UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

Mariana Lombardi Peres De Carvalho

**Identificação de Proteínas Modificadas por Fosforilação
em *Schistosoma mansoni* após Tratamento
com TNF- α Humano**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

27/11/2014

Mariana Lombardi Peres De Carvalho

**Identificação de proteínas modificadas por fosforilação em
Schistosoma mansoni após tratamento
com TNF- α humano**

*Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto
de Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Ciências
(Bioquímica)*

Área de Concentração: Bioquímica

Orientador: Dr. Sergio Verjovski-Almeida

São Paulo

2014

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

C331i Carvalho, Mariana Lombardi Peres de
Identificação de proteínas modificadas por fosforilação em
Schistosoma mansoni após tratamento com TNF- α humano
/ Mariana Lombardi Peres de Carvalho. -- São Paulo, 2014.
73p.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Verjovski-Almeida, Sergio

1. Fosforilação de proteína : Bioquímica 2. Relação
hospedeiro-parasita I. T. II. Verjovski-Almeida, Sergio,
orientador.

574.19245 CDD

Mariana Lombardi Peres De Carvalho

Identificação de proteínas modificadas por fosforilação em *Schistosoma mansoni*
após tratamento com TNF- α humano

*Dissertação de mestrado apresentada ao
Instituto de Química da Universidade de São
Paulo para obtenção do Título de Mestre em
Ciências (Bioquímica)*

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedico aos meus pais Manoel e Solange, por terem acreditado no meu potencial e por me proporcionarem umas das poucas coisas que ninguém pode tirar de mim – conhecimento, educação e integridade moral. Aos meus familiares, pelo apoio e compreensão. Aos meus amigos, pelos melhores momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Acredito que, mais que qualquer livro e artigo científico, são as pessoas que temos ou tivemos em nossas vidas que nos trazem o verdadeiro conhecimento. Portanto, agradeço primeiramente a todas as pessoas que passaram e as que ainda estão presentes em minha vida e que, direta ou indiretamente, influenciaram minha formação e ajudaram de alguma forma no meu desenvolvimento, não apenas profissionalmente, mas como ser humano. Gostaria que soubessem que me sinto muito feliz e satisfeita por ter tido a oportunidade de tê-las, mesmo que apenas por um breve período.

Ao meu pai Manoel, meu grande exemplo nessa vida.

À minha mãe Solange, com quem pude aprender que a vida não é fácil não.

Ao meu irmão Gustavo.

Aos meus familiares.

Ao professor Dr. Sergio Verjovski-Almeida pela orientação e paciência.

À professora Dr. Deborah Schechtman e seus alunos Mariana e Matheus pela colaboração.

Aos pesquisadores do Instituto Adolpho Lutz, por cederem os hamsters infectados para a realização desse trabalho.

Aos técnicos de laboratório Jeff e Bianca.

À Ana Paula, a loira mais linda do IQ.

Aos meus amigos de laboratório Murilo, Lauren, Otto, Felipe, Ana Ayupe, Ana Carolina, Angela, Kleber, Lucas, Ester, Julio e, em especial, Santiago, que

aturou diariamente minhas oscilações de humor, alegrias, tristezas, vontades loucas de falar, cantorias e idéias loucas, sempre com muita paciência e atenção.

Às Xto Girls Katia, Giu e Anderson.

À minha irmã Kerol. Sem ela minha vida seria como Tom sem Jerry, Bonnie sem Clyde ou Dr. Jekyll sem Mr. Hide.

À minha querida amiga Helen, por estar sempre rindo.

Ao meus queridos amigos do IQ Luciana, Greice, Potato, Renan, Fufu, Exu e Amanda.

À minha cachorra Nina, por sempre me receber tão alegremente, mesmo depois de um dia ruim. E pela companhia durante o processo de escrita dessa dissertação. Me ajudou a preservar a sanidade mental e carência afetiva neste momento de refúgio.

Ao meu Macaco, meu companheiro, amigo e namorado intergalático.

Às agências FAPESP, CNPq e CAPES pelo financiamento e pelas diferentes bolsas, concedidas em momentos diversos deste trabalho.

*“Your life is your life
Don’t let it be clubbed into dank submission.
Be on the watch.
There are ways out.
There is light somewhere.
It may not be much light but
It beats the darkness.
Be on the watch.
The gods will offer you chances.
Know them.
Take them.
You can’t beat death but
You can beat death in life, sometimes.
And the more often you learn to do it,
The more light there will be.
Your life is your life.
Know it while you have it.
You are marvelous
The gods wait to delight
In you.”*

- The Laughing Heart, Charles Bukowski

RESUMO

Carvalho, M.L.P. **Identificação de proteínas modificadas por fosforilação em *Schistosoma mansoni* após tratamento com TNF- α humano.** 2014. 73 p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Esquistossomose é uma das doenças parasitárias com maior incidência mundial. *Schistosoma mansoni*, a única espécie encontrada no Brasil, tem um ciclo de vida complexo que inclui seis estágios de desenvolvimento distintos e dois hospedeiros, sendo um deles o homem. Nosso grupo identificou um gene que codifica um receptor que possui homologia com o receptor de TNF- α humano em *S. mansoni* (SmTNFR) e descrevemos o efeito *in vitro* da citocina humana TNF- α sobre a expressão gênica em larga escala no parasita. A via de sinalização através da qual o TNF- α atua sobre o parasita permanece desconhecida. Em humanos, o TNF- α , ao se ligar à isoforma do receptor que é mais semelhante ao SmTNFR, inicia uma cascata de fosforilação que conduz à ativação de diversas proteínas quinases que levam à ativação de fatores de transcrição. A nossa hipótese é a de que esta citocina humana atuaria no parasita de forma semelhante, resultando na alteração da expressão gênica do parasita observada em nosso trabalho anterior. No presente trabalho tivemos como objetivo verificar se há aumento de proteínas fosforiladas após o tratamento *in vitro* de vermes com o TNF- α humano, e identificá-las, elucidando a via de sinalização induzida por esta citocina em *S. mansoni*.

A fim de identificar as proteínas que são significativamente diferencialmente fosforiladas após exposição de *S. mansoni* à citocina humana, vermes machos adultos foram incubados em cultura por 15 min com TNF- α (20 ng / ml), ou somente com o veículo, em controles, seguido da extração de proteínas totais. Utilizamos a abordagem fosfoproteômica por meio da realização de eletroforese bidimensional, seguida de coloração com corante específico para fosfoproteínas Pro-Q Diamond (Invitrogen). Para identificar quais proteínas tiveram fosforilação alterada pelo tratamento, fizemos uma análise quantitativa dos *spots*

(volume dos *spots*) nas imagens dos géis corados com Pro-Q, utilizando o *software* 2D Platinum (GE). Em seguida a coloração de proteína total dos géis foi realizada utilizando Coomassie Blue Coloidal, para localização de todos os spots de proteínas de cada gel. Cortamos dos géis os *spots* de proteínas que apresentaram mudanças estatisticamente significativas na fosforilação ($n = 3$ réplicas; $p < 0,05$, teste-*t*), com base na comparação de seus volumes relativos nas imagens dos géis das amostras tratadas comparadas com as controles, e em seguida as proteínas das amostras foram identificadas por espectrometria de massa. Analisamos três réplicas biológicas e observamos 45 *spots* que tiveram fosforilação significativamente alterada, sendo que 42 deles apresentaram fosforilação aumentada e 3 apresentaram fosforilação diminuída após o tratamento com a citocina. Entre os *spots* identificados por espectrometria de massa, verificou-se que proteínas relacionadas a processos metabólicos, sinalização celular, citoesqueleto e contração muscular estavam entre as que sofreram aumentos de fosforilação com o tratamento com TNF- α humano.

Embora a abordagem experimental adotada para este estudo não tenha sido sensível o suficiente para concluir qual via canônica de transdução de sinal é ativada por TNF- α humano em *S. mansoni*, este estudo confirmou o aumento da fosforilação de proteínas-alvo induzido por TNF- α humano, abrindo novos caminhos para uma investigação mais aprofundada que caracterize o papel das proteínas identificadas como alteradas por essa via de sinalização, e permita entender melhor a importância do TNF- α humano na biologia do *S. mansoni* e na interação parasita-hospedeiro.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*, TNF- α humano, fosfoproteoma

ABSTRACT

Carvalho, M.L.P. **Identification of proteins modified by phosphorylation after treatment of *Schistosoma mansoni* with human TNF-alpha.** 2014. 73 p. Masters Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Schistosomiasis remains one of the parasitic diseases with the highest incidence worldwide. *Schistosoma mansoni*, the only species found in Brazil, has a complex life cycle which includes six life stages and two hosts, one of them being humans. Our group has identified a gene that encodes a TNF-alpha receptor-like in *S. mansoni* (SmTNFR) and described the in vitro effect of human TNF-alpha cytokine on large-scale gene expression of the parasite. The signaling pathways by which TNF-alpha acts upon the parasite remain unknown. In humans, when TNF-alpha binds to the receptor isoform that is most similar to SmTNFR it initiates a phosphorylation cascade that activates a signaling pathway leading to the activation of transcription factors. Our hypothesis is that this cytokine could act in the parasite through a phosphorylation cascade that activates transcription factors resulting in the change of gene expression observed in our previous work. The aim of this work was to verify if there were proteins that showed increased phosphorylation upon the *in vitro* treatment of worms with human TNF-alpha, identifying them, to try and elucidate the signaling pathway by which the cytokine acts in *S. mansoni*.

In order to identify which proteins are significantly differentially phosphorylated upon exposure of *S. mansoni* to the human cytokine, we incubated male adult worms for 15 min in culture with human TNF-alpha (20 ng / ml), or with vehicle only, in controls, and we extracted total proteins from the parasites. We used the phosphoproteomics approach of bidimensional gel electrophoresis followed by phospho-specific staining of gels using Pro-Q Diamond dye (Invitrogen). To identify which proteins were phosphorylated or had their phosphorylation changed due to the treatment, we quantified the spots (determined the spots volumes) from Pro-Q stained gels using Image Master 2D Platinum software (GE). A total

protein staining of the gels was performed using Coomassie Brilliant Blue (CBB) in order to localize all protein spots in the gel. We excised from CBB stained gels the protein spots that showed statistically significant changes in phosphorylation ($n=3$ replicates; $p\text{-value}<0.05$, t -test), based on the relative volumes of their spot images with respect to the total volume of spots in the gel, with samples from treated compared to control parasites, and subsequently the proteins in these samples were identified by mass spectrometry. We have analyzed three biological replicates and observed 45 spots that were differentially phosphorylated; 42 of them had their phosphorylation increased and 3 had their phosphorylation decreased upon a 15-min-treatment of male adult worms with the cytokine. Among the spots identified by mass spectrometry, we found proteins related to metabolic process, cell signaling, and cytoskeleton and muscle contraction.

Although the experimental approach adopted for this study was not sensitive enough to conclude which canonical signal transduction pathway is activated by human TNF- α in *S. mansoni*, this kind of study confirmed the increase in phosphorylation of target proteins induced by human TNF- α , opening new paths for further investigation in order to characterize the role of the proteins identified as altered by this specific signaling, which will lead to a better understanding of the importance of this cytokine in the biology of *S. mansoni* and in host-parasite interaction.

Keywords: *Schistosoma mansoni*, human TNF- α , phosphoproteome

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT / PKB	<i>Protein Kinase B</i>
AMPC	Monofosfato cíclico de adenosina
ASK-1	<i>Apoptosis signal-regulating kinase 1</i>
ATP	Trifosfato de adenosina
CHAPS	3-[(3-Colamidopropil)-dimetil amônio]-propano- sulfonato
DHEA	Desidroepiandrosterona
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
DTT	Ditiotreitol
EST	<i>Expressed sequence tags</i>
GO	<i>Gene Ontology</i> (Ontologia Gênica)
IEF	<i>Isoelectric focusing</i> (Focalização isoeletrica)
IL-7	Interleucina 7
JNK	c-Jun N-terminal kinase
JNKK	c-Jun N-terminal kinase kinase
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LC/MS/MS	<i>Liquid chromatography-mass spectrometry-mass spectrometry</i>
MAPKK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
mRNA	RNA mensageiro
NAD	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NF-κB	Nuclear factor kappa B
NR	Nuclear receptor
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão Fosfato-Salino)
<i>pI</i>	<i>Isoelectric point</i>
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
<i>S. mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>
SCID	<i>Severe combined immunodeficiency</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>

SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SmTNFR	<i>Schistosoma mansoni Tumor Necrosis Factor receptor</i>
TFA	<i>Trifluoroacetic acid (ácido trifluoroacético)</i>
TGF- β	Transforming Grown Factor Beta
TNFR	Tumor Necrosis Factor receptor
TNFR1	<i>Tumor Necrosis Factor receptor</i>
TNFR2	<i>Tumor Necrosis Factor receptor 2</i>
TNF- α	<i>Tumos Necrosis Factor Alpha</i>
TRAF2	TNF receptor-associated factor 2
UNIPROT	Universal Protein Resource
WHO	World Health Organization

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. O parasita <i>Schistosoma mansoni</i>	15
1.2. Esquistossomose: aspectos gerais e epidemiológicos	18
1.3. Relação parasita-hospedeiro e o papel do TNF- α	22
2. OBJETIVOS.....	29
2.1. Objetivos gerais.....	29
2.2. Objetivos específicos.....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1. Processo de perfusão cardíaca para obtenção de parasitas adultos de <i>S. mansoni</i>	30
3.2. Cultivo de parasitas adultos de <i>S. mansoni</i>	31
3.3. Separação por géis bidimensionais das proteínas fosforiladas após o tratamento de machos de <i>S. mansoni</i> com TNF- α humano	32
3.3.1. Preparação de lisados para géis bidimensionais.....	32
3.3.2. Géis bidimensionais	32
3.3.3. Detecção de fosfoproteínas utilizando corante fluorescente Pro-Q® Diamond (Invitrogen).....	33
3.3.4. Coloração com Coomassie Blue Coloidal.....	34
3.3.5. Análise dos Géis.....	34
3.3.6. Secção dos spots dos géis bidimensionais e preparação das amostras para análise por espectrometria de massa	34
3.4. Identificação por espectrometria de massas das proteínas	35
4. RESULTADOS	37
4.1. Detecção em géis bidimensionais de proteínas diferencialmente fosforiladas após o tratamento de machos adultos de <i>S. mansoni</i> com TNF- α humano.....	37
4.2. Identificação de proteínas por espectrometria de massas.....	40
4.3. Anotação funcional das proteínas identificadas	48
5. DISCUSSÃO.....	50
5.1. Proteínas envolvidas na via glicolítica que possuem fosforilação aumentada após tratamento do <i>S. mansoni</i> com TNF- α humano	53
5.2. Proteínas envolvidas em sinalização celular que possuem fosforilação aumentada após tratamento do <i>S. mansoni</i> com TNF- α humano	58
5.3. Proteínas de citoesqueleto que possuem fosforilação aumentada após tratamento do <i>S. mansoni</i> com TNF- α humano	61
5.4. Estudo da anexina como proteína participante na internalização do receptor SmTNFR	61
6. CONCLUSÕES.....	63
7. REFERÊNCIAS.....	65
8. ANEXOS.....	74

1. INTRODUÇÃO

1.1. O parasita *Schistosoma mansoni*

O *Schistosoma mansoni* pertence ao Filo dos *Platelmintos*, Classe *Trematoda*, Subclasse *Digenea* e família *Schistosomatidae*. A principal característica que os distingue de outros *Digenea* é o dimorfismo sexual, diferente dos outros representantes da subclasse, que são hermafroditas (Rey 2008). É um dos agentes causadores da esquistossomose, uma doença crônica de ocorrência mundial.

O ciclo biológico deste parasita é bastante complexo, uma vez que possui seis estágios de desenvolvimento distintos e enfrenta ambientes completamente diferentes, necessitando de adaptações fisiológicas e morfológicas para sua sobrevivência (Figura 1). Caracteriza-se pela alternância entre estágios larvais, uma fase assexuada em um hospedeiro intermediário, um caramujo do gênero *Biomphalaria*, e uma fase sexuada em seu hospedeiro definitivo, o humano, podendo também infectar outros mamíferos, como cães e bovinos (Rey 2008).

Figura 1. Ciclo biológico do parasita *S. mansoni*. Adaptado de (CDC 2013).

Os ovos dos parasitas são eliminados juntamente com as fezes do hospedeiro definitivo. Em água, sob condições de luz e temperatura adequadas, esses ovos eclodem, liberando os miracídios, primeiro estágio larval de vida livre do parasita. Estas larvas nadam rapidamente usando cílios ancorados a placas epidermais, até localizarem e penetrarem em seu hospedeiro intermediário, um caramujo do gênero *Biomphalaria*, em um processo quimiotático por moléculas liberadas pelo caramujo na água. A penetração dos miracídios é facilitada pela liberação de diversas proteases pelas glândulas laterais e apicais da larva. Uma vez dentro do hospedeiro, essas larvas se alojam no tecido fibro-muscular da região cefalopodal do caramujo e se diferenciam em esporocisto primário (Barbosa 1995). Estes esporocistos, em cerca de 2 semanas, geram esporocistos secundários que migram da musculatura cefalopodal até as glândulas digestivas, ou hepatopâncreas do molusco, onde dão origem às cercárias, que irão infectar o hospedeiro definitivo. No final desse processo, um único miracídio pode gerar cerca de 300 mil cercárias.

As cercárias emergem do caramujo cerca de 4 semanas pós-infecção. São larvas de vida livre, que nadam até encontrarem o hospedeiro definitivo, enquanto não esgotarem suas reservas de glicogênio. O processo de encontrar o hospedeiro é influenciado por diversos fatores como a turbulência da água, temperatura e a presença na água de moléculas da pele do hospedeiro, como ceramidas, arginina e ácido linoleico (Haas, Grabe et al. 2002; Haeberlein and Haas 2008; Lee, Burgess et al. 2013).

Ao encontrar seu hospedeiro, as cercárias iniciam um processo de penetração através da epiderme para que consigam alcançar a corrente sanguínea de seu hospedeiro definitivo. Para que isso seja possível, possuem diversas glândulas que liberam enzimas que degradam o tecido do hospedeiro. No processo de penetração, as cercárias perder suas caudas, e se transformam estruturalmente e fisiologicamente em esquistossômulos (Rey 2008).

Os esquistossômulos permanecem na pele por cerca de 48 horas antes de migrarem para a derme e vênulas e entrarem na circulação. Neste processo migram para o coração e pulmões. Nos capilares pulmonares, as larvas tornam-se mais delgadas e longas, quadruplicando de tamanho, facilitando, assim, sua migração através da rede vascular e dos capilares de diversos órgãos até que cheguem ao fígado (He, Chen et al. 2002).

Ao chegarem no sistema porta-hepático, os esquistossômulos crescem rapidamente e começam a alimentar-se de sangue. Neste período também iniciam o processo de pareamento entre vermes machos e vermes fêmeas, processo essencial para que ambos alcancem a maturidade sexual. Os casais migram, então, para as veias mesentéricas, onde, após maturação, acasalam e iniciam o processo de ovoposição (Rey 2008).

Os vermes machos e fêmeas estão intimamente associados; as fêmeas residem no canal ginecóforico dos machos e há uma intensa troca de sinalização entre eles, garantindo a maturação. A produção de ovos se inicia cerca de 4 a 6 semanas pós-infecção e pode se estender por até 15 anos (Rey 2008).

Os vermes adultos possuem duas ventosas terminais que auxiliam na sua ancoragem na parede das veias mesentéricas, um complexo tegumento que possui papel essencial na interação parasita-hospedeiro e no escape do sistema inflamatório do hospedeiro. As fêmeas maduras podem produzir centenas de ovos por dia, que atravessam os vasos passivamente com o auxílio de células endoteliais, saindo das veias mesentéricas até atingirem a mucosa intestinal, aonde são liberados no ambiente juntamente com as fezes (File 1995).

Os ovos que não conseguem atravessar os vasos acabam por ficarem presos em órgãos, principalmente no fígado e intestino, causando uma reação imune que leva à principal patologia da esquistossomose, que é a formação de grânulos ao redor desses ovos. A formação dos granulomas está associada à resposta dos linfócitos T CD4+ aos antígenos liberados pelo miracídio no interior do ovo, que, juntamente com as fibras de colágeno,

macrófagos e eosinófilos, formam uma lesão granulomatosa ao redor dos ovos, levando à fibrose e consequentemente ao comprometimento da função hepática, maior problemática da doença (Rumbley, Zekavat et al. 1998).

1.2. Esquistossomose: aspectos gerais e epidemiológicos

A esquistossomose, popularmente chamada de “xistose” ou “barriga d’água”, é causada por parasitas do gênero *Schistosoma*. Dentre as principais espécies de importância epidemiológica estão o *Schistosoma mansoni*, encontrado na África, Oriente Médio, Venezuela, Suriname e Brasil; *Schistosoma haematobium*, presente na África e Oriente Médio; e *Schistosoma japonicum*, na China, Indonésia e Filipinas (Neves 2002).

Estima-se que mais de 240 milhões de pessoas em 76 países estejam infectadas e que mais de 700 milhões de pessoas habitem áreas endêmicas e corram o risco de infecção (WHO 2014). A doença é prevalente em áreas tropicais e subtropicais em comunidades pobres sem água potável e saneamento adequado (Steinmann, Keiser et al. 2006). A Figura 2 ilustra as áreas endêmicas e classifica o grau de prevalência desta doença em cada região.

Figura 2. Distribuição global e prevalência da esquistossomose. Adaptado de (WHO 2008).

No Brasil, o único agente etiológico causador da esquistossomose é o *S. mansoni*, introduzido no país durante o tráfico de escravos africanos no século XVI (Katz and Almeida 2003). O sucesso da introdução deste parasita no país se deu pela existência de caramujos do gênero *Biomphalaria*, que, no ciclo de vida do parasita, representam o hospedeiro intermediário, somado à condições ambientais semelhantes ao local de origem do parasita. Hoje a doença ocorre em uma vasta área endêmica que se estende do Maranhão até o Espírito Santos e Minas Gerais. Há diversos focos da doença encontrados no Distrito Federal e nos estados do Pará, Piauí, Goiás, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. A Figura 3 demonstra a distribuição geográfica e prevalência do parasita no Brasil (Coura and Amaral 2004). Estima-se que mais de 6 milhões de pessoas estejam infectadas no país, e mais 25 milhões em risco de contrair a doença (WHO 2014).

Figura 3. Distribuição da esquistossomose no Brasil de acordo com sua prevalência em cada estado. Adaptado de (Coura and Amaral 2004).

A patogenia da doença está ligada a vários fatores, tais como a cepa do parasita, a carga parasitária, a idade, o estado nutricional e a resposta imune individual (Gryseels, Polman et al. 2006). A primeira alteração notada no paciente infectado é a chamada dermatite

cercariana, que ocorre devido à penetração das cercárias através da pele (Kolarova 2007). É caracterizada por edema, erupções cutâneas e prurido intenso. Em função da evolução parasitária, o indivíduo pode apresentar linfadenia generalizada, febre, esplenomegalia e sintomas pulmonares (Rey 2008).

Na sua fase aguda, a esquistossomose apresenta sintomatologia variada, podendo ser até assintomática. Na fase pré-postural, os sintomas são generalizados como mal-estar, febre, problemas pulmonares (especialmente tosse), dores musculares, desconforto abdominal e um quadro de hepatite aguda. Em torno de 50 dias após a infecção, devido à postura e disseminação dos ovos, pode ocorrer necrose, e, consequentemente enterocolite aguda; há formação de granulomas no fígado e em outros órgãos, o que pode causar febre, sudorese, calafrios, emagrecimento, fenômenos alérgicos, diarreia, cólicas, disenteria, hepatoesplenomegalia, leucocitose com eosinofilia, e alteração discreta nas funções hepáticas. O período agudo dura cerca de 120 dias após a infecção (Gryseels, Polman et al. 2006; Caldas, Campi-Azevedo et al. 2008) .

Na fase crônica da parasitose, o indivíduo infectado pode apresentar grandes variações clínicas, dentre elas diarréia muco-sanguinolenta, dor abdominal e fibrose de alças intestinais. Com relação ao quadro hepático, ele se desenvolve dependendo do grau de infecção do indivíduo e do número de ovo presentes. Assim, inicia-se com hepatomegalia e acumulação de granulomas; em fases mais adiantadas o fígado pode encontra-se totalmente fibrosado o que poderá causar fibrose periportal e obstrução dos ramos intra-hepáticos trazendo como consequência hipertensão portal. A hipertensão portal poderá causar a esplenomegalia, devido a congestão do ramo esplênico, formação de varizes esofagianas e ascite, comumente chamada de barriga d`água (Rey 2008) .

O método diagnóstico clássico da esquistossomose é feito através do exame parasitológico das fezes, preferencialmente pelo método Kato-Katz, que permite a

visualização e contagem de ovos por grama de fezes. Existem outros métodos diagnósticos, como os sorológicos e moleculares (que buscam a detecção de DNA do parasita no soro ou fezes) que também são utilizados, especialmente úteis em infecções com baixa carga parasitária e regiões de baixa endemicidade (Pontes, Oliveira et al. 2003).

O tratamento da esquistossomose se dá pela administração do praziquantel, uma droga com eficácia de 95 a 98%, em dose única de 40 mg/kg (Belizario Jr. VY 2008). Esta droga foi escolhida por ser bastante efetiva, ter um baixo custo, baixa toxicidade, ser administrada via oral e em dose única. O efeito dessa droga no parasita se dá pela alteração da captação de Ca^{2+} , ocasionando intensa contração muscular que provoca ruptura no tegumento levando, consequentemente, a morte; entretanto, o mecanismo exato de como isso ocorre ainda precisa ser melhor compreendido (Doenhoff, Cioli et al. 2008).

Existe um esforço por parte da WHO para controle e tratamento da esquistossomose nas populações que vivem em áreas afetadas. Esta estratégia de controle consiste no tratamento em massa utilizando o praziquantel, especialmente em crianças, grávidas e lactantes e grupos com ocupação envolvendo contato com águas infestadas como pescadores, fazendeiros, mulheres que realizam atividades domésticas próximas a águas e comunidades inteiras que vivem em áreas endêmicas (WHO 2014).

Apesar de muito eficiente, o tratamento com praziquantel não previne a reinfecção, o que leva à necessidade de desenvolvimento de outras estratégias e programas de controle da esquistossomose, o que inclui provisão de água potável, condições sanitárias adequadas, educação da população e controle do caramujo.

Recentemente, ocorre uma preocupação da comunidade médica e científica com relação de relatos de cepas de *S. mansoni* resistentes ao praziquantel. Em algumas áreas endêmicas, como no norte do Senegal, houve uma diminuição na taxa de cura da população perante administração da droga (Stelma, Talla et al. 1995). Além disso, já foi observado em

laboratório que cepas de *S. mansoni* se tornam mais resistentes à droga após sucessivas passagens (Cioli, Botros et al. 2004). Atualmente, diversos grupos de pesquisa procuram novas drogas potenciais para o tratamento da esquistossomose (Abdulla, Ruelas et al. 2009; Santiago Ede, de Oliveira et al. 2014).

Embora o controle e tratamento da esquistossomose sejam teoricamente simples observa-se que a doença continua sendo um grave problema de saúde pública em países em desenvolvimento. O entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na relação parasita-hospedeiro é essencial para o desenvolvimento de novas abordagens profiláticas e terapêuticas.

1.3. Relação parasita-hospedeiro e o papel do TNF- α

O *S. mansoni* possui uma surpreendente diversidade de mecanismos envolvidos em interação com o hospedeiro. Possuem sofisticados sistemas de evasão da resposta imune seja mudando seus antígenos de superfície rapidamente de forma que não haja uma resposta do sistema imune eficiente, seja expressando epítomos similares, se não idênticos, ao do hospedeiro ou até modulando sua resposta imune (Salzet, Capron et al. 2000).

Outra forma de adaptação deste parasita é através da utilização de moléculas como citocinas, fatores de crescimento e hormônios de seu hospedeiro para seu desenvolvimento. Wahab e cols. (Wahab, Warren et al. 1971) descreveram que hormônios esteróides e tireoidiano agem no crescimento e maturação de vermes adultos *in vitro* através de ligação com receptores nucleares (NR) dependentes de fatores de transcrição que possuem domínios comuns. O hormônio DHEA foi descrito como possuir um efeito protetor contra infecções por *S. mansoni* em murinos (Fallon, Richardson et al. 1998), e *in vitro* demonstrou possuir efeito citotóxico contra cercárias, esquistossômulos e vermes adultos além de diminuição da ovoposição *in vitro* (Morales-Montor, Mohamed et al. 2001). O mesmo efeito do DHEA sobre a ovoposição foi observado *in vivo* (Morales-Montor, Newhouse et al. 2001).

Citocinas humanas como IL-7 (Wolowczuk, Delacre et al. 1997; Wolowczuk, Nutten et al. 1999; Wolowczuk, Roye et al. 1999) e TGF- β (Loverde, Osman et al. 2007) foram descritas como possuindo papel importante no metabolismo e desenvolvimento de esquistossômulos. Amiri e cols. (Amiri, Locksley et al. 1992) observaram que TNF- α pode influenciar a fertilidade de fêmeas adultas e restaurar a formação de granulomas em camundongos imunodeficientes (SCID). Nestes camundongos imunodeficientes (SCID) observou-se que há uma diminuição da produção de ovos, porém o tratamento com o TNF- α murino restaura a capacidade de ovoposição (Amiri, Locksley et al. 1992). Cheever e cols. (Cheever, Poindexter et al. 1999) observaram um atraso da postura de ovos em camundongos SCID devido à ausência de TNF- α . Controversamente, (Haseeb, Solomon et al. 1996) mostraram em *S. mansoni* que a ovoposição é diminuída na presença da mesma citocina.

O entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na sinalização existente entre as moléculas do hospedeiro e do parasita ainda é limitado. Entretanto, recentemente várias moléculas envolvidas em vias de transdução de sinal tem sido descritas, e diversos receptores de *S. mansoni* homólogos a receptores humanos vêm sendo descritos. Assim, (Osman, Niles et al. 2006) descreveram o homólogo do receptor tipo II de TGF- β em *S. mansoni*; (Wu, Niles et al. 2007) identificaram um receptor homólogo ao receptor do Hormônio Tireotrófico.

Nosso grupo identificou e caracterizou em *S. mansoni* um gene homólogo ao receptor de TNF- α humano tipo II e o efeito do TNF- α humano no perfil de expressão gênica do parasita (Oliveira, Carvalho et al. 2009). *SmTNFR* codifica um receptor composto de 599 aminoácidos (Figura 4) que possui quatro domínios conservados ricos em cisteína *in tandem*, característicos dos receptores da família do TNFR.

Figura 4. Representação esquemática do gene *SmTNFR* e a respectiva ORF. Cada barra cinza representa um éxon diferente e é mostrada sua respectiva localização nos *scaffolds* do genoma do parasita, que está incompleto e ainda fragmentado. O gene *SmTNFR* é codificado na fita mais (senso). A barra hachurada representa a predição gênica (*in silico*) Smp_168070 original do projeto genoma. As barras coloridas representam domínios proteicos conservados da ORF codificada pelo gene *SmTNFR*; TNFR, Domínio Rico em Cisteína (CRD), característico da superfamília dos receptores de TNF; TM, Motivo de domínio Transmembrana. Adaptado de (Oliveira, Carvalho et al. 2009).

Ao se medir o nível de expressão do mRNA de *SmTNFR* entre os estágios de desenvolvimento do parasita foi observada uma maior expressão do receptor em cercária, o estágio infectante (Figura 5).

Figura 5. Níveis de expressão do gene SmTNFR entre os diferentes estágios de desenvolvimento detectados por experimentos de RT-PCR em Tempo Real. As barras de cores diferentes representam cada uma de 3 réplicas biológicas. Adaptado de (Oliveira, Carvalho et al. 2009).

Com o objetivo de estudar as alterações de expressão gênica no parasita induzidas pela citocina humana, vermes adultos foram tratados com TNF- α humano em uma concentração de 20 ng/ml de meio por 1h e 24h. Em seguida experimentos de *microarray* foram realizados, utilizando uma plataforma desenhada pelo nosso grupo e fabricada pela *Agilent* contendo 44000 sondas de oligonucleotídeos que representam fragmentos de genes de *S. mansoni* (Verjovski-Almeida, Venancio et al. 2007). A análise destes dados mostrou que 1395 genes apresentavam mudanças transientes de expressão, onde 821 foram induzidos com o tratamento por 1h com a citocina e reprimidos em 24h, e 544 apresentaram padrão oposto (Figura 6A). Dentre este grupo, pode-se destacar genes que estão relacionados à organização celular, modificação pós-transcricional de RNA, síntese proteica, expressão gênica e ciclo celular. Outro grupo de genes apresentou uma mudança de perfil de expressão gênica sustentada durante o período de 24h (Figura 6B), sendo 336 induzidos e 155 reprimidos. Dentre estes, estão genes envolvidos com os processos de desenvolvimento do sistema nervoso, metabolismo de ácido nucléico e sinalização celular.

Figura 6. Efeito do TNF- α humano no perfil de expressão gênica de vermes adultos. Vermes adultos pareados foram tratados por 1h e 24h com 20 ng/ml de TNF- α humano. A figura mostra os genes que tiveram alterações significativas (q -value < 0,05) nos níveis de expressão entre os vermes tratados e controles. (A) Agrupamento hierárquico de 1365 genes com mudanças transientes de expressão. (B) Agrupamento hierárquico dos 492 genes com mudanças sustentadas nos níveis de expressão em 24h de observação. Cada linha representa um gene e cada coluna representa uma réplica experimental. Foram feitas duas réplicas técnicas para cada uma das duas réplicas biológicas. Os níveis de expressão estão indicados como Log2 das intensidades (Tratado/Controle) para cada tempo (1h e 24h). Para cada gene a intensidade da cor é proporcional ao Log da razão, como indicado na barra de escala, e mostra genes induzidos (vermelho) ou reprimidos (verde) pelo tratamento. Extraída de (Oliveira, Carvalho et al. 2009)

Sabe-se que TNF- α é liberado na pele humana, quando os parasitas penetram (He, Chen et al. 2002). Neste contexto, como o estágio que apresentava a maior expressão do SmTNFR era o de cercária, foi avaliado o efeito do TNF- α humano em esquistossômulos após 3 horas de transformados, incubados com a citocina por 1 hora.

Em esquistossômulos de 3 horas, tratados por 1h com a citocina humana, 548 genes foram identificados como diferencialmente expressos, onde 309 foram induzidos e 239 foram reprimidos. Genes relacionados à regulação de expressão gênica, crescimento celular e proliferação foram identificados no primeiro grupo.

Uma vez identificado o possível efector molecular e os genes que alteram a expressão com o tratamento com TNF- α humano nosso grupo realizou uma análise *in silico* dos

possíveis elementos que poderiam participar da via de sinalização do *Sm*TNFR. A busca por sequências homólogas às sequências das proteínas humanas envolvidas na via canônica de sinalização no genoma e transcriptoma do parasita e, a concomitante publicação do genoma do parasita com a predição completa da sequência de cerca de 13 mil genes (Berriman, Haas et al. 2009) permitiram identificar e postular os possíveis genes preditos que codificam os membros da via canônica de sinalização no parasita. Nove elementos identificados em *S. mansoni* estão representados na Figura 7.

Figura 7. Representação esquemática da possível via de sinalização de TNF- α em *S. mansoni*. Elementos representados em laranja foram identificados em *S. mansoni* pela análise *in silico* dos bancos de dados de ESTs e mRNAs; em azul estão representados os elementos que não foram encontrados. Símbolos ($\rightarrow$) indicam modificação covalente: fosforilação de proteína; ($\dashv$) indicam interação não covalente: associação proteína-proteína. Relação: (+) estimulatória; (-) inibitória; (0) neutra; (?) indefinida. Extraído de (Oliveira, Carvalho et al. 2009).

A caracterização experimental da via de transdução de TNF- α em *S. mansoni* nunca foi realizada e seu estudo, proposto nesta dissertação, trará informações essenciais sobre o

papel desta citocina nos processos biológicos do parasita. Em humanos, a via de sinalização do TNF- α é mediada por uma cascata de proteínas quinases que desencadearão a fosforilação dos elementos da cascata e outros elementos secundários também responsáveis pela mudança de expressão de genes alvo. Ao ligar-se a uma das duas isoformas dos receptores humanos, TNFR1 e TNFR2, esta citocina é capaz de ativar no homem pelo menos três vias distintas que levam ou para a ativação de caspases (TNFR1) ou de fatores de transcrição (TNFR2) (Baud and Karin 2001). Assim como descrevemos anteriormente (Figura 7), o parasita *S. mansoni* possui os elementos mínimos para comporem uma via completa potencialmente ativada por um receptor sem domínio de morte, similar ao TNFR2 humano.

Neste contexto, caracterizar experimentalmente, pela primeira vez, as mudanças que ocorrem na fosforilação das proteínas do parasita quando exposto ao TNF- α humano pode indicar os efeitos diretos e indiretos sobre a via de sinalização e/ou sobre outras proteínas fosforiladas por elementos da via que foi predita para o parasita. Isto é sem dúvida de grande contribuição para entender os mecanismos envolvidos nos efeitos em larga-escala da citocina humana sobre a expressão gênica, que já foram observados no parasita.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Neste trabalho tivemos como objetivo verificar se há aumento de proteínas fosforiladas após o tratamento *in vitro* de vermes adultos de *S. mansoni* com TNF- α humano recombinante, e identificar quais são estas proteínas, com o intuito de elucidar a via de sinalização induzida pela citocina em *S. mansoni* para melhor compreender a função e a importância biológica desta via no parasita.

2.2. Objetivos específicos

- Analisar através de eletroforese bidimensional seguida de coloração dos géis com corante específico para proteínas fosforiladas Pro-Q Diamond (Invitrogen) quantas proteínas são diferencialmente fosforiladas em vermes adultos machos de *S. mansoni* após tratamento de 15 min com a citocina humana TNF- α ou apenas com o veículo (controles).
- Identificar por meio de espectrometria de massa as proteínas que forem detectadas como diferencialmente fosforiladas pela ação do TNF- α no experimento de eletroforese bidimensional.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Processo de perfusão cardíaca para obtenção de parasitas adultos de *S. mansoni*

O método utilizado para obtenção de parasitas adultos de *S. mansoni* foi o de perfusão cardíaca, primeiramente descrito por (Pellegrino and Siqueira 1956) e adaptado em nosso laboratório. Hamsters-sírios (*Mesocricetus auratus*) foram infectados com cerca de 150 cercárias cada através de injeção subcutânea, e mantidos no Setor de Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz, local de manutenção do ciclo do parasita.

Após 42 dias de infecção, os hamsters foram transportados para nosso laboratório para serem submetidos ao processo de perfusão. A perfusão cardíaca exige que os animais estejam profundamente anestesiados porém apresentem atividade cardíaca evitando a morte dos parasitas e a coagulação do sangue nas veias e artérias. Assim os animais foram colocados em câmara de CO₂ para anóxia e anestesiados com Xilazina (10 mg/kg) e Quetamina (200 mg/kg) via injeção intraperitoneal, o que os leva a sedação profunda após o tempo de aproximadamente 5 minutos. O estado de sedação foi verificado pela perda de reflexos sensoriais através de pinçamento das patas anteriores. Os animais foram então imersos em etanol 70%, a fim de diminuir a contaminação microbiana da pele que eventualmente possa se espalhar para o meio durante a perfusão e interferir nas culturas dos parasitas. Em seguida se realizou um processo cirúrgico de laparotomia e toracotomia para exposição do plexo mesentérico e do coração.

Para melhor posicionamento durante a perfusão e minimização do contato dos parasitas com a pele do animal (contaminada com a flora) durante o processo de perfusão, os hamsters foram colocados em um suporte de superfície plana e vertical, e fixados pelas patas direita anterior e posterior, permitindo que as vísceras ficassem estendidas para fora da cavidade abdominal. Uma tela presa ao suporte foi posicionada logo abaixo de forma que todo o sangue dos animais fluísse através da tela, retraindo os parasitas.

No processo de perfusão cardíaca dos animais, primeiramente foi feito um corte na veia porta hepática seguido da inserção de uma agulha (21G) no ventrículo esquerdo do coração dos animais. Esta agulha, conectada a um sistema de fluxo contínuo (através da utilização de uma bomba de infusão com controle de velocidade) permite infundir meio de cultura RPMI (com Heparina 10 mg/L) pré-aquecido à 37 °C, que é bombeado para a aorta e as demais artérias do sistema circulatório a uma velocidade constante. Desta forma o meio de cultura passa pelas artérias mesentéricas e chega às veias mesentéricas, onde o sangue e os parasitas são empurrados pelo meio de cultura e se deslocam das veias mesentéricas e escapam pelo corte feito na veia porta, caindo na tela presa ao suporte, onde os vermes adultos ficam retidos.

3.2. Cultivo de parasitas adultos de *S. mansoni*

Os parasitas foram coletados imediatamente após processo de perfusão cardíaca, e colocados em placa de cultura, em meio RPMI (suplementado com 10 % de soro fetal bovino, Penicilina, Estreptomicina e Gentamicina).

Os vermes machos adultos, após serem separados das fêmeas, foram cultivados em meio RPMI (37 °C, CO₂ 5%) por 24 h antes da adição do TNF- α , para recuperação do estresse resultante do processo de perfusão. Eles foram tratados com a citocina a uma concentração de 20 ng/ml por 15 min (tempo estimado para a ativação da via de sinalização), 30 min e 60 min. O grupo controle foi cultivado em meio RPMI completo e tratado apenas com o veículo (Tris-HCl pH 8 10 mM). Após o tratamento, os vermes foram lavados com PBS à 4°C e imediatamente congelados em nitrogênio líquido em solução com inibidores de protease (*Protease Inhibitor Cocktail Tablets*, Roche) e fosfatases (*PhosSTOP*, Roche), e estocados à -80 °C. Os vermes destinados ao experimento de microarranjo de oligonucleotídeos, nos experimentos anteriores (Oliveira, Carvalho et al. 2009), foram estocados em solução

estabilizadora de RNA, RNALater® (Applied Biosystems), à 4 °C por 24 h e depois congelados à -20 °C.

3.3. Separação por géis bidimensionais das proteínas fosforiladas após o tratamento de machos de *S. mansoni* com TNF- α humano

3.3.1. Preparação de lisados para géis bidimensionais

Extrato total de proteína de parasitas machos adultos foram obtidos utilizando tampão de homogeneização [uréia 7 M, tiouréia 2 M, CHAPS 4%, DTT 40 mM, coquetel inibidor de protease (*Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets* 1 X concentrado - Roche,) e coquetel inibidor de fosfatases (*PhosSTOP* 1 X concentrado – Roche)]. A ruptura do tecido e lise celular foram realizadas através do uso de um homogeneizador tipo *potter* seguido por sonicação a 4 °C em 3 ciclos de 1 minuto com 1 minuto de intervalo a cada ciclo. Em seguida, as amostras foram submetidas a leve agitação utilizando agitador orbital, por 30 min a 4 °C com um protocolo adaptado de (Luo, Zhou et al. 2012). Com o objetivo de separar as proteínas de possíveis contaminantes, as amostras foram submetidas a precipitação utilizando acetona 80 % (por 4 h à -20°C), centrifugadas por 10 m a 15.000 g, solubilizadas em *DeStreak Rehydration Solution* (GE Healthcare) e quantificadas utilizando *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad) baseado no método de Bradford (Bradford 1976). A qualidade da extração e quantificação foram verificadas através de eletroforese das amostras pela técnica de SDS-PAGE, seguida de coloração com Coomassie Blue Coloidal.

3.3.2. Géis bidimensionais

A técnica de eletroforese bidimensional consiste na separação de proteínas primeiramente pelo seu ponto isoelétrico (*pI*) através da focalização isoelétrica e depois por sua massa molecular por eletroforese pela técnica de SDS-PAGE. Para este experimento foi

utilizado o sistema de 2-DE da GE e o protocolo foi otimizado seguindo as recomendações do fabricante (*GE Healthcare*).

Após a preparação das amostras (discutido acima), estas foram separadas por seu ponto isoelétrico através de focalização isoelétrica (IEF). Foram utilizadas fitas com gradiente de pH imobilizado (*Immobiline Dry Strip Gel* da *GE*) de 13 cm com uma faixa de pH de 3 a 10 e 4 a 7. Para cada fita, foi utilizada uma quantidade de 240 µg ou 800 µg de extrato total proteico de parasita, respectivamente. As fitas foram rehidratadas utilizando *DeStreak Rehydration Solution* (GE) e 1% *IPG Buffer* pH 3-10 ou 4-7 por 10 h e submetidas a três etapas de eletro-separação (500 V por 1 h, 1000 V por 1h, 8000 V por 3:30 h). Ao final do procedimento, as fitas foram equilibradas primeiramente em *SDS Equilibration Buffer Solution* (Uréia 6M, Tris-Cl pH 8.8 75 mM, glicerol 29.3 %, SDS 2 %, azul de bromofenol 0,002 %) com DTT 10 mg/ml e depois na mesma solução porém com 25 mg/ml de iodoacetamida ao invés de DTT. Após esse processo, as fitas foram transferidas para a segunda dimensão em um SDS-PAGE 12 %. A eletroforese foi executada a 100 V por cerca de 5 horas.

3.3.3. Detecção de fosfoproteínas utilizando corante fluorescente Pro-Q® Diamond (Invitrogen)

Para a detecção de proteínas fosforiladas, os géis foram fixados por 12 horas em Solução Fixadora [Metanol 50 %, Acido Acético 10 %], seguido por 3 lavagens com água ultrapura para remoção de todo o ácido acético e metanol. A detecção das fosfoproteínas se deu através de incubação dos géis por 4 horas utilizando *ProQ Diamond®* (Invitrogen), um corante fluorescente específico para fosfoproteínas, protegidos da luz sob leve agitação. Após a incubação, os géis foram descorados em Solução para Descoloração [Acetonitrila 20 %, Acetato de Sódio pH 4.0 50 mM] em 3 lavagens de 30 minutos cada, e finalmente lavados em água ultrapura por 30 minutos.

Após o processo de incubação os géis foram imediatamente levados para escaneamento para detecção das fosfoproteínas, realizado no instrumento Typhoon Trio (GE Healthcare). Foi utilizado o modo de excitação verde (canal Green, que gera imagens de

amostras coradas com corantes fluorescentes que são excitados a 532 nm, sendo usado um filtro de emissão de 580 nm).

3.3.4. Coloração com Coomassie Blue Coloidal

Os géis, após coloração com corante fosfoespecífico e obtenção das imagens, foram corados por 12 h com solução de Coomassie Brilliant Blue G-250 80 % [Coomassie Brilliant Blue 0,1 % (m/v), Ácido Orto-Fosfórico 2 % (m/v), Sulfato de Amônio 10% (m/v)] e metanol 20 %. Os géis foram lavados em solução de Ácido Acético 1 % (v/v) para remoção das partículas precipitadas de Coomassie.

3.3.5. Análise dos Géis

As imagens dos géis bidimensionais obtidas foram analisadas utilizando o programa Image Master 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare), no qual é feita a identificação automática de todos os *spots* em cada gel, são avaliados o número total de *spots* e a similaridade entre os géis, e é quantificada a porcentagem de volume de cada *spot* em relação ao volume total dos *spots* do gel. As análises estatísticas se baseiam no valor de porcentagem de volume de cada *spot*. Foram selecionados *spots* corados com corante específico para fosfoproteínas que apresentavam um aumento ou diminuição de pelo menos 1,5 vezes nas amostras tratadas em relação ao controle e/ou com $p\text{-value} < 0,05$ pelo teste estatístico t de Student, nas comparações entre as 3 réplicas. Como certificação de que quantidades iguais de proteína foram colocadas em cada gel, foi feita a análise descrita acima para os *spots* corados com *Coomassie Brilliant Blue Colloidal*.

3.3.6. Secção dos *spots* dos géis bidimensionais e preparação das amostras para análise por espectrometria de massa

Os *spots* selecionados como diferencialmente fosforilados foram excisados dos géis bidimensionais com o auxílio de um estilete. Para cada proteína, foram recortados e

combinados os *spots* dos géis referentes a cada uma das três réplicas biológicas do teste ou das três réplicas biológicas do controle, para aumentar a quantidade de proteínas que foram injetadas no espectrômetro de massa.

Os três géis de cada um dos *spots* foram colocados em um tubo *eppendoff* de 1,5 ml e enviados para análise por espectrometria de massas no INRS - Institut Armand-Frappier (*Institut National de la Recherche Scientifique*, Laval, Canadá). As amostras foram submetidas a um protocolo padronizado por aquele centro, que inclui a lavagem com NH_4HCO_3 seguida de lavagem com acetonitrila por 12 h para remoção do corante Coomassie Brilliant Blue. As amostras foram reduzidas e alquiladas utilizando DTT e iodoacetamida. Após esse processo, as proteínas dos *spots* foram digeridas no gel com a enzima tripsina (*Trypsin Gold – Mass Spectrometry Grade*, Promega) por 12 h e os peptídeos oriundos da digestão foram eluídos do gel com TFA 0.1 % em acetonitrila 60 %, liofilizados, e ressuspensos em solução de TFA 1%.

3.4. Identificação por espectrometria de massas das proteínas

Os espectros de massa foram obtidos utilizando espectrômetro de massa tipo *Linear Ion Trap Quadrupole LC/MS/MS* (AB Applied Biosystems, MDS SCIEX Instruments) equipado com fonte de *nano-electrospray ionization* (nanoESI). A junção de dados gerados pelo MS/MS foi realizada com o programa Software Analyst, versão 1.4 (AB Applied Biosystems, MDS SCIEX Instruments). Mascot Distiller (Matrix Science) foi usado para criar listas de picos dos dados brutos de MS e MS/MS. O programa MASCOT MS/MS *Ion Search* (Perkins, Pappin et al. 1999) foi utilizado para realização da busca das sequências utilizando BLAST contra o banco de dados do NCBI nr. Apenas foram considerados peptídeos cuja significância fosse de $p < 0,05$. Os outros parâmetros usados para a busca foram: enzima tripsina; modificações variadas – Carbamidomethyl (C), Phospho (ST), Phospho (Y), *Max Missed Tolerance* 1; *Fragment* ou *Mass Tolerance* $\pm 1,5$ Da; *Max Missed Cleavages* 1. O

critério utilizado para aceitar a identificação das proteínas foi baseado na cobertura de sequência, número de peptídeos identificados e o *score* de probabilidade.

4. RESULTADOS

4.1. Detecção em géis bidimensionais de proteínas diferencialmente fosforiladas após o tratamento de machos adultos de *S. mansoni* com TNF- α humano

A detecção da alteração de expressão de genes sob o tratamento com TNF- α , a presença de um gene homólogo do receptor de TNF- α no parasita, e a identificação dos potenciais elementos de sinalização da via da citocina (Oliveira, Carvalho et al. 2009) haviam sugerido que poderia ocorrer a ativação de uma via de sinalização, através da interação da citocina do hospedeiro com o receptor do parasita, como discutido na Introdução. Como consequência, a ativação da via de sinalização causaria alterações pós-traducionais de fosforilação em proteínas alvos da cascata de quinases da via de sinalização ativada, e a caracterização destas alterações foi o principal objeto de estudo deste trabalho.

Para alcançar tal objetivo, foi utilizada a técnica de fosfoproteômica através de géis bidimensionais corados com corante específico para fosfoproteínas para indicar possíveis proteínas serina-treonina quinases e também proteínas-alvo que aumentassem ou diminuíssem sua fosforilação sob a presença da citocina.

Por questões de natureza logística, fizemos os estudos somente com vermes adultos machos, deixando para uma ocasião posterior a análise em fêmeas.

Os machos adultos de *S. mansoni* foram mantidos em cultura por 24 h após processo de perfusão, e tratados com TNF- α humano recombinante por 15 min a uma concentração de 20 ng/ml, a mesma concentração de citocina utilizada nos experimentos que detectaram alteração no perfil de expressão gênica em parasitas adultos (Oliveira, Carvalho et al. 2009). Foram realizados três experimentos independentes (três réplicas biológicas de vermes tratados com a citocina e três com veículo - controle).

Após o tratamento, foram preparados lisados de parasitas como descrito em Materiais e Métodos, as proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford 1976) e

submetidas à eletroforese tipo SDS-PAGE. Posteriormente o gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue* para verificação tanto da qualidade de extração (integridade das proteínas extraídas) como da quantificação. Os resultados obtidos são ilustrados na Figura 8.

Figura 8. Avaliação da qualidade dos extratos totais de proteínas de parasitas machos adultos de *S. mansoni* utilizados nos géis bidimensionais. Amostras T (de parasitas tratados com TNF- α humano recombinante) e C (controle) foram resolvidas em SDS-PAGE seguido de coloração por *Coomassie Brilliant Blue*.

A prévia verificação da quantificação e integridade das amostras a serem utilizadas nos géis bidimensionais é extremamente importante para realização da análise comparativa dos mesmos. Posteriormente, cada uma das amostras foi submetida à focalização isoeletrica seguida de eletroforese em SDS-PAGE. Os géis bidimensionais foram primeiramente corados com ProQ-Diamond[®], corante específico para proteínas fosforiladas, com o objetivo de analisar quais *spots* possuíam alteração de intensidade estatisticamente significativa (teste t de Student, $p\text{-value} < 0,05$) quanto ao perfil de fosforilação das proteínas de parasitas submetidos a tratamento com TNF- α humano comparado aos controles. Após serem lavados, os mesmos géis foram corados com *Coomassie Blue* Coloidal, corante para proteínas totais, para visualização de todos os *spots* de proteínas do gel, e secção de alguns destes para serem submetidos à espectrometria de massas para a identificação das proteínas contidas.

Todos os géis bidimensionais foram feitos simultaneamente para evitar possíveis variações experimentais que pudessem interferir nos resultados das réplicas.

Inicialmente, realizamos géis bidimensionais utilizando uma fita de pH imobilizado na faixa de 3 a 10 de 13 cm, para padronização da técnica, como mostrado na imagem representativa de um dos experimentos, na Figura 9.

Figura 9. Detecção por eletroforese bidimensional de proteínas fosforiladas pelo tratamento de parasitas por 15 min com TNF- α humano (20ng/ml) ou com veículo (controle). Imagem representativa de géis bidimensionais de amostras vermes adultos machos resolvidas em fita de *pH* imobilizado de 3 a 10 de 13 cm. Nos painéis **A** e **B** estão representadas amostras de vermes tratados apenas com o veículo (Tris-Cl 10 mM) em gel corado com *Coomassie Blue Coloidal* e *Pro-Q Diamond*, respectivamente. Nos painéis **C** e **D** estão representadas amostras de vermes tratados com TNF- alfa humano recombinante em gel corado com *Coomassie Blue Coloidal* e *Pro-Q Diamond*, respectivamente.

Após a padronização da técnica em nosso modelo, realizamos géis bidimensionais utilizando fita de pH imobilizado de 4 a 7 de 13 cm, pois observamos que a maioria das proteínas fosforiladas se encontrava nessa faixa de pH. A escolha da fita de pH 4 a 7 teve o

intuito de melhorar a resolução e também o enriquecimento dos géis com fosfoproteínas através da adição de maior quantidade de extrato total proteico.

Após a coloração com corante específico para fosfoproteínas e a análise das imagens, foram observados em média 191 *spots* entre as réplicas biológicas do vermes adultos machos tratados com TNF- α humano, enquanto na condição controle foram observados em média 190 *spots*. Após a coloração dos géis bidimensionais com Coomassie Coloidal, corante de proteínas totais, foram detectados em média 266 *spots* entre as réplicas biológicas das duas condições experimentais (tratados e controles).

Após análise, foram selecionados *spots* que apresentavam uma fosforilação de pelo menos 1,5 vezes maior após o estímulo com a citocina, ou *p-value* <0,05 no teste estatístico t de Student, e que estivessem presentes nas três réplicas biológicas de uma condição (tratado ou controle). As Figuras 10 e 11 ilustram um resultado representativo, e mostram os *spots* marcados e numerados.

Foram detectados 45 *spots* com alteração significativa na fosforilação modulada pelo tratamento de vermes machos adultos com TNF- α humano. Destes, 42 possuem fosforilação aumentada e três *spots* fosforilação diminuída com o tratamento. Estes *spots* foram seccionados dos géis e enviados para identificação por LC-MS/MS.

4.2. Identificação de proteínas por espectrometria de massas

Todos os 45 *spots* de proteínas detectadas como diferencialmente fosforiladas foram enviados para serem identificados por espectrometria de massas. Tanto as amostras tratadas com TNF- α quanto as amostras controle foram analisadas por espectrometria de massas. Esta abordagem permitiu a identificação de 33 proteínas nos 45 *spots* conforme é listado na Tabela 1. Cada *spot* numerado gerou na espectrometria de massas a identificação da mesma proteína, tanto nas amostras tratadas com citocina quanto nas contrôles. Os outros 11 *spots* não foram identificados devido, principalmente, a baixa quantidade de proteína enviada para análise por

espectrometria de massas e também pela presença de queratina em alguns deles (possível contaminação). A identificação de cada *spot* foi obtida considerando o maior *score* calculado pela análise do MASCOT (Perkins, Pappin et al. 1999) em cada *spot* diferencialmente fosforilado entre as duas condições. O MASCOT calcula o *score* através da probabilidade de que o pareamento observado seja um evento ao acaso, dada a identidade entre as sequências e o tamanho do banco de sequências usado na busca. Foram selecionadas as proteínas que apresentaram um *score* mínimo de 67 recomendado pelo programa.

A tabela 1 também descreve a porcentagem de cobertura referente a cada uma das proteínas identificadas, o número de fragmentos de sequências significantes para cada proteína identificada, a massa molecular teórica e experimental, a média da razão do volume relativo dos *spots* referentes a parasitas tratados com a citocina comparados com os controles, além de uma análise de predição de sítios de fosforilação utilizando o NetPhos 2.0 Server (Blom, Gammeltoft et al. 1999). Esta análise foi realizada porque a técnica de espectrometria de massas especificamente não nos permitiu a identificação de qual resíduo (fosfoserina, fosfotreonina ou fosfotirosina) está fosforilado.

A Figura 12 mostra o volume relativo de cada um dos *spots* que mostraram fosforilação aumentada após tratamento dos parasitas com TNF- α comparado com seus respectivos controles, com dados quantitativos extraídos das análises das três réplicas de cada condição (tratado ou controle), a partir das imagens de géis similares aos mostrados na Figura 10.

Figura 10. Detecção com corante específico para fosfoproteínas de proteínas fosforiladas em amostras de parasitas tratados por 15 min com TNF- α humano (20 ng / ml) ou com veículo (controle). Imagem representativa de uma das réplicas de géis bidimensionais de extrato total de proteínas de vermes machos de *S. mansoni* tratados com veículo Tris-HCl 10 mM (esquerda) ou com TNF- α (direita). Ambos os géis foram revelados com Pro-Q Diamond, corante específico para fosfoproteínas.

Figura 11. Detecção com corante Coomassie Blue Coloidal das proteínas totais presentes nas amostras de parasitas tratados por 15 min com TNF- α humano (20 ng/ml) ou com veículo (controle). Imagem representativa de uma das réplicas de géis bidimensionais de extrato total de proteína de vermes machos de *S. mansoni* tratados com veículo Tris-HCl 10 mM (esquerda) ou com TNF- α (direita). Ambos os géis foram revelados com Coomassie Blue Coloidal.

Tabela 1. Identificação através de espectrometria de massas de proteínas de *S. mansoni* detectadas por eletroforese bidimensional como significativamente diferencialmente fosforiladas em parasitas tratados com TNF- α humano recombinante.

Spot ID	Proteína	Gene	% Cobertura	Sequências Significantes	Score	Teórico		Experimental		Processo Biológico	Sítios de fosforilação preditos			Razão T/C
						MW (kDa)	pI	MW (kDa)	pI		Ser	Thr	Tyr	
13	Gelsolin	Smp_008660.1	35%	3	547	41.68	5.57	48.48	5.69	Cytoskeleton organization	13	4	5	3,65
20	Myosin Regulatory Light Chain	Smp_00132670.1	26%	8	390	22.7	4.84	21.1	4.69	Muscle Contraction	6	2	2	1,78
22	Proteasome Subunit Alpha 3 (T01 family)	Smp_092280	40%	10	571	28.06	4.89	24.56	7.79	Proteolysis	4	0	3	2,54
35	Lamin	Smp_159900	2%	6	285	217.95	5.87	75.15	5.96	Nucleus organization, Mitotic cell cycle	128	34	23	2,62
39	PREDICTED: similar to Actin-87E isoform 2 [<i>T. castaneum</i>]	LOC656991	31%	6	292	37.8	5.36	57.98	5.45	Muscle Contraction/ Cytoskeleton organization	7	8	6	2,18
40	PREDICTED: similar to Actin-87E isoform 2 [<i>T. castaneum</i>]	LOC656991	31%	7	383	37.8	5.36	48.92	5.5	Muscle Contraction/ Cytoskeleton organization	7	8	6	2,95
41	Major egg antigen	Smp_049240	13%	3	149	39.4	6.23	44.33	6.47	-	16	2	3	1,82
42	UDP-glucose 4-epimerase	Smp_070780	38%	10	633	38.99	5.85	40.54	6.07	Metabolic Process	7	2	10	4,53

Spot ID	Proteína	Gene	% Cobertura	Sequências Significantes	Score	Teórico		Experimental		Processo Biológico	Sítios de fosforilação preditos			Razão T/C
						<i>MW (kDa)</i>	<i>pI</i>	<i>MW (kDa)</i>	<i>pI</i>		<i>Ser</i>	<i>Thr</i>	<i>Tyr</i>	
43	Arginase	Smp_059980	13%	3	273	39.89	5.72	48.48	5.93	Metabolic Process	4	5	2	2,69
45	Aldehyde Dehydrogenase	Smp_050390	63%	19	1440	53.72	5.76	64.55	5.93	Metabolic Process	8	9	5	4,48
46	Aldehyde Dehydrogenase	Smp_050390	5%	6	438	53.72	5.76	66.31	6.22	Metabolic Process	8	9	5	22,69
47	Enolase	Smp_024110	61%	14	1270	46.96	6.18	54.95	6.52	Metabolic Process	6	4	2	15,69
49	Aldehyde Dehydrogenase	Smp_050390	59%	10	1254	53.72	5.76	64.55	6.07	Metabolic Process	8	9	5	3,03
50	L-lactate Dehydrogenase	Smp_033040	3%	1	75	35.69	6	40.18	5.86	Metabolic Process	8	3	4	2,17
51	Actin-1 [A. castellanii]	-	17%	1	161	41.7	5.3	61.73	5.15	Muscle Contraction	10	5	7	2,37
52	Tubulin subunit beta	Smp_030730	19%	2	370	46.03	4.73	63.97	4.85	Cytoskeleton organization	9	8	6	1,93
53	Set	Smp_155060.2	22%	1	283	29.27	4.25	40.18	4.04	DNA replication, Mitotic cell cycle	11	3	1	8,18
54	Lamin	Smp_159900	2%	5	815	217.95	4.79	82.19	6.03	Nucleus organization, Mitotic cell cycle	128	34	23	3,59
55	T-complex protein 1 subunit α	Smp_017360	17%	2	467	60.04	5.96	72.51	6.09	Protein Folding	13	2	4	1,36
56	Kinesin light chain, putative	Smp_000040	5%	1	149	47.12	7.12	71.86	5.97	Intracellular protein transport	11	4	9	2,56
58	Gelsolin	Smp_008660	24%	1	380	41.68	5.57	48.05	5.56	Cytoskeleton organization	13	4	5	5,58

Spot ID	Proteína	Gene	% Cobertura	Sequências Significantes	Score	Teórico		Experimental		Processo Biológico	Sítios de fosforilação preditos			Razão T/C
						<i>MW (kDa)</i>	<i>pI</i>	<i>MW (kDa)</i>	<i>pI</i>		<i>Ser</i>	<i>Thr</i>	<i>Tyr</i>	
59	Prohibitin, putative	Smp_075940	12%	1	180	23.11	4.77	29.11	6.02	DNA biosynthetic process	6	4	1	4,7
60	Prohibitin, putative	Smp_075940	37%	3	348	23.11	4.77	27.56	5.99	DNA biosynthetic process	6	4	1	5,72
61	Annexin	Smp_045560	38%	4	587	36.86	5.96	31.55	6.25	-	13	5	2	2,83
67	Troponin T Invertebrate	Smp_179810	25%	6	572	37.41	5.89	45.54	5.81	Muscle Filament Sliding	7	4	3	16,75
68	14-3-3 epsilon 2	Smp_002410	36%	2	470	28.41	5.2	27.59	4.97	Intracellular Signal Transduction	11	4	3	22,73
69	Actin	Smp_161920	47%	5	711	41.71	5.3	48.05	5.46	Muscle Contraction	10	5	7	17,98
70	camp-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit	Smp_079010	18%	5	310	42.96	5.12	51.61	4.95	Signal Transduction, Regulation of protein phosphorylation	10	9	5	2,14
71	Gelsolin	Smp_008660.1	54%	6	1038	39.86	6.38	52.54	6.33	Cytoskeleton organization	14	4	5	7,03
72	Enolase	Smp_024110	38%	7	865	46.96	6.18	52.54	6.17	Metabolic Process	6	3	2	3,44
74	ATP Synthase Beta Subunit	Smp_038100	28%	6	698	55.8	5.22	58.5	4.84	ATP Biosynthetic Process	13	8	2	1,68
77	ATP Synthase Beta Subunit	Smp_038100	62%	13	1496	55.8	5.22	58.5	4.9	ATP Biosynthetic Process	13	8	2	3,48
78	PREDICTEDsimilar to Actin-87E isoform 2 [<i>T. castaneum</i>]	LOC656991	32%	1	279	37.8	5.36	52.54	5.15	Muscle Contraction	7	8	6	3,15

Figura 12. Aumento da fosforilação de proteínas de *S. mansoni* após tratamento com TNF- α . Volume Relativo de cada *spot* comparado com o volume total de *spots* em cada gel, medido entre as três réplicas biológicas de parasitas tratados por 15 min com TNF- α (20ng/ul) ou com veículo (grupo controle) (p -value < 0,05, teste- t). A identidade de cada *spot* foi obtida por espectrometria de massas, como mostrado na Tabela 1. A quantificação de cada *spot* foi extraída de imagens de géis similares aos da Figura 10, corados para fosfoproteínas. As barras em cinza representam a média do volume de cada *spot* entre as três réplicas biológicas do grupo controle, enquanto as barras em preto representam a média do volume de cada *spot* entre as três réplicas biológicas do grupo tratado com a citocina.

4.3. Anotação funcional das proteínas identificadas

Para melhor compreender a função biológica das 33 proteínas identificadas como sendo moduladas pelo TNF- α humano em vermes machos adultos de *S. mansoni*, foi realizada uma anotação da Ontologia Gênica (Ashburner, Ball et al. 2000) para cada uma das proteínas observadas na tabela 1. As ontologias associadas a cada proteína presente na Tabela 1 foram anotadas a partir do banco de dados do Uniprot (2014) e estão associadas ao número de acesso de cada proteína neste banco. Na Figura 13 podemos observar a distribuição de frequências da categorização das proteínas encontradas.

Figura 13. Classificação funcional de proteínas de *S. mansoni* que sofreram aumento de fosforilação após tratamento dos parasitas com TNF- α por 15 min. As proteínas foram classificadas a partir do Processo Biológico do qual participam. As categorias de GO (Ashburner, Ball et al. 2000) foram anotadas a partir do banco de dados UNIPROT(2014).

Na análise da distribuição funcional das proteínas encontradas, observamos que há uma maior quantidade de proteínas envolvidas em processos metabólicos, como glicólise, metabolismo de galactose, ciclo da uréia e oxidação de aldeídos (37%), seguido de proteínas

envolvidas em contração muscular (21%), proteínas pertencentes ao citoesqueleto (18%), envolvidas na organização nuclear (6%) ou envolvidas em sinalização celular (6%).

5. DISCUSSÃO

O papel da citocina humana TNF- α na biologia do parasita *S. mansoni*, até então, nunca foi explorado do ponto de vista de sinalização celular. Há poucos trabalhos que descrevem o efeito da citocina e os trabalhos publicados até o momento descrevem a influência do TNF- α principalmente na quantificação da postura de ovos em fêmeas e na formação de granulomas no fígado. Oliveira e cols. (Oliveira, Carvalho et al. 2009) caracterizaram o gene que codifica uma proteína que possui alta similaridade com os receptores tipo TNFR, que possui domínios ricos em cisteína conservados característicos desta família. Além disso, no mesmo trabalho, avaliou-se o efeito *in vitro* da citocina humana no perfil de expressão gênica de parasitas adultos pareados e esquistossômulos após 3 h de transformação *in vitro*.

Aquele foi o primeiro trabalho que demonstrou que tanto parasitas adultos quanto esquistossômulos respondem ao tratamento com TNF- α através da alteração da expressão de diversos genes (Oliveira, Carvalho et al. 2009), sendo muitos deles relacionados à regulação de expressão gênica, crescimento celular e proliferação, sustentando a hipótese de que a citocina humana possivelmente atue sobre o desenvolvimento do parasita.

A partir deste ponto surgiu o interesse em estudar e identificar quais moléculas estão envolvidas no processo de transdução de sinal e o efeito desta cascata de sinalização quando ativada, objetivo principal desta dissertação.

TNF- α é um dos principais mediadores da resposta inflamatória, e é produzido por macrófagos e monócitos durante o processo inflamatório agudo. Em nível celular, regula diversos processos como apoptose, diferenciação e proliferação celular (Gaur and Aggarwal 2003). Esta citocina em humanos atua através do estímulo de dois receptores diferentes – TNFR1 e TNFR2 (Wajant, Pfizenmaier et al. 2003). Ao se ligar a um de seus receptores, o TNF- α induz a trimerização destes, evento essencial para a iniciação da sinalização. O parasita *S. mansoni* (Oliveira, Carvalho et al. 2009) possui um gene homólogo ao TNFR2, a

isoforma do gene humano que não possui *death domain* em sua porção citosólica e, portanto, não é capaz de ativar respostas que levam a mecanismos de ativação de apoptose. Sob o estímulo de TNF- α , TNFR2 em humanos inicia uma cascata de sinalização que envolve o recrutamento de TRAF2 e ativação de vias de MAP quinases e da via do NF- κ B, culminando na ativação de diversos fatores de transcrição e da expressão gênica (Baud and Karin 2001; Wajant and Scheurich 2001). Fazendo uma busca no genoma do parasita, não identificamos moléculas homólogas presentes na via que ativa o NF- κ B, nos levando a hipotetizar que o TNF- α em *S. mansoni* atuaria através de ativação das vias das MAP quinases (Oliveira, Carvalho et al. 2009). Ao associar-se com TRAF2, em humanos há a ativação de MAPKK, que, por sua vez, ativa JNKK que leva a ativação de JNK por fosforilação. Esta proteína leva à fosforilação do fator de transcrição c-JUN no núcleo (Pelech and Sanghera 1992; Zhao, Conze et al. 2007; Faustman and Davis 2010; Naude, den Boer et al. 2011; Cabal-Hierro, Rodriguez et al. 2014).

Visto que a sinalização por TNF- α é controlada por uma cascata de diversas proteínas quinases, utilizamos uma abordagem de análise de fosfoproteoma para identificar possíveis proteínas que poderiam participar da via de sinalização induzida por esta citocina no parasita, mas também principalmente identificar os demais alvos que seriam fosforilados pela ativação da via de sinalização. Para este fim, utilizamos a técnica de separação de proteínas por eletroforese em géis bidimensionais seguida de coloração dos géis utilizando um corante específico para fosfoproteínas. Esta abordagem nos permitiu observar quais proteínas aumentavam ou diminuam sua fosforilação após o tratamento com TNF- α . As proteínas detectadas como estatisticamente diferencialmente fosforiladas foram identificadas utilizando a técnica de espectrometria de massas.

A utilização de géis bidimensionais combinado com o uso de corante específico para fosfoproteínas seguido de identificação de proteínas por espectrometria de massas é uma

abordagem promissora e amplamente utilizada. O uso desse corante fornece uma visão global e direta das proteínas fosforiladas, em contraste com o uso de anticorpos.

Entretanto, é necessário ter em mente que a sinalização celular possui quatro características gerais: especificidade, amplificação, adaptação e integração (Li and Qian 2003). Neste contexto é importante considerar a relativa baixa abundância dos primeiros elementos da via de sinalização e a maior abundância dos elementos a jusante e outras proteínas alvos fosforiladas. Também é necessário considerar a integração de outras vias de sinalização à via acionada pelo SmTNFR e efeitos secundários (adaptação) decorridos do tempo de exposição ao sinal; embora a exposição do parasita ao TNF- α humano ocorreu por somente 15 minutos é difícil prever qual o tempo ideal para avaliar a ação primária da citocina sobre a via de sinalização e proteínas correlacionadas.

A abordagem experimental utilizada nos permitiu identificar 45 proteínas diferencialmente fosforiladas, sendo que 42 possuíam fosforilação aumentada, e 3 diminuída pelo TNF- α humano. Através da abordagem de espectrometria de massas foram identificadas 33 destas proteínas. Não foi possível a identificação das proteínas hipotetizadas como pertencentes à via de sinalização por SmTNFR, mas apenas proteínas-alvo finais. Isso pode ser explicado pelo fato da técnica não ser sensível o suficiente para detectar proteínas que não são abundantes, e pelos motivos mencionados anteriormente; além disso, foram utilizados vermes adultos inteiros para a realização dos experimentos, e isto dificulta detectar a sinalização que seja órgão- ou tecido-específica, o que provavelmente ocorre no parasita. Esta caracterização tecido-específica em *S. mansoni* no momento é tecnicamente muito difícil de ser abordada. A abordagem de utilizar vermes adultos inteiros causa uma diluição da detecção dos elementos tecido-específicos, entretanto é uma das abordagens experimentais mais utilizadas no momento pela comunidade científica.

Experimentos de hibridização *in situ* de nosso grupo, ainda não publicados, mostram que o SmTNFR está presente em órgãos do parasita como ovário e vitelarium de fêmeas, testículos de machos, gânglios nervosos e no parênquima do parasita. Experimentos de imunolocalização, também ainda não publicados, sugerem a presença do receptor na superfície do parasita, mas estes dados necessitam ser confirmados. Possivelmente nem todas as células do parasita são responsivas ao estímulo do TNF- α humano adicionado na cultura de vermes adultos inteiros, tornando difícil a identificação de moléculas envolvidas diretamente na via de sinalização que não são abundantes. Este dados ressaltam que será interessante utilizar esta mesma abordagem num estudo órgão específico. Recentemente, protocolos para o isolamento de órgãos como ovário e testículo estão sendo desenvolvidos e será possível realizar uma abordagem mais tecido específica (Hahnel, Lu et al. 2013).

As 45 proteínas identificadas com sua fosforilação modulada por esta citocina possivelmente estão envolvidas em processos celulares, resultantes da sinalização pelo TNF- α , indicando que esta citocina é capaz de ativar sua via de sinalização em um período de 15 min e que, neste tempo, já estamos observando os efeitos desta molécula no parasita.

A análise das ontologias das 33 proteínas identificadas demonstrou uma porcentagem expressiva de proteínas envolvidas em processos metabólicos (37%), contração muscular (21%), citoesqueleto (18%) e sinalização (6%). A seguir discutiremos as proteínas envolvidas nestas categorias funcionais.

5.1. Proteínas envolvidas na via glicolítica que possuem fosforilação aumentada após tratamento do *S. mansoni* com TNF- α humano

Os vermes adultos de *S. mansoni* residem dentro das veias mesentéricas onde importam açúcar diretamente do sangue, através de transportadores de glicose presentes no seu tegumento. O consumo de glicose para manutenção é tão grande que chegam a consumir a cada 5 horas o seu peso seco deste carboidrato (Bueding 1950; Schiller, Bueding et al. 1975).

Neste estágio, apesar de possuírem mitocôndrias funcionais capazes de realizar a fosforilação oxidativa, a maior parte do catabolismo da glicose é via fermentação láctica de forma que o piruvato formado após a glicólise é reduzido a lactato

Em nosso fosfoproteoma identificamos que a maior parte das proteínas que tiveram fosforilação estimulada após o tratamento com TNF- α participam de vias metabólicas, especialmente metabolismo da glicose. Entre essas proteínas pode-se destacar a L-lactato desidrogenase e a enolase.

A enolase, também conhecida como fosfopiruvato hidratase, é uma proteína muito expressa no citosol de diversos organismos. É encontrada em diversos organismos, desde arqueobacterias até vertebrados, e sua sequência é altamente conservada (Piaś, Kustrzeba-Wojcicka et al. 2005). É uma importante enzima da via glicolítica que catalisa a conversão reversível do 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato, na penúltima reação da glicólise. Por ser um metaloenzima, requer Mg^{2+} para sua ativação. Além da sua função na via glicolítica, participa de diversos outros processos celulares como regulação da morfologia celular e tráfego através de interação com proteínas do citoesqueleto. Também já foi encontrada no núcleo de *Toxoplasma gondii* participando na regulação transcricional de genes envolvidos em proliferação celular (Mouveaux, Oria et al. 2014).

A enolase também foi descrita como sendo presente na superfície celular de diversos organismos patogênicos e não patogênicos. Por exemplo, foi demonstrado que as enolases de superfície em organismos patogênicos como *Bacillus anthracis* constituem um importante fator de virulência (Agarwal, Kulshreshtha et al. 2008). Em parasitas Apicomplexos, como *Plasmodium spp.*, é sugerido que essas enolases de superfície participam do processo de invasão tecidual (Avilan, Gualdron-Lopez et al. 2011). Curiosamente, há estudos de proteômica de tegumento de *S. mansoni* e *S. bovis* que também encontraram esta proteína na superfície de vermes adultos, que possivelmente desempenham um papel na inibição de

formação de coágulos durante a infecção (Braschi, Curwen et al. 2006; Perez-Sanchez, Valero et al. 2008). Este pode ser um mecanismo de evasão do parasita sobre a resposta de seu hospedeiro que é ativado pelo TNF- α do próprio hospedeiro.

Poucos trabalhos descrevem a influência da fosforilação na atividade da enolase. Como exemplo temos o trabalho de (Nettelblad and Engstrom 1987) que descreveram que enolase é fosforilada *in vitro* pela PKC em músculo de coelhos, e que esta alteração afeta a cinética enzimática da reação por ela catalisada, onde a fosforilação da enolase resulta na estimulação da conversão do 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato.

Em nosso proteoma, encontramos dois *spots* referentes a enolase, 47 e 72, com *pI* e massas diferentes, podendo sugerir a existência de mais de uma isoforma desta proteína em *S. mansoni* como é encontrado em humanos .

Outra enzima da via glicolítica encontrada em nosso fosfoproteoma que nos chamou atenção foi a L-Lactato desidrogenase. Esta enzima catalisa a conversão do piruvato a lactato durante a glicólise. Este é o último passo da glicólise que permite a regeneração de NAD⁺ necessária como aceptor de elétrons para manter o catabolismo anaeróbico da glicose citoplasmática. Já foi demonstrado que a fosforilação desta proteína humana em resíduos específicos de tirosina (Y10 e Y83) aumenta sua atividade, sua tetramerização e ligação ao seu substrato NADH (Fan, Hitosugi et al. 2011).

Como dito anteriormente, os vermes adultos de *S. mansoni* possuem um metabolismo de degradação da glicose majoritariamente via fermentação láctica. É bastante interessante que duas enzimas essenciais dessa via estejam sendo fosforiladas após tratamento com TNF- α . Apesar de detectarmos aumento da fosforilação, não podemos afirmar que esta via esteja sendo de fato estimulada pela citocina e produzindo mais lactato, ativando a glicólise. Estudos demonstraram que a lactato desidrogenase tem maior nível de fosforilação em *Trachemys scripta elegans* quando em ambiente anóxico (Xiong and Storey 2012), o que

sugere que a via glicolítica está deslocada na geração de lactato pela sinalização do TNF- α humano. Seriam necessários estudos que demonstrassem que há um maior aumento do consumo de glicose e formação de piruvato - lactato após o tratamento, como por exemplo experimentos de incorporação de glicose ou formação de piruvato e lactato para confirmar esta hipótese. A Figura 14 demonstra de quais etapas da via glicolítica as duas enzimas discutidas acima fazem parte.

Figura 14. Mapa metabólico da via glicolítica em *S. mansoni*. As proteínas em verde representam proteínas que estão presentes no genoma do parasita. Circuladas em vermelho, estão as duas enzimas encontradas em

nosso fosfoproteoma que tiveram fosforilação aumentada após tratamento de 15 min com a citocina TNF- α . Mapa obtido do banco de dados KEGG (Ogata, Goto et al. 1999)

Outra enzima importantíssima para ser destacada é a ATP sintase. Em nosso fosfoproteoma encontramos a subunidade beta da ATP sintase como possuindo fosforilação aumentada após o tratamento com TNF- α . A ATP sintase promove a síntese de ATP utilizando o gradiente de H⁺ gerado pelo transporte de elétrons pela membrana interna da mitocôndria, na cadeia de transporte de elétrons, num processo conhecido como fosforilação oxidativa.

Procurando na literatura, há poucos estudos que demonstram a fosforilação da subunidade beta da ATP sintase e a influência dessa alteração na fosforilação oxidativa. No trabalho de (Hojlund, Wrzesinski et al. 2003) foi demonstrado por análise proteômica que a subunidade beta da ATP sintase humana é regulada por fosforilação em diversos sítios. Neste artigo os autores sugerem que estas fosforilações podem estar envolvidas na atividade catalítica da F₁-ATP sintase devido a recentes observações de que a proteína 14-3-3, também encontrada em nosso fosfoproteoma, encontra-se associada com a ATP sintase mitocondrial em plantas de forma dependente de fosforilação, e que essa interação diminui drasticamente a atividade da ATP sintase (Bunney, van Walraven et al. 2001).

Estudos com mutantes da subunidade beta da ATP sintase em *S. cerevisiae* demonstraram que a perda de determinados sítios de fosforilação causaram diminuição da atividade ATPase da proteína ou alteraram a formação/manutenção dos dímeros no complexo F₁F₀ ATP sintase (Kane, Youngman et al. 2010).

Se de fato ocorre um mecanismo de regulação por fosforilação em *S. mansoni*, podemos hipotetizar que o TNF- α poderia induzir uma inibição da fosforilação oxidativa, favorecendo o metabolismo anaeróbico.

Outra proteína interessante que encontramos como sendo modulada por TNF- α é a enzima arginase envolvida na reação final do ciclo da uréia. É bem interessante esta

observação, uma vez que o aumento da captação de tirosina induzida por TNF- α já foi descrito por (Haseeb 1998), e isto sugere que em geral o metabolismo oxidativo de aminoácidos pode estar aumentado.

5.2. Proteínas envolvidas em sinalização celular que possuem fosforilação aumentada após tratamento do *S. mansoni* com TNF- α humano

Apesar das limitações da técnica que usamos para identificar os elementos canônicos de sinalização direta da via do TNF- α , como mencionamos anteriormente, conseguimos identificar duas moléculas bastante interessantes que participam em processos de sinalização celular.

A proteína 14-3-3, identificada no *spot* 68, pertence a uma família de proteínas envolvidas em diversos processos de sinalização celular. Elas são proteínas altamente conservadas expressas em todas células eucarióticas, de levedura a mamíferos (Fu, Subramanian et al. 2000; Tzivion, Shen et al. 2001; Tzivion and Avruch 2002). Em *S. mansoni* foram descritas duas isoformas da 14-3-3 (Schechtman, Winnen et al. 2001; McGonigle, Loschiavo et al. 2002).

Estas proteínas 14-3-3 se ligam a motivos contendo fosfoserina/fosfotreonina de uma forma sequência-específica. Os efeitos sob suas moléculas alvo podem ser divididos em 3 categorias – mudança conformacional, oclusão física de sequências específicas e ancoragem (Bridges and Moorhead 2005). Possuem função essencial na regulação de uma variedade de processos biológicos. Dentre eles pode-se destacar progressão do ciclo celular, alterações transcricionais e resposta celular a stress. Já foram descritas mais de 150 proteínas que interagem *in vivo* com as 14-3-3. Dentre elas há diversas proteínas envolvidas em sinalização celular como Raf, fostatidilinositol 3 quinase, PKC, ASK-1, MAPKs e AKT (Roy, McPherson et al. 1998; Van Der Hoeven, Van Der Wal et al. 2000; Xing, Zhang et al. 2000; Dong, Kang et al. 2007; Thandavarayan, Watanabe et al. 2008; Chung, Okamoto et al. 2009).

As 14-3-3 podem ser também fosforiladas em diversos resíduos. Esta regulação está diretamente relacionada à sua dimerização. A fosforilação em resíduos específicos das diferentes isoformas de 14-3-3 inibe sua capacidade de se dimerizar. A sua conformação monomérica ou dimérica influencia na sua capacidade de ligar às suas proteínas alvo, determinando sua participação em processos celulares distintos como proliferação ou indução de apoptose (Woodcock, Murphy et al. 2003).

O interesse nestas proteínas provém do fato delas participarem diretamente de vias de transdução de sinal. Apesar de não ser possível compreender suas função na vida de sinalização via SmTNFR, ou com quais moléculas ela interage, o fato dela ser modulada sob o estímulo de TNF- α humano indica que ela participa deste processo de sinalização, o que aponta para o interesse de se estudar o papel desta proteína nesta via de sinalização que aparentemente teria sua atividade diminuída por fosforilação.

A outra proteína envolvida em sinalização celular mostrada como sendo fosforilada em *S. mansoni* após estímulo de TNF- α humano foi a proteína quinase dependente de AMPc tipo II – subunidade regulatória alfa. Esta proteína é uma das subunidades componentes da PKA, uma fosfoserina-treonina quinase que é ativada por AMPc. Esta enzima é formada por duas subunidades: uma reguladora (R), com alta afinidades por AMPc, e outra catalítica (C). Na ausência de AMPc, a subunidade C torna-se inativa por formar um complexo tetramérico composto por duas subunidades regulatórias e duas catalíticas. A ligação do AMPc à subunidade R induz mudanças conformacionais no arranjo, resultando na dissociação da enzima inibida. Assim, a subunidade catalítica fica livre para fosforilar seus alvos (Akamine, Madhusudan et al. 2003). Em ratos, a fosforilação da Ser 96 da subunidade regulatória RII altera sua afinidade com proteínas ancoradoras da PKA (AKAPs) e a afinidade com a subunidade catalítica, afetando a fosforilação dos substratos pela PKA (Manni, Mauban et al. 2008).

A PKA, através da fosforilação de substratos, participa de diversos processos celulares como regulação de efetores enzimáticos e hormonais, transcrição de genes que regulam crescimento e diferenciação celular e metabolismo (Cass, Summers et al. 1999; Liu, Verin et al. 2001; Zambon, Zhang et al. 2005).

Andrade e cols. (Andrade, Nahum et al. 2011) analisaram o proteoma predito do parasita com objetivo de identificar e classificar todas as proteínas quinases de eucariotos presentes em *S. mansoni*, e verificaram a existência de cinco genes homólogos à subunidade catalítica da PKA, e seis predições gênicas para as subunidades regulatórias, sendo uma delas, Smp_079010, a encontrada em nosso fosfoproteoma.

Estudos *in vitro* utilizando inibidores específicos da PKA e silenciamento gênico por RNA de interferência da Smp_PKA-C em vermes adultos de *S. mansoni* demonstraram que a atividade dessa enzima é essencial para a viabilidade dos parasitas revelando sua importância em vias de sinalização intracelulares (Swierczewski and Davies 2009).

De Saram e cols. (de Saram, Ressurreicao et al. 2013), através de análise *in situ* da PKA ativa utilizando um anticorpo anti-fosfoPKA, construíram um mapa que demonstra a localização e distribuição da PKA quando ela está exclusivamente ativa. Neste estudo, a PKA encontrava-se associada ao tegumento, esôfago, musculatura somática e ventosas orais e ventrais, tanto em machos quanto em fêmeas adultas. Em macho, também foi encontrada presente nas vesículas seminais e no músculo do canal ginecofórico. A exposição dos parasitas adultos à um ativador da PKA mostrou sua ativação no sistema nervoso central e periférico, inclusive em terminações nervosas próximas a superfície. Esses dados sugerem que a PKA possui papel central nas atividades motoras e comunicação neuronal, possivelmente como um intermediário entre esses dois sistemas.

Os dados acima descritos interligando PKA com sistema motor e neurológico são bastante interessantes pois em nosso fosfoproteoma encontramos diversas proteínas relacionadas

à contração muscular, como Actina, Troponina T e Cadeira regulatória leve da Miosina que podem estar ligadas à respostas secundárias na sinalização por TNF- α nos parasitas.

5.3. Proteínas de citoesqueleto que possuem fosforilação aumentada após tratamento do *S. mansoni* com TNF- α humano

O citoesqueleto é uma estrutura dinâmica tridimensional que preenche o citoplasma e está presente tanto em células procarióticas quanto em eucarióticas. É composto principalmente por actinas, tubulina e filamentos intermediários. Possui um importante papel em diversos processos celulares como organização celular, proteção, citocinese, transporte intracelular, motilidade e proteção (Aggleton and Pearce 2001; Engqvist-Goldstein and Drubin 2003; Pollard and Borisy 2003).

Encontramos em nosso fosfoproteoma como diferencialmente fosforiladas diversas proteínas do citoesqueleto como actina, gelsolina e tubulina. A modulação por fosforilação das proteínas de citoesqueleto já foi descrita em cães e humanos (De Corte, Gettemans et al. 1997; Watanabe, Hosoya et al. 2007).

Apesar dos nossos dados serem insuficientes para determinar de qual forma essas proteínas estão sendo moduladas por fosforilação e qual o resultado dessa modulação, é interessante observar que tantas moléculas do citoesqueleto estão sendo moduladas com o tratamento, indicando que o TNF- α induz diversos processos celulares que, juntamente com os dados já discutidos anteriormente, podem indicar um caminho que deva ser estudado mais profundamente para melhor compreensão dessa citocina no parasita.

5.4. Estudo da anexina como proteína participante na internalização do receptor SmTNFR

Outra proteína interessante encontrada como sendo modulada por fosforilação pelo TNF- α em machos de *S. mansoni* foi a anexina. Anexinas fazem parte de uma família de proteínas que são capazes de se ligar à fosfolipídeos carregados negativamente na presença de

Ca^{2+} , apontando para sua função nos processos de dinâmica de membrana. Já foram descritas evidências do envolvimento da anexina 2 humana em vias de endocitose (Emans, Gorvel et al. 1993; Mayran, Parton et al. 2003; Hayes, Merrifield et al. 2004). Interessantemente, a Anexina 1 foi encontrada como sendo modulada por fosforilação sob tratamento com $\text{TNF-}\alpha$ em células humanas em cultura (Cantin, Venable et al. 2006). Além do que diversos trabalhos já descreveram a interação de anexinas com as proteínas de citoesqueleto, como a actina, proteína também identificada como modulada por $\text{TNF-}\alpha$. A fosforilação da Anexina A2 em células humanas foi descrita como sendo necessária para o rearranjo da actina que leva à mudanças de morfologia celular associadas a processo de adesão celular (Rescher, Ludwig et al. 2008).

A sinalização por $\text{TNF-}\alpha$ é regulada principalmente por um processo de internalização do receptor junto com o seu ligante. Este processo é dependente de proteínas chamadas clatrininas. Neste processo ocorre todo um rearranjo do citoesqueleto no local da formação do endossomo. A partir dos dados de fosfoproteômica, podemos hipotetizar que a fosforilação de anexinas e actina estão envolvidas no processo de formação de endossomo e rearranjo do citoesqueleto para internalização do receptor e seu ligante. Em experimentos de imunolocalização realizados pela Dr. Katia Pereira Oliveira ainda não publicados, foi possível observar o SmTNFR no citoplasma do parênquima, em compartimentos que pareciam vesículas. Além do que em experimentos de duplo-híbrido ainda não-publicados, a Dra. Katia observou que o SmTNFR interage com uma cadeia leve da dineína em *S. mansoni*, proteína envolvida no transporte de endossomos (Bananis, Nath et al. 2004), o que sustenta a hipótese de internalização do receptor e envolvimento da anexina e actina neste processo.

6. CONCLUSÕES

A interação parasita-hospedeiro é baseada na complexa relação entre estratégias de sobrevivência por parte do parasita e mecanismos de defesa por parte do hospedeiro. Neste contexto, os parasitas utilizam-se de moléculas de seu hospedeiro para promover sua sobrevivência além de modularem a resposta imune adaptativa e inata do hospedeiro.

Nosso grupo descreveu em *S. mansoni* a presença de um receptor homólogo ao TNFR humano, além de mostrar que o parasita responde ao estímulo do TNF- α *in vitro* através de alteração global de expressão gênica. Vale ressaltar que TNF- α é uma importante citocina produzida por macrófagos humanos durante resposta imune aguda. A presença de um receptor para citocina no parasita é bastante curiosa, já que citocinas são moléculas com função de sinalizar às células do sistema imune a presença de um patógeno. O estudo da função dessa citocina na biologia de *S. mansoni* é de extrema importância para melhor compreensão dos mecanismos que são mobilizados no parasita e que utilizam esta molécula sinalizadora, o que certamente afeta a relação parasita-hospedeiro.

A função do TNF- α na biologia do parasita *Schistosoma mansoni* até hoje foi pouco estudada. Poucos trabalhos descreveram os efeitos biológicos desta citocina no parasita. Neste trabalho procuramos abordar este estudo do ponto de vista da sinalização celular.

Encontramos em nosso fosfoproteomas diversas proteínas relacionadas aos processos metabólicos, especialmente da via glicolítica, sinalização celular, citoesqueleto e contração muscular. A alteração dessas proteínas mostra que o TNF- α induz modificações celulares que poderiam levar a alterações de expressão gênica no parasita, já observadas em trabalhos anteriores.

Apesar da abordagem experimental adotada para esse estudo não ser sensível o suficiente para detectarmos elementos canônicos da via de transdução de sinal ativada pelo TNF- α humano em *S. mansoni*, esse tipo de estudo abre um caminho para investigações mais

detalhadas e direciona futuros estudos para identificar qual o papel das proteínas alvo identificadas por este trabalho como sendo modificadas por esta via de sinalização no parasita, a fim de melhor compreender qual a importância desta citocina na biologia do *S. mansoni* e na interação com o seu hospedeiro.

7. REFERÊNCIAS

- (2014). "Activities at the Universal Protein Resource (UniProt)." Nucleic Acids Res **42**(Database issue): D191-198.
- Abdulla, M. H., D. S. Ruelas, B. Wolff, J. Snedecor, K. C. Lim, F. Xu, A. R. Renslo, J. Williams, J. H. McKerrow and C. R. Caffrey (2009). "Drug discovery for schistosomiasis: hit and lead compounds identified in a library of known drugs by medium-throughput phenotypic screening." PLoS Negl Trop Dis **3**(7): e478.
- Agarwal, S., P. Kulshreshtha, D. Bambah Mukku and R. Bhatnagar (2008). "alpha-Enolase binds to human plasminogen on the surface of *Bacillus anthracis*." Biochim Biophys Acta **1784**(7-8): 986-994.
- Aggleton, J. P. and J. M. Pearce (2001). "Neural systems underlying episodic memory: insights from animal research." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **356**(1413): 1467-1482.
- Akamine, P., Madhusudan, J. Wu, N. H. Xuong, L. F. Ten Eyck and S. S. Taylor (2003). "Dynamic features of cAMP-dependent protein kinase revealed by apoenzyme crystal structure." J Mol Biol **327**(1): 159-171.
- Amiri, P., R. M. Locksley, T. G. Parslow, M. Sadick, E. Rector, D. Ritter and J. H. McKerrow (1992). "Tumour necrosis factor alpha restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice." Nature **356**(6370): 604-607.
- Andrade, L. F., L. A. Nahum, L. G. Avelar, L. L. Silva, A. Zerlotini, J. C. Ruiz and G. Oliveira (2011). "Eukaryotic protein kinases (ePKs) of the helminth parasite *Schistosoma mansoni*." BMC Genomics **12**: 215.
- Ashburner, M., C. A. Ball, J. A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J. M. Cherry, A. P. Davis, K. Dolinski, S. S. Dwight, J. T. Eppig, M. A. Harris, D. P. Hill, L. Issel-Tarver, A. Kasarskis, S. Lewis, J. C. Matese, J. E. Richardson, M. Ringwald, G. M. Rubin and G. Sherlock (2000). "Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium." Nat Genet **25**(1): 25-29.
- Avilan, L., M. Gualdron-Lopez, W. Quinones, L. Gonzalez-Gonzalez, V. Hannaert, P. A. Michels and J. L. Concepcion (2011). "Enolase: a key player in the metabolism and a probable virulence factor of trypanosomatid parasites-perspectives for its use as a therapeutic target." Enzyme Res **2011**: 932549.
- Bananis, E., S. Nath, K. Gordon, P. Satir, R. J. Stockert, J. W. Murray and A. W. Wolkoff (2004). "Microtubule-dependent movement of late endocytic vesicles in vitro: requirements for Dynein and Kinesin." Mol Biol Cell **15**(8): 3688-3697.
- Barbosa, F. S. (1995). Tópicos em Malacologia Médica. Rio de Janeiro - RJ, Editora Fiocruz.
- Baud, V. and M. Karin (2001). "Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives." Trends Cell Biol **11**(9): 372-377.

- Belizario Jr. VY, A. M., Martinez RM, Mallari AO, C. Tai CM (2008). "Efficacy and safety of 40 mg/kg and 60 mg/kg single doses of praziquantel in the treatment of schistosomiasis " Journal of Pediatric Infectious Diseases **3**(1): 7.
- Berriman, M., B. J. Haas, P. T. LoVerde, R. A. Wilson, G. P. Dillon, G. C. Cerqueira, S. T. Mashiyama, B. Al-Lazikani, L. F. Andrade, P. D. Ashton, M. A. Aslett, D. C. Bartholomeu, G. Blandin, C. R. Caffrey, A. Coghlan, R. Coulson, T. A. Day, A. Delcher, R. DeMarco, A. Djikeng, T. Eyre, J. A. Gamble, E. Ghedin, Y. Gu, C. Hertz-Fowler, H. Hirai, Y. Hirai, R. Houston, A. Ivens, D. A. Johnston, D. Lacerda, C. D. Macedo, P. McVeigh, Z. Ning, G. Oliveira, J. P. Overington, J. Parkhill, M. Pertea, R. J. Pierce, A. V. Protasio, M. A. Quail, M. A. Rajandream, J. Rogers, M. Sajid, S. L. Salzberg, M. Stanke, A. R. Tivey, O. White, D. L. Williams, J. Wortman, W. Wu, M. Zamanian, A. Zerlotini, C. M. Fraser-Liggett, B. G. Barrell and N. M. El-Sayed (2009). "The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*." Nature **460**(7253): 352-358.
- Blom, N., S. Gammeltoft and S. Brunak (1999). "Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites." J Mol Biol **294**(5): 1351-1362.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Braschi, S., R. S. Curwen, P. D. Ashton, S. Verjovski-Almeida and A. Wilson (2006). "The tegument surface membranes of the human blood parasite *Schistosoma mansoni*: a proteomic analysis after differential extraction." Proteomics **6**(5): 1471-1482.
- Bridges, D. and G. B. Moorhead (2005). "14-3-3 proteins: a number of functions for a numbered protein." Sci STKE **2005**(296): re10.
- Bueding, E. (1950). "Carbohydrate metabolism of *schistosoma mansoni*." J Gen Physiol **33**(5): 475-495.
- Bunney, T. D., H. S. van Walraven and A. H. de Boer (2001). "14-3-3 protein is a regulator of the mitochondrial and chloroplast ATP synthase." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(7): 4249-4254.
- Cabal-Hierro, L., M. Rodriguez, N. Artime, J. Iglesias, L. Ugarte, M. A. Prado and P. S. Lazo (2014). "TRAF-mediated modulation of NF-kB AND JNK Activation by TNFR2." Cell Signal **26**(12): 2658-2666.
- Caldas, I. R., A. C. Campi-Azevedo, L. F. Oliveira, A. M. Silveira, R. C. Oliveira and G. Gazzinelli (2008). "Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection." Acta Trop **108**(2-3): 109-117.
- Cantin, G. T., J. D. Venable, D. Cociorva and J. R. Yates, 3rd (2006). "Quantitative phosphoproteomic analysis of the tumor necrosis factor pathway." J Proteome Res **5**(1): 127-134.
- Cass, L. A., S. A. Summers, G. V. Prendergast, J. M. Backer, M. J. Birnbaum and J. L. Meinkoth (1999). "Protein kinase A-dependent and -independent signaling pathways contribute to cyclic AMP-stimulated proliferation." Mol Cell Biol **19**(9): 5882-5891.

- CDC. (2013). "Schistosomiasis Infection." 2014, from <http://www.cdc.gov/dpdx/schistosomiasis/index.html>.
- Cheever, A. W., R. W. Poindexter and T. A. Wynn (1999). "Egg laying is delayed but worm fecundity is normal in SCID mice infected with *Schistosoma japonicum* and *S. mansoni* with or without recombinant tumor necrosis factor alpha treatment." *Infect Immun* **67**(5): 2201-2208.
- Chung, J. J., Y. Okamoto, B. Coblitz, M. Li, Y. Qiu and S. Shikano (2009). "PI3K/Akt signalling-mediated protein surface expression sensed by 14-3-3 interacting motif." *FEBS J* **276**(19): 5547-5558.
- Cioli, D., S. S. Botros, K. Wheatcroft-Francklow, A. Mbaye, V. Southgate, L. A. Tchunte, L. Pica-Mattoccia, A. R. Troiani, S. H. El-Din, A. N. Sabra, J. Albin, D. Engels and M. J. Doenhoff (2004). "Determination of ED50 values for praziquantel in praziquantel-resistant and -susceptible *Schistosoma mansoni* isolates." *Int J Parasitol* **34**(8): 979-987.
- Coura, J. R. and R. S. Amaral (2004). "Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **99**(5 Suppl 1): 13-19.
- De Corte, V., J. Gettemans and J. Vandekerckhove (1997). "Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate specifically stimulates PP60(c-src) catalyzed phosphorylation of gelsolin and related actin-binding proteins." *FEBS Lett* **401**(2-3): 191-196.
- de Saram, P. S., M. Ressurreicao, A. J. Davies, D. Rollinson, A. M. Emery and A. J. Walker (2013). "Functional mapping of protein kinase A reveals its importance in adult *Schistosoma mansoni* motor activity." *PLoS Negl Trop Dis* **7**(1): e1988.
- Doenhoff, M. J., D. Cioli and J. Utzinger (2008). "Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis." *Curr Opin Infect Dis* **21**(6): 659-667.
- Dong, S., S. Kang, T. L. Gu, S. Kardar, H. Fu, S. Lonial, H. J. Khoury, F. Khuri and J. Chen (2007). "14-3-3 Integrates prosurvival signals mediated by the AKT and MAPK pathways in ZNF198-FGFR1-transformed hematopoietic cells." *Blood* **110**(1): 360-369.
- Emans, N., J. P. Gorvel, C. Walter, V. Gerke, R. Kellner, G. Griffiths and J. Gruenberg (1993). "Annexin II is a major component of fusogenic endosomal vesicles." *J Cell Biol* **120**(6): 1357-1369.
- Engqvist-Goldstein, A. E. and D. G. Drubin (2003). "Actin assembly and endocytosis: from yeast to mammals." *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**: 287-332.
- Fallon, P. G., E. J. Richardson, F. M. Jones and D. W. Dunne (1998). "Dehydroepiandrosterone sulfate treatment of mice modulates infection with *Schistosoma mansoni*." *Clin Diagn Lab Immunol* **5**(2): 251-253.
- Fan, J., T. Hitosugi, T. W. Chung, J. Xie, Q. Ge, T. L. Gu, R. D. Polakiewicz, G. Z. Chen, T. J. Boggon, S. Lonial, F. R. Khuri, S. Kang and J. Chen (2011). "Tyrosine phosphorylation of lactate dehydrogenase A is important for NADH/NAD(+) redox homeostasis in cancer cells." *Mol Cell Biol* **31**(24): 4938-4950.

- Faustman, D. and M. Davis (2010). "TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases." Nat Rev Drug Discov **9**(6): 482-493.
- File, S. (1995). "Interaction of schistosome eggs with vascular endothelium." J Parasitol **81**(2): 234-238.
- Fu, H., R. R. Subramanian and S. C. Masters (2000). "14-3-3 proteins: structure, function, and regulation." Annu Rev Pharmacol Toxicol **40**: 617-647.
- Gaur, U. and B. B. Aggarwal (2003). "Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily." Biochem Pharmacol **66**(8): 1403-1408.
- Gryseels, B., K. Polman, J. Clerinx and L. Kestens (2006). "Human schistosomiasis." Lancet **368**(9541): 1106-1118.
- Haas, W., K. Grabe, C. Geis, T. Pach, K. Stoll, M. Fuchs, B. Haberl and C. Loy (2002). "Recognition and invasion of human skin by *Schistosoma mansoni* cercariae: the key-role of L-arginine." Parasitology **124**(Pt 2): 153-167.
- Haeberlein, S. and W. Haas (2008). "Chemical attractants of human skin for swimming *Schistosoma mansoni* cercariae." Parasitol Res **102**(4): 657-662.
- Hahnel, S., Z. Lu, R. A. Wilson, C. G. Grevelding and T. Quack (2013). "Whole-organ isolation approach as a basis for tissue-specific analyses in *Schistosoma mansoni*." PLoS Negl Trop Dis **7**(7): e2336.
- Haseeb, M. A. (1998). "*Schistosoma mansoni*: females enhance [¹⁴C]-tyrosine incorporation in males maintained in vitro." J Helminthol **72**(2): 123-126.
- Haseeb, M. A., W. B. Solomon and J. F. Palma (1996). "*Schistosoma mansoni*: effect of recombinant tumor necrosis factor alpha on fecundity and [¹⁴C]-tyrosine uptake in females maintained in vitro." Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol **115**(3): 265-269.
- Hayes, M. J., C. J. Merrifield, D. Shao, J. Ayala-Sanmartin, C. D. Schorey, T. P. Levine, J. Proust, J. Curran, M. Bailly and S. E. Moss (2004). "Annexin 2 binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate on endocytic vesicles is regulated by the stress response pathway." J Biol Chem **279**(14): 14157-14164.
- He, Y. X., L. Chen and K. Ramaswamy (2002). "*Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, and *S. japonicum*: early events associated with penetration and migration of schistosomula through human skin." Exp Parasitol **102**(2): 99-108.
- Hojlund, K., K. Wrzesinski, P. M. Larsen, S. J. Fey, P. Roepstorff, A. Handberg, F. Dela, J. Vinten, J. G. McCormack, C. Reynet and H. Beck-Nielsen (2003). "Proteome analysis reveals phosphorylation of ATP synthase beta -subunit in human skeletal muscle and proteins with potential roles in type 2 diabetes." J Biol Chem **278**(12): 10436-10442.
- Kane, L. A., M. J. Youngman, R. E. Jensen and J. E. Van Eyk (2010). "Phosphorylation of the F(1)F(o) ATP synthase beta subunit: functional and structural consequences assessed in a model system." Circ Res **106**(3): 504-513.

- Katz, N. and K. Almeida (2003) "Esquistossomose, xistosa, barriga d'água." Cienc. Cult. [online] **55**, 38-43.
- Kolarova, L. (2007). "Schistosomes causing cercarial dermatitis: a mini-review of current trends in systematics and of host specificity and pathogenicity." Folia Parasitol (Praha) **54**(2): 81-87.
- Lee, V. S., J. L. Burgess, C. R. Sterling and E. A. Lutz (2013). "Schistosoma mansoni: assessment of effects of oleic acid, cercarial age and water temperature on parasite-host attraction." Int J Parasitol **43**(10): 837-842.
- Li, G. and H. Qian (2003). "Sensitivity and specificity amplification in signal transduction." Cell Biochem Biophys **39**(1): 45-59.
- Liu, F., A. D. Verin, T. Borbiev and J. G. Garcia (2001). "Role of cAMP-dependent protein kinase A activity in endothelial cell cytoskeleton rearrangement." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **280**(6): L1309-1317.
- Loverde, P. T., A. Osman and A. Hinck (2007). "Schistosoma mansoni: TGF-beta signaling pathways." Exp Parasitol **117**(3): 304-317.
- Luo, R., C. Zhou, J. Lin, D. Yang, Y. Shi and G. Cheng (2012). "Identification of in vivo protein phosphorylation sites in human pathogen Schistosoma japonicum by a phosphoproteomic approach." J Proteomics **75**(3): 868-877.
- Manni, S., J. H. Mauban, C. W. Ward and M. Bond (2008). "Phosphorylation of the cAMP-dependent protein kinase (PKA) regulatory subunit modulates PKA-AKAP interaction, substrate phosphorylation, and calcium signaling in cardiac cells." J Biol Chem **283**(35): 24145-24154.
- Mayran, N., R. G. Parton and J. Gruenberg (2003). "Annexin II regulates multivesicular endosome biogenesis in the degradation pathway of animal cells." EMBO J **22**(13): 3242-3253.
- McGonigle, S., M. Loschiavo and E. J. Pearce (2002). "14-3-3 proteins in Schistosoma mansoni; identification of a second epsilon isoform." Int J Parasitol **32**(6): 685-693.
- Morales-Montor, J., F. Mohamed, A. M. Ghaleb, S. Baig, C. Hallal-Calleros and R. T. Damian (2001). "In vitro effects of hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) hormones on Schistosoma mansoni." J Parasitol **87**(5): 1132-1139.
- Morales-Montor, J., E. Newhouse, F. Mohamed, A. Baghdadi and R. T. Damian (2001). "Altered levels of hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis hormones in baboons and mice during the course of infection with Schistosoma mansoni." J Infect Dis **183**(2): 313-320.
- Mouveaux, T., G. Oria, E. Werkmeister, C. Slomianny, B. A. Fox, D. J. Bzik and S. Tomavo (2014). "Nuclear glycolytic enzyme enolase of Toxoplasma gondii functions as a transcriptional regulator." PLoS One **9**(8): e105820.
- Naude, P. J., J. A. den Boer, P. G. Luiten and U. L. Eisel (2011). "Tumor necrosis factor receptor cross-talk." FEBS J **278**(6): 888-898.

- Nettelblad, F. A. and L. Engstrom (1987). "The kinetic effects of in vitro phosphorylation of rabbit muscle enolase by protein kinase C. A possible new kind of enzyme regulation." FEBS Lett **214**(2): 249-252.
- Neves, D. P. (2002). Parasitologia humana. São Paulo, Ed. Atheneu.
- Ogata, H., S. Goto, K. Sato, W. Fujibuchi, H. Bono and M. Kanehisa (1999). "KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes." Nucleic Acids Res **27**(1): 29-34.
- Oliveira, K. C., M. L. Carvalho, T. M. Venancio, P. A. Miyasato, T. Kawano, R. DeMarco and S. Verjovski-Almeida (2009). "Identification of the *Schistosoma mansoni* TNF- α receptor gene and the effect of human TNF- α on the parasite gene expression profile." PLoS Negl Trop Dis **3**(12): e556.
- Osman, A., E. G. Niles, S. Verjovski-Almeida and P. T. LoVerde (2006). "*Schistosoma mansoni* TGF- β receptor II: role in host ligand-induced regulation of a schistosome target gene." PLoS Pathog **2**(6): e54.
- Pelech, S. L. and J. S. Sanghera (1992). "MAP kinases: charting the regulatory pathways." Science **257**(5075): 1355-1356.
- Pellegrino, J. and A. F. Siqueira (1956). "[A perfusion technic for recovery of *Schistosoma mansoni* from experimentally infected guinea pigs]." Rev Bras Malariol Doencas Trop **8**(4): 589-597.
- Perez-Sanchez, R., M. L. Valero, A. Ramajo-Hernandez, M. Siles-Lucas, V. Ramajo-Martin and A. Oleaga (2008). "A proteomic approach to the identification of tegumental proteins of male and female *Schistosoma bovis* worms." Mol Biochem Parasitol **161**(2): 112-123.
- Perkins, D. N., D. J. Pappin, D. M. Creasy and J. S. Cottrell (1999). "Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data." Electrophoresis **20**(18): 3551-3567.
- Piast, M., I. Kustrzeba-Wojcicka, M. Matusiewicz and T. Banas (2005). "Molecular evolution of enolase." Acta Biochim Pol **52**(2): 507-513.
- Pollard, T. D. and G. G. Borisy (2003). "Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments." Cell **112**(4): 453-465.
- Pontes, L. A., M. C. Oliveira, N. Katz, E. Dias-Neto and A. Rabello (2003). "Comparison of a polymerase chain reaction and the Kato-Katz technique for diagnosing infection with *Schistosoma mansoni*." Am J Trop Med Hyg **68**(6): 652-656.
- Rescher, U., C. Ludwig, V. Konietzko, A. Kharitonov and V. Gerke (2008). "Tyrosine phosphorylation of annexin A2 regulates Rho-mediated actin rearrangement and cell adhesion." J Cell Sci **121**(Pt 13): 2177-2185.
- Rey, L. (2008). Parasitologia. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan.

- Roy, S., R. A. McPherson, A. Apolloni, J. Yan, A. Lane, J. Clyde-Smith and J. F. Hancock (1998). "14-3-3 facilitates Ras-dependent Raf-1 activation in vitro and in vivo." Mol Cell Biol **18**(7): 3947-3955.
- Rumbley, C. A., S. A. Zekavat, H. Sugaya, P. J. Perrin, M. A. Ramadan and S. M. Phillips (1998). "The schistosome granuloma: characterization of lymphocyte migration, activation, and cytokine production." J Immunol **161**(8): 4129-4137.
- Salzet, M., A. Capron and G. B. Stefano (2000). "Molecular crosstalk in host-parasite relationships: schistosome- and leech-host interactions." Parasitol Today **16**(12): 536-540.
- Santiago Ede, F., S. A. de Oliveira, G. B. de Oliveira Filho, D. R. Moreira, P. A. Gomes, A. L. da Silva, A. F. de Barros, A. C. da Silva, T. A. Dos Santos, V. R. Pereira, G. G. Goncalves, F. A. Brayner, L. C. Alves, A. G. Wanderley and A. C. Leite (2014). "Evaluation of the anti-Schistosoma mansoni activity of thiosemicarbazones and thiazoles." Antimicrob Agents Chemother **58**(1): 352-363.
- Schechtman, D., R. Winnen, R. Tarrab-Hazdai, D. Ram, V. Shinder, C. G. Grevelding, W. Kunz and R. Arnon (2001). "Expression and immunolocalization of the 14-3-3 protein of Schistosoma mansoni." Parasitology **123**(Pt 6): 573-582.
- Schiller, E. L., E. Bueding, V. M. Turner and J. Fisher (1975). "Aerobic and anaerobic carbohydrate metabolism and egg production of Schistosoma mansoni in vitro." J Parasitol **61**(3): 385-389.
- Steinmann, P., J. Keiser, R. Bos, M. Tanner and J. Utzinger (2006). "Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk." Lancet Infect Dis **6**(7): 411-425.
- Stelma, F. F., I. Talla, S. Sow, A. Kongs, M. Niang, K. Polman, A. M. Deelder and B. Gryseels (1995). "Efficacy and side effects of praziquantel in an epidemic focus of Schistosoma mansoni." Am J Trop Med Hyg **53**(2): 167-170.
- Swierczewski, B. E. and S. J. Davies (2009). "A schistosome cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit is essential for parasite viability." PLoS Negl Trop Dis **3**(8): e505.
- Thandavarayan, R. A., K. Watanabe, M. Ma, P. T. Veeraveedu, N. Gurusamy, S. S. Palaniyandi, S. Zhang, A. J. Muslin, M. Kodama and Y. Aizawa (2008). "14-3-3 protein regulates Ask1 signaling and protects against diabetic cardiomyopathy." Biochem Pharmacol **75**(9): 1797-1806.
- Tzivion, G. and J. Avruch (2002). "14-3-3 proteins: active cofactors in cellular regulation by serine/threonine phosphorylation." J Biol Chem **277**(5): 3061-3064.
- Tzivion, G., Y. H. Shen and J. Zhu (2001). "14-3-3 proteins; bringing new definitions to scaffolding." Oncogene **20**(44): 6331-6338.
- Van Der Hoeven, P. C., J. C. Van Der Wal, P. Ruurs and W. J. Van Blitterswijk (2000). "Protein kinase C activation by acidic proteins including 14-3-3." Biochem J **347 Pt 3**: 781-785.

- Verjovski-Almeida, S., T. M. Venancio, K. C. Oliveira, G. T. Almeida and R. DeMarco (2007). "Use of a 44k oligoarray to explore the transcriptome of *Schistosoma mansoni* adult worms." Exp Parasitol **117**(3): 236-245.
- Wahab, M. F., K. S. Warren and R. P. Levy (1971). "Function of the thyroid and the host-parasite relation in murine schistosomiasis mansoni." J Infect Dis **124**(2): 161-171.
- Wajant, H., K. Pfizenmaier and P. Scheurich (2003). "Tumor necrosis factor signaling." Cell Death Differ **10**(1): 45-65.
- Wajant, H. and P. Scheurich (2001). "Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2 and its role in TNF signaling." Int J Biochem Cell Biol **33**(1): 19-32.
- Watanabe, T., H. Hosoya and S. Yonemura (2007). "Regulation of myosin II dynamics by phosphorylation and dephosphorylation of its light chain in epithelial cells." Mol Biol Cell **18**(2): 605-616.
- WHO. (2008). "Schistosomiasis, Countries or areas at risk.", from http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_ShistoPrevalence_ITHRiskMap.png.
- WHO (2014). Schistosomiasis. media center - Fact sheets.
- Wolowczuk, I., M. Delacre, O. Roye, S. L. Giannini and C. Auriault (1997). "Interleukin-7 in the skin of *Schistosoma mansoni*-infected mice is associated with a decrease in interferon-gamma production and leads to an aggravation of the disease." Immunology **91**(1): 35-44.
- Wolowczuk, I., S. Nutten, O. Roye, M. Delacre, M. Capron, R. M. Murray, F. Trottein and C. Auriault (1999). "Infection of mice lacking interleukin-7 (IL-7) reveals an unexpected role for IL-7 in the development of the parasite *Schistosoma mansoni*." Infect Immun **67**(8): 4183-4190.
- Wolowczuk, I., O. Roye, S. Nutten, M. Delacre, F. Trottein and C. Auriault (1999). "Role of interleukin-7 in the relation between *Schistosoma mansoni* and its definitive vertebrate host." Microbes Infect **1**(7): 545-551.
- Woodcock, J. M., J. Murphy, F. C. Stomski, M. C. Berndt and A. F. Lopez (2003). "The dimeric versus monomeric status of 14-3-3zeta is controlled by phosphorylation of Ser58 at the dimer interface." J Biol Chem **278**(38): 36323-36327.
- Wu, W., E. G. Niles and P. T. LoVerde (2007). "Thyroid hormone receptor orthologues from invertebrate species with emphasis on *Schistosoma mansoni*." BMC Evol Biol **7**: 150.
- Xing, H., S. Zhang, C. Weinheimer, A. Kovacs and A. J. Muslin (2000). "14-3-3 proteins block apoptosis and differentially regulate MAPK cascades." EMBO J **19**(3): 349-358.
- Xiong, Z. J. and K. B. Storey (2012). "Regulation of liver lactate dehydrogenase by reversible phosphorylation in response to anoxia in a freshwater turtle." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **163**(2): 221-228.

- Zambon, A. C., L. Zhang, S. Minovitsky, J. R. Kanter, S. Prabhakar, N. Salomonis, K. Vranizan, I. Dubchak, B. R. Conklin and P. A. Insel (2005). "Gene expression patterns define key transcriptional events in cell-cycle regulation by cAMP and protein kinase A." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(24): 8561-8566.
- Zhao, Y., D. B. Conze, J. A. Hanover and J. D. Ashwell (2007). "Tumor necrosis factor receptor 2 signaling induces selective c-IAP1-dependent ASK1 ubiquitination and terminates mitogen-activated protein kinase signaling." J Biol Chem **282**(11): 7777-7782.

8. ANEXOS

Anexo I – Súmula curricular

SÚMULA CURRICULAR

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Mariana Lombardi Peres de Carvalho

Local e data de nascimento: São Paulo – 23/05/1987

2. EDUCAÇÃO

Colégio Hugo Sarmiento, São Paulo, 2002 - 2004.

Ensino Médio

Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, 2006 - 2010.

Graduação em Ciências Biológicas

Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010 - 2013.

Mestrado em Bioquímica

3. FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Explorando o genoma, transcriptoma e proteoma do parasita *Schistosoma mansoni*, Instituto Butantan, São Paulo. Carga horária: 20h.

Proteomics methods and approaches for protein identification and quantitation, ministrado pelo Prof. Dr. Pierre Thibault da Universidade de Montreal, Canadá.

Carga horária: 25h

Cultura Inglesa, São Paulo, 2010 – 2012. Carga horária: 240h.

4. OCUPAÇÃO

Bolsista de Iniciação Científica ,CNPq, Agosto 2008 – Julho 2010

Bolsista de Mestrado, Universidade de São Paulo, Fapesp, 2011 - 2012

Analista em Genética e Medicina Personalizada Fevereiro 2014 - Atual

5. PUBLICAÇÕES (Artigos Completos e Resumos em Congressos)

Artigos Completos

Oliveira, K. C., M. L. Carvalho, T. M. Venancio, P. A. Miyasato, T. Kawano, R. DeMarco, S. Verjovski-Almeida (2009). "Identification of the *Schistosoma mansoni* TNF-alpha receptor gene and the effect of human TNF-alpha on the parasite gene expression profile." PLoS Negl Trop Dis **3**(12): e556.

Oliveira, K. C., M. L. Carvalho, V. Maracaja-Coutinho, J. P. Kitajima, S. Verjovski-Almeida (2011). "Non-coding RNAs in schistosomes: an unexplored world." An Acad Bras Cienc **83**(2): 673-694.

Oliveira, K. C., M. L. Carvalho, S. Verjovski-Almeida, P.T. LoVerde (2012). "Effect of human TGF-beta on the gene expression profile of *Schistosoma mansoni* adult worms." Mol Biochem Parasitol **183**(2): 132-139.

Resumos em Congressos

Carvalho, M. L. P. ; Oliveira, C. P. ; DeMarco, Ricardo ; Verjovski-Almeida, S. Characterization of TNF Alpha Receptor in *Schistosoma mansoni*. XXXVIII Annual Meeting of The Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2009, Águas de Lindóia – SP.

Carvalho, M. L. P., Duarte, M. L., Bonatto, J. M.C., Schechtman, D., Verjovski-Almeida, S. Phosphoproteomic analysis of the signaling pathway induced by human TNF-alpha in *Schistosoma mansoni*. XLI Annual Meeting of the Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society, 2012, Foz do Iguaçu – PR.

Anexo II - Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais

O presente trabalho foi realizado em colaboração com a Dra. Katia C. P. Oliveira Santos, do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz – Central, e utilizou animais infectados fornecidos por aquele Instituto.

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CEUA-IAL

ANEXO E

São Paulo, 09 de janeiro de 2014.

Parecer Projeto 07/2013 – CEUA IAL

Venho pela presente informar que o projeto de pesquisa intitulado **“Estudo das vias de transdução de sinal em Schistosoma mansoni e sua relevância na interação parasita-hospedeiro (Schisto-Sig)”**, sob coordenação da Dra. Katia Cristina Pereira Oliveira Santos do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz - Central, foi considerado **APROVADO**, e poderá ser realizado conforme procedimentos delineados apresentados a esta Comissão.

O presente projeto utilizará no total 51 camundongos swiss, machos ou fêmeas, com 30 dias de idade.

Informamos que devem ser encaminhados relatórios **ANUAIS** à CEUA-IAL, no intuito de acompanharmos os procedimentos realizados segundo os aspectos éticos e sanitários e permitindo também a elaboração de relatórios anuais que são realizados por esta CEUA-IAL e que são encaminhados ao Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), conforme a Lei Federal 11.794 de 8 de outubro de 2008.

Atenciosamente,

Raquel dos Anjos Fazioli
Coordenadora da CEUA-IAL

RAF/raf

Endereço: Avenida Doutor Arnaldo, nº 355
11º Andar – Salas 1102 – Cerqueira César
São Paulo – SP – CEP: 01246-902
Tel: (11) 3068-2887 – e-mail: ceua@ial.sp.gov.br