechnology Information*, Centro Nacional de Informação Biotecnológica.

OD- densidade ótica.

ORF - *open read frame*, janela de leitura aberta.

pb - pares de base.

PCR - *polymerase chain reaction*, reação em cadeia da polimerase.

Pfam - *Protein families database*, banco de dados de famílias proteicas.

PK - proteína quinase.

PM - massa molecular.

pmk-1 - p38 map-quinase de *Caenorhabditis elegans*.

p38 - p38 MAP-quinase.

q.s.p - quantidade suficiente para.

r.p.m - rotação por minuto.

RNA - ácido ribonucleico.

RNAi - *RNA interference*, RNA de interferência.

RNAse - ribonuclease.

ROS - reactive oxygen species, espécies reativas de oxigênio.

RT-PCR - PCR de um produto de transcrição reversa.

RT-qPCR - PCR quantitativo em tempo real.

seg - Segundos.

siRNA - *small interfering RNA*, pequenos RNAs de interferência.

SmERK-1 - proteína quinase regulada por sinais extracelulares de *Schistosoma mansoni*, grupo CMGC, família MAPK, sbfamília ERK1.

SmERK-2 - proteína quinase regulada por sinais extracelulares de *Schistosoma mansoni*, grupo CMGC, família MAPK, sbfamília ERK2.

SmGCL - Glutamato-cisteína-ligase de *Schistosoma mansoni*.

SmJNK- C-Jun N-Terminal Kinase de *Schistosoma mansoni*.

SmMAP3K-1 - map-quinase-quinase-quinase de *Schistosoma mansoni*, grupo STE, família STE 11, sbfamília MEKK1.

Smp38 - p38 map-quinase de *Schistosoma mansoni*.

sny-1 - map-quinase-quinase-quinase de *Caenorhabditis elegans*.

STE - MAP Kinase Cascade Kinases.

T.A - temperatura ambiente.

TBE - tris borato EDTA.

TDR - Research and Training in Tropical Diseases.

TEMED - N, N, N', N'-tetra metiletilenodiamina.

TGF- β - fator de crescimento tumoral beta.

TGF- α - fator de crescimento tumoral alfa.

TNF α - fator de necrose tumoral alfa.

U - unidade.

UV - ultravioleta.

μm - micrometro.

μM - micromolar

WHO - *World Health Organization*, Organização Mundial da Saúde.

Resumo

Existem três importantes espécies do gênero *Schistosoma* que parasitam o homem: *Schistosoma mansoni*, *S. japonicum* e *S. haematobium*. Juntas, estas espécies são responsáveis pela infecção crônica de aproximadamente 200 milhões de pessoas e mais de 200.000 mortes anuais em todo o mundo ocorrem como resultado direto ou indireto da esquistossomose. A única droga para o tratamento em massa da esquistossomose é o Praziquantel® (PZQ) que tem sido utilizada com sucesso por mais de 40 anos. PZQ é uma droga eficiente, entretanto com algumas limitações, e o desenvolvimento de resistência tem sido discutido. Visando uma solução, informações dos genomas recentemente sequenciados destes parasitos foram utilizadas para identificar potenciais alvos para o desenvolvimento de drogas alternativas. Proteínas quinases eucarióticas (ePKs) são atrativos alvos para o desenvolvimento de drogas em vários sistemas biológicos e portanto tornaram-se alvo deste estudo. Uma via de sinalização estudada pelo nosso grupo é a de MAPK. A proteção contra o estresse oxidativo é necessária para a homeostase do parasito e regulada, em outros organismos, pela ação da proteína p38 que participa da via de MAPK. Portanto, nos propomos avaliar o papel da via de sinalização p38 MAPK no desenvolvimento do *S. mansoni* e na proteção contra o estresse oxidativo. Três principais perguntas alicerçam o nosso trabalho: 1. a via de p38 MAPK é importante para a homeostase do parasito? 2. a via de p38 MAPK é importante para a sobrevivência do parasito frente ao estresse oxidativo? 3. quais genes alvos da via de p38 MAPK têm a expressão regulada? Após significativa redução nos níveis de transcritos de p38 MAPK por RNAi, nenhum fenótipo claro foi observado em esquistossômulos mantidos *in vitro*. Sendo assim, camundongos foram infectados com esquistossômulos silenciados ou inibidos e o desenvolvimento dos vermes adultos foi observado. Demonstramos que p38 MAPK exerce um importante papel no desenvolvimento e sobrevivência dos parasitos, uma vez que um baixo número de vermes adultos foi recuperado, a produção dos ovos diminuiu drasticamente, o tegumento dos vermes sobreviventes foi danificado e vermes fêmeas exibiram ovários subdesenvolvidos. Além disso, apenas 13% dos ovos produzidos se desenvolveram em ovos maduros. Nossos resultados sugerem que a inibição da atividade de p38 MAPK interfere na proteção do parasito contra espécies reativas de oxigênio e também demonstram que p38 MAPK e glutamato-cisteína-ligase são superexpressas após indução de estresse oxidativo. Juntos, nossos dados demonstram que a via de sinalização p38 MAPK é uma rota criticamente importante e pode representar alguns alvos terapêuticos atrativos para o tratamento da esquistossomose.

Abstract

There are three important *Schistosoma* species parasitizing humans: *Schistosoma mansoni*, *S. japonicum* and *S. haematobium*. Together, they are responsible for the chronic infection of 200 million people and over 200,000 annual deaths worldwide. The only drug to treat schistosomiasis is Praziquantel[®] (PZQ) that has been used for over 40 years. Although PZQ is an efficacious drug, with some limitations, and resistance development is of concern. To contribute to a solution, various information of the recently sequenced genomes of these parasites was used to identify potential targets for the development of an alternative drug. Since eukaryotic protein kinases (ePKs) are good medical targets for drug development in different biological systems, they have become the focus of this study. A signaling pathway studied by our group is to MAPK. Protection against oxidative stress is necessary for *S. mansoni* homeostasis and regulated in other species by the action of p38 MAPK signaling pathway. Therefore, we propose to assess the role of p38 MAPK signaling pathway in the development of *S. mansoni* and protection against oxidative stress. Three main questions drive this work: 1. the p38 MAPK signaling pathway is required for *S. mansoni* homeostasis? 2. the p38 MAPK signaling pathway is crucial for the parasite survival against oxidative stress? 3. which target genes of p38 MAPK signaling pathway have expression regulated? After a significant reduction in the transcription level by gene silencing of the p38 MAPK, no visible phenotypic changes were reported in schistosomula in culture. Therefore, mice were infected with the silenced or inhibited schistosomula and the development of adult worms was observed. It was showed that p38 MAPK has an important role in transformation and survival of the parasites as low number of adult worms was recovered, the egg production was significantly lower, the tegument of survived worms was damaged, and female worms had underdeveloped ovaries. Furthermore, only \approx 13% of the eggs produced develop into mature eggs. Our results suggest that inhibition of the p38 MAPK activity interfere in protecting parasites against reactive oxygen species and also demonstrate that p38 MAPK and glutamate-cysteine-ligase are overexpressed in parasites after exposition to oxidative stresses. Together our data show that p38 MAPK signaling pathway is a critically important route and may represent an attractive therapeutic target for the treatment and control of schistosomiasis.

1. Introdução

1.1 A esquistossomose

A esquistossomose, causada por platelmintos do gênero *Schistosoma*, é uma doença parasitária crônica, debilitante e em alguns casos fatal, afetando indivíduos principalmente em áreas rurais. A parasitose é endêmica em 76 países tropicais e subtropicais, atingindo mais de 200 milhões de indivíduos, sendo 170 milhões na África Sub-Saariana e outros 30 milhões no Norte da África, Ásia e América do Sul. Estima-se que no mundo 600 milhões de pessoas estejam sob risco de infecção (Goldberg 2007), sendo 6 a 12 milhões somente no (Katz and Peixoto 2000).

O agente da esquistossomose foi descoberto em 1851, pelo médico alemão Theodor Bilharz. Em 1913, o hospedeiro intermediário foi identificado e o ciclo de vida do parasito descrito e reproduzido em laboratório (Foster 1965). Várias espécies de *Schistosoma* já foram identificadas: *S. bovis*, *S. curassoni*, *S. edwardiense*, *S. haematobium*, *S. hippopotami*, *S. incognitum*, *S. indicum*, *S. intercalatum*, *S. japonicum*, *S. leiperi*, *S. malayensis*, *S. mansoni*, *S. margrebowiei*, *S. mattheei*, *S. mekongi*, *S. nasale*, *S. ovuncatum*, *S. rodhaini*, *S. sinensium* e *S. spindale*. As três espécies mais importantes para a saúde humana, *S. mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum*, têm distribuição geográficas diferentes ou localizações topográficas distintas no organismo do hospedeiro definitivo, além de características morfológicas e fisiológicas peculiares (Lawton, Hirai et al. 2011). O foco deste trabalho é *S. mansoni*, única espécie do gênero encontrada no Brasil.

A espécie *S. mansoni* ocorre principalmente na África, América Latina e Antilhas (Figura 1). A infecção causada por esta espécie é denominada esquistossomose mansônica ou intestinal, pela localização dos parasitos nas vênulas da parede do intestino grosso, sigmóide e reto, com sintomas predominantemente intestinais. Nos casos mais graves, há envolvimento hepatoesplênico e hipertensão no sistema porta (Rey 1991). A esquistossomose mansônica foi introduzida no Brasil pelo tráfico de escravos, que foi confirmado por estudos de diferenciação gênica e isoenzimáticos entre parasitos do velho e novo mundo (Despres, Imbert-Establet et al. 1993).

O controle da esquistossomose vem sendo realizado através de intervenções químicas e/ou biológicas de eliminação do hospedeiro intermediário, através de obras de engenharia sanitária, possibilitando o aporte adequado de água para as casas e à adequada eliminação dos dejetos, através de campanhas de educação para a saúde, fazendo com que as populações residentes em zonas endêmicas não apenas tenham consciência do problema, mas modifiquem seu comportamento e, principalmente, através do tratamento com drogas como o Praziquantel® (PZQ), que representa a única droga usada em larga escala para o

tratamento da doença (Hotez, Savioli et al. 2012). Embora existam múltiplas alternativas para o controle desta parasitose, os últimos dados mostram que a prevalência da doença permanece inalterada em regiões endêmicas, devido, na maioria das vezes, aos altos níveis de re-infecção de indivíduos já tratados e ao aparecimento de populações de parasitos naturalmente resistentes ao tratamento (Siddiqui, Siddiqui et al. 2011).

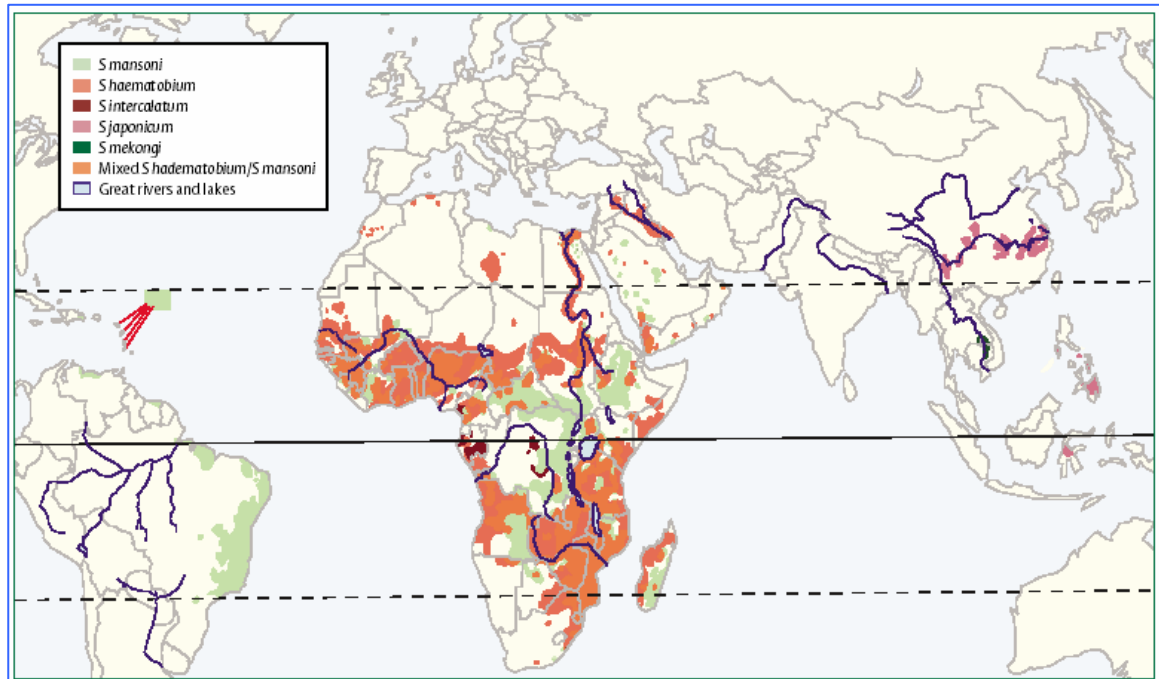


Figura 1: Distribuição global da esquistossomose. *S. mansoni* é encontrado principalmente na África Sub-Saariana, Brasil, Suriname, Venezuela e Caribe, com menor frequência no Egito e península da Arábia. *S. haematobium* tem maior prevalência na África Sub-Saariana, Egito, Sudão e península da Arábia. *S. japonicum* encontra-se ao longo dos lagos e rios centrais da China, em Mindanao, Leyte, em algumas outras ilhas das Filipinas e em pequenas regiões na Indonésia. *S. mekongi* é encontrado na Bacia Central Mekong, Laos e Camboja. *S. intercalatum* abrange a África ocidental e central (Gryseels et al. 2006).

Como já mencionado, o tratamento atual para as esquistossomoses é baseado principalmente no PZQ, que foi introduzido aproximadamente há 25 anos e se apresenta seguro, bem tolerado e efetivo em dose única (Gryseels and De Vlas 1996, Cioli and Pica-Mattoccia 2003, Doenhoff and Pica-Mattoccia 2006). Entretanto, falhas no tratamento têm sido reportadas e creditadas ao grande número de parasitos imaturos, à rapidez da reinfecção (Cioli 2000, Gryseels, Mbaye et al. 2001) e à possível resistência dos parasitos à droga (Gryseels and De Vlas 1996, Cioli and Pica-Mattoccia 2003). A Oxaminiquina pode

ser usada como droga alternativa para o tratamento das esquistossomoses. Entretanto, não apresenta efeitos contra o *S. haematobium*, pode provocar efeitos colaterais pronunciados, tem um custo bem mais elevado que o PZQ (Gryseels and De Vlas 1996), além dos relatos sobre a resistência de parasitos à esta droga (Cioli, Pica-Mattoccia et al. 1992).

Embora consideremos que o caminho mais adequado para o controle da esquistossomose seja a melhoria do saneamento básico associada ao tratamento com drogas, é necessário reconhecer as dificuldades políticas e econômicas do momento, que impedem ou dificultam o uso destas medidas nos países em desenvolvimento. Portanto, a vacina poderia ser também um instrumento complementar de controle da esquistossomose. Nos últimos anos, grandes avanços no nível molecular do *Schistosoma* foram alcançados graças ao crescimento das tecnologias "ômicas". O secretoma desses parasitos tem sido caracterizado utilizando genômica, transcritômica, proteômica (Cass, Johnson et al. 2007) e, além disso, novas técnicas para manipulação genética (Alrefaei, Okatcha et al. 2011, Beckmann and Grevelding 2012) e silenciamento gênico (Pereira, Evangelista et al. 2013) estão sendo propostas. Todas essas novas tecnologias associadas às últimas abordagens propostas para a descoberta de antígenos, conhecidas como imunômica (Driguez, Doolan et al. 2010), contribuem expressivamente para a elucidação de uma vacina efetiva contra o *Schistosoma*. Diante de tantos esforços, alguns antígenos potencialmente candidatos à vacina para a esquistossomose foram sugeridos, porém nenhum deles apresentou um nível de proteção efetivo (Hotez, Bethony et al. 2010). Ademais, todas as medidas de controle da esquistossomose disponíveis até o presente momento apresentam falhas e, portanto, o desenvolvimento de uma nova droga anti-schistotoma é uma realidade que não pode ser desprezada.

1.2 O *S. mansoni*: Características adaptativas e ciclo biológico

A espécie *S. mansoni* representa um grupo taxonômico de parasitos digenéticos, pertencentes ao filo Platyhelminthes, classe Trematoda, ordem Digenea, família Schistosomatidae e gênero *Schistosoma*. *S. mansoni* é amplamente abundante e sua ocorrência está associada à expressiva distribuição de espécies de moluscos do gênero *Biomphalaria* susceptíveis à infecção (Morgan, Dejong et al. 2001). O ciclo biológico do *S. mansoni* é bastante complexo alternando entre estágios de vida livre e estágios parasitários que se desenvolvem em diferentes hospedeiros (Figura 2).

Milhares de cercárias são produzidas por um único esporocisto durante a reprodução assexuada no hospedeiro intermediário (caramujos do gênero *Biomphalaria*), que as liberam de forma intermitente. A saída das cercárias do hospedeiro intermediário é induzida pela luz, portanto a liberação ocorre preferencialmente nas horas mais claras do dia. Quando

madura, a cercária é liberada pelo caramujo em ambiente aquático e está apta à infectar hospedeiros definitivos, representados por diferentes espécies de mamíferos, incluindo o homem (Martins 1958). A cercária mede cerca de 0,5 mm em comprimento e tem como característica uma cauda bifurcada. Na água, acusa geotropismo negativo, fototropismo positivo e tende a acumular-se sob a superfície líquida (Rollinson and Southgate 1987). Uma vez que não se alimentam, possuem uma grande reserva de glicogênio e precisam encontrar um hospedeiro vertebrado num período de 36-48 horas (Mahmoud 2001). Quando encontram um hospedeiro apropriado, penetram pela sua pele ou mucosa liberando a cauda. A capacidade invasora das larvas depende de um esforço mecânico e da ação química exercida pela secreção das glândulas cefálicas de penetração. A ação mecânica ocorre por auxílio de uma ventosa oral. A ação química ocorre por proteases, do tipo colagenases e elastases, ou por enzimas que são ativas contra as glicoproteínas da pele. Após a penetração, a cercária passa por mudanças na conformação da membrana, que se torna pentalamina e no metabolismo, que se torna principalmente anaeróbico (Rollinson and Southgate 1987), iniciando-se desta forma, o processo de transformação em esquistossômulos.

Após permanecerem na pele por um tempo variável, de minutos a 24 horas, os esquistossômulos iniciam a migração pelo corpo do hospedeiro vertebrado, caso não sejam destruídos pelo sistema imune do próprio hospedeiro. Os esquistossômulos utilizam as secreções líticas das glândulas cefálicas para penetrar nos vasos cutâneos. Através da circulação, eles chegam ao coração e aos pulmões em cinco dias, tornando-se mais longos e delgados, o que facilita a sua migração através da rede vascular pulmonar. Do pulmão, os esquistossômulos voltam ao coração e são enviados pela circulação geral a todas as partes do corpo do hospedeiro. Somente quando alcançam o sistema porta intra-hepático podem se diferenciar em vermes adultos (Rollinson and Southgate 1987). Quatro semanas após a infecção, a maioria dos vermes encontra-se maduros e prontos para se acasalarem. Os vermes acasalados deslocam-se ativamente contra a corrente circulatória do sistema porta e migram para as veias mesentéricas pélvicas. As localizações habituais são as vênulas da parede do reto, sigmóide e intestino grosso (Foster 1965).

Os vermes adultos têm aproximadamente 1 centímetro em comprimento, se alimentam de plasma e células do sangue venoso, são delgados e longos, e caracterizados por terem duas ventosas, uma oral e uma ventral (Mahmoud 2001). A fêmea é mais fina, cilíndrica e longa que o macho, existindo também diferenças fisiológicas e antigênicas entre macho e fêmea. O par está em constante associação, encontrando-se a fêmea no canal ginecórico do macho, portanto a fêmea depende do contato com o macho para completar a sua maturação (Loverde and Chen 1991).

A maior parte da energia das fêmeas é gasta na produção de ovos. Cerca de 300 ovos de *S. mansoni* são liberados a cada dia por casal de vermes em espécies de roedores infectados, sendo que este número pode aumentar em primatas (Cheever, Mosimann et al. 1994). A produção de ovos começa 30 a 40 dias após a infecção. Os ovos medem aproximadamente 142µm em comprimento e 60µm em largura. A forma característica do ovo de *S. mansoni* é a presença de uma espícula lateral. Os ovos são eliminados para o ambiente através das fezes de indivíduos infectados. No momento da ovoposição o desenvolvimento embrionário é ainda incompleto, requerendo mais seis ou sete dias para completar-se. A expectativa de vida dos ovos maduros é de aproximadamente 20 dias e os miracídios morrem caso a eclosão não se complete dentro de três a quatro semanas após a ovoposição (Rollinson and Southgate 1987).

Muitos dos ovos não ultrapassam a parede intestinal e são levados a órgãos e tecidos do hospedeiro pela corrente sanguínea. A presença destes ovos nos tecidos resulta na formação de granuloma, resultante da resposta do sistema imune do hospedeiro. A resposta de hipersensibilidade retém antígenos citotóxicos e mata o ovo, mas também causa danos ao tecido, sendo responsável pela manifestação clínica da esquistossomose crônica. O órgão mais atingido é o fígado, entretanto o baço também é um órgão bastante prejudicado (Warren and Domingo 1970).

Os miracídios liberados após a eclosão dos ovos apresentam uma forma piriforme e medem aproximadamente 70µm em largura por 160µm em comprimento. Seu corpo é coberto por células anucleadas ciliadas e possui na sua extremidade anterior organelas sensoriais. Os miracídios possuem geotropismo negativo e fototropismo positivo, que o auxilia na localização do hospedeiro intermediário, além de ser atraído por substâncias químicas eliminadas pelo próprio caramujo. A infecção dos moluscos deve ocorrer em 24 horas (Foster 1965). O miracídio penetra no hospedeiro intermediário específico por movimentos rotatórios e ação lítica. Após penetração, os miracídios sofrem uma perda do revestimento epitelial e dos órgãos de penetração e, em seguida, atrofia da musculatura. Por volta do oitavo dia após penetração nos moluscos, os miracídios apresentam-se como um tubo enovelado, imóvel, repleto de células germinativas em multiplicação e transformam em esporocisto (Mahmoud 2001).

O esporocisto mãe ou primário apresenta grandes células germinativas isoladas ou agrupadas. Por volta da segunda semana, esporocistos primários rompem-se pra liberar esporocistos secundários ou filhos, em número de 20 a 40. Os esporocistos secundários também apresentam células germinativas em constante multiplicação. Os aglomerados celulares se diferenciam para formar cercárias. Os esporocistos podem formar várias gerações de cercárias. A transformação dos esporocistos em cercárias ocorre apenas quando atingem sua localização permanente, nas glândulas digestivas do caramujo. As

cercárias deixam o hospedeiro intermediário em busca do hospedeiro definitivo, reiniciando o ciclo de vida do *S. mansoni* (Rollinson and Southgate 1987) (Figura 2).

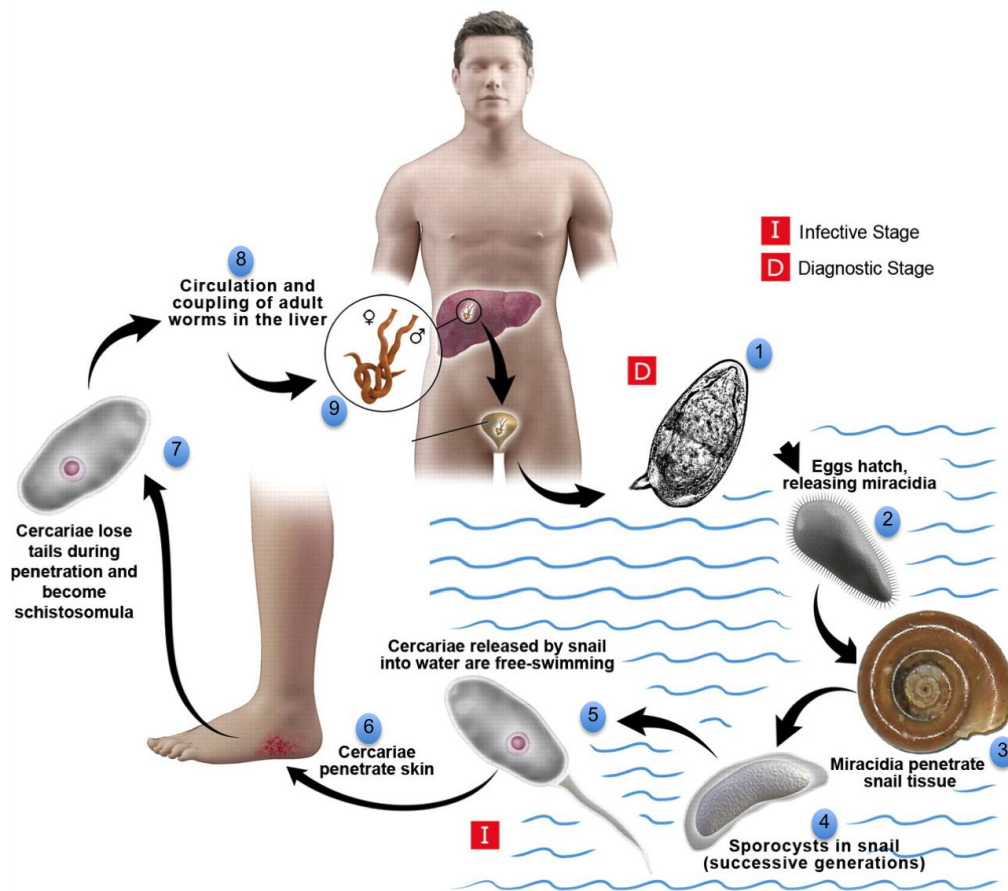


Figura 2: Ciclo biológico do *S. mansoni*. Os ovos são eliminados juntamente com as fezes do hospedeiro infectado (1). Em condições ideais de luz, temperatura e hipotonicidade os miracídeos eclodem (2), nadando livremente em busca de moluscos do gênero *Biomphalaria* (3). Os estágios no molusco incluem duas gerações de esporocístos e a produção de cercárias (4). As cercárias são liberadas pelo molusco em ambiente aquático em busca do hospedeiro definitivo (5). Após penetração (6), as cercárias perdem sua cauda bifurcada, transformando-se em esquistossômulos (7). Os esquistossômulos migram através de diversos tecidos até alcançarem o sistema porta intra-hepático (8), se diferenciando em vermes adultos maduros e acasalados (9). Os ovos produzidos pelas fêmeas são movidos progressivamente para o lúmen do intestino e são eliminados com as fezes do hospedeiro. Adaptado de Shebel e colaboradores (Shebel, Elsayes et al. 2012).

1.3 O “universo” quinase

1.3.1 Proteína quinases eucarióticas

Proteína quinases eucarióticas (ePKs) compreendem enzimas mediadoras de sinais em resposta a estímulos externos que controlam funções biológicas essenciais, tais como: replicação, controle do ciclo celular, transcrição gênica, rearranjos do citoesqueleto, apoptose, estresse oxidativo e metabolismo energético (Hanks, Quinn et al. 1988). O processo biológico comum a todas ePKs é a fosforilação, que ocorre através da transferência de um grupo fosfato a partir de uma molécula de ATP para aminoácidos específicos de um substrato que possuam o grupo hidroxila livre (usualmente resíduos de serina, tirosina e treonina) (Hanks and Hunter 1995). O fosfato é carregado negativamente, o que leva à mudança na conformação da proteína, causando modificações na sua estrutura e conseqüentemente na sua atividade. A atividade das ePKs é regulada por autofosforilação ou pela fosforilação por outras quinases.

A assinatura proteica das ePKs é a presença do domínio catalítico, responsável pela fosforilação de substratos. O domínio catalítico se divide em 12 subdomínios compostos por aminoácidos individuais ou motivos proteicos altamente conservados (Hanks and Quinn 1991). Vários representantes de ePKs possuem além do domínio catalítico a ocorrência de domínios acessórios que asseguram a diversidade funcional dessas enzimas.

De acordo com os sítios de reconhecimento do substrato, ePKs são divididas em duas grandes classes: serina treonina quinases (STKs) e tirosina quinases (TKs). Proteína quinases de dupla especificidade (híbridas), que fosforilam representantes de ambas as classes, também são encontradas (Tabela 1). ePKs foram classificadas em oito grupos com base na similaridade da sequência do domínio catalítico, na presença e similaridade dos domínios acessórios e de acordo com o modo de regulação (Andrade, Nahum et al. 2011) indicado na Tabela 1. O grupo nomeado *Other*, representa membros que não possuem quaisquer assinaturas proteicas que favoreçam sua classificação em grupos e/ou famílias já conhecidas.

1.3.2 O quinoma de *S. mansoni*

O termo quinoma (tradução do inglês, *kinome*) foi cunhado por Manning e colaboradores (Manning, Whyte et al. 2002) para descrever o conjunto de proteína quinases expresso pelo genoma nuclear de um organismo.

Abordagens baseadas em famílias gênicas para a descoberta de drogas e validação de alvos estão sendo propostas para o quinoma humano (ter Haar, Walters et al. 2004), e mais recentemente para o quinoma de *Plasmodium falciparum* (Apicomplexa: Aconoidasida) (Lucet, Tobin et al. 2012). A necessidade de novas drogas contra o *Schistosoma* é uma realidade amplamente difundida na comunidade científica. Portanto, acreditamos fortemente que explorar potenciais alvos representados pelo quinoma de *S. mansoni* seja uma estratégia bastante promissora.

O quinoma de *S. mansoni* é formado por 252 ePKs que correspondem a 1,9% do proteoma predito do parasito (Andrade, Nahum et al. 2011). *S. mansoni* possui ePKs de todos os grupos de proteína quinases e grande parte dessas enzimas foram claramente agrupadas à ePKs de outros eucariotos de acordo com análises filogenéticas. Nenhuma das ePKs são exclusivas de *S. mansoni* e expansões de famílias proteicas também não foram encontradas no quinoma deste parasito. Até o presente momento, apenas 17 ePKs de *S. mansoni* foram estudadas experimentalmente, 12 são preditas como inativas para catálise e a classificação de aproximadamente 2% das ePKs deste parasito permanece desconhecida. Algumas dessas ePKs foram preditas como efetoras de funções essenciais ao *S. mansoni* e, portanto, apontadas como potenciais alvos para o desenvolvimento de drogas (Andrade, Nahum et al. 2011).

Tabela 1: Classificação das proteína quinases (Andrade, Nahum et al. 2011. Adaptado de Hanks, Quinn et al. 1988).

Superfamily	Class	Group
Eukaryotic Protein Kinases (ePKs)	Serine/Threonine Kinases	AGC
		CaMK
		CMGC
		STE
		CK1
	Tyrosine Kinases	TK
		RGC
	Hybrid	TK like
		Other
Atypical Protein Kinases (aPKs)		Atypical

1.3.3 Sinalização celular no desenvolvimento de *S. mansoni*

Como já mencionado, o ciclo de vida do *S. mansoni* é bastante complexo e a percepção de sinais externos é crucial para que ocorram mudanças bioquímicas, fisiológicas e morfológicas, assegurando o perfeito desenvolvimento do parasito. Vermes adultos de *S. mansoni* podem ser bastante longevos, podendo sobreviver por décadas no organismo parasitado, utilizando de suas biomoléculas como fonte de alimento, energia e também como moléculas sinalizadoras (Vermund, Bradley et al. 1983).

Vários trabalhos sugerem o envolvimento de complexas redes de sinalização celular na relação parasito-hospedeiro, a saber: Amiri e colaboradores mostraram que TNF- α do hospedeiro é requerido pelo parasito para a produção de ovos (Amiri, Locksley et al. 1992). Ademais, IL-7 disponibilizada também pelo hospedeiro é essencial para o crescimento dos vermes e fecundação dos ovócitos (Wolowczuk, Roye et al. 1999). Receptores para TGF- β são expressos na superfície do tegumento sincicial de *S. mansoni* e sugere a utilização deste fator do hospedeiro pelo parasito (Davies, Shoemaker et al. 1998). Fato bastante interessante ocorre em hospedeiros imunodeprimidos, em que o desenvolvimento do *S. mansoni* é mais lento. Possivelmente o parasito aguarda por melhores condições do hospedeiro, para então finalizar o seu processo de crescimento, acasalamento e fecundidade. Estes resultados indicam que o parasito está totalmente adaptado ao meio, requerendo proteínas imunoreguladoras do hospedeiro como sinais para seu desenvolvimento (Amiri et al. 1992).

A sinalização celular sincrônica também é essencial para maturação sexual de vermes adultos. Além da fêmea requerer o contato com o macho para atingir a maturação sexual, sabemos que esse processo depende da transferência de moléculas sinalizadoras, como hormônios esteróides, que são captadas por receptores do parasito (Kunz 2001). Ademais, quando as fêmeas são separadas dos seus parceiros, a transcrição de alguns genes responsáveis pela diferenciação dos vitelócitos é interrompida (Kunz 2001). O desenvolvimento reprodutivo do macho não depende da interação com a fêmea. No entanto, o macho necessita da fêmea para regular a produção da enzima antioxidante glutatona e para a síntese de lipídeos (Cazaubon, Bornancin et al. 1994).

As interações moleculares entre o parasito e seu hospedeiro dita o sucesso ou a falha no estabelecimento da infecção. Estes fenômenos requerem comunicações celulares mediadas por refinados processos de transdução de sinal. Proteína quinases representam a principal família de enzimas mediadoras da comunicação celular em eucariotos. Portanto, acreditamos fortemente que essas proteínas são responsáveis por estabelecer sofisticadas redes de sinalização celular que coordenam o desenvolvimento de todas as fases evolutivas do *S. mansoni*.

1.3.4 Sinalização molecular mediada por p38 MAPK

Proteínas MAPKs (do inglês, *Mitogen-Activated Protein Kinases*) representam uma família de serina/treonina quinases pertencentes ao grupo CMGC (Hanks, Quinn et al. 1988). Vias de sinalização MAPKs são evolutivamente conservadas entre eucariotos e participam de uma diversidade de processos biológicos essenciais, incluindo controle do ciclo celular, proliferação de células, apoptose, ativação do sistema imune e proteção contra o estresse oxidativo (Seger and Krebs 1995). De acordo com a similaridade no nível da sequência primária de aminoácidos e o modo de ativação, membros da família MAPK são divididos em três subfamílias: ERK (do inglês, *extracellular-signal-regulated kinase*); JNK (do inglês, *c-Jun amino-terminal kinase*) e p38 (Hanks and Hunter 1995).

A via de sinalização p38 MAPK é alvo deste estudo, em que propomos investigar o seu envolvimento no desenvolvimento de *S. mansoni* e na proteção contra o estresse oxidativo. Nossas motivações foram alimentadas pelo crescente número de trabalhos que preconizam membros da via p38 MAPK como potenciais alvos para o desenvolvimento de drogas (Eglen and Reisine 2011). Recentemente, Margarida e colaboradores (Ressurreicao, Rollinson et al. 2011, Ressurreicao, Rollinson et al. 2011) mostraram que p38 MAPK de *S. mansoni* é essencial no controle do batimento ciliar de miracídios e na transformação de miracídios em esporocistos. Esses achados claramente evidenciam a importância de p38 para o desenvolvimento do *S. mansoni* e na relação parasito-hospedeiro.

A via de sinalização p38 MAPK é relativamente simples quando comparamos com outras redes de sinalização mediadas por proteína quinases (Figura 3). Um repertório de diferentes estímulos, como fatores de crescimento, citocinas inflamatórias e espécies reativas de oxigênio, podem desencadear a fosforilação em cascata de moléculas efetoras e/ou ativadoras da sinalização p38 MAPK (Nebreda and Porras 2000). Resumidamente, o estímulo externo é transmitido para o meio intracelular ativando membros da subfamília MKK3 ou MKK6, que são altamente específicos para p38 MAPKs. MKK6 fosforila todas as isoformas de p38 (p38 α , p38 β p38 δ e p38 γ), enquanto que MKK3 é seletiva para as isoformas p38 α , p38 δ e p38 γ . MKK3/6 transmitem esse sinal à p38 que é translocada do núcleo para o citoplasma, ativando fatores de transcrição que controlam a expressão de enzimas envolvidas em rotas antioxidantes, na proliferação, diferenciação, inflamação e apoptose (Figura 3).

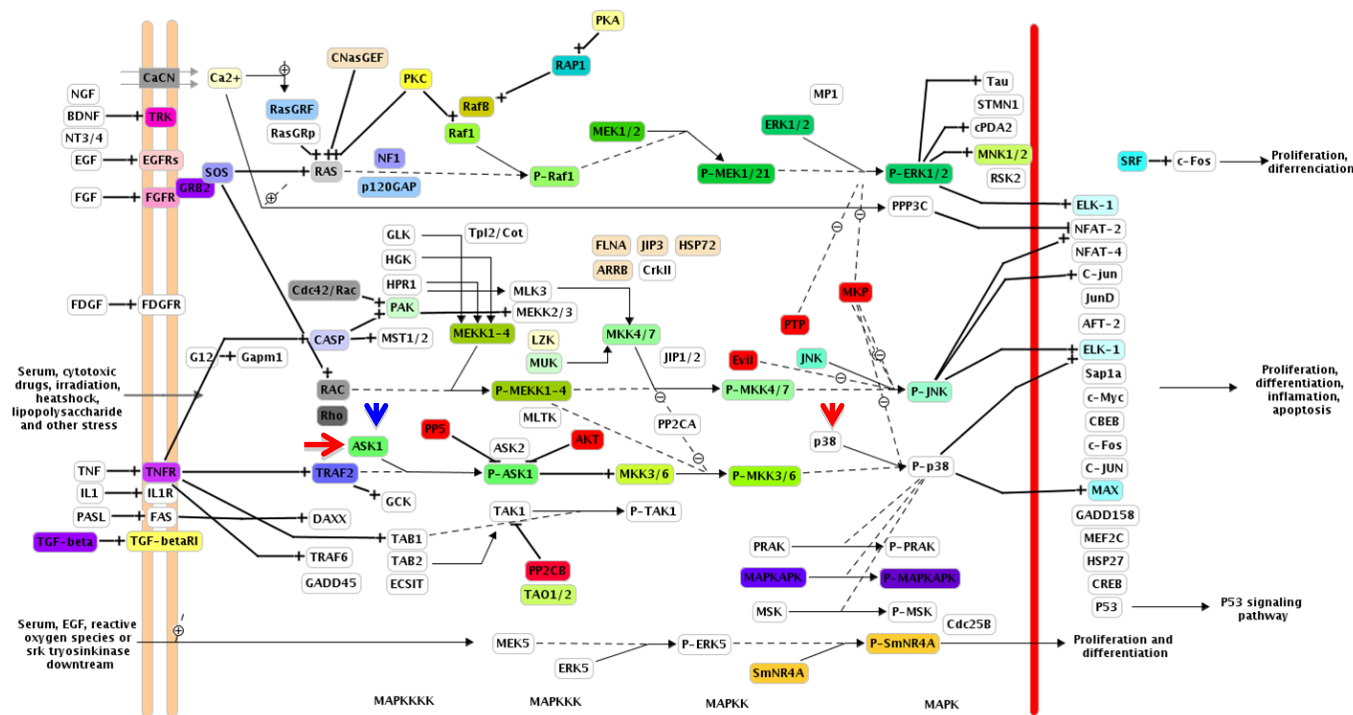


Figura 3: Via de sinalização MAPK predita em *S. mansoni* (LoVerde, Andrade et al. 2009, Andrade, Nahum et al. 2011). Os blocos coloridos correspondem à homólogos encontrados no proteoma predito do parasito em comparação aos mamíferos. A seta azul representa uma ePK do grupo STE ativadora da cascata p38 MAPK em resposta à estímulos externos. Subsequentes eventos de fosforilação em cascata ocorrem levando a fosforilação de uma map-quinase-quinase (MKK3 ou MKK6). Rapidamente o sinal é transmitido para p38 que é translocada para o núcleo, fosforilando fatores de transcrição, como ELK-1 e MAX, que controlam a expressão de enzimas envolvidas em respostas antioxidantes, na proliferação, diferenciação, inflamação e apoptose. Setas vermelhas representam os pontos da via em que interferimos, objetivando avaliar a importância funcional desta rota de sinalização molecular para o desenvolvimento do *S. mansoni* e proteção contra o estresse oxidativo.

1.4 Estudo funcional de genes do *S. mansoni*

O número de novas ferramentas para acessar a função de um gene se torna cada vez mais expressivo em função do crescente número de genomas completamente sequenciados de diversos organismos (Nahum, Mourão et al. 2012). Esses avanços refletem novas descobertas sobre a função dos genes de *S. mansoni*, que teve seu genoma nuclear completamente sequenciado (Berriman, Haas et al. 2009) e uma nova versão desse genoma foi disponibilizada à comunidade científica, integrando dados de mapeamento genético e de sequenciamento massivo de mRNA (RNA-seq) de diferentes fases do desenvolvimento do parasito (Protasio, Tsai et al. 2012). Entre inúmeros avanços alcançados na era pós-sequenciamento do genoma nuclear de *S. mansoni*, podemos sobressaltar o progresso obtido na identificação de regiões gênicas, através de experimentos de microarranjos (Verjovski-Almeida, DeMarco et al. 2003, Dillon, Feltwell et al. 2006), e mais recentemente, do sequenciamento de transcritos (Protasio, Tsai et al. 2012). Esses dados também contribuíram na seleção e validação experimental de proteínas de superfície do parasito (van Balkom, van Gestel et al. 2005), melhorando os métodos de busca por candidatos à vacina e moléculas modeladoras do sistema imune.

Apesar de múltiplos esforços, o estudo funcional de genes enfrenta algumas limitações em *S. mansoni*, sobretudo para ensaios funcionais em larga escala. Métodos tradicionais de manipulação genética, como o nocaute gênico e transgenia, bem estabelecidos no organismo modelo *Caenorhabditis elegans* (Nematoda: Chromadorea), não alcançam a mesma eficiência em *Schistosoma*. Parte disso é devido ao complexo ciclo de vida do parasito, que requer alternância de gerações em diferentes hospedeiros para se completar. Ademais, estágios de vida livre possuem um curto período de vida ou se diferenciam em um novo estágio rapidamente, o que dificulta a manutenção *in vitro* dessas formas evolutivas. É válido ressaltar que *S. mansoni* requer um hospedeiro vertebrado para atingir a maturação sexual, o que vincula à necessidade da infecção e sacrifício de roedores para ensaios *in vivo*. Por ser um parasito multicelular, *S. mansoni* apresenta um conjunto de tecidos distintos com células bem especializadas para as quais ainda não existe uma linhagem contínua que possa ser cultivada em condições laboratoriais (Alrefaei, Okatcha et al. 2011). A soma dessas limitações dificulta a aplicação de técnicas refinadas para o estudo funcional de genes em *S. mansoni*. Diante deste cenário, nos perguntamos: Com tantos obstáculos, como podemos nos beneficiar das técnicas existentes para o estudo funcional de genes? Uma estratégia seria o silenciamento gênico por RNA de interferência (RNAi), uma ferramenta de genética reversa bastante promissora, proposta nesse estudo para o estudo funcional de proteína quinases de *S. mansoni*.

O termo interferência por RNA (RNAi) se refere ao processo pelo qual moléculas de RNA dupla-fita (dsRNA), inibem a expressão de um determinado gene. O mecanismo mediado por RNAi foi descrito pela primeira vez em *C. elegans* (Fire, Xu et al. 1998), alcançando ampla aplicação em vários sistemas biológicos. O mecanismo de RNAi envolve a participação de múltiplas proteínas com função biológica amplamente conservada entre os eucariotos (Tabach, Billi et al. 2013). Antes de tudo, RNAi faz parte de um atrativo mecanismo de defesa celular contra a infecção por vírus de RNA dupla fita e elementos genéticos móveis. Em teoria, qualquer organismo que possua a maquinaria de silenciamento gênico pode se beneficiar desta poderosa técnica para o estudo funcional de genes.

Resumidamente, o mecanismo de RNAi envolve um complexo proteico, chamado DICER, que possui atividade ribonuclease III e cliva os dsRNAs que entram na célula, produzindo pequenos fragmentos de 21 a 23 pb de RNA dupla fita, nomeados siRNAs. Os siRNAs contém dois nucleotídeos não pareados de cada um dos lados que se ligam ao complex RISC. Uma de suas fitas, em geral a fita antisenso, é selecionada para permanecer ligada ao complexo. O complexo é guiado ao mRNA de sequência complementar ao siRNA que está ligado à RISC. Uma endonuclease, chamada argonauta 2 (Ago2), presente no complexo, cliva o mRNA em um ponto interno central às fitas pareadas siRNA/mRNA. Os fragmentos liberados são degradados devido a perda de elementos essenciais à estabilidade dos mRNAs, tais como cauda poliA, suprimindo assim a tradução do mRNA alvo do silenciamento (Vidalin, Muslmani et al. 2009) (Figura 4).

A técnica de RNAi está sendo aplicada em *Schistosoma* desde 2003 (Boyle, Wu et al. 2003, Skelly, Da'dara et al. 2003) em diferentes fases do desenvolvimento. No geral, os autores que se propuserem utilizar a técnica de RNAi em *Schistosoma* para estudar a função gênica e/ou identificar potenciais alvos para o desenvolvimento de drogas, observaram que a eficiência da técnica é transiente, uma vez que o decréscimo na quantidade da proteína está associado à estabilidade da proteína-alvo, na forma de distribuição do RNA dupla fita e da sequência utilizada para a síntese do dsRNA/siRNA. O Quadro 1 ilustra vários alvos silenciados em *Schistosoma mansoni* e os fenótipos decorrentes do silenciamento.

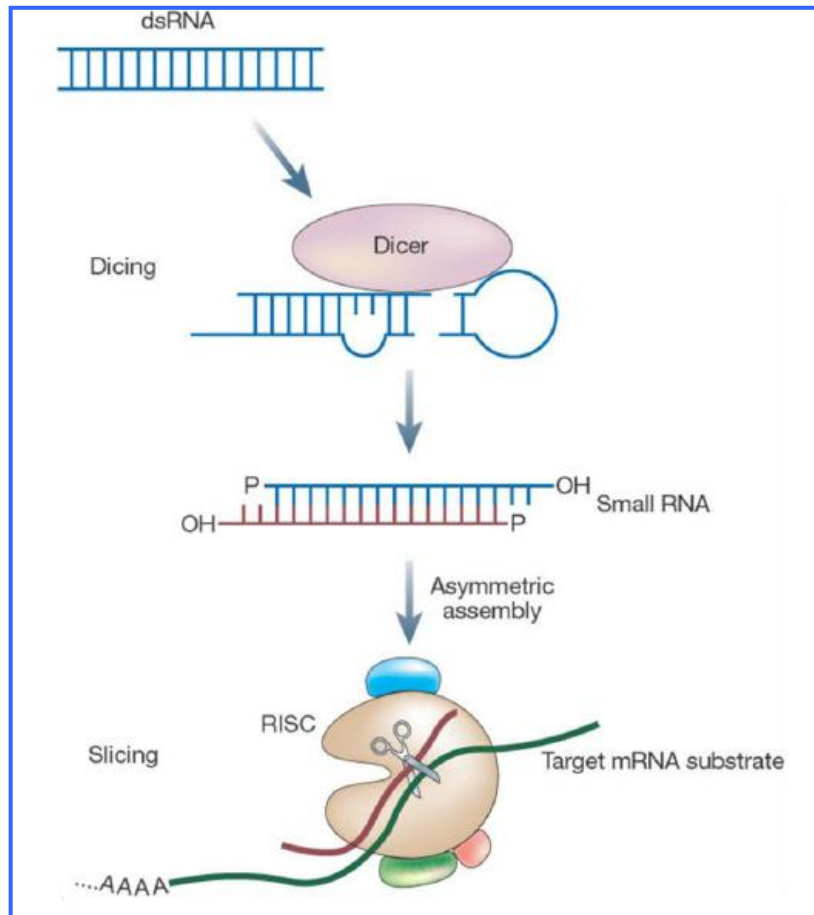


Figura 4: Maquinaria de silenciamento gênico por RNAi. Longos dsRNA são degradados pela enzima Dicer em pequenos RNAs (siRNAs). siRNAs se ligam ao complexo RISC e são utilizados como molde para a ligação no mRNA complementar. O mRNA é então clivado, inibindo a tradução da proteína (Vidalin, Muslmani et al. 2009).

Quadro 1: Alvos moleculares silenciados em *S. mansoni*.

Objetivo	Alvo	Molécula	Sistema	Efeito	Referência
Terapêutica	SmDR2; SmMRP1	siRNA	Ambos*	Redução no número de ovos recuperados do fígado de camundongos infectados	(Tran, Freitas et al. 2010)
	SmDR2; SmMRP1	dsRNA	Ambos	Retardo no crescimento dos vermes <i>in vitro</i> , supressão da atividade enzimática, não maturação sexual dos vermes adultos	(Morales, Rinaldi et al. 2008)
	HGPRTase	siRNA	<i>In vivo</i>	Redução de 27% no número de vermes recuperados	(Pereira, Pascoal et al. 2008)
	SGTP1; SGTP4	siRNA	Ambos	Redução da viabilidade dos vermes adultos e alteração da capacidade de importar glicose	(Krautz-Peterson, Simoes et al. 2010)
	SmNPP-5	siRNA	Ambos	Interferência no pareamento dos vermes adultos	(Bhardwaj, Krautz-Peterson et al. 2011)
	SmInAct	dsRNA	<i>In vitro</i>	Não maturação dos ovos	(Freitas, Jung et al. 2007)
	TGR	dsRNA	Ambos	Redução de 60% no número de vermes recuperados	(Kuntz, Davioud-Charvet et al. 2007)
Função gênica	SmPKA-C	dsRNA	<i>In vitro</i>	Supressão da atividade enzimática	(Swierczewski and Davies 2009)
	32 genes	dsRNA	<i>In vitro</i>	Redução no tamanho dos esporocistos para 11 genes	(Mourao, Dinguirard et al. 2009)
	LAP1; LAP2	dsRNA	<i>In vitro</i>	Não eclosão dos miracídios	(Rinaldi, Morales et al. 2009)
	GST26; GST28; GPx; Prx1; Prx2, SOD	dsRNA	<i>In vitro</i>	Maior susceptibilidade ao estresse oxidativo (mortalidade de 60 a 80% em 48h), exceto para SOD	(Mourao Mde, Dinguirard et al. 2009)
	SmTSP-1; SmTSP-2	dsRNA	Ambos	Alterações do tegumento	(Tran, Freitas et al. 2010)
	SmCB1	dsRNA	<i>In vitro</i>	Supressão da atividade enzimática	(Tchoubrieva, Ong et al. 2010)

*Triagem de fenótipos foi realizada em *In vitro* e em *In vivo*. Adaptado de Pereira e colaboradores (Pereira, Evangelista et al. 2013).

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar o papel da via de sinalização p38 MAPK no desenvolvimento do *S. mansoni* e na proteção contra o estresse oxidativo.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar a participação de proteínas da via de sinalização p38 MAPK na homeostase do *S. mansoni*;
- Determinar o papel de p38 MAPK na resistência do parasito ao estresse oxidativo *in vitro*;
- Verificar diferenças de expressão dos prováveis alvos regulados pela via p38 MAPK em *S. mansoni*.

3. Materiais e Métodos

Para alcançar os nossos objetivos utilizamos diferentes recursos da biologia molecular e da bioinformática, tendo como principais estratégias o silenciamento gênico por RNAi, ensaios de inibição farmacológica, ensaios *in vivo* frente ao sistema imune do modelo murino, ensaios *in vitro* de estresse oxidativo e predição de interações proteína-ligante.

3.1 Seleção dos alvos moleculares

Os critérios utilizados para a seleção das proteína quinases alvos desse estudo foram: (1) importância funcional dos ortólogos; (2) ser o único representante de uma subfamília, evitando assim, que a função da proteína alvo seja suplantada; (3) ser uma proteína ativadora/efetora da via de sinalização p38 MAPK. De acordo com os critérios estabelecidos duas proteína quinases foram selecionadas para os ensaios experimentais, a saber: SmMAP3K-1 (Smp_050380) e Smp38 (Smp_133020). Ambas as proteínas foram identificadas pelo nosso grupo em estudos anteriores (Andrade, Nahum et al. 2011).

3.2 Desenho de iniciadores específicos aos alvos moleculares

Os iniciadores desenhados para amplificação dos alvos moleculares podem ser agrupados em três diferentes categorias, numeradas de 1 a 3 (Quadro 2). Na categoria 1 foram agrupados os iniciadores utilizados na amplificação da sequência codificante completa, na categoria 2 estão os iniciadores utilizados para amplificar fragmentos em torno de 500 pb, utilizados na síntese dos dsRNAs e na categoria 3 estão os iniciadores utilizados para amplificar em torno de 150 pb, utilizados nos ensaios de qRT-PCR. Todos os iniciadores foram desenhados pelo programa Primer 3 (<http://primer3.sourceforge.net>) e construídos de acordo com as sequências codificantes disponíveis no banco de dados genômicos do *S. mansoni*, SchistoDB (Zerlotini, Aguiar et al. 2013). Os programas Oligo Analyser (<http://eu.idtdna.com/pages/home/about-us/what-we-do>), Amplifix (<http://en.bio-soft.net/pcr/AmplifX.html>) e FastPCR (<http://primerdigital.com/fastpcr.html>), foram utilizados para verificar a possível formação de *primer-dimer*, grampos, estruturas secundárias e para evitar a baixa especificidade de ligação à extremidade 3'. À extremidade 5' dos iniciadores da categoria 2, foi adicionado o promotor T7 RNA polimerase-específico.

3.3 Amplificação, clonagem e sequenciamento

Utilizando os iniciadores descritos no Quadro 2, os fragmentos de interesse foram amplificados pela técnica de PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*). Para amplificação utilizamos o kit *Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity* (Invitrogen) em um volume final de 50 μ l, segundo orientações do fabricante. Para isso adicionamos 2,5 μ l de *10X PCR Buffer minus mg*, 1,0 μ l de $MgSO_4$ (50mM), 0,5 μ l de DNTp à 10mM, 0,2 μ l de *Taq DNA Polymerase High Fidelity* (5U/ μ l), 1 μ l de cada iniciador (senso e anti-senso), à 10 μ M e 1 μ l de cDNA de esquistossômulos cultivados *in vitro* (gentilmente cedido pela Dra. Marina de Moraes Mourão). As temperaturas utilizadas em 30 ciclos foram: 94°C (desnaturação das fitas de DNA); 55°C (anelamento dos iniciadores); 68°C (polimerização pela *Taq DNA Polymerase High Fidelity*). Após amplificação, os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose não desnaturante 1% e após a eletroforese foram excisados do gel e purificados utilizando o kit *QIAquick Gel Extraction* (QIAGEN) segundo orientações do fabricante.

A clonagem foi realizada utilizando-se o kit de clonagem TOPO TA (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. 6,5 μ l da purificação descrita anteriormente, 1 μ l do *10X PCR Buffer* (10X), 1 μ l de DNTp (10mM), 0,5 μ l de $MgCl_2$ (50mM) e 1 μ l da enzima *Taq DNA Polymerase* (5 U/mL, Invitrogen) foram misturados e incubados a 70°C por 15min. para a adição de adenina extra requerida na clonagem em Topo. A ligação foi realizada misturando-se 6 μ l do produto de PCR poliadenilada, 1 μ l de *salt solution* (1,2M NaCl; 0,06M $MgCl_2$) e 1 μ l de vetor pCR 2.1 Topo, seguido de incubação por 5min. à T.A.

As transformações dos plasmídeos foram realizadas em células de *E. coli* cepa Top10F' quimicamente competentes tratadas com cloreto de cálcio. 65ng de plasmídeo foram adicionados à alíquota de 100 μ l de células competentes. A mistura foi incubada em gelo por 30min., seguido de choque térmico a 42°C por 40s. Em seguida o tubo foi colocado em gelo. 250 μ l de meio SOC (100 μ l 1M $MgSO_4$, 1mL 0,1M $MgCl_2$, 200 μ l 1M glicose, meio SOB q.s.p 10mL) foram adicionados ao tubo, que por seguinte, foi incubado a 37°C por 1h. A cultura foi plaqueada em meio LB-agar (10mg NaCl, 5mg extrato de levedura, 10mg peptona, 1,5% ágar, H₂O q.s.p 1L, pH=7,0) com ampicilina (100 μ g/mL) ou kanamicina (50 μ g/mL) e incubada a 37°C por 16h.

Para a extração do plasmídeo foi utilizado o kit de extração plasmidial *Quiaprep spin miniprep* (QIAGEN). Colônias de bactérias contendo o plasmídeo de interesse foram cultivadas em 5mL de meio LB com ampicilina (100 μ g/mL) em agitador orbital a 300 r.p.m, a uma temperatura de 37°C, durante 16h. A cultura foi centrifugada em micro-centrifuga a 13.000 r.p.m por 5min. e o sedimento ressuspensionado em 250 μ l de tampão P1 de

ressuspensão (50mM Tris-HCl, pH=8,0; 10mM EDTA, 100 µg/mL RNase A). 250µl do tampão de lise P2 (200mM NaOH, 1% SDS) foram acrescentados ao tubo, que por sua vez, foi invertido por 6 vezes. 350µl do tampão N3 de neutralização (fórmula proprietária do fabricante) foram acrescentados e, após a mistura das soluções, o tubo foi centrifugado por 10min. a uma rotação de 13.000 r.p.m. Após a centrifugação, o sobrenadante foi aplicado nas micro-colunas, que foram centrifugadas por 2min. A coluna foi equilibrada com 750µl de tampão PB de equilíbrio (fórmula proprietária do fabricante) e centrifugada por 2min. A coluna foi em seguida lavada com 750µl de tampão PE de lavagem (fórmula proprietária do fabricante) e novamente centrifugada por 2min. O DNA foi eluído com 50µl de tampão de eluição (10mM Tris-HCl, pH=8,5) pré-aquecido a 60°C. A quantificação foi realizada no *Nanodrop Spectrometer ND-1000* (Nanodrop) e o plasmídeo armazenado a -20°C para posterior utilização.

Quadro 2: Lista de iniciadores. Os alvos moleculares mCherry (do inglês, *Red Fluorescent Protein*) e GFP (do inglês, *Green Fluorescent Protein*) representam genes não codificados pelo genoma do *S. mansoni* e constituem os controles inespecíficos dos ensaios de RNAi. A sequência taatacgaactcactataggg corresponde ao promotor T7 RNA polimerase-específico.

<i>SchistoDB-ID</i>	Alvo molecular	Iniciador senso 5'	Iniciador anti-senso 3'
Categoria 1			
Smp_133020	p38 MAPK	ATGATCGGGTATGGGGC	TCAAGCTGCATT TGTCTCTTC
Smp_133020	p38 MAPK	-	ACTGAATTGATGAATATGATTA CCAC
Categoria 2			
Smp_133020	p38 MAPK	taatacgaactcactatagggACAGTATTGGCT TAATTCATCG	taatacgaactcactatagggTGGATCATCG AATCTCTCTGC
Smp_133020	p38 MAPK	taatacgaactcactatagggGTTGCAACTCGT TGGTATCG	taatacgaactcactatagggTCGCGAATAA ATCCACATGC
Smp_050380	MAP3K	taatacgaactcactatagggGATACGTGGTCC TATTCTGG	taatacgaactcactatagggCCGTTACGA ATGTTACG
Smp_050380	MAP3K	taatacgaactcactatagggTAAATTATTCGT GAAGGATGC	taatacgaactcactatagggGTCTCGACAT GACAATTACG
Smp_050380	MAP3K	taatacgaactcactatagggGTCATGTGCATT TTCACA	taatacgaactcactatagggTGCCATGGTG GTTTACTTGTA
-	mCherry	taatacgaactcactatagggTGGTGAGCAAGG GCCGA	taatacgaactcactatagggTACTTGTAC AGCTCGTCC
-	GFP	taatacgaactcactatagggTCTTCAGTCCGC CATG	taatacgaactcactatagggTGCTCAGGTA GTGGTTGTC
Categoria 3			
Smp_133020	p38 MAPK	GCCCACGATAACAAATTAACC	AAGGCATCAATCAAACAACG
Smp_050380	MAP3K	GCTACACCATCTAATACTGAGG	GCTACACCATCTAATACTGAGG
Smp_013860	GCL	TCCTGATAGTGGTGCTTCC	CCGTTACGAATGTTACG
Smp_900000	Cox	TACGGTTGGTGGTGTCACAG	ACGGCCATCACCATACTAGC

Para a extração do plasmídeo foi utilizado o kit de extração plasmidial *Quiaprep spin miniprep* (QIAGEN). Colônias de bactérias contendo o plasmídeo de interesse foram cultivadas em 5mL de meio LB com ampicilina (100µg/mL) em agitador orbital a 300 r.p.m, a uma temperatura de 37°C, durante 16h. A cultura foi centrifugada em micro-centrifuga a 13.000 r.p.m por 5min. e o sedimento ressuscitado em 250µl de tampão P1 de ressuspensão (50mM Tris-HCl, pH=8,0; 10mM EDTA, 100 µg/mL RNase A). 250µl do tampão de lise P2 (200mM NaOH, 1% SDS) foram acrescentados ao tubo, que por sua vez, foi invertido por 6 vezes. 350µl do tampão N3 de neutralização (fórmula proprietária do fabricante) foram acrescentados e, após a mistura das soluções, o tubo foi centrifugado por 10min. a uma rotação de 13.000 r.p.m. Após a centrifugação, o sobrenadante foi aplicado nas micro-colunas, que foram centrifugadas por 2min. A coluna foi equilibrada com 750µl de tampão PB de equilíbrio (fórmula proprietária do fabricante) e centrifugada por 2min. A coluna foi em seguida lavada com 750µl de tampão PE de lavagem (fórmula proprietária do fabricante) e novamente centrifugada por 2min. O DNA foi eluído com 50µl de tampão EB de eluição (10mM Tris-HCl, pH=8,5) pré-aquecido a 60°C. A quantificação foi realizada no *Nanodrop Spectrometer ND-1000* (Nanodrop) e o plasmídeo armazenado a -20°C para posterior utilização.

O sequenciamento foi realizado com o kit de sequenciamento *DYEnamic ET Dye terminator* para análise de DNA em sistema MegaBACE (Amershan Bioscience), segundo orientações do fabricante. Na placa de PCR para sequenciamento foi colocado 2µl do DNA plasmidial recombinante (100ng/µl), 4µl do pré-mix de sequenciamento *DYEnamic terminator*, 1µl de iniciador (3µM), para volume final de 10µl. Para a reação de sequenciamento foi utilizado o programa: 95°C por 20s. (desnaturação), 50°C por 15s. (anelamento) e 60°C por 1min. (extensão) por 25 ciclos consecutivos. A placa foi centrifugada em centrífuga 5804R (Eppendorf) e em seguida foi adicionado 1µl de acetato de amônia 7,5M e 27µl de etanol 100%. Após misturar os reagentes por inversão, a placa foi centrifugada a 800 r.p.m por 1min., e em seguida encubada por 10min. à T.A e ao abrigo de luz. A placa foi centrifugada a 3.700 r.p.m por 45min. e, em seguida, o sobrenadante foi descartado. 100µl de etanol 70% foram adicionados à placa que foi em seguida centrifugada a uma rotação de 3.700 r.p.m por 10min. O sobrenadante foi descartado e a placa foi centrifugada invertida a 800 r.p.m por 1min. Após 10min., a reação de sequenciamento foi ressuscitada em 10µl de tampão de amostra do kit (70% formamida, 1mM EDTA) e a placa foi centrifugada a 3.700 r.p.m por 2min. A placa foi então sequenciada no aparelho de sequenciamento automático de DNA MegaBace 500 (GE Healthcare Life Sciences). Para validar o resultado do sequenciamento, as sequências

obtidas foram alinhadas às sequências depositadas no *SchistoDB* utilizando o programa Clustal-W (Thompson, Higgins et al. 1994).

3.4 Síntese de dsRNA

Após confirmação das sequências de interesse por sequenciamento, os dsRNAs foram sintetizados utilizando o kit *T7 RiboMAX Express RNAi Systems* (Promega) seguindo o protocolo do fornecedor. Com o intuito de aumentar a concentração e a quantidade de dsRNAs produzidos, modificamos o protocolo para a produção final de 70 μ L de dsRNA. Para isso, na reação inicial, adicionamos 30 μ L do plasmídeo recombinante de interesse, 35 μ L *RiboMAX™ Express T7 2X Buffer* e 5 μ L *Enzyme Mix T7 Express*. As amostras foram incubadas a 37°C por 16 h., e em seguida, tratadas com DNase durante 30 min. a 37°C. O produto foi precipitado com etanol e dissolvido em água *DNase/RNase Free* (Invitrogen). A concentração das amostras foi dosada utilizando o *Nanodrop Spectrometer ND-1000* (Nanodrop) e a integridade foi conferida em gel agarose 1% não desnaturante. Os dsRNAs foram armazenados a -20°C para posterior utilização.

3.5 Ensaios *in vitro*

3.5.1 Obtenção das cercárias e transformação em esquistossômulos

Cercárias da cepa LE do parasito *S. mansoni* foram gentilmente cedidas pela Dra. Liana Konovaloff (Laboratório de Malacologia - Centro de Pesquisas René Rachou). Nesse laboratório é utilizado o modelo de passagem por *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda), seguido de *hamsters*, retornando a *B. glabrata*.

As cercárias obtidas foram distribuídas em alíquotas de 50mL e incubadas por 60 min. no gelo. Em seguida, os tubos contendo as cercárias foram centrifugados a 1.000 r.p.m por 3 min. a 4°C e o sobrenadante descartado. O sedimento foi ressuscitado em 2mL de meio MEM (Minimum Essential Medium Eagle-Sigma-Aldrich) contendo 1% de penicilina/estreptomicina e o conteúdo de três tubos transferido para um tubo de 15mL (utilizando pipetas Pasteur descartável) seguido de centrifugação à 1.000 r.p.m por 3 min. O sobrenadante foi descartado e novamente o sedimento foi ressuscitado em 2mL de meio MEM contendo 1% de penicilina/estreptomicina. Os tubos foram submetidos à agitação máxima em vórtex por três vezes, durante 2 min., com intervalos de 1 min. entre cada agitação. O volume de cada tubo foi transferido para um frasco estéril de cultura de 50mL e o volume completado para 10mL com meio MEM contendo 1% de

penicilina/estreptomicina. A garrafa de cultura foi incubada em estufa a 37°C, com atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade por 1 h. Após a incubação, as amostras foram transferidas para tubos estéreis de 15mL dentro de fluxo laminar. Os tubos contendo parasitos foram submetidos a sedimentação por 5 min. Em seguida, o sobrenadante foi retirado. O sedimento foi ressuspenso em 5mL de meio MEM contendo 1% de penicilina/estreptomicina e sedimentado por mais 5 min. Novamente, o sobrenadante foi removido e este passo repetido por mais cinco vezes diminuindo apenas o tempo de sedimentação (duas vezes 5 min., duas vezes 4 min., duas vezes 3 min.). Após a última sedimentação, o sobrenadante foi ressuspenso em 1mL de meio MEM suplementado com meio Schneider (5%), HEPES (20mM), hidrolisado de lactoalbumina (0,1%), hipoxantina (5x10⁻⁷), serotonina (1x10⁻⁶), triiodotironina (2x10⁻⁷), hidrocortisona (1x10⁻⁶), MEM vitaminas (0,5%) e soro fetal bovino - Sigma (1%). Uma alíquota do volume ressuspenso foi observada com o auxílio de lupa para análise da presença de caudas e cercárias. Os parasitos foram contados e transferidos para placa de 24 poços. O número de parasitos em cada poço variou de acordo com o objetivo do experimento.

3.5.3 Exposição dos esquistossômulos aos dsRNAs

Após prévia padronização da cultura, os dsRNAs sintetizados (Smp38-dsRNA (p38.1, p38.2), SmMAP3K-1-dsRNA, mCherry-dsRNA, GFP-dsRNA), como tamanho aproximado de 500 pb, foram inseridos na concentração de 100nM em culturas contendo aproximadamente 2.000 parasitos e 2 mL de meio MEM suplementado (Ver 3.5.2). Em cada uma das placas os tratamentos foram realizados em duplicata e tiveram a duração de dois, quatro e sete dias. As culturas foram observadas diariamente por microscopia de inversão (*ABO 100 - ZEISS*) para verificação de mudanças fenotípicas. Imagens dos parasitos foram registradas utilizando o software *Axion Vision REL 4* no sétimo dia de cultura. As extrações de RNA foram realizadas dois, quatro e sete dias após o tratamento com dsRNA. Foram realizadas pelo menos três réplicas biológicas experimentais de cada ensaio para obtermos suporte estatístico dos experimentos realizados.

3.5.4 Triagem de fenótipos dos esquistossômulos expostos aos dsRNAs

Como mencionado em 3.5.3, no sétimo dia de cultura os esquistossômulos foram fotografados pela câmera de alta resolução *Axiocam MRc Ver.3* acoplada ao microscópio invertido (*Axio Observer, Carl Zeiss*). Para evitar erros de amostragem capturamos imagens de três campos distintos/poço. A área (µM²) de todos os esquistossômulos fotografados foi medida utilizando o programa *AxionVision Release 4.8*. Os tamanhos dos

esquistossômulos tratados com os dsRNA para S foram comparados com os parasitos tratados com o dsRNA inespecífico mCherry e controle negativo. Como as amostras não seguiam uma distribuição normal, a significância dos resultados foi realizada utilizando o teste de Mann-Whitney (*Wilcoxon-Sum of Ranks*, $p < 0,05$, $N=3$).

3.6 Extração e tratamento de RNA total

As extrações de RNA dos esquistossômulos expostos aos dsRNAs após dois, quatro e sete dias foram realizadas utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen - Life Technologies) e purificadas com o RNeasy mini Kit (QIAGEN). Resumidamente, os parasitos foram transferidos para tubos 1,5 mL e centrifugados durante 1 min. em baixa velocidade a 4°C. O sobrenadante foi retirado, foram adicionados 50 µL de TRIzol e os parasitos foram macerados com auxílio de um pistilo. Em seguida, foram adicionados 950 µL de TRIzol e as amostras foram mantidas por 5 min. a temperatura ambiente. Acrescentou-se 500 µL de clorofórmio e as amostras foram agitadas vigorosamente por 15 s. e, logo em seguida, foram mantidas à temperatura ambiente por 3 min., com posterior centrifugação das amostras a 12.000 r.p.m por 15 min. a 4°C. A fase aquosa, na qual se encontra o RNA, foi transferida para tubo novo e 280 µL de etanol 70% foram adicionados e transferidos para a coluna do RNeasy mini Kit (QIAGEN). O tubo foi então centrifugado a 12.000 r.p.m por 1 min. O sobrenadante foi removido e 700 µL do Buffer RW1 foi acrescentado à coluna (fórmula proprietária do fabricante), que foi então levada à centrifugação por 15 s. a 10.000 r.p.m. O eluato foi descartado e 500 µL de solução RPE (fórmula proprietária do fabricante) foram adicionados à coluna. Mais um ciclo de centrifugação foi realizado por 15 s. a 10.000 r.p.m. Em seguida, mais 500 µL de solução RPE foram adicionados e a centrifugação dessa vez foi realizada por 2 min.. As amostras foram centrifugadas por mais 1 min. e a coluna transferida para tubo novo. Para eluição, 30 µL de água livre de RNAase foram acrescentados à coluna. Objetivando a remoção de DNA genômico contaminante nas amostras de RNA, foi realizado o tratamento com DNase por 30 min. a 37°C, utilizando o kit TURBO DNA-free (Ambion - Life Technologies), segundo manual do fabricante. Posteriormente, a densidade óptica OD_{260/280} do RNA tratado foi medida utilizando o Nanodrop Spectrometer ND-1000 (Thermo Fisher Scientific).

3.7 Síntese de cDNA

Para síntese de cDNA do RNA extraído e tratado como descrito acima, foi utilizado o kit *SuperScript III System RNase H* (Invitrogen- Life Technologies) e as mesmas quantidades de RNA total foram utilizadas para cada amostra dentro de um mesmo experimento. Ao RNA foram adicionados 1 µL de oligo(dt) (500µg/mL) e 1 µL de DNTp (10mM) em um volume final de 10 µL. A amostra foi incubada a 65°C por 5 min. e colocada imediatamente no gelo. Ao tubo foram acrescentados 4 µL de tampão de síntese de primeira fita 5X (250 mM Tris-HCl, pH=8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂), 2 µL de DTT (0,1mM) e 1 µL de *RNase-Out* (40µg/mL, *Invitrogen- Life Technologies*). O tubo foi incubado a 42°C por 2 min. e foi, em seguida, acrescentado 1 µL de *SuperScript III* (200 U/mL). A reação foi então incubada a 50°C por 50 min, e, em seguida, incubada a 80°C por 15 min. Para remoção da fita de RNA do híbrido RNA-DNA, foi adicionado 1µL de RNase H e incubado 37°C por 20 min. As amostras foram armazenadas a -20°C para posterior utilização.

3.8 Ensaios de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

Os níveis de transcritos dos genes alvo expostos aos dsRNAs em cultura de esquistossômulos (Ver 3.5.3) foram avaliados por qRT-PCR. Todos os iniciadores passaram primeiramente por uma padronização para certificar a eficiência da amplificação e definição das concentrações. Para isso, três diferentes concentrações: 200nM, 300nM e 600nM foram utilizadas para cada iniciador. O cDNA dos esquistossômulos foi utilizado em 5 diferentes concentrações (50ng/µl, 12,5ng/µl, 3,125ng/µl, 781,25pg/µl, 195,31pg/µl). O gene normalizador foi a subunidade I do citocromo oxidase (COXI) de *S. mansoni* (GenBank AF216698), constitutivamente expresso em várias fases do ciclo do parasito. Os valores CT (*Cycle threshold*) foram plotados em função da diluição do cDNA. A eficiência dos iniciadores foi medida através da análise das inclinações das curvas (entre -3,5 e -3,2) combinada aos cálculos dos coeficientes R² (foram considerados valores maiores que 0,98) indicando alta reprodutibilidade entre as triplicatas. Apenas os iniciadores que exibiram esses parâmetros foram considerados.

Para verificar o nível de transcrito dos genes alvo, utilizamos as seguintes amostras: cDNA de esquistossômulos expostos aos dsRNAs e cDNA de esquistossômulos que não receberam nenhum tipo de tratamento (controle negativo). Na mesma placa, triplicatas de todas as amostras acima relacionadas foram amplificadas com iniciadores específicos e com iniciadores para o gene COXI (controle para normalização). As reações foram realizadas no aparelho 7500 Real Time PCR System (*Applied Biosystems*) e em

placas 96-Well Optical Reaction Plate (ABI PRISM, Applied Biosystems) que continham em cada poço 12,5 μ l de SYBR GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1,0 μ l de cDNA e 0,5 μ l de cada iniciador (200nM concentração final por reação), em um volume final de 25 μ l por reação. Em cada placa havia também um controle negativo (contendo todos os reagentes para a síntese de cDNA e para amplificação, exceto o RNA) e controle de DNA genômico das amostras (onde todos os reagentes foram adicionados com exceção da transcriptase reversa). A expressão relativa foi analisada através do método do $\Delta \Delta$ CT (Livak and Schmittgen 2001) onde os valores Ct de cada amostra foram subtraídos do Ct do normalizador (COXI) (Δ Ct). Em seguida, os valores correspondentes ao Δ Ct encontrado para cada amostra foi subtraído do Δ Ct normalizado. Os níveis de expressão de cada gene foram comparados com os níveis de expressão de transcritos do mesmo gene em parasitos tratados com GFP-dsRNA ou mCherry-dsRNA. A significância dos resultados foi realizada pelo teste estatístico Wilcoxon-Sum of Ranks (Mann-Whitney, significância $p > 0,05$) utilizando os $\Delta \Delta$ CTs obtidos.

3.9 Curva de sobrevivência dos parasitos na presença de SB 203580

Fizemos uma curva de sobrevivência, para estipularmos a concentração limite do inibidor (SB 203580, inibidor da atividade enzimática de p38) na qual os esquistossômulos de fase tegumentar eram capazes de sobreviver. Para isso, parasitos foram colocados em placas de 24 poços em duplicata para cada concentração do inibidor por 24h. Testamos 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M e 100 μ M de SB 203580 (Sigma) em cada poço, em um volume final de 500 μ l. Para cada concentração testada, tínhamos esquistossômulos em duplicata tratados com 0,02% v/v de DMSO (Sigma) e esquistossômulos também em duplicata, que não receberam nenhum tipo de tratamento. Os parasitos expostos à DMSO e aqueles que não receberam tratamento foram os controles do experimento. Foi estipulado que a concentração do inibidor limite para a sobrevivência seria de 15 μ M. Para quantificarmos os parasitos mortos, foi adicionado 5 μ g/ml de iodeto de propídio aos poços, que cora apenas esquistossômulos mortos. Ao microscópio, os parasitos totais de todos os poços foram contados, e posteriormente, com o laser no comprimento de onda de 572nm, os organismos mortos foram identificados e contabilizados. Apenas esquistossômulos totalmente corados eram contados como organismos mortos. A significância foi analisada por One-way ANOVA e os resultados significativos foram tratados pelo teste de Bonferroni, N=3.

3.10 Ensaios *in vivo*

Após exposição dos esquistossômulos aos dsRNAs durante quatro dias (Ver 3.5.3) ou à 15 μ M de SB 203580 durante 12h (Ver item 3.9), 300 parasitos foram imersos em 0,5mL de meio de cultura MEM suplementado e inoculados em dose única, na região dorsal com aplicação subcutânea, em camundongos suíços (*Mus musculus*). Em cada experimento foram utilizados cinco camundongos para os tratamentos com dsRNA-alvo-específico e inibidor, além de cinco camundongos para os grupos controles (dsRNA-controle-inespecífico, DMSO 0,02% v/v e não tratado). Três réplicas biológicas foram realizadas tanto para inoculação com esquistossômulos expostos aos dsRNAs ou para àqueles expostos ao inibidor. Após 40 dias de infecção, praticamos a eutanásia dos camundongos por deslocamento cervical e os possíveis vermes adultos foram então recuperados por perfusão (Pellegrino and Katz 1974). Após a perfusão, o fígado de cada camundongo foi retirado, pesado e acondicionado em tubos com KOH 10% onde ficaram por 16 h. a 4°C e em seguida, incubados a 37°C, por 1 h. Os tubos foram centrifugados por cinco min. a 2000 r.p.m e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi ressuspendido com salina 0,85% para lavagem. Esta etapa foi repetida por mais duas vezes. Depois da última centrifugação, o sedimento foi ressuspendido em 1mL de salina 0,85% e o número de ovos presentes em cada amostra foi contado por microscopia a partir de 3 alíquotas de 10 μ L. Tanto o número de ovos quanto o número de vermes adultos recuperados para os tratamentos com dsRNA-alvo-específico e SB 203580 nos três experimentos, foram comparados com o número de ovos e vermes adultos recuperados nos camundongos infectados com esquistossômulos dos grupos controles (dsRNA-controle-inespecífico, DMSO 0,02% v/v e não tratado). Como as amostras não seguiam uma distribuição normal, a significância dos resultados foi realizada utilizando o teste de Mann-Whitney (*Wilcoxon-Sum of Ranks*, $p < 0,05$, $N=3$).

3.11 Morfometria e morfologia dos vermes adultos

Amostras de vermes adultos recuperados após a perfusão de camundongos infectados com esquistossômulos expostos aos dsRNAs foram analisadas por microscopia confocal em busca de alterações fenotípicas. Para isso, os parasitos foram fixados em AFA (ácido acético 2%, formaldeído 10% e álcool 48%) e armazenados a temperatura ambiente para posterior utilização. Em seguida os vermes foram corados com carmim hidrocloreídrico 2,5%, desidratados por passagem em álcool 70%, 90% e 100%, clarificados com salicilato de metila e Bálsamo do Canadá (1:2) e montados individualmente em lâminas de vidro. Análises morfométricas foram realizadas nos vermes vermes adultos de ambos os sexos

utilizando imagens computacionais (Image Pro Plus - Media Cybernetics, EUA) capturadas por uma câmera Sony acoplado (640 x 480 pixels, RGB) ao microscópio de luz (Olympus BX50). Os seguintes parâmetros foram determinados: número e área dos lobos testiculares, presença de tubérculos, a área do ovário, presença de ovos e glândulas vitelínicas e a integridade do tegumento. A significância dos resultados foi realizada utilizando o teste de Mann-Whitney (Wilcoxon-Sum of Ranks, $p < 0,05$, $N=3$). Imagens confocal (LSM-410, Zeiss), utilizando laser 488 nm He/Ne e filtro LP 585 no modo refletido foram usados para estudar o sistema reprodutivo de machos (lóbulo testicular) e fêmeas (ovário, útero, oótipo, e glândulas vitelínicas) além da integridade do tegumento de ambos os sexos do parasito.

3.12 Cinética do desenvolvimento dos vermes adultos e dos ovos

Para avaliarmos a cinética do desenvolvimento dos vermes adultos, esquistossômulos foram novamente expostos aos dsRNAs (Ver 3.5.3) e após quatro dias de tratamento foram inoculados em camundongos suíços como descrito em 3.10. Após 17 dias e 40 dias de infecção, os camundongos foram submetidos a eutanásia por deslocamento cervical e os possíveis vermes foram recuperados por perfusão (Pellegrino and Katz 1974). Todos os vermes foram contados e classificados de acordo com o sistema de classificação de desenvolvimento proposto por Barbosa e colaboradores (Barbosa, Pellegrino et al. 1978). Para avaliarmos a cinética do desenvolvimento dos ovos, camundongos foram infectados como descrito acima e após 40 dias de infecção os animais foram submetidos a eutanásia por deslocamento cervical. Um fragmento de aproximadamente 1 cm² do intestino de cada camundongo (íleo terminal) foi removido, seguido por lavagem com salina 0,85% para retirada das fazes. Esses fragmentos são colocados entre uma lâmina de vidro e uma lamínula de plástico e pressionados com o auxílio de uma prensa de ferro. As lâminas são levadas ao microscópio para contagem por amostragem (100 ovos/camundongo) e classificação dos ovos de acordo com o proposto por Prata (Prata 1957). Como as amostras não seguiam uma distribuição normal, a significância dos resultados foi realizada utilizando o teste de Mann-Whitney (*Wilcoxon-Sum of Ranks*, $p < 0,05$, $N=3$).

3.13 Infecção de moluscos

Esquistossômulos foram novamente expostos aos dsRNAs (Ver 3.5.3) e após quatro dias de tratamento foram inoculados em camundongos suíços como descrito em 3.10. Após 50 dias de infecção, os camundongos foram submetidos a eutanásia por deslocamento cervical e o fígado de cada camundongo foi retirado. A obtenção dos miracídios para infecção dos moluscos foi realizada segundo a técnica descrita por Pellegrino e colaboradores (Pellegrino, Lima-Costa et al. 1977), brevemente: Os fígados de cada camundongo foram triturados individualmente no liquidificador em salina 0,85%, e posteriormente transferidos para cálices individuais. Os cálices foram mantidos na ausência de luz por 30 minutos. Após esse período o sobrenadante foi descartado, e o volume completado para 1L com água desclorada. Os cálices foram mantidos na ausência de luz por mais 20 minutos e após esse período o sobrenadante foi descartado (essa lavagem foi repetida por duas vezes). O sedimento remanescente de cada cálice foi transferido individualmente para balão volumétrico. Estes balões foram colocados sob luz artificial para estimular a eclosão dos miracídios. Os miracídios obtidos foram contados e utilizados para infecção em massa de caramujos *B. glabrata* linhagem Barreiro de Cima. Para infecção foram utilizados moluscos entre 8 e 10mm de diâmetro da concha. Após à eclosão, 200 miracídios provenientes dos ovos recuperados do fígado de um único camundongo foram expostos à 20 moluscos contidos em *beckers* com água desclorada (10 miracídios/caramujo). Os *beckers* contendo os caramujos e miracídios foram mantidos na luz por aproximadamente 3 horas a 27°C, antes de serem colocados no aquário. Após 30 dias de infecção, os moluscos foram expostos à luz, individualmente, em recipientes contendo água desclorada, por 40 minutos e examinados em lupa para verificar a eliminação de cercárias.

3.14 Avaliação do efeito de estresse oxidativo

Para observarmos o efeito funcional do silenciamento de Smp38 ou do tratamento com SB 203580 nos parasitos, expusemos os esquistossômulos a estresse oxidativo adicionado peróxido de hidrogênio no meio de cultura.

3.14.1 Curva de sobrevivência dos parasitos na presença de H₂O₂

Primeiramente, fizemos uma curva de sobrevivência, para estipularmos a concentração limite na qual os esquistossômulos de fase tegumentar eram capazes de sobreviver. Para isso, parasitos expostos à mCherry-dsRNA (controle) foram colocados em

placas de 24 poços em duplicata para cada concentração de água oxigenada testada por 24h. Testamos 5mM, 100µM, 50µM, 25µM, 10µM e 5µM de peróxido de hidrogênio (Sigma) em cada poço, em um volume final de 500µl. Foi estipulado que a concentração de H₂O₂ limite para a sobrevivência seria de 50µM. Para quantificarmos os parasitos mortos, foi adicionado 5µg/ml de iodeto de propídio aos poços, que cora apenas esquistossômulos mortos. Ao microscópio, os parasitos totais de todos os poços foram contados, e posteriormente, com o laser no comprimento de onda de 572nm, os organismos mortos foram identificados e contabilizados. Apenas esquistossômulos totalmente corados eram contados como organismos mortos.

3.14.2 Experimento de estresse oxidativo

Esquistossômulos tratados com dsRNA (Ver 3.5.3) por quatro dias ou expostos à SB 203580 por 12h (Ver 3.9) foram dispostos em placas de 24 poços em triplicatas. Para quantificarmos os parasitos mortos antes de serem expostos à H₂O₂, foi adicionado 5µg/ml de iodeto de propídio aos poços contendo esquistossômulos controle. Ao microscópio, os parasitos totais de todos os poços foram contados e, posteriormente, com o laser no comprimento de onda de 572nm, os organismos mortos foram identificados e contabilizados. Esta contagem indicava a porcentagem de esquistossômulos mortos por outra forma que não pela adição de peróxido de hidrogênio. Após a contagem, peróxido de hidrogênio na concentração de 50µM foi adicionado a dois dos três poços contendo parasitos de cada tratamento e os poços restantes foram mantidos com meio MEM (branco). As placas contendo esquistossômulos silenciados foram incubadas em estufa a 37°C, com atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade por 4h, 24h e 48h. Os esquistossômulos expostos ao inibidor foram climatizados nas mesmas condições descritas anteriormente por 24h e 48h. Os parasitos mortos foram contados a cada um destes intervalos de tempo. Apenas esquistossômulos totalmente corados eram contabilizados como organismos mortos.

Para que fosse possível estabelecer uma correlação entre estresse oxidativo e a morte dos parasitos, subtraímos o número de organismos mortos antes da exposição ao peróxido de hidrogênio do número total de esquistossômulos por poço, sendo o resultado, o número total de organismos vivos antes da exposição a H₂O₂. O número inicial de esquistossômulos mortos foi subtraído do número de parasitos mortos observados após cada contagem e a porcentagem de mortos calculada em relação ao número total de organismos vivos presentes inicialmente. Os resultados foram analisados por Two-way ANOVA e quando os resultados se mostravam significativos, aplicou-se a correção de Bonferroni, comparando-se cada tempo de análise do tratamento com seus respectivos

tempos em esquistossômulos controles (tratados com DMSO 0,02% v/v ou mCherry-dsRNA). (Significância $p < 0,05$, $N=3$).

3.14.3 Neutralização do estresse oxidativo

Para nos certificarmos que era o peróxido de hidrogênio o único fator oxidante no meio, esquistossômulos tratados com SB 203580 foram expostos a $50\mu\text{M}$ de H_2O_2 e a mesma concentração de H_2O_2 contendo 0,025% da enzima catalase bovina (Sigma). A concentração de 0,025% de catalase foi demonstrada por Mourão e colaboradores (Mourao Mde, Dinguirard et al. 2009) como a ideal para neutralizar os efeitos do peróxido de hidrogênio em cultura de esporocistos. Os parasitos foram incubados em estufa a 37°C , com atmosfera de 5% de CO_2 e 95% de umidade por 24h. A contagem foi feita como explicado em 3.15.2. A sobrevivência dos parasitos foi comparada após exposição a H_2O_2 . Os resultados foram analisados por Two-way ANOVA e quando os resultados se mostravam significativos, aplicou-se a correção de Bonferroni, comparando-se o tempo de análise do tratamento com seu respectivo tempo em esquistossômulos que não foram tratados (branco) (Significância $p < 0,05$, $N=3$).

3.14.4 Detecção dos níveis de transcritos após estresse oxidativo

Esquistossômulos de fase tegumentar (Ver 3.5.2) foram expostos em triplicata à $100\mu\text{M}$ ou $200\mu\text{M}$ de H_2O_2 durante 5min, 10min e 30min. Os níveis de transcritos de algumas enzimas que participam da via de sinalização p38 MAPK foram acessados em cada um destes tempos. Para cada enzima, tínhamos esquistossômulos controle, que não foram expostos a H_2O_2 , e os níveis de transcritos desses alvos também foram acessados nessas populações em seus respectivos tempos, para confirmarmos se a expressão dos transcritos alvos estava alterada após indução do estresse oxidativo. O RNA total dos esquistossômulos foi extraído com descrito em 3.6, seguido de síntese de cDNA (Ver 3.7) e PCR quantitativo em tempo real (Ver 3.8).

3.15 Docking molecular

A sequência primária de aminoácidos de p38 MAPK de *S. mansoni* (Smp_133020) foi utilizada para buscas de potenciais homólogos com estrutura tridimensional conhecida no PDB (Protein Data Bank) (Berman, Henrick et al. 2007). A estrutura química de SB 203580 (4-[4-(fluorophenyl)-2-(4methylsulfinylphenyl)-1H-imidazol-5-yl]pyridine), fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{FN}_3\text{OS}$, foi obtida no banco de dados de compostos químicos ChemSpider (Williams

2008). Estudos de ancoramento molecular foram realizados com SB 203580, utilizando o programa Gold, visando identificar as interações resultantes do complexo de referência, formado pela estrutura tridimensional do potencial homólogo associada à SB 203580. A análise das ligações de hidrogênio foi feita através do programa Pymol. A caracterização das interações dos resíduos de aminoácidos identificados no complexo de referência foi realizada pelo pacote *ab initio* programa Gamess com funcional B3LYP-D3 e base 6-31++G**. Todas as ferramentas citadas acima estão implementadas no pacote DockoMatic 2.0 (Bullock, Cornia et al. 2013). A análise visual dos resultados de *docking* através de medidas de distância interatômicas e orientação do ligante no sítio ativo da enzima foi realizada pelo *software* LigandScout 3-D (Wolber and Langer 2005).

|

4. Resultados e Discussão

4.1 Alvos selecionados e correção do modelo do gene

O nosso grupo de pesquisa tem se dedicado nos últimos anos à compreender a participação de redes de sinalização celular no desenvolvimento do *S. mansoni* e, desta forma, contribuir para a elucidação de novos alvos de drogas contra a esquistossomose. Nesse estudo propomos investigar o papel biológico de proteína quinases envolvidas na via de sinalização p38 MAPK para o desenvolvimento e sobrevivência do *S. mansoni* e na proteção contra o estresse oxidativo.

Muitos estímulos extracelulares são convertidos em respostas celulares específicas através da ativação de proteína quinases ativadas por mitógenos (MAPKs). A cascata de sinalização p38 MAPK é preferencialmente ativada por estímulos não mitogênicos, como por exemplo, fatores de estresse ambiental e citocinas pro-inflamatórias (Nebreda and Porras 2000).

C. elegans e *Brugia malayi* (Nematoda: Secernentea) respondem ao estresse oxidativo através da ativação de p38 MAPK. A formação de ROS (do inglês, *Reactive Oxygen Species*) nesses organismos induz a fosforilação de p38 MAPK que transmite esse sinal aos alvos específicos responsáveis pela transcrição de enzimas detoxificantes (Patel, Chojnowski et al. 2011). Ensaio utilizando *C. elegans* deletados ou silenciados para o gene p38 MAPK (*pmk-1*) mostraram uma maior susceptibilidade à infecção por patógenos, reforçando o papel da via de sinalização na resposta imune (Bolz, Tenor et al. 2010). Alguns trabalhos apontam p38 MAPK como molécula reguladora chave de processos biológicos essenciais, como por exemplo, morfogênese (Adachi-Yamada, Nakamura et al. 1999), oogênese (Suzanne, Irie et al. 1999), diferenciação celular (Engelman, Lisanti et al. 1998) e apoptose (Zechner, Craig et al. 1998).

Os critérios utilizados para a seleção das proteína quinases alvos desse estudo foram: 1. importância funcional dos ortólogos; 2. ser o único representante de uma subfamília, evitando assim, que a função da proteína alvo seja complementada por outra proteína; 3. ser uma proteína ativadora/efetora da via de sinalização p38 MAPK. De acordo com os critérios estabelecidos duas proteína quinases foram selecionadas para os ensaios experimentais, a saber: SmMAP3K-1 (*Smp_050380*) e Smp38 (*Smp_133020*). Ambas as proteínas foram identificadas pelo nosso grupo em estudos anteriores (Andrade, Nahum et al. 2011) e estão destacadas na Figura 3 pelas setas vermelhas.

SmMAP3K-1 é uma proteína quinase do grupo STE, família STE11 e subfamília MAP3K-1 ou MEKK1. Apesar da existência de quatro subfamílias MAP3K em humanos (MAP3K-1/4), uma única subfamília foi encontrada em *C. elegans* (*sny-1*) e em *S. mansoni*.

Apenas dados de predição de sequência estão disponíveis para SmMAP3K-1 e o papel funcional dessa proteína para o *S. mansoni* permanece desconhecido. Em organismos homólogos MAP3K-1 é a proteína ativadora das cascatas de sinalização JNK, ERK-1/2 (Uhlik, Abell et al. 2004) e p38 (Zhuang, Zhou et al. 2006). MAP3K-1 fosforila seletivamente diferentes MAP2K efetoras da transdução de sinal. Na cascata de sinalização das MAPKs em humanos, MAP2K-1/2 fosforilam ERK-1/2, MAP2K-4/7 fosforilam JNK-1/2/3 e MAP2K-3/6 fosforilam p38- $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ (Kyriakis and Avruch 2012).

Smp38 é uma proteína quinase do grupo CMGC, família MAPK e subfamília p38. Diferentes produtos proteicos foram descritos em humanos (p38- $\alpha/\beta/\gamma/\delta$) e *C. elegans* (pmk-1/2/3), enquanto que em *S. mansoni* apenas uma proteína p38 foi predita (Andrade, Nahum et al. 2011). Até o presente momento dois trabalhos descrevem a importância funcional de p38 para o *S. mansoni*. Anisomicina[®], um potente ativador da atividade de p38 acelerou a perda dos cílios dos miracídios, sugerindo a participação da via de sinalização p38 MAPK na transformação dos miracídios em esporocistos (Ressurreicao, Rollinson et al. 2011). Além disso, também foi observado que os níveis de fosforilação de p38 aumentam consideravelmente durante a transformação dessas fases evolutivas (Ressurreicao, Rollinson et al. 2011).

Estudos de genômica comparativa realizados pelo nosso grupo revelaram que a proteína predita Smp38 (Smp_133020) possui aproximadamente 60% do tamanho esperado quando comparada aos ortólogos. Suspeitávamos que essa alteração no tamanho da proteína poderia ter sido ocasionada por: 1. Erros no modelo do gene; 2. Variabilidade genética existente entre diferentes cepas do *S. mansoni*; 3. Ocorrência de deleções espontâneas responsáveis pelo encurtamento do polipeptídeo.

Motivados pelas nossas hipóteses, amplificamos o transcrito de Smp38 e, para a nossa surpresa, o tamanho do transcrito amplificado (1.020 pb) não correspondia ao tamanho do transcrito predito (714 pb), se assemelhando portanto ao tamanho do transcrito dos ortólogos. Nosso próximo passo foi realizar buscas por similaridade de sequências utilizando o algoritmo BLAST (Johnson, Zaretskaya et al. 2008) contra o banco de dados de sequências nucleotídicas não redundantes depositadas no GenBank, alimentado pelo NCBI (Benson, Cavanaugh et al. 2013). A sequência predita de Smp38 é formada por sete exons e seis íntrons (Figura 5.A). Nossas análises demonstraram que a inserção encontrada no transcrito amplificado corresponde a regiões de íntrons da sequência predita. Desta forma, concluímos que o encurtamento do polipeptídeo se trata de erros no modelo do gene processados durante a montagem do genoma do *S. mansoni*. A correção do modelo do gene prevê a ocorrência de nove exons e oito íntrons totalizando 19.810 pb (Figura 5.A). A proteína codificada possui 339 aminoácidos e foi predita a partir do sequenciamento do

transcrito de Smp38, enquanto que, o transcrito de Smp38 predito (Smp_133020) codifica uma proteína de 237 aminoácidos (Figura 5.B). Buscas por domínios conservados utilizando o banco de dados de famílias de proteínas Pfam (Punta, Coggill et al. 2012) foram realizadas para ambas as sequências e a única assinatura proteica identificada foi o domínio catalítico (Pfam 00069), assim como o encontrado nos ortólogos. Entretanto, o domínio catalítico da sequência predita (Smp_133020) possui uma falha decorrente da ausência dos exons 04 e 05 (indicada pela seta azul), tornando a nossa hipótese de erros no modelo do gene ainda mais confiante (Figura 5.B).

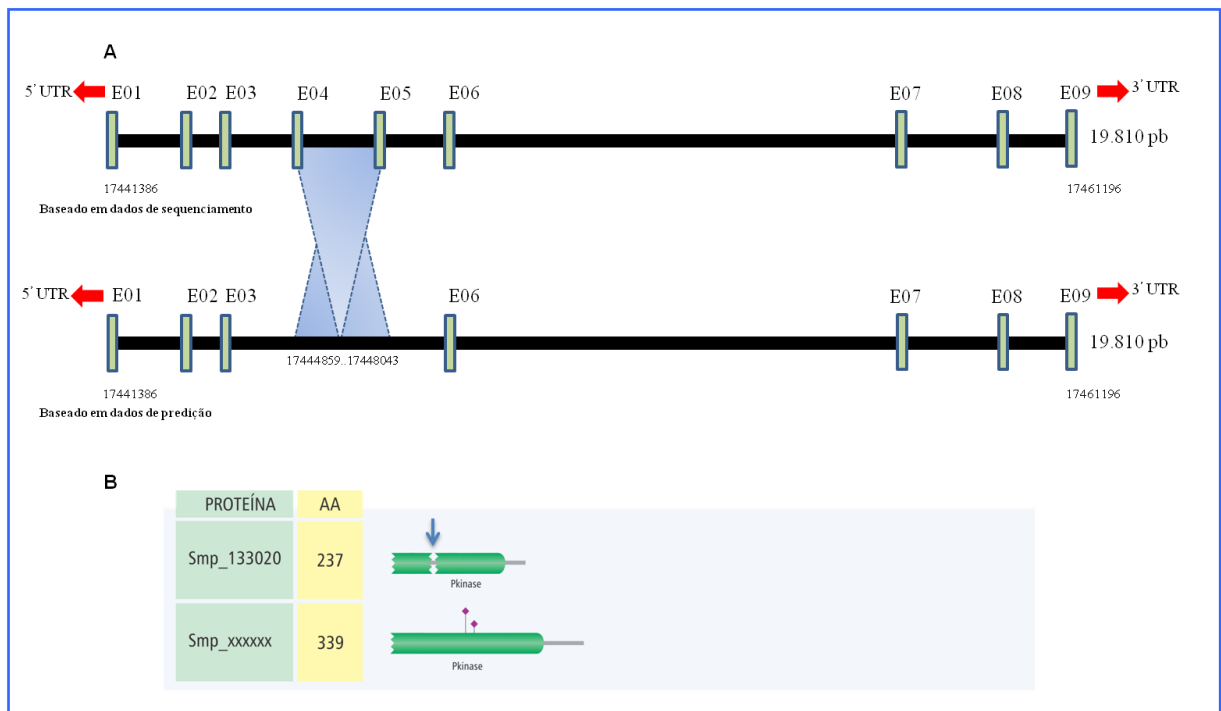


Figura 5: Organização genômica e proteica de Smp38. A. Representação da organização genômica da sequência confirmada por sequenciamento e da sequência predita. A linha horizontal preta representa o tamanho do gene em pb e as barras verticais verdes representam os exons (E-01/09) inter espaçados pelos íntrons. Os números inferiores à linha preta representam a localização de Smp38 no genoma do *S. mansoni* (GenBank Assembly ID: GCA_000237925.2). **B.** Predição de domínios proteicos. A primeira coluna representa o identificador de Smp38 no banco de dados relacional do *S. mansoni*, SchistoDB (Zerlotini, Aguiar et al. 2013) e a segunda coluna representa o tamanho das sequências em aminoácidos (AA). Ambas as sequências possuem apenas o domínio catalítico conservado. A ausência dos sítios de fosforilação, representados pelos losangos rosa e a falha no domínio catalítico representada pela seta azul, aumentam as evidências de erros no modelo do gene.

4.2 Análises fenotípicas do silenciamento de Smp38 e SmMAP3K-1

Para iniciarmos este trabalho, cada dsRNA foi sintetizado, purificado e analisado em gel de agarose 1% não desnaturante. A Figura 6 mostra exemplos de alguns dsRNAs sintetizados. Notamos que a eficiência da síntese de dsRNA variou entre os diferentes transcritos alvos e isso pode ser devido à diferentes eficiências nas reações de PCR e na recuperação dos produtos da PCR dos genes alvos, previamente à produção do dsRNA. No entanto, para a adição dos dsRNA às culturas de esquistossômulos estes eram dosados e sempre adicionava-se uma quantidade em cada poço para a concentração final de 100 nM.

Trabalhos de silenciamento gênico por RNAi em larga escala demonstram que diferentes regiões de um mesmo gene podem produzir diferentes níveis de redução do transcrito (Stefanic, Dvorak et al. 2010). Na tentativa de maximizar os resultados do silenciamento, duas diferentes regiões dos nossos alvos foram selecionadas para a síntese de dsRNA, entretanto, obtivemos sucesso nas ampliações que precedem à síntese de dsRNA apenas para o alvo Smp38. As diferentes regiões de Smp38 foram chamadas de p38.1 e p38.2.

Mourão e colaboradores (Mourao, Dinguirard et al. 2009) demonstraram que o controle inespecífico, apesar de não ser codificado pelo genoma do *S. mansoni* pode produzir efeitos não específicos. Tal fato pode ocorrer quando trabalhamos com longos dsRNAs, uma vez que a enzima *Dicer* cliva aleatoriamente essas moléculas, podendo gerar siRNAs complementares à algum transcrito do *S. mansoni*. O resultado obtido por esses autores (Mourao, Dinguirard et al. 2009) foi corroborado pelos nosso estudos e, dessa forma, trabalhamos com diferentes controles inespecíficos para cada um de nossos alvos. O controle inespecífico mCherry-dsRNA, utilizado nos ensaios de silenciamento para o alvo Smp38, codifica para a proteína vermelha fluorescente de *Discosoma sp.* (Cnidaria: Anthozoa) e o controle inespecífico GFP-dsRNA, utilizando para o alvo SmMAP3K-1, codifica para a proteína verde fluorescente de *Aequorea victoria* (Cnidaria: Hydrozoa).

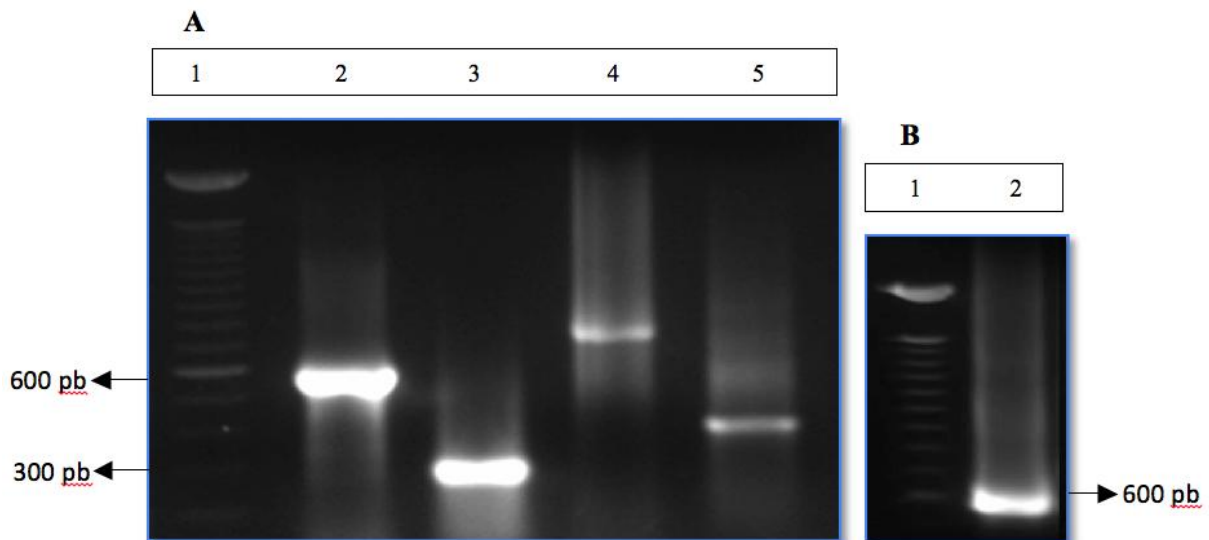


Figura 6: Representação dos dsRNAs sintetizados. Os dsRNAs foram devidamente anelados e resolvidos em gel de agarose 1% não desnaturante. **A.** Canaleta 1: Padrão de peso molecular (100 bp DNA Ladder - Promega), Canaleta 2: p38.1-dsRNA, Canaleta 3: p38.2-dsRNA, Canaleta 4: mCherry-dsRNA, Canaleta 5: GFP-dsRNA. **B.** Canaleta 1: Padrão de peso molecular (100 bp DNA Ladder - Promega), Canaleta 2: MAP3K-1-dsRNA.

Escolhemos trabalhar com esquistossômulos transformados mecanicamente, mantidos em cultura e no sétimo dia do desenvolvimento. Neste estágio de desenvolvimento, após penetração no hospedeiro definitivo, significativas mudanças morfológicas, fisiológicas e bioquímicas ocorrem nos esquistossômulos (Wilson 2009). Embora não apresentem uma fisiologia idêntica aos esquistossômulos que penetram pela pele, esquistossômulos transformados mecanicamente e mantidos em cultura por diferentes períodos, passam por todos os estágios evolutivos que ocorrem no hospedeiro definitivo e são rotineiramente utilizados para estudos de comportamento, desenvolvimento biológico, atividade metabólica, ensaios de bioquímica, biologia molecular e imunologia, desenvolvimento de vacinas e triagem de drogas (Tang, Dong et al. 2012). Existem evidências que esquistossômulos transformados mecanicamente são estruturalmente similares aos seus contemporâneos de estágio pulmonar e após sete dias mantidos em cultura são capazes de atingir a maturação quando introduzidos em camundongos (Wilson 2009).

É importante ressaltar que antes de iniciarmos a triagem de fenótipos decorrentes do tratamento com dsRNA teríamos que verificar se o tratamento com dsRNA é tóxico para os esquistossômulos. Para analisar a existência de um fenótipo letal, após sete dias de

incubação com dsRNA para um dos nossos controles internos (mCherry-dsRNA) e para o silenciamento dos transcritos alvos, foi adicionado à população de esquistossômulos iodeto de propídio, que cora moléculas de DNA dupla-fita mas não consegue atravessar uma membrana citoplasmática saudável. Por conseguinte, esquistossômulos totalmente corados foram contabilizados e considerados inviáveis após o tratamento. Não houve diferença significativa quando comparamos a porcentagem de esquistossômulos mortos nas populações tratadas com as populações que não receberam tratamento (controle negativo) (Figura 7).

Estas observações indicam que os parasitos permanecem viáveis, em longo prazo, após o tratamento com dsRNA. É válido ressaltar que apenas o tratamento com o dsRNA para o controle interno seria suficiente para prever a toxicidade do dsRNA para os parasitos. No entanto, o número de parasitos mortos decorrentes do tratamento com dsRNA para os transcritos alvos nos auxiliou na exclusão do fenótipo de letalidade na população de esquistossômulos supostamente silenciados.

Parasitos tratados com dsRNAs para os genes selecionados foram observados todos os dias por sete dias. Durante os sete dias procuramos observar possíveis fenótipos possivelmente associados aos tratamentos com dsRNA. Na triagem por fenótipos, procuramos observar mudanças na forma, lise do tegumento e morte e perda ou aumento no movimento. Medidas da área (μM^2) dos esquistossômulos foram feitas ao sétimo dia de cultura para obtenção de dados referentes a forma dos esquistossômulos.

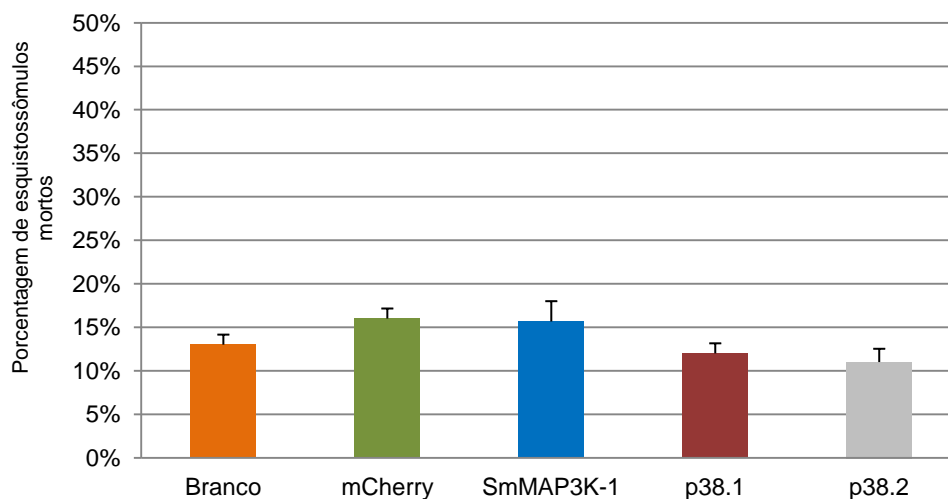


Figura 7: Mortalidade dos esquistossômulos expostos à dsRNA. Os esquistossômulos foram expostos aos dsRNAs mCherry, SmMAP3K-1 e Smp38 (p38. 1 e p38.2) e a mortalidade dos parasitos foi avaliada em relação ao controle negativo após sete dias de tratamento. Os dados foram tratados pelo teste t de Student não pareado. Esquistossômulos não expostos à dsRNA constituem o controle negativo que é expresso no gráfico como “branco”. As barras representam o erro padrão entre os experimentos (N=3).

Após a exposição dos esquistossômulos aos dsRNAs dos genes selecionados, o único fenótipo associado que pudemos distinguir entre os diferentes tratamentos foi o de alteração na forma dos parasitos tratados com dsRNAs para o alvo Smp38. Exemplos de esquistossômulos após os tratamentos com dsRNA são mostrados na Figura 8. É válido ressaltar que durante a triagem de fenótipos associados aos tratamentos, os esquistossômulos foram diariamente observados durante 30 dias, após a data de início do experimento.

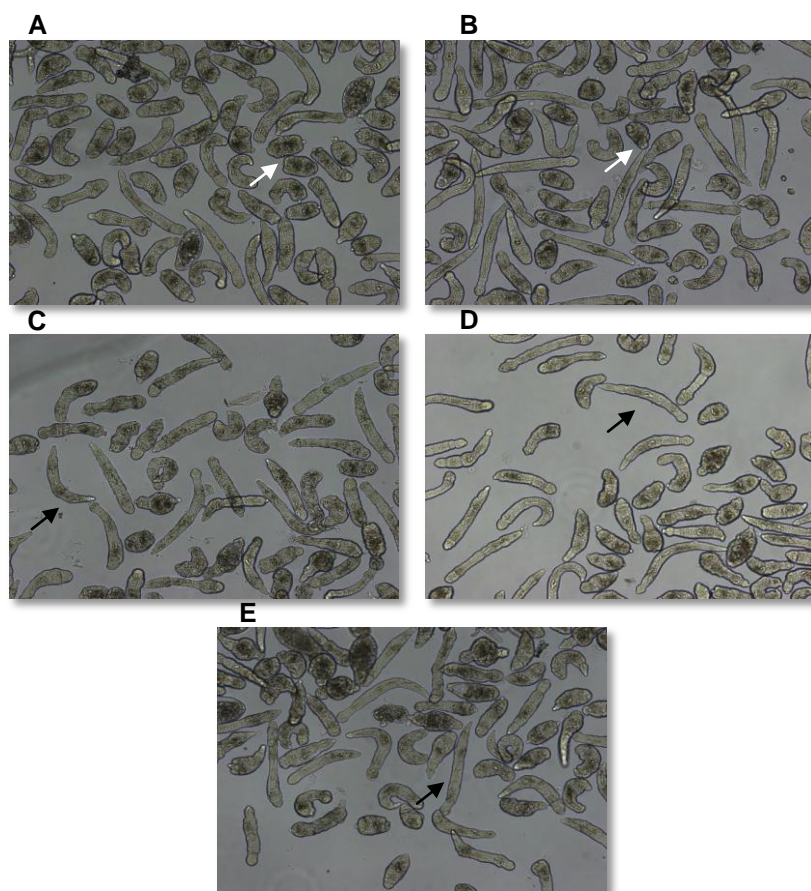


Figura 8: Imagens de esquistossômulos tratados com dsRNA. Os esquistossômulos foram observados diariamente por sete dias após exposição aos dsRNAs e o fenótipo de alteração da forma foi observado. Como controle inespecífico, esquistossômulos foram incubados com mCherry-dsRNA (C) e GFP-dsRNA (E). Em A e B estão representados os parasitos tratados com p38-dsRNA, p38.1 e p38.2 respectivamente. Em D estão representados os parasitos tratados com MAP3K-1-dsRNA (imagens com aumento de 100x). A forma alongada dos parasitos, representada pelas setas pretas, está de acordo com o esperado para esquistossômulos com sete dias de desenvolvimento (Crabtree and Wilson 1980). Esquistossômulos de forma arredondada são indicados pelas setas brancas.

Ao sétimo dia, esquistossômulos foram amostrados em fotografias e a área de cada parasito foi medida, com exceção dos organismos mortos. As medidas obtidas foram submetidas a tratamento estatístico usando o teste de Mann-Whitney (significância $p < 0,05$). Estes experimentos foram repetidos por três vezes para cada tratamento.

A mediana do área dos esquistossômulos variou nos diversos grupos analisados como pode ser visto na Figura 9. Portanto, cada experimento foi considerado separadamente e a mediana de cada amostra comparada com a mediana do controle inespecífico mCherry-dsRNA. Vale a pena ressaltar que apesar de não demonstrado no gráfico, não houve diferença significativa entre os grupos de parasitos controle (mCherry-dsRNA e controle negativo).

Apesar de termos observado durante a triagem de fenótipos alterações na forma dos parasitos tratados com p38.1-dsRNA e p38.2-dsRNA, alguns tratamentos foram inconsistentes, apresentando alteração da área apenas em dois dos três experimentos realizados. Neste caso, devemos desconsiderar o fenótipo de alteração na forma dos esquistossômulos.

Nos apoiamos em algumas evidências para argumentar o fenótipo de alteração na forma dos esquistossômulos e a inconsistência dos nossos resultados. Recentes aplicações de RNAi em esquistossômulos, miracídios ou vermes adultos produziram fenótipos de parasitos menores (Kalinna and Brindley 2007). Mourão e colaboradores (Mourao, Dinguirard et al. 2009) mediram o comprimento de esporocistos silenciados para vários genes envolvidos em importantes processos biológicos do *S. mansoni* e a mesma inconsistência foi observada em vários tratamentos. Em *C. elegans* foi observado que apenas cerca de 10% dos vários genes silenciados apresentam algum fenótipo, sendo 2% dos fenótipos viáveis detectáveis relacionados com tamanho alterado ou crescimento (Kamath and Ahringer 2003). Além disso, a eficiência do silenciamento e quais os genes eram silenciados em *C. elegans* foram, de certa forma, dependente dos métodos de RNAi empregados (O'Rourke and Bowerman 2005), evidenciando dessa forma, que a ausência de fenótipos e a inconsistência entre métodos de silenciamento é recorrente, até mesmo em *C. elegans*, organismo em que essa ferramenta foi desenvolvida e é amplamente utilizada.

A ausência de um fenótipo associado ao tratamento *in vitro* com dsRNA para produtos gênicos de MAPKs também foi descrito por Andrade e colaboradores (Andrade 2013). Apesar da técnica de RNAi se mostrar eficiente em *S. mansoni*, não podemos nos esquecer que, ao contrário do nocaute gênico, o efeito do silenciamento não produz fenótipo nulo. Portanto, o efeito da supressão da expressão gênica pode ser transiente e uma expressão mínima de uma determinada proteína pode ser suficiente para a execução de sua função. Não podemos desconsiderar a localização celular e tecidual em que o transcrito alvo é expresso e, dessa forma, poderia não ser sensível ao mecanismo de RNAi. Mais ainda, a

absorção de dsRNA não é uniforme em uma mesma população de parasitos (Mourao, Dinguirard et al. 2009).

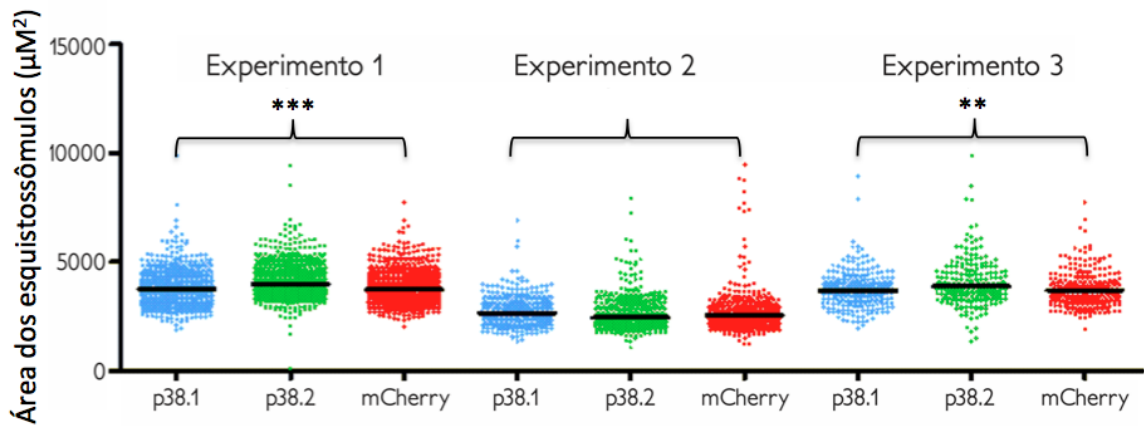


Figura 9: Área dos esquistossômulos após tratamento com dsRNAs. A área dos esquistossômulos expostos aos dsRNAs p38.1 e p38.2 foi comparada à área dos esquistossômulos controle (tratados com mCherry-dsRNA). O gráfico ilustra a representação de três experimentos analisados pelo teste de Mann-Whitney (*Wilcoxon sum of ranks*). Com asteriscos, estão as amostras que apresentaram significativa alteração da área dos esquistossômulos (p38.1 e p38.2) quando comparadas ao seu respectivo controle interno, mCherry. As barras pretas horizontais representam a mediana da área da população amostrada (** e *** indicam $p < 0,01$, e $p < 0,001$ respectivamente). Os símbolos representam um único verme para cada grupo experimental. Como os valores das medianas não se mantiveram constantes entre as réplicas biológicas, os análises dos experimentos foram realizadas separadamente.

4.3 Estudo dos níveis de transcritos em parasitos tratados com dsRNA

Utilizamos PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) para verificarmos o nível dos transcritos expressos pelos parasitos tratados com dsRNA, comparando-os com o nível dos mesmos transcritos em esquistossômulos tratados com mCherry-dsRNA e GFP-dsRNA. Na tentativa de mapear qual seria o tempo ideal para o silenciamento de cada um dos genes selecionados, o nível dos transcritos foi dosado dois, quatro e sete dias após cada tratamento com dsRNA. Acessar os níveis de transcritos em diferentes tempos é essencial, uma vez que a redução no nível de transcritos por RNAi em *Schistosoma* não é constante e que cada RNA mensageiro apresenta uma meia-vida diferente (Yoshino, Dinguirard et al. 2010). É válido ressaltar que todos os iniciadores utilizados na qPCR anelam em regiões externas à região alvo para a síntese de dsRNA, prevenindo que os dsRNAs remanescentes na amostra de cDNA sejam amplificados e quantificados.

Infortunadamente, detectamos que o alvo SmMAP3K-1 não foi sensível ao silenciamento gênico, produzindo uma diminuição extremamente sutil e inconsciente no nível de transcritos (Figura 10).

Em nossos estudos de supressão da expressão gênica empregamos o uso de dsRNA e *soaking*. Diferentes protocolos da técnica de RNAi foram propostos na tentativa de potencializar os efeitos do silenciamento em *S. mansoni*. Ndegwa e colaboradores (Ndegwa, Krautz-Peterson et al. 2007) estudaram diferentes protocolos para suprimir a expressão da proteína fosfatase alcalina (SmAP) e concluíram que tanto dsRNA como siRNA promovem um silenciamento efetivo. Entretanto, o efeito do silenciamento foi influenciado pelo método de entrega do dsRNA exógeno, produzindo resultados mais significativos e conscientes por eletroporação quando comparados aos resultados obtidos por *soaking*. Na tentativa de maximizar os nossos resultados, também utilizamos a estratégia de eletroporação (dados não mostrados). Entretanto, apesar de empregarmos a mesma metodologia descrita por Ndegwa e colaboradores (Ndegwa, Krautz-Peterson et al. 2007), acreditamos que a voltagem aplicada não foi capaz de induzir poros reversíveis nas membranas celulares.

Além disso, Mourão e colaboradores detectaram que alguns alvos tratados com dsRNA demonstravam fenótipo evidente *in vitro* mas não apresentavam mudanças significativas no nível do transcrito. Esses resultados sugerem que talvez não exista uma correlação entre a ocorrência de um fenótipo evidente e o nível de silenciamento do transcrito, ou que, cada transcrito apresenta um *turnover* diferente.

É evidente que vários fatores devem ser considerados quando o silenciamento gênico não é alcançado para um determinado alvo, como por exemplo: 1. O método de silenciamento foi baseado em dsRNA ou siRNA? 2. Qual método de entrega foi empregado

para o dsRNA exógeno? 3. Qual é a localização celular e tecidual do transcrito alvo? Proteína quinases da subfamília MAP3K-1 são moléculas *upstream* das cascatas de sinalização das MAPKs em organismos eucariotos (JNK, ERK-1/2 e p38). Devido ao seu papel essencial nessas redes complexas, acreditamos que o RNA mensageiro de SmMAP3K-1 possui uma meia-vida curta, sendo requerido de uma forma mais homogênea durante todo o desenvolvimento do *S. mansoni*. Uma vez os níveis de transcritos de SmMAP3K-1 foram acessados somente dois dias após o início dos tratamentos é possível que a expressão gênica já tenha se normalizado.

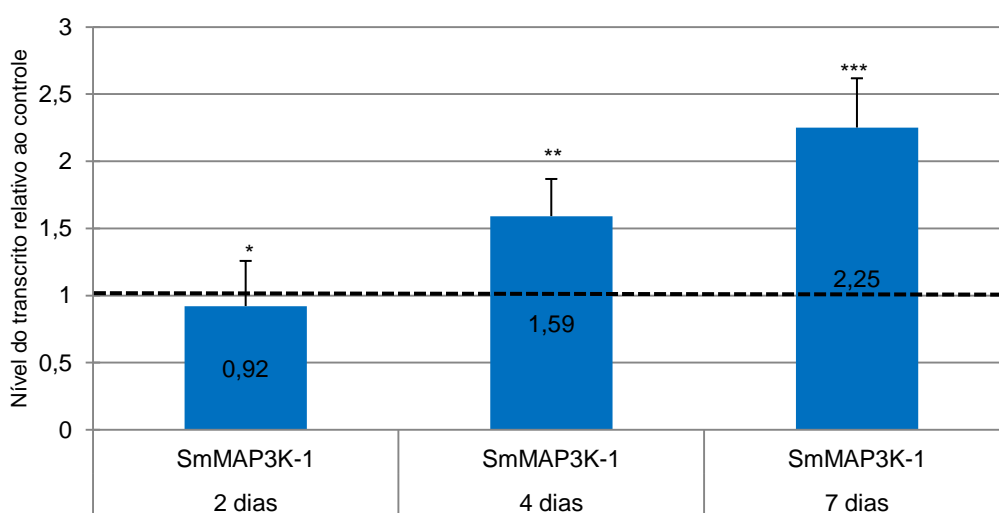


Figura 10: Nível de transcritos de SmMAP3K-1 pós-dsRNA. Os níveis de transcritos de SmMAP3K-1 foram comparados àqueles dos parasitos tratados com GFP-dsRNA (controle) durante dois, quatro ou sete dias. Os resultados foram analisados pelo método $\Delta\Delta\text{CT}$ seguido do teste de Mann-Whitney (*Wilcoxon sum of ranks*); $P < 0.05$; $N = 3$, alterações significativas nos níveis de transcritos são mostradas com asteriscos (*). A linha pontilhada representa o nível normalizado de transcritos na população controle (GFP-dsRNA). As barras representam o erro padrão entre os experimentos e os valores no interior das colunas representam os níveis de transcritos quantificados.

Em contrapartida, quando acessamos os níveis de transcritos de Smp38 em diferentes tempos após o tratamento com dsRNA, detectamos um silenciamento satisfatório para ambas as regiões selecionadas (Figura 11). Interessantemente, a eficiência do silenciamento variou para cada região testada e com o decorrer dos dias uma diminuição consistente nos níveis de transcritos foi observada para p38.1, ao passo que p38.2

demonstrou um aumento progressivo nos níveis de transcritos. A menor redução nos níveis de transcritos para p38.1 foi de 85% após sete dias de tratamento e para p38.2 foi de 78% após dois dias (Figura 11). Apesar da localização no produto proteico das regiões p38.1 e p38.2 não ser o enfoque principal deste trabalho, faremos uma prévia aqui. A região p38.2 representa na cadeia polipeptídica a extremidade C-terminal do domínio catalítico onde está localizado o motivo DFG (Asp-Phe-Gly) altamente conservado entre as proteínas quinases eucarióticas e essencial na regulação da atividade quinase (Peng, Shiao et al. 2013). À vista disso, acreditamos que no início do tratamento o silenciamento promova uma redução drástica do transcrito, mas ao sétimo dia, no momento em que acessamos o nível deste transcrito, a expressão gênica esteja se normalizando. Não obstante, estamos diante de uma possível estratégia do parasito em regularizar a expressão de uma proteína efetora de uma importante cascata de sinalização requerida para o seu desenvolvimento.

A satisfatória diminuição da expressão gênica medida por RT-qPCR associada à ausência de um fenótipo claro e consistente na população de esquistossômulos nos deixou bastante intrigados. Nos arriscamos a sugerir algumas hipóteses para esse ocorrido: 1. a diminuição dos níveis do transcrito não seria suficientemente eficaz para levar a uma diminuição dos níveis proteicos no tempo máximo observado (sete dias); 2. o fenótipo de silenciamento gênico produzido seria muito sutil, não sendo percebido pelos nossos métodos de avaliação; 3. a diminuição dos níveis do transcrito levaria a uma queda na síntese da proteína, mas o produto proteico apresentaria uma meia-vida longa, o que reduziria os efeitos do silenciamento; 4. mesmo havendo quedas, por vezes drásticas, do nível de transcrito e da proteína por ele codificada, a presença de uma pequena quantidade de proteína seria suficiente para manter sua função e, por último mas não menos importante; 5. a função do gene silenciado poderia ser substituída por um outro gene funcionalmente análogo.

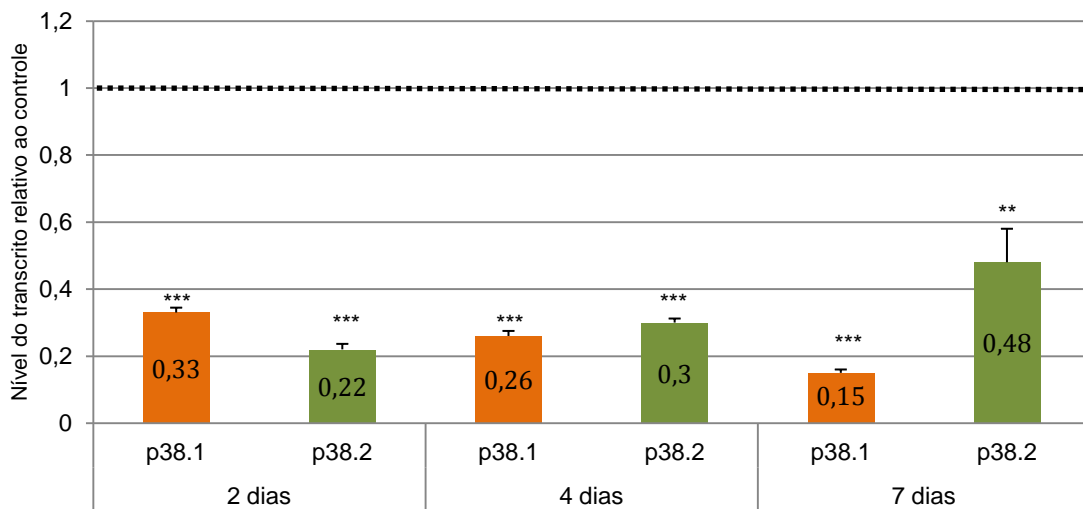


Figura 11: Nível de transcritos de Smp38 pós-dsRNA. Os níveis de transcritos de Smp38 foram comparados àqueles dos parasitos tratados com mCherry-dsRNA (controle) durante dois, quatro ou sete dias. Os resultados foram analisados pelo método $\Delta\Delta\text{CT}$ seguido do teste de Mann-Whitney (*Wilcoxon sum of ranks*); $P < 0.05$; $N = 3$, decréscimos significativos nos níveis de transcritos são mostrados com asteriscos (*). A linha pontilhada representa o nível normalizado de transcritos na população controle (mCherry-dsRNA). As barras representam o erro padrão entre os experimentos e os valores no interior das colunas representam os níveis de transcritos quantificados.

Embora satisfeitos com o resultado do silenciamento gênico de Smp38 precisávamos investigar outro questionamento: O transcrito de Smp38 seria o alvo exclusivo do silenciamento? Bhardwaj e colaboradores (Bhardwaj, Krautz-Peterson et al. 2011), grupo pioneiro em estudos de silenciamento gênico por RNAi no *S. mansoni*, recomenda fortemente que o tamanho dos longos dsRNAs seja de aproximadamente 400-500 pb. Longos dsRNAs serão reconhecidos e processados pelo complexo DICER e, por seguinte, degradados de forma randômica em pequenos siRNAs (~ 22 pb). Além disso, já foi descrito que a eficiência do silenciamento está associada à sequência escolhida para a síntese de dsRNA (Naito and Ui-Tei 2013). Ademais, para evitar a degradação inespecífica de transcritos é necessário que para a síntese de dsRNA seja escolhida uma região pouco conservada entre membros de uma mesma família proteica. Visto que o transcrito de Smp38 possui 1.020 pb e que cada dsRNA sintetizado deveria ter entre 400-500 pb, foi inevitável

que a composição do dsRNA não refletisse parte do domínio catalítico altamente conservado entre proteína quinases eucarióticas da família MAPK.

Sabemos que o quinoma do *S. mansoni* possui oito representantes da família MAPK (Andrade, Nahum et al. 2011), e três destes foram caracterizados experimentalmente por membros do nosso grupo, a saber: SmERK-1 (Smp_047900), SmERK-2 (Smp_142050) e SmJNK (Smp_172240) (Andrade 2013). Ademais, estudos que remontam à história evolutiva das MAPKs do *S. mansoni* evidenciam que JNK e p38 sejam grupos irmãos (Gava 2013) reforçando a similaridade no nível da sequência de aminoácidos desses representantes e fortalecendo a nossa suspeita de que o silenciamento gênico de Smp38 poderia estar produzindo *off-targets*. Sendo assim, partimos para a amplificação dos transcritos de SmERK-1, SmERK-2 e SmJNK em amostras silenciadas para Smp38 (quatro dias após exposição ao dsRNA). Para a nossa plena satisfação, os níveis de transcritos desses genes não foram reduzidos e, desta forma, nos sentimos confiantes para prosseguir com os nossos estudos (Figura 12).

Interessantemente, parasitos tratados com dsRNA para Smp38 apresentaram uma superexpressão gênica de SmERK-1, SmERK-2 e SmJNK, comparado com os esquistossômulos tratados com mCherry-dsRNA (Figura 12). Esse fato é ainda reforçado por Henklova e colaboradores (Henklova, Vrzal et al. 2008) que ao utilizar células de hepatócitos de humanos, demonstraram *in vitro* que a ativação das proteínas ERK e JNK é decorrente da inibição da atividade de p38. Para nos certificarmos que não era artifício de técnica, amplificamos SmERK-1, SmERK-2 e SmJNK em amostras com outro tratamento e estas apresentaram um nível normal do transcrito (resultados não mostrados).

Sabemos que proteínas da família MAPK são transdutoras do sinal que controla múltiplos processos celulares essenciais para o desenvolvimento de um organismo, incluindo crescimento celular, proliferação, diferenciação, apoptose, estresse oxidativo e imunidade inata (Seger and Krebs 1995). A inibição da expressão gênica de Smp38 interrompe a transdução do sinal ativador de fatores de transcrição que controlam tais processos celulares, causando grandes prejuízos ao parasito. Não obstante, concluímos que a superexpressão de SmERK-1, SmERK-2 e SmJNK representa uma medida compensatória adotada pelo parasito para suplantar a função perdida após o silenciamento de Smp38.

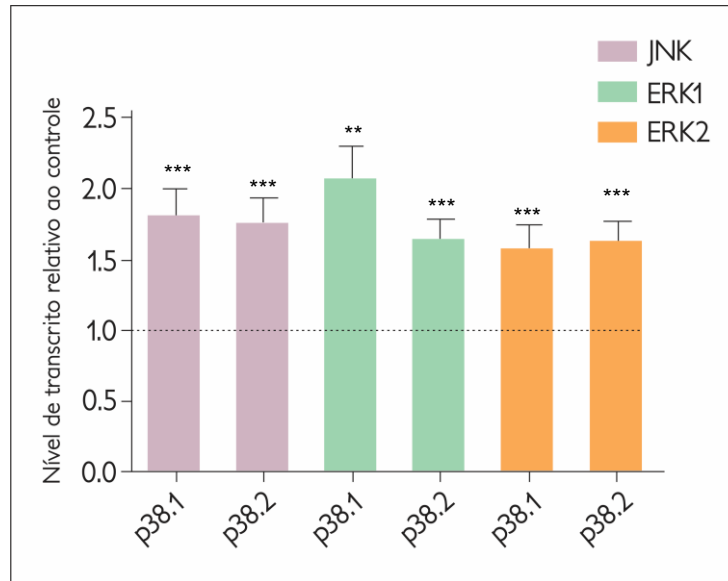


Figura 12: Nível de transcritos de MAPKs em amostras silenciadas. Os níveis de transcritos de SmERK-1, SmERK-2 e SmJNK foram acessados em amostras silenciadas para Smp38 após tratamento com p38.1-dsRNA e p38.2-dsRNA durante quatro dias. Os níveis de transcritos foram comparados àqueles dos parasitos tratados com mCherry-dsRNA (controle). Os resultados foram analisados pelo método $\Delta\Delta\text{CT}$ seguido do teste de Mann-Whitney (*Wilcoxon sum of ranks*); $P < 0.05$; $N = 3$, alterações significativas nos níveis de transcritos são mostradas com asteriscos (*). A linha pontilhada representa o nível normalizado de transcritos na população controle (mCherry-dsRNA). As barras representam o erro padrão entre os experimentos.

4.4 Papel biológico de Smp38 frente ao sistema imune do hospedeiro

A pergunta motivadora que nos direcionou para os testes *in vivo* foi: Esquistossômulos expostos ao sistema imune do hospedeiro definitivo após supressão da expressão gênica ou inibição da atividade enzimática de Smp38 se desenvolvem em vermes adultos viáveis? Ansiosos pela resposta, traçamos duas estratégias distintas: 1. infectar camundongos com esquistossômulos silenciados para a expressão gênica de Smp38; 2. infectar camundongos com esquistossômulos expostos à SB 203580, um inibidor da atividade de p38 MAPK que compete pelo sítio de ligação à ATP, altamente potente e específico (Kumar, Jiang et al. 1999). Por conseguinte, para ambas as estratégias foi possível observar o desenvolvimento do parasito de forma similar à infecção natural.

Para alcançar os objetivos idealizados em nossa primeira estratégia, 2.000 esquistossômulos foram novamente expostos à dsRNA para p38.1, p38.2 e mCherry e após quatro dias (tempo em que a redução no nível de transcritos foi similar para p38.1 e p38.2), 300 esquistossômulos foram injetados em camundongos. Para garantir que o silenciamento foi eficaz nessas amostras, os esquistossômulos remanescentes foram utilizados para extração do RNA total, seguido de síntese de cDNA e RT-qPCR. A análise por RT-qPCR confirmou uma redução significativa no nível de transcritos, como esperado, o que nos leva a confiar que qualquer fenótipo observado nos ensaios *in vivo* são efeitos decorrentes do silenciamento (Figura 13). Portanto, 40 dias após a infecção, realizamos a perfusão dos camundongos para recuperação e contagem dos vermes adultos e também excisamos os fígados, que foram digeridos para a recuperação e contagem dos ovos.

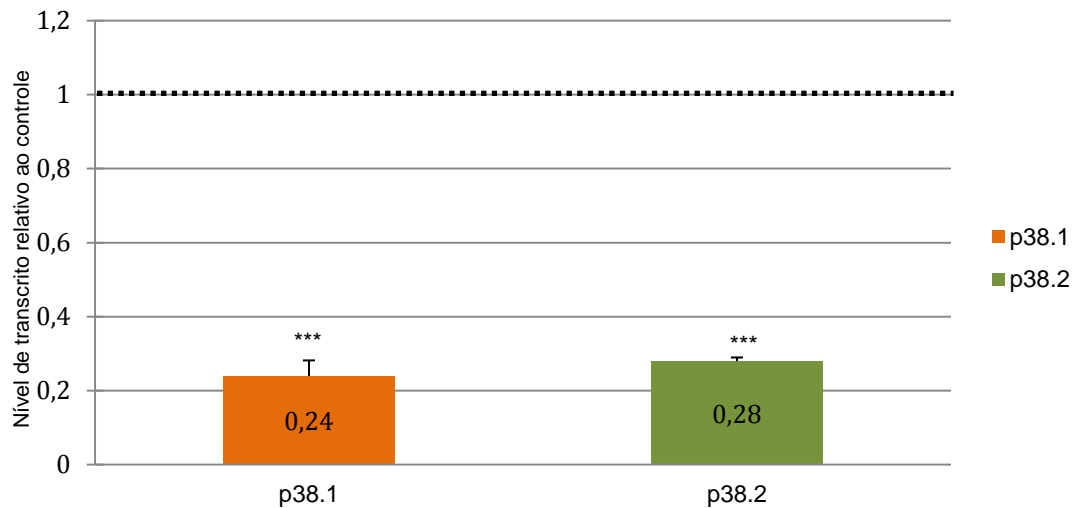


Figura 13: Níveis de transcritos de Smp38 pré-infecção dos camundongos. Representação dos níveis de transcritos de p38.1 e p38.2 em relação ao controle (mCherry-dsRNA) após tratamento com dsRNA durante quatro dias. Os resultados foram analisados pelo método $\Delta\Delta\text{CT}$ seguido do teste de Mann-Whitney (*Wilcoxon sum of ranks*); $P < 0.05$; $N = 3$, decréscimos significativos nos níveis de transcritos são mostrados com asteriscos (*). A linha pontilhada representa o nível normalizado de transcritos na população controle (mCherry-dsRNA). As barras representam o erro padrão entre os experimentos e os valores no interior das colunas representam os níveis de transcritos quantificados.

O número de vermes adultos e ovos provenientes do desenvolvimento de esquistossômulos silenciados diminuí significativamente quando comparamos com o nosso grupo controle inespecífico (esquistossômulos expostos à mCherry-dsRNA) (Figura 14 e 15). Em relação ao número de vermes houve uma redução de **46%** para p38.1 e **67%** para p38.2 e em relação à postura de ovos observamos uma redução de **55%** para p38.1 e **85%** para p38.2. Não houve significância estatística entre os grupos mCherry e controle negativo (resultado não mostrado). A diminuição no número de vermes e ovos nos deixou bastante entusiasmados, pois era evidente que Smp38 afetava ambas ou pelo menos uma das duas principais características para a reprodução do parasito: desenvolvimento e sobrevivência. Mais ainda, foi demonstrado que o silenciamento de SmJNK (Andrade 2013), uma MAPK filogeneticamente relacionada à p38 (Gava 2013) também reduz o número de vermes produzidos pelo parasito, reforçando o papel das MAPKs no desenvolvimento e/ou sobrevivência do *S. mansoni*.

Nossos resultados são ainda apoiados por semelhanças encontradas em outros organismos, como por exemplo, mamíferos em que p38 atua como mediadora da

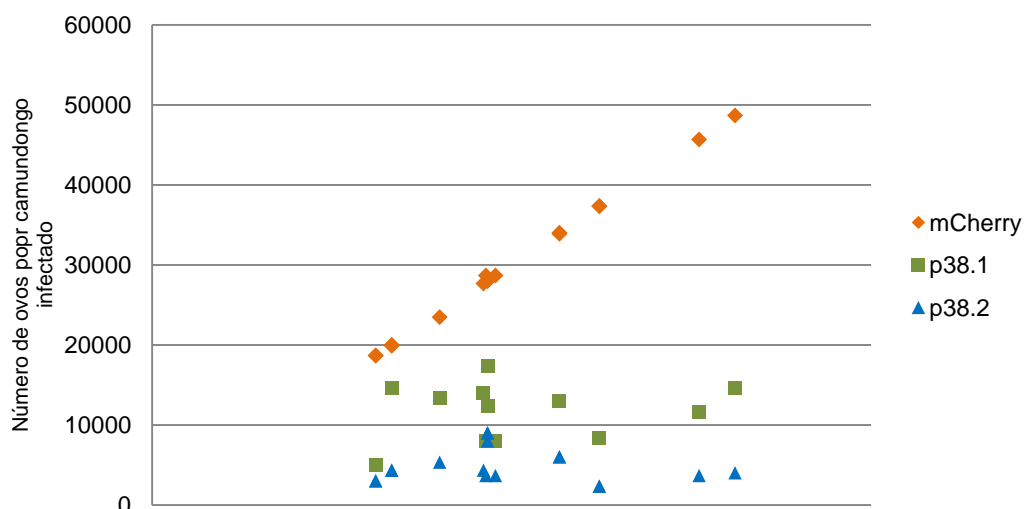


Figura 15: Número de ovos recuperados pós-silenciamento. O gráfico ilustra o número de ovos obtidos do fígado de camundongos infectados com esquistossômulos silenciados em relação ao controle inespecífico mCherry. Representação de três experimentos analisados pelo teste de Mann-Whitney (*Wilcoxon sum of ranks*). Os símbolos representam o número de ovos recuperados nos fígados para cada camundongo em seu respectivo grupo. Ambos os tratamentos alcançaram significância estatística quando comparados ao controle (p38.1 *versus* mCherry: $p < 0.001$; p38.2 *versus* mCherry: $p < 0.001$). A mediana do número de ovos total para cada grupo experimental foi: mCherry: **28.000**; p38.1: **12.670**; p38.2: **4.165**.

Como mencionado anteriormente, a absorção de dsRNA em uma população não é uniforme e, por um momento, pensamos que os vermes remanescentes poderiam ser provenientes de esquistossômulos cujo o silenciamento não foi efetivo. Surpreendentemente, quando acessamos os níveis de transcrito de Smp38 nos vermes adultos, constatamos que o silenciamento gênico permanecia efetivo, rejeitando a nossa hipótese inicial de que os vermes remanescentes seriam uma população de parasitos não silenciados (Figura 16).

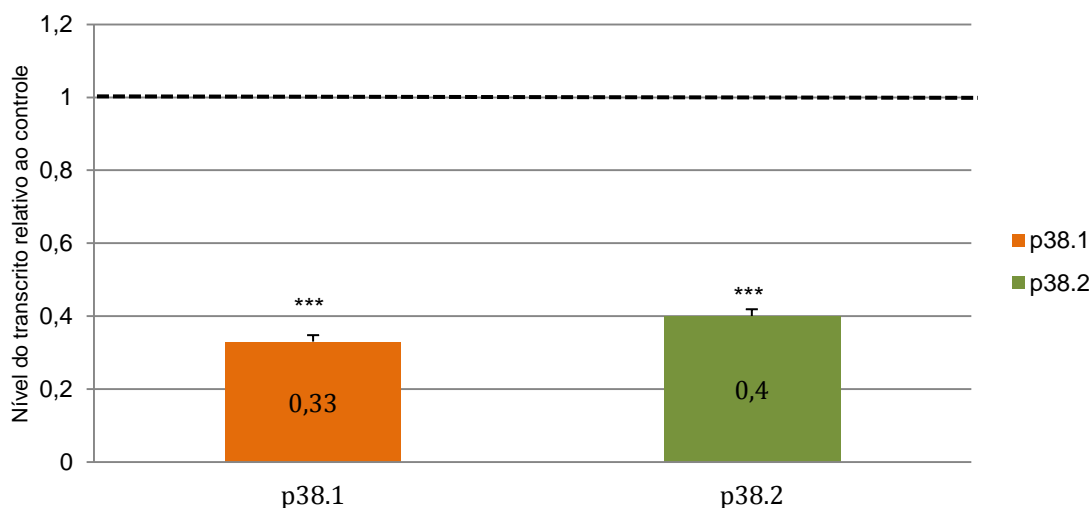


Figura 16: Nível de transcritos de Smp38 em vermes adultos. Os níveis de transcritos de Smp38 foram acessados em vermes adultos recuperados após infecção com esquistossômulos silenciados. Os níveis de transcritos foram comparados àqueles dos parasitos tratados com mCherry-dsRNA (controle inespecífico). Os resultados foram analisados pelo método $\Delta\Delta\text{CT}$ seguido do teste de Mann-Whitney (*Wilcoxon sum of ranks*); $P < 0.05$; $N = 3$, decréscimos significativos nos níveis de transcritos são mostrados com asteriscos (*). A linha pontilhada representa o nível normalizado de transcritos na população controle (mCherry-dsRNA). As barras representam o erro padrão entre os experimentos e os valores no interior das colunas representam os níveis de transcritos quantificados.

As análises morfológicas dos vermes adultos silenciados iluminaram a nossa idéia de que Smp38 é essencial para o desenvolvimento e sobrevivência do *S. mansoni*. Por microscopia ótica, vermes fêmeas apresentaram uma redução na densidade de células vitelínicas das glândulas vitelogênicas e vermes machos expressaram baixa densidade de células germinativas dos lobos testiculares e baixa densidade de tubérculos tegumentares (Tabela 2).

Tabela 2: Morfologia dos vermes adultos observada pós-silenciamento.

Morfologia das fêmeas			
Estrutura	Grupos experimentais		
	Smp38-dsRNA	mCherry-dsRNA	Controle negativo
Glândulas vitelínicas	+	+++	+++
Eliminação de oócitos	P	P	P
Ovo	P	P	P
Espermateca	P	P	P
Espermatozóides	P	P	P

Morfologia dos machos			
Estrutura	Grupos experimentais		
	dsRNA-p38 MAPK	dsRNA-mCherry	Controle negativo
Células germinativas	+	+++	+++
Vesícula Seminal	P	P	P
Espermatozóides	P	P	P
Tubérculos	+	+++	+++

+++ : alta densidade, + : baixa densidade, P : presença.

As glândulas vitelogênicas ocupam dois terços posteriores do corpo das fêmeas. As células vitelínicas de cada folículo apresentam diferentes estágios do desenvolvimento, desde pequenas células sem glóbulos da casca até outras com grandes glóbulos, com material precursor para a casca do ovo (Mone and Boissier 2004). Portanto, a redução no número de ovos produzidos pelas fêmeas silenciadas está associada não somente à redução no número de fêmeas recuperadas mas também à baixa densidade de células vitelínicas destes parasitos. Nos machos, as células germinativas dos lobos testiculares se diferenciam em espermatozóides que serão transportados pelo vaso eferente que se reúne em um canal deferente, desembocando na vesícula seminal (Mone and Boissier 2004). Portanto, concluímos que a baixa densidade de células germinativas observada nos machos silenciados altera o número de espermatozóides viáveis à fecundação dos oócitos, reduzindo o número de ovos produzidos pelas fêmeas.

As análises morfométricas dos vermes adultos comparadas aos controles foram realizadas para a altura dos tubérculos, para o número de lobos testiculares e para as áreas do agrupamento testicular, do ovário e da vesícula seminal (Figura 17). Observamos uma diferença significativa na altura dos tubérculos dos machos silenciados em comparação com os vermes do grupo controle (vermes provenientes de esquistossômulos que não receberam nenhum tipo de tratamento), porém, quando comparamos àqueles do grupo mCherry não observamos nenhuma alteração significativa e portanto, esses resultados foram considerados inconsistentes (Figura 17). Ademais, quando comparados esses vermes aos controles não constatamos alterações no número de lobos, na área do agrupamento testicular e da vesícula seminal. Em relação às fêmeas, a maioria apresentou uma redução significativa na área dos ovários (Figura 17). Esse resultado é corroborado pelo observado em *D. melanogaster*, em que foi demonstrado que a deleção de p38 interfere no desenvolvimento do ovário (Suzanne, Irie et al. 1999).

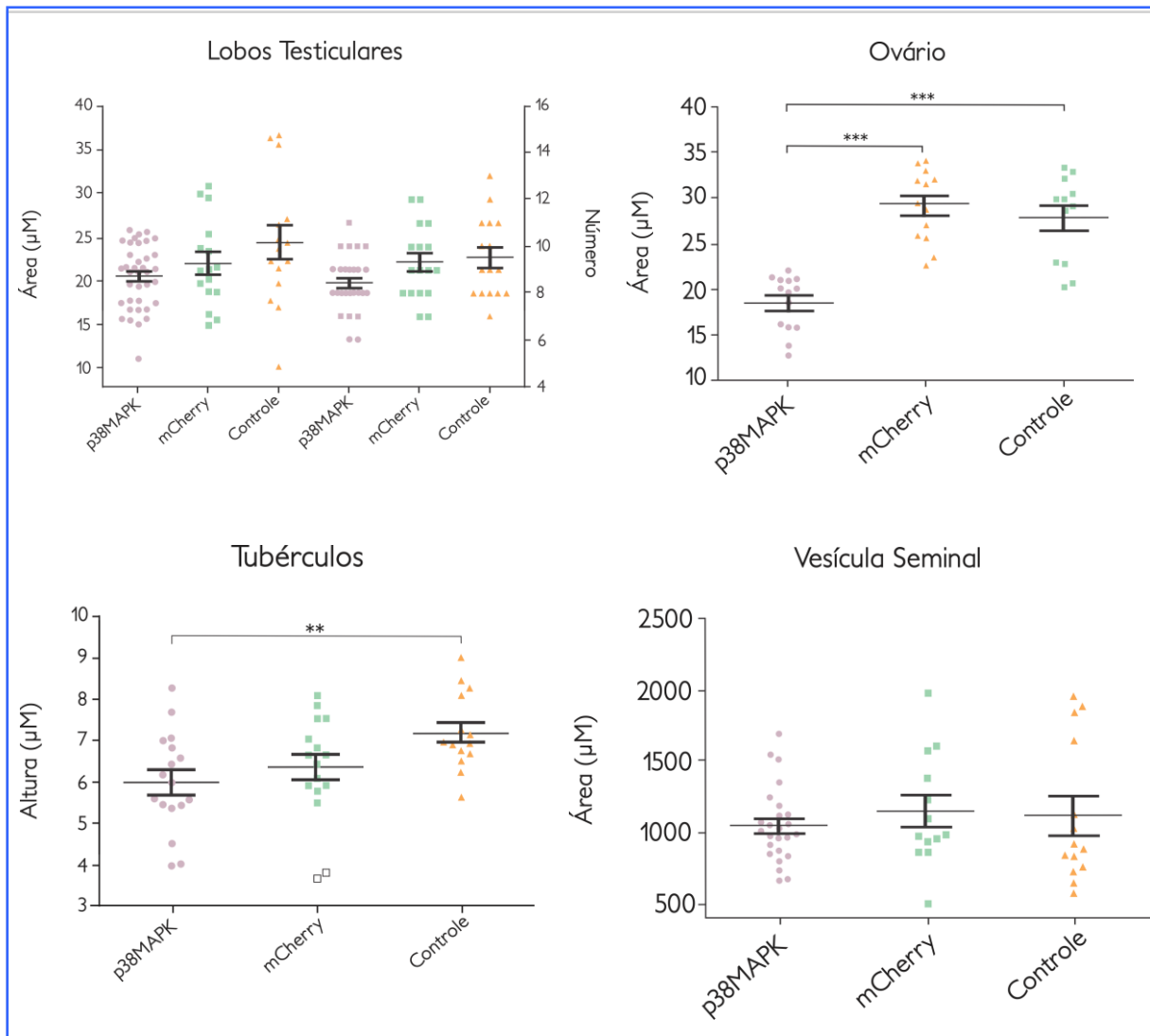


Figura 17: Análises morfométricas dos vermes adultos. A morfometria foi realizada para comparar algumas estruturas dos vermes adultos recuperados após infecção com esquistossômulos silenciados em relação às estruturas dos vermes dos grupos controles. Para tais análises avaliamos a altura dos tubérculos, o número dos lobos testiculares e as áreas do agrupamento testicular, da vesícula seminal e do ovário. Os símbolos representam um único verme para cada grupo experimental. Os dados foram tratados pelo teste de Mann-Whitney (*Wilcoxon sum of ranks*). Com asteriscos, estão as amostras que apresentaram significativa redução da área do ovário ou da altura dos tubérculos quando comparadas ao controle mCherry e/ou controle negativo (representado no gráfico apenas por "controle"). N=3. As barras pretas horizontais representam a mediana da área ou do número de tubérculos da população amostrada (** e *** indicam $p \leq 0.01$, e $p \leq 0.001$ respectivamente).

Imagens obtidas por microscopia confocal a *laser* nos concedeu uma análise qualitativa das alterações estruturais observadas nos vermes recuperados após infecção com esquistossômulos silenciados. Como já esperado, os machos dos nossos controles mCherry-dsRNA (Figura 18A) e negativo (Figura 18B) apresentam o tegumento íntegro, com tubérculos bem desenvolvidos e distribuídos regularmente na superfície dorsal do parasito. O curso da infecção é acompanhado pelo desenvolvimento de estruturas do sistema reprodutivo que asseguram a maturação sexual dos vermes. Quatro semanas após a infecção grande parte dos machos exibem o canal ginecóforo e o agrupamento testicular que, na maioria das vezes, varia entre oito a dez lobos (Neves, Costa-Silva et al. 2003). Esse perfil também foi observado em nossos controles, que possuem o agrupamento testicular plenamente desenvolvido com células germinativas bem diferenciadas (Figura 18 A e B). Todavia, grande parte dos machos silenciados para Smp38 apresentaram irregularidades no agrupamento testicular e alterações na densidade e diferenciação das células germinativas (Figura 18C). Mais ainda, o tegumento desses parasitos apresentou irregularidades e baixa densidade de tubérculos (Figura 18 D). Os tubérculos do tegumento são protuberâncias com espinhos e estão associados à fixação dos machos (Van Hellemond, Retra et al. 2006). Sendo assim, acreditamos que o pequeno número de vermes adultos recuperados nos camundongos infectados com esquistossômulos silenciados seja um efeito da má formação do tegumento, impedindo que esses vermes se fixem às paredes do intestino, sendo levados pela corrente sanguínea.

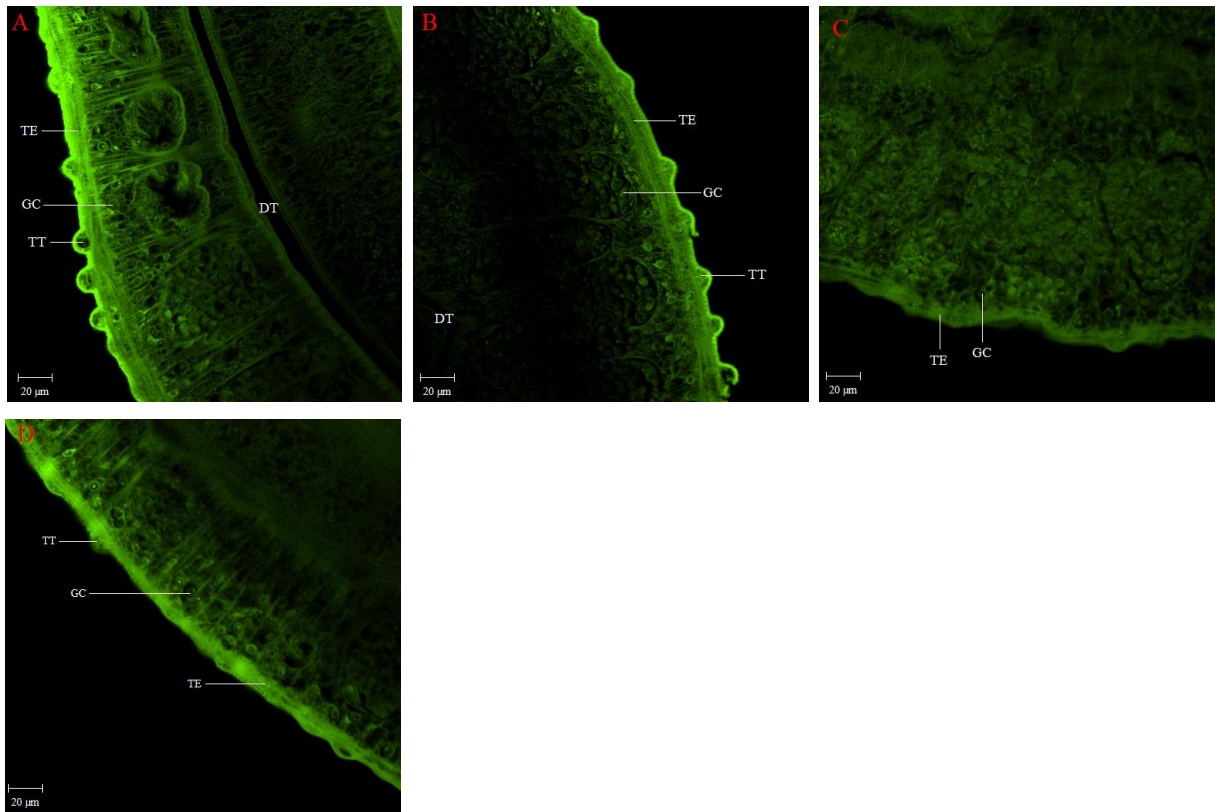


Figura 18: Microscopia confocal a laser de vermes machos. **A.** Vermes provenientes de esquistossômulos expostos à mCherry-dsRNA; **B.** Vermes provenientes de esquistossômulos não expostos à dsRNA; **C e D.** Vermes provenientes de esquistossômulos expostos à Smp38-dsRNA. As estruturas estão indicadas pelas seguintes letras: **DT:** tubo digestivo; **GC:** células germinativas; **TE:** tegumento; **TT:** tubérculos tegumentares. Para cada grupo experimental foram analisados seis vermes machos provenientes de três réplicas biológicas. Irregularidades no agrupamento testicular e alterações na densidade e diferenciação das células germinativas são amostradas em **C** e irregularidades e baixa densidade de tubérculos podem ser observadas em **D**.

Imagens por microscopia confocal a *laser* das fêmeas recuperadas estão amostradas na Figura 19. Vermes fêmeas com cinco semanas de desenvolvimento já produzem oócitos, possuem glândulas vitelínicas e espermateca completamente desenvolvidas com espermatozóides visíveis, a maioria possui um ovo situado no útero ou oótipo e o ovário possui diferenciação celular com células menores (imaturas) na região proximal e maiores (maduras) na região distal (Biolchini Cde, Neves et al. 2006). O tegumento das fêmeas é praticamente liso e caracterizado pela ausência de tubérculos (Skelly and Alan Wilson 2006). Todas essas características e estruturas foram observadas nas fêmeas dos grupos mCherry e controle negativo (Figura 19 A, B, C, D, E). Em contrapartida, as fêmeas silenciadas para Smp38 apresentaram irregularidades no tegumento, caracterizadas por profundas reentrâncias (Figura 19G e 19I). Apesar de termos encontrado ovo no oótipo (Figura 19I), para a maioria das fêmeas também observamos uma maior densidade de células imaturas no ovário (Figura 19G) e uma menor densidade de células vitelínicas (Figura 19H). As modificações observadas nas estruturas relacionadas ao aparelho reprodutor das fêmeas reforça ainda mais a consistência dos nossos resultados, uma vez que a redução da diferenciação celular em oócitos e da densidade de células vitelínicas favorecem à diminuição do número de ovos produzidos pelas fêmeas.

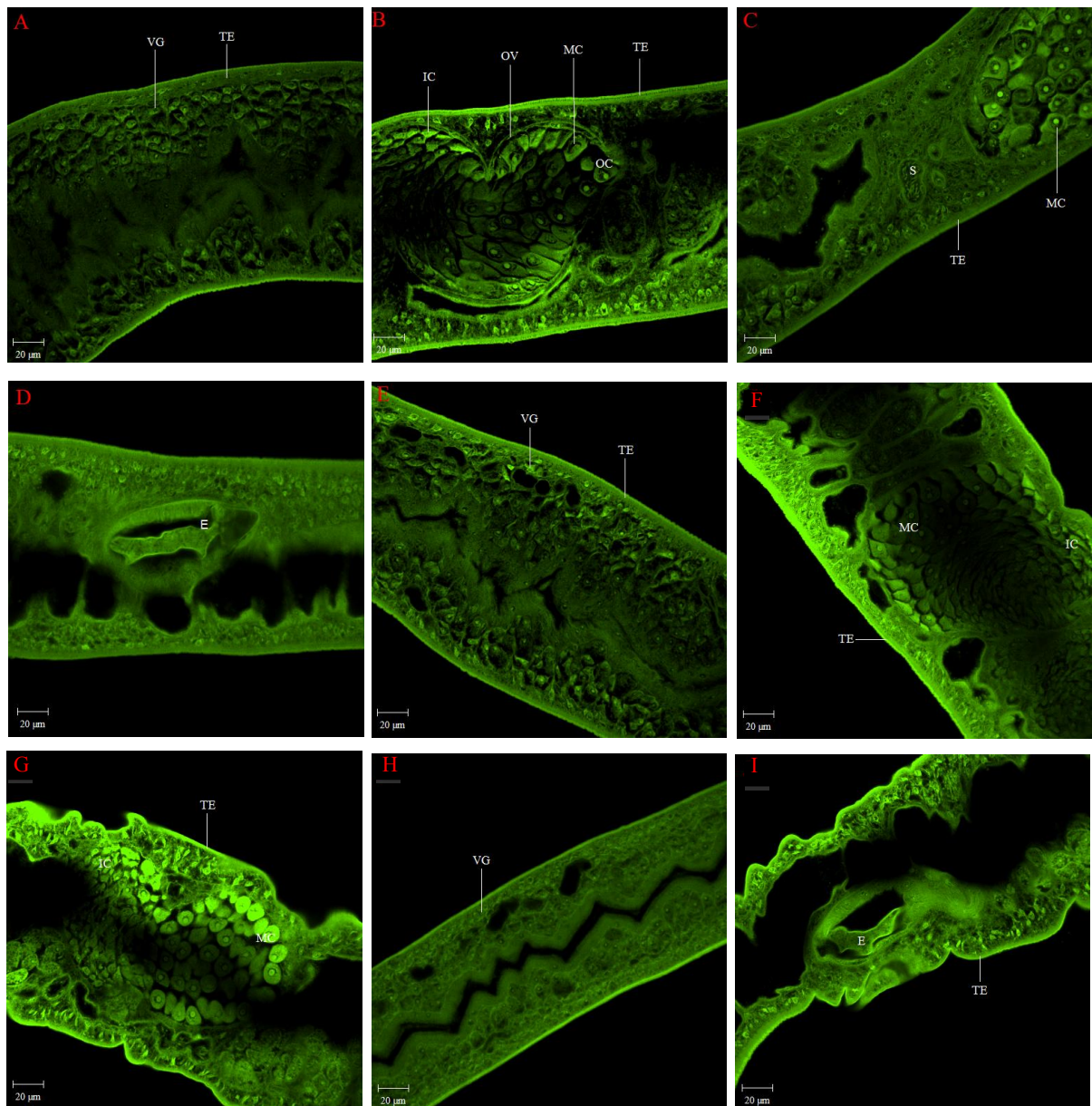


Figura 19: Microscopia confocal a laser de vermes adultos fêmeas. A, B e C. Vermes provenientes de esquistossômulos expostos à mCherry-dsRNA; **D, E e F.** Vermes provenientes de esquistossômulos não expostos à dsRNA; **G, H e I.** Vermes provenientes de esquistossômulos expostos à Smp38-dsRNA. As estruturas estão indicadas pelas seguintes letras: **E:** ovo no oótipo, **IC:** células imaturas, **MC:** células maduras; **OC:** oócito; **OV:** ovário; **S:** espermateca; **TE:** tegumento; **VG:** glândulas vitelínicas. Para cada grupo experimental foram analisados seis vermes fêmeas provenientes de três réplicas biológicas. Irregularidades no tegumento caracterizadas por profundas reentrâncias são amostradas em **G** e **I**, maior densidade de células imaturas no ovário pode ser observada em **G** e menor densidade de células vitelínicas em **I**.

Até o presente momento, estávamos diante do seguinte cenário: 1. o silenciamento de Smp38 foi satisfatório, 2. o efeito do silenciamento causa uma diminuição significativa no número de vermes recuperados e no número de ovos produzidos pelas fêmeas; 3. o silenciamento é transmitido de esquistossômulos para vermes adultos; e por fim, 4. os vermes adultos machos e fêmeas silenciados apresentam alterações no tegumento e em estruturas do aparelho reprodutor. Estávamos intrigados com a drástica redução na produção de ovos pelas fêmeas e, mais ainda, ao contabilizarmos o número de vermes maduros recuperados em cada infecção, observamos a ocorrência de fêmeas imaturas, o que não é comum após 40 dias de infecção. Logo, nos motivamos a responder três perguntas que nos auxiliaria no melhor entendimento do desenvolvimento do parasito: 1. O silenciamento de Smp38 interfere na maturação sexual das fêmeas e conseqüentemente no número de ovos produzidos? 2. O silenciamento de Smp38 interfere na maturação desses ovos? 3. Os ovos produzidos pelas fêmeas silenciadas são viáveis?

Para responder nossa primeira pergunta avaliamos a cinética da maturação dos vermes provenientes da infecção com esquistossômulos silenciados. Nesse experimento utilizamos cinco camundongos para cada um dos quatro grupos experimentais, a saber: p38.1, p38.2, mCherry e branco (controle negativo). Os camundongos foram sacrificados em diferentes tempos, sendo 17 e 40 dias após a infecção. A nossa hipótese era que se o silenciamento estivesse interferindo na maturação sexual, após 17 dias de infecção a maioria dos vermes recuperados estariam nos primeiros estágios do desenvolvimento e após 40 dias de infecção grande parte dos vermes não teriam alcançado a maturação sexual.

Uma das formas de acessar a cinética da maturação é através do schistograma, que consiste em contar e classificar os parasitos recuperados em seis estágios do desenvolvimento com auxílio de microscópio estereoscópio. Critérios morfológicos são usados para classificar o parasito em relação ao seu estágio, sendo estes baseados no desenvolvimento do intestino após a ingestão de sangue (Silva-Leitao, Biolchini et al. 2009). A classificação segue os seguintes critérios: esquistossômulos de primeiro estágio são de curta duração e representados pelos parasitos recém chegados dos pulmões, apresentam somente uma mancha escura referente ao início do ceco; no segundo estágio a mancha escura se bifurca de modo que não ultrapassa o acetábulo; no terceiro estágio a mancha bifurcada ultrapassa o acetábulo formando uma estrutura arredondada; no quarto e quinto estágio há uma extensão da mancha bifurcada de modo que não ultrapasse o ceco; e no sexto e último estágio encontramos adultos jovens e maduros com o ceco completamente desenvolvido (Barbosa, Pellegrino et al. 1978).

Ao analisarmos a cinética da maturação dos vermes silenciados após 17 dias de infecção, verificamos que em todos os grupos experimentais havia parasitos do primeiro ao

quarto estágio do desenvolvimento e que todos aqueles recuperados após 40 dias, alcançaram a maturação sexual (Figura 20). É interessante notar que apesar de todos os vermes terem alcançado a maturação sexual após 40 dias de infecção, o número de vermes recuperados para p38. 1 e p38.2 foi menor em relação aos controles, corroborando resultados já mostrados anteriormente.

Ademais, concluímos que o silenciamento de Smp38 não interfere na maturação sexual do *S. mansoni* mas muito provavelmente está relacionado ao desenvolvimento dos órgãos reprodutores e/ou no acasalamento dos parasitos. Em *C. elegans*, o nocaute de p38 (pmk-2) interfere no desenvolvimento da vulva e dos oócitos e, conseqüentemente, interrompe a postura de ovos (Berman, McKay et al. 2001).

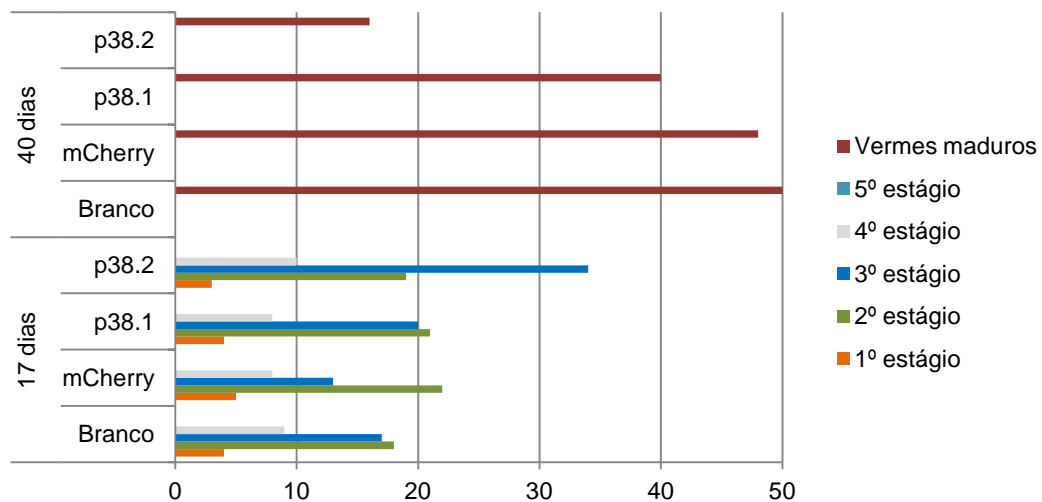


Figura 20: Cinética da maturação dos vermes pós-silenciamento. Os vermes foram recuperados de camundongos após 17 e 40 dias de infecção com esquistossômulos silenciados. Nesse experimento utilizamos cinco camundongos para cada um dos quatro grupos experimentais, sendo estes: p38.1, p38.2, mCherry e branco (controle negativo). Os camundongos foram sacrificados em diferentes tempos, sendo 17 e 40 dias após a infecção. Os valores representados na linha horizontal representam o número de vermes recuperados em cada grupo experimental de acordo com o estágio do desenvolvimento e com o tempo de infecção.

Retomando nosso segundo questionamento, gostaríamos de saber se o silenciamento de Smp38 interfere no processo de maturação dos ovos. Para tal, foi realizado o oograma intestinal com o objetivo de avaliar o processo de maturação dos ovos neste tecido. O processo consistiu da ressecção de 1 cm² da porção intermediária do íleo, com posterior corte longitudinal, seguida de compressão deste fragmento de tecido entre duas lâminas de microscopia. As lâminas são levadas ao microscópio para quantificação dos estágios de maturação dos ovos presentes no fragmento do intestino. Os ovos foram classificados de acordo com o trabalho de Prata (Prata 1957) em ovos imaturos, maduros e mortos. Os ovos imaturos compreendem os quatro primeiros estágios do desenvolvimento, os ovos maduros são caracterizados pelo desenvolvimento completo dos miracídios e os ovos mortos são divididos em cascas, ovos escuros, semitransparentes e granuloso. Todos os estágios dos ovos imaturos e os tipos de ovos mortos foram contabilizados. Entretanto, para facilitar a demonstração, serão expressos apenas o total de ovos imaturos, maduros e mortos.

A nossa hipótese era que se o silenciamento interferisse na maturação dos ovos, uma porcentagem maior seria representada por ovos imaturos ou mortos quando comparamos aos ovos das fêmeas dos nossos controles. Para nossa plena satisfação, grande parte dos ovos das fêmeas silenciadas permanecem nos estágios imaturos ou morrem antes de atingirem o estágio maduro (Figura 21). Diante deste cenário, não nos resta dúvidas de que Smp38 também é essencial para a maturação dos ovos do *S. mansoni*, portanto capaz de interromper o ciclo biológico deste parasito, e por conseguinte, figuraria na lista de potenciais alvos de drogas.

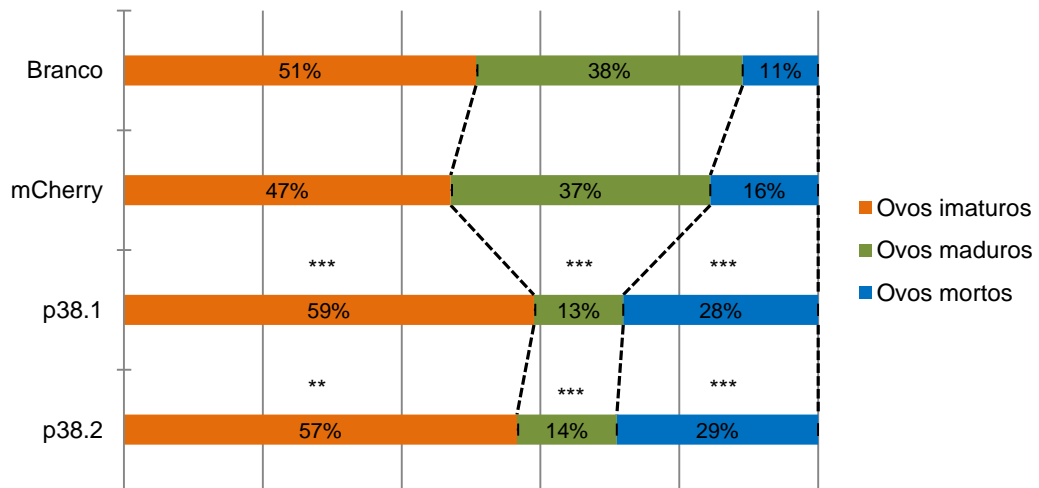


Figura 21: Cinética da maturação dos ovos pós-silenciamento. O gráfico ilustra a porcentagem de ovos imaturos, maduros e mortos, presentes na porção intermediária do íleo de camundongos infectados com esquistossômulos silenciados e não silenciados. As análises foram realizadas por amostragem (100 ovos/fragmento do intestino/camundongo) e os dados foram tratados pelo teste de Mann-Whitney (*Wilcoxon sum of ranks*). Com asteriscos, estão as amostras que apresentaram uma redução significativa de ovos para cada estágio do desenvolvimento quando comparamos aos controles mCherry e branco (controle negativo). N=3. Os valores no interior das colunas representam a porcentagem em relação ao número total de ovos para cada grupo experimental nos diferentes estágios do desenvolvimento. (** e *** indicam $p \leq 0.01$, e $p \leq 0.001$ respectivamente). As barras representam o erro padrão entre os experimentos.

Através do oograma constatamos que em média 13,5% dos ovos das fêmeas silenciadas atingem a maturação. Retomando nossa última pergunta: Os ovos maduros produzidos pelas fêmeas silenciadas são viáveis? Neste experimento, utilizamos novamente uma população de esquistossômulos silenciados para infectar cinco camundongos para cada grupo experimental, sendo estes: p38.1, p38.2, mCherry e branco (controle negativo). Após 40 dias de infecção, o fígado de cada um dos camundongos foi retirado e processado individualmente para obtenção dos ovos. Após à eclosão, 200 miracídios provenientes dos ovos recuperados do fígado de um único camundongo foram expostos à 20 caramujos da espécie *B. glabrata*. Trinta dias após a exposição aos miracídios, os caramujos foram expostos à luz artificial por 1 hora, para verificar a positividade, ou seja, a liberação de cercárias. Após 30 dias de exposição aos miracídios, verificamos que praticamente todos os caramujos sobreviventes de cada grupo estavam liberando cercárias e, portanto, positivos para a infecção, o que nos permite afirmar que os ovos das fêmeas silenciadas que se

tornavam maduros são plenamente viáveis (Figura 22). Uma vez que nossa hipótese foi rejeitada, pois esperávamos que os ovos das fêmeas sensíveis ao silenciamento não dessem continuidade ao ciclo biológico do *S. mansoni*, nosso próximo passo foi avaliar se o silenciamento de Smp38 permanecia efetivo na mesma população de miracídios utilizada na infecção dos caramujos. Para isso, extraímos o RNA total dos miracídios eclodidos remanescentes, sintetizamos o cDNA e realizamos a reação de PCR em tempo real para quantificarmos os níveis do transcrito de Smp38. Corroborando nossa hipótese, observamos que a transcrição de Smp38 nesses miracídios havia se normalizado (Figura 23). Portanto, concluímos que o silenciamento de Smp38 em esquistossômulos é transmitido para os vermes adultos, interferindo na maturação dos ovos, porém é perdido nos miracídios e não causa efeito algum na viabilidade dos ovos. Entretanto, é imprescindível lembrar que alguns esquistossômulos podem ter escapado ao silenciamento e que os ovos maduros podem ser produto das fêmeas não sensíveis ao silenciamento. Alguns trabalhos mostram o sucesso do silenciamento gênico *in vitro* de ovos do *S. mansoni* (Rinaldi, Morales et al. 2009) e é essa poderia ser uma alternativa mais assertiva para associarmos o silenciamento de Smp38 à viabilidade dos ovos do parasito.

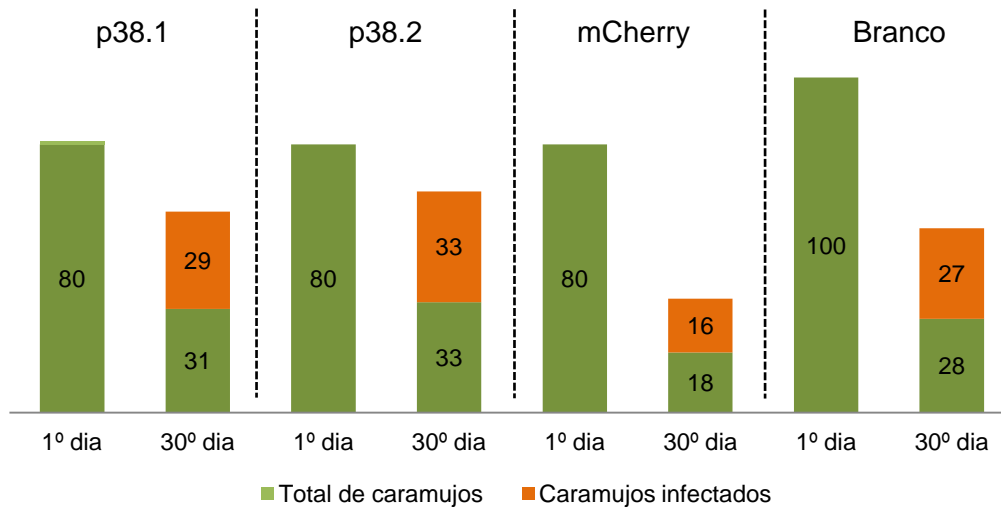


Figura 22: Avaliação da viabilidade dos miracídios pós-silenciamento. Representação do número de caramujos expostos aos miracídios e do número de caramujos sobreviventes e infectados após exposição. Cinco camundongos foram infectados com esquistossômulos silenciados ou não silenciados de acordo com o grupo experimental. Cerca de 200 miracídios eclodidos dos ovos recuperados dos fígados de cada camundongo foram expostos à 20 caramujos, totalizando uma população inicial formada por 100 caramujos, exceto para p38.1, p38.2 e mCherry, nestes grupos trabalhamos com quatro fígados, uma vez que um camundongo de cada grupo não resistiu à infecção. Após 30 dias de exposição aos miracídios, verificamos que praticamente todos os caramujos sobreviventes de cada grupo estavam liberando cercárias e, portanto, positivos para a infecção.

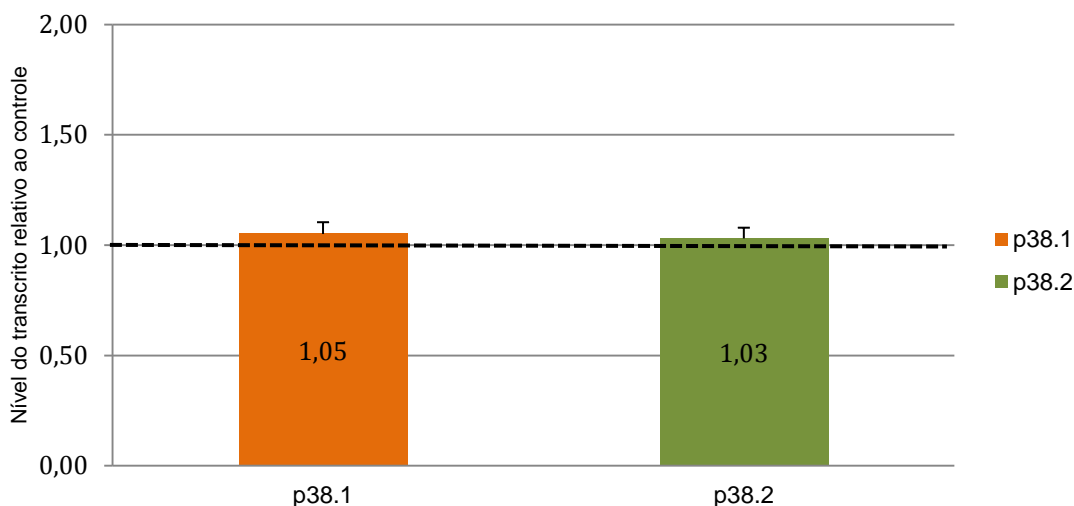


Figura 23: Nível de transcritos de Smp38 em miracídios. Os níveis de Smp38 foram acessados em miracídios eclodidos de ovos extraídos dos fígados de camundongos infectados com esquistossômulos silenciados. Os níveis de transcritos foram comparados àqueles da população exposta à mCherry-dsRNA (controle). Os resultados foram analisados pelo método $\Delta\Delta\text{CT}$ seguido do teste de Mann-Whitney (*Wilcoxon sum of ranks*). N=3. A linha pontilhada representa o nível normalizado de transcritos na população controle (mCherry-dsRNA). As barras representam o erro padrão entre os experimentos e os valores no interior das colunas representam os níveis de transcritos quantificados.

Retomando uma das nossas primeiras idéias, também gostaríamos de saber se a infecção de camundongos com esquistossômulos expostos à SB 203580, um inibidor da atividade de p38 MAPK, seria capaz de bloquear e/ou interferir no desenvolvimento do ciclo biológico do *S. mansoni*. A concentração de uso de 15 μM foi escolhida após a realização de uma curva de mortalidade utilizando diversas concentrações do inibidor em populações formadas por 100 esquistossômulos de estágio tegumentar (Figura 24). Após 24 horas de exposição ao inibidor foi adicionado às populações de esquistossômulos 5 $\mu\text{g/ml}$ de iodeto de propídio e parasitos totalmente corados foram contabilizados e considerados mortos.

Para os testes *in vivo*, camundongos foram infectados com 300 esquistossômulos de estágio tegumentar após 12 horas de exposição à 15 μM do inibidor. Uma vez que o inibidor foi dissolvido em DMSO, era necessário certificar que a mortalidade ocorreu pela intolerância ao inibidor e não pela toxicidade do DMSO. Portanto, neste experimento trabalhamos com dois controles, sendo estes: esquistossômulos expostos à 0,02% v/v de DMSO e esquistossômulos sem qualquer tipo de tratamento.

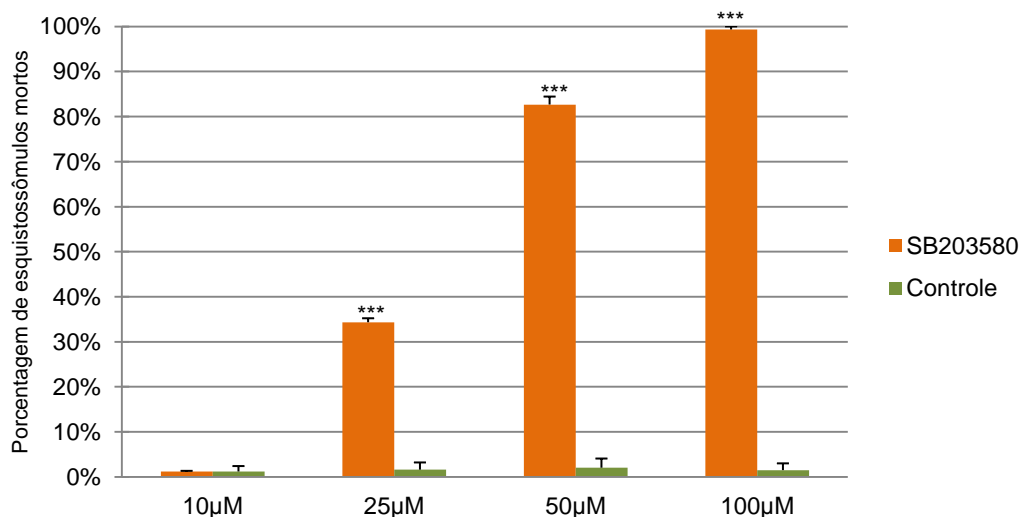


Figura 24: Curva de sobrevivência dos esquistossômulos pós-SB 203580. O gráfico ilustra a porcentagem da mortalidade de esquistossômulos tegumentares expostos à diferentes concentrações de SB 203580. Esquistossômulos foram expostos a 10µM, 25µM, 50µM e 100µM de SB 203580 e sua viabilidade avaliada após 24 horas. O controle corresponde aos parasitos expostos à 0,02% v/v de DMSO de acordo com a concentração do inibidor testada. A significância foi analisada por One-way ANOVA e os resultados significativos foram tratados pelo teste de Bonferroni. (significância (***) $p < 0,001$, $N=3$). As barras representam o erro padrão entre os experimentos.

Após 40 dias de infecção, realizamos a perfusão dos camundongos para recuperação e contagem dos vermes adultos e também excisamos os fígados, que foram digeridos para a recuperação e contagem dos ovos. O número de vermes adultos e ovos provenientes do desenvolvimento de esquistossômulos expostos ao inibidor diminuiu significativamente quando comparamos com o nosso grupo controle (DMSO) (Figura 25 e 26). Em relação ao número de vermes houve uma redução de **64%** e em relação à postura de ovos observamos uma redução de **84%**. Não houve significância estatística entre os grupos DMSO e controle negativo (resultado não mostrado). Este resultado nos permite afirmar que a inibição da atividade enzimática de Smp38 em esquistossômulos expostos ao sistema imune do hospedeiro também interfere no desenvolvimento e/ou sobrevivência do *S. mansoni*. Mais ainda, resultados similares foram observados tanto para os ensaios de inibição farmacológica como para os ensaios de silenciamento, o que nos deixa muito confortáveis para reafirmar que os fenótipos encontrados não são efeitos de *off-target*.

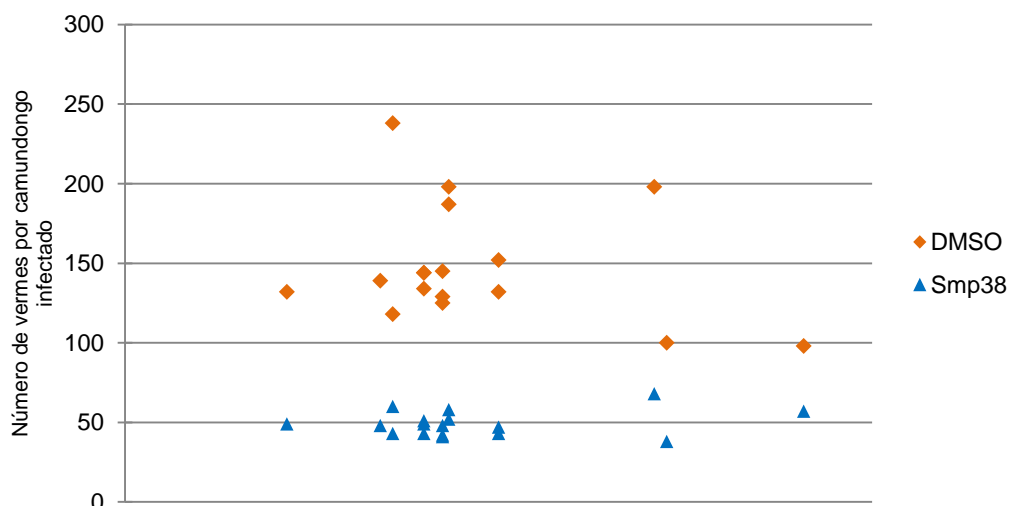


Figura 25: Número de vermes adultos recuperados pós-SB 203580. O gráfico ilustra o número de vermes adultos obtidos após perfusão de camundongos infectados com esquistossômulos expostos à 15 μ M do inibidor por 12 horas, em comparação ao número de vermes do grupo controle (DMSO). Representação de três experimentos analisados pelo teste de Mann-Whitney (*Wilcoxon sum of ranks*). Os símbolos representam o número de vermes recuperados para cada camundongo em seu respectivo grupo. O tratamento alcançou significância estatística quando comparado ao controle DMSO (Smp38 versus DMSO: $p < 0.001$). A mediana do número de vermes total para cada grupo experimental foi: DMSO: **136,5**; Smp38: **58**.

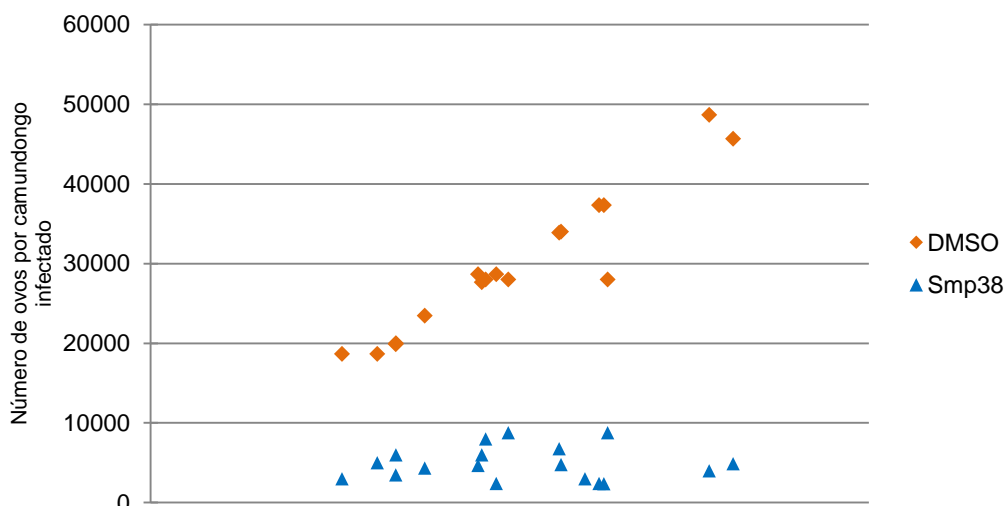


Figura 26: Número de ovos recuperados pós-SB 203580. O gráfico ilustra o número de ovos obtidos dos fígados de camundongos infectados com esquistossômulos expostos à 15µM do inibidor por 12 horas, em comparação ao número de ovos do grupo controle (DMSO). Representação de três experimentos analisados pelo teste de Mann-Whitney (*Wilcoxon sum of ranks*). Os símbolos representam o número de ovos recuperados nos fígados para cada camundongo em seu respectivo grupo. O tratamento alcançou significância estatística quando comparado ao controle DMSO (Smp38 *versus* DMSO: $p < 0.001$). A mediana do número de ovos total para cada grupo experimental foi: DMSO: **29.370**; Smp38: **4.713**.

Como havíamos monitorado a letalidade de SB 203580 para os esquistossômulos apenas por 24 horas, não sabíamos se a redução no número de vermes após infecção com esquistossômulos era consequência da letalidade do inibidor à estes parasitos. Portanto, realizamos uma curva de mortalidade dos esquistossômulos expostos à 15µM do inibidor durante sete dias (Figura 27), pois acreditávamos que se os esquistossômulos fossem resistentes ao inibidor durante este período, estariam aptos para migrarem para o sistema porta-hepático dos camundongos e atingirem a maturação sexual. Como resultado, observamos que a exposição dos esquistossômulos à 15µM de SB 203580 durante sete dias não altera a viabilidade destes parasitos e portanto, podíamos confiar nos resultados dos testes *in vivo* realizados anteriormente.

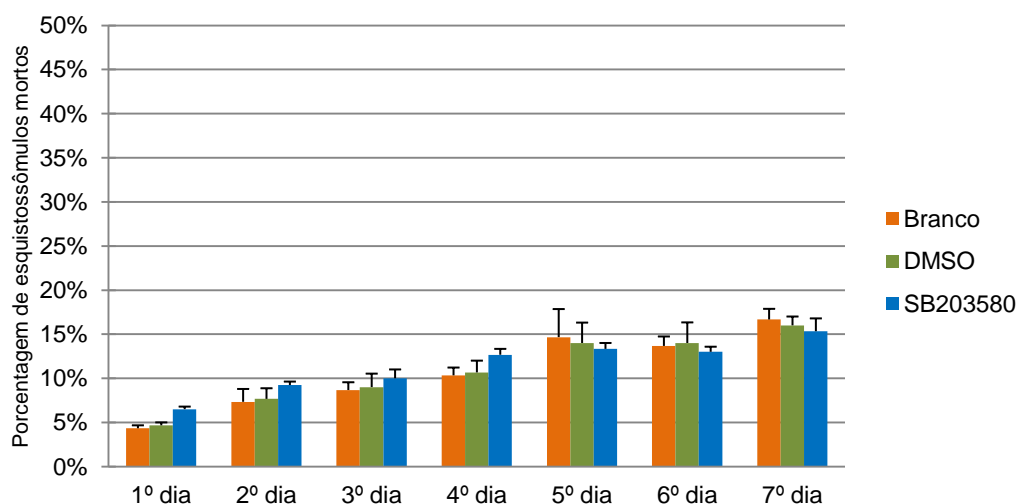


Figura 27: Mortalidade dos parasitos pós-SB 203580 durante sete dias. Esquistossômulos foram expostos à 15µM de SB 203580 e sua viabilidade avaliada a cada dia durante sete dias. “DMSO” corresponde aos parasitos expostos à 0,02% v/v de DMSO e “Branco” representa a população de esquistossômulos que não recebeu nenhum tipo de tratamento. Os dados foram tratados pelo teste One-way ANOVA, N=3. As barras representam o erro padrão entre os experimentos.

4.5 Papel biológico de Smp38 frente ao estresse oxidativo

Durante a infecção pelo *S. mansoni* as células do sistema imune do hospedeiro respondem à presença dos vermes adultos e dos ovos deste parasito, produzindo espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*), como por exemplo, radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), gerando estresse oxidativo (Oke, Moskovitz et al. 2009). Portanto, ROS pode ser um vantajoso mecanismo de defesa do hospedeiro contra parasitos. Entretanto, os parasitos desenvolveram estratégias de evasão do sistema imune, tal como a produção de enzimas antioxidantes, que são essenciais para a proteção contra a formação de ROS pelo hospedeiro (Loverde 1998).

O papel da via de sinalização p38 MAPK na proteção contra o estresse oxidativo é estudado em vários organismos (Inoue, Hisamoto et al. 2005, Patel, Chojnowski et al. 2011, Karkali and Panayotou 2012), entretanto permanece desconhecido em *S. mansoni*. Sendo assim, no intuito de avaliarmos funcionalmente o efeito do silenciamento gênico de Smp38, expusemos esquistossômulos tratados por quatro dias com Smp38-dsRNA e mCherry-dsRNA (controle) ao meio contendo peróxido de hidrogênio. A concentração de uso de $50\mu M$ de H_2O_2 foi determinada após a realização de uma curva de mortalidade utilizando diversas concentrações de peróxido de hidrogênio em esquistossômulos controle por 24 horas. O experimento de estresse oxidativo foi repetido seis vezes e todos os tratamentos possuíam seu respectivo controle negativo, ou seja, parasitos tratados com dsRNAs sem adição de H_2O_2 . A viabilidade dos esquistossômulos foi avaliada após 4h, 24h e 48h de tratamento com H_2O_2 e a porcentagem de mortalidade calculada (Figura 28). É importante ressaltar que separamos alguns tratamentos que não foram expostos à H_2O_2 para acessarmos os níveis de transcritos de Smp38, nos certificando que a expressão gênica havia sido suprimida nesses parasitos.

Nossa hipótese era que parasitos silenciados expostos à H_2O_2 fossem incapazes de acionar enzimas antioxidantes e portanto, esse tipo de tratamento seria letal aos esquistossômulos. Infortunadamente, não houve diferença significativa na mortalidade dos esquistossômulos silenciados após 4h, 24h e 48h de exposição à H_2O_2 . Acreditamos que esse resultado está associado à ocorrência dos seguintes eventos: 1. a diminuição dos níveis do transcrito de Smp38 levaria a uma queda na síntese da proteína, mas o produto proteico apresentaria uma meia-vida longa, o que reduziria os efeitos do silenciamento; 2. o bloqueio da expressão de Smp38 compromete a ativação de enzimas antioxidantes, entretanto o produto proteico dessas enzimas também apresentaria uma meia-vida longa, reagindo aos ataques de espécies reativas de oxigênio; 3. outros mecanismos redox poderiam ser acionados pelo parasito como uma tentativa de suplantar à via de sinalização p38 MAPK inoperante.

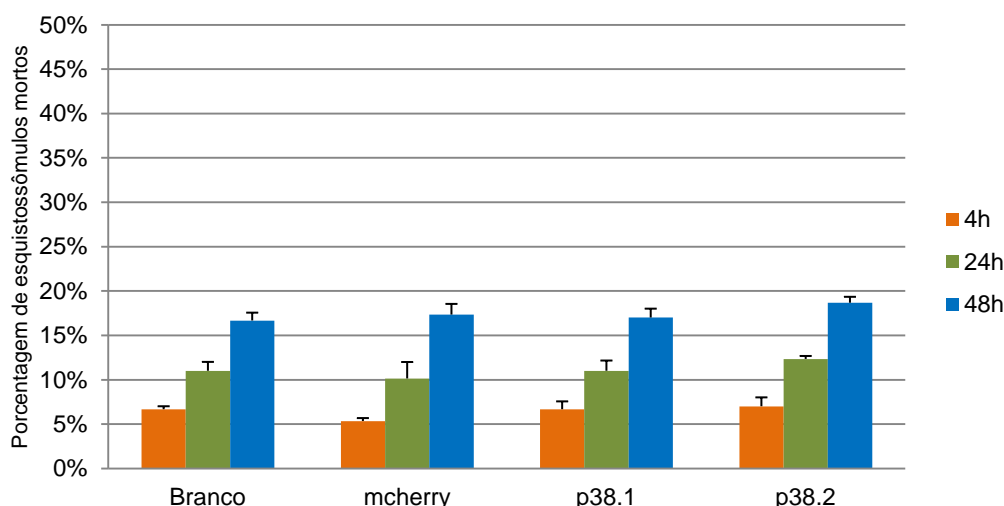


Figura 28: Mortalidade dos esquistossômulos silenciados pós-H₂O₂. Parasitos após quatro dias de tratamento com Smp38-dsRNA foram expostos à 50µM de peróxido de hidrogênio e sua viabilidade avaliada após 4h, 24h, 48h. Os nossos controles foram parasitos não expostos à H₂O₂ (Branco e mCherry-dsRNA). Os dados foram tratados por Two-way ANOVA, N=6. As barras representam o erro padrão entre os experimentos.

Na tentativa de melhor compreender o resultado que alcançamos quando expomos esquistossômulos silenciados à H₂O₂, tratamos os esquistossômulos com 15µM de SB 203580 por 12h e em seguida expomos esses parasitos à 50µM de H₂O₂. A viabilidade dos esquistossômulos foi avaliada após 24h e 48h de tratamento com H₂O₂ e a porcentagem de mortalidade calculada. Os resultados alcançados são mostrados na Figura 29. Surpreendentemente, os esquistossômulos tratado com 15µM do inibidor se mostraram significativamente ($p < 0,001$) mais suscetíveis ao estresse oxidativo após 24h e 48h de exposição à H₂O₂ quando comparados à parasitos controle ("Branco", parasitos que não receberam nenhum tipo de tratamento e "DMSO", parasitos expostos à 0,02% v/v de DMSO). Parasitos expostos simultaneamente à H₂O₂ e ao inibidor apresentaram uma média de aumento da mortalidade de ~ 22% após 24 horas ($p < 0,001$, N=3) e de 71% após 48 horas ($p < 0,001$, N=3), comparando com 2% e 8% de mortalidade dos controles, respectivamente. Sendo assim, acreditamos fortemente que a via de sinalização p38 MAPK é acionada pelo parasito na proteção contra ataques de espécies reativas de oxigênio. Muito provavelmente o produto proteico de Smp38 possui uma meia-vida longa e por isso não alcançamos o mesmo resultado nos ensaios de estresse oxidativo em esquistossômulos silenciados.

O provável mecanismo de ação da via de sinalização p38 de *S. mansoni* será descrito em maiores detalhes posteriormente, mas faremos uma prévia aqui. Estudos

anteriores demonstraram que o silenciamento gênico por RNAi de tiorredoxina-glutationa redutase (TGR) em esquistossômulos diminui substancialmente a sobrevivência dos parasitos (97% de mortalidade após quatro dias de tratamento) (Kuntz, Davioud-Charvet et al. 2007). Acreditamos que a inibição da atividade de Smp38 decorrente do tratamento com SB 203580 interfere na expressão de glutamato-cisteína ligase e conseqüentemente na síntese de glutatona, um dos substratos de tiorredoxina-glutationa redutase, o que provoca a mesma letalidade do silenciamento de TGR. Portanto, nossos resultados nos permite associar a participação de p38 do *S. mansoni* nas mesmas rotas metabólicas de importantes enzimas antioxidantes, confirmando a importância da cascata de sinalização p38 MAPK na proteção do parasito frente ao estresse oxidativo.

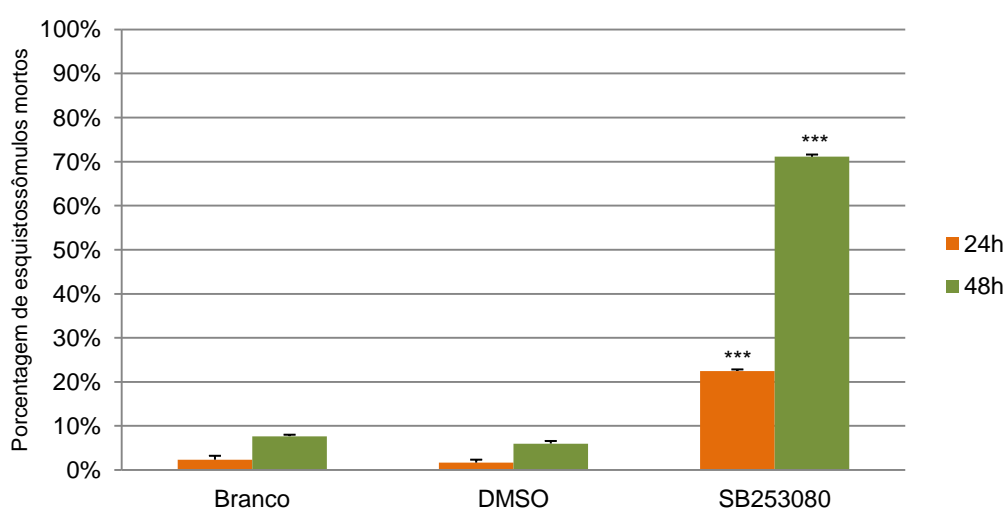


Figura 29: Mortalidade dos esquistossômulos inibidos pós-H₂O₂. Parasitos após 12 horas de tratamento com 15µM de SB 203580 foram expostos à 50µM de peróxido de hidrogênio e sua viabilidade avaliada após 24h e 48h. Os nossos controles foram parasitos não expostos à H₂O₂ (Branco e DMSO). Os dados foram tratados por Two-way ANOVA e os resultados significativos foram tratados pelo teste de Bonferroni, comparando-se cada tempo do tratamento com seus respectivos tempos em esquistossômulos controles. (significância (***) p<0,001, N=3). As barras representam o erro padrão entre os experimentos.

Para nos certificarmos de que o peróxido de hidrogênio era o fator oxidante no meio e que seria o causador da morte dos parasitos, tratamos esquistossômulos com a concentração subletal de SB 203580 (15µM) e após 12h expusemos esses parasitos à 50µM de peróxido de hidrogênio na presença e ausência de catalase bovina 0,025% e como controle, apenas catalase foi adicionado ao meio de cultura. A viabilidade dos parasitos foi avaliada após 24h (Figura 30).

A porcentagem de mortalidade dos esquistossômulos tratados com SB 203580 quando expostos à H_2O_2 + catalase, ou apenas à catalase foi bastante similar (média de 15% e 13% respectivamente, $P>0,05$; não sendo estatisticamente significativa) (Figura 30). Este resultado está em contraste com os efeitos observados após exposição à H_2O_2 pura, no qual a mortalidade dos esquistossômulos foi significativamente maior, com uma média de mortalidade de 55% ($p<0,001$, $N=3$). A taxa de mortalidade exibida por esquistossômulos não tratados (branco), não foi significativamente diferente daquela de parasitos expostos à H_2O_2 acrescido de catalase ou somente a catalase. No entanto, a porcentagem de esquistossômulos mortos quando expostos ao peróxido de hidrogênio é significativamente elevada para organismos tratados com o inibidor. Assim, a enzima catalase foi capaz de neutralizar os efeitos do peróxido de hidrogênio, mostrando que H_2O_2 é o fator oxidante no meio e a causa da morte dos esquistossômulos tratados com SB 203580.

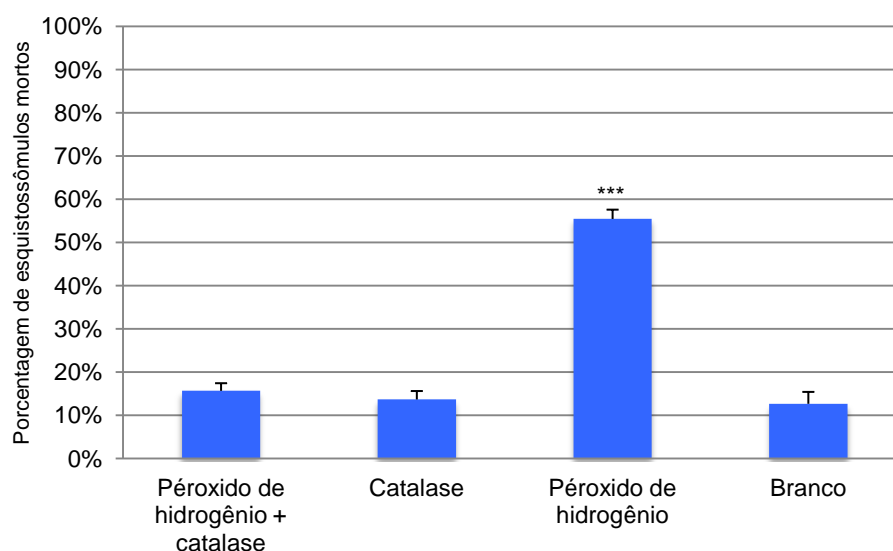


Figura 30: Neutralização de estresse oxidativo pós- H_2O_2 . Parasitos após 12 horas de exposição ao inibidor foram expostos à $50\mu M$ de H_2O_2 , na presença ou ausência de catalase bovina 0,025% e sua viabilidade avaliada após 24h de exposição. "Branco" representa os esquistossômulos que não receberam nenhum tipo de tratamento. Significância analisada por Two-way ANOVA e os resultados significativos foram tratados pelo teste de Bonferroni. (significância (***) $p<0,001$, $N=3$). As barras representam o erro padrão entre os experimentos.

Vários estudos demonstram que a exposição direta de células à H_2O_2 exógena para mimetizar estresse oxidativo leva à ativação das vias de sinalização MAPKs (Ruffels, Griffin et al. 2004). O mecanismo pelo qual espécies reativas de oxigênio ativam essas vias

permanece desconhecido. Entretanto, como ROS altera a estrutura e função de proteínas através da modificação de resíduos de aminoácidos críticos, a modificação oxidativa destas proteínas sinalizantes pode ser um mecanismo plausível para a ativação das cascatas MAPKs (Torres and Forman 2003).

Na via p38 MAPK, espécies reativas de oxigênio ativam membros da subfamília MKK3 ou MKK6, que são altamente específicos para p38 MAPKs. MKK6 fosforila todas as isoformas de p38 (p38 α , p38 β p38 δ e p38 γ), enquanto que MKK3 é seletiva para as isoformas p38 α , p38 δ e p38 γ . MKK3/6 transmitem esse sinal à p38 que é translocada do núcleo para o citoplasma, ativando fatores de transcrição que controlam a expressão de enzimas envolvidas em rotas antioxidantes (Son, Kim et al. 2013). Em outros organismos como *B. Malayi* e *C. elegans* foi descrito que via de sinalização p38 MAPK controla a expressão de glutamato-cisteína ligase (GCL) (Inoue, Hisamoto et al. 2005, Patel, Chojnowski et al. 2011), enzima que participa do primeiro passo da síntese de glutatona (GSH), um tripeptídeo formado por ácido glutâmico, glicina e cisteína e que desempenha um importante papel na manutenção do balanço redox intracelular (Haddad and Harb 2005).

Nossas descobertas afirmam que p38 MAPK em *S. mansoni* participa na proteção contra o estresse oxidativo, porém desconhecíamos o efeito da exposição ao peróxido de hidrogênio na transcrição de genes alvos da via p38 MAPK. Com o intuito de verificar se a via de sinalização p38 MAPK que induz a síntese de glutamato-cisteína ligase em *B. malayi* e *C. elegans* está conservada em *S. mansoni*, acessamos os níveis de transcritos de Smp38 e SmGCL (Smp_013860) em esquistossômulos de fase tegumentar expostos à 100 μ M e 200 μ M de H₂O₂ após 5, 10 e 30 minutos. Para esse experimento realizamos uma curva de mortalidade dos esquistossômulos mediante exposição à 200 μ M de H₂O₂ durante 30min e constatamos que essa concentração de peróxido de hidrogênio não é letal aos parasitos durante o tempo avaliado (dados não mostrados).

O resultado mostra que a indução de estresse oxidativo em populações de esquistossômulos aumenta a transcrição de Smp38 e SmGCL em relação à população controle, representada por esquistossômulos não expostos à H₂O₂ (Figura 31). Um aumento significativo nos níveis de transcritos de Smp38 (2,3x, p<0,001, N=3) e SmGCL (2,5x, p<0,001, N=3) foi observado logo após 5min de exposição à 200 μ M de H₂O₂ e os níveis de transcrição dessas enzimas permaneceram significativamente aumentados durante o tempo máximo avaliado, sugerindo que a ativação da via p38 MAPK é requerida pelo parasito na detoxificação de espécies reativas de oxigênio.

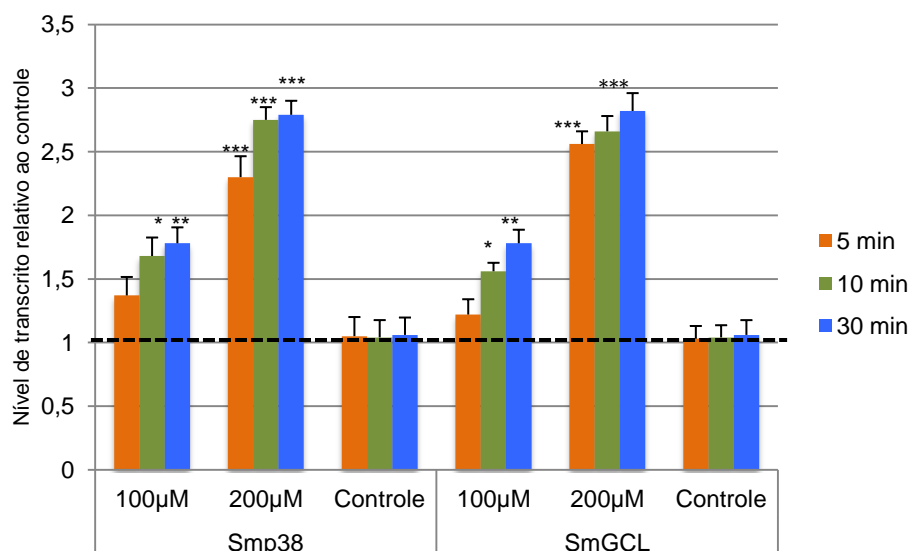


Figura 31: Níveis de transcritos de Smp38 e SmGCL pós-H₂O₂. Os níveis de transcritos de Smp38 e SmGCL foram acessados após indução de estresse oxidativo em esquistossômulos de fase tegumentar. Dosamos os níveis de transcritos de Smp38 e SmGCL 5, 10 e 30 minutos após exposição à 100µM e 200µM de peróxido de hidrogênio e comparamos àqueles níveis de transcritos da população de esquistossômulos não exposta ao estresse oxidativo (controle). Os resultados foram analisados pelo método $\Delta\Delta$ CT seguido do teste de Mann-Whitney (*Wilcoxon sum of ranks*). (*, ** e *** indicam $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$ respectivamente). N=3. A linha pontilhada representa o nível normalizado de transcritos na população controle. As barras representam o erro padrão entre os experimentos.

Um acúmulo de evidências sugere que as modificações oxidativas das MAPKs estão associadas à um robusto sistema de amplificação do sinal de fosforilação acionado por espécies reativas de oxigênio e possivelmente essas complexas redes de comunicação celular são similares entre *S. mansoni*, *B. malayi* e *C. Elegans* (Inoue, Hisamoto et al. 2005, Patel, Chojnowski et al. 2011). Nosso trabalho é o primeiro a descrever em *S. mansoni* a ativação por espécies reativas de oxigênio de uma via de sinalização MAPK e também contribui para o intenso trabalho que vem sendo desenvolvido sobre os mecanismos redox neste parasito.

Os vermes adultos de *S. mansoni* se alojam nas veias mesentéricas do hospedeiro definitivo e podem sobreviver por até 30 anos (Vermund, Bradley et al. 1983). Uma vez que vivem em ambiente aeróbico, requerem um robusto mecanismo para manter o balanço celular redox, além de serem capazes de evadir às espécies reativas de oxigênio geradas

pela resposta imune do hospedeiro (Kuntz, Davioud-Charvet et al. 2007). A maioria dos eucariotos possuem dois principais sistemas para detoxificar ROS, um baseado no tripeptídeo glutathiona (GSH) e outro baseado na enzima tiorredoxina (Trx) (Gromer, Urig et al. 2004). Entretanto, *S. mansoni* possui uma única enzima que combina as atividades das enzimas tiorredoxina redutase (TrxR) e glutathiona redutase (GR) presentes em mamíferos (Alger and Williams 2002). Esta enzima de *S. mansoni* é responsável por manter a tiorredoxina e a glutathiona nos seus estados ativos reduzidos, permitindo assim, a ativação de três tiorredoxinas peroxidases (TPx1-3) e da glutathiona peroxidase (GPx), as quais serão então capazes de reduzir H₂O₂ e outras espécies reativas de oxigênio (Sayed, Cook et al. 2006).

Acreditamos que a indução de estresse oxidativo em *S. mansoni* ativa a fosforilação de SmMAP3K (Smp_050380) que transmite o sinal para SmMAP2K (Smp_073490 ou Smp_073510 ou Smp_146290) que rapidamente fosforila Smp38 (Smp_133020). p38 fosforilada pode se translocar para o núcleo e ativar fatores de transcrição como ATF-2, que controlam a transcrição de glutamato-cisteína ligase (Smp_013860) (Figura 32).

Muito possivelmente a GCL de *S. mansoni* participa da primeira reação enzimática na síntese de GSH que, em mamíferos, consiste na condensação do glutamato com a L-cisteína. O segundo passo limitante desta rota é a conversão de glutamato a γ -glutamil em uma reação catalisada por γ -glutamil-cisteína sintetase (γ -GCS). O terceiro e último passo é catalisado pela glutamil sintase e converte o γ -glutamil-cisteína no tripeptídeo γ -glutamil-cisteínil-glicina conhecido como GSH (Haddad and Harb 2005). Endogenamente, GSH reduzida é utilizada pela enzima glutathiona peroxidase (Smp_058690 ou Smp_058700) para a conversão do peróxido de hidrogênio em água, restaurando o balanço redox intracelular.

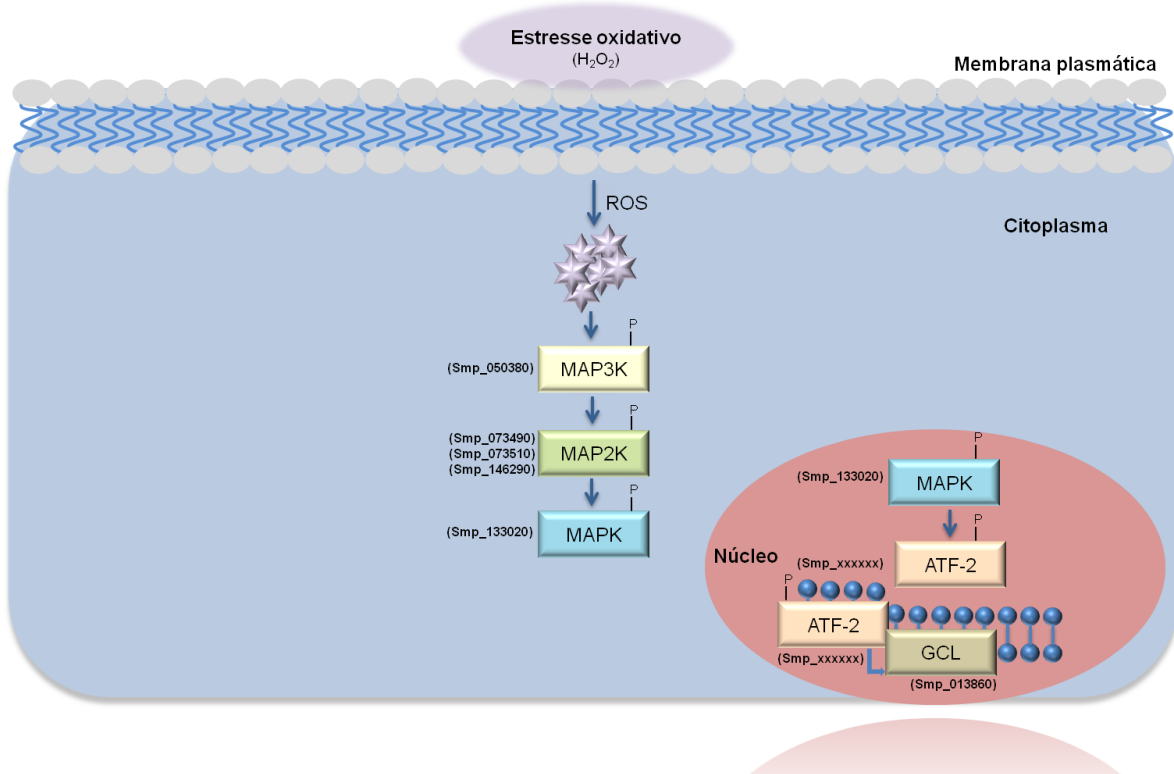


Figura 32: Via de sinalização hipotética p38 MAPK em *S. mansoni*. Constatamos que a via p38 MAPK em *S. mansoni* é ativada por estresse oxidativo que leva a regulação da enzima glutamato-cisteína ligase. Acreditamos que espécies reativas de oxigênio (ROS) transmitem o sinal para o meio intracelular através da ativação de Smp_050380, uma proteína quinase do grupo STE ativadora de MAPKs. Subseqüentes eventos de fosforilação em cascata ocorrem levando a fosforilação de uma das três possíveis MAP2K preditas no proteoma do *S. mansoni* (Smp_073490 ou Smp_073510 ou Smp_146290). Rapidamente o sinal é transmitido para Smp_133020, uma p38 MAPK que é translocada para o núcleo, fosforilando fatores de transcrição, como ATF-2, responsáveis pela expressão de glutamato-cisteína ligase (Smp_013860), uma importante proteína precursora da síntese da enzima antioxidante glutathiona (GSH). Endogenamente, GSH reduzida é utilizada pela enzima glutathiona peroxidase (Smp_058690 ou Smp_058700) para a detoxificação das espécies reativas de oxigênio, restaurando o balanço redox intracelular.

4.6 Interação proteína-ligante

O tratamento de várias parasitoses, incluindo a esquistossomose, enfrenta grandes desafios como a emergência de resistência a drogas e ausência de uma vacina efetiva (Pal and Bandyopadhyay 2012), o que torna a identificação de novos alvos de drogas uma demanda global. A susceptibilidade de muitos parasitos como o *S. mansoni* ao estresse oxidativo é um fenômeno bastante conhecido. Portanto, a geração de espécies reativas de oxigênio associada à inibição de enzimas antioxidantes endógenas poderia ser o enfoque principal em abordagens para o desenho racional de drogas antiparasitárias.

Como já mencionamos, durante a infecção pelo *S. mansoni* as células do sistema imune do hospedeiro respondem à presença dos vermes adultos e dos ovos deste parasito, produzindo espécies reativas de oxigênio como por exemplo, radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Demonstramos em nossos estudos que espécies reativas de oxigênio ativam a cascata de sinalização p38 MAPK de *S. mansoni* que controla a expressão de glutamato-cisteína ligase, essencial para a síntese de glutatona (GSH), uma importante enzima envolvida na detoxificação de ROS. Mais ainda, mostramos que a inibição da atividade enzimática de Smp38 em esquistossômulos expostos à espécies reativas de oxigênio gera um fenótipo de letalidade à estes parasitos. Portanto, temos como última pergunta deste trabalho: Smp38 poderia ser um promissor alvo de droga contra o *S. mansoni*?

Para responder à essa pergunta, realizamos a predição dos sítios de ligação de SB 203580 à Smp38, através de buscas por potenciais homólogos com estrutura tridimensional (3D) conhecida e *docking* molecular. Buscas utilizando a sequência primária de aminoácidos de Smp38 contra informações de estruturas 3D do PDB (do inglês, *Protein Data Bank*) (Berman, Henrick et al. 2007), determinadas experimentalmente, retornaram como potencial homólogo a estrutura tridimensional de p38 α -MAPK de humano obtida por difração de raio-X (Identificador no PDB: 3ITZ). Simulações da ligação de SB 203580 à 3ITZ foram realizadas (Figura 33) e o sítios de ligação foram determinados (Figura 34). Em seguida, mapeamos estes sítios de ligação na sequência linear de Smp38 para que fosse possível avaliar o grau de conservação destas regiões entre p38 de *S. mansoni* e p38 de humano (Figura 35). Infortunadamente, apenas dois resíduos de aminoácidos são invariantes, L74 e I84, e estes foram trocados por substituições conservativas, I74 e V84, respectivamente. Sendo assim, é muito provável que SB 203580 inibe a atividade enzimática tanto de p38 de *S. mansoni* como p38 de humano, impossibilitando o uso desse inibidor no tratamento da esquistossomose.

Proteína quinases como novos alvos de drogas contra o *S. mansoni* é um assunto discutido pela comunidade científica massivamente (Dissous, Ahier et al. 2007, Avelar,

Nahum et al. 2011, Beckmann, Leutner et al. 2012) e todos estes trabalhos convergem para a mesma pergunta: é possível criar inibidores de proteína quinases mais seletivos que se liguem à regiões únicas da molécula? Esse questionamento é de notável relevância, pois mais uma vez vimos que muitos dos inibidores disponíveis competem com o sítio de ligação à ATP, região conservada entre membros de proteína quinases de diferentes organismos (Eglen and Reisine 2011).

Uma tendência recente para a criação de inibidores mais seletivos é o uso de moduladores alostéricos que exploram fortemente os perfis estruturais das proteína quinases (Johnson 2009). Os moduladores alostéricos varrem todo o quinoma e se ligam à regiões menos conservadas acessíveis apenas quando há mudanças conformacionais. Estes moduladores, por conseguinte, proporcionam diversas vantagens, como uma maior seletividade e maior tempo de resistência do alvo à droga (Fang, Grutter et al. 2013).

Retomando nossa pergunta, é possível criar inibidores de proteína quinases mais seletivos que se liguem à regiões únicas da molécula? Sim, é possível. Portanto, se torna evidente que existem várias alternativas para o desenho racional de drogas e múltiplos caminhos devem ser percorridos antes de afirmamos que proteína quinases como alvos de droga contra o *S. mansoni* está longe de ser uma realidade.

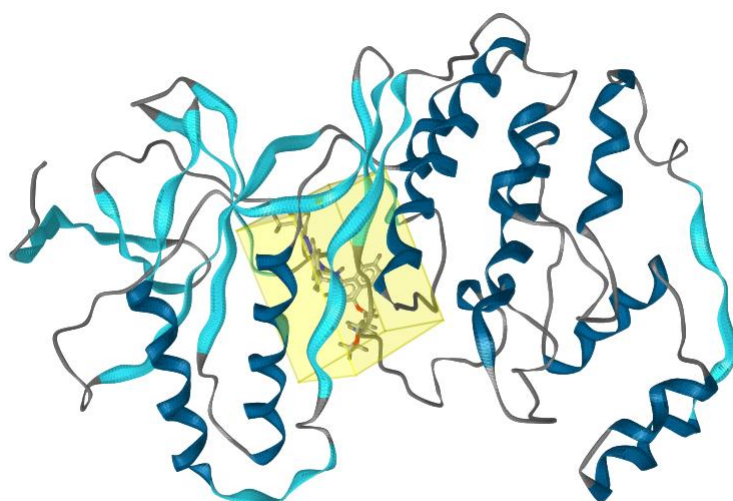


Figura 33: Docking molecular entre 3ITZ e SB 203580. A imagem representa a interação proteína-ligante entre a estrutura tridimensional de p38- α MAPK de humano (PDB: 3ITZ) e SB 203580. A sequência primária de aminoácidos de Smp38 foi utilizada para buscas no PDB (Berman, Henrick et al. 2007), retornado 3ITZ como potencial homólogo. A estrutura química de SB 203580, evidenciada pelo retângulo amarelo, foi obtida no banco de dados de compostos químicos ChemSpider (Williams 2008). A interação proteína-ligante foi determinada utilizando ferramentas do pacote DockoMatic 2.0 (Bullock, Cornia et al. 2013) e para visualização das imagens utilizamos o *software* LigandScout 3-D (Wolber and Langer 2005).

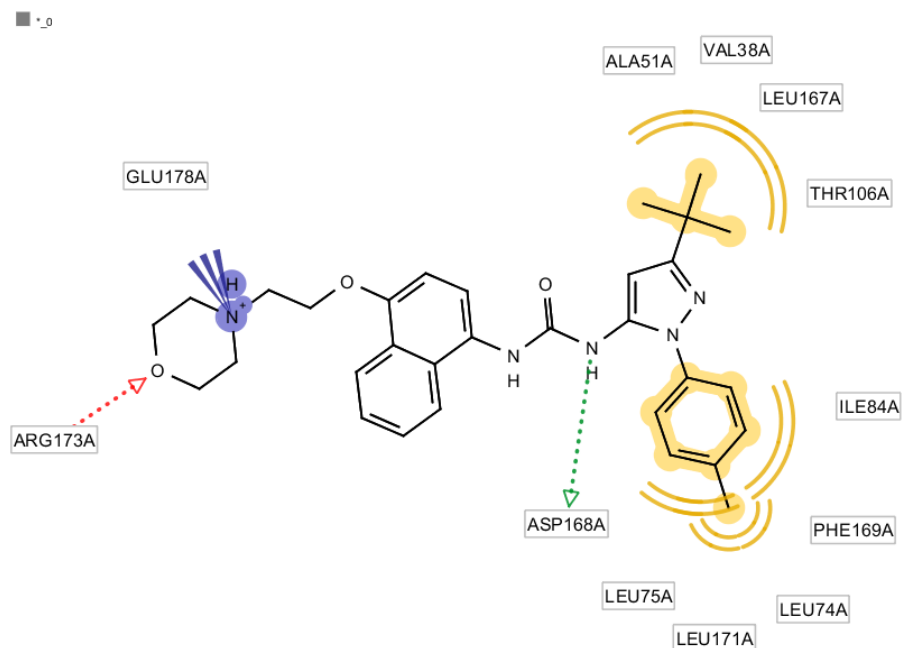


Figura 34: Identificação dos sítios de ligação entre 3ITZ e SB 203580. No centro da imagem está representada a estrutura química de SB 203580. Os aminoácidos no interior de cada retângulo representam os sítios de ligação de 3ITZ à SB 203580 e os números representam a posição de cada aminoácido na sequência linear de 3ITZ. Os agrupamentos hidroxila e nitrogênio de amida estão representados pelas setas vermelha e verde respectivamente e correspondem ao farmacóforo, região da molécula de um ligante (SB203580) que esta intimamente associada ao seu receptor (3ITZ). O farmacóforo foi determinado pelo *software* LigandScout 3-D (Wolber and Langer 2005).

5. Conclusões

Proteína quinases e enzimas antioxidantes são propostas como alvos de drogas em vários sistemas biológicos. Motivados por essa premissa nos propomos à investigar o papel da via de sinalização p38 MAPK no desenvolvimento do *S. mansoni* e na proteção contra o estresse oxidativo.

Nosso primeiro desafio foi selecionar os alvos moleculares e de acordo com alguns critérios estabelecidos duas proteína quinases foram selecionadas para os ensaios experimentais, a saber: SmMAP3K-1 (Smp_050380) e Smp38 (Smp_133020). Para Smp38 observamos uma diferença de tamanho entre a sequência codificante predita e a sequência confirmada por sequenciamento e nossas análises sugerem que o encurtamento da sequência predita se trata de erros no modelo do gene processados durante a montagem do genoma do *S. mansoni*.

Como ponto de partida, escolhemos a técnica de silenciamento gênico por RNAi por ser uma importante ferramenta na validação funcional de alvos. Infortunadamente, não observamos redução nos níveis de transcritos de SmMAP3K-1, mas em contrapartida, uma diminuição significativa nos níveis de transcritos de Smp38 foi alcançada. Apesar da não visualização de um fenótipo consistente decorrente do silenciamento de Smp38 em esquistossômulos mantidos *in vitro*, o efeito do silenciamento e da inibição da atividade enzimática de p38 foram notáveis em estudos *in vivo*.

Ademais, demonstramos em nossos estudos que espécies reativas de oxigênio (ROS) ativam a cascata de sinalização p38 MAPK de *S. mansoni* que controla a expressão de glutamato-cisteína ligase, essencial para a síntese de glutatona (GSH), uma importante enzima envolvida na detoxificação de ROS. Mais ainda, mostramos que a inibição da atividade enzimática de Smp38 em esquistossômulos expostos à espécies reativas de oxigênio gera um fenótipo de letalidade à estes parasitos.

Os resultados de *docking* molecular sugerem fortemente que o inibidor SB 203580 bloqueia a atividade enzimática tanto de p38 de *S. mansoni* como p38 de humano, o que dificulta o uso desse inibidor no tratamento da esquistossomose. Entretanto, temos evidências de que p38 é um importante alvo para o desenvolvimento deste parasito e a construção de inibidores mais específicos possivelmente irá interromper o ciclo de vida do parasito e conseqüentemente a infecção.

Nosso trabalho é o primeiro a estudar a importância da via de sinalização p38 MAPK para o desenvolvimento do parasito no hospedeiro definitivo e a descrever a ativação por espécies reativas de oxigênio de uma via de sinalização MAPK no modelo biológico *S. mansoni*, contribuindo para o intenso trabalho que vem sendo desenvolvido sobre os mecanismos redox neste helminto.

6. Anexos

6.1 Atividades desenvolvidas durante o doutorado

Atividade	Descrição
Colaborações	<ul style="list-style-type: none"> • Diversidade funcional e evolutiva de tirosina quinases de <i>S. mansoni</i> • Efeito do Praziquantel[®] sobre proteínas quinases de <i>S. mansoni</i> • Identificação de proteína quinases eucarióticas (ePKs) no proteoma predito de <i>S. mansoni</i>; • Importância funcional de proteínas universal de estresse (USP) para o desenvolvimento de <i>S. mansoni</i> • Modelagem molecular por homologia de tirosina quinases de <i>S. mansoni</i>
Orientação	<ul style="list-style-type: none"> • Assmaa El Khal <ul style="list-style-type: none"> ✓ Nível: co-orientação de iniciação científica ✓ Período: 01/2013 a 02/2013 ✓ Agência financiadora: FAPEMIG • Larissa Jardim Melo <ul style="list-style-type: none"> ✓ Nível: Orientação de PROVOC ✓ Período: 07/2012 a 08/2013 ✓ Agência financiadora: Fiocruz • Mercedes Carolina Soares Silva <ul style="list-style-type: none"> ✓ Nível: co-orientação de iniciação científica ✓ Período: 08/2010 a 12/2012 ✓ Agência financiadora: FAPEMIG
Revisora de periódico	African Journal of Pharmacy and Pharmacology
Prêmios	<ul style="list-style-type: none"> • (2010) Travel award recebido para participação no "eCHeminfo Workshop on Drug Discovery & Applications". Medical Sciences Teaching Laboratory. Oxford University. • (2010) Travel award recebido para participação no "Simpósio sobre Biologia de Sistemas". Instituto Internacional de Física. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

6.2 Artigos completos publicados em periódicos

- Andrade LF, Nahum LA, **Avelar LG**, Silva LL, Zerlotini A, Ruiz JC, Oliveira G. (2011). "Eukaryotic protein kinases (ePKs) of the helminth parasite *Schistosoma mansoni*." BMC Genomics **12**: 215.
- **Avelar LG**, Nahum LA, Andrade LF, Oliveira G. (2011). "Functional Diversity of the *Schistosoma mansoni* Tyrosine Kinases." J Signal Transduct **2011**: 603290.
- Isokpehi RD, Mahmud O, Mbah AN, Simmons SS, **Avelar L**, Rajnarayanan RV, Udensi UK, Ayensu WK, Cohly HH, Brown SD, Dates CR, Hentz SD, Hughes SJ, Smith-McInnis DR, Patterson CO, Sims JN, Turner KT, Williams BS, Johnson MO, Adubi T, Mbuh JV, Anumudu CI, Adeoye GO, Thomas BN, Nashiru O, Oliveira G. (2011). "Developmental Regulation of Genes Encoding Universal Stress Proteins in *Schistosoma mansoni*." Gene Regul Syst Bio **5**: 61-74.

7. Referências Bibliográficas

Adachi-Yamada, T., et al. (1999). "p38 mitogen-activated protein kinase can be involved in transforming growth factor beta superfamily signal transduction in *Drosophila* wing morphogenesis." Mol Cell Biol **19**(3): 2322-2329.

Alger, H. M. and D. L. Williams (2002). "The disulfide redox system of *Schistosoma mansoni* and the importance of a multifunctional enzyme, thioredoxin glutathione reductase." Mol Biochem Parasitol **121**(1): 129-139.

Alrefaei, Y. N., et al. (2011). "Progress with schistosome transgenesis." Mem Inst Oswaldo Cruz **106**(7): 785-793.

Andrade, L. F., et al. (2011). "Eukaryotic protein kinases (ePKs) of the helminth parasite *Schistosoma mansoni*." BMC Genomics **12**: 215.

Andrade, L. F. d. (2013). Proteínas quinase eucarióticas (ePKs) de *Schistosoma*: identificação, anotação funcional e seleção de potenciais alvos terapêuticos. Tese de doutorado. CPqRR-Fiocruz.

Avelar, L. G., et al. (2011). "Functional Diversity of the *Schistosoma mansoni* Tyrosine Kinases." J Signal Transduct **2011**: 603290.

Barbosa, M. A., et al. (1978). "Quantitative aspects of the migration and evolutive asynchronism of *Schistosoma mansoni* in mice." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **20**(3): 121-132.

Beckmann, S. and C. G. Grevelding (2012). "Paving the way for transgenic schistosomes." Parasitology **139**(5): 651-668.

Beckmann, S., et al. (2012). "Protein kinases as potential targets for novel anti-schistosomal strategies." Curr Pharm Des **18**(24): 3579-3594.

Benson, D. A., et al. (2013). "GenBank." Nucleic Acids Res **41**(Database issue): D36-42.

Berman, H., et al. (2007). "The worldwide Protein Data Bank (wwPDB): ensuring a single, uniform archive of PDB data." Nucleic Acids Res **35**(Database issue): D301-303.

Berman, K., et al. (2001). "Isolation and characterization of pmk-(1-3): three p38 homologs in *Caenorhabditis elegans*." Mol Cell Biol Res Commun **4**(6): 337-344.

Berriman, M., et al. (2009). "The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*." Nature **460**(7253): 352-358.

Bhardwaj, R., et al. (2011). "Using RNA interference in *Schistosoma mansoni*." Methods Mol Biol **764**: 223-239.

Biolchini Cde, L., et al. (2006). "Development of *Schistosoma mansoni* worms in mice analyzed by bright field and confocal microscopy." Mem Inst Oswaldo Cruz **101 Suppl 1**: 261-265.

Bolz, D. D., et al. (2010). "A conserved PMK-1/p38 MAPK is required in *caenorhabditis elegans* tissue-specific immune response to *Yersinia pestis* infection." J Biol Chem **285**(14): 10832-10840.

Boyle, J. P., et al. (2003). "Using RNA interference to manipulate endogenous gene expression in *Schistosoma mansoni* sporocysts." Mol Biochem Parasitol **128**(2): 205-215.

Bullock, C., et al. (2013). "DockoMatic 2.0: High Throughput Inverse Virtual Screening and Homology Modeling." J Chem Inf Model.

Cass, C. L., et al. (2007). "Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* egg secretions." Mol Biochem Parasitol **155**(2): 84-93.

Cheever, A. W., et al. (1994). "Natural history of *Schistosoma mansoni* infection in mice: egg production, egg passage in the feces, and contribution of host and parasite death to changes in worm numbers." Am J Trop Med Hyg **50**(3): 269-280.

Cioli, D. (2000). "Praziquantel: is there real resistance and are there alternatives?" Curr Opin Infect Dis **13**(6): 659-663.

Cioli, D. and L. Pica-Mattoccia (2003). "Praziquantel." Parasitol Res **90 Supp 1**: S3-9.

Cioli, D., et al. (1992). "*Schistosoma mansoni*: hycanthone/oxamniquine resistance is controlled by a single autosomal recessive gene." Exp Parasitol **75**(4): 425-432.

Crabtree, J. E. and R. A. Wilson (1980). "*Schistosoma mansoni*: a scanning electron microscope study of the developing schistosomulum." Parasitology **81**(Pt 3): 553-564.

Despres, L., et al. (1993). "Molecular characterization of mitochondrial DNA provides evidence for the recent introduction of *Schistosoma mansoni* into America." Mol Biochem Parasitol **60**(2): 221-229.

Dillon, G. P., et al. (2006). "Microarray analysis identifies genes preferentially expressed in the lung schistosomulum of *Schistosoma mansoni*." Int J Parasitol **36**(1): 1-8.

Dissous, C., et al. (2007). "Protein tyrosine kinases as new potential targets against human schistosomiasis." Bioessays **29**(12): 1281-1288.

Doenhoff, M. J. and L. Pica-Mattoccia (2006). "Praziquantel for the treatment of schistosomiasis: its use for control in areas with endemic disease and prospects for drug resistance." Expert Rev Anti Infect Ther **4**(2): 199-210.

Driguez, P., et al. (2010). "Schistosomiasis vaccine discovery using immunomics." Parasit Vectors **3**: 4.

Eglen, R. and T. Reisine (2011). "Drug discovery and the human kinome: recent trends." Pharmacol Ther **130**(2): 144-156.

Engelman, J. A., et al. (1998). "Specific inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase block 3T3-L1 adipogenesis." J Biol Chem **273**(48): 32111-32120.

Fang, Z., et al. (2013). "Strategies for the selective regulation of kinases with allosteric modulators: exploiting exclusive structural features." ACS Chem Biol **8**(1): 58-70.

Fire, A., et al. (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." Nature **391**(6669): 806-811.

Foster, W. (1965). *The Schistosomata. A history of parasitology.* Edinburgh, Livingstone.

Freitas, T. C., et al. (2007). "TGF-beta signaling controls embryo development in the parasitic flatworm *Schistosoma mansoni*." PLoS Pathog **3**(4): e52.

Gava, S. G. (2013). Estudo funcional da proteína JNK do *Schistosoma mansoni* através de expressão heteróloga no organismo modelo *Caenorhabditis elegans*. Dissertação de Mestrado. CPqRR-Fiocruz.

Goldberg, J. E. (2007). "Parasitic colitides." Clin Colon Rectal Surg **20**(1): 38-46.

Gromer, S., et al. (2004). "The thioredoxin system--from science to clinic." Med Res Rev **24**(1): 40-89.

Gryseels, B. and S. J. De Vlas (1996). "Worm burdens in schistosome infections." Parasitol Today **12**(3): 115-119.

Gryseels, B., et al. (2001). "Are poor responses to praziquantel for the treatment of *Schistosoma mansoni* infections in Senegal due to resistance? An overview of the evidence." Trop Med Int Health **6**(11): 864-873.

- Gryseels, B., et al. (1996). "Human schistosomiasis". Lancet **368**(9541): 1106-1118.
- Haddad, J. J. and H. L. Harb (2005). "L-gamma-Glutamyl-L-cysteinyl-glycine (glutathione; GSH) and GSH-related enzymes in the regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines: a signaling transcriptional scenario for redox(y) immunologic sensor(s)?" Mol Immunol **42**(9): 987-1014.
- Hanks, S. K. and T. Hunter (1995). "Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification." FASEB J **9**(8): 576-596.
- Hanks, S. K. and A. M. Quinn (1991). "Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members." Methods Enzymol **200**: 38-62.
- Hanks, S. K., et al. (1988). "The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains." Science **241**(4861): 42-52.
- Henklova, P., et al. (2008). "SB203580, a pharmacological inhibitor of p38 MAP kinase transduction pathway activates ERK and JNK MAP kinases in primary cultures of human hepatocytes." Eur J Pharmacol **593**(1-3): 16-23.
- Hotez, P. J., et al. (2010). "Developing vaccines to combat hookworm infection and intestinal schistosomiasis." Nat Rev Microbiol **8**(11): 814-826.
- Hotez, P. J., et al. (2012). "Neglected tropical diseases of the Middle East and North Africa: review of their prevalence, distribution, and opportunities for control." PLoS Negl Trop Dis **6**(2): e1475.
- Inoue, H., et al. (2005). "The C. elegans p38 MAPK pathway regulates nuclear localization of the transcription factor SKN-1 in oxidative stress response." Genes Dev **19**(19): 2278-2283.
- Johnson, L. N. (2009). "Protein kinase inhibitors: contributions from structure to clinical compounds." Q Rev Biophys **42**(1): 1-40.

Johnson, M., et al. (2008). "NCBI BLAST: a better web interface." Nucleic Acids Res **36**(Web Server issue): W5-9.

Kalinna, B. H. and P. J. Brindley (2007). "Manipulating the manipulators: advances in parasitic helminth transgenesis and RNAi." Trends Parasitol **23**(5): 197-204.

Kamath, R. S. and J. Ahringer (2003). "Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*." Methods **30**(4): 313-321.

Karkali, K. and G. Panayotou (2012). "The *Drosophila* DUSP pucker is phosphorylated by JNK and p38 in response to arsenite-induced oxidative stress." Biochem Biophys Res Commun **418**(2): 301-306.

Katz, N. and S. V. Peixoto (2000). "Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil." Rev. Sociedade Brasileira de Medicina Tropical **33**(3): 6.

Krautz-Peterson, G., et al. (2010). "Suppressing glucose transporter gene expression in schistosomes impairs parasite feeding and decreases survival in the mammalian host." PLoS Pathog **6**(6): e1000932.

Kumar, S., et al. (1999). "Pyridinylimidazole compound SB 203580 inhibits the activity but not the activation of p38 mitogen-activated protein kinase." Biochem Biophys Res Commun **263**(3): 825-831.

Kuntz, A. N., et al. (2007). "Thioredoxin glutathione reductase from *Schistosoma mansoni*: an essential parasite enzyme and a key drug target." PLoS Med **4**(6): e206.

Kyriakis, J. M. and J. Avruch (2012). "Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update." Physiol Rev **92**(2): 689-737.

Lawton, S. P., et al. (2011). "Genomes and geography: genomic insights into the evolution and phylogeography of the genus *Schistosoma*." Parasit Vectors **4**: 131.

Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.

Loverde, P. T. (1998). "Do antioxidants play a role in schistosome host-parasite interactions?" Parasitol Today **14**(7): 284-289.

LoVerde, P. T., et al. (2009). "Signal transduction regulates schistosome reproductive biology." Curr Opin Microbiol **12**(4): 422-428.

Loverde, P. T. and L. Chen (1991). "Schistosome female reproductive development." Parasitol Today **7**(11): 303-308.

Lucet, I. S., et al. (2012). "Plasmodium kinases as targets for new-generation antimalarials." Future Med Chem **4**(18): 2295-2310.

Mahmoud, A. (2001). Schistosomiasis: Setting the stage. Schistosomiasis. A. Mahmoud, Imperial College Press.

Manning, G., et al. (2002). "The protein kinase complement of the human genome." Science **298**(5600): 1912-1934.

Martins, A. V. (1958). "Non-human vertebrate hosts of *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma mansoni*." Bull World Health Organ **18**(5-6): 931-944.

Mone, H. and J. Boissier (2004). "Sexual biology of schistosomes." Adv Parasitol **57**: 89-189.

Morales, M. E., et al. (2008). "RNA interference of *Schistosoma mansoni* cathepsin D, the apical enzyme of the hemoglobin proteolysis cascade." Mol Biochem Parasitol **157**(2): 160-168.

Morgan, J. A., et al. (2001). "*Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria*: past history and future trends." Parasitology **123** Suppl: S211-228.

Mourao Mde, M., et al. (2009). "Role of the endogenous antioxidant system in the protection of *Schistosoma mansoni* primary sporocysts against exogenous oxidative stress." PLoS Negl Trop Dis **3**(11): e550.

Mourao, M. M., et al. (2009). "Phenotypic screen of early-developing larvae of the blood fluke, *Schistosoma mansoni*, using RNA interference." PLoS Negl Trop Dis **3**(8): e502.

Nahum, L. A., et al. (2012). "New frontiers in *Schistosoma* genomics and transcriptomics." J Parasitol Res **2012**: 849132.

Naito, Y. and K. Ui-Tei (2013). "Designing functional siRNA with reduced off-target effects." Methods Mol Biol **942**: 57-68.

Ndegwa, D., et al. (2007). "Protocols for gene silencing in schistosomes." Exp Parasitol **117**(3): 284-291.

Nebreda, A. R. and A. Porras (2000). "p38 MAP kinases: beyond the stress response." Trends Biochem Sci **25**(6): 257-260.

Neves, R. H., et al. (2003). "Reproductive system abnormalities in *Schistosoma mansoni* adult worms isolated from *Nectomys squamipes* (Muridae: Sigmodontinae): brightfield and confocal laser scanning microscopy analysis." Mem Inst Oswaldo Cruz **98**(3): 361-365.

O'Rourke, S. M. and B. Bowerman (2005). "Genomics: frontiers of gene function." Nature **434**(7032): 444-445.

Oke, T. T., et al. (2009). "Characterization of the methionine sulfoxide reductases of *Schistosoma mansoni*." J Parasitol **95**(6): 1421-1428.

Pal, C. and U. Bandyopadhyay (2012). "Redox-active antiparasitic drugs." Antioxid Redox Signal **17**(4): 555-582.

Patel, A., et al. (2011). "The role of a *Brugia malayi* p38 MAP kinase ortholog (Bm-MPK1) in parasite anti-oxidative stress responses." Mol Biochem Parasitol **176**(2): 90-97.

Pellegrino, J. and N. Katz (1974). "[Experimental therapy of schistosomiasis mansoni. IX. Observations on the activity of quinine and its isomers]." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **16**(5): 301-304.

Pellegrino, J., et al. (1977). "Experimental chemotherapy of schistosomiasis mansoni. XIII. Activity of praziquantel, an isoquinoline-pyrazino derivative, on mice, hamsters and *Cebus* monkeys." Z Parasitenkd **52**(2): 151-168.

Peng, Y. H., et al. (2013). "Protein kinase inhibitor design by targeting the Asp-Phe-Gly (DFG) motif: the role of the DFG motif in the design of epidermal growth factor receptor inhibitors." J Med Chem **56**(10): 3889-3903.

Pereira, T. C., et al. (2013). "Applications of RNA Interference in Schistosomiasis: Gene Function Identification and Development of New Therapies." Parasitology.

Pereira, T. C., et al. (2008). "Schistosoma mansoni: evaluation of an RNAi-based treatment targeting HGPRTase gene." Exp Parasitol **118**(4): 619-623.

Prata, A. R. (1957). Biópsia retal na esquistossomose mansoni: Bases e aplicações no diagnóstico e tratamento.

Protasio, A. V., et al. (2012). "A systematically improved high quality genome and transcriptome of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*." PLoS Negl Trop Dis **6**(1): e1455.

Punta, M., et al. (2012). "The Pfam protein families database." Nucleic Acids Res **40**(Database issue): D290-301.

Ressurreicao, M., et al. (2011). "A role for p38 MAPK in the regulation of ciliary motion in a eukaryote." BMC Cell Biol **12**: 6.

Ressurreicao, M., et al. (2011). "A role for p38 mitogen-activated protein kinase in early post-embryonic development of *Schistosoma mansoni*." Mol Biochem Parasitol **180**(1): 51-55.

Rey, L. (1991). Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na Africa. Guanabara Koogan. 731 páginas.

Rinaldi, G., et al. (2009). "RNA interference targeting leucine aminopeptidase blocks hatching of *Schistosoma mansoni* eggs." Mol Biochem Parasitol **167**(2): 118-126.

Rollinson, D. and V. Southgate (1987). The genus *Schistosoma*: A Taxonomic Appraisal. The Biology of Schistosomes: From genes to Latrines. L. A. Press.

Ruffels, J., et al. (2004). "Activation of ERK1/2, JNK and PKB by hydrogen peroxide in human SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of ERK1/2 in H₂O₂-induced cell death." Eur J Pharmacol **483**(2-3): 163-173.

Sayed, A. A., et al. (2006). "Redox balance mechanisms in *Schistosoma mansoni* rely on peroxiredoxins and albumin and implicate peroxiredoxins as novel drug targets." J Biol Chem **281**(25): 17001-17010.

Seger, R. and E. G. Krebs (1995). "The MAPK signaling cascade." FASEB J **9**(9): 726-735.

Shebel, H. M., et al. (2012). "Genitourinary schistosomiasis: life cycle and radiologic-pathologic findings." Radiographics **32**(4): 1031-1046.

Siddiqui, A. A., et al. (2011). "Schistosomiasis vaccines." Hum Vaccin **7**(11): 1192-1197.

Silva-Leitao, F. W., et al. (2009). "Development of *Schistosoma mansoni* in the laboratory rat analyzed by light and confocal laser scanning microscopy." Exp Parasitol **123**(4): 292-295.

Skelly, P. J. and R. Alan Wilson (2006). "Making sense of the schistosome surface." Adv Parasitol **63**: 185-284.

Skelly, P. J., et al. (2003). "Suppression of cathepsin B expression in *Schistosoma mansoni* by RNA interference." Int J Parasitol **33**(4): 363-369.

Son, Y., et al. (2013). "Reactive Oxygen Species in the Activation of MAP Kinases." Methods Enzymol **528**: 27-48.

Stefanic, S., et al. (2010). "RNA interference in *Schistosoma mansoni* schistosomula: selectivity, sensitivity and operation for larger-scale screening." PLoS Negl Trop Dis **4**(10): e850.

Suzanne, M., et al. (1999). "The *Drosophila* p38 MAPK pathway is required during oogenesis for egg asymmetric development." Genes Dev **13**(11): 1464-1474.

Swierczewski, B. E. and S. J. Davies (2009). "A schistosome cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit is essential for parasite viability." PLoS Negl Trop Dis **3**(8): e505.

Tabach, Y., et al. (2013). "Identification of small RNA pathway genes using patterns of phylogenetic conservation and divergence." Nature **493**(7434): 694-698.

Tang, C. L., et al. (2012). "[Progress of research on mechanism of growth and development of schistosomula of *Schistosoma*]." Zhongguo Xue Xi Chong Bing Fang Zhi Za Zhi **24**(5): 591-593, 606.

Tchoubrieva, E. B., et al. (2010). "Vector-based RNA interference of cathepsin B1 in *Schistosoma mansoni*." Cell Mol Life Sci **67**(21): 3739-3748.

ter Haar, E., et al. (2004). "Kinase chemogenomics: targeting the human kinome for target validation and drug discovery." Mini Rev Med Chem **4**(3): 235-253.

Thompson, J. D., et al. (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." Nucleic Acids Res **22**(22): 4673-4680.

Thornton, T. M. and M. Rincon (2009). "Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival." Int J Biol Sci **5**(1): 44-51.

Torres, M. and H. J. Forman (2003). "Redox signaling and the MAP kinase pathways." Biofactors **17**(1-4): 287-296.

Tran, M. H., et al. (2010). "Suppression of mRNAs encoding tegument tetraspanins from *Schistosoma mansoni* results in impaired tegument turnover." PLoS Pathog **6**(4): e1000840.

Uhlik, M. T., et al. (2004). "Wiring diagrams of MAPK regulation by MEKK1, 2, and 3." Biochem Cell Biol **82**(6): 658-663.

van Balkom, B. W., et al. (2005). "Mass spectrometric analysis of the *Schistosoma mansoni* tegumental sub-proteome." J Proteome Res **4**(3): 958-966.

Van Hellemond, J. J., et al. (2006). "Functions of the tegument of schistosomes: clues from the proteome and lipidome." Int J Parasitol **36**(6): 691-699.

Verjovski-Almeida, S., et al. (2003). "Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*." Nat Genet **35**(2): 148-157.

Vermund, S. H., et al. (1983). "Survival of *Schistosoma mansoni* in the human host: estimates from a community-based prospective study in Puerto Rico." Am J Trop Med Hyg **32**(5): 1040-1048.

Vidalin, O., et al. (2009). "In vivo target validation using gene invalidation, RNA interference and protein functional knockout models: it is the time to combine." Curr Opin Pharmacol **9**(5): 669-676.

Warren, K. S. and E. O. Domingo (1970). "Granuloma formation around *Schistosoma mansoni*, *S. HAEMATOBIIUM*, AND *S. japonicum* eggs. Size and rate of development, cellular composition, cross-sensitivity, and rate of egg destruction." Am J Trop Med Hyg **19**(2): 292-304.

Williams, A. J. (2008). "Public chemical compound databases." Curr Opin Drug Discov Devel **11**(3): 393-404.

Wilson, R. A. (2009). "The saga of schistosome migration and attrition." Parasitology **136**(12): 1581-1592.

Wolber, G. and T. Langer (2005). "LigandScout: 3-D pharmacophores derived from protein-bound ligands and their use as virtual screening filters." J Chem Inf Model **45**(1): 160-169.

Yoshino, T. P., et al. (2010). "In vitro manipulation of gene expression in larval *Schistosoma*: a model for postgenomic approaches in Trematoda." Parasitology **137**(3): 463-483.

Youngman, M. J., et al. (2011). "A decline in p38 MAPK signaling underlies immunosenescence in *Caenorhabditis elegans*." PLoS Genet **7**(5): e1002082.

Zechner, D., et al. (1998). "MKK6 activates myocardial cell NF-kappaB and inhibits apoptosis in a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent manner." J Biol Chem **273**(14): 8232-8239.

Zerlotini, A., et al. (2013). "SchistoDB: an updated genome resource for the three key schistosomes of humans." Nucleic Acids Res **41**(Database issue): D728-731.

Zhuang, Z. H., et al. (2006). "Regulation of *Drosophila* p38 activation by specific MAP2 kinase and MAP3 kinase in response to different stimuli." Cell Signal **18**(4): 441-448.