UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

ANDRESSA BARBAN DO PATROCINIO

Enzimas desubiquitinadoras ligadas ao proteassoma são essenciais para a viabilidade do *Schistosoma mansoni*

Ribeirão Preto

2018

ANDRESSA BARBAN DO PATROCINIO

Enzimas desubiquitinadoras ligadas ao proteassoma são essenciais para a viabilidade do *Schistosoma mansoni*

Tese a ser apresentada à Faculdadede Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção de título de Doutor em Ciências. Área de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Vanderlei Rodrigues

Ribeirão Preto

2018

Nome: PATROCINIO, Andressa Barban do

Título: Enzimas desubiquitinadoras ligadas ao proteassoma são essenciais para a viabilidade do *Schistosoma mansoni*

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor em Ciências. Área Bioquímica.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.:

Instituição:

Julgamento:

Prof. Dr.:

Instituição:

Julgamento:

Prof. Dr.:

Instituição:

Julgamento:

Prof. Dr.:

Instituição:

Julgamento:

Dedico este trabalho aos meus filhos, Lucas e Daniel, por estarem sempre tendo paciência com a mãe deles, pois precisei estar ausente. E sempre preocupados, esperavam eu chegar em nosso lar e recebia deles um abraço apertado de saudade. Vocês são a minha luz e aprendi com vocês a dedicar um amor sem limites!

Aos meus pais que sempre me incentivaram e me ensinaram a buscar o que eu queria e que a vida é feita de sonhos. E devemos fazer além do nosso limite para realizá-los. Obrigada por me apoiarem a cada momento e estarem sempre e sempre comigo. E me ensinarem a trilhar sempre o caminho certo e que Deus está sempre do nosso lado.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A minha gratidão a todos que me ajudaram na realização desse trabalho:

Ao Professor Vanderlei Rodrigues que sempre deixou eu buscar meus caminhos como pesquisadora, me apoiando. Aprendi muito com ele. E que a cada etapa da pesquisa é necessário ter equilíbrio e paciência, sendo fundamentais, para o desenvolvimento profissional. Muito obrigada Professor. Acho o senhor um ser humano incrível.

À Professora Renata Guerra de Sá que me ensinou muito no mestrado e me coorientou no doutorado. Sempre acompanhando meu desenvolvimento e fazendo com que eu conseguisse o melhor de mim para a realização deste trabalho, aprimorando meu aprendizado. E pelas discussões enriquecedoras que tanto contribuíram para a finalização deste trabalho. Muito obrigada.

À Professora Fernanda Cabral que me acompanhou no mestrado, trabalhando muitas vezes juntas até tarde. E que do meu lado, após meu afastamento por alguns anos da pesquisa, sentou comigo e me ensinou o que estava acontecendo em nosso campo de trabalho para que eu ingressasse no doutorado. E que agora estará também na finalização desta etapa. Meu muito obrigada.

À Professora Lizandra Guide Magalhães Costa por me apoiar e ajudar no desenvolvimento deste trabalho e pela amizade. Muito obrigada.

À minha amiga Olinda Mara Brigato por estar sempre ao meu lado, sempre escutando minhas aflições e pelo auxílio técnico na manutenção do ciclo do parasita *S. mansoni*.

À todos do Laboratório do Professor Adriano Sebollela pelo auxilio na realização dos *Western blottings*, pela amizade, momentos de convívio e discussões científicas.

Ao Professor Adriano Sebollela por abrir para mim as portas de seu laboratório.

A técnica Silvana Chedraoui Silva pelo auxílio em algumas ocasiões em que precisei**.**

Às minhas amigas Raquel, Niele e Mari pelos momentos de descontração, conversas e por estenderem as mãos sempre que precisei.

Ao Renato Graciano de Paula pelo auxílio experimental.

Ao Professor Roberto do Nascimento Silva e Cláudio Miguel da Costa Neto por disponibilizarem o uso de seus aparelhos.

Ao técnico Wander Cosme Ribeiro da Silva e a técnica Vera Lucia Aparecida Aguillar Epifânio pelo auxílio algumas vezes que precisei**.**

Aos técnicos do Deparatemento de Bilogia Celular Tereza, José e Bete pela realização das microscopias eletrônicas e **Vani** pela realização dos cortes histológicos utilizados neste trabalho..

Aos docentes da Bioquímica por compartilharem seus conhecimentos teóricos, práticos e que, direta ou indiretamente, contribuíram para a minha formação científica.

À todos os funcionário do Departamento de Bioquímica e Imunologia, principalmente a Maria Ivone Campos Fonseca e Rosimeire Ferreira da Costa Gonçalves.

RESUMO

Patrocínio, A.B. **Enzimas desubiqutindoras ligadas ao proteassoma são essenciais para a viabilidade do *Schsistosoma manoni*.** 2018. 99fs. Tese (Doutorado).- Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Rreto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O proteassoma 26S é uma estrutura em forma de barril com um núcleo catalítico 20S que é flanqueado por tampas 19S em ambos os lados. Nosso grupo tem demonstrado que o proteassoma 26S é crítico para o desenvolvimento e sobrevivência do *Schistosoma mansoni*, sendo que mais de 95% dos casais de vermes tratados com o inibidor de proteassoma MG132 apresentaram alteração na postura dos ovos e viabilidade. O tampão 19S é o complexo regulador e funciona no desdobramento e na desubiquitinação das proteínas, antes de sua entrada no complexo 20S, usando enzimas desubiquitinadoras (DUBS). Recentemente, foi demonstrado que a inibição das DUBS, UCHL5 e USP14, que estão reversivelmente ligadas à partícula 19S do complexo 26S, chamada b-AP15, resulta em autofagia, seguida de morte celular, pois leva uma variedade de células de mamíferos ao estresse oxidativo. O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito da droga sobre o desenvolvimento reprodutivo de *S. mansoni* e como possível alvo terapêutico, tendo como objetivos específicos determinar os seus efeitos: na inibição da oviposição *in vitro* de casais de parasitas *Schistosoma mansoni* através da contagem dos ovos e expressão do gene p14; avaliar se os órgãos reprodutores dos parasitas sofreram alguma modificação estrutural; se a substância utilizada leva a autofagia; se o tratamento dos casais de parasita com a droga leva a apoptose, ocasionada pela ativação de caspase-3. Este estudo é o primeiro a documentar o papel da droga b-AP15 como um agente esquistossomicida, pois desencadeia alterações ultraestruturais em casais de vermes de *S. mansoni*. Os seguintes métodos foram utilizados para analisar as alterações: Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), Varredura (MEV) e Confocal; ensaio quantitativo colorimétrico baseado no brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio (MTT), atividade do proteassoma através do substrato Suc-Leu-Le-Al-Tyr-AMC específico para atividade de *quimotripsina-like*; *western* blotting; Reação de Polimerase em Cadeia em tempo real e TUNEL. Foram testadas várias concentrações do fármaco (0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2 até 50 µM), sendo que a partir de 1,6 µM de b-AP15 ocorreu a inibição da produção de ovos dos casais de parasitas tratados *in vitro* por 24 h, não havendo alteração da viabilidade, mas mostrou alterações a partir da dosagem de 3,2 µM. A partir de 1,6 µM ocorreram alterações celulares e tegumentares e vermes adultos tratados com 50 µM estavam mortos. O *Western blotting* mostrou acúmulo de proteínas poliubiquitinadas de alto peso molecular na presença de 1,6µM, havendo mudanças na atividade *quimotripsina-like* do proteassoma 20S. Os resultados mostraram que o b-AP15 altera a oviposição, a viabilidade e leva à morte de casais de parasitas, reforçando a hipótese de que o sistema ubiquitina/ proteassoma e que as enzimas deubiquitinadoras ligadas a partícula 19S são essenciais para a biologia de *S. mansoni*.

Palavras-chaves: *Schistosoma mansoni*. Enzimas desubiquitinadoras. Proteassoma 26S. Oviposição. Sistema reprodutivo.

ABSTRACT

Patrocínio, A.B. **Desubiquitinating enzymes bound to proteasome are essencial for *Schsistosoma manoni*.** 2018. 99fs. Tese (Doutorado).- Department of Biochemistry and Immunology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

The 26S proteasome is a barrel structure with a catalytic core 20S that is flanked by 19S caps on both sides. Our group has been showed that 26S proteasomes are critical for *Schistosoma mansoni* development and survival, being that more than 95% of worms pairs treated with the proteasome inhibitor MG132 showed alteration on egg laying and viability. The 19S cap is the regulatory complex and functions in unfolding and deubiquitinating the proteins before their entry into the 20S complex using constitutive deubiquitinating enzymes (DUBS). Recently, it has been demonstrated that inhibition of the DUBS, UCHL5 and USP14, which are reversibly bound to the 19S particle of the 26S complex, called b-AP15 , results in cell death because it leads to autophagy, followed by cell death in a variety of mammalian cells. The general objective of this work was to evaluate the effect of the drug on the reproductive development of *S. mansoni* and as a possible therapeutic target. The specific objectives to determine its effects: in inhibiting the *in vitro* oviposition of couples of *Schistosoma mansoni* parasites by counting eggs and p14 gene expression; evaluate whether the reproductive organs of the parasites have undergone some structural modification; if the substance used leads to autophagy; if the treatment of the parasite couples with the drug leads to apoptosis, caused by the activation of caspase-3. This study is the first to document the role of the b-AP15 drug as a schistosomicidal agent, as it triggers ultrastructural changes in couples of *S. mansoni* worms. The following methods were used to analyze the changes: Transmission Electron Microscopy (MET), Scanning (SEM) and Confocal; Colorimetric assay based on 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), proteasome activity through Suc-Leu-Le-Al-Tyr-AMC substrate specific for chymotrypsin-like activity; western blotting; Polymerase chain reaction in real time and TUNEL. Various concentrations of the drug (0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 to 50 μM) were tested. 1.6 μM b-AP15 occurred the inhibition of egg production of couples of parasites treated in vitro for 24 h, with no change in viability, but showed changes from the dosage of 3.2 μM. Cell and tegumentary changes occurred in 1.6 μM and adult worms treated with 50 μM were dead. Western blotting showed accumulation of high molecular weight polyubiquitinated proteins in the presence of 1.6μM, with changes in the chymotrypsin-like activity of the 20S proteasome. The results showed that b-AP15 alters the oviposition, viability and leads to the death of couples of parasites, reinforcing the hypothesis that the ubiquitin / proteasome system and the deubiquitinating enzymes bound to the 19S particle are essential for the biology of *S. mansoni*.

Key-words: *Schistosoma mansoni*. Deubiquitinating enzymes. 26S Proteasome. Oviposition. Reproductive system.

Figura 1- Mapa de distribuição da doença..... 14

Figura 2-Ciclo de vida do parasita *S. mansoni*.. 16

Figura 3-Estrutura da partícula 19S..... 17

Figura 4- Estrutura do proteassoma 26S.. 19

Figura 5- Ativação da ubiquitina e o proteassoma 26S.. 20

Figura 6 - Loops BL1 e BL2 da Usp14.. 23

Figura 7 - Mudança conformacional de Rpn11.. 25

Figura 8-Regulação da UCH 37 através da interação com Rpn13DEU e NFRKBDEU.. 26

Figura 9- Estrutura química do inibidor das DUBs USP 14 e UCHL 5.. 29

Figura 10- Microscopia confoncal..... 37

Figura 11- Casais de parasitas adultos foram tratados in vitro em tempos diferentes na presença de concentrações crescentes do inibidor b-AP15.. 54

Figura 12 - Efeito in vitro de b-AP15 na viabilidade de casais maduros de *S. mansoni*, com ênfase nas mudanças de atividade motora dos casais, tratados por até 72h.. 55

Figura 13- Efeito in vitro na viabilidade de casais maduros de *S. mansoni* tratados por 24h com b-AP15 pelo ensaio MTT/formazan medido a 550 nm. 56

Figura 14- Expressão quantitativa do mRNA de SmP14.. 57

Figura 15- Atividade do proteassoma 26S de extrato de casais de parasitas com e sem a droga b-AP15. 58

Figura 16- Expressão quantitativa do mRNA de *SmUbiquitina*.. 59

Figura 17-Análise proteica de conjugados ubiquitinados.. 60

Figura 18- Microscopia de Varredura (MEV) de parasitas fêmeas incubadas com e sem a droga b-AP15 por 24 h.. 62

Figura 19- Microscopia de Varredura (MEV) de parasitas fêmeas incubadas com e sem a droga b-AP15 por 72 h.. 63

Figura 20- Microscopia de Varredura (MEV) de parasitas machos incubados com e sem a droga b-AP15 por 24 h.. 65

Figura 21- Microscopia de Varredura (MEV) de parasitas machos incubados com e sem a droga b-AP15 por 72h.. 66

Figura 22- Microscopia de Transmissão (MET) de parasitas fêmeas incubadas com e sem a droga b-AP15 por 24 h.. 68

Figura 23- Microscopia de Transmissão (MET) de parasitas fêmeas incubadas com e sem a droga b-AP15 por 72 h.. 69

Figura 24 -Microscopia de Transmissão (MET) de parasitas machos incubados com e sem a droga b-AP15 por 24 h.. 70

Figura 25 - Microscopia de Transmissão (MET) de parasitas machos incubados com e sem a droga b-AP15 por 72 h.. 71

Figura 26- Microscopia Confocal de parasitas fêmeas incubadas na presença e ausência da droga b-AP15 por 24h e 72 h.. 72

Figura 27 - Microscopia Confocal de parasitas machos incubados na presença e ausência da droga b-AP15 por 24h e 72 h.. 73

Figura 28- Expressão quantitativa dos mRNAs de SmCaspase 3 e 7.. 74

Figura 29- Atividade caspase- 3 de casais de vermes de *Schistosoma mansoni* incubados com e sem a droga b-AP15 por 24h.. 75

Figura 30- Quantificação relativa de caspase- 3..... 76

Figura 31- b-AP15 induz a fragmentação do DNA em parasitas fêmeas de *S. mansoni*.. 77

Figura 32- b-AP15 induz a fragmentação do DNA em parasitas machos de *S. mansoni. y*.... 78

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO **13**

1.1. Considerações iniciais sobre a esquistossomose 13

1.2 O sistema ubiquitina-proteassoma (UPS – Ubiquitin Proteasome System) 16

1.3 Enzimas desubiquitinadoras associadas à partícula 19S 22

1.4 b-AP15, um inibidor das DUBs USP 14/ UCH 37 e UCH-L5/ Ubp6 do complexo 27

1.5 Proteassoma 26S não é um sistema de degradação independente da autofagia-lisosssomal 30

1.6 O sistema ubiquitina proteassoma e a reversibilidade pelas DUBs em Schistosoma mansoni 33

1.7 O sistema reprodutivo do parasita e o estudo racional de drogas 36

2. OBJETIVOS **39**

2.1 Objetivos gerais 39

2.2 Objetivos específicos 39

3. METODOLOGIA **40**

3.1 Manutenção do ciclo de vida do parasita *S. mansoni* 40

3.2 Obtenção de vermes adultos de S. mansoni e cultura in vitro dos parasitas 40

3.3 Ensaio de viabilidade 41

3.4 Obtenção de extratos proteicos de casais de vermes adultos de *S.mansoni* para ensaio de atividade de caspase-3, proteassoma 20S e Western blotting 41

3.4.1 Extrato proteico solúvel total 41

3.4.2 Extrato de proteínas de vermes adultos enriquecido com proteassoma 26S 42

3.4.3 Extrato para ensaio de caspase-3 43

3.5 Western blotting para a detecção de proteínas ubiquitinadas e caspase-3 ativa 43

3.6 Ensaio da atividade do complexo 20S 44

3.7 Ensaio de atividade caspase - 3 44

3.8 Microscopia eletrônica para avaliação tegumentar, das estruturas reprodutivas e organelas dos casais de parasitas 45

3.8.1 Microscopias eletrônicas de varredura e transmissão 45

3.8.1.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) 46

3.8.1.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) 46

3.8.2 Microscopia eletrônica confocal 46

3.9 Análise de fragmentação do DNA pelo método Deoxinucleotidil transferase terminal mediada por incisão de dUTP-biotina e marcação de núcleo apoptótico (TUNEL) 47

3.10 Perfil de expressão dos RNAm, por reação de polimerase em cadeia quantitativo em tempo real (qRT-PCR) dos genes ligados a apoptose celular e p14 48

3.10.1 Extração de RNA total 48

3.10.2. Síntese do DNA complementar (cDNA) 49

3.10.3Reação de polimerase em cadeia quantitativa em tempo real (qRT-PCR) 49

3.11 Análises estatísticas 50

4. RESULTADOS 52

4.1 Efeitos do inibidor b-AP15 na produção diária de ovos dos casais de parasitas de *S. mansoni* 52

4.2 Efeitos do inibidor b-AP15 na viabilidade dos casais de parasitas de *S. mansoni* e na expressão quantitativa do mRNA de *SmP14* 54

4.3 A droga inibe parcialmente a atividade do complexo 20S de casais do parasita 57

4.4 Expressão quantitativa do mRNA de *SmUbiquitina* e proteínas ubiquitinadas 58

4.5 b-AP15 induz alterações no tegumento e organelas de vermes adultos de *S. mansoni* .. 60

4.6 Alterações nas estruturas reprodutivas dos casais de *S. mansoni* 72

4.7 O inibidor não altera a via apoptótica nos casais de *S. mansoni* tratados por 24h *in vitro* 73

5. DISCUSSÃO 79

6. CONCLUSÕES 88

7. BIBLIOGRAFIA 89

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações iniciais sobre a esquistossomose

Mundialmente, 52 países requerem o tratamento preventivo para esquistossomose tendo como uso a droga Praziquantel. Nesses países, 118,5 milhões de crianças em idade escolar fazem parte do grupo de risco. Em 2015, 34 países trataram a doença, correspondendo a uma cobertura de 65,4%, sendo que o tratamento foi dado a 50,1 milhões de crianças na idade escolar, correspondendo a 42,2% da taxa mundial da doença (WHO, 2016). Segundo WHO (2017), 90 milhões de indivíduos foram tratados da esquistossomose na África em 2016, sendo que 70,9 milhões pertenciam ao grupo de crianças em idade escolar e 18,3 milhões eram adultos. O maior número de casos de esquistossomose está na África, sendo que, em cada 10 pessoas, 9 são infectadas. No entanto, dos 41 países africanos onde o tratamento preventivo é necessário, somente 30 relataram seus dados para a WHO em 2016. Destes, 12 países atingiram 75% de cobertura do tratamento preventivo com a droga Praziquantel. Ainda em 2016, dos 95,2 milhões de adultos em área de risco, 18,3 milhões foram tratados preventivamente em 23 países. No mundo, o último dado mostra que 66,5 milhões de pessoas foram tratadas com esquistossomose em 2015 e 65,7 milhões em 2014.

Segundo El-Tonsy et al. (2013) a esquistossomose, após a malária, é a doença parasitária de maior prevalência no mundo, estando entre as 17 doenças negligenciadas que mostram prevalência entre as áreas socioeconomicamente excluídas. De uma forma geral, atinge principalmente pessoas em áreas rurais de países subtropicais e tropicais em 74 países dos continentes africano, asiático e americano **(Figura 1)**. Isso se deve, em parte, ao sucesso adaptativo do parasito sobre a espécie parasitada (ROLLISON et. al, 2012). Existem três espécies principais de *Schistosoma* que infectam humanos: *S. japonicum* que ocorre na Ásia, Filipinas e China; *S. haematobium* e *S. mansoni* que ocorrem na África e Oriente Médio, sendo que na América há somente o *S. mansoni* (COLLEY et al., 2014). Segundo Hotez (2018), a projeção para 2050 é o aumento do número de favelas nas grandes cidades e, consequentemente, a diminuição da infraestrutura e tratamento de água, aumentando o número de casos de doenças parasitárias como a esquistossomose.

No Brasil, a área endêmica da esquistossomose mansônica abrange 19 estados, concentrando principalmente nas regiões norte e nordeste, sendo que as regiões centro-oeste, sudeste e sul são de baixa prevalência, exceto em Minas Gerais. O Brasil apresenta

aproximadamente 25 milhões de habitantes expostos ao risco e cerca de 6 milhões de indivíduos infectados pelo parasito *Schistosoma mansoni*, apresentando o maior número de casos entre os países da América Latina e Caribe. No nordeste de Minas Gerais foi realizado um estudo com 506 crianças entre 6 e 15 anos com histórico de esquistossomose mansônica. As mesmas foram monitoradas após um ano de tratamento, com sucesso, com a droga Praziquantel. Destas, 111 foram reinfectadas. O estudo mostrou que, na região estudada, os principais fatores de risco foram os níveis socioeconômico e educacional (AMARAL, 2006; GAZZINELLI, 2017).

Dessa maneira, é importante salientar a importância do estudo de drogas que possam impedir a reinfecção. Em outro estudo realizado por Faria et al. (2017), foram avaliados 3245 pacientes atendidos no Instituto de Doenças Infecciosas Evandro Chagas (FIOCRUZ, RJ) com diversos tipos de parasitoses, apresentando, às vezes, mais de um tipo de parasita por indivíduo, sendo que o *S. mansoni* estava presente em 3,3% dos pacientes. Nesse caso estudado, os indivíduos apresentavam privação nutricional, sendo a doença influenciada pelas condições socioeconômicas. Pode- se dizer que as parasitoses intestinais, de uma maneira geral, persistem devido à falta de condições sanitárias (BASSO, 2008). O estado de São Paulo apresenta grande importância epidemiológica quando se diz respeito à esquistossomose, pois possuiu os três hospedeiros intermediários do parasita *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*, os quais estão distribuídos em córregos, lagoas, barragens e reservatórios nos municípios (PALASIO et. al, 2017). Dentro deste contexto, mostra-se o interesse no estudo da esquistossomose mansônica.

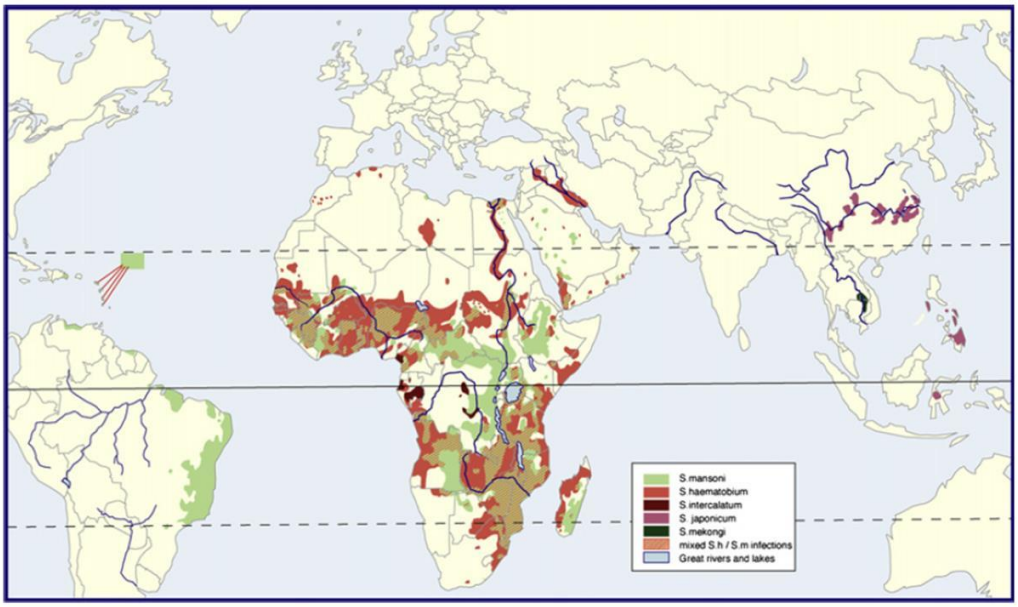

Figura 1- Mapa de distribuição da doença. A figura mostra o mapa da distribuição da esquistossomose no mundo. Adaptada de Human schistosomiasis (GRYSEEL, 2012, com permissão).

O *Schistosoma* pertence à classe Trematoda e ao filo Platelminto e vive por volta de 3 a 10 anos no seu hospedeiro vertebreado, podendo infectá-lo por até 40 anos. São heteroxenos e as fêmeas vivem acopladas dentro do canal ginecófaro dos machos, onde se desenvolvem e amadurecem seu sitema reprodutivo. Os parasitas se encontram fixados nas veias (porta hepática e mesentérica) de seus hopedeiros, onde se alimentam de células sanguíneas e globulinas, as quais são digeridas pelo trato digestivo, sendo os "debris" regurgitados no sistem sanguíneo de seus hospedeiros. Provem também do sangue a glicose e ácidos graxos, os quais são utilizados pelas fêmeas para a produção de ovos, além do metabolismo anaeróbico que também participa desse papel, sendo que o mesmo promove o movimento dos vermes machos (COLLEY et al.2014; GRYSEELS, 2012).

Os parasitos do gênero *Schistosoma* possuem um complexo ciclo de vida que envolve diversas formas do parasita **(Figura 2)**, nas quais ocorrem mudanças estruturais e metabólicas, requerendo a presença de um hospedeiro invertebrado e outro vertebrado. O hospedeiro vertebrado é infectado quando as cercárias liberadas na água pelos caramujos do gênero *Biomphalaria* (hospedeiro intermediário) penetram pela epiderme e derme e perdem a cauda, desencadeando o desenvolvimento dos esquistossômulos. Após a passagem pela epiderme, os esquistossômulos migram para as veias da derme e, ao encontrar a artéria pulmonar, são levados até os pulmões. Dos pulmões, eles chegam à circulação venosa e seguem ao sistema porta hepático. Neste ambiente, desenvolvem-se até vermes adultos e então ocorre o pareamento dos casais e a sua maturação sexual (KUNZ et al., 2001). Os vermes migram para as veias mesentéricas, onde acontece a postura dos ovos (PELLEGRINO; COELHO, 1978). Os ovos na parede do intestino podem induzir uma reação periovular inflamatória, expelindo-os pela luz intestinal (LENZI et al., 1987) ou, de outra forma, podem ficar retidos no fígado do hospedeiro. Nesse órgão, os ovos induzem a modulação da resposta imune através de células T $CD4^+$ auxiliar do tipo 2 (Th-2), levando ao desenvolvimento de reações granulomatosas aos redores dos ovos, os quais apresentam ao seu redor fibras de colágeno e grupos celulares como: neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e fibroblastos. Assim, eles são os maiores responsáveis pela patologia da doença, formando placas fibróticas (PEARCE; MACDONALD, 2002). Após a liberação dos ovos, através das fezes pelo hospedeiro definitivo, os ovos eclodem em contato com a água, liberando a forma larval denominada de miracidio. Uma vez liberados, os miracidios poderão infectar o seu hospedeiro intermediário. Após penetrarem pelas partes moles dos caramujos do gênero *Biomplalaria*, os miracidios, por poliembrionia, desenvolvem-se e originam as cercárias, completando desse modo, o ciclo de vida do parasito (KING, 2009).

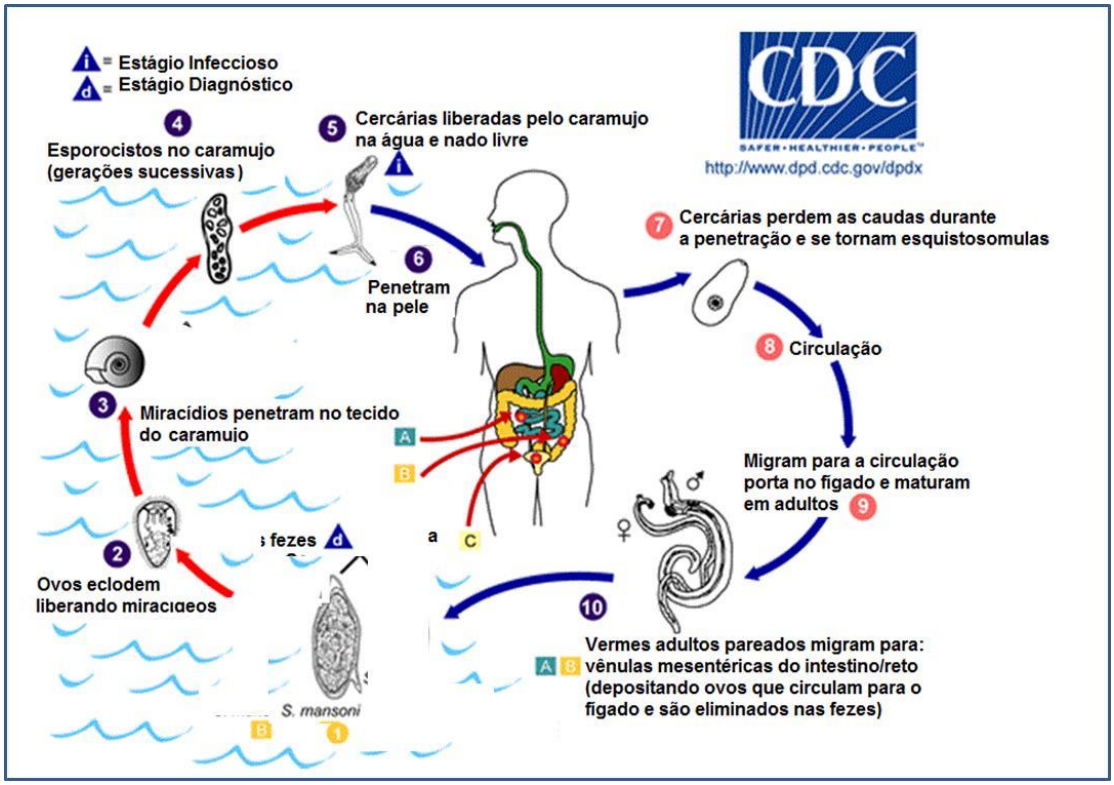

Figura 2-Ciclo de vida do parasita *S. mansoni*. A figura apresenta as formas do parasita S. mansoni (ovo, cercária, esquistossômulo, casais adultos, miracídeo) e seus hospedeiros intermediário (Biomphalaria glabrata) e definitivo (vertebrado).

1.2 O sistema ubiquitina-proteassoma (UPS – Ubiquitin Proteasome System)

O proteassoma 26S é um complexo macromolecular formado por múltiplas subunidades, sendo seus dois principais componentes a partícula reguladora chamada de 19S (RP) e a partícula catalítica conhecida como 20S (CP). Este complexo é responsável pela degradação de mais de 80% das proteínas celulares, mantendo a homeostase e regulando diversos processos celulares como: reparo do DNA, transcrição, apoptose, transdução de sinal, resposta ao estresse e apresentação de antígenos (GLICKMAN; CIECHANOVER, 2002). Este sistema não é simplesmente um componente celular responsável pela degradação de várias proteínas, sendo importante por selecionar somente aquelas proteínas que estão com algum defeito ou não tem mais função, como algumas proteínas reguladoras do ciclo celular, que são degradas em períodos precisos dentro do ciclo (SHABEK; CIECHANOVER, 2010).

A partícula 19S é composta por vários componentes responsáveis pelo reconhecimento dos substratos ubiquitinados, processamento dos mesmos e encaminhamento para o sitio catalítico para serem degradados. É formada por seis subunidades ATPásicas (Rpt1-Rpt6) e

subunidades não ATPásicas (Rpn1-Rpn13), as quais formam dois subcomplexos: a “tampa” e a “base” do proteassoma. A tampa é formada pela ligação entre as subunidades Rpn3, Rpn5-9, Rpn11 e Rpn12 e é responsável pela deubiquitinação de substratos para ocorrer a entrada dos mesmos no complexo. Esta partícula possui em sua estrutura duas grandes subunidades: Rpn1, que está ligada do lado de fora do anel 19S, e Rpn2, que está no topo do anel e se liga a Rpn10 e Rpn13 **(Figuras 3 e 4)**. Essas duas subunidades, assim como Rpn 1, são receptores de substratos e reconhecem a Ub indireta ou diretamente. O reconhecimento indireto ocorre através da ligação de uma família de proteínas que possui um domínio N-terminal ubiquitina-like (UBL), as quais adicionam receptores de ubiquitina (Ub) ao complexo. O reconhecimento de forma direta é feito através de outra família de proteínas, que possuem um C - t e r m i n a l (C-t) no domínio de associação Ub (UBA) que se liga em conjugados ubiquitinados. Duas subunidades são de grande importância: a Rpn11, que é uma metaloprotease, e Rpn 8, as quais serão citadas mais adiante (BARD et al., 2018; DE POOT, TIAN, FINLEY, 2017; D. HUSNJAK et al., 2008). A “base” possui no seu centro as seis subunidades Rpts.

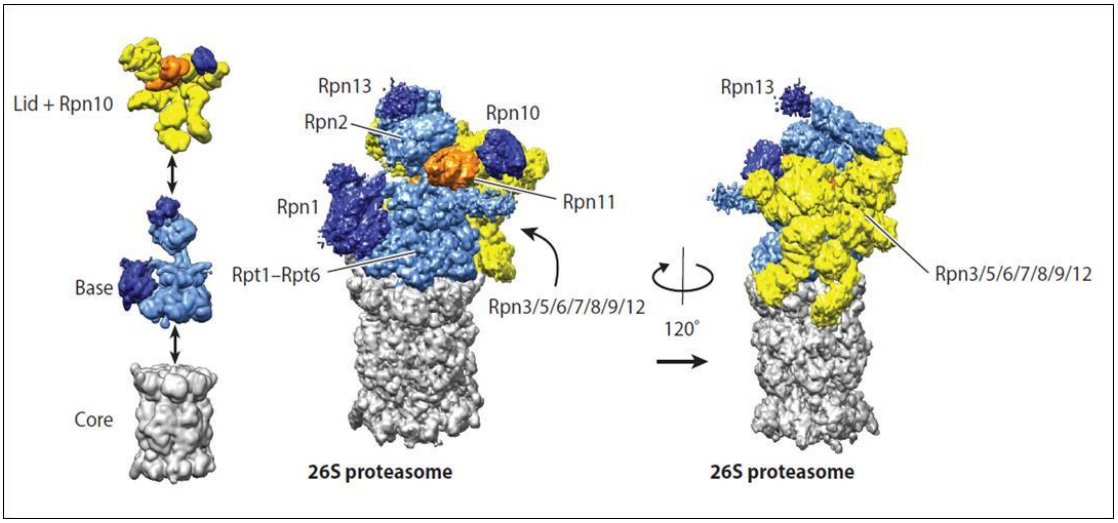

Figura 3-Estrutura da partícula 19S. O proteassoma 26S é composto de três subcomplexos: core-centro catalítico 20S (cinza); a base (com Rpn2 e as subunidades motoras Rpt1 – Rpt6 em azul claro e as subunidades de ligação a ubiquitina Rpn1 e Rpn13 em azul escuro);); e a tampa (com Rpn3, Rpn5, Rpn6, Rpn7, Rpn8, Rpn9, Rpn12 e Sem1 em amarelo, e o DUB Rpn11 em laranja). O receptor de ubiquitina Rpn10 é mostrado em conjunto com a tampa (azul escuro). Do lado esquerdo, os três subcomplexos são representados individualmente; No centro e a direita, toda a estrutura do proteassoma 26S é mostrada. A orientação central permite uma visão da entrada do poro central e o local ativo Rpn11, e a orientação correta, girada em 120◦, enfatiza o subcomplexo da tampa com sua estrutura em forma de as subunidades contendo o domio PCI (proteassoma-CSN-factor de iniciao 3). Adaptada de *Annual Review of Biochemistry* (BARD et al., 2018).

A partícula catalítica 20S **(Figura 4)** é formada por uma serie de anéis α e β, alinhados numa sequência de α(1-7) e β(1-7), sendo estas últimas situadas no centro do complexo. Nas

subunidades β1, β2 e β5 residem as atividades catalíticas, *caspase-like (C-L), trypsin-like (T-L)* e *chymotrypsin-like (CT-L).* As subunidades β catalíticas são sintetizadas como precursores, tendo propeptídeos N-terminais (N-t), os quais, durante a maturação do complexo, expõem o N-t da treonina, formando os três sítios proteolíticos distintos. As subunidades α formam o portão de entrada para as proteínas que serão degradadas, regulando a entrada dos substratos na câmara catalítica através dos N-ts das subunidades α, principalmente da subunidade α3. As subunidades α interagem tanto com o RP quanto com a câmara proteolítica, além de ter um sinal de localização nuclear (NLS) importante para a localização subcelular proteassomal (LIVNEH et al., 2016). Os mecanismos, tanto para a abertura do "portão", como de atividade do proteassoma, são regulados a partir da associação de partículas ao complexo: 19S RP, PA28, PA200, ECM29 e PI31, os quais possuem resíduos de aminoácidos hidrofóbicos. (CIECHANOVER; STANHILL , 2013; SHABEK et al., 2012;). As subunidades Rpn 2 e Rpn 10 interagem com a CP via as subunidades ATPásicas. Pesquisas recentes têm mostrado que as moléculas de ATP e substratos ligados à ubiquitina, quando estão presentes, promovem alteração da conformação do complexo, ativando-o (INOBE E MATOUSCHEK, 2014).

Desta maneira, a abertura do "portão" é variável, dependendo da conformação assumida pelo proteassoma, sendo quatro os principais estados conformacionais que variam de acordo com as interações com as subunidades Rpts. Esses estados são induzidos por interações diferenciais entre as caudas C-terminais das subunidades Rpt e a partícula central 20S. O C-t de Rpt6 faz contatos adicionais com o núcleo 20S, o que pode desencadear a abertura completa do portão observada neste estado (BARD et al., 2018).

O proteassoma também está presente em arqueobactérias e outras ordens de bactérias, como as actinomicetas, sendo conhecidas duas formas de proteassoma 20S. Uma em que o complexo é formado por 28 subunidades homoheptaméricas, parecido com de eucarioto, 14 α e 14 β, formando 2 anéis de sete subunidades α (externos) e 2 anéis de sete subunidades β (internos), com atividade peptidásica similar ao de eucariotos. A outra forma não é parecida com de eucariotos, pois não tem a ubiquitina como alvo para o reconhecimento de proteínas a serem degradadas, mas uma proteína chamada Pup, que é desordenada e não tem sequências estruturais como as caudas de ubiquitina, mas possuem a mesma função (LUPOLI et al., 2018).

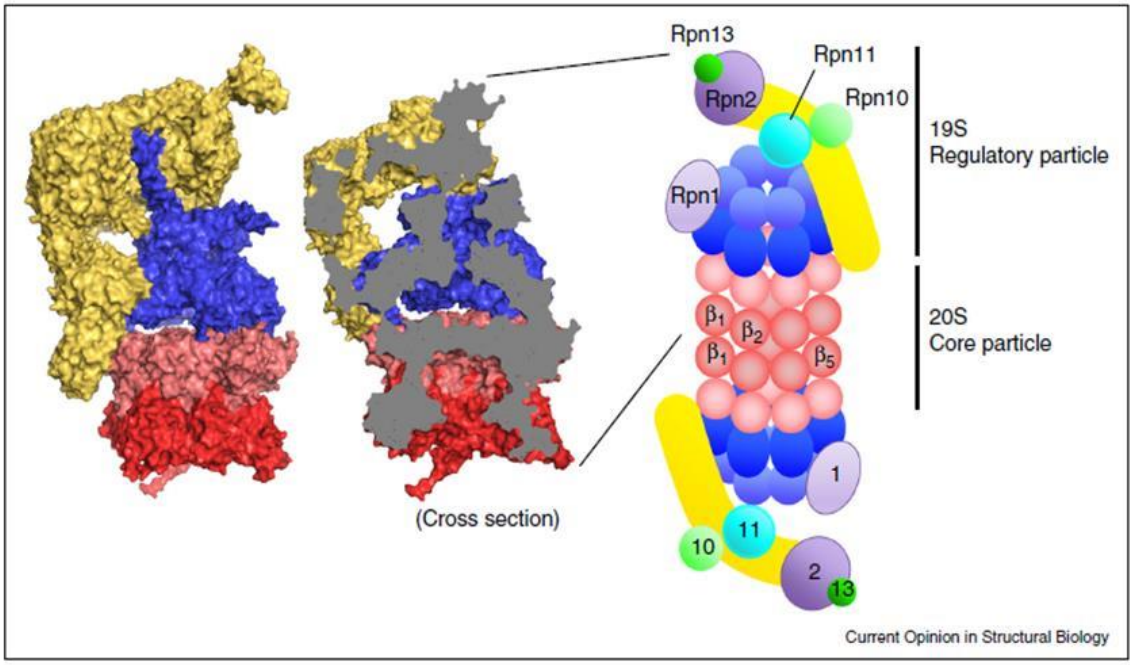

Figura 4 Estrutura do proteassoma 26S. A figura apresenta as duas partículas: 19S, reguladora, formada pelas subunidades ATPásicas (azul) e não ATPásicas (amarelo). As subunidades Rpn 1(roxo claro) e Rpn2 (roxo escuro), Rpn10-receptor de Ub (verde claro) e Rpn13 verde escuro) e Rpn11 –metaloprotease. A partícula 20S é formada pelas subunidades em vermelho claro e escuro. Adaptada de Current Opinion in Structural Biology (INOBE E MATOUSCHEK, 2014).

A via de modificação pós-traducional de proteínas dependente de ubiquitina tem um papel central na proteólise intracelular dependente do proteassoma 26S, sendo desvendada no fim da década de 80 e início da década de 90 (GLICKMAN; CIECHANOVER, 2002, *review*). Segundo Pickart (2001), esta via de modificação é um processo dinâmico, reversível e controlado pela ação de múltiplas enzimas distintas. A conjugação da ubiquitina é catalisada pela ação sucessiva de três enzimas: a primeira etapa ocorre pela ação da enzima ativadora de ubiquitina (E1), formando um intermediário através de uma ligação tiol éster; na segunda etapa, a Ub ativada por E1 é transferida para um resíduo de cisteína de uma de várias enzimas conjugadoras, chamadas de E2, formando um novo intermediário tiol éster, o qual transfere diretamente a Ub para o substrato, ou através da interação com uma enzima E3 ligase faz essa transferência, sendo essa a terceira etapa **(Figura 5).** As enzimas E3 ligases estão divididas em três famílias que são classificadas a partir de seus domínios (EBNERAL, VERTEEGB, IKEDAA, 2017): *HECT*, o qual possui um resíduo Cys que recebe a Ub ativada de E2, formando um intermedíário tiol-éster e transfere a Ub para o substrato e um domínio NH2-terminal que varia entre as E3 ligases e se liga ao substrato; *RING* que possui dois resíduos conservados Cys e His que se ligam ao íon Zn e são responsáveis por posicionar as E2 e transferir a Ub diretamente para o substrato e *RING*-

between-RING (RBR): essas enzimas utilizam os dois mecanismos citados anteriormente. Além da degradação mediada pelo complexo, na qual a Ub dita a ordem em que as proteínas serão degradadas, essa pequena proteína de 76 aminoácidos também participa de uma grande variedade de funções celulares. A versatilidade da ubiquitinação é devido à presença de sete resíduos de lisina na ubiquitina nas posições 6, 11, 27, 29, 33, 48, e 63, os quais podem servir como sítio de ligação para outras moléculas de ubiquitina (GLICKMAN; CIECHANOVER, 2002).

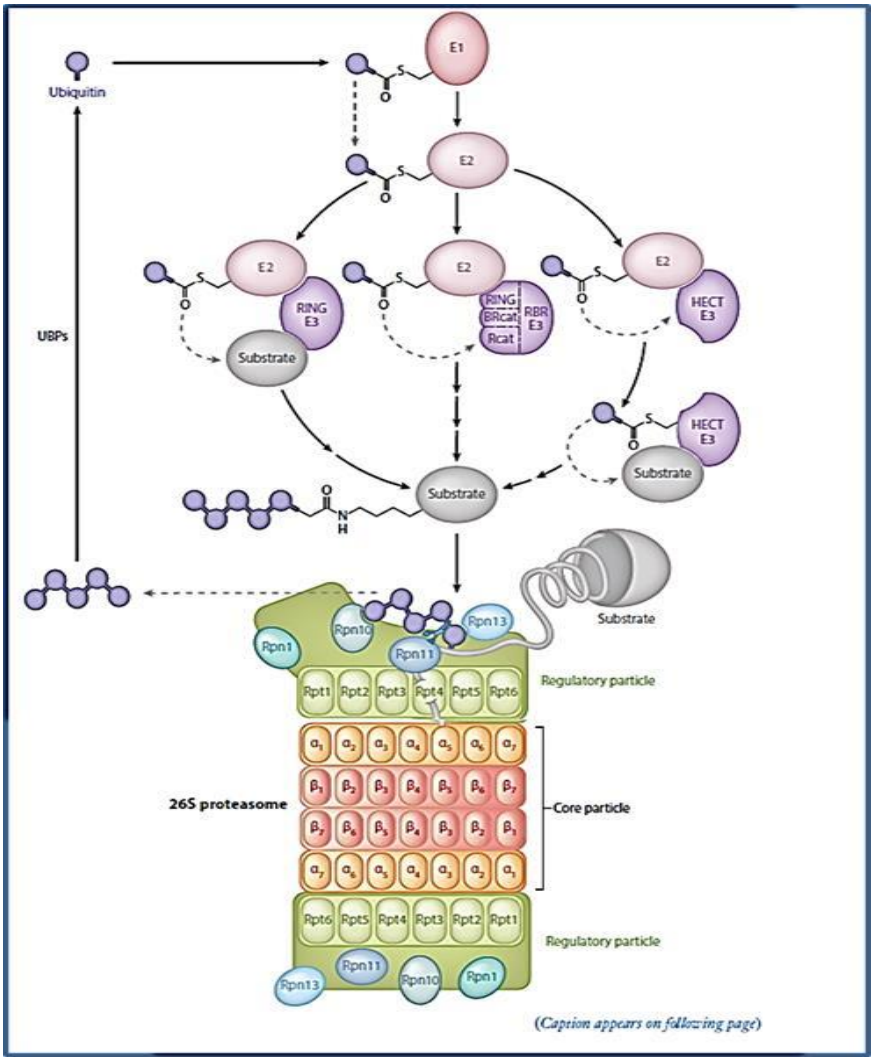

Figura 5- Ativação da Ubiquitina e o proteassoma 26S. A enzima ativadora E1 transfere a Ub para a enzima conjugadora E2 que junto com enzima E3 ligase, transfere a Ub para a proteína alvo, formando em seguida o substrato poliubiquitinado que é reconhecido pelos reconhecido pelos receptores de Ub do RP (Rpn1, Rpn 10 e Rpn 13) e deubiquitinado por Rpn11 e degradado pelo CP pelas subunidades β1, β 2 e β 5. A cadeia de poliubiquitinada é liberada e clivada em monômeros de Ub.

A partir da ligação da Ub com o substrato, este pode ser mono ou poliubiquitinado através da ligação dos resíduos de lisina entre as ubiquitinas. A cadeia de poliubiquitina é

formada pela ligação entre os resíduos de lisina (K) das Ub, sendo que a ligação da cadeia ao substrato ocorre pela formação da ligação isopeptídica do grupo Ct da glicina (Gly) 76 da Ub com o amino grupo do resíduo de lisina do substrato, podendo ocorrer, raramente, entre o N terminal da cadeia de Ub e a Cisteína (Cys) do substrato proteico (KOMANDER, 2012; PICKART, 2000; SHABEK et al., 2012). Para a degradação mediada pelo proteassoma, a proteína necessita estar marcada com no mínimo uma cadeia com quatro moléculas de Ub, sendo que a afinidade pelo substrato com quatro moléculas de Ub, ao invés de duas, é 100 vezes maior. Seria necessário, ainda, que proteínas monoubiquitinadas fizessem parte somente de processos de transmembrana e regulação transcricional. No entanto, atualmente isso é um paradigma, pois diversas pesquisas têm demonstrado que proteínas monubiquitinadas são sinais para a proteólise dependente de proteassoma. Um estudo mostrou que as proteínas mais curtas, menores que 150 resíduos, podem ser degradados por monoubiquidação, mas que necessitam ter no mínimo 20 resíduos de aminoácidos. Proteínas mais longas requerem poliubiquitilação para promover sua proteólise eficiente. Dessa maneira, pode-se dizer que o tamanho do substrato dita o tamanho da cadeia de Ub necessária para a degradação (SHABEK et al., 2012).

Quanto ao tipo de ligação, K48 foi identificada como o sinal canônico para degradação pelo proteassoma 26S, entretanto, alguns alvos podem utilizar a sinalização mediada por K11 como sinal de degradação dependente do complexo, particularmente em proteínas reguladoras do ciclo celular e em substratos de retículo endoplasmático (BABOSHINA; HAAS, 1996; KIRKPATRICK et al., 2006; MEVISSEN e KOMANDER, 2017). K29 tem sido associada com a degradação de substratos ubiquitinados (JOHNSON et al., 1995; MEVISSEN e KOMANDER, 2017). K63 é tipicamente implicada em funções independentes do proteassoma, tais como: sinalização celular, tráfico intracelular e resposta a dano ao DNA, sendo que as proteínas marcadas por ela são degradadas por via lisossomal (MEVISSEN e KOMANDER, 2017).

Semelhante a fosforilação, a ubiquitinação é uma modificação reversível, rápida e específica. A desubiquitinação, a reversão deste processo, é estritamente controlada por enzimas desubiquitinadoras. Há cerca de 100 DUBs funcionais em humanos, que são divididas em cinco subfamílias: *ubiquitin C-terminal hydrolases* (UCH), que ligam-se fracamente a diubiquitinas; *ubiquitin-specific proteases* (USP or UBP), *ovarian tumor proteases* (OTU), *Machado-Joseph disease proteases* (MJD), que ligam-se fracamente a diubiquitinas; *JAB1/MPN/Mov34* metaloenzimas que são específicas para a ligação K63

(JAMM) e *MYND* que se ligam especificamente a K48 (revisado por CLAGUE et al., 2013; KOMANDER e MEVISSEN, 2017). A desubiquitinação é importante para a geração de monômeros de ubiquitina a partir de precursores e das cadeias poliubiquitinadas (AMERIK; HOCHSTRASSER, 2004). Assim como existe especificidade do tipo de ligação mediada por E2, também existe para DUBs.

As DUBs podem atuar em vários níveis da via de ubiquitinação, estando envolvidas tanto com a formação da ubiquitina livre, como na remoção da ubiquitina dos conjugados proteicos mono ou poliubiquitinados. Neste último caso, elas funcionam como um ponto de regulação extra da via proteolítica dependente do proteassoma 26S, uma vez que os substratos poliubiquitinados são os alvos naturais dessa via metabólica (WILKINSON, 1997). Estas enzimas também estão envolvidas na remoção da ubiquitina das proteínas que regulam o ciclo celular durante a mitose (AMERIK; HOCHSTRASSER, 2004). Devido a estas funções, a desubiquitinação vem sendo relacionada a diversos processos celulares como, por exemplo, no crescimento e diferenciação, memória, oncogênese, regulação do DNA e estruturas dos cromossomos (CHUNG; BAEK, 1999, VOGEL et al., 2015).

Estudos recentes mostraram que ocorre a autoubiquitinação das E3 ligases e que as DUBs são responsáveis pela deubiquitinação dessas enzimas ligadoras de ubiquitina, assim como delas mesmas, pois estas também sofrem ubiquitinação, formando uma rede de controle de processos celulares e degradação de proteínas. Há pelo menos 600 E3 ligases em humanos e, aproximadamente, 20.000 sítios de ubiquitinação em milhares de proteínas intracelulares que podem ser detectados. No entanto, o número de DUBs é relativamente pequeno e, consegue regular um número tão vasto de modificações. (HAQ e RAMAKRISHNA, 2017; LEZNICKI e KULATHU, 2017).

1.3 Enzimas desubiquitinadoras associadas à partícula 19S

Existem três DUBs associadas à partícula 19S: Rpn11/Poh1/PSMD14 (JAMM), USP 14/ UCH 37 (USP/UBP) e UCH-L5/ Ubp6 (UCH). Estas regulam a degradação de proteínas ubiquitinadas e estão relacionadas com a atividade do UPS, pertencendo a três famílias distintas e demonstrando a evolução do complexo, sendo que Rpn 11 está vinculada a desubiquitinação de proteínas em estados mais tardios e as outras duas no estágio inicial de degradação (LEZNICKI e KULATHU, 2017).

Tanto a USP 14 como a UCHL 5 possuem domínios *Fingers, Palm* e *Thumb*. Na enzima USP 14, a Ub se liga ao domínio Finger e promove a formação de um sulco entre seus dois outros domínios. Na forma inativa, a enzima possui dois loops BL1 e 2, dentro do sulco em que a Ub se liga, bloqueando o acesso da mesma a enzima. A ligação com a Ub promove a liberação do sulco, formando a ligação do Ct da Ub no sulco **(Figura 6)**.

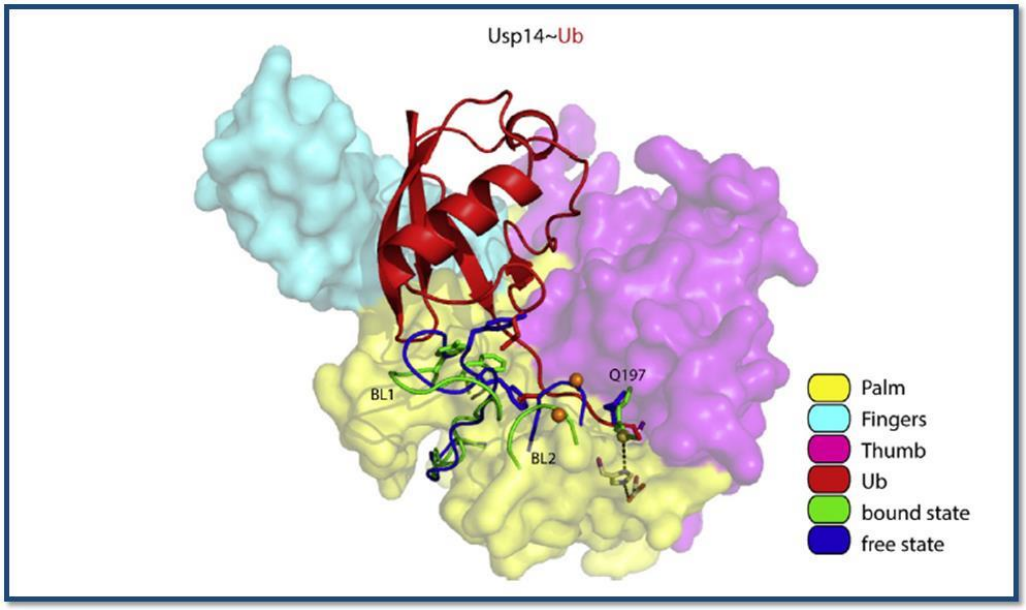

Figura 6 - Loops BL1 e BL2 da Usp14. A figura mostra a tríade catalítica formada pelos domínios Palm, Thumb e Fingers. A figura mostra os loops BL 1 e 2. No que o estado livre está representado pela cor azul escuro e o estado ligado pela cor verde, sendo que quando a Ub se liga, Q197 se vira. O grupo tiol da Cys é representado por esfera amarela e a Ser 432 fosforilada por esfera laranja. Adaptada de Journal of Molecular Biolog (DE POOT, WORDEN, DONG e MARTIN, 2017).

A USP 14/ UCH 37, ligada à base da partícula 19S, reconhece proteínas ubiquitinadas incorretamente e que não deveriam ir para a degradação, além de substratos a serem degradados. Ela corta cadeias de ubiquitina por clivagem interna, remove ubiquitinas ramificadas dos substratos e se liga a subunidade Rpn13 através do C-terminal domínio UDL (DE POOT, 2017; WORDEN, DONG e MARTIN, 2017). Ao se associar ao complexo causa mudanças alostéricas, sendo o seu maior regulador negativo, promovendo a abertura da partícula 20S (LEE et al., 2016). Segundo os autores citados anteriormente: “A atividade da USP14 depende da arquitetura das cadeias de ubiquitina no substrato e não simplesmente a ligação do substrato ao proteassoma.”, sendo que inibidores da USP14 produzem efeitos seletivos sobre o *turnover* de substratos do proteassoma. Quando fosforilada por AKT no resíduo de Ser 432, localizada dentro do *loop* BL 2, a USP 14 é ativada independente do

proteassoma e é capaz de clivar a ubiquitina em Lys 48 da cadeia de poliubiquitina de proteínas para estabilizar substratos que seriam degradados.

Segundo De Poot (2017), USP 14/ UCH 37 e UCH-L5/ Ubp6 possuem um domínio N-terminal ubiquitina-*like* (UBL) e um domínio catalítico C-terminal. O receptor proteassomal para Ubp 6 é a Rpn 1, sendo que o domínio UBL que se liga em Rpn 1 é o mesmo que a Ub se liga na DUB, mas em sítios diferentes e adjacentes. Uma característica desta DUB é que ela não possui efeito catalítico, inibindo a degradação de proteínas através da ligação da Ub ao sítio ativo da Ubp6 e USP14, sendo que esse efeito depende do arranjo do grupo de Ub ligada ao substrato. Além disso, a inibição pode ocorrer também quando seu domínio catalítico de ligação a Ub interage com as subunidades Rpt 1e Rpt 2 do proteassoma. No entanto, Ubp 6 e USP 14 também podem ativar o proteassoma e abrir parcialmente o canal de CP. No entanto, a USP 14 não é capaz de substituir a subunidade Rpn 11.

A enzima desubiquitinadora Rpn 11 é ativada por hidrólise de ATP, diferentemente das UCHL 5 e USP 14, sendo responsável pela clivagem da ubiquitina proximal da cadeia de poliubiqitina e estando localizada na tampa da partícula 19S, como dito anteriormente (LEE et al., 2016; LEZNICKI e KULATHU, 2017; MERISSEN e KOMONDER, 2017). Worden, Dong e Martin (2017), em estudo realizado em *S. cerevisiae*, mostraram que a ligação com a ubiquitina, da cadeia de substratos poliubiquitinados, faz com que haja uma mudança conformacional de Rpn 11 complexada com Rpn8. Isso faz com que aconteça a alteração de um loop inativo (Insert-1) para uma estrutura de β hairpin ativa **(Figura 7)**, sendo essa conversão o limitante da velocidade de desubiquitinação e entrada do substrato na câmara proteolítica dependente de ATP (AAA+), sendo a translocação do substrato acelerada por este último mecanismo. A atividade do heterodímero Rn11-Rpn8 é inibida com a interação com Rpn5 que fecha o loop Insert-1 e Rpn9 que bloqueia Rpn8 (DE POOT, 2017; WORDEN, DONG e MARTIN, 2017).

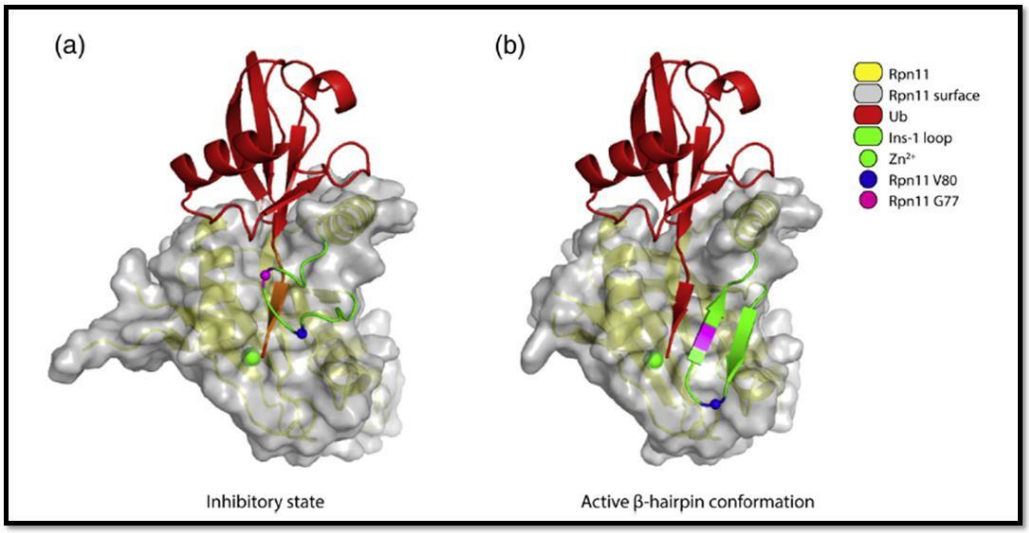

Figura 7 - Mudança conformacional de Rpn11. (a) Conformação inativa de Rpn11 está complexada com Rpn8. O estado pouco ativo de Ins-1 limita a ligação do C-t da Ub no síttio ativo (b) Após a ligação da Ub ao complexo Rpn11-Rpn8, onde ocorre a formação da estrutura de β hairpin ativa. A habilidade do loop Ins-1 para assumir estados ativos e inativos é uma adaptação refinada pelo acoplamento deubiquitinação-degradação. Adaptada de Journal of Molecular Biolog (DE POOT, WORDEN, DONG e MARTIN, 2017).

Segundo D'Arcy e Linder (2012), a enzima USP 14/UCH 37 se associa à partícula 19S pela subunidade Rpn13, a qual é ativada através do domínio ULD, sendo uma das DUBs requeridas para a clivagem da cadeia de poliubiquitina. Alguns estudos têm demonstrado que essa enzima tem substratos específicos, como a oxido nítrico sintetase e LKB, o que mostra a possibilidade da enzima ter uma duplicidade regulatória em relação ao complexo, suprimindo ou ativando a degradação de proteínas específicas.

Além disso, há um *crossover loop* (ASCL) que é liberado pela ligação com Rpn 13, fazendo com que a enzima fique em sua forma inativa. O domínio conservado de Rpn13 contém NFRKB^{DEU} que, ao interagir com os resíduos Tyr135 e His164 da enzima, acarreta na interrupção de sua atividade catalítica **(Figura 8)** (ARPALAHTI et al., 2017; DE POOT, WORDEN, DONG e MARTIN, 2017). Estudos recentes têm mostrado que a baixa expressão desta DUB associada ao complexo impede a degradação de certos substratos proteicos, o que por sua vez pode desencadear a apoptose. Em pesquisas, foi descoberto que a associação com Rpn13 está envolvida na manutenção da progressão do ciclo celular e replicação do DNA (ARPALAHTI et al., 2017).

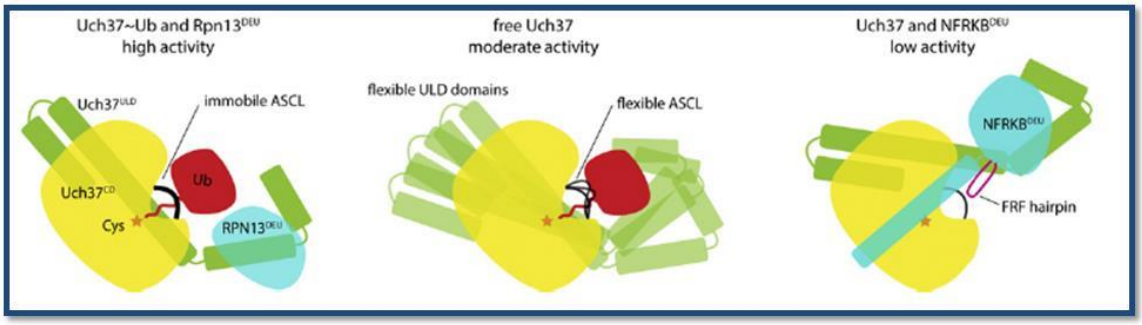

Figura 8-Regulação da UCH 37 através da interação com Rpn13DEU e NFRKBDEU. Representação da UCH 37 em vários níveis de atividade. Uch37 livre é representada no centro, Uch37 ligada a Rpn13DEU à esquerda e NFRKBDEU à direita. As linhas pretas representada no centro, Uch37 ligada a $Rpn13^{DEU}$ à esquerda e $NFRKB^{DEU}$ à direita. As linhas pretas representam a mobilidade do *loop* ASCL. Adaptada de Journal of Molecular Biolog (DE POOT, WORDEN, DONG e MARTIN, 2017).

Estudos em *C. elegans*, de seu ortólogo UBH-4 com RNAi, mostraram sua interação com a molécula de ATP e que, ainda, a sua ausência interfere parcialmente na diminuição no tempo de vida e tamanho do parasita. Atualmente, os inibidores, tanto de USP 14, como de UCHL 5, tem sido alvo de terapia para células cancerígenas devido à resistência das mesmas ao tratamento convencional (ARPALAHTI et al., 2017).

A regulação das DUBs Rpn11, UCHL5 e USP 14 ocorre através das diferentes clivagens que fazem em relação à cadeia de poliubiquitina, existindo três tipos delas: a clivagem distal, que remove a Ub do final da cadeia; a clivagem proximal ou *en bloc*, que cliva a primeira Ub ligada ao substrado, separando toda a cadeia e as clivagens que removem vários grupos de ubiquitina de uma só vez, mas não toda a cadeia, conhecidas como clivagens endo (DE POOT, WORDEN, DONG e MARTIN, 2017).

Os autores supracitados descrevem que, em relação a Rpn11, esta ajuda na translocação da proteína a ser degradada para dentro da câmara catalítica através da retirada da cadeia de Ub. Caso ocorra uma falha nesse sistema e a Ub não for retirada, a mesma cria uma barreira para o substrato, que não será degradado. Esta DUB é altamente promíscua e cliva vários tipos de cadeias de Ub de forma proximal, mas não internamente. A Ub possui uma estrutura globular e o pequeno espaço entre o proteassoma e a Rpn 11 faz com que a Ub seja expulsa e não seja degradada. A USP14 livre cliva cadeias livres de Ub em baixa atividade. A clivagem é distal, sendo que a degradação de substratos ligados a cadeias de Ub e a USP 14 ligadas ao proteassoma ocorre em milissegundos. Quando ligada ao proteassoma, ela remove as cadeias de forma proximal, e não de forma distal. USP 14 e Rpn11 agem em conjunto, pois Rpn11 é ATP dependente e age após o reconhecimento do substrato pela USP 14, que age antes no substrato ubiquitinado, pois não precisa de ATP para estar ativa. A UCHL 5 remove de forma distal uma ubiquitina por vez de cadeias com três moléculas

(triUb) e remove a Ub com cadeias de vários tipos de ligações. Atualmente, sabe-se que a USP 14 parece ser crítica para neurônios motores em relação às suas estrutura e função; UCHL5 tem sido implicada na replicação do DNA e ciclo celular; via de sinalização TGF β,longevidade, migração celular (ARPALAHTI et al., 2017).

Sabe-se que a inibição de Rpn11 acarreta no acúmulo de proteínas conjugadas a Ub de alto peso molecular. Além da reciclagem de ubiquitina, muito pouco é conhecido a respeito das reais funções destas DUBs associadas ao proteassoma. Sabe-se que a depleção da Rpn11 (Poh1- subunidade da partícula 19S), através de siRNA, interfere com a montagem do complexo. Por outro lado, a depleção da USP 14/UCH37 isolada aumenta a degradação de proteínas (SONG, 2006), mostrando que ambas atuam na atividade proteolítica e que a ausência de uma delas é compensada pela integridade da outra.

Recentemente, foi descoberto que o proteassoma pode variar, tanto enzimaticamente, como em sua composição, dentro e entre as células, e em condições fisiológicas distintas, principalmente na partícula 19S. Essa heterogeneidade promove o desenvolvimento de medicamentos que tem como alvo proteassomas específicos para o tratamento de mielomas, doenças neurodegenerativas e doenças inflamatória, como por exemplo através da ativação ou inibição de uma subpopulação de proteassomas específicos para essas doenças, permitindo uma terapia seletiva (KUO e GOLDBERG, 2017).

1.4 b-AP15, um inibidor das DUBs USP 14/ UCH 37 e UCH-L5/ Ubp6 do complexo

Atualmente, o principal foco de estudo do proteassoma 26S são drogas que agem no complexo e possam ser usadas como tratamento de doenças, como o câncer, pois o mesmo está envolvido na homeostase e controle de vários processos essenciais celulares (controle ciclo celular, supressor de tumor p53, apoptose e regulação de fatores transcricionais), os quais estão alterados em células cancerígenas. Alguns inibidores proteassomais (PIs) estão sendo estudados recentemente. Um deles é o bortezomib, que faz parte da primeira geração de PIs e foi o primeiro aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de linfomas e mielomas múltiplos. Depois, foi desenvolvida a segunda geração de PIs, como o ixazomib e o carfilzomib. Os PIs causam efeitos celulares como: acúmulo de proteínas poliubiquitinadas e agregados proteicos que causam estresse no RE; a não degradação do inibidor do fator de transcrição NFκβ, responsável pelo controle da apoptose celular e algumas proteínas como p53 e da família BCl-2, as quais são pró-apoptóticas e são

estabilizadas, induzem a autofagia através da degradação de proteínas poliubiquititinadas por via lisossomal (ROETEN, 2017).

A droga b-AP15 (3,5-bis [(4-nitrophenyl) methylidene]-1-prop-2-enoylpiperidin-4-one, NSC687852), uma nitrofenilpiperidina, é um inibidor reversível de USP14 e UCHL-5. Essa droga induz a apoptose por via lisossomal dependente de catepsina-D, a apoptose via o fator de transcrição AP-1 e a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em algumas células de tipos diferentes de câncer. Promove também o acúmulo de inibidores do ciclo celular dependentes de quinases, como CDKN1A, CDKN1B. Em muitas células de linhagem de mielomas, ativa tanto a apoptose intrínseca como a extrínseca via caspases 7, 8 e 9, ativando e clivando pro-caspase-3. Também é capaz de induzir a apoptose independente de p53 e ativar as proteínas pro apoptóticas como BCl 2, que faz parte da regulação da apoptose mitocondrial e também a proteína BAX, havendo perda de potencial de membrana (FENG, 2013).

Desta maneira, tem sido intensamente estudada como uma das alternativas para alguns tipos de cânceres. Pesquisadores que testaram a droga b-AP15 descrevem que ela inibe a atividade das DUBs UCHL 5 e Ubp 6 ligadas de forma reversível ao proteassoma sem inibir a atividade da partícula 20S, havendo o acúmulo de conjugados ubiquitinados de alto peso molecular e inibindo somente o 19S (AVHANDLING. A, 2017; CHITTA et al, 2015; OH et. al, 2017; SARHAN et al., 2013). No entanto, em relação à inibição de 20S há controvérsias. Em ensaios *in vitro* realizados por Huang, Jung e Chen (2014), para testar a influência do inibidor na atividade *quimiotripsina-like*, ocorreu 50% de inibição da partícula 20S na concentração de 18,1 µM (IC 50), sendo que a dosagem de (IC50) 40,6 uM inibiu fracamente a atividade *tripsina-like* e não inibiu a atividade *caspase-like*, sendo que a inibição da partícula 19S ocorreu em uma concentração de (IC50)15,2 µM. A explicação para esse fenômeno é dada devido à ligação promiscua do inibidor ao complexo 26S, pois a molécula do b-AP15 possui múltiplos aceptores de Michael **(Figura 9)** que interagem com os grupos hidroxila e sulfidrila dos aminoácidos das proteínas (CHITTA et al, 2015; WANG et al., 2014).

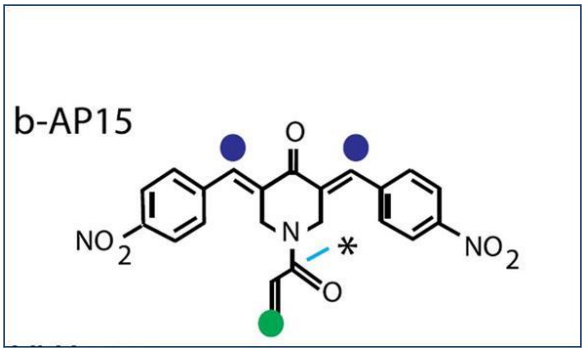

Figura 9 Estrutura química do inibidor das DUBs USP 14 e UCHL 5. Em verde os aceptores de Michael e em azul αβ- grupos carbonilas não saturados. Devido a sua estrutura o b-AP15 possui baixa solubilidade em DMSO o que está levando a sintetizar alguns análogos d análogos da moléculas. Até o momento são dez, os análogos, dentre eles VLX1570 (70 % da capacidade do IC50 de b-AP15) e é solubilizado PBS. VLX1561-1567 que é similar ao VLX1570. Adaptado de MOLECULAR PHARMACOLOGY (WANG et al., 2014).

Estudos farmacológicos mostraram que b-AP15 é reversível, apesar de possuir tirosina e lisina disponíveis para estabilização nos nitrogênios carregados de grupos −NO2, permitindo a estabilização em longo prazo. Estudos bioquímicos sugeriram que b-AP15 tem uma maior afinidade para USP14 e foi mais eficaz na inibição da sua atividade em comparação com UCHL5. A droga foi testada em diversas células: carcinoma de cólon HCT116, A549 , HeLa, MelJuSo e o IC50 para essas células ficou entre 2,8 uM e 16,8 uM. Em células HCT116, as DUBs proteassomais, mostraram estar inibidas com 1 uM da droga e o acúmulo de proteínas ubiquitindas via K 48 foi baixo nessa dosagem, havendo o início do estresse oxidativo. Em estudos realizados por esses autores, na análise de *imunoblotting*, as proteínas da maquinaria de chaperona e resposta ao estresse ER/UPR se apresentavam induzidas (XBP1u e XBP1s) (CHITTA, 2015; WANG et al. , 2014).

Em experimentos realizados *in vivo* por D'arcy et al. (2011), utilizando b-AP15, ocorreu uma inibição da progressão do tumor. Camundongos com câncer de pulmão e leucemia foram tratados com redução da metástase pulmonar e da progressão da leucemia em relação ao grupo controle tratado com o veículo. Os camundongos leucêmicos do grupo controle apresentaram hepatoesplenomegalia e invasão massiva das células mielóides do fígado, sendo que no grupo tratado com b-AP15, os hepatócitos se apresentavam estruturalmente normais e sem infiltração leucêmica. Vogel e col. (2015) também investigaram células de câncer de mama utilizando dois inibidores de DUBs, o b-AP15 e RA-9, sendo que os dois causam autofagia. Segundo eles, o tratamento das células com b-AP15 causou uma ativação dose dependente de caspase-3 e apoptose que ocorrem bem depois do estresse proteotóxico, sugerindo que a apoptose medeia a morte celular como um mecanismo compensatório em resposta ao estresse desenvolvido no sistema proteassoma-ubiquitina. No entanto, a autofagia celular ocorreu bem antes da apoptose.

Atualmente, sabe-se que o inibidor leva tanto ao estresse do reticulo endoplasmático, como a ativação do estresse oxidativo, através da ativação da via *Jun-N-terminal kinase 1/2 (JNK)/activating protein-1*, levando à apoptose células HCT116 (BRNJIC et al., 2014). Segundo Oh et al. (2017), o que ocorre em relação a apoptose de células cancerígenas é um efeito modulatório da droga b-AP15 na ativação do receptor de morte 5 (DR5), havendo o aumento da expressão do mesmo na superfície celular, levando, então, as células à apoptose.

Segundo Johnston et al. (2015), não só nos parasitas que causam fibrose crônica, mas no seu hospedeiro, ocorre o aumento na expressão da via TGF ß, assim como a imunodepressão no hospedeiro. Dessa maneira, há uma homeostase da infecção crônica e o parasita fica alojado no hospedeiro por um longo tempo. Uma pesquisa realizada por Nan et al. (2016), em células HLF tratadas *in vitro*, mostrou que UCHL-5 estabiliza as Smads 2 e 3, envolvidas na via TGF β, fazendo com que haja o aumento de proteínas pró-fibróticas e deposição de colágeno, levando à fibrose pulmonar. Assim, as células foram tratadas com o inibidor b-AP15, havendo a degradação dessas proteínas não por via proteasomal, mas lisossomal, devido ao *croosstalking* entre as vias de degradação. Seguindo essa linha de pesquisa, foi feita histologia do pulmão de camundongos com fibrose pulmonar, a qual foi induzida por bleomicina, e tratados depois com o inibidor b-AP15 (2,5 mg/Kg/ 1x ao dia), havendo diminuição do colágeno e redução da fibrose pulmonar.

1.5 Proteassoma 26S não é um sistema de degradação independente da autofagia-lisosssomal

O proteassoma 26S é responsável pela degradação de pequenas proteínas ligadas a ubiquitina, sendo um processo mais seletivo, degradando proteínas de vida curta dobradas erroneamente e também proteínas de vida longa que são as que estão presentes na maioria nas células. No entanto, as organelas danificadas e grandes proteínas e complexos mal formados são degradadas pela via autofágica-lisossomal (ALP). O sistema de degradação ALP é muito parecida com o USP, ocorre através da ação em conjunto de várias proteínas relacionadas a autofagia (Atg) que formam complexos moleculares e entregam o substrato a ser degradado para os lisossomas (KOROVILA et al. 2017; LIEBL e HOPPE, 2016; NAM et al., 2017).

Estudos recentes mostraram que as duas maquinarias estão interligadas a níveis moleculares e funcionais, influenciando- se através do nível de componentes chaves de seus sistemas, havendo vários reguladores e substratos comuns entre as duas vias, sendo a maior

delas a ubiquitina. Esta proteína é um dos reguladores chaves, pois a sua depleção por inibidores traducionais promove a toxicidade celular, pois a expressão de genes de ativação da Ub e das DUBs será diminuída ou bloqueda. No entanto, como já citado, eles têm como função manter o pool libre de Ub intracelular e são essenciais para a função e desenvolvimento celular, além da tolerância ao estresse. Dessa maneira, a célula consegue manter a homeostase da proteólise intracelular e responder em condições de estresse, onde há o aumento da síntese de novos complexos, assim como a melhora na capacidade de dobrar proteínas recém-formadas pelas Hsp 40 e 70, sendo esses parâmetros estudados em *Drosophila*, células de mamífero e leveduras (DIKIC, 2017; NAM et al., 2017).

Sabe- se que a maquinaria de autofagia também é ativada quando o USP é inibido e também para reduzir o estresse proteotóxido no interior celular, causando um efeito protetivo intracelular, sendo a proteína responsável por essa ligação chamada de UPR, que resulta na ativação do fator de transcrição TRF4 e faz com que ocorra uma *up* regulação e genes ligados a autofagia. Mas o contrario não ocorre, ou seja, quando há inibição da autofagia, o proteassoma não é ativado devido ao tamanho das proteínas que são degradadas pelo autofagosoma, que são grandes para que ocorra a entrada no complexo (NAM et al., 2017).

No sistema ubiquitina-proteassoma ocorre a ativação da ubiquitina e a formação das cadeias poliubiquitinadas, as quais se ligam as proteínas e a levam para a degradação, como descrito anteriormente. Na autofagia, a cadeia de poliubiquitina é reconhecida por proteínas como p62, que recrutam os substratos e os encaminham para o autofagossoma, sendo esse tipo de degradação chamada de autofagia seletiva. A escolha entre um ou outro sistema de degradação é realizada através da ligação de lisinas (K) entre as Ub da cadeia ligada às proteínas. As proteínas que se dirigem ao proteassoma 26S são marcadas por poliubiquitina K-48, K-11 e K-29. Proteínas ligadas à cadeia de poliubiquitina K-63, mitocôndrias danificadas e proteínas monubiquitinadas são degradadas por autofagia. A ponte entre os dois sistemas ocorre por proteínas como p62 e a histona deacetilase 6 (HDAC6), as quais possuem em suas estruturas tanto domínio de ligação para Ub (UBA), quanto ao domínio de ligação ao autofagossoma, chamado de *LC3-interacting region* (LIR) (NAM et al., 2017)

Segundo Liebl e Hoppe (2016), pode-se dizer que a regulação da atividade das E3 ligases e de sua competição para ligação a substratos e as E2 conjugadoras, bem como sua interação com as enzimas deubiquitnadoras, representam eventos-chave na cooperação entre USP e autofagia. A coordenação entre ambas as rotas de degradação é ainda mais influenciada

por fatores de choque térmico e ligação à ubiquitina proteínas (UBPs) tais como p97, p62 ou optineurina.

Existem proteínas que determinam qual o sistema de degradação que será ativado. Podem-se citar algumas como: chaperona HSP 70, que auxilia no dobramento correto das proteínas de forma adequada pelo reticulo endoplasmático (RE), assim como direcionam as proteínas com falha no seu dobramento ao proteassoma para serem degradadas; BCL-2; Parkin, uma E3 ligase que tem uma função crítica ente os dois sistemas de degradação, mediando a degradação proteassomal de um subconjunto de substratos mitocondriais, assim como outro subconjunto que é direcionado à degradação autofágica. Deve-se citar também que o proteassoma 26S inativo é degradado por autofagia em um processo chamado de proteofagia, através do reconhecimento de sua própria subunidade Rpn10 pelo autofagossoma (DIKIC, 2017).

Pesquisas têm demonstrado que o supressor de tumor p53 tem em sua maior função fazer o *crosstalking* entre as duas vias, pois seu acúmulo ativa a proteína AMP quinase (AMPK), havendo inibição de mTOR, induzindo a autofagia. Estudos recentes realizados em macrófagos, células endoteliais e epitalias e em algumas linhagens de células cancerígenas mostraram que a inibição do proteassoma faz com que haja a ativação de AMPK (DICIK, 2017). O comprometimento do funcionamento do complexo acarreta em problemas em todas as outras organelas, sendo que os dois sensores celulares que indicam a redução de atividade do proteassoma são duas organelas: a mitocôndria e RE.

Na mitocôndria ocorre a alteração do proteoma mitocondrial, o que leva à formação de grupos reativos de oxigênio (ROS), levando a autofagia pela via AMPK através do acúmulo de AMPc, devido a baixa concentração de ATP pela depleção mitocondrial. Desta maneira, a concentração de ATP celular indica se a degradação será autofágica ou via UPS. O RE pode não estar dobrando corretamente as proteínas e acontecer o acúmulo dessas proteínas. Havendo a sobrecarga do sistema proteassomal a autofagia é ativada (LIEBL e HOPPE, 2016; NAM et al., 2017). As duas vias de degradação também têm como função manter a plasticidade e dinâmica mitocondrial já que é a maior produtora de ROS. Quando as células estão em estresse oxidativo, promove a oxidação de lipídeos e danos ao DNA, alteração das proteínas e das atividades moleculares. Assim, dependendo do nível de estrese celular e de como a mitocôndria se comporta, ocorre a mitofagia para haver a preservação celular. No entanto, existe uma produção de ROS que é considerada normal para manter sinais de sobrevivência e proliferação celular (DICIK, 2017).

1.6 O sistema ubiquitina proteassoma e a reversibilidade pelas DUBs em *Schistosoma mansoni*

Atualmente, existe um amplo estudo do sistema ubiquitina proteassoma em *S. mansoni*. Estudos realizados por Guerra-Sá et. al (2005) avaliaram tanto a atividade proteolítica endógena, como a peptidásica dos proteassomas presentes em cercárias e vermes adultos. Os resultados obtidos mostraram que essas duas atividades são menores em cercárias e que o uso de MG132, inibidor clássico do complexo, mostrou ser farmacologicamente mais ativo nessa fase, o que sugere uma variação estágio-específica nas atividades peptidásicas.

Em 2007, Castro-Borges purificou a partícula 20S do parasito *Schistosoma mansoni* a partir de vermes adultos e cercárias, as quais foram analisadas por gel 2D e espectrometria de massa, mostrando que os 14 transcritos das subunidades encontradas no genoma do parasita eram representados por diversas isoformas das subunidades α e β, demonstrando modificações pós-traducionais das proteínas do complexo 20S. Análises posteriores dos extratos do proteassoma 26S mostraram a presença de 44 subunidades, sendo 24 do tipo alfa e 20 do tipo beta. Foi constatada a presença de 7 isoformas das subunidades alfa 1, 4 e 7. Neste mesmo trabalho, foi demonstrada a importância da modificação pós-traducional do complexo por fosforilação, sugerindo que os proteassomas 26S de cercárias estariam preferencialmente defosforilados e, consequentemente, menos ativos. Este resultado foi corroborado por dados de *Western blot*, que mostraram níveis elevados de conjugados ubiquitinados em extratos totais de cercárias e a sua baixa atividade proteolítica endógena, 16 vezes menor que em vermes adultos (dados não publicados). Pereira-Júnior et al. (2013) demonstraram um perfil de expressão gênica diferencial das subunidades constituintes do complexo 19S nos estágios de cercária e esquistossômulo em análise realizada por reação de polimerase em cadeia.

Botelho-Machado e colaboradores (2010) demonstraram pela primeira vez a estrutura conservada do inibidor endógeno do proteassoma 20S, denominado SmPI31. Além disso, testes com a SmPI31 recombinante demonstraram seu papel na regulação da atividade do proteassoma 20S. Posteriormente, Soares et al. (2013) caracterizaram o perfil de expressão diferencial do ativador endógeno da partícula 20S nas diversas fases do ciclo do parasita chamado PA28Ɣ. Além disso, miracidios transformados *in vitro* na presença de dsRNA específico para PA28Ɣ apresentaram uma diminuição significativa em seu número em relação ao controle, sugerindo que PA28Ɣ pode ter um papel importante no desenvolvimento larval do *S. mansoni*.

Costa et al. (2015) analisaram a expressão gênica de 17 enzimas conjugadoras em vermes adultos, esquistossômulas, ovos e cercárias de *S. mansoni*, além disso, foi realizada a análise *in silico* e a árvore filogenética que demonstrou uma conservação das E2 do parasito em relação aos seus ortólogos. Para a análise foram utilizados o domínio UBC e o resíduo de cisteina ativo da enzima. Nenhum dos genes para E2 estavam *up* regulados em cercaria quando comparados aos outros estágios. Algumas UBE2J se mostraram *up* reguladas em esquistossomulas de 24h, sendo essenciais para a regulação de *anaphase-promoting complex* (APC) no ciclo celular. Algumas das E2 analisadas tiveram expressão diferenciada ao comparar os estágios larvais com o de verme adulto o que reforça a complexidade da via de proteassoma-ubiquitina no parasita.

Pouco é conhecido sobre as DUBs em *S. mansoni*. No entanto, em estudo realizado por Pereira et al. (2014), em relação à família UCH no ciclo de vida do parasita, os resultados levantaram uma série de questões referentes à regulação da atividade do proteassoma e a função das mesmas na biologia do parasita. Foram analisados os transcritos referentes às enzimas UCHL5, UCHL3, BAP-1 e USP5 presentes nas fases de cercária, ovos, vermes adultos e esquistossômulos, sendo que, como dito anteriormente, UCHL5 está intimamente ligado a subunidade Rpn13 do proteassoma. Bap-1 interfere na proliferação celular em G1/S e UCHL-3 está envolvida no processamento de precursores de ubiquitina (Ub) e substratos ubiquitinados para gerar Ub livre, sendo altamente expressa em vermes adultos.

Pereira R. et al. (2015a), demonstraram o padrão de expressão gênica para um conjunto de 17 enzimas da família USP em *S. mansoni* nas fases de cercaria, vermes adultos, esquitossômulos e ovos (*SmUSP2, SmUSP7, SmUSP8, SmUSP9x, SmUSP10, SmUSP14, SmUSP15, SmUSP16, SmUSP20, SmUSP22, SmUSP24, SmUSP30, SmUSP36-42, SmUSP46, SmUSP49-44* e *SmUSP48*), mostrando ser diferencialmente expressos entre cercárias e vermes adultos. Em outro estudo, utilizando o substrato Z-Arg-Leu-Arg-Gly-Gly-AMC, ficou evidenciado a baixa atividade dessas enzimas nos estágios de cercária e esquistossômulos jovens, o que induz ao acúmulo de conjugados ubiquitinados e baixa atividade do proteassoma nesses estágios evolutivos do parasito. Em conjunto, esses dados levantam a hipótese da importância dessas enzimas na regulação do sistema ubiquitina-proteassoma e na biologia do parasito (PEREIRA et al., 2014). O mesmo grupo de pesquisadores analisou duas famílias de DUBS: *ovarian tumour* (OTU), específica para a reciclagem de cadeias longas de poliubiquitina via lisina 48 e 63, e *Machado-Joseph*m (MJD) nas fases de cercária, esquistossômulo, verme adulto, ovo e miracidio. As análises *in silico* identificaram dois

membros diferentes da subfamília *MJD*, *SmAtaxin-3* e *SmJosephin*, e cinco proteases OTU distintas, *SmOTU1, SmOTU3, SmOTU5a, SmOTU6b* e *SmOtubain*. A expressão dos genes apresentou perfis diferentes para todos os transcritos entre as fases de cercárias, esquistossômulos e vermes adultos. Os dados sugerem que essas duas famílias de proteínas regulam a atividade do UPS no ciclo de vida do parasita (PEREIRA R. et al., 2015b).

O efeito de inibidores clássicos do proteassoma 20S, como o MG132 e PSI, demonstraram o papel desta via no desenvolvimento do parasita (GUERRA- SÁ, 2005), bem como na oviposição, por induzir separação dos casais (dados não publicados, GUERRA-SÁ, 2000). Estudos realizados com algumas drogas mostraram que o estresse químico induzido com curcumina, IBMX (3-isobutil-1-metilxantina) e MG132 modificou a expressão gênica das enzimas SmHul5 e SmUbp6, relacionadas com o proteassoma. O nível de transcritos para SmUbp6 e SmHul5 foram reduzidos em 16 e 9 vezes, respectivamente, induzido pelo estresse químico com IBMX, sugerindo desmontagem do proteassoma. Por outro lado, o estresse oxidativo induzido por curcumina e MG132 aumentou a expressão destes genes. Além disso, a expressão do gene da proteína de maturação do proteassoma (SmPOMP) foi aumentada em condições de estresse induzidas pela curcumina, MG132, e hidróxido de hidriogênio, o que poderia estar relacionado com a síntese de novos proteassomas (DE PAULA et al., 2015).

Segundo Morais et al. (2017), a expressão de genes de parasitas incubados *in vitro* por 24 horas com MG 132 foi analisada por microarrays. Foram identificados 1.919 genes diferencialmente expressos após o tratamento, sendo 1.130 genes *up* regulados e 790 genes *down* regulados. A análise estatística dos dados da expressão dos genes mostrou que havia a ativação de genes do complexo e a inibição de outros, como chaperonas, que e ligam a RP, maturação de CP, ubiquitina -*like* NEDD8 e Cullin-3 ubiquitina ligase, O gene pro-apoptótico Bax era *down* regulado e dois genes inibidores de apoptose eram *up* regulados IAP1 e BRE1 e o ativador apoptótico Apaf-1 *down* regulado.

Em pesquisa realizada por Mathieson e colaboradores (2011), foi demonstrado que a UPS é essencial para o desenvolvimento dos ovos do parasita e que o proteassoma exibe diferentes subunidades durante esse processo, sendo não somente responsável pela degradação de células vitelínica mas também responsável pelo desenvolvimento do envelope que envolve o miracídio e produz as proteínas secretadas pelo ovo, favorecendo o escape perante a resposta imune do hospedeiro. Outra particularidade é que o transcriptoma do *S. mansoni* não possui todas as proteínas da via apoptótica. No entanto, deve ser considerado que a ativação desta via ocorre em minutos e que todo o processo apoptótico demora horas.

Sabe-se que a autofagia, mais que a apoptose, é um processo viável para as células vitelínicas em ovos mal formados, sendo que todos os componentes da via autofágica foram apresentados no transcriptoma de vermes adultos e ovos. A hipótese atual é que a UPP está envolvida na degradação de células vitelinas nos primeiros estágios e depois a autofagia se torna ativa nesse processo. No parasita fêmea, a vitelaria ocupa 2/3 do seu tamanho e engloba os dutos e folículos vitelínios que produz as células vitelínicas **(FIGURA 10).** Cada fêmea de *S. mansoni* produz cerca de 200 ovos por dia e cada um contém 30-40 células vitelinas, o que acarreta na alta produção de proteínas, as quais são também degradadas pelo proteassoma

1.7 O sistema reprodutivo do parasita e o estudo racional de drogas

Vermes fêmeas desenvolvem seu sistema reprodutivo acopladas no canal ginecófaros dos vermes machos. Estudos têm mostrado que parasitas fêmeas, com sua capacidade de oviposição normal quando separadas do parasita macho, e coladas cirurgicamente em seus hospedeiros, regridem o seu sistema reprodutivo e param a oviposição. Em culturas *in vitro* de longa duração, mesmo quando a concentração de glicose e oxigênio não é limitante e em condições anaeróbicas (5% CO_2), parasitas fêmeas acopladas ao seu parceiro cessam a produção de ovos, sendo que a produção máxima de ovos está entre 4 e 6 dias (HUANG et. Al, 2012). Após a maturação sexual das fêmeas acoplada no canal ginecófaro, ocorre a produção dos oócitos pelo ovário das fêmeas, que posteriormente são liberados no oviduto e fertilizados pelo esperma dos machos que estão armazenados em um reservatório no oviduto. Em seguida, os oócitos fertilizados movem pelo oviduto e são circundados por cerca de 30-40 células vitelínicas (que foram originadas nas glândulas vitelínicas e que estão ligadas ao oviduto pelo ducto vitelínico) e migram para o oótipo **(FIGURA 10)**. As contrações no oótipo fazem com que as células vitelínicas liberem seus grânulos contendo as proteínas precursoras da casca dos ovos. Após a formação, os ovos passam para o útero para serem liberados na circulação (DEWALICK et al., 2012; HUNANG et. al, 2012). Os testículos de parasitas machos possuem de 7 a 10 lóbulos testiculares, contendo numerosas espermatogônias e espermatócitos em diferentes estágios de maturação, com espermatozoides maduros alongados visíveis na vesícula anterior do espermatozoide (GUIDI et al., 2016).

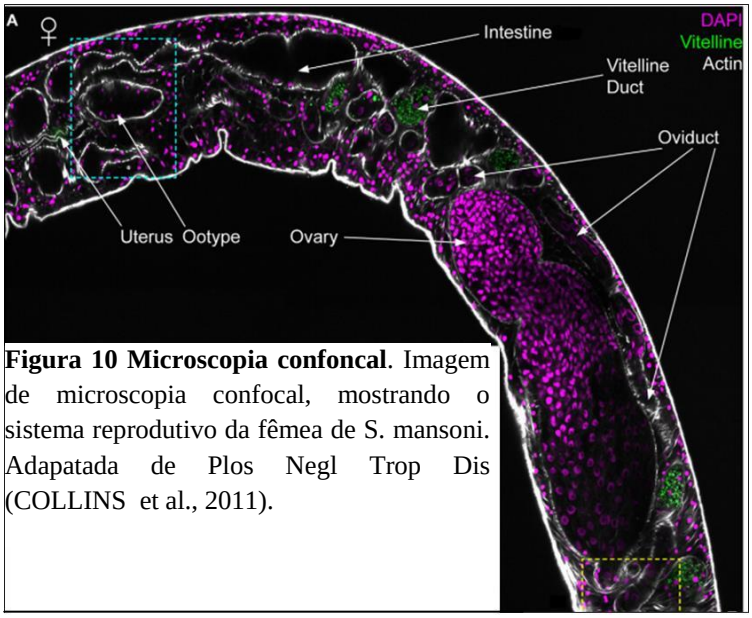

Figura 10 Microscopia confoncal. Imagem de microscopia confocal, mostrando o sistema reprodutivo da fêmea de S. mansoni. Adapatada de Plos Negl Trop Dis (COLLINS et al., 2011).

Os mecanismos pelos quais os parasitos machos influenciam na maturação sexual das fêmeas, culminando com a produção de ovos, ainda são poucos conhecidos. No entanto, estudos demonstram que os vermes machos governam a transcrição de genes, que são expressos com especificidade em tecidos dos órgãos reprodutivos das fêmeas, como por exemplo o gene envolvido com a proteína percursoras da casca do ovo (p14) (GREVELDING et al., 1997). No entanto, evidências sugerem que moléculas de vias de sinalizações podem estar envolvidas com esses processos de desenvolvimento. (BECKMAN et al., 2010*a*; YOU et al., 2011; MOREIRA, 2012).

Pesquisas recentes possuem um intenso estudo de extratos de drogas de origem vegetal utilizadas em culturas do parasita adulto *in vitro* e como elas interferem morfologicamente e na oviposição dos mesmos. Estudos prévios têm demonstrado que o tegumento é um forte alvo para o desenvolvimento de drogas esquistomicidas, sendo que a droga de escolha para tratamento da doença, o Praziquantel (PZQ), altera o tegumento entre outros mecanismos ainda não definidos do parasita. Dentre os extratos estudados, pode-se citar: a droga (−)-6,6_-dinitrohinokinin (DNK), testada *in vitro*, altera tanto o tegumento de parasitas machos, como de fêmeas, além de separar os casais dos parasitas e diminuir o número de ovos e a porcentagem de desenvolvimento dos mesmos. O teste *in vivo* diminuiu o número de ovos por grama de tecido e consequente redução do tamanho do baço e fígado, além da redução da carga parasitária (PEREIRA C. et al., 2015). A curcumina, um extrato extraído da *Curcuma longa*, induz a apoptose, ou seja, as células possuem alterações morfológicas como: inchaço e ruptura de mitocôndrias; cromatina condensada e DNA fragmentado; inchaço e degeneração

da membrana mitocondrial; condensação da cromatina e formação de vacúolos em adultos vermes machos e fêmeas, sendo que em vermes fêmeas as alterações ocorreram principalmente no vitelário. O estresse oxidativo causado pela droga em casais de *S. mansoni* altera a viabilidade e interfere na produção e desenvolvimento dos ovos, pois age nas vias de embriogêmese e oogenese como a Notch e TGF-β e causa a morte dos casais, havendo mudanças morfológicas no tegumento, alterações mitocondriais e condensação da cromatina, aumento na expressão dos transcritos de *SmCASP3/7* e da atividade de caspase-3 em machos e fêmeas (AGUIAR et al, 2016; MORAIS et al., 2013).

Dentro deste contexto, entende-se que o processo de oviposição constitui não só um bom modelo para avaliar a relevância biológica dos ciclos de ubiquitinação/deubiquitinação como também um bom exemplo de um organismo onde alterações na atividade deubiquitinadora poderiam modular a taxa de oviposição, bem como susceptibilidade a drogas, principalmente as que inibem as DUBs (Ubp6 e USP14) ligadas ao proteassoma 26S. Até o momento, estudos com MG 132 têm demonstrado que a oviposição cessa devido a separação dos casais, não confirmando ser devido a inibição do complexo. No entanto, o fato de utilizar uma dosagem de droga que iniba as DUBs vinculadas ao proteassoma, que não aja na separação dos casais de parasita e cesse a oviposição, mostra a importância desse sistema e que as DUBs ligadas ao proteassoma controlam vários processos biológicos do parasita, além da oviposição. Como citado anteriormente, estudos realizados por Vogel et al. (2015) com células de câncer de mama, utilizando dois inibidores de DUBs: o b-AP15 e o inibidor RA-9 levaram as células à autofagia, sendo que b-AP15 causa uma ativação dose dependente de caspase-3 e, como consequência, a apoptose que ocorre bem depois do stress proteotóxico, sugerindo que a apoptose medeia a morte celular como um mecanismo compensatório em resposta ao estresse desenvolvido no sistema proteassoma-ubiquitina. Desta forma, o estudo propõe que ocorra a autofagia causada pelo uso do inibidor b-AP15 no tratamento dos casais de parasitas em cultura devido à inibição dessas duas DUBs específicas, levando a autofagia, interferindo na oviposição da fêmea de *S. mansoni* e que essas enzimas, assim como a ubiquitina, são tão importantes quanto o proteassoma 26S para o controle de várias vias de sinalização dos casais de parasita.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito da substância b-AP15, inibidora das enzimas desubiquitinadoras USP14/Ubp6 e UCHL5/USP37, sobre o desenvolvimento reprodutivo de *S. mansoni* e como possível alvo de droga terapêutica.

2.2 Objetivos específicos

Como objetivos específicos buscou-se determinar o efeito de b-AP15:

- ✓ na inibição da oviposição *in vitro* de casais de parasitas *Schistosoma mansoni* através da contagem dos ovos e expressão do gene p14;
- ✓ avaliar se os órgãos reprodutores dos parasitas sofreram alguma modificação estrutural;
- ✓ avaliar se a substância utilizada leva a autofagia;
- ✓ avaliar se o tratamento dos casais de parasita com a droga leva a apoptose ocasionada pela ativação de caspase-3;

3. METODOLOGIA

3.1 Manutenção do ciclo de vida do parasita S. mansoni

O ciclo biológico do *S. mansoni* (linhagem Luís Evangelista - LE) é mantido no laboratório de Biologia Molecular de Parasitas, do Departamento de Bioquímica e Imunologia da FMRP- USP, utilizando como hospedeiros definitivos camundongos da linhagen Balb/c (Protocolo 195/2015) e, como hospedeiros intermediários, caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*. Os ovos do parasito foram recuperados das fezes de camundongos infectados, pelo método de Hoffman (HOFFMAN et al., 1934) e expostos à água e a luz por 1 hora para eclosão dos miracídios. Cerca de 15 a 18 miracídios foram utilizados para infecção de cada caramujo. As cercárias liberadas, 43 dias após infecção dos caramujos, foram coletadas e aproximadamente 180 cercárias foram inoculadas em cada camundongo por via subcutânea

3.2 Obtenção de vermes adultos de S. mansoni e cultura in vitro dos parasitas

Vermes adultos foram obtidos por meio de perfusão do sistema porta-hepático de camundongos eutanasiados após 50-55 dias de infecção, segundo condições previamente descritas por Smithers e Terry (1965). Após a coleta, os casais de parasitas foram cultivados em estufa com atmosfera controlada com 5% CO_2 a 37˚C (CO_2 Incubator COM-19AIC (UV), Panasonic, USA & Canadá). Após a coleta, os casais foram transferidos para placas estéreis de 24 poços, as quais continham 2 ml do meio RPMI 1640 com 25 mM de HEPES e L-glutamina (Gibco, Carlsbad, CA, EUA), suplementado com bicarbonato de sódio, antibióticos100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco, Carlsbad, CA, EUA) por poço, 10% de soro fetal bovino inativado por 30 minutos a 56°C (Gibco, Carlsbad, CA, EUA). Após 24 horas de adaptação em cultivo *in vitro*, os vermes foram submetidos às diferentes concentrações do inibidor b-AP15 (OnTarget Chemistry, Suécia). Casais em meio RPMI 160, com ou sem DMSO 0,1%, foram mantidos em cultura pelo mesmo período, sendo utilizados como controles negativos. A produção total de ovos por casal foi monitorada com o auxílio de microscópio óptico invertido, por um período de 24h, 48h e 72h. Feita a padronização, os casais de parasitas maduros foram tratados com a concentração de b-AP15 de 0,8; 1,6; 3,2 e 50µM por 24h e 72h. Em seguida, armazenados a -70ºC até o momento do

uso. Foram realizados três experimentos independentes, sendo utilizados 12 casais por experimento, sendo avaliados 36 casais no total, neste ensaio.

3.3 Ensaio de viabilidade

A viabilidade dos casais foi avaliada por quantificação colorimétrica através de *3-(4,5 dimethylthiazol-2yl)- 2,5- diphenyl tetrazolium bromide* (MTT) (COMLEY et al., 1989). Após o período de tratamento com ou sem o inibidor, cada casal foi transferido para um poço em placa de 96 poços, contendo 100 µL de tampão fosfato salino (PBS) com 1mg de MTT/mL e incubados por 30 minutos a 37°C. Posteriormente, a solução foi removida e foram adicionados 200 µL de DMSO em cada poço, sendo os casais incubados a temperatura ambiente por 1h. A absorbância foi lida em espectrômetro a 550 nm (BIO- RAD xMark Microplate Spectrophotometer).

Para esse experimento, os casais foram mantidos em cultura por um período de 24h, nas seguintes condições (2 ml de meio por poço): em meio RPMI 160 na presença e ausência de DMSO 0,1%, sendo utilizados como controles negativos; em meio RPMI 160 e mortos a 56°C por 20 minutos, sendo os controles positivos e incubados com a droga b-AP15 (0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 µM). Foram realizados três experimentos independentes, sendo utilizados 12 casais por experimento, sendo avaliados 36 casais no total, neste ensaio.

3.4 Obtenção de extratos proteicos de casais de vermes adultos de S.mansoni para ensaio de atividade de caspase-3, proteassoma 20S e Western blotting

Casais de vermes adultos foram perfundidos como descrito no item 3.2. Após a perfusão foram armazenados a -70°C.

3.4.1 Extrato proteico solúvel total

As amostras, contendo 50 casais cada uma, foram homogeneizadas em 300 µL de tampão de extração (Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, 0,5% glicerol, 1 mM DTT e 1x coquetel de inibidor de proteases (Sigma- P834), em sonicador através de cinco pulsos de 10 segundos, com intervalos de 10 segundos entre cada pulso, sendo mantidas no gelo). Posteriormente, foram centrifugadas (Centrifuge 5417R, Eppendorf) por 1 hora a 20.800 x g a 4°C. O

sobrenadante foi transferido para outro tubo e centrifugado por 30 minutos a 4ºC a 15.000 x g, novamente coletado e armazenado no -70ºC até o momento do uso. A concentração protéica das frações foi determinada segundo o Método de *Bradford*, através de uma curva padrão de BSA, conforme descrito pelo fabricante. A absorbância lida a 595 nm em espectrofotômetro (BIO- RAD xMark Microplate Spectrophotometer).

Casais de vermes adultos foram mantidos em cultivo como descrito no item 3.2. Para esse experimento, foram utilizados casais incubados por 24 horas nas concentrações de 0,8; 1,6; 3,2 e 50 µM de b-AP15. Como controles negativos, casais incubados em meio RPMI 160 na presença e ausência DMSO 0,1% e, como controles positivos, vermes incubados com 3,2 e 50 µM de MG 132. Para tanto, foram feitas perfusões distintas, sendo realizadas triplicatas biológicas do extrato.

3.4.2 Extrato de proteínas de vermes adultos enriquecido com proteassoma 26S

Para a preparação das amostras enriquecidas com proteassoma 26S, utilizou-se 350 vermes adultos, os quais foram homogeneizados em tampão (Tris-HCl 5mM pH 8,0; glicerol 1%; EDTA 1mM; EGTA 1mM; leupeptina 50µM (Cayman Chemical Company) e β-mercaptoetanol 1mM), correspondente a um volume de 3 vezes o peso úmido do parasita. O material foi homogeneizado em sonicador, como descrito no item anterior. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (Centrifuge 5417R, Eppendorf) por 30 minutos a 10.000 xg. O sobrenadante foi centrifugado (Optima TLX Ultracentrifuge, Beckman) por 30.000 g a 4°C por 20 min e armazenado a -70ºC. A concentração protéica das amostras foi determinada segundo o Método de *Bradford*, conforme descrito pelo fabricante. A absorbância lida a 595 nm em espectrofotômetro (BIO- RAD xMark Microplate Spectrophotometer). Após a leitura das amostras, adicionou-se 10% de glicerol ao sobrenadante final.

Casais de vermes adultos foram perfundidos da veia porta-hepática de camundongos, como descrito no item 3.2, mas não foram mantidos em cultura, sendo diretamente armazenados a -70°C até o momento da extração. Para tanto foram feitas perfusões distintas, sendo realizadas triplicatas biológicas do extrato

3.4.3 Extrato para ensaio de caspase-3

Casais de vermes adultos foram mantidos em cultivo como descrito no item 3.2. As amostras, contendo 50 casais cada uma, foram homogeneizadas em tampão de extração (5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM Tris 7.5, 1 mM DTT, 1% Triton-X100, e 50µM cathepsin inhibitor K77111) através de sonicador por 4 pulsos de 2 minutos (0.75 s e 40% amplitude). Em seguida, realizou-se a centrifugação do material (Centrifuge 5417R- Eppendorf) a 5000 g e depois a 15.500 g a 4˚C, por 15 min cada centrifugação. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -70°C. A concentração protéica das frações foi determinada segundo o Método de *Bradford*, conforme descrito pelo fabricante e a absorbância lida a 595 nm em espectrofotômetro (BIO- RAD xMark Microplate Spectrophotometer). Para esse experimento foram utilizados casais tratados por 24 horas com 1,6 e 3,2 µM de bAP15 e, como controles negativos, casais incubados em meio RPMI 160 com e sem DMSO 0,1%, pelo mesmo período. Para tanto, foram feitas perfusões distintas, sendo realizadas triplicatas biológicas do extrato.

3.5 Western blotting para a detecção de proteínas ubiquitinadas e caspase-3 ativa

Casais de vermes adultos tratados por 24 horas com b-AP15 (item 3.2) foram homogeneizados com auxílio do sonicador em tampão de extração, conforme descrito no item 3.4.1. A seguir, 25 µg/ml de proteínas totais de cada amostra foram fracionadas em eletroforese em gel de acrilamida 12%- FastCast (Bio-Rad) e transferidas para membranas de nitrocelulose em sistema semisseco (Trans- blot turbo – BIO-RAD). Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário policlonal de coelho anti-ubiquitina (Invitrogen- PA517067), anticorpo monoclonal anti-caspase 3 ativa de coelho (Millipore- 04-439), diluídos na proporção de 1:1000. Os anticorpos primários foram incubados com as membranas *over-nigth*. Após a incubação e lavagem, as mesmas foram incubadas com o anticorpo secundário, anti-IgG de coelho, ligados à peroxidase na diluição de 1:5000 (GE Healthcare) por 2 horas. Após a lavagem das membranas para a remoção do excesso de anticorpo secundário não ligado, a membrana foi revelada através do *kit ECl prime* (GE Healthcare).

Para o western blotting anti-caspase-3 foram utilizados casais tratados com 1,6 e 3,2 µM de b-AP15. Para o *western blotting* anti-poliubiquitina foram utilizados casais tratados

com b-AP15 nas concentrações de 0,8; 1,6; 3,2 e 50 µM, sendo, para os controles positivos, casais tratados com 3,2 e 50 µM de MG 132. Como controles negativos para os dois experimentos, casais foram incubados em meio RPMI 160 com e sem DMSO 0,1%. Para este experimento foram feitas perfusões distintas, sendo realizadas triplicatas biológicas do experimento.

3.6 Ensaio da atividade do complexo 20S

O ensaio de atividade do complexo 20S foi realizado utilizando o extrato proteico do item 3.4.2. Para tanto, utilizou-se 50 µM do substrato Suc-Leu-Le- Al-Tyr-AMC específico para atividade quimiotripsina (Enzo Life Sciences); 50 µg de extrato proteico enriquecido com proteassoma 26S; 5mM de ATP; droga na concentração a ser analisada; DTT 1mM; tampão da reação (Tris-HCl 50 mM pH8,0, contendo $MgCl_2$ 10mM) para um volume final de 240 µl. Neste experimento, verificou-se a atividade do complexo 20S com o extrato incubado com b-AP15 nas seguintes concentrações: 0,8; 1,6; 3,2 e 50 µM. Como controle positivo, o extrato foi incubado com 50 µM de MG132 e como controles negativos extratos incubados com 0,1% de DMSO e sem nenhum tratamento. A atividade foi avaliada nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos. A florescência das amostras foi lida a 380 nm (excitação) e 440 mm (emissão) (Perkin Elmer- EnSpire Multimode Plate Reader). Foram realizados três experimentos independentes, sendo os resultados expressos em unidade relativa de fluorescência (RFU).

3.7 Ensaio de atividade caspase - 3

Para o ensaio de atividade de caspase - 3 utilizou-se o extrato feito de acordo com o item 3.4.3. Mediu-se a atividade enzimática por método colorimétrico através do substrato Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilina (p-Na) (Sigma- Aldrich), de acordo com o manual do fabricante. A reação foi realizada em placa de 96 poços, da seguinte maneira: 50 µg de proteína de cada amostra; 2mM de substrato e tampão (120 mM HEPES (pH 7.4), 0.1% CHAPS, 5 mM DTT e 2 mM EDTA) para um volume final de 200 µL. Foi incubada a 37°C

por 90 minutos. A absorbância foi lida a 405 nm (BIO- RAD xMark Microplate Spectrophotometer), sendo os resultados expressos em absorbância.

As amostras dos extratos utilizados foram de casais tratados com 1,6 e 3,2 µM de b-AP15, sendo os controles negativos, casais de parasitas incubados em meio RPMI 160 na presença e ausência de DMSO 0,1% por um período de 24 horas. O controle positivo, estava presente no *Kit*, um solução em que a enzima estava ativa e também, como controle negativo, foi utilizado a solução do *Kit* em que a enzima estava ativa e adicionado um inibidor presente também no Kit. Para tanto, foram feitas perfusões distintas, sendo realizadas triplicatas técnicas e biológicas do experimento.

3.8 Microscopia eletrônica para avaliação tegumentar, das estruturas reprodutivas e organelas dos casais de parasitas

As amostras de parasitas analisadas foram incubadas com b-AP15 nas concentrações de 1,6; 3,2 e 50 µM. Como controles negativos, os casais foram incubados somente em meio de cultura RPMI 160 com e sem DMSO 0,1% por 24h e 72h.

3.8.1 Microscopias eletrônicas de varredura e transmissão

As alterações nos tegumentos dos casais de parasitas foram observadas utilizando microscopia eletrônica de varredura e as alterações estruturais nas organelas celulares através de microscopia eletrônica de transmissão. Após os casais serem mantidos em cultura, como descritos no item 3.2, os mesmos foram separados manualmente e submetidos ao tratamento a seguir. Foram lavados em tampão fosfato 0.1 M (pH 7.2) e incubados por 1 hora a 37°C e por mais 2 horas a temperatura ambiente em fixador glutaraldeído 3% (*Sigma–Aldrich*). Depois, os parasitas foram lavados e armazenados com tampão fosfato 0,1 M (pH7,2) a 4°C, até serem processados para as respectivas microscopias eletrônicas.

3.8.1.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para microscopia eletrônica de varredura, os casais de vermes foram pós- fixados em tampão fosfato contendo 1% de *osmiumtetroxide* (*Sigma–Aldrich*) em temperatura ambiente por 1h. Posteriormente, os mesmos foram hidratados em etanol 100% e secos em CO_2. Parasitas machos e fêmeas foram montados em *stubs* separadamente, revestidos com uma fina camada de ouro e examinados no microscópio de varredura Joel JSM-5200 operando a 25kV. Todas as medidas foram realizadas em micrômetros (µm). Para esse experimento, foram utilizados casais de parasitas de perfusões distintas, sendo analisados dez parasitas fêmeas e dez machos para cada amostra para cada tempo de incubação.

3.8.1.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para verificar as alterações estruturais das organelas celulares de parasitas machos e fêmeas, com e sem o tratamento com b-AP15, os mesmos foram pós-fixados em 1% *osmium tetroxide* (*Sigma-Aldrich*) em tampão fosfato e incubados por 2 horas a 4°C. Depois, eles foram reidratados em gradiente de etanol e embebidos em resina *Araldite 6005* (EMS). Cortes ultrafinos dos vermes (0,5 micra) eram vitrificados com acetato de uranil 0,5% (*Sigma-Aldrich*) e 0.3% de citrato de chumbo (*Sigma-Aldrich*). As características estruturais foram analisadas em microscópio TEM (*JEOL Model JEM-100CXII* equipado com câmera digital Hamamatsu ORCA-HR, Tokyo, JPN). Para esse experimento, foram utilizados casais de parasitas de perfusões distintas, sendo analisados seis parasitas fêmeas e seis machos para cada amostra e para cada tempo de incubação.

3.8.2 Microscopia eletrônica confocal

Após os casais serem mantidos em cultura, como descritos no item 3.2, os mesmos foram separados manualmente e submetidos ao tratamento a seguir: fixados em AFA (95% de etanol 70%, 3% de formaldeído a 37% e 2% de ácido acético glacial) por 16 horas a 4°C. Após esse período, parasitas machos e fêmeas foram corados com carmim hidroclorico 2% e 1% por 30 minutos. Em seguida, os mesmos foram descorados com etanol ácido (70% de

etanol 100%, 2.5% de HCl a 37% e 27.5% de H_2O deionizada) até que o parasita não liberasse mais o corante. Os parasitas Machos e fêmeas foram desidratados através da seguinte série alcoólica: etanol 70, 90, and 100% por 5min cada um (Neves et al., 2005). Em seguida, colocados em meio de montagem bálsamo do Canadá. As imagens foram tiradas em microscópio confocal (Leyca) usando 488nm He/Ne laser para excitação e filtro 470nm long-pass. As fotos foram obtidas com objetivas de 40x ou 63x em óleo de imersão, como descrito por Beckmann et al. (2010) em microscópio confocal Leyca TCS SP5 (**Fapesp 2004/08868-0).** Para esse experimento, foram utilizados casais de parasitas de três perfusões distintas, sendo analisados 9 parasitas fêmeas e 9 machos para cada amostra e para cada tempo de incubação.

3.9 Análise de fragmentação do DNA pelo método Deoxinucleotidil transferase terminal mediada por incisão de dUTP-biotina e marcação de núcleo apoptótico (TUNEL)

Para a detecção da fragmentação no DNA o método utilizado foi *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labelling (TUNEL)* e o *Kit DeadEnd Colorimetric TUNEL System* (Promega, Madison, USA), seguindo as instruções do fabricante. Vermes adultos foram mantidos em cultivo como descrito no item 3.2. Posteriormente, os casais foram separados manualmente. Como controle do experimento, foram utilizadas lâminas com vermes incubados em meio RPMI 160, sendo o controle positivo, lâmina com vermes tratados com Dnase (Dnase I Amolification Grade- Sigma-Aldrich) e como controle negativo lâmina com vermes tratados sem a enzima rTdT, presente no *kit*.

Após o período de 24h de cultura dos casais com ou sem a droga, os tratamentos para preparo das lâminas eram realizados em temperatura ambiente. Parasitas machos e fêmeas eram fixados, separadamente, em paraformaldeído 4% por 12h e embebidos em parafina e fatiados na espessura de 5 μm. Para a realização da técnica, os parasitas foram desparafinisados e reidratados (mistura de xilol/ etanol absoluto três vezes por 10 minutos; etanol absoluto 5 minutos e por mais três minutos; série de álcoólica: 95%; 85%; 70%; 50% e 30% por três minutos cada um e em solução de 0,85% de cloreto de sódio por 5 minutos).

As lâminas foram lavadas em solução fosfato/salina (PBS) e permeabilizadas com proteinase K (20 mg/mL) por 15 minutos. As mesmas foram lavadas com PBS e tratadas com formaldeído 4% e, respectivamente, lavadas em PBS. Em seguida, as mesmas foram

colocadas em tampão de equilíbrio, sendo o DNA fragmentado marcado com nucleotídeo biotinilado/ deoxinucleotidil transferase em câmera úmida e escura. Em seguida, a apoptose celular de parasitas machos e fêmeas, foi avaliada com um kit de desoxinucleotidil transferase dUTP de acordo com as instruções do fabricante.

As fotos das lâminas foram feitas em aumento de 40x no Microscópio Olympicos 8x61VS. O índice apoptótico, definido como a porcentagem de células apoptóticas, foi utilizado como medida quantitativa de apoptose celular. O índice apoptótico foi determinado da seguinte forma: (número de células TUNEL positivas / número total de células) x 100. O experimento foi realizado uma única vez, sendo analisadas 100 células de cada amostra.

Para esse experimento foram utilizados casais incubados por 24h nas concentrações de 1,6; 3,2 e 50 µM de bAP15 e, como controles negativos, casais mantidos em meio RPMI 160 com e sem DMSO 0,1%. Esse experimento foi realizado uma única vez com 5 casais, avaliados separadamente.

3.10 Perfil de expressão dos RNAm, por reação de polimerase em cadeia quantitativo em tempo real (qRT-PCR) dos genes ligados a apoptose celular e p14

3.10.1 Extração de RNA total

A extração do RNA dos parasitas foi feita com o uso de trizol, os quais foram homogeneizados em politron três vezes por 1 minuto, com intervalo de 1 minuto entre cada homogeneização. A mistura foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente até a completa solubilização. Adicionou-se a ela 400 µl de clorofórmio, sendo incubada no gelo por 3 minutos. Após esse período, as amostras foram centrifugadas (Centrifuge 5417R, Eppendorf) por 15 minutos a 12000g a 4ºC. Acrescentou-se etanol absoluto a fase aquosa a fim de precipitar o RNA das amostras. Para a purificação do RNA foi utilizado o *kit* RNeasy Mini (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. O mesmo foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop TM 1000 (Thermo Sccientific). A absorbância foi medida nos comprimentos de onda de 260, 280 e 230, a fim de avaliar o grau de pureza, as razões A260/280 e A260/230 deveriam estar compreendidas entre 1,9 e 2,1. Em seguida, o RNA foi estocado a -70ºC. Para a extração, os casais foram mantidos em cultivo como descrito no item 3.2 e incubados por 24horas nas concentrações de 0,8; 1,6 e 3,2 µM de b-AP15 e, como

controles negativos, foram utilizados casais mantidos em meio RPMI 160 com e sem DMSO 0,1%. As extrações do RNA foram realizadas para cada uma das amostras em triplicatas biológicas.

3.10.2. Síntese do DNA complementar (cDNA)

Para a síntese do DNA complementar (cDNA) foi utilizado 1 ug de RNA total tratado com 2 U de DNase I (Sigma-Aldrich), tendo a mistura reacional um volume final de 10 µl. O tratamento foi realizado a 37°C por 30 minutos e feita a inativação da enzima por 10 minutos a 65°C. Após o tratamento, foram adicionados à mistura reacional acima 2,5 µM de oligodT e 1mM de dNTP *mix* para um volume final de 12 µl e incubados por 5 minutos a 65°C, seguido de banho de gelo por 3 minutos. Em seguida, adicionou-se a transcriptase reversa (15 U/µl), conforme descrição do fabricante (RT-PCR ThermoScriptTM - Invitrogen), sendo a reação final 20 µl. Posteriormente a mistura foi incubada, respectivamente, a 65°C por 1hora e 85°C por 5 minutos e, colocada por 3 minutos no gelo. Adicionou-se a essa mistura reacional RNAse H (40 U/µl) e incubada por 20 minutos a 37°C. Todas as incubações foram feitas em termociclador (MJ Research, Inc.- PTC-100 Programmmable Thermal Controller). O cDNA foi estocado a -20°C até o momento do uso.

3.10.3Reação de polimerase em cadeia quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

Foram utilizados oligonucleotídeos específicos e sondas FAM / Iowa (IDT- Integrated DNA Technologies) para detecção do gene p14 e como constitutivo foi utilizado o ge GAPDH, os quais foram desenhados no site https://www.idtdna.com/scitools/Applications/RealTimePCR/. A sequência do gene GAPDH foi retirada do banco de dados do *Schistosoma mansoni* (http://www.genedb.org/Homepage) e a do F10/P14 do banco de dados do NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov). Para a via de apoptose foi analisada a expressão os genes caspase – 3 e 7 descritos por Dubois et al. (2009) e Morais et al. (2013): *SmCASP3 forward*, 5’- TTTGCGGTCAATGAAGAAATAAAC-3’, *reverse* 5’-AAGAGCGAAACACAATCGTGC-3’; *SmCASP7 forward* 5’CGTGACCATGATTGTTTCGC-3’, *reverse* 5’-GCAATGATACGATCCACGGG-3’;,

SmUbiquitina forward (*Smp*_046690, poliubiquitina C) 5'-GCAGTTGGAAGATGGACG-3' e *reverse* 5'- CACCACGTAGACGAAGGAC-3'. *SmGAPDH forward*, 5' -TCGTTGAGTCTACTGGAGTCTTTACG-3' e reverse 5' AAT ATGAGCCTGAGCTTTATCAATGG-3'.

A reação foi feita em um total de 10 µl, contendo 300nM de oligonucleotídeos iniciadores, 5 µl de iTaq Universal Probes supermix (1725131- Bio-rad) e 100 ng de cDNA. A amplificação do cDNA foram realizadas nas seguintes condições: incubado a 95ºC para desnaturação inicial por 10 min e submetido a 40 ciclos de 95ºC por 15 s. para que ocorresse a ativação da DNA polimerase, sendo o anelamento e extensão a 60ºC por 1 min. O ensaio das sondas 5'FAM/ 3'Iowa Black e oligonucleotídeos foi padronizado pela IDT. No entanto, foi realizada a otimização para a quantidade de cDNA adequada para a quantificação dos transcritos a serem analisados. Para amplificação do cDNA, foram utilizadas as seguintes condições: 95°C para desnaturação inicial por 30s e posteriormente submetidos a 40 ciclos de 95°C por 5s, para que ocorresse a ativação da DNA polimerase, sendo o anelamento e extensão a 60 ° C por 30s. A reação experimental continha oligonucleotídeos (*forward* e *reverse*) a 500 nM e 250nM de sondas, *iTaq Univesal probes supermix* (Bio-rad) e 100ng de cDNA e, como controles experimentais, água ao invés de cDNA e, outra reação, com o RNA tratado com Dnase I (item 3.10.1).

A expressão do gene foi calculada pelo método Ct comparativo (método ΔΔCT) e os níveis relativos dos transcritos foram normalizados utilizando o gene endógeno GAPDH (Gliceraldeído fosfato desidrogenase). Primeiramente, os Cts de cada gene foram normalizados a partir dos Cts do gene endógeno, amplificado em cada amostra (ΔCT) e, respectivamente, normalizados por ΔΔCT, utilizando a média do Ct da amostra controle (casais de vermes adultos cultivados em meio RPMI 1640). E então a expressão gênica de cada gene para cada amostra, calculada pela expressão 2^-ΔΔCt. As reações foram realizadas em triplicata técnica e biológica, utilizando o sistema de PCR em tempo real CFX 96 **(**Bio-rad).

3.11 Análises estatísticas

Os resultados obtidos nos experimentos das culturas de casais de parasitas com o inibidor b-AP15 e com RPMI 160 na presença e ausência de DMSO 0,1 %, tanto de

oviposição como de viabilidade, foram realizadas nos seguintes programas estatísticos: *R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.* URL https://www.R-project.org e *SAS Statistical Software (version 9.3; SAS Institute, Inc. Cary, NC)*. Para as análises foi utilizado o modelo de regressão com efeitos mistos desses dois programas. A quantificação do Western blotting para caspase-3 e conjugados ubiquitinados, atividade do proteassoma, TUNEL e PCR real time dos genes foi utilizado o programa Prisma 6.0.

4. RESULTADOS

4.1 Efeitos do inibidor b-AP15 na produção diária de ovos dos casais de parasitas de *S. mansoni*

Inicialmente foi realizada a padronização das culturas *in vitro* dos casais maduros de *S. mansoni* em relação à droga b-AP15, a fim de avaliar qual a concentração e o período de tratamento necessário para induzir de forma eficaz a inibição da oviposição dos casais (material e métodos- item 3.2). Para tanto, foram realizados três experimentos independentes, utilizando 12 casais de parasitas (n=12) para cada experimento. Foram avaliadas as concentrações de 1,56 µM, dobrando a concentração até 50 µM (1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25 e 50). A separação e a alteração de motricidade dos casais foram avaliadas por microscópio óptico invertido e ocorreram a partir de 3,125µM em 24 horas, sendo que a partir de 12,5µM estavam 100% separados e com o tratamento de 50 µM, a droga teve ação esquistomissida em um período de 72 horas.

Posteriormente, foram avaliadas as concentrações de 0,2 µM; 0,4 µM, 0,8 µM, 1,6 µM, devido aos resultados prévios obtidos. A **tabela 1** mostra que não houve diferença estatística entre os controles negativos dos parasitas incubados em meio de cultura RPMI 160 (CTRL) e o controle DMSO 0,1%, ou seja, o diluente da droga não influencia na produção do número total de ovos nos períodos analisados e na porcentagem em que foi utilizado. Nas concentrações de 0,2 e 0,4 µM não há diferença significativa em relação aos controles negativos, por outro lado, a dosagem de 0,8 µM mostra uma pequena diferença a partir de 24h, enquanto que 1,6 µM mostrou uma maior diferença no total de números de ovos em todos os períodos analisados **(Figura 11)**, sendo que a mesma foi de 92,92 em relação ao controle nas primeiras 24 horas, aumentando até 187,31 em 72 horas de incubação. Por esse motivo, essa foi a dosagem definida para os próximos experimentos. A droga teve uma inibição irreversível na oviposição dos parasitas fêmeas.

Tabela 1-Comparação entre controle (CTRL) e as diferentes concentrações da droga b-AP15 na produção diária de ovos dos casais de parasitas de *S. mansoni*.

CTRL em relação aos tratamentos b-AP15 (µM)	Período (h)	Diferença Estimada	Valor p	Intervalo de confiança 95%	
				Inferior	Superior
DMSO 0,1%		13,06	0,4699	-22,43	48,54
0,2	24	7,39	0,6825	-28,09	42,87
0,4		37,42	0,0388	1,93	72,90
0,8		65,92	0,0003	30,43	101,40
1,6		92,92	0,0001	57,43	128,40
DMSO 0,1%		16,44	0,3628	-19,04	51,93
0,2		4,22	0,8152	-31,26	39,71
0,4	48	64,78	0,0004	29,29	100,26
0,8		90,22	0,0001	54,74	125,71
1,6		158,56	0,0001	123,07	194,04
DMSO 0,1%		15,92	0,3784	-19,57	51,40
0,2		-9,42	0,6022	-44,90	26,07
0,4	72	47,53	0,0088	12,04	83,01
0,8		94,81	0,0001	59,32	130,29
1,6		187,31	0,0001	151,82	222,79

Casais de parasitas foram incubados em meio RPMI 1640 na presença e ausência de DMSO 0,1 % (controles negativos). Foram usadas as concentrações de 0,2; 0,4; 0,8 e 1,6 µM de b-AP15. Os ovos foram contados de maneira cumulativa em um total de 72 horas por microscópio optico invertido. Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes, sendo o n=12 para cada experimento. Para a análise foi utilizado modelo de regressão com efeitos mistos *(R Core Team e SAS Statistical Software*).

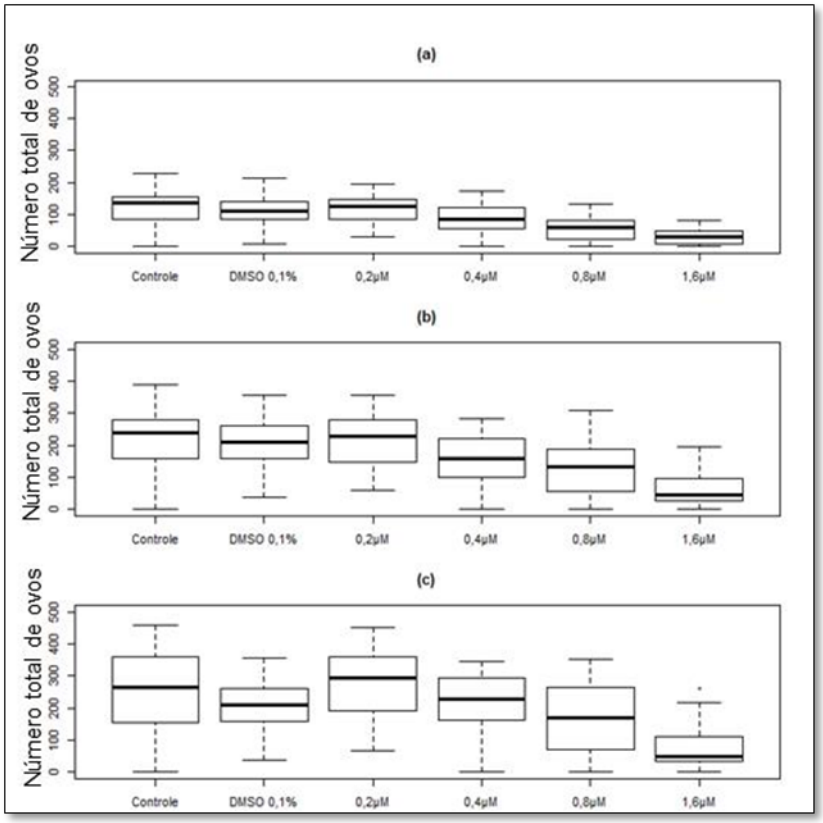

Figura 11 Casais de parasitas adultos foram tratados in vitro em tempos diferentes na presença de concentrações crescentes do inibidor b-AP15. O número de ovos foi estimado com auxílio de um microscópio optico invertido. Os parasitas pertencentes aos grupos controles foram incubados apenas com o meio RPMI 1640 na presença e ausência de DMSO 0,1 %. Contagem de ovos 24 h (a), contagem de ovos 48 h (b) e contagem de ovos 72 h (c). As análises foram feitas a partir de três experimentos independentes, sendo o n = 12 casais de parasita utilizado para cada concentração da droga e em cada experimento que foi realizado em triplicata. Para as análises estatísticas foram usados os métodos de R Core Team e SAS Statistical Software.

4.2 Efeitos do inibidor b-AP15 na viabilidade dos casais de parasitas de *S. mansoni* e na expressão quantitativa do mRNA de *SmP14*

A viabilidade foi agrupada de acordo com as mudanças na motricidade dos casais e morte (definida como o casal não tendo nenhum movimento após 2 minutos) de acordo com os procedimentos padrão para a triagem de compostos definidos pelo WHO-TDR (Ramirez B. et al, 2007), sendo a cultura realizada de acodo com o item 3.2.

O primeiro teste (não demonstrado) com a droga b-AP15, nas concentrações citadas anteriormente, demonstrou que nas concentrações de 3,125 e 6,250 µM houve diminuição da atividade motora dos parasitas machos e fêmeas; com 12,5 e 25 µM a atividade foi mínima e com 50 µM houve morte dos parasitas. Diante dos resultados obtidos, optou-se por repetir os experimentos, utilizando as concentrações de 0,2; 0,4; 0,8 e 1,6 µM (**Figura 12**), as quais não demonstraram alterações, exceto no período de 72 horas na concentração de 1,6 µM.

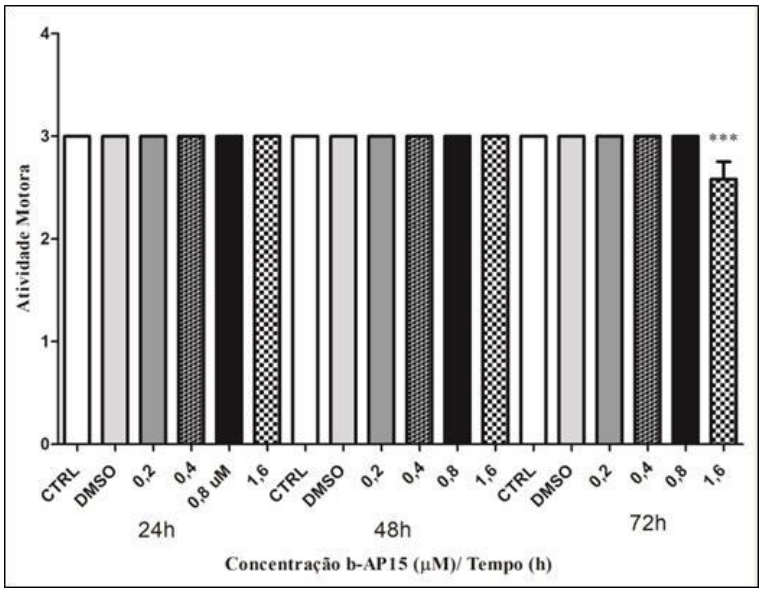

Figura 12 - Efeito in vitro de b-AP15 na viabilidade de casais maduros de *S. mansoni*, com ênfase nas mudanças de atividade motora dos casais, tratados por até 72h. Casais de vermes adultos foram incubados com a droga b-AP15 nas dosagens de 0,2; 0,4; 0,8 e 1,6 µM. A viabilidade dos casais foi monitorada usando a escala de viabilidade de 0 à 3 (3 = vitalidade total, atividade normal, 2 = atividade diminuída, 1 = atividade mínima, 0 = morte). Como controles negativos, os casais foram incubados em meio RPMI160 na presença e ausência de DMSO 0,1%. Os resultados apresentaram uma significância de ± S.E.M para três experimentos independentes, sendo o n=12 casais para cada experimento. O asterisco indica as diferenças estatisticamente significativas quando os grupos foram comparados com o controle em meio RPMI (***$p < 0.001$). Para análise foi utilizado o método de ANOVA.

Para o ensaio de viabilidade, casais de vermes adultos foram mantidos por 24 horas em meio RPMI 160, em condições descritas anteriormente (item 3.2). Para analisar o efeito da droga na viabilidade dos casais, utilizaram-se as dosagens de 0,2 a 3,2 µM, a fim de analisar uma concentração acima da que inibe a oviposição. Realizaram-se três experimentos independentes, com um n=12 casais por experimento. Após este período de cultivo, fez-se o ensaio de MTT/ formazan (item 3.3) (Comley JCW et al., 1989). Verificou-se então que houve alteração da viabilidade somente na concentração de 3,2 µM em relação aos controles negativos. No entanto, houve diferença em relação ao controle positivo de todos os casais incubados com o inibidor, não havendo morte dos casais de parasitas nas concentrações em que os mesmos foram incubados (**Figura 13**).

Diante desses resultados, foi escolhida a dosagem de 1,6 µM para os próximos experimentos, pois diminui a oviposição dos parasitas fêmeas e não há a alteração de viabilidade em relação aos controles negativos em um período de 24 horas havendo diferença em relação ao controle positivo. No entanto, os experimentos seguintes foram realizados também com casais tratados com uma dosagem abaixo (0,8 µM) e uma dosagem acima (3,2 µM) e outros com a dosagem de 50µM que é esquistomissida.

Tabela 2-Comparação entre controle (CTRL) e as diferentes dosagens da droga b-AP15 na viabilidade dos casais de parasitas de *S. mansoni no período* de 24h de tratamento.

CTRL e CTRL56 em relação aos tratamentos b-AP15 (µM)	Diferença Estimada	Valor p	Intervalo de confiança 95%	
			Inferior	Superior
CTRL – DMSO	0,06	0,0526	-0,0007	0,1176
CTRL – 0,2	0,05	0,0723	-0,0049	0,1133
CTRL – 0,4	0,07	0,0207	0,0107	0,1290
CTRL – 0,8	-0,01	0,7838	-0,0674	0,0509
CTRL – 1,6	0,02	0,4500	-0,0364	0,0819
CTRL – 3,2	0,16	0,0001	0,1050	0,2233
CTRL56– DMSO	0,35	0,0001	0,2901	0,4084
CTRL56– 0,2	0,35	0,0001	0,2944	0,4127
CTRL56– 0,4	0,34	0,0001	0,2788	0,397
CTRL56– 0,8	0,42	0,0001	0,3569	0,4751
CTRL56– 1,6	0,39	0,0001	0,3259	0,4442
CTRL56– 3,2	0,24	0,0001	0,1845	0,3027

Casais de parasitas foram incubados em meio RPMI 1640 na presença e ausência de DMSO 0,1 % (controles negativos). Incubados em meio RPMI 1640 com as dosagens de 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 µM de b-AP15 por 24h. Foi realizado o ensaio de viabilidade com MTT/Formazan. Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes, sendo o n=12 casais para cada experimento. Para a análise foi utilizado modelo de regressão com efeitos mistos *(R Core Team e SAS Statistical Software*).

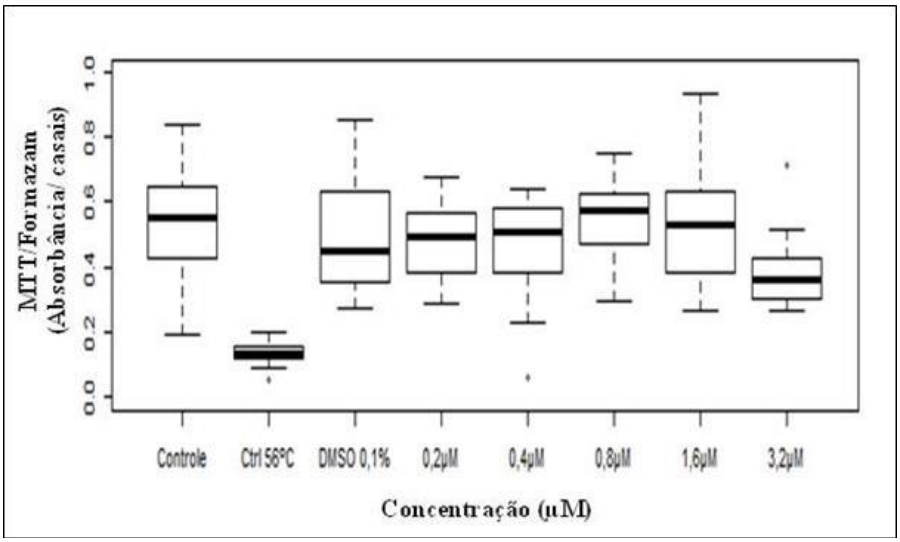

Figura 13- Efeito in vitro na viabilidade de casais maduros de *S. mansoni* tratados por 24h com b-AP15 pelo ensaio MTT/formazan medido a 550 nm. Casais de vermes adultos foram incubados na presença de diferentes dosagens de b-AP15: 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 uM. Como grupos controles, casais foram incubados com meio RMPI 1640 na presença e ausência de DMSO 0,1 %. No grupo controle positivo, casais de vermes adultos foram mortos por calor a 56 ° C. As análises foram realizadas a partir de valores de três experimentos independentes, sendo o n = 12 casais utilizados em cada experimento para cada concentração.

Após avaliar qual a dosagem da droga interferia na oviposição, mas sem que alterasse a viabilidade, foi analisado o nível de expressão do mRNA de p14 (*SmP14*) a fim de validar o

processo de inibição da droga, havendo diferença estatística ($p < 0,05$) entre as dosagens de 1,6 e 3,2 µM em relação ao controle (CTRL) de acordo com o item 3.10.

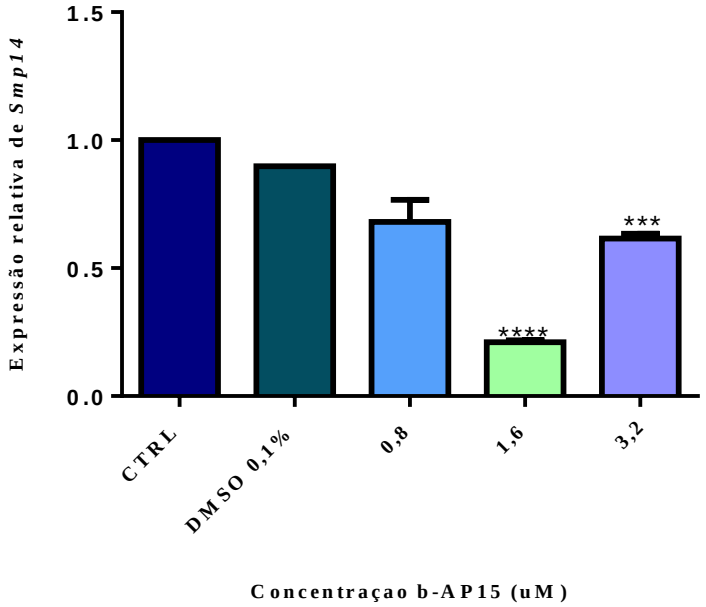

Figura 14- Expressão quantitativa do mRNA de SmP14. O nível de expressão dos mRNAs foram analisados em casais de vermes adultos incubados na presença e ausência da droga b-AP15 por um período de 24h por PCR quantitativo. As dosagens utilizadas foram: 0,8; 1,6 e 3,2 uM de b-AP15. Como controles negativos foram utilizados parasitas em meio RPMI 160 com a ausência (CTRL) e presença de DMSO 0,1%. A expressão foi calculada de acordo com o método Ct $2^{-\Delta\Delta CT}$ e normalizada pela expressão do padrão endógeno de *SmGAPDH*. Os asteriscos (*) representam a diferença estatística em relação ao grupo CTR ($p < 0,05$). O experimento foi realizado em triplicata técnica e biológica. O teste utilizado foi *one-way anova* e o *pós-teste Turkey*.

4.3 A droga inibe parcialmente a atividade do complexo 20S de casais do parasita

Após definida a dosagem e tempo em que a droga inibiu a oviposição dos casais, ou seja, fez-se a padronização da cultura, foi realizada a atividade do proteassoma 26S, de acordo com os itens 3.4.2 e 3.6. O extrato foi incubado da seguinte maneira: com o b-AP15 nas seguintes dosagens: 0,8; 1,6; 3,2 e 50 µM; com 50 µM de MG132 (controle positivo) e com 0,1% de DMSO e sem nenhum tratamento (controles negativos). A atividade foi avaliada nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos **(Figura 15)**.

Os resultados experimentais mostraram que houve uma alteração em torno de 50% ao incubar o extrato com a droga em relação tanto aos controles negativos como ao controle positivo. A inibição foi progressiva e teve início a partir de 1,6 µM, sendo que a partir da concentração de 3,2 µM, não houve uma alteração dose-resposta quando o extrato foi incubado com 50 µM, sendo nos dois casos em torno de 50%.

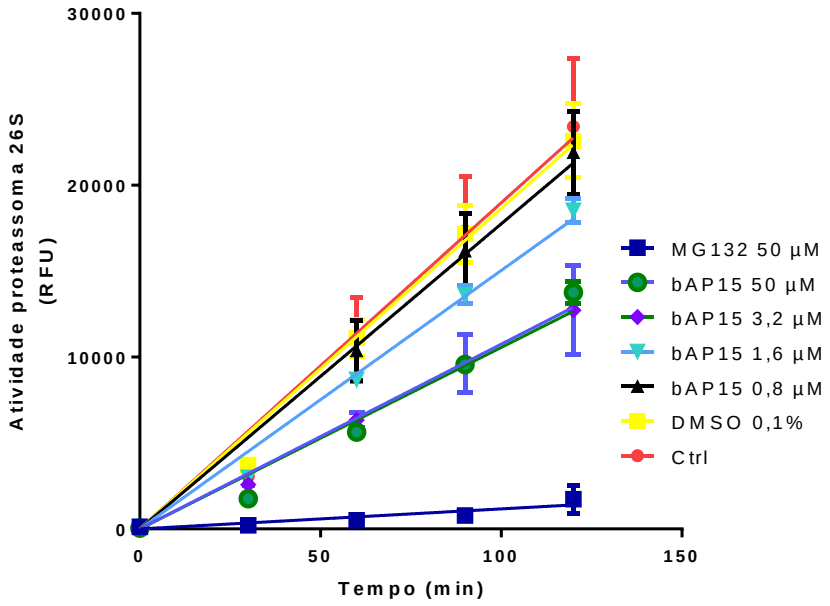

Figura 15- Atividade do proteassoma 26S de extrato de casais de parasitas com e sem a droga b-AP15. Após a perfusão, foi extraído o extrato de 350 casais de parasitas. Foram utilizadas 50 µg de proteínas para cada amostra. Amostras: extratos sem incubação e incubados com DMSO 0,1% (controles negativos); extrato incubado com MG 132 (controle positivo); e incubados com a droga b-AP15 nas dosagens de 1,6; 3,2 e 50 µM. A medida da fluorescência foi feita nos seguintes tempos: 0; 30; 60; 90 e 120 minutos. Foi realizada triplicata biológica e quintuplicata técnica.

4.4 Expressão quantitativa do mRNA de *SmUbiquitina* e proteínas ubiquitinadas

Em seguida, sabendo-se que a inibição da atividade da partícula 20S ocorria de forma parcial, fez-se a análise da expressão quantitativa do mRNA de *SmUbiquitina* descrito no item 3.10 e do conteúdo ubiquitinado ligado a proteínas de diversos pesos moleculares por *Western blotting* (item3.5). Para realização do experimento, os casais de parasitas foram incubados em cultura *in vitro* de acordo com o item 3.2. A análise de *SmUbiquitina* apresentou um aumento do nível do padrão de expressão nas dosagens de 1,6 e 3,2 µM em relação ao controle (CTRL) devido ao possível acúmulo de conteúdo ubiquitinado, mas não houve diferença estatística entre as dosagens da droga utilizada **(Figura 16)**. Assim, procedeu-se a avaliação do acúmulo de proteínas ubiquitinadas **(Figura 17)**, o resultado apresentou diferenças estatísticas em relação aos controles (CTRL e DMSo 0,1%) para o tratamento a partir de 1,6 µM de b-AP15 e permaneceu sem alterações estatísticas em relações aos controles negativos, mesmo com o aumento da dosagem. Não ocorreu diferença entre as dosagens de 3,2 uM de b-AP15 e a mesma dosagem do inibidor clássico do proteasoma 26S (MG 132). No entanto, o controle positivo MG 132, na dosagem de 50 uM em relação a mesma dosagem de b-AP15, houve

diferença estatística, mostrando que MG 132 interfere de maneira mais efetiva no acúmulo de proteínas ubiquitinadas.

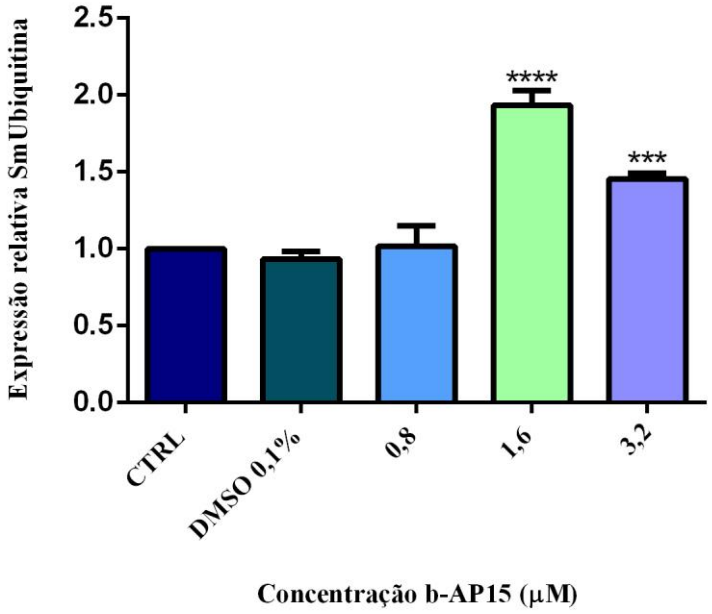

Figura 16- Expressão quantitativa do mRNA de *SmUbiquitina*. Os níveis de expressão dos mRNAs foram analisados em casais de vermes adultos incubados na presença e ausência da droga b-AP15 por um período de 24h por PCR quantitativo. As dosagens utilizadas foram: 0,8; 0,8; 1,6 e 3,2 uM de b-AP15. Como controles negativos foram utilizados parasitas em meio RPMI 160 com a ausência (CTRL) e presença de DMSO 0,1%. A expressão foi calculada de acordo com o método Ct $2^{-\Delta\Delta CT}$ e normalizada pela expressão do padrão endógeno de *SmGAPDH*. Os asteriscos (*) representam a diferença estatística em relação ao grupo CTR ($p < 0,05$). O experimento foi realizado em triplicata técnica e biológica. A análise estatística foi feita por *one-way anova* e o pós-teste por *Turkey*.

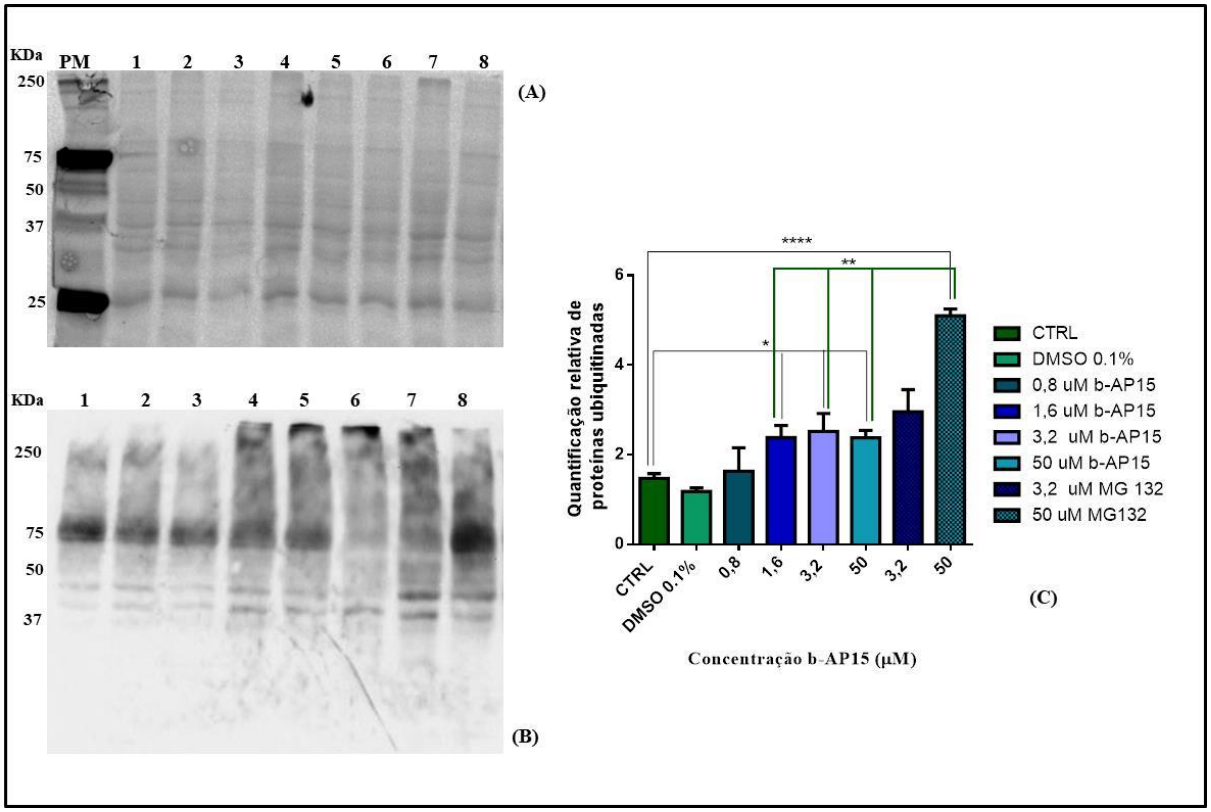

Figura 17-Análise proteica de conjugados ubiquitinados. (A) Gel *FastCast* proteinas totais. **(B)** *Western blotting* para análise e identificação de proteínas ubiquitinadas do extrato total de proteínas extraídas de casais de parasitas com a presença e ausência de b-AP15. Para a análise foram utilizadas 25 µg/ml de proteínas extraídas de 50 casais de parasitas tratados por 24h. (1) CTRL (controle RMPI 160 completo) e (2) RPMI 160 com DMSO 0,1% como controles negativos; (3) b-AP15 0,8 µM; (4) b-AP15 1,6 µM; (5) b-AP15 3,2 µM; (6) b-AP15 50 µM; (7) MG132 3,2 µM e (8) MG 132 50 µM como controles positivos.. **(C)** Análise estatística dos conjugados ubiquitinados realizada por *one-way anova* e teste de *Turkey*, sendo as diferenças estatísticas representadas por asterisco (*) ($p < 0,05$). O experimento foi realizado em triplicada biológica.

4.5 b-AP15 induz alterações no tegumento e organelas de vermes adultos de *S. mansoni*

A fim de analisar se o inibidor b-AP15 causaria danos nas células e organelas dos parasitas machos e fêmeas, foi realizada a microscopia eletrônica de transmissão (item 3.8.1.2). Para verificar se ocorreriam alterações morfológicas no tegumento de machos e fêmeas tratados com a droga, foi realizada a microscopia de varredura (MEV), descrita em materiais e métodos de acordo com o item 3.8.1.1.

Após a adaptação dos casais de *S. mansoni* em cultura, os mesmos foram incubados por 24 horas e 72 horas (item 3.2) na presença da droga. Como controles negativos, casais foram mantidos em meio RPMI 160 na ausência e presença de DMSO 0,1% e tratados com a droga nas dosagens de 1,6; 3,2 e 50 µM. Após o período de incubação, os casais foram separados manualmente e processados para a microscopia eletrônica (3.8.1).

Na **figura 18,** após 24 hoas de tratamento, as parasitas fêmeas sem tratamento não apresentam alteração tegumentar: tegumento liso, com fissuras normais e sem alteração nas ventosas, tanto na parte ventral como na dorsal e na cauda. Entretanto, o mesmo não acontece com as parasitas fêmeas tratadas com o inibidor, a partir de 1,6 µM, apresentaram alterações tegumentares como desintegração, enrugamento e bolhas, tanto na extensão do parasita como na ventosa. No período de 72 horas de tratamento (**figura 19**), não ocorreram muitas alterações externas no tegumento na dosagem de 1,6 µM, mas com 3,2 µM houve um aumento da desintegração tegumentar, sendo que com 50 µM ocorreu o enrugamento tegumentar e morte do parasita fêmea.

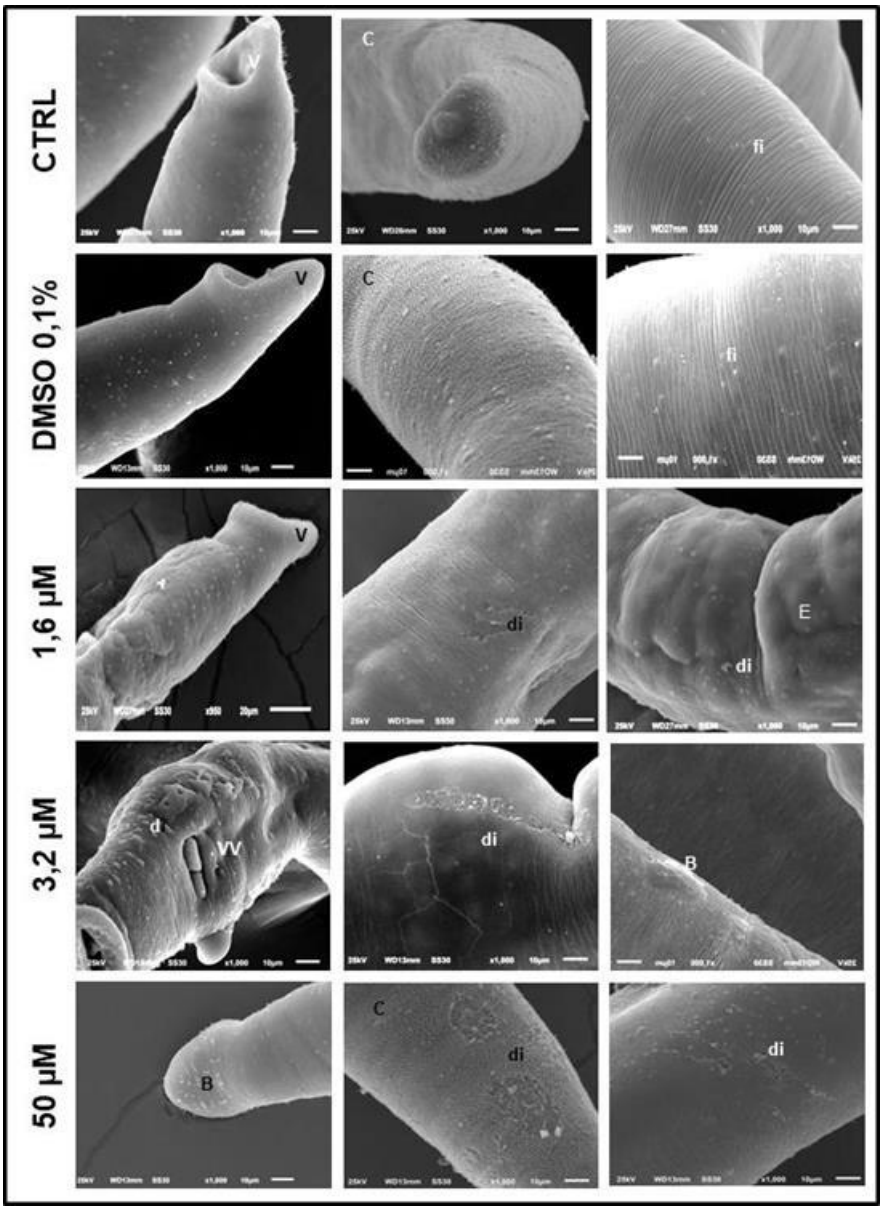

Figura 18- Microscopia de Varredura (MEV) de parasitas fêmeas incubadas com e sem a droga b-AP15 por 24 h. Casais de parasitas foram incubados em meio RPMI 1640 com e sem DMSO 0,1% (controles negativos). Casais foram incubados com 1,6; 3,2 e 50 µM da droga b-AP15 Depois da incubação, vermes machos e fêmeas de *S. mansoni* foram separados e processados para análise de Microscopia (MEV). Parasitas fêmeas controles apresentaram o tegumento liso, com fissuras (fi) normais e sem alteração nas ventosas (V) tanto na parte ventral (VV) como na dorsal (VD) e na cauda (C). Parasitas fêmeas incubadas com a droga, a partir da dosagem de 1,6 µM, apresentaram alterações tegumentares como desintegração (di), enrugamento (E) e bolhas (B) tanto na extensão do parasita como na ventosa. O experimento foi realizado a partir de perfusões distintas, sendo analisadas dez parasitas fêmeas para cada amostra.

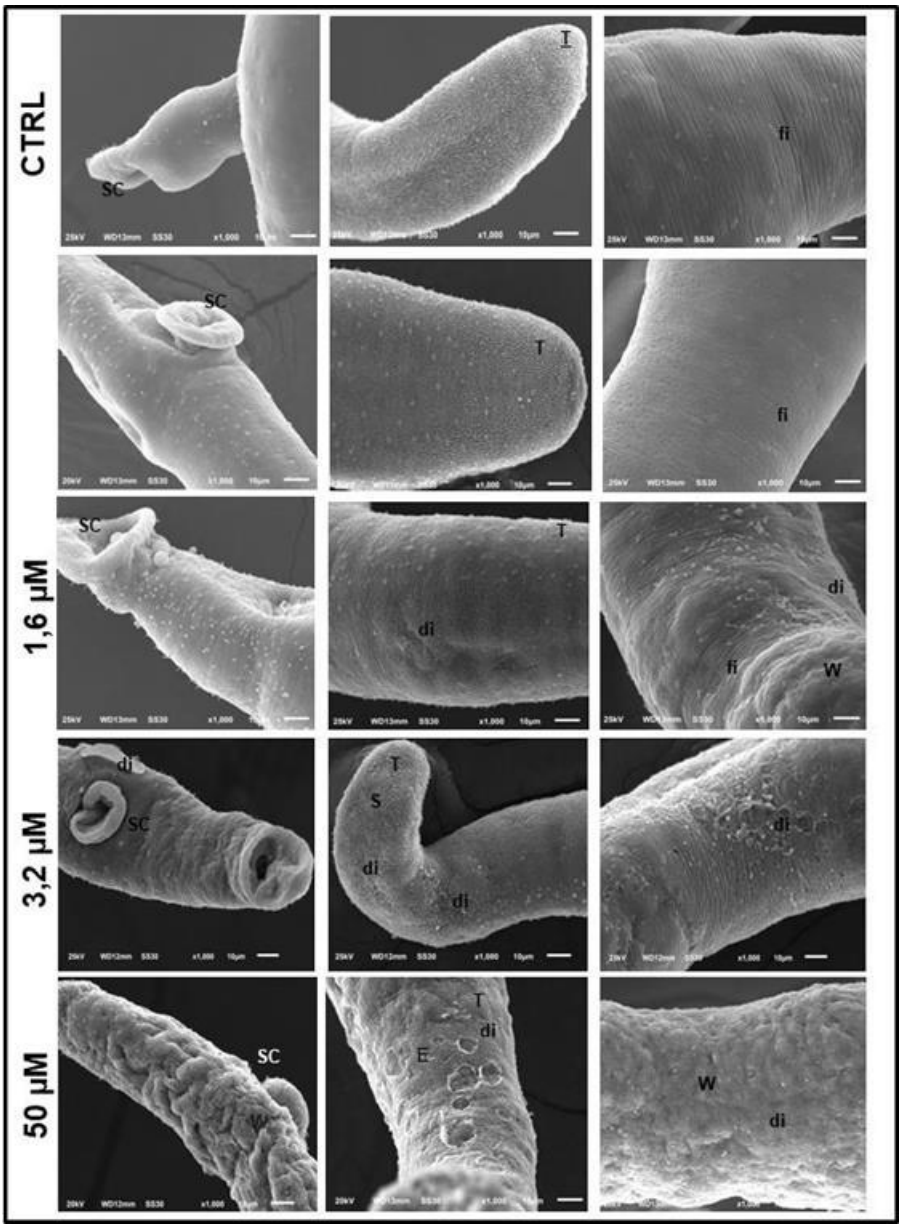

Figura 19- Microscopia de Varredura (MEV) de parasitas fêmeas incubadas com e sem a droga b-AP15 por 72 h. Casais de parasitas foram incubados em meio RPMI 1640 com e sem DMSO 0,1% (controles negativos). Casais foram incubados com 1,6; 3,2 e 50 µM da droga b-AP15. Depois da incubação, vermes machos e fêmeas de *S. mansoni* foram separados e processados para análise de Microscopia (MEV). Parasitas fêmeas controles apresentaram o tegumento liso, com fissuras (fi) normais e sem alteração nas ventosas (V) tanto na parte ventral (VV) como na dorsal (VD) e na cauda (C). Parasitas fêmeas Incubadas com a droga a partir da concentração de 1,6 µM apresentaram alterações tegumentares como desintegração (di) tegumentar, enrugamento (E) e bolhas tanto na extensão do parasita como na ventosa. Na dosagem de 50µM a fêmea estava morta. O experimento foi realizado a partir de perfusões distintas, sendo analisadas dez parasitas fêmeas para cada amostra.

Os parasitas machos foram incubados e analisados da mesma forma, depois de 24 horas com a presença e ausência de droga (**figura 20**). Na morfologia do tegumento de vermes adultos controles, pôde-se observar a presença de uma grande quantidade de

tubérculos e espículas, não havendo alterações na ventosa e canal ginecófaro. A partir do tratamento com 1,6 µM, ocorreram alterações no canal ginecóforo e mudanças tegumentares tais como: descamação, formação de bolhas, espaçamento entre os tubérculos e desintegração tegumentar, com o desaparecimento dos tubérculos e espículas, além de exposição da membrana basal. No tempo de 72 horas de tratamento (**figura 21**), as alterações aumentaram em todas as concentrações. No entanto, na concentração de 50 µM, os parasitas machos estavam mortos.

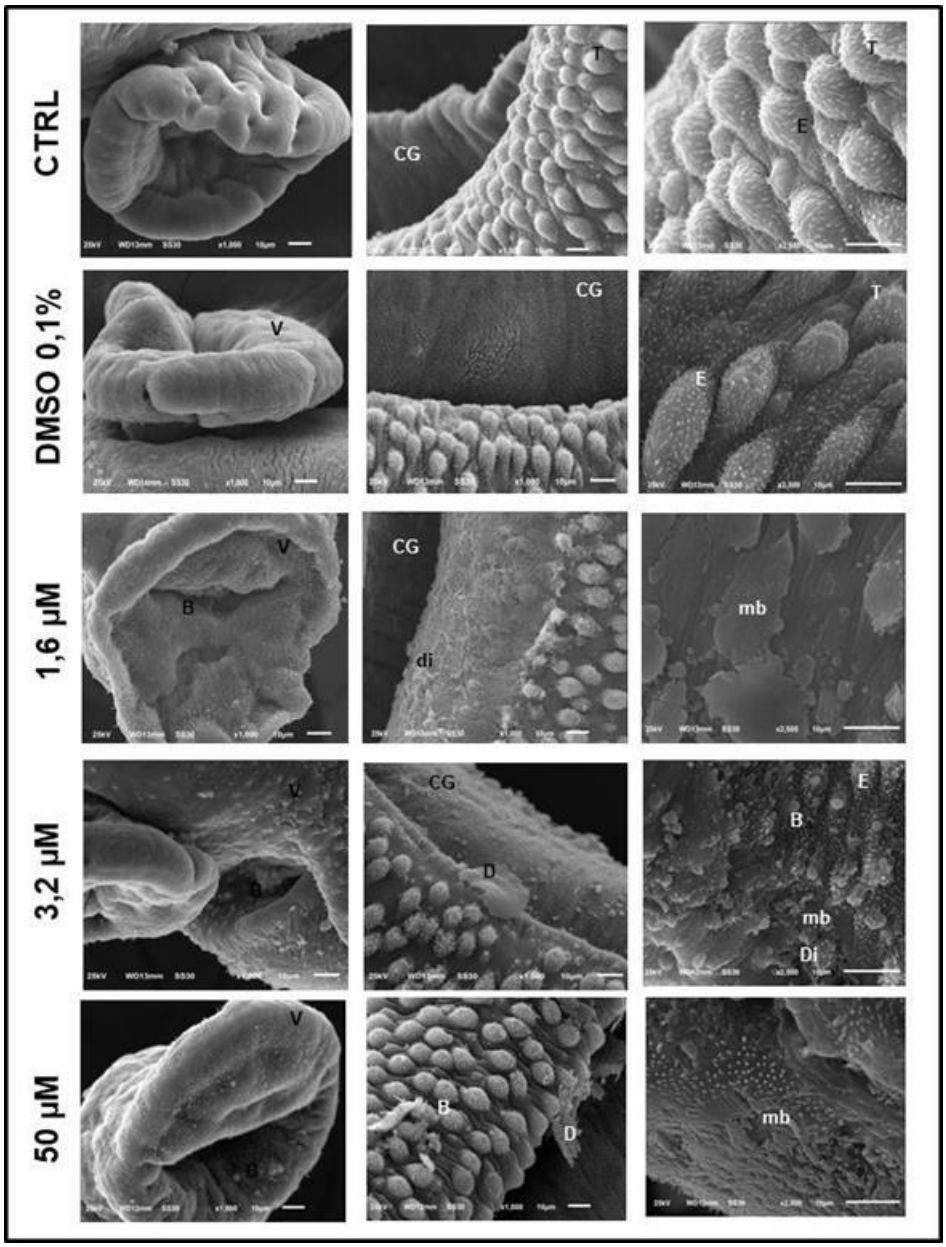

Figura 20 - Microscopia de Varredura (MEV) de parasitas machos incubados com e sem a droga b-AP15 por 24 h. Casais de parasitas foram incubados em meio RPMI 1640 com e sem DMSO 0,1% (controles negativos). Casais foram incubados com 1,6; 3,2 e 50 µM da droga b-AP15. Depois da incubação, vermes machos e fêmeas de *S. mansoni* foram separados e processados para análise de Microscopia (MEV). Os grupos controles não apresentaram alterações no tegumento, no canal ginecófaro (CG) e ventosa (V). O tegumento permaneceu com grande número de tubérculos (T) e espículas (E) típicas. A partir do tratamento com 1,6 µM, ocorreram alterações no canal ginecófaro e mudanças tegumentares tais como descamação (D), formação de bolhas (B), espaçamento entre os tuberculos e desintegração tegumentar (di), com o desaparecimento dos tubérculos e espículas, além de exposição da membrana basal (mb). O experimento foi realizado a partir de perfusões distintas, sendo analisados dez parasitas machos para cada amostra.

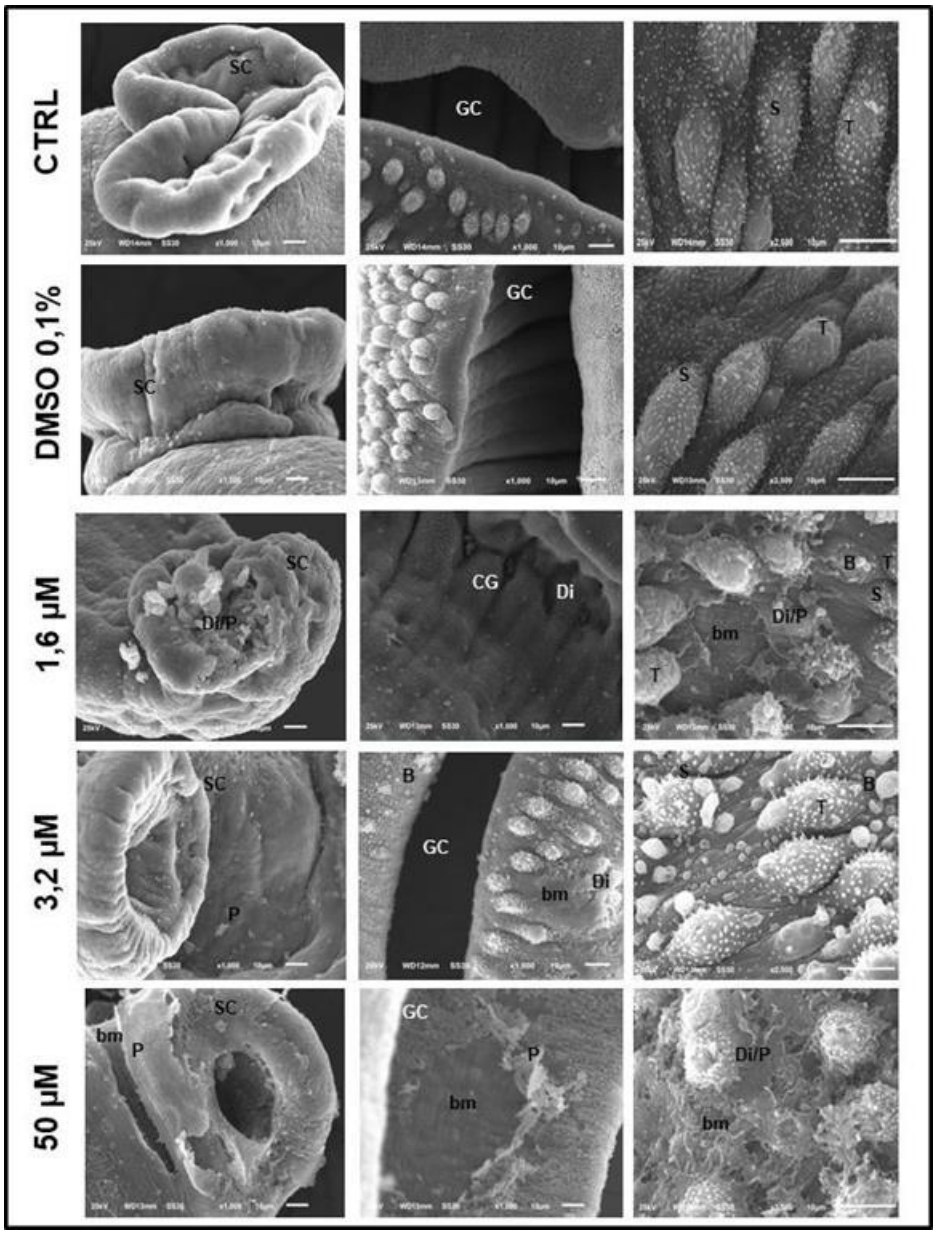

Figura 21- Microscopia de Varredura (MEV) de parasitas machos incubados com e sem a droga b-AP15 por 72h. Casais de parasitas foram incubados em meio RPMI 1640 com e sem 0.1% DMSO (controles negativos). Casais foram incubados com as concentrações de 1,6; 3,2 e 50 µM da droga. Depois da incubação, vermes machos e fêmeas de *S. mansoni* foram separados e processados para análise de Microscopia (MEV). Os grupos controles não apresentaram alterações no tegumento, no canal ginecófaro (CG) e ventosa (V). O tegumento permaneceu com grande número de tubérculos (T) e espículas (E) típicas. O tratamento com b-AP 15 por 72h causou alterações no canal ginecófaro e mudanças tegumentares, tais como, descamação (D), formação de bolhas (B) e desintegração (di) tegumentar, com o desaparecimento dos tubérculos e espículas, além de exposição da membrana basal (mb). Não ocorreram grandes diferenças nas alterações causadas entre as doses de 1,6 µM e 3,2 µM, mas na dose de 50 µM houve alterações que levaram a morte do parasita. O experimento foi realizado a partir de perfusões distintas, sendo analisados dez parasitas machos para cada amostra.

As análises das organelas celulares dos casais de parasitas, após o tratamento com o inibidor, foram realizadas por MET (itens 3.8.1 e 3.8.1.2), como descrito anteriormente. Os casais de parasitas foram incubados em meio RPMI 1640 na ausência e presença de DMSO

0,1%, os quais foram utilizados como controles negativos. Os casais foram incubados com 1,6; 3,2 e 50 µM da droga (item 3.2) para ver quais alterações estavam presentes. Depois da incubação, vermes machos e fêmeas de *S. mansoni* foram separados e processados para análise da MET.

Os vermes fêmeas utilizados como controles e incubadas por 24 horas (**figura 22),** não apresentaram em seus tecidos a formação de vacúolo, mudanças celulares ou alteração tegumentar. Na dosagem de 1,6µM, ocorreram nas células teciduais formações de vacúolos, assim como no tegumento, sendo que algumas mitocôndrias estavam inchadas e alguns núcleos fragmentados. As células vitelínicas apresentaram alterações em alguns *droplets* vitelínicos. Não havendo mudanças das fibras musculares e uma menor alteração do tecido abaixo delas, em relação às outras concentrações analisadas. Na concentração de 3,2 µM, as mesmas alterações teciduais apareceram, entretanto, com maior intensidade nos *droplets* vitelínicos das células vitelínicas. Uma maior quantidade de mitocôndrias estava alterada. Na concentração de 50 µM, as fêmeas mostravam em seus tecidos a presença de alguns pontos de necrose tecidual, fragmentação da membrana celular e nuclear. A fibra muscular dos vermes fêmeas estava presente, mas apresentava-se em uma faixa estreita, com o tecido abaixo delas totalmente necrosado.

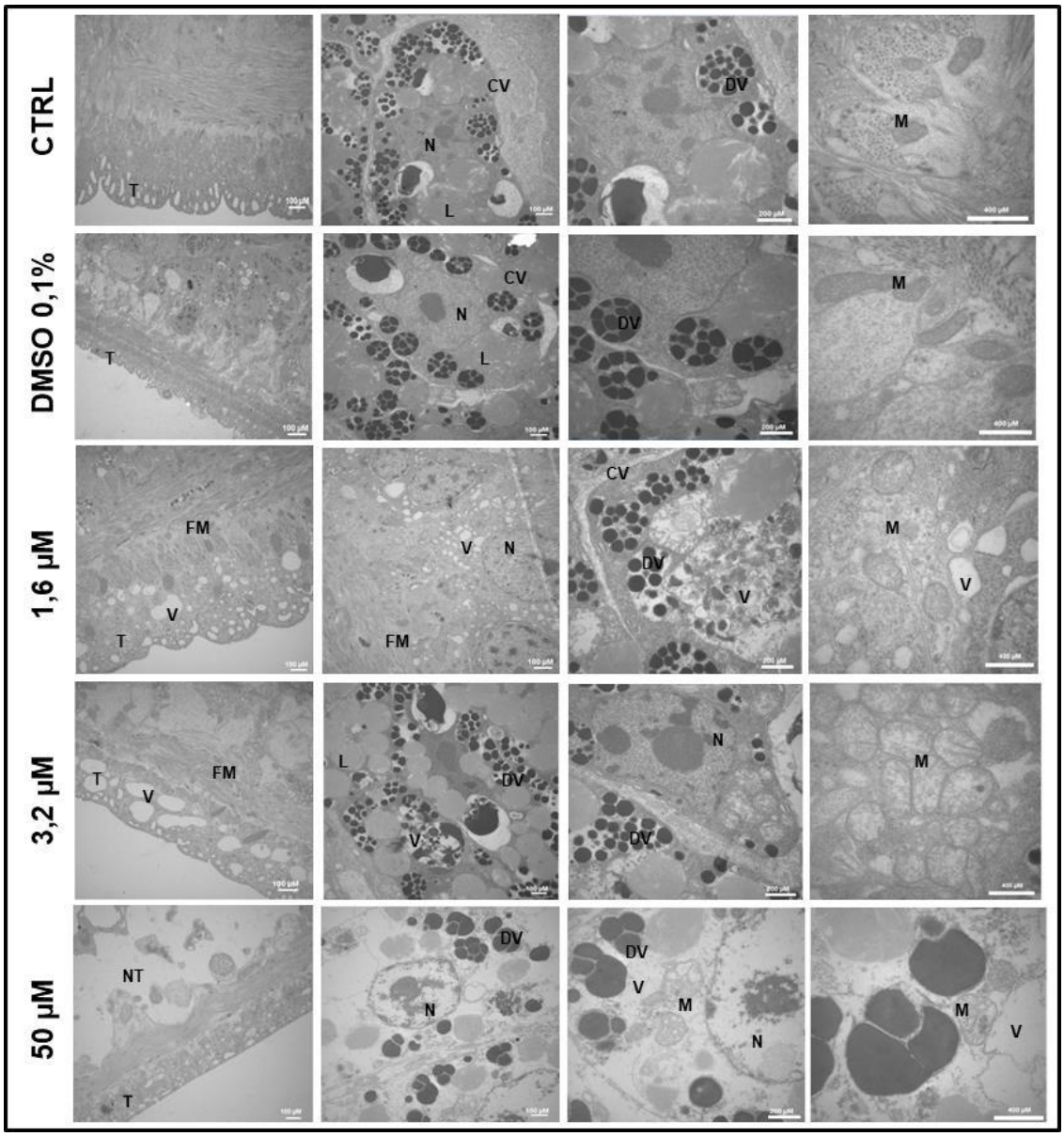

Figura 22- Microscopia de Transmissão (MET) de parasitas fêmeas incubadas com e sem a droga b-AP15 por 24 h. Casais de parasitas foram incubados em meio RPMI 1640 com e sem 0.1% DMSO (controles negativos). Casais foram incubados com 1,6; 3,2 e 50 µM da droga. Depois da incubação, vermes machos e fêmeas de *S. mansoni* foram separados e processados para análise de Microscopia (MET). Tegumento (T); fibra muscular (FM), lipídeos (L); células vitelínicas (CV), droplets vitelínicos, vacúolos (V), necrose tecidual (NT) e mitocôndrias (M). As mudanças tegumentares iniciaram a partir da dosagem de 1,6 µM com a presença de vacúolos, havendo outras alterações ultraestruturais no parasita. Os controles experimentais não apresentaram mudanças estruturais nas organelas celulares. O experimento foi realizado a partir de perfusões distintas, sendo analisadas seis parasitas fêmeas para cada amostra.

A **figura 23** mostra as alterações dos parasitas fêmeas tratados por 72 horas com a droga, os quais não apresentaram grandes modificações em relação a 24 horas de tratamento. Entretanto, a concentração de 50 µM causou uma maior alteração na parte externa do tegumento e nas mitocôndrias, sendo que nessa concentração e nesse tempo os vermes fêmeas estavam mortos.

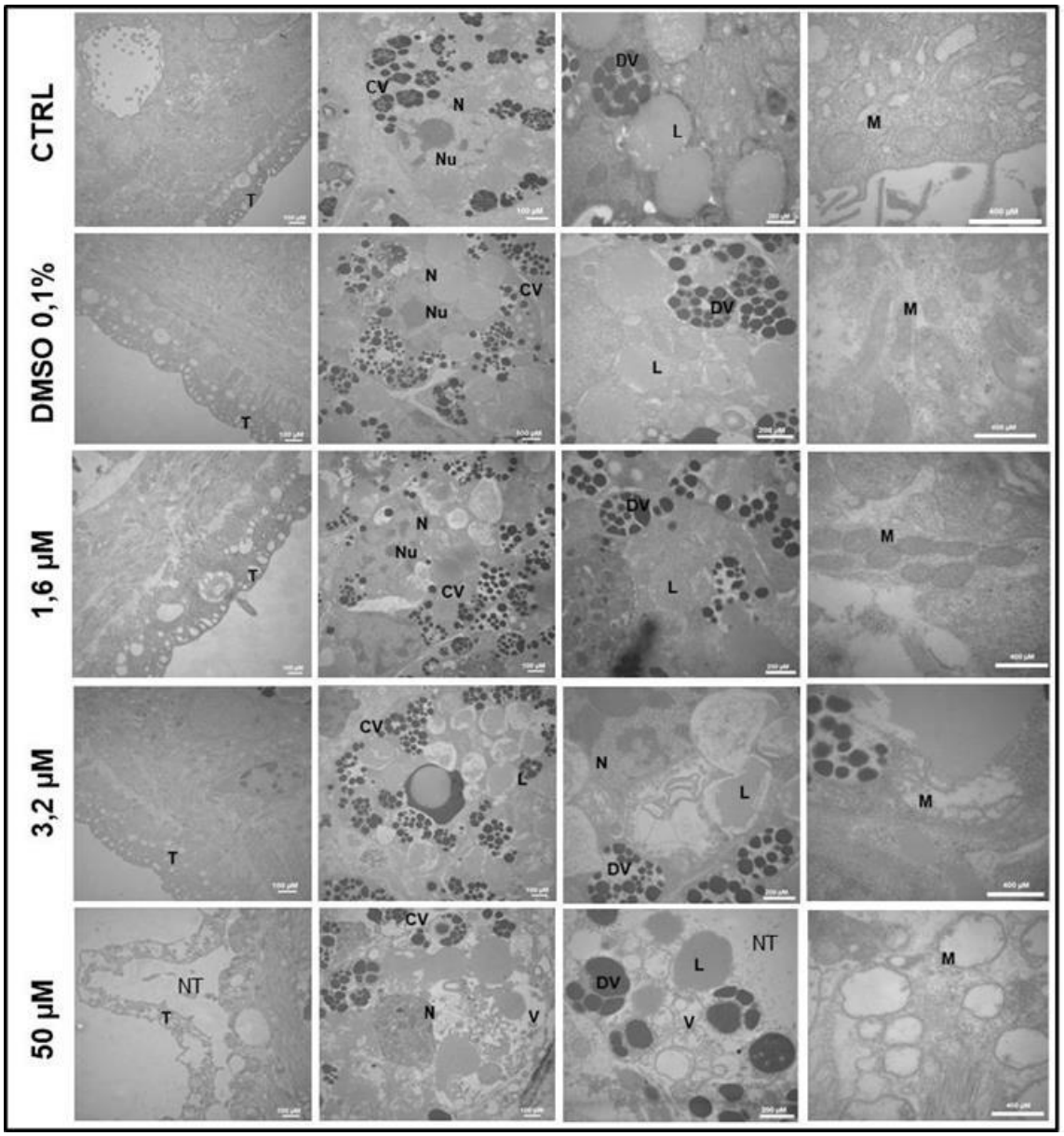

Figura 23- Microscopia de Transmissão (MET) de parasitas fêmeas incubadas com e sem a droga b-AP15 por 72 h. Casais de parasitas foram incubados em meio RPMI 1640 com e sem 0.1% DMSO (controles negativos). Casais foram incubados com 1,6; 3,2 e 50 µM de b-AP15. Depois da incubação, vermes machos e fêmeas de *S. mansoni* foram separados e processados para análise de Microscopia (MET). Tegumento (T); fibra muscular (FM), lipídeos (L); células vitelínicas (CV), droplets vitelínicos, vacúolos (V), mitocôndrias (M) e necrose tecidual (NT). As mudanças tegumentares iniciaram a partir da dosagem de 1,6 µM com a presença de vacúolos, havendo outras alterações ultraestruturais no parasita. O experimento foi realizado a partir de perfusões distintas, sendo analisadas seis parasitas fêmeas para cada amostra.

Na **figura 24** foram observados os parasitas machos. Os parasitas incubados como controles negativos não apresentavam alterações no tegumento ou teciduais, incluindo as organelas celulares. Podem ser notadas alterações nas espículas do tegumento do parasita na dosagem de 1,6 e 3,2 µM, sendo que o mesmo estava lesionado. No entanto, em imagens não demonstradas, algumas áreas o tegumento não se mostrava com a mesma alteração. No

período analisado, os parasitas machos tratados com a droga não tinham diferenças nas fibras musculares em relação aos controles. A partir da dosagem de 1,6 µM ocorreu a formação de vacúolos e algumas células apresentavam fragmentação nuclear, sendo que na análise tecidual mais interna dos parasitas, os controles tinham suas estruturas totalmente preservadas e a partir da dosagem de 1,6 µM, ocorreram a formações de vacúolos autofágicos degradativos e o inchaço de diversas mitocôndrias dos tecidos dos parasitas machos.

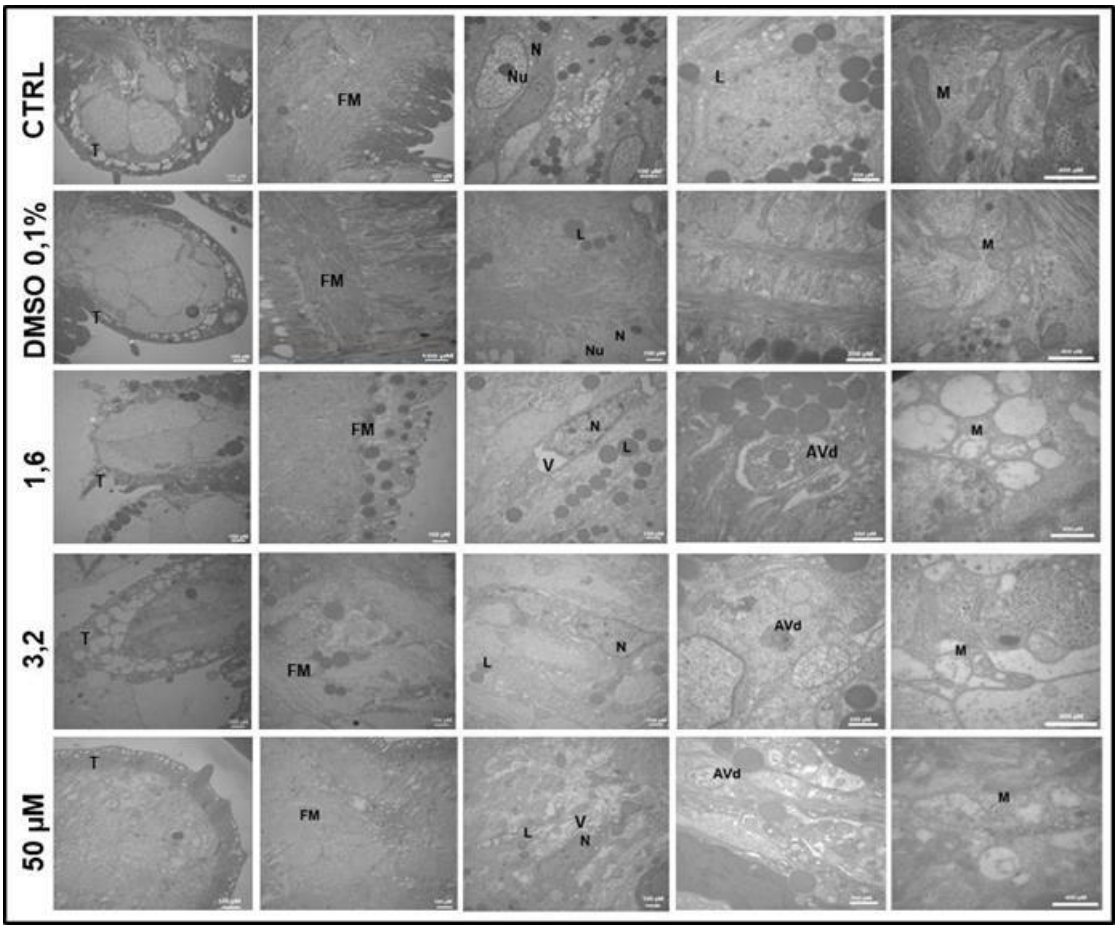

Figura 24 -Microscopia de Transmissão (MET) de parasitas machos incubados com e sem a droga b-AP15 por 24 h. Casais de parasitas foram incubados em meio RPMI 1640 com e sem 0.1% DMSO (controles negativos). Casais foram incubados com 1,6; 3,2 e 50 µM da droga. . Depois da incubação, vermes machos e fêmeas de *S. mansoni* foram separados e processados para análise de Microscopia (MET). Tegumento (T); fibra muscular (FM), lipídeos (L); células vitelínicas (CV), droplets vitelínicos, vacúolos (V), necrose tecidual (NT) e mitocôndrias (M). As mudanças tegumentares iniciaram a partir da dosagem de 1,6 µM com a presença de vacúolos, havendo outras alterações ultraestruturais no parasita. O experimento foi realizado a partir de perfusões distintas, sendo analisadas seis parasitas machos para cada amostra.

A **figura 25** mostra as alterações dos parasitas machos tratados por 72 horas com a droga, os quais não apresentaram grandes modificações em relação a 24 horas de tratamento. Entretanto, a dosagem de 50 µM causou uma maior alteração na parte externa do tegumento, com perda das espículas. Internamente, ocorreu a necrose tecidual em todo tecido abaixo do tegumento, restando apenas grânulos de lipídeos. Não havia mais a presença de células e suas

organelas. Apenas podemos identificar alguns núcleos fragmentados. Nessa dosagem e nesse tempo os vermes machos estavam mortos.

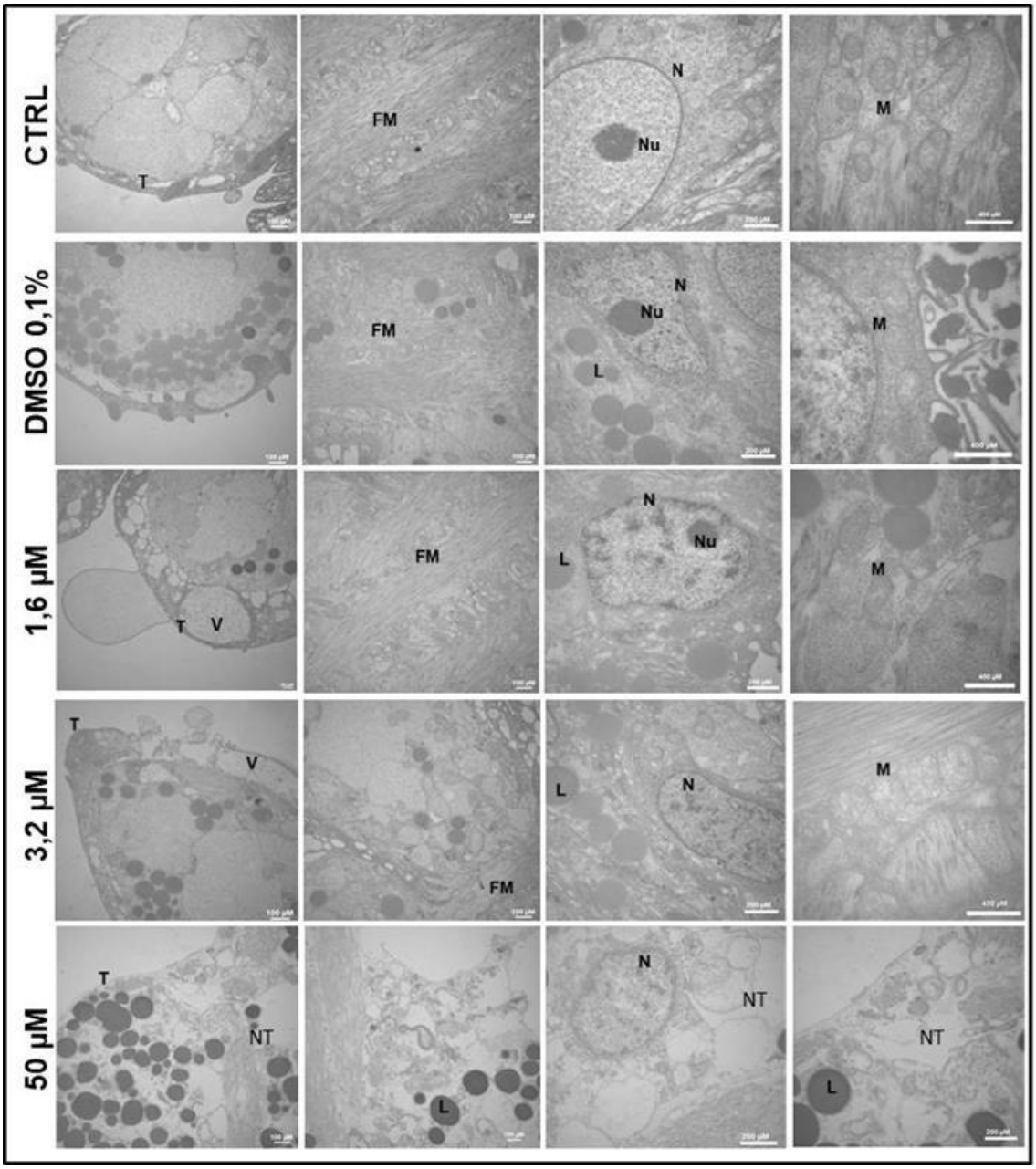

Figura 25 - Microscopia de Transmissão (MET) de parasitas machos incubados com e sem a droga b-AP15 por 72 h. Casais de parasitas foram incubados em meio RPMI 1640 na ausência e presença de 0.1% DMSO (controles negativos). Casais de parasitas foram incubados com 1,6; 3,2 e 50 µM da droga. Depois da incubação, vermes machos e fêmeas de *S. mansoni* foram separados e processados para análise de Microscopia (MET). Tegumento (T); fibra muscular (FM), lipídeos (L); vacúolos (V), vacúolo autofágico degradativo (AVd), mitocôndrias (M) e necrose tecidual (NT). As mudanças tegumentares e teciduais iniciaram a partir da concentração de 1,6 µM com a presença de vacúolos, havendo outras alterações ultraestruturais no parasita. O experimento foi realizado a partir de perfusões distintas, sendo analisadas seis parasitas machos para cada amostra.

4.6 Alterações nas estruturas reprodutivas dos casais de *S. mansoni*

As análises das estruturas reprodutivas dos casais de parasitas, após o tratamento com o inibidor, foram realizadas por microscopia confocal (item 3.8.2), como descrito anteriormente. Os casais de parasitas foram incubados em meio RPMI 1640 na ausência e presença de DMSO 0,1%, os quais foram utilizados como controles negativos. Os casais foram incubados com 1,6; 3,2 e 50 µM da droga (item 3.2) para ver quais alterações estavam presentes. Depois da incubação, vermes machos e fêmeas de *S. mansoni* foram separados e processados para análise.

Vermes fêmeas incubados por 24 horas com a droga b-AP15 não apresentaram mudanças estruturais no ovário, o qual possui os oócitos maturos ou imaturos, quando comparadas com o controle, mas apresentaram mudanças no ductos vitelínicos com 50 µM. No entanto, vermes fêmeas incubados por 72 horas apresentaram alteração nos ductos vitelínicos a partir de 1,6 µM e diferenças estruturais no ovário a partir de 3,2 µM e com 50 µM o ovário estava lesionado.

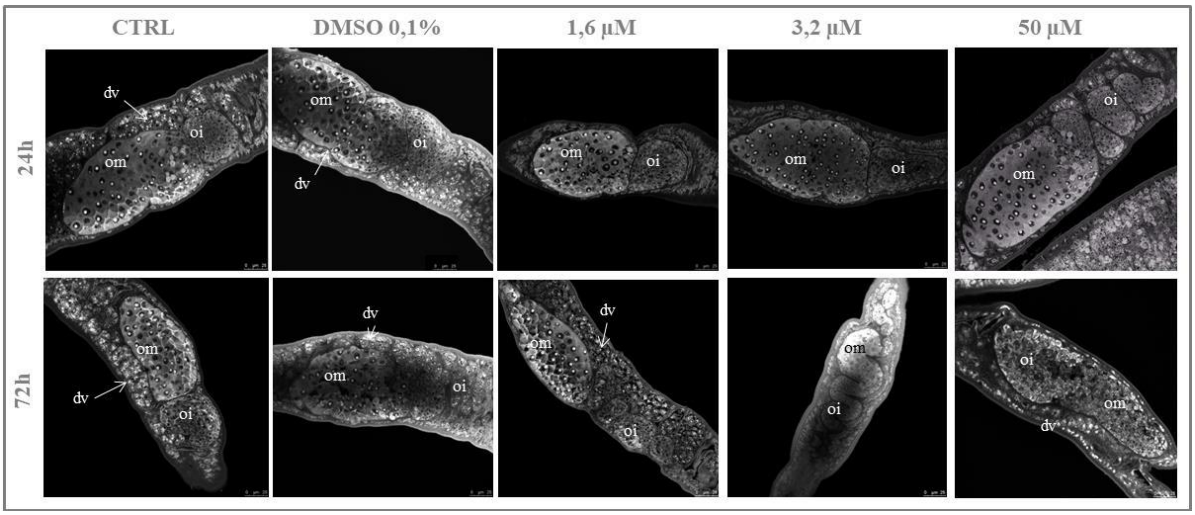

Figura 26- Microscopia Confocal de parasitas fêmeas incubadas na presença e ausência da droga b-AP15 por 24h e 72 h. Casais de parasitas foram incubados: em meio RPMI 1640 na presença e ausência de DMSO 0.1% (controles negativos) ou com 1,6; 3,2 e 50 µM da droga. Depois da incubação, vermes machos e fêmeas de *S. mansoni* foram separados e processados para análise. Ovários com oócitos maduros (om) e oocitos imaturos (oi) e ductos vitelínicos (dv). Para esse experimento, foram utilizados casais de parasitas de três perfusões distintas, sendo analisados 9 parasitas fêmeas para cada amostra e para cada tempo de incubação.

Os parasitas machos incubados por 24 horas com a droga b-AP15 não apresentaram mudanças estruturais tanto na vesícula seminal como nos lóbulos testiculares, quando comparados com os controles negativos (RPMI 160 completo na ausência e presença de

DMSO 0,1%). No entanto, os machos incubados por 72 horas apresentaram alteração nessas estruturas a partir de 3,2 µM, sendo que com 50 µM estavam totalmente alterados, apresentando lesões e modificações na membrana que envolve os lóbulos testiculares. Mas o número de lóbulos estava normal entre 7 e 10 lóbulos,

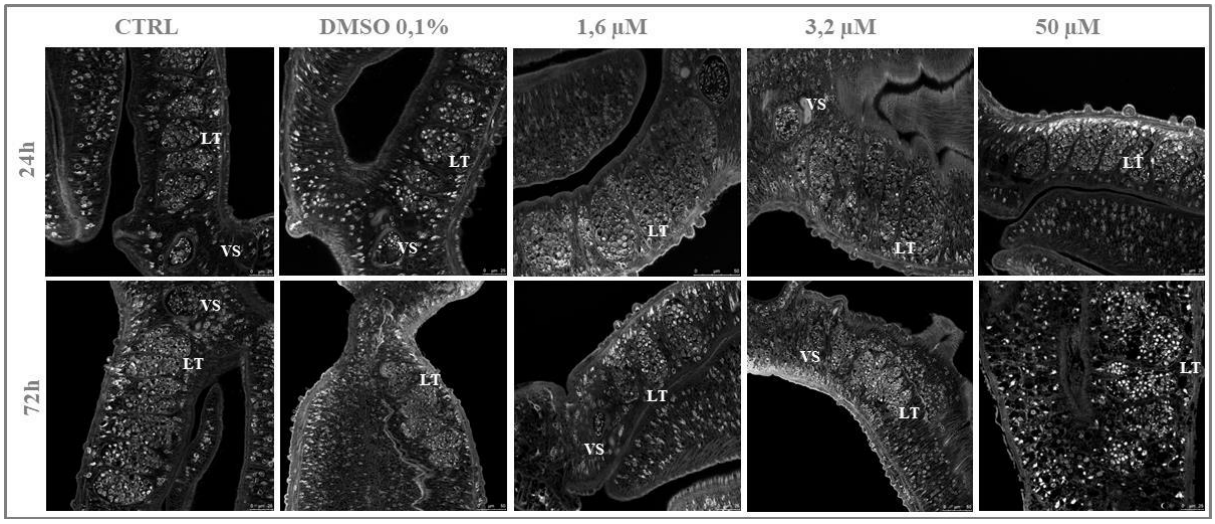

Figura 27 - Microscopia Confocal de parasitas machos incubados na presença e ausência da droga b-AP15 por 24h e 72 h. Casais de parasitas foram incubados: em meio RPMI 1640 na presença e ausência de DMSO 0.1% (controles negativos) ou com 1,6; 3,2 e 50 µM da droga. Depois da incubação, vermes machos e fêmeas de *S. mansoni* foram separados e processados para análise. Lóbulos testiculares (LT) e vesícula seminal (VS). Para esse experimento, foram utilizados casais de parasitas de três perfusões distintas, sendo analisados 9 parasitas machos para cada amostra e para cada tempo de incubação.

4.7 O inibidor não altera a via apoptótica nos casais de *S. mansoni* tratados por 24 horas *in vitro*

Perante os resultados da MET e da inibição de oviposição da cultura *in vitro* de casais incubados por 24 horas com a droga, avaliou-se se a via apoptótica estaria ativa nesse período. Dessa maneira, os casais de parasitas foram incubados *in vitro* de acordo com o item 3.2 e fez-se a expressão quantitativa das caspases -3 e 7, de acordo com o item 3.10, que pode ser observada na **figura 28**. A análise estatística foi realizada para observar se havia diferença na expressão entre o controle e os tratamentos, assim como o controle com DMSO 0,1%. Observou-se que a expressão de mRNA de *SmCasp-3* há diferença significativa a partir de 1,6 µM de b-AP15 e para *SmCasp-7* com 3,2 µM da droga.

Diante dos resultados anteriores, verificou-se se havia atividade da enzima caspase-3 **(Figura 29)**, a fim de analisar se a mesma estava ativa nas células do parasita. Para tanto, os parasitas foram tratados de acordo com os itens 3.2 e o ensaio de atividade enzimático foi realizado de acordo com os itens 3.4.3 e 3.7. Os casais de parasitas foram incubados em meio

RPMI 1640 com a ausência e presença de DMSO, os quais foram utilizados como controles negativos. Os casais foram incubados com 1,6 e 3,2 µM, ou seja, na concentração e no tempo (24 horas) em que iniciava a inibição da oviposição com a droga e na concentração acima dela e que havia alteração da viabilidade dos casais de parasita.

O experimento foi feito em triplicata técnica e biológica e a análise estatística dos dados mostrou não haver morte dos casais de *S. mansoni* causada por essa via. A única diferença estatística foi entre o controle positivo e o controle positivo com inibidor presente no *kit* usado para o ensaio.

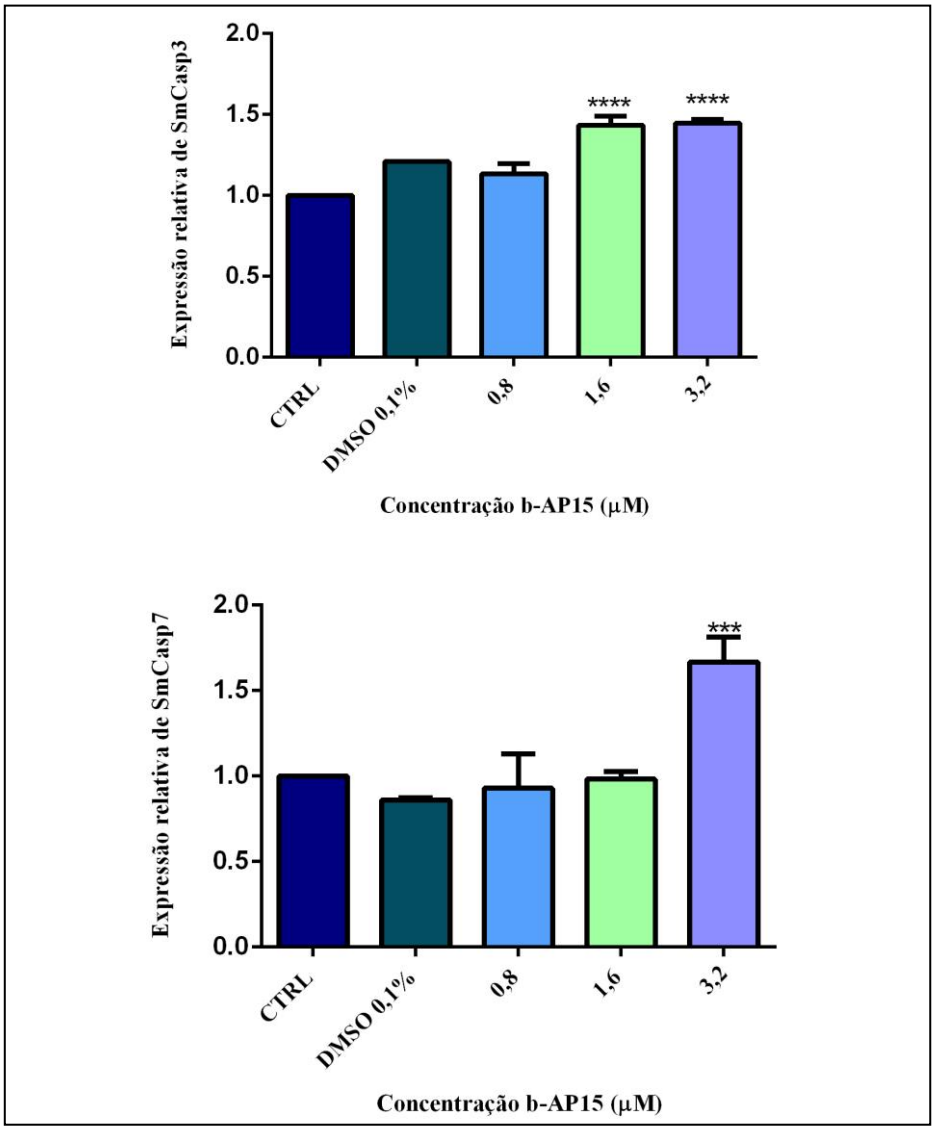

Figura 28- Expressão quantitativa dos mRNAs de *SmCaspases 3 e 7*. Os níveis de expressão de mRNAs foram analisados em casais de vermes adultos incubados na presença e ausência da droga b-AP15 por um período de 24h por PCR quantitativo. As dosagens utilizadas foram: 0,8; 1,6 e 3,2 uM de b-AP15. Como controles negativos foram utilizados parasitas em meio RPMI 160 com a ausência (CTRL) e presença de DMSO 0,1%. A expressão foi calculada de acordo com o método $Ct2^{-\Delta\Delta CT}$ e normalizada pela expressão do padrão endógeno de *SmGAPDH*. Os asteriscos (*) representam a diferença estatística em relação ao grupo CTR ($p < 0,05$). O experimento foi realizado em triplicata técnica e biológica. O método de análise utilizado foi *one-way anova* e o pós-teste foi *Turkey*.

Em seguida a fim de validar o ensaio descrito acima, os parasitas foram incubados *in vitro* de acordo com o item 3.2 e fez-se o *Wester blotting* (item 3.5) para a identificação de caspase-3 ativa, o qual não identificou as formas clivadas da enzima que se dimerizam para conceber a forma ativa da proteína, com aproximadamente 17 e 19 KDa, mas somente a pró-enzima inativa com 35 KDa **(Figura 30A)** e avaliou estatisticamente a expressão da enzima e nas dosagens e período mostrados na **figura 30B**, não havendo diferença estatística em relação ao controle.

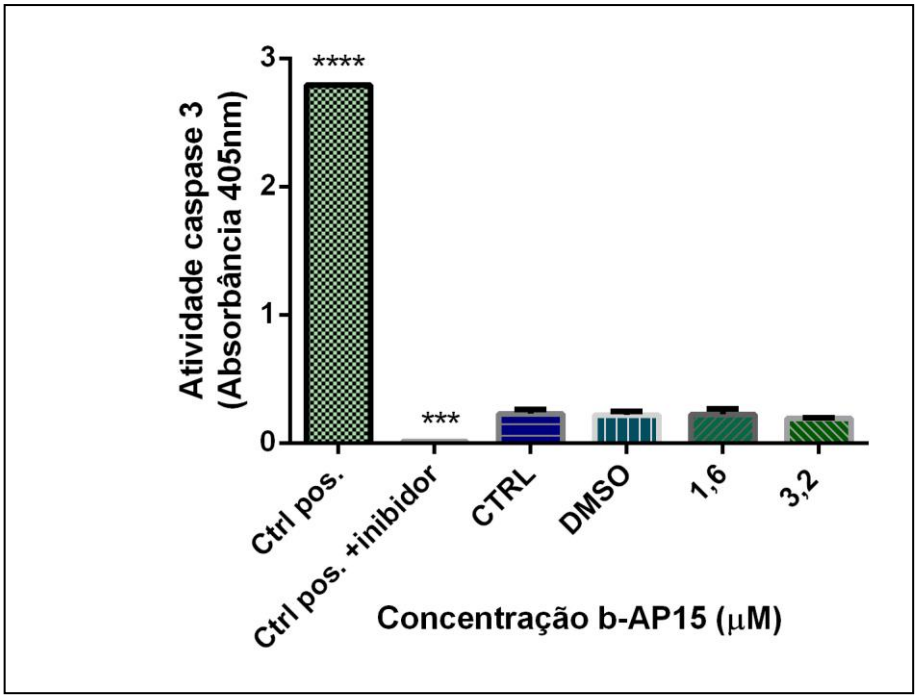

Figura 29- Atividade caspase- 3 de casais de vermes de *Schistosoma mansoni* incubados com e sem a droga b-AP15 por 24h. Após a perfusão, casais de vermes adultos foram incubados na presença e ausência da droga b-AP15. Foi extraído o extrato de 50 casais de parasitas. Foram utilizadas 50 µg de proteínas para cada amostra. Como controles negativos foram utilizados parasitas em meio RPMI 160 com e sem DMSO 0,1% e um inibidor de caspase-3 incubado em conjunto com o controle positivo presente no ensaio. Como controle positivo foi utilizado o controle presente no ensaio. Foram realizados três experimentos independentes. Os asteriscos (*) indicam a diferença estatísticas entre as amostras (*** $p < 0,001$) e o método estatístico utilizados *one-way anova* e o pós teste *Turkey*.

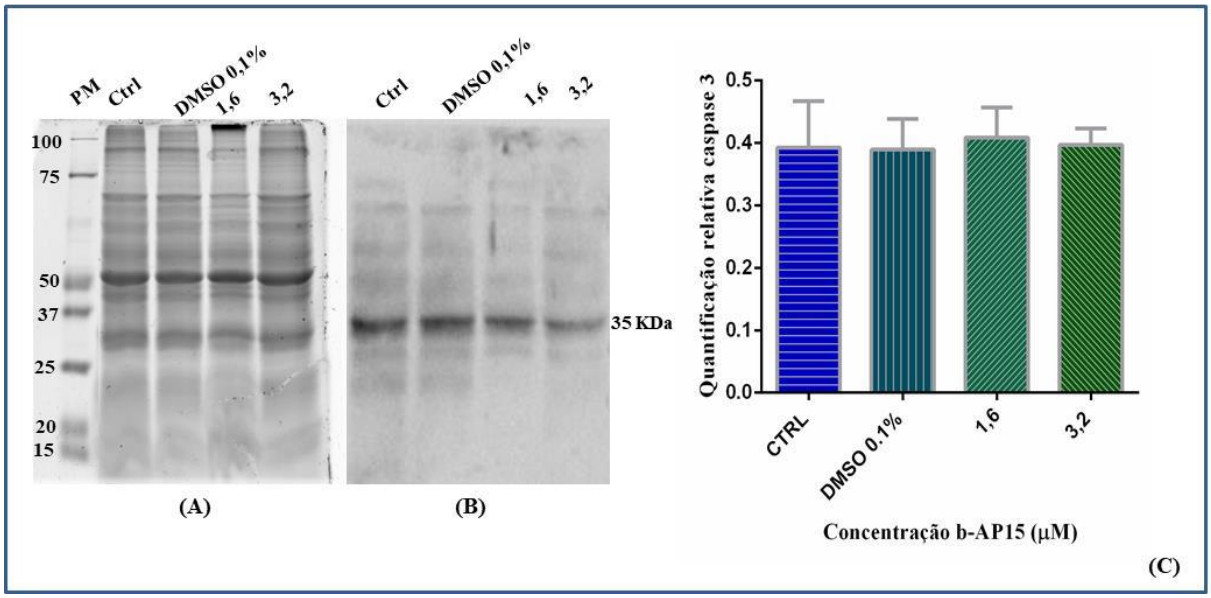

Figura 30- Quantificação relativa de caspase- 3. **(A)** Gel *FastCast.* **(B)** *Western blotting* para a identificação de alteração de caspase-3 em extrato de proteínas de parasitas na presença e ausência de b-AP15. Para a análise foram utilizadas 50 µg/ml de proteínas extraídas de 50 casais de parasitas tratados com b-AP15 por 24h. As doses utilizadas de b-AP15 foram : 1,6 e 3,2 µM; Ctrl (RMPI 160 completo) e RPMI 160 com DMSO 0,1% como controles negativos. Os anticorpos utilizados foram: anticorpo monoclonal anti-caspase 3 ativa (1:1000) e **(C)** Quantificação do western blotting para detecção de proteína caspase-3 ativa. O experimento foi realizado em triplicata biológica. O gráfico mostra que não há diferença estatística entre a quantificação da proteína entre os controles e o tratamento com a droga.A análise foi realizada por One-way anova e o pós -teste utilizado foi o de Bonferroni (Prisma 6.0).

No entanto, devido ao aumento do nível de expressão do mRNA de *SmCasp 7* foi feito o ensaio de túnel a fim de verificar se havia fragmentação do DNA já que esse é o principal parâmetro de ativação da via apoptótica sendo que as caspases-3 ativas clivam o DNA celular **(figuras 31 e 32).** Os casais incubados por 24 horas com a droga foram separados e analisados (itens 3.2 e 3.10). A **figura 31** mostra que os vermes fêmeas apresentaram em suas células uma diferença estatística na porcentagem do DNA fragmentado tanto em relação aos controles negativos como ao controle positivo, ou seja, os parasitas fêmeas a partir do tratamento da dosagem de 1,6 uM da droga por um período de 24 horas, apresentam fragmentação cromossomal. No entanto, isso não ocorre com os parasitas machos (**figura 32**). Os pontos marrons escuros nas imagens microscópicas demostram os pontos de fragmentação.

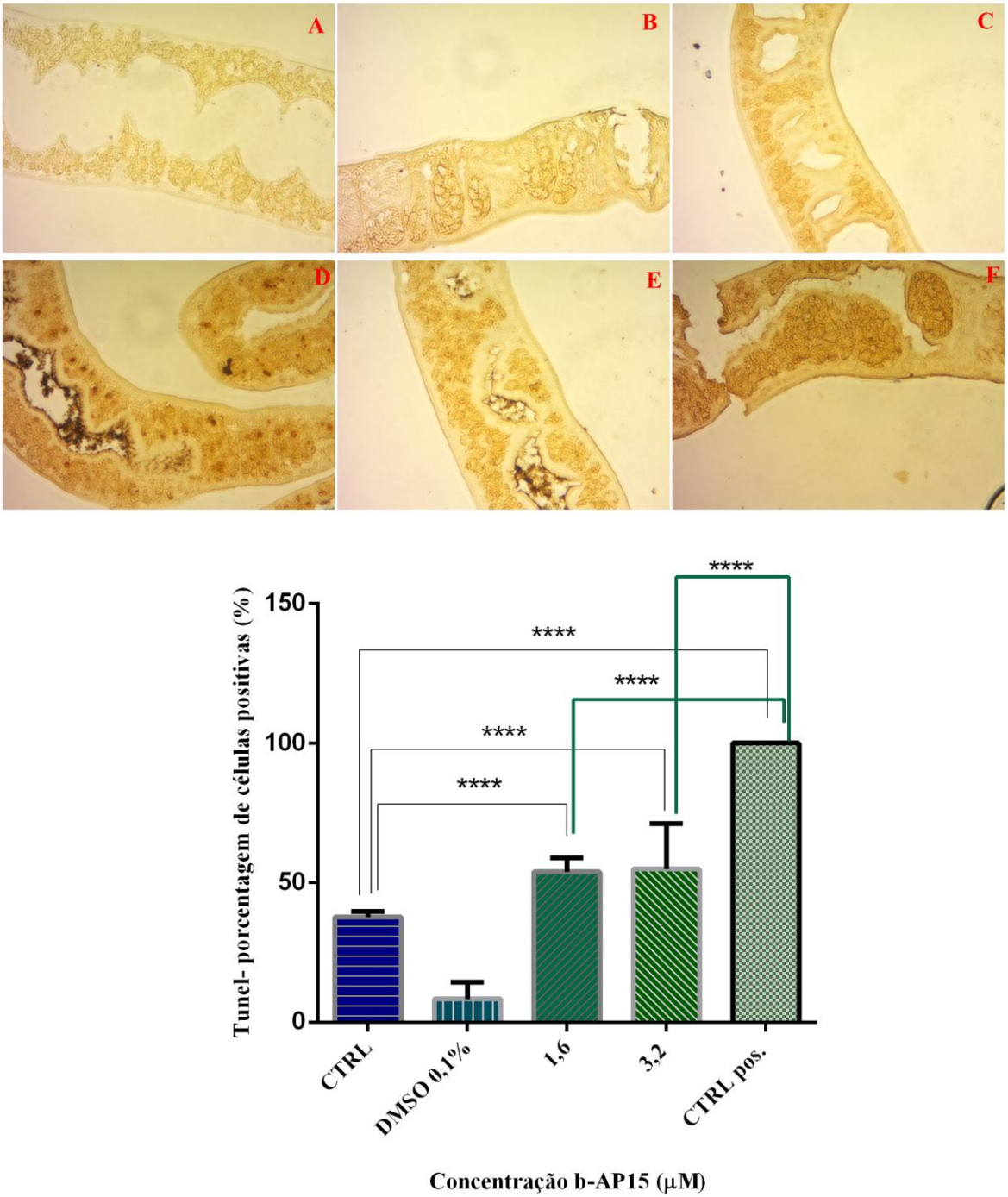

Figura 31- b-AP15 induz a fragmentação do DNA em parasitas fêmeas de *S. mansoni.* Casais de parasitas foram incubados: em meio RPMI 1640 na presença e ausência de DMSO 0.1% (controles negativos) ou com 1,6; 3,2 e 50 µM da droga. Depois da incubação, vermes machos e fêmeas de *S. mansoni* foram separados e processados para análise. (A) Controle positivo; (B) Controle; (C) DMSO 0,1%; (D) b-AP15 50µM; (E) b-AP15 3,2µM; F: b-AP15 1,6µM. Os histogramas indicam a porcentagem de células positivas para TÚNEL. Pelo menos 100 células foram analisadas. Os valores são expressos como a média ± S.E.M do experimento. O asterisco indica as diferenças estatisticamente significativas em comparação com o grupo controle negativo e positivo (p<0,0001). As análises estatísticas foram realizadas por *one-way anova* e o pós-teste feito por *Turkey*.

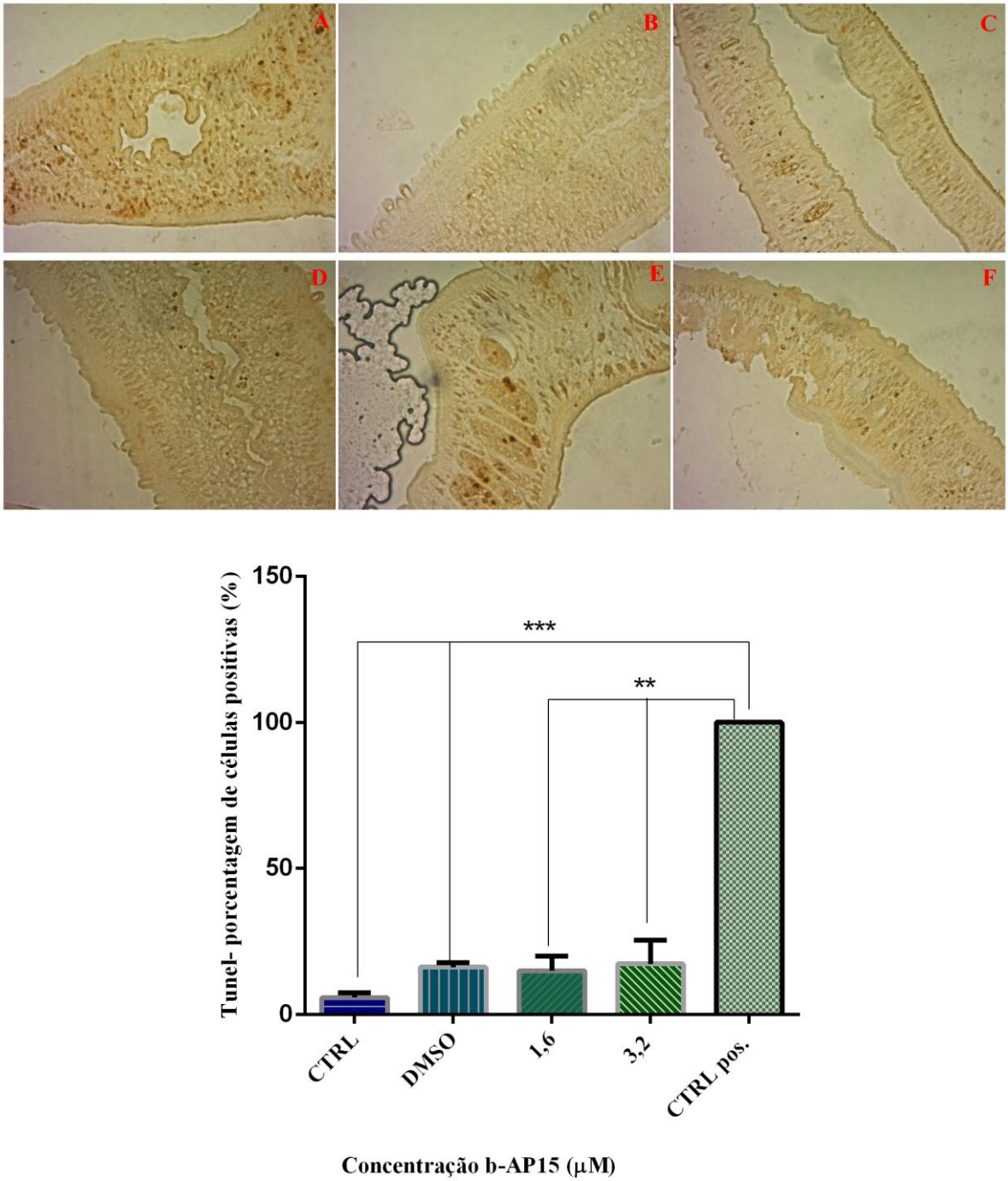

Figura 32- b-AP15 induz a fragmentação do DNA em parasitas machos de *S. mansoni.* Casais de parasitas foram incubados: em meio RPMI 1640 na presença e ausência de DMSO 0.1% (controles negativos) ou com 1,6; 3,2 e 50 µM da droga. Depois da incubação, vermes machos e fêmeas de *S. mansoni* foram separados e processados para análise. (A) Controle positivo; (B) Controle; (C) DMSO 0,1%; (D) b-AP15 50µM; (E) b-AP15 3,2µM; F: b-AP15 1,6µM. Os histogramas indicam a porcentagem de células positivas para TÚNEL. Pelo menos 100 células foram analisadas. Os valores são expressos como a média ± S.E.M do experimento. O asterisco indica as diferenças estatisticamente significativas em comparação com o grupo controle positivo (** $p < 0,01$ e *** $p < 0.001$). As análises estatísticas foram realizadas por *one-way anova* e o pós-teste feito por *Turkey*.

5. DISCUSSÃO

Desde 1998 que nosso grupo de pesquisa vem estudando a importância do sistema ubiquitina proteassoma na biologia do *S. mansoni*. Uma das abordagens adotadas foi o uso de inibidores do proteassoma 26S que mostrou o papel essencial desse sistema para a viabilidade dos vermes adultos. No entanto, pouco se sabe a respeito da importância das DUBs na biologia do parasita, principalmente da função das mesmas no sistema reprodutivo dos casais de vermes. Estudos em células de mamíferos mostram que essas enzimas funcionam como ponto de regulação do sistema ubiquitina proteassoma já que estão envolvidas tanto na regulação das E3 ligases como na formação do *pool* de ubiquitina livre a partir de conjugados proteicos mono ou poliubiquitinados (LEZNICKI e KULATHU, 2017; WILKINSON, 1997). Estão relacionadas a diversos processos celulares como, por exemplo no crescimento e diferenciação, memória, oncogênese, regulação do DNA e estruturas dos cromossomos (CHUNG; BAEK, 1999, VOGEL et al., 2015). Até o momento estudos de casais de *S. mansoni in vitro* tratados com MG 132 têm demonstrado que a oviposição cessa devido a separação dos casais o que não confirma ser devido a inibição do complexo. Assim, este trabalho propôs o estudo de uma droga chamada b-AP15, a partir de uma dosagem em que os casais estejam acoplados e que iniba as DUBs ligadas reversivelmente ao proteassoma 26S, USP 14 e UCHL5, sendo que o complexo está presente nas fases do ciclo do parasita, sugerindo a sua importância na biologia do *S. mansoni*, principalmente nas fases de verme adulto e ovos. O sistema UPS é essencial para o desenvolvimento dos ovos, sendo que o proteassoma exibe diferentes subunidades durante esse processo e é responsável pela degradação de células vitelínica, mas também responsável pelo desenvolvimento do envelope que envolve o miracídio (GUERRA-SÁ et al., 2005; MATHIESON et al., 2011). No entanto, pouco se conhece a respeito das DUBs em *S. mansoni*, mas recentemente Pereira et al. (2014) e Pereira R. et al. (2015a) mostrou a importância dessas enzimas e a presença de suas diversas subfamílias nas fases do ciclo do parasita, demonstrando o padrão de expressão gênica para um conjunto de 17 enzimas da família USP em *S. mansoni* nas fases de cercaria, vermes adultos, esquitossômulos e ovos (SmUSP2, SmUSP7, SmUSP8, SmUSP9x, SmUSP10, SmUSP14, SmUSP15, SmUSP16, SmUSP20, SmUSP22, SmUSP24, SmUSP30, SmUSP36-42, SmUSP46, SmUSP49-44 e SmUSP48), mostrando ser diferencialmente expressos entre cercárias e vermes adultos. O mesmo grupo de pesquisadores analisou duas famílias de DUBS: *ovarian tumour* (OTU) e *Machado-Joseph*m (MJD) nas fases de cercária, esquistossômulo, verme adulto, ovo e miracidio. As análises *in silico* identificaram dois

membros diferentes da subfamília *MJD, SmAtaxin-3 e SmJosephin*, e cinco proteases *OTU* distintas, *SmOTU1, SmOTU3, SmOTU5a, SmOTU6b* e *SmOtubain*. A expressão dos genes apresentaram perfis diferentes para todos os transcritos entre as fases de cercárias, esquistossômulos e vermes adultos. Os dados sugerem que essas duas famílias de proteínas regulam a atividade do UPS no ciclo de vida do parasita (PEREIRA R. et al., 2015b).

A fim de se entender melhor esse sistema de regulação ubiquitinação/deubiquitinação e proteasoma na oviposição e no sistema reprodutivo nos casais de parasita, a dosagem da droga foi padronizada. Durante a padronização da cultura, os primeiros resultados mostraram que dosagens altas da droga causavam separação total do parasita (12,5 µM), alteração da viabilidade e motricidade a partir 3,125µM e morte (50 µM). Entretanto, como a finalidade foi avaliar a inibição da oviposição perante uma dosagem que não houvesse a separação do casal, foram utilizadas as concentrações entre 0,2 µM e 1,6 µM para uma nova tentativa de conseguir o objetivo proposto. A escolha das concentrações citadas acima se justifica a partir de testes realizados em alguns tipos de células de mamíferos onde o IC 50 variou entre 2,8 uM e 16,8 uM. Mas em alguns tipos e celulares como HCT116, as DUBs proteassomais mostraram estar inibidas com 1 uM da droga (CHITTA, 2015; WANG et al. , 2014). Dessa forma, foi realizada a varredura da dosagem e do tempo de tratamento adequados para a inibição da oviposição.

Os primeiros resultados obtidos com a droga b-AP15 mostraram que há a maior inibição da oviposição estatisticamente diferente em relação ao controle na dosagem de 1,6 µM (**tabela 1** e f**igura 11)** sem ocorrer a alteração da viabilidade e da motricidade no período estudado (24 horas) (**tabela 2** e f**iguras 12** e **13)**, além do nível de expressão do mRNA de SmP14 estar diminuído a partir dessa dosagem (**figura 14**). Então, esse primeiro dado obtido é de suma importância, pois no hospedeiro, os ovos induzem uma reação periovular inflamatória na parede do intestino (LENZI et al., 1987) ou, podem ficar retidos no fígado. Nesse órgão, os ovos induzem a modulação da resposta imune, levando ao desenvolvimento de reações granulomatosas, sendo os maiores responsáveis pela patologia da doença, formando placas fibróticas (PEARCE; MACDONALD, 2002). Dessa maneira, o início dos experimentos priorizou saber se *in vitro* haveria a diminuição da oviposição pela fêmea acoplada no canal ginecófaro do macho e se as dosagens abaixo e acima de 1,6 µM alterariam a viabilidade do casal. No entanto, apesar de alguns estudos em células de mamíferos tratadas com o inibidor mostrarem que o mesmo se liga de maneira reversível as DUBs dos proteassoma (FENG, 2013), nas culturas de casais do parasita a droga se mostrou irreversível, pois durante o período analisado não houve a necessidade de adicionar mais droga à cultura

durante as 72 horas de análise da oviposição, ou seja, o número de ovos permaneceu o mesmo colocando a droga somente uma vez após a adaptação do parasita em cultura *in vitro.* Outras drogas que interferem na oviposição, viabilidade e causam morte dos parasitas estão sendo testadas pelo nosso grupo de pesquisa. Alguns extratos de plantas estão sendo pesquisados como a droga (−)-6,6_-dinitrohinokinin (DNK), testada *in vitro e in vivo*, e a curmina, os quais interferem na oviposição e alteram o tegumento dos casais de parasita. A curcumina também altera a viabilidade e desenvolvimento dos ovos, pois interfere nas vias de embriogêmese e oogenese como a Notch e TGF-β e causa a morte dos casais (AGUIAR et al, 2016; GAZZINELLI, 2017; MORAIS et al., 2013PEREIRA C. et al., 2015; WHO, 2017).

As diversas dosagens analisadas nesse estudo mostraram que a inibição de UCHL5 e USP14 interferem na atividade quimiotripsina-like da partícula 20S, tendo início a partir de 1,6 µM, aumentando com 3,2 µM, não havendo diferença quando o extrato foi incubado com 50 µM, sendo nas duas últimas dosagens em torno de 50% (**figura 15**). Isso demonstra que o aumento entre essas duas dosagens não altera mais a atividade de 20S. Nos últimos anos alguns trabalhos descrevem que b-AP15 não inibe a atividade da partícula 20S (AVHANDLING. A, 2017; CHITTA et al, 2015; OH et. al, 2017; SARHAN et al., 2013). No entanto, há controvérsias. Em ensaios *in vitro* realizados por Huang, Jung e Chen (2014) para testar a influência do inibidor na atividade *quimiotripsina-like*, ocorreu 50% de inibição da partícula 20S na concentração de 18,1 µM (IC 50). A explicação para esse fenômeno é dada devido à ligação promiscua do inibidor ao complexo 26S, pois a molécula do b-AP15 possui múltiplos aceptores de Michael que interagem com os grupos hidroxila e sulfidrila dos aminoácidos das proteínas (CHITTA et al, 2015; WANG et al., 2014). Sabe-se também que a droga em culturas de diversos tipos celulares interfere na regulação do proteassoma pelo bloqueio da RP, havendo o acúmulo de proteínas ubiquitinadas de alto peso molecular (AVHANDLING A., 2017; CHITTA et al, 2015; OH et. al, 2017; SARHAN et al., 2013).

Assim, para a avaliação da ação do inibidor na capacidade de UCHL5 e USP14 exercerem a sua função em relação a desubiquitinação de substratos ubiquitinados, havendo acúmulo dessas proteínas pela alteração no RP em *S. mansoni*, foi feito o *western blotting* (**figura 17**) para conjugados de proteínas ubiquitinadas. Os resultados mostraram que o controle positivo MG132, o qual inibe o proteassoma e induz aumento dos conjugados proteicos em vermes adultos (dados não publicados) na dosagem de 50 µM, mostram que o efeito de MG132 tem um maior acúmulo de proteínas ubiquitinadas em relação a mesma dosagem de b-AP15, mas nas concentrações iguais das duas drogas (3,2 µM), o acúmulo total

dos conjugados não apresenta diferença. Estudos avaliaram a presença do complexo nas várias fases do parasita e que o mesmo é altamente expresso em verme adulto e que 50 µM de MG132 é capaz tanto de separar os casais como de inibir totalmente a atividade do proteassoma, aumentando o nível de transcritos para *SmUbp6* (CASTRO-BORGES et al., 2007; DE PAULA et al., 2015; GUERRA-SÁ et al., 2005 ; PEREIRA-JÚNIOR, 2013) . No entanto, a expressão do mRNA para *SmUbiquitina* tem um nível aumentado a partir de 1,6 µM, sendo menor para 3,2 µM, pois é a partir de 1,6 que ocorre a inibição da oviposição. Segundo Mathieson et al. (2011), o Sistema USP é responsável pela degradação de células vitelínica, mas também responsável pelo desenvolvimento do envelope que envolve o miracídio e produz as proteínas secretadas pelo ovo. Foi descrito que b-AP15 induz a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em algumas células de tipos diferentes de câncer (FENG, 2013) o que segundo Hanna (2007) interfere na homeostase dos níveis de ubiquitina, sendo que essa pequena proteína é essencial para a manutenção de funções celulares essenciais como regulação do ciclo celular, transcrição entre outros. Em leveduras, a deficiência de Ub sensibiliza as células a uma variedade de estresses químicos e ambientais, incluindo alterações no desdobramento de proteínas, danos ao DNA, exposição a metais pesados, inibição da tradução e privação. A droga inibe Ubp6, a qual é conhecida como um sensor do proteassoma para detecção dos níveis de Ub e poupa essa proteína da degradação pelo complexo. O fato da proteína Ubp6 não ser parte integral do proteassoma faz com que os níveis dessa enzima alterem a função do complexo, havendo alterações na função de 20S e de 19S, como pôde ser demonstrando nos ensaios de atividade *quimiotripsina-like* e de *western blotting* que mostrou o acúmulo de proteínas ubiquitinadas. Entretanto, ainda não é conhecido o que aumenta os níveis de novas Ub, que pode ser observado na **figura 16**. É conhecido que b-AP15 se liga mais facilmente na USP 14 do que a UCHL5 e as duas estão correlacionadas com a desmontagem das cadeias de poliubiquitina de proteínas no estágio inicial de degradação, sendo que alguns estudos demonstram que UCHL5 pode ter uma duplicidade regulatória em relação ao complexo, suprimindo ou ativando a degradação de proteínas específicas (D’ARCY e LINDER, 2012; WANG et al., 2014). Assim, a inibição de ambas as DUBs ligadas reversivelmente ao complexo acarreta no aumento de conjugados ubiquitinados. Deve-se citar também que o proteassoma 26S inativo é degradado por autofagia em um processo chamado de proteofagia através do reconhecimento de sua própria subunidade Rpn10 pelo autofagossoma (DIKIC, 2017).

Diante dos resultados, foram realizadas as análises do tegumento, organelas e aparelho reprodutivo dos casais de parasita. Os dados de MEV e MET mostraram que o inibidor na

dosagem de 1,6 µM com 24 horas (**figuras 18, 20, 22** e **24**) de incubação, não somente afeta a oviposição, mas também o tegumento dos casais, principalmente dos parasitas machos que com 24 horas de tratamento já se percebem grandes lesões tegumentares. Sendo que com 72 horas de tratamento (**figuras 19, 21, 23** e **25**) as lesões aumentam e na dosagem de 50 µM os parasitas estão mortos. Nenhuma alteração foi detectada nos casais de parasita que são controles negativos do experimento. O tegumento é um importante alvo de drogas, pois é essencial para a sobrevivência do parasita no seu hospedeiro, pois a membrana de sua superfície e a integridade do tegumento são críticas para a sobrevivência do verme adulto e tem um papel fundamental na evasão da resposta imune, absorção de nutrientes e metabolismo do colesterol do hospedeiro (SANTIAGO et. al, 2014). As análises dos casais de parasitas realizadas por MET mostrou que no *S. mansoni* fêmea ocorreram alterações nas células vitelínicas e fragmentação nuclear (**figura 22**) e no macho (**figura 24**) ocorreram as formações de vacúolos autofágicos degradativos (AVd) e a pouca presença de núcleos fragamentados. Nos dois sexos do parasita aconteceram a formação de vacúolos, as mitocôndrias estavam aumentadas e foi detectada a presença de uma grande quantidade de lipídeos a partir do tratamento com 1,6 µM e com 24 horas de incubação, o que mostra um possível processo de autofagia. O processo de autofagia inclui o aumento da síntese de lipídeos, a formação de autofagossomas e a liberação de produtos de degradação. AVd é carcterizado por tipicamente ter apenas uma membrana limitante; contêm material citoplasmático denso e organelas em vários estágios de degradação que ocorre devido ao processo de digestão intracelular. Eles podem conter apenas poucos fragmentos de membrana e ser difícil a distinção das organelas presentes no seu interior, podendo ser lisossomas, endossomas ou RE (KLINSKY et. al, 2012). Na concentração de 50 µM, vermes fêmeas mostravam em seus tecidos a presença de necrose tecidual, principalmente abaixo do tegumento, havendo grandes alterações nas células vitelínicas, no entanto, ainda não estavam mortas, mas com a motricidade diminuída. Vermes machos tinham uma grande quantidade de vacúolos em todo o parasita e o tecido estava desorganizado.

É conhecido que o comprometimento do funcionamento do complexo acarreta em problemas em todas as outras organelas, sendo que os dois sensores celulares que indicam a redução de atividade do proteassoma são duas organelas: a mitocôndria e RE. Os resultados mostram que tanto nos parasitas machos como nas fêmeas a mitocôndria está inchada o que acarreta na formação de grupos reativos de oxigênio (ROS) por essas organelas, levando a autofagia. Além disso, devido a ação da droga a níveis moleculares, o RE pode não estar dobrando corretamente as proteínas, havendo o acúmulo das mesmas e, consequentemente,

sobrecarga do sistema proteassomal, o qual já está comprometido e, então, a autofagia é ativada (LIEBL e HOPPE, 2016; NAM et al., 2017). Nesse contexto, dependendo do nível de estrese celular e de como a mitocôndria se comporta, ocorre a mitofagia para haver a preservação celular (DICIK, 2017).

Atualmente é conhecido que as duas maquinarias se interligam a níveis moleculares e funcionais, influenciando-se através do nível de componentes chaves de seus sistemas, havendo vários reguladores e substratos comuns entre as duas vias, sendo a maior delas a ubiquitina (KOROVILA et al. 2017; LIEBL e HOPPE, 2016; . NAM et al., 2017), a qual tem seu nível de mRNA aumentado nos casais de parasitas tratados com a droga. No sistema ubiquitina-proteassoma ocorre a ativação da ubiquitina e a formação das cadeias poliubiquitinadas, as quais se ligam as proteínas e as levam para a degradação. Na autofagia, a cadeia de poliubiquitina é reconhecida por proteínas, como a p62, que recrutam os substratos e os encaminham para o autofagossoma, sendo esse tipo de degradação chamada de autofagia seletiva. A escolha entre um ou outro sistema de degradação é realizada através da ligação de lisinas (K) entre as Ub da cadeia ligada as proteínas. As proteínas que se dirigem ao proteassoma 26S são marcadas por poliubiquitina K-48, K-11 e K-29, as proteínas ligadas à cadeia de poliubiquitina K-63, mitocôndrias danificadas e proteínas monubiquitinadas são degradadas por autofagia (NAM et al., 2017), e as proteínas de alto peso molecular acumuladas pelo uso do inibidor b-AP15 possivelmente ativam a via ALP dessa maneira. Segundo Liebl e Hoppe (2016), pode-se dizer que a regulação da atividade das E3 ligases e de sua competição para ligação a substratos e as E2 conjugadoras, bem como sua interação com as enzimas deubiquitnadoras, representam eventos-chave na cooperação entre USP e autofagia. Entende-se então que os resultados de MET indicam que a falha do proteassoma 26S nos casais de parasita indica que possa estar havendo uma ativação da via de degradação lisossomal.

As alterações dos parasitas fêmeas tratados por 72 horas com a droga não apresentaram grandes modificações em relação a 24 horas de tratamento. Entretanto, a concentração de 50 µM causou uma maior alteração na parte externa do tegumento e no tecido abaixo dele e nas mitocôndrias. Os parasitas machos tratados por 72 horas com a droga apresentaram grandes modificações em relação a 24 horas de tratamento, sendo que a concentração de 50 µM causou uma maior alteração na parte externa do tegumento, com perda das espículas e internamente, ocorreu a necrose tecidual em todo tecido abaixo do tegumento, restando apenas grânulos de lipídeos. Não havia mais a presença de células e suas

organelas, somente puderam-se identificar alguns núcleos fragmentados. Nessa dosagem, os casais de parasitas estavam mortos. Alguns extratos estudados pelo nosso grupo como a curcumina é um agente farmacológico eficaz para induzir a apoptose em estágios embrionários, sugerindo bloqueio da embriogênese. Dessa maneira, foi testada em casais de *S. mansoni* e induziu a apoptose, ou seja, as células apresentaram alterações morfológicas como: inchaço e ruptura de mitocôndrias; cromatina condensada e DNA fragmentado; inchaço e degeneração da membrana mitocondrial; condensação da cromatina e formação de vacúolos em adultos vermes machos e fêmeas, sendo que em vermes fêmeas as alterações ocorreram principalmente no vitelário. Diante desses parâmetros, talvez o que ocorra com os casais de parasitas tratados com b-AP15 por 24 horas seja um processo autofágico seguido, após 72 horas de incubação, por um processo de apoptose celular, pois é conhecido que em células de câncer de mama, b-AP15 leva às células a autofagia e causa uma ativação dose dependente de caspase-3 e que a apoptose que ocorre bem depois do stress proteotóxico, sugerindo que a apoptose medeia a morte celula, como um mecanismo compensatório em resposta ao estresse desenvolvido no sistema proteassoma-ubiquitina (VOGEL et al.,2015). Dentro desse contexto, a inibição das DUBs proteassomais e o consequente bloqueio de RP e diminuição da atividade *quimiotripsina-like* de CP, em casais de parasitas incubados com a droga em um período de 24 horas, acarretou em estresse proteotóxico, havendo então a danificação das organelas e tegumento e, dos órgãos reprodutivos do parasita, após incubação dos casais por 72 horas. Dessa maneira, o acúmulo de proteínas de alto peso molecular deva ser degradado pela via autofágica-lisossomal (ALP), pois sabe- se que a maquinaria de autofagia também é ativada quando o USP é inibido, a fim de reduzir o estresse proteotóxido no interior celular, causando um efeito protetivo intracelular (DICIK, 2017). No entanto, o fato da permanente exposição dos vermes à droga o efeito protetivo por essa via deixa de ser efetivo.

A droga também modifica os órgãos reprodutivos dos casais de vermes adultos quando comparados com os casais de parasitas incubados em meio RPMI 160 completo na presença e ausência de DMSO 0.1% (controles negativos) (**figuras 26** e **27**). Apesar dos casais apresentarem alterações externas no tegumento, em algumas células vitelínicas e mitocôndrias com o tratamento com 1,6 µM, a alteração nas estruturas reprodutivas inicia-se nos vermes fêmeas com 50 µM em um período de 24 horas. No período de 72 horas, existem modificações nos ductos vitelínicos das parasitas fêmeas com 1,6 µM. A estrutura do ovário das fêmeas está desorganizada com o tratamento na dosagem de 3,2 µM, havendo a presença de lesões com 50 µM. As alterações detectadas com a dosagem de 1,6 µM começam com

vermes fêmeas acopladas no canal ginecófaro dos parasitas machos, ou seja, após já terem atingido a maturação sexual e não estarem separados dos vermes machos, o que exclui a possibilidade de uma regressão do sistema reprodutivo dos parasitas fêmeas devido a separação do casal. Além disso, a cultura dos casais foi feita em um período entre 24 horas até 72 horas o que exclui a possibilidade dos parasitas fêmeas terem cessado a produção de ovos devido a cultura *in vitro* ser de longa duração (HUNAG et al, 2012) e ter ocorrido a regressão do sistema reprodutivo, o que pode ser verificado nas imagens quando comparamos os controles entre os dois períodos de incubação (24 horas e 72 horas). Nos parasitas machos há alteração nos lóbulos testiculares a partir da dosagem de 3,2 µM e da vesícula seminal com 50 µM da droga, sendo que nessa dosagem as membranas que envolvem os lóbulos estão lesionadas. O número de lóbulos está normal em todas as dosagens utilizadas de b-AP15, sendo que o número em parasitas machos está entre 7 a 10 lóbulos testiculares, contendo numerosas espermatogônias e espermatócitos em diferentes estágios de maturação com espermatozoides maduros alongados visíveis na vesícula anterior do espermatozoide (GUIDI et al., 2016).

O fato de b-AP15 não alterar a via apoptótica nos casais de *S. mansoni* tratados por 24 horas *in vitro*, como mostrado pelo ensaio de caspase-3 (**figura 29**), em que não ocorreu a alteração da atividade da enzima em relação tanto ao extrato de proteínas de casais de parasitas usados como controles negativos como em relação ao controle positivo (proveniente do *Kit*); o *western blotting*, assim como sua quantificação (**figura 30**), para expressão de caspase-3 ativa não ter detectado a clivagem da enzima, o que demonstra que não houve a ativação da via de caspase, apesar de tanto *SmCaspase-3* quanto *SmCaspase-7* (**figura 28**), estarem com o nível de mRNA aumentado nos casais de parasitas, não é possível afirmar que no período de 72 horas de tratamento com a droga, a via de caspase não esteja ativa nos casais de parasitas, principalmente devido aos resultados obtidos por MET. O tratamento de células de mamíferos com o inibidor das DUBs proteassomais promove também o acúmulo de inibidores do ciclo celular dependentes de quinases, como CDKN1A, CDKN1B. Em muitas células de linhagem de mielomas, ativa tanto a apoptose intrínseca como a extrínseca via caspases 7, 8 e 9, ativando e clivando pro-caspase-3. Também é capaz de induzir a apoptose independente de p53 e ativar as proteínas pro apoptóticas como BCl 2, que faz parte da regulação da apoptose mitocondrial e também a proteína BAX, havendo perda de potencial de membrana (FENG, 2013). Foi pesquisado que o extrato de curcumina induz a apoptose através do aumento dos transcritos de *SmCaspase-3* e *SmCaspase-7* em casais tratados com a droga devido ao estresse oxidativo; altera a viabilidade; interfere na produção e

desenvolvimento dos ovos, pois interfere nas vias de embriogêmese e oogenese como a *Notch e TGF* ß (AGUIAR et al, 2016; MORAIS et al., 2013). Assim, a fragmentação do DNA observado nas fêmeas (**figura 31**) em relação ao controle parece ocorrer devido ao início de um processo apoptótico. Atualmente, sabe-se que o inibidor leva tanto ao estresse do reticulo endoplasmático como a ativação do estresse oxidativo, através da ativação da via *Jun-N-terminal kinase 1/2 (JNK)/activating protein-1* , levando a apoptose células HCT116 (BRNJIC et al., 2014). A droga foi testada em diversas células: carcinoma de cólon HCT116, A549, HeLa, MelJuSo e o IC50 para essas células ficou entre 2,8 uM e 16,8 uM. Esse estudo preliminar de cultura de casais *in vitro* mostra que as dosagens de 1,6 e 3,2 uM utilizadas nesse estudo estão abaixo do IC 50 máximo utilizado em células e que as dosagens demonstram grandes alterações nos casais de parasitas. Dessa maneira, pode-se pensar no estudo *in vivo* da droga em camundongos infectados com esquistossomose a fim de verificar se há a redução da fibrose hepática e morte dos casais. Pois em pesquisa realizada por Nan et al. (2016), foi feita histologia do pulmão de camundongos com fibrose pulmonar, induzida por bleomicina, e tratados depois com o inibidor (2,5 mg/Kg/ 1x ao dia), havendo diminuição do colágeno e redução da fibrose pulmonar.

6. CONCLUSÕES

Conclui-se que o inibidor b-AP15 provoca alterações na oviposição e sistema reprodutivo do parasita *S. mansoni*, havendo também alterações biomoleculares, celulares e estruturais, sendo que em dosagens mais elevadas ocorre a morte dos casais. Assim, diante de diversos estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa e dos resultados obtidos, demonstramos a importância não só do proteassoma 26S, mas das DUBs ligadas de forma reversível a partícula RP na biologia e vida do parasita.

7 BIBLIOGRAFIA

Amaral, R. S., Tauil, P. L., Lima, D. D., Engels, D. An analysis of the impact of the schistosomiasis control programme in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 2006 Sep;101 Suppl 1:79-85.. http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762006000900012 .

AVHANDLING. A. Studies of b-AP15 – a novel inhibitor of proteasome deubiquitinase activity. Tese de doutorado som för avläggande av medicine doktorsexamen vid Karolinska Institutet offentligen försvaras i CMM lecture Hall L8:00 Karolinska Universitetssjukhuset, Solna. 2017.

Bard JAM, Goodall EA, Greene ER, Jonsson E, Dong KC, Martin A. Structure and Function of the 26S Proteasome. **Annu Rev Biochem**. 2018 Apr 13. doi: 10.1146/annurev-biochem-062917-011931.

Beckmann, S., Quack, T., Burmeister, Buro, C., Long, T., et al.. *Schistosoma mansoni*: signal transduction processes during the development of the reproductive organs. **Parasitology.**137, 497–520. 2010*a.*

Beckmann, S., Buro, C., Dissous, C., Hirzmann, J., & Grevelding, C. G. (2010). The Syk Kinase SmTK4 of *Schistosoma mansoni* Is Involved in the Regulation of Spermatogenesis and Oogenesis. **PLoS Pathogens**, *6*(2), e1000769. http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000769.

Beckmann, S., C.G. Grevelding, C.G. Imatinib has a fatal impact on morphology, pairing stability and survival of adult *Schistosoma mansoni in vitro.* **International Journal for Parasitology** 40:521–526. 2010c.

Beckmann, S., Hahnel, S., Cailliau, K., Vanderstraete, M., Browaeys, E., Dissous, C., & Grevelding, C. G. (2011). Characterization of the Src/Abl Hybrid Kinase SmTK6 of *Schistosoma mansoni*. **The Journal of Biological Chemistry**, *286*(49), 42325–42336. http://doi.org/10.1074/jbc.M110.210336

Beckmann, S., Leutner, S., Gouignard, N., Dissous, C., Grevelding, C.G.. Protein kinases as potential targets for novel anti-schistosomal strategies. **Curr Pharm Des.(**2012);18(24):3579-94.

Berriman, M., Haas, B. J., LoVerde, P. T., Wilson, R. A., Dillon, G. P., Cerqueira, G. C., El-Sayed, N. M. (2009). The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. **Nature**, *460*(7253), 352–358. http://doi.org/10.1038/nature08160

Chitta, K., Paulus, A., Akhtar, S., Blake, M. K. K., Caulfield, T. R., Novak, A. J., … Chanan-Khan, A. (2015). Targeted inhibition of the deubiquitinating enzymes, USP14 and UCHL5, induces proteotoxic stress and apoptosis in Waldenström macroglobulinaemia tumour cells. *British Journal of Haematology*, *169*(3), 377–390. http://doi.org/10.1111/bjh.13304

Clague, M.J.; Barsukov, I.; Coulson, J.M.; Liu, H.; Rigden, D.J.; Urbé, S. Deubiquitylases from genes to organismo**. Physiol Ver** 93: 12891315. 2013.

Wolberger C. Mechanisms for regulating deubiquitinating enzymes. **Protein Science : A Publication of the Protein Society**. 2014;23(4):344-353. doi:10.1002/pro.2415.

Colley DG, Bustinduy AL, Secor WE, King CH. Human schistosomiasis. **Lancet** *(London, England)*. 2014;383(9936):2253-2264. doi:10.1016/S0140-6736(13)61949-2.

Costa MP, Oliveira VF, Pereira RV, de Abreu FC, Jannotti-Passos LK, Borges WC, Guerra-Sá R. In silico analysis and developmental expression of ubiquitin-conjugating enzymes in *Schistosoma manson*i. **Parasitol Res**; (2015) 114: 1769. https://doi.org/10.1007/s00436-015-4362-x

D'Arcy P1, Brnjic S, Olofsson MH, Fryknäs M, Lindsten K, De Cesare M, Perego P, Sadeghi B, Hassan M, Larsson R, Linder S. Inhibition of proteasome deubiquitinating activity as a new cancer therapy. **Nat Med**. (2011);17(12):1636-40.

D'Arcy P., Linder S.. Proteasome deubiquitinases as novel targets for cancer therapy The international journal of biochemistry & cell biology, ISSN: 1878-5875, Vol: 44, Issue: 11, Page: 1729-38, (2012).

De Paula Aguiar, D., Brunetto Moreira Moscardini, M., Rezende Morais, E., Graciano de Paula, R., Ferreira, P. M., Afonso, A., … Magalhães, L. G. Curcumin Generates Oxidative Stress and Induces Apoptosis in Adult *Schistosoma mansoni* Worms. *PLoS ONE*, (2016), *11*(11), e0167135. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0167135

De Poot SAH, Tian G., Finley D.. Meddling with Fate: The Proteasomal Deubiquitinating Enzymes. **J Mol Biol**. 2017 Nov 10;429(22):3525-3545. doi: 10.1016/j.jmb.2017.09.015. Epub 2017 Oct 5. Review.

Dewalick, S., Tielens, A.G., Van Hellemond, J.J.. *Schistosoma mansoni:* the egg, biosynthesis of the shell and interaction with the host. **Exp Parasitol**. (2012)132(1):7-13.

Dikic I. Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. **Annu Rev Biochem**. (2017 Jun) 20);86:193-224. doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-044908. Epub 2017 May 1. Review.

Dubois, F., Caby, S., Oger, F., Cosseau, C., Capron, M., et al. 2009. Histone deacetylaseinhibitors induce apoptosis, histone hyperacetylation and up-regulation of gene transcription in *Schistosoma mansoni*. **Molecular and biochemical parasitology**, ISSN: 1872-9428, Vol: 168, Issue: 1, Page: 7-15: (2009).

Ebner, Petra, Gijs A. Versteeg, and Fumiyo Ikeda. “Ubiquitin Enzymes in the Regulation of Immune Responses.” **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology** 52.4 (2017): 425–460. *PMC*. Web. 6 July 2018.

Enyara Rezende Morais. 2012. Tese de Doutorado: Avaliação do efeito de curcumina e MG-132 sobre o parasita Schistosoma mansoni: uma abordagem genômica. Departamento de Bioquímica. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP.

Enyara R. Morais, Katia C. Oliveira, Lizandra G. Magalhães, Érika B.C. Moreira, Sergio Verjovski-Almeida, Vanderlei Rodrigues. Effects of curcumin on the parasite Schistosoma mansoni: A transcriptomic approach. **Molecular and biochemical parasitology**, (2013). ISSN: 1872-9428, Vol: 187, Issue: 2, Page: 91-7

Feng X.[1], Holmlund T.[1], Zheng C[2], Fadeel B[3]., Proapoptotic effects of the novel proteasome inhibitor b-P15 on multiple myeloma cells and natural killer cells. **Exp Hematol.** 2014 Mar;42(3):172-82. doi: 10.1016/j.exphem.2013.11.010. Epub 2013 Nov 27.

Fitzpatrick, J.M., Hirai, Y., Hirai, H., Hoffmann, K.F.. Schistosome egg production is dependent upon the activities of two developmentally regulated tyrosinases. **FASEB J.** (2007); 21(3):823-835.

Freitas, Tori C, Euihye Jung, and Edward J Pearce. "TGF-B Signaling Controls Embryo Development in the Parasitic Flatworm *Schistosoma mansoni* ." Ed. Rick M Maizels. **PLoS Pathogens** 3.4 (2007): e52. *PMC*. Web. 6 July 2018.

Galanti, S.E., Huang, S.C., Pearce, E.J.. Cell death and reproductive regression in female *Schistosoma mansoni*. **PLoS Negl Trop(** 2012). *Dis*. 6(2):e1509.

Grevelding, C. G., Sommer, G. and Kunz, W.. Female-specific gene expression in *Schistosoma mansoni* is regulated by pairing. **Parasitology.** (1997); 115, 635–640.

Gryseels B. Schistosomiasis. **Infect Dis Clin North Am.** (2012); Jun;26;(2):383-97. doi: 10.1016/j.idc.2012.03.004.

Guidi A, Lalli C, Perlas E, et al. Discovery and Characterization of Novel Anti-schistosomal Properties of the Anti-anginal Drug, Perhexiline and Its Impact on *Schistosoma mansoni* Male and Female Reproductive Systems. Greenberg RM, ed. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. (2016);10(8):e0004928. doi:10.1371/journal.pntd.0004928.

Hanna J, Meides A, Zhang DP, Finley D.
A ubiquitin stress response induces altered proteasome composition. **Cell.** (2007) May 18;129(4):747-59. PMID: 17512408

Hotez, P. J., Molyneux, D. H., Fenwick, A., Kumaresan, J., Sachs, S. E., et al.. Control of neglected tropical diseases. **N. Engl. J. Med**. (2007) ;357: 1018–1027.

Hotez PJ. Human Parasitology and Parasitic Diseases: Heading Towards 2050. **Adv Parasitol**. 2018;100:29-38. doi: 10.1016/bs.apar.2018.03.002. Epub 2018 Apr 5.

Huang SC[1], Freitas TC, Amiel E, Everts B, Pearce EL, Lok JB, Pearce EJ.
Fatty acid oxidation is essential for egg production bythe parasitic flatworm Schistosomamans oni. **PLoS Pathog**. (2012);8(10):e1002996. doi: 10.1371/journal.ppat.1002996. Epub 2012 Oct 25.

Johnston CJC, Smyth DJ, Dresser DW, Maizels RM. TGF-β in tolerance, development and regulation of immunity. **Cellular Immunology**. (2016);299:14-22. doi:10.1016/j.cellimm.2015.10.006.

Kapp, K., Knobloch, J., Schussler, P., Sroka, S., Lammers, R., et al.. The *Schistosoma mansoni* Src kinase TK3 is expressed in the gonads and likely involved in cytoskeletal organization. **Mol Biochem Parasitol**. (2004);138: 171–182.

Kapp, K., Schussler, P., Kunz, W., Grevelding, C. G.. Identification, isolation and characterization of a Fyn-like tyrosine kinase from *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**. (2001);122: 317–327.

Keiser J. *In vitro* and *in vivo* trematode models for chemotherapeutic studies. **Parasitology**. (2010); 137(3):589-603.

King, C.H.. Toward the elimination of schistosomiasis. **The New England Journal of Medicine**. (2009); 360(2):106-109.

Klionsky DJ et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). **AUTOPHAGY** (2016), VOL. 12, NO. 1, 1–222. http://dx.doi.org/10.1080/15548627.2015.1100356

Knoblock, J., Rossi, A., Osman, A., LoVerde, P.T., Klinkert, M.Q., et al.. Cytological and biochemical evidence for a gonad-preferential interplay of SmFKBP12 and SmTbetaR-I in *Schistosoma mansoni*. **Mol. Biochem. Parasitol**. . (2004); 138, 227–236.

Knoblock, J., Kunz, W. and Grevelding, C. G.. Herbimycin A suppresses mitotic activity and egg production of female *Schistosoma mansoni*. **International Journal for Parasitology**. (2006); 36: 1261–1272.

Korovila, Ioanna et al. “Proteostasis, Oxidative Stress and Aging.” **Redox Biology** 13 (2017): 550–567. *PMC*. Web. 6 July 2018.

Kunz, W. Schistosome male-female interaction: induction of germ-cell differentiation. **Trends in Parasitology**.17(5):227-231, 2001.

Lee, Erinna F. et al. “Discovery and Molecular Characterization of a Bcl-2–regulated Cell Death Pathway in Schistosomes.” **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 108.17 (2011): 6999–7003. PMC. Web. 6 July 2018.

Lenzi, H.L.; Lenzi, J.A.; Sobral, A.C.. Eosinophils favor the passage of eggs to the intestinal lumen in schistosomiasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research. (**1987);20: 433–435.

Liebl, Martina P., and Thorsten Hoppe. “It’s All about Talking: Two-Way Communication between Proteasomal and Lysosomal Degradation Pathways via Ubiquitin.” American Journal of Physiology - **Cell Physiology** 311.2 (2016): C166–C178. PMC. Web. 6 July 2018.

Livneh, Ido et al. “The Life Cycle of the 26S Proteasome: From Birth, through Regulation and Function, and onto Its Death.” **Cell Research** 26.8 (2016): 869–885. *PMC*. Web. 6 July 2018.

Lo Verde, P.T., Niles, E.G., Osman, A., Wu, W.. *Schistosoma mansoni* male-female interactions. **Canadian Journal of Zoology**. (2004); 82:357-374.

Lupoli, Tania J. et al. “Targeting the Proteostasis Network for Mycobacterial Drug Discovery.” **ACS Infectious Diseases** 4.4 (2018): 478–498. *PMC*. Web. 6 July 2018.

Magalhães, L.G. Via *Notch* em *Schistosoma mansoni:*Aspectos moleculares e funcionais. 2009,195f. Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

Mathieson W, Castro-Borges W, Wilson RA. The proteasome-ubiquitin pathway in the Schistosoma mansoni egg has development- and morphology-specific characteristics. **Mol**

Biochem Parasitol. 2011 Feb;175(2):118-25. doi: 10.1016/j.molbiopara.2010.10.005. Epub 2010 Oct 21.

Morais ER[1], Oliveira KC, Magalhães LG, Moreira EB, Verjovski-Almeida S, Rodrigues V. Effects of curcumin on the parasite Schistosoma mansoni: **A transcriptomic approach. Mol Biochem Parasitol.** 2013 Feb;187(2):91-7. doi: 10.1016/j.molbiopara.2012.11.006. Epub 2012 Dec 29.

NamT[1], HanJH[1], DevkotaS[2], LeeHW[1].Emerging Paradigm of Crosstalk between Autophagy a nd the Ubiquitin-Proteasome System. **Mol Cells**. 2017 Dec 31;40(12):897-905. doi: 10.14348/molcells.2017.0226. Epub 2017 Dec 12.

Neves, R.H., De al.. A new description of the reproductive system of *Schistosoma mansoni* (Trematoda: Schistosomatidae) analyzed by confocal laser scanning microscopy. **Parasitol Res.** (2005) 95(1):43-49.

Oh Y-T, Deng L, Deng J, Sun S-Y. The proteasome deubiquitinase inhibitor b-AP15 enhances DR5 activation-induced apoptosis through stabilizing DR5. **Scientific Reports**. 2017;7:8027. doi:10.1038/s41598-017-08424-w.

Osman, A, Niles EG, LoVerde PT.. Identification and characterization of a Smad2 homologue from Schistosoma mansoni, a transforming growth factor-beta signal transducer. **J Biol Chem** (2001); 276: 10072–10082.

Osman A., Niles, E.G., LoVerde, P.T.. Expression of functional *Schistosoma mansoni* Smad4: Role in Erk-mediated transforming growth factor beta(TGF-beta) **down-regulation. J Biol Chem.** (2004);279: 6474–6486.

Osman A, Niles EG, Verjovski-Almeida S, LoVerde PT. *Schistosoma mansoni* TGF-β Receptor II: Role in Host Ligand-Induced Regulation of a Schistosome Target Gene. Tracy J, ed. **PLoS Pathogens**. 2006;2(6):e54. doi:10.1371/journal.ppat.0020054.

Pearce, J.E; Mcdonald, A.S.. The Immunobiology of Schistosomiasis. **Nature Reviews** *(*2002); 2: 499-511.

Pellegrino, J, Coelho, P.M.. *Schistosoma mansoni:* wandering capacity of a worm couple. **The Journal of Parasitology.***(*1978); 64: 181–182.

Pereira AC[1], Silva ML[2], Souza JM[2], Laurentiz RS[3], Rodrigues V[4], Januário AH[2], Pauletti PM[2], Tavares DC[2], Filho AA[5], Cunha WR[2], Bastos JK[6], Magalhães LG[7]. In vitro and in vivo anthelmintic activity of (−)-6,6_-dinitrohinokinin against schistosomula and juvenile and adult worms of Schistosoma mansoni. *schistosoma mansoni* (1 items). **Acta Trop.** (2015 Sep);149:195-201. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.06.005. Epub 2015 Jun 10.

Pereira RV[1], Vieira HG[1], Oliveira VF[1], Gomes Mde S[2], Passos LK[3], Borges Wde C[1], Guerra-Sá.R[1.]Conservation and developmental expression of ubiquitin isopeptidases in Schistosoma mansoni. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2014 Feb;109(1):1-8. doi: 10.1590/0074-0276130107. Epub 2014Nov 4.

Pereira RV**[1],** de S Gomes M**[2],** Olmo RP**[3],** Souza DM**[4],** Cabral FJ**[5],** Jannotti-Passos LK**[6],** Baba EH**[7],** Andreolli AB**[8],** Rodrigues V**[9],** Castro-Borges W**[10],** Guerra-Sá R**.** Ubiquitin-specific proteases are differentially expressed throughout the Schistosoma mansoni life cycle. **Parasit Vectors**. 2015a Jun 26;8:349. doi: 10.1186/s13071-015-0957-4

Pereira RV[1], Gomes Mde S, Costa MP, Passos LK, Borges Wde C, Guerra-Sá R.
MJD and OTU deubiquitinating enzymes in *Schistosoma mansoni*. **Parasitol Res**. 2015 Aug;114(8):2835-43. doi: 10.1007/s00436-015-4484-1. Epub 2015b May 1.

Peter Makaula1*, John R Sadalaki2 , Adamson S Muula2 , Sekeleghe Kayuni3 , Samuel Jemu4 and Paul Bloch. Schistosomiasis in Malawi: a systematic review. Makaula et al. **Parasites & Vectors** (2014), 7:570 http://www.parasitesandvectors.com/content/7/1/570

Roeten MSF[1], Cloos J[2,3], Jansen G.
Positioning of proteasome inhibitors in therapy of solid malignancies. **Cancer Chemother Pharmacol.** 2018 Feb;81(2):227-243. doi: 10.1007/s00280-017-3489-0. Epub 2017 Nov 28.

Rollinson, D., Knopp, S., Levitz, S., Stothard, J. R., Tchuenté, L. A., et al. 2012. Time to set the agenda for schistosomiasis elimination. **Acta tropica** (2013); ISSN: 1873-6254, Vol: 128, Issue: 2, Page: 423-40

Sánchez Alvarado, Alejandro. “On the Trail of a Tropical Disease.” **eLife** 2 (2013): e01115. *PMC*. Web. 6 July 2018.

Santiago Ede F[1], de Oliveira SA, de Oliveira Filho GB, Moreira DR, Gomes PA, da Silva AL, de Barros AF, da Silva AC, Dos Santos TA, Pereira VR, Gonçalves GG, Brayner FA, Alves LC, Wanderley AG, Leite AC. Evaluation of the anti-Schistosoma mansoni activity of thiosemicarbazones and thiazoles. **Antimicrob Agents Chemother.** 2014;58(1):352-63. doi: 10.1128/AAC.01900-13. Epub 2013 Oct 28.

Sarhan, D; Wennerberg, E.• D’Arcy, P., Gurajada, D., Linder, S., Lundqvist, A. A novel inhibitor of proteasome deubiquitinating activity renders tumor cells sensitive to TRAIL-mediated apoptosis by natural killer cells and T cells. **Cancer Immunol Immunother.** May 2013. DOI 10.1007/s00262-013-1439-1

Shabek N[1], Herman-Bachinsky Y, Buchsbaum S, Lewinson O, Haj-Yahya M, Hejjaoui M, Lashuel HA, Sommer T, Brik A, Ciechanover A. The size of the proteasomal substrate determines whether its degradation will e mediated by mono- or polyubiquitylation. **Mol Cell**. 2012 Oct 12;48(1):87-97. doi: 10.1016/j.molcel.2012.07.011. Epub 2012 Aug 16.

Smithers, S.R., Terry, R.J., Infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni*: and the recovery of adult worms. **Parasitololgy** (1965); 55:695–700.

Verjovski-Almeida, S., Demarco, R., Martins, E.A., Guimaraes, P.E., Ojopi, E.P., et al.. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. **Nature Genetics.** (2003); 35(2):148-157.

Verjovski-Almeida, S., Leite, L.C., Dias-Neto, E., Menck, C.F., Wilson, R.A..Schistosome transcriptome: insights and perspectives for functional genomics. **Trends in Parasitology**. (2004);20(7):304-308.

Vogel RI, Coughlin K, Scotti A, Iizuka Y, Anchoori R, Roden RB, Marastoni M, Bazzaro M. Simultaneous inhibition of deubiquitinating enzymes (DUBs) and autophagy synergistically kills breast cancer cells. **Oncotarget.** Feb 28;6(6):4159-70, 2015.

Wang, Bo, James J Collins, and Phillip A Newmark. “Functional Genomic Characterization of Neoblast-like Stem Cells in Larval *Schistosoma Mansoni*.” Ed. Alejandro Sánchez Alvarado. **eLife** 2 (2013): e00768. *PMC*. Web. 6 July 2018.

Wang X, Stafford W, Mazurkiewicz M, Fryknäs M, Brjnic S, Zhang X, Gullbo J, Larsson R, Arnér ES, D'Arcy P, Linder S. The 19S Deubiquitinase inhibitor b-AP15 is enriched in cells and elicits rapid commitment to cell death. **Mol Pharmacol.** 2014 Jun;85(6):932-45. doi: 10.1124/mol.113.091322. Epub 2014 Apr 8.

World Health Organization (WHO). Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire. (dezembro, 2016 e 2017)

Wilson, R. A.. The cell biology of schistosomes: a window on the evolution of the early metazoa. **Protoplasma.** (2011);249(3):503-518.

You, H., Gobert, G.N., Jones, M.K., Zhang, W., McManus, D.P.. Signalling pathways and the host-parasite relationship: putative targets for control interventions against schistosomiasis: signalling pathways and future anti-schistosome therapies. **Bioessays**. (2011);33(3):203-214.