UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

ANA ELIZA ZERAIK

Caracterização estrutural e funcional de septinas de *Schistosoma mansoni*

São Carlos
2013

ANA ELIZA ZERAIK

Caracterização estrutural e funcional de septinas de *Schistosoma mansoni*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada

Opção: Física Biomolecular

Orientador: Prof. Dr. Ricardo De Marco

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Ulian de Araujo

Versão Corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Zeraik, Ana Eliza

Caracterização estrutural e funcional de septinas de *Schistosoma mansoni* / Ana Eliza Zeraik; orientador Ricardo DeMarco; co-orientadora Ana Paula Ulian de Araujo - versão corrigida -- São Carlos, 2013.

163 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2013.

1. Septinas. 2. *Schistosoma mansoni*. 3. Estudos estruturais. 4. Imunolocalização. I. DeMarco, Ricardo, orient. II. Ulian de Araujo, Ana Paula, co-orient. III. Título.

À minha família: meus pais, Marcia e Otávio e minhas irmãs, Maria Luiza e Vivian por todo o amor, incentivo e suporte.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo De Marco por todo o apoio durante o desenvolvimento deste projeto. Por nunca ter deixado de me escutar e ajudar sempre que precisei. Pela atenção dispensada aos seus alunos e seu entusiasmo com a pesquisa, que nos incentivam a continuar na área, e pela rapidez nas correções!

À minha co-orientadora Prof. Dra. Ana Paula Ulian de Araujo por todo o suporte e sugestões ao longo destes anos, e pela amizade.

Ao meu orientador no exterior Prof. Dr. Paul Brindley por ter me recebido em seu laboratório, ter proporcionado todas as condições para o desenvolvimento deste projeto e pela atenção e preocupação durante os nove meses de minha estadia em Washington.

Ao Dr. Gabriel e a Dra. Danielle, por me ajudarem no laboratório durante meu estágio em Washington, me ensinando todos os protocolos, contribuindo com ideias e, principalmente, pela amizade, que tornou minha estadia lá mais fácil e agradável.

Ao Dr. Anastas Popratiloff por me ensinar a utilizar o microscópio confocal e à Dra Victoria Mann pela ajuda com a manutenção do laboratório em Washington.

Ao Dr. Vitold Galkin pela colaboração nas medidas de microscopia eletrônica de transmissão.

Ao Dr. Humberto D'Muniz Pereira e ao Prof. Dr. Richard C. Garratt pela resolução da estrutura da *SmSEPT10G* e pela discussão destes resultados.

À Andressa, Bel e Fernando por toda a ajuda na rotina do laboratório e por torná-lo tão organizado, facilitando o trabalho de todos.

Ao Prof. Dr. Francisco Guimarães pelo auxílio nas análises de microscopia confocal feitas no IFSC.

À Profa. Dra Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo pela produção de anticorpos.

Ao Prof. Dr. R. Alan Wilson pelo auxílio na interpretação das imagens de microscopia confocal.

Ao grupo dos septinólogos pelas reuniões e discussões, especialmente à Joci e ao Júlio pelo auxílio nos protocolos relacionados às septinas, e pela amizade.

Aos amigos e colegas da biofísica e do IFSC em especial a Valéria, Patrícia, Amanda, Ana Isabel, Zé Luis, Sabrina, Yuri, Assuero (agora FFCLRP), Gisele e ao Militar pelo carinho e apoio.

Às amigas de longa data Ana Júlia, Fabiana, Keila, Maria Fernanda e Lya por estarem sempre presentes.

À minha família: Marcia, Otávio, Maria Luiza e Vivian pelo amor e dedicação. Ao Marco por estar ao meu lado em grande parte deste projeto e ter me dado suporte e incentivo.

Ao Instituto de Física de São Carlos.

Ao CNPq e à CAPES pelas bolsas concedidas.

I have no dress except the one I wear every day. If you are going to be kind enough to give me one, please let it be practical and dark so that I can put it on afterwards to go to the laboratory.

Marie Curie

RESUMO

ZERAIK, A. E. **Caracterização estrutural e funcional de septinas de *Schistosoma mansoni***. 2013. 166p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

Septinas são proteínas pertencentes à família das GTPases que estão envolvidas em uma variedade de funções celulares. Verificamos através de análises bioinformáticas que *Schistosoma mansoni*, um dos principais agentes etiológicos da esquistossomose, possui quatro genes que codificam septinas (*SmSept5*, *SmSept10*, *SmSept7.1* e *SmSept7.2*). O objetivo deste trabalho foi a produção heteróloga das proteínas codificadas por estes genes, visando estudos estruturais e funcionais das mesmas. As septinas *SmSEPT5* e *SmSEPT10* foram expressas em sistema recombinante e foi possível a obtenção de formas solúveis destas proteínas. Experimentos de gel filtração e *cross-linking* mostraram que elas são diméricas em solução e estáveis em ampla faixa de pH, embora agregados proteicos tenham sido observados com o aumento da temperatura. Ambas as proteínas foram capazes de ligar GTP e GDP, embora apenas *SmSEPT5* tenha apresentado atividade GTPásica. Mg^{2+} se mostrou essencial para a ligação de GTP a ambas as proteínas, enquanto a ligação do GDP foi independente da presença deste cofator. Ensaio de cristalização com o domínio GTPase de *SmSEPT10* resultaram em cristais de ótima qualidade cuja difração resultou na obtenção da estrutura com melhor resolução alcançada até o momento para septinas: 1.9 Å para a forma ligada a GDP e 2.1 Å para a forma ligada a GTP. A análise da sobreposição das estruturas obtidas resultou na observação do deslizamento de uma fita β em relação às demais, que acreditamos estar envolvido com o mecanismo de associação destas proteínas à membranas. Um sistema de coexpressão foi construído em que *SmSEPT5*, *SmSEPT10* e *SmSEPT7.2* foram coexpressas e copurificadas, resultando na verificação da formação de hetero-oligômeros e filamentos por estas proteínas. Tratamento de diversas fases do ciclo de vida do parasito com um composto (FCF) que afeta a dinâmica de filamentos de septina, resultou em um fenótipo reversível de paralisia no parasito. Estudos de imunolocalização revelaram a colocalização de septinas e actina em fibras musculares do parasito, sugerindo que a interação entre filamentos de septina e actina pode ter um papel importante nas funções motoras do parasita. A imunolocalização revelou ainda a presença de septinas em placas epiteliais ciliadas

de miracídios, células germinativas de miracídios e esporocistos e protonefrídios de cercárias. Os resultados apresentados aqui constituem a primeira descrição de septinas em platelmintos e nos possibilitam o estabelecimento de correlações estruturais e funcionais entre septinas de *S. mansoni* e complexos análogos de septinas de outros organismos, contribuindo para a elucidação da função desta família de proteínas.

Palavras-chave: Septinas. *Schistosoma mansoni*. Estudos estruturais. Imunolocalização.

ABSTRACT

ZERAIK, A. E. **Structural and functional characterization of *Schistosoma mansoni* septins**. 2013. 166p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

Septins belong to the GTPase family of proteins and are involved in a variety of cellular processes. We have identified four genes encoding septins in *Schistosoma mansoni*, one of the main causative agents of schistosomiasis, these genes were named *SmSept5*, *SmSept10*, *SmSept7.1* e *SmSept7.2*. The aim of this study was to clone the cDNA of these genes in order to subject the resulting proteins to a set of biophysical and functional studies. Biophysical characterizations were undertaken with *SmSEPT5* and *SmSEPT10* because of the higher solubility of these proteins, which were dimeric in solution and stable over a wide range of pH, although increasing temperatures promoted the aggregation of these proteins. The nucleotide binding assays revealed that both were capable of binding GTP and GDP, although only *SmSEPT5* presented GTPase activity. Mg^{2+} has shown to be essential for GTP binding in both proteins while GDP binding was independent of this cofactor. Crystallization assays with the GTPase domain of *SmSEPT10* have resulted in crystals of high quality and consequently high resolution structures were obtained: 1.9 Å to the GDP bound form and 2.1 Å to the GTP bound form, the best resolution achieved to date for any septin member. The superposition of the structures obtained enabled us to observe a strand slippage in $\beta 3$ strand suggesting that it might be part of an activation mechanism involved in the association of these proteins to membranes. A coexpression system was produced, in which *SmSEPT5*, *SmSEPT10* and *SmSEPT7.2* were coexpressed and copurified. These proteins were able to assemble into heterocomplexes that further polymerize into filaments. Functional studies performed with a drug (FCF) that affects the dynamics of septin filaments have resulted in a reversible paralysis phenotype in the parasite. Immunolocalization experiments revealed the colocalization of septins and actin in muscular structures of the parasite, suggesting that the interaction of septin and actin filaments might have an important role in the motor activity of the parasite. The immunolocalization also revealed the presence of septins in the epithelial plates of miracidia, germ cells of miracidia and sporocysts and protonephridia of cercariae. The results presented here constitute the first description of septins in phatyhelminthes and enabled us the

establishment of structural and functional relationships among septins from *S. mansoni* and analogous septin complexes in other organisms, contributing to elucidate the function of this family of proteins.

Keywords: Septins. *Schistosoma mansoni*. Structural studies. Immunolocalization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura típica de septinas.....	26
Figura 2 - Análise filogenética de septinas humanas.....	29
Figura 3 - Análise filogenética de septinas em metazoários.....	30
Figura 4 - Distribuição global da esquistossomose.....	32
Figura 5 - Ciclo de transmissão da esquistossomose.	33
Figura 6 - Imagens de ovos maduros de <i>S. mansoni</i>	34
Figura 7 - Microscopia de campo claro de miracídios (A) e esporocistos (B).	35
Figura 8 - Microscopia de campo claro de cercárias.....	36
Figura 9 - Microscopia de campo claro de esquistossômulos..	37
Figura 10 - Microscopia de campo claro de verme adulto macho (A) e fêmea (B).	38
Figura 11 - Representação esquemática dos motivos proteicos e domínios presentes nas septinas de <i>S. mansoni</i>	51
Figura 12 - Alinhamento múltiplo das sequências do domínio GTPase das septinas de <i>S. mansoni</i> e humanas.....	52
Figura 13 - Análise filogenética de septinas de organismos deuterostômios e protostômios, incluindo <i>Schistosoma mansoni</i>	53
Figura 14 - Análise filogenética de septinas de platelmintos..	55
Figura 15 - Amplificação dos cDNAs <i>SmSept10</i> (b), <i>SmSept7.1</i> (c), <i>SmSept7.2</i> (d), e <i>SmSept5</i> (e).....	56
Figura 16 - Análises de restrição dos clones de septinas de <i>S. mansoni</i>	56
Figura 17 - Análises de SDS-PAGE da expressão e purificação de <i>SmSEPT5</i> (A) e <i>SmSEPT10</i> (B).	57
Figura 18 - Espectro de CD (A) e Emissão de fluorescência dos triptofanos (B) de <i>SmSEPT5</i>	58
Figura 19 - Espectros de CD (A) e Emissão de fluorescência (B) de <i>SmSEPT10</i>	58
Figura 20 - Perfil cromatográfico de <i>SmSEPT5</i> (A) e <i>SmSEPT10</i> (B).	60
Figura 21 - Estimativa de massa molecular das proteínas <i>SmSEPT5</i> e <i>SmSEPT10</i> utilizando cromatografia de exclusão molecular.	61
Figura 22 - Análise do estado oligomérico de <i>SmSEPT5</i> e <i>SmSEPT10</i> por reações de <i>cross-linking</i>	62

Figura 23 - Avaliação da influência da ligação de nucleotídeos de guanina no estado oligomérico de septinas de <i>S. mansoni</i> ..	63
Figura 24 - Avaliação do conteúdo de nucleotídeo de <i>SmSEPT5</i> (A) e <i>SmSEPT10</i> (B)..	64
Figura 25 - Teste de atividade GTPásica..	65
Figura 26 - Análises de SDS-PAGE da expressão e purificação de <i>SmSEPT7.2</i> ..	65
Figura 27 - Perfil cromatográfico de <i>SmSEPT7.2</i> em coluna Superdex 200.....	66
Figura 28 - Espectro de CD (A) e Emissão de fluorescência dos triptofanos (B) de <i>SmSEPT7.2</i>	66
Figura 29 - Teste de atividade GTPásica para <i>SmSEPT7.2</i>	67
Figura 30 - Análise da estabilidade da estrutura secundária das proteínas em função do pH por espectroscopia de dicroísmo circular.....	69
Figura 31 - Análise da estabilidade da estrutura terciária das proteínas em função do pH por espectroscopia de fluorescência.	69
Figura 32 - Análises de agregação proteica por espalhamento de luz a ângulo fixo.....	70
Figura 33 - Estrutura da Tioflavina T com os dois planos de rotação destacados.	71
Figura 34 - Monitoramento da formação de fibras do tipo β -amilóide por emissão de fluorescência da sonda Tioflavina T (ThT).	72
Figura 35 - Isotermas de ligação de <i>SmSEPT5</i>	73
Figura 36 - Isotermas de ligação de <i>SmSEPT10G</i> ..	74
Figura 37 - Cristais de <i>SmSEPT10</i> ..	76
Figura 38 - Estrutura de <i>SmSEPT10G</i> ..	78
Figura 39 - Resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação de <i>SmSEPT10G</i> a GTP e ao Mg^{2+} ..	79
Figura 40 - Diagrama esquemático do mecanismo universal <i>loaded spring</i>	80
Figura 41 - Resíduos de aminoácidos envolvidos na coordenação do íon Mg^{2+} por <i>SmSEPT10</i> (A) e <i>SEPT2</i> (B). C) sobreposição das regiões correspondentes ao switch I em <i>SEPT2</i> (amarelo) e em <i>SmSEPT10</i> (vermelho).	80
Figura 42 - Densidade eletrônica da fita $\beta 3$. Mapas de densidade eletrônica para a fita $\beta 3$ em <i>SmSEPT10G</i> -GDP (A) e <i>SmSEPT10G</i> -GTP (B).	81
Figura 43 - Sobreposição das estruturas de <i>SmSEPT10G</i> ligadas a GTP e GDP.....	82
Figura 44 – Homofilamento de <i>SmSEPT10G</i> presente no cristal.....	84
Figura 45 - Análises de SDS-PAGE e CD do complexo <i>SmSEPT5/10/7.2</i> ..	85
Figura 46 - Purificação do complexo <i>SmSEPT5/10/7.2</i> ..	86

Figura 47 - Espectro de massas do complexo formado por <i>SmSEPT5</i> , <i>SmSEPT10</i> e <i>SmSEPT7.2</i> após digestão com tripsina.	87
Figura 48 - Via de RNA de interferência proposta em <i>Schistosoma mansoni</i>	94
Figura 49 - Estrutura química de forchlorfenuron (FCF).....	95
Figura 50 - Esquema do aparato de perfusão para coletar vermes adultos de <i>S. mansoni</i> da veia porta hepática de camundongos.	97
Figura 51 - Análises de <i>Western blot</i> para avaliação da especificidade dos anticorpos produzidos.....	108
Figura 52 - Imagem representativa de um experimento controle em miracídios.....	109
Figura 53 - Imunolocalização de septinas em camadas superficiais de miracídios e esporocistos..	110
Figura 54 - Imunolocalização de septinas em camada interna de miracídios e esporocistos..	112
Figura 55 - Imunolocalização de septinas em miracídios. Série de 28 seções ópticas tiradas a cada 0,5 µm e projetadas no eixo Z com o software Zen..	113
Figura 56 - Imunolocalização de septinas em esporocistos primários. Série de 28 seções ópticas tiradas a cada 0,5 µm e projetadas no eixo Z com o software Zen.	113
Figura 57 - Imagens representativas da imunolocalização de septinas em cercárias.. ..	114
Figura 58 - Imunolocalização de septinas em esquistossômulos cultivados por dois dias: Seção superficial..	115
Figura 59 - Imunolocalização de septinas em esquistossômulos cultivados por dois dias: Seção interna.....	115
Figura 60 - Imunolocalização de septinas em esquistossômulos cultivados por 14 dias: Seção superficial..	115
Figura 61 - Imunolocalização de septinas em esquistossômulos cultivados por 14 dias: Seção interna.....	115
Figura 62 - Imunolocalização de septinas em esquistossômulos de <i>S. mansoni</i> cultivados por 14 dias. Série de 40 seções ópticas tiradas a cada 0,5 µm e projetadas no eixo Z com o software Zen..	117
Figura 63 - Imagem representativa da imunolocalização de septinas em vermes adultos.	118
Figura 64 - Análise da integridade dos RNAs extraídos de diferentes estágios do ciclo vida de <i>S. mansoni</i>	119
Figura 65- Perfil de expressão das septinas de <i>S. mansoni</i>	120

Figura 66 - Análise da redução dos níveis de RNAm das septinas de <i>S. mansoni</i> após três dias da eletroporação com dsRNA..	122
Figura 67 - Análise da redução dos níveis de RNAm das septinas de <i>S. mansoni</i> após sete dias da eletroporação com dsRNA..	123
Figura 68 - Septinas de <i>S. mansoni</i> se associam para formar filamentos <i>in vitro</i> A) SDS-PAGE das proteínas presentes no complexo. (B-E) Micrografias de complexos de septinas de <i>S. mansoni</i>..	125
Figura 69 - Influência de FCF (25 μM) na polimerização de septinas de <i>Schistosoma mansoni in vitro</i>. Micrografias de complexos de septinas de <i>Schistosoma mansoni</i> utilizando a técnica de coloração negativa..	127
Figura 70 - Influência de FCF (75 μM) na polimerização de septinas de <i>Schistosoma mansoni in vitro</i>. Micrografias de complexos de septinas de <i>Schistosoma mansoni</i> utilizando a técnica de coloração negativa..	129
Figura 71 - Tipos de estruturas encontradas em filamentos de septinas de <i>S. mansoni</i>.	130
Figura 72 - Medidas de DLS indicam que FCF aumenta a velocidade de polimerização de septinas de <i>S. mansoni</i>.	131
Figura 73 - Viabilidade de miracídios após 1h de exposição a 200 μM de FCF.....	133
Figura 74 – Cercária marcada com faloidina após tratamento com FCF.....	135

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
CD	<i>Circular Dichroism</i>
cDNA	Ácido desorribonucleico complementar
CM	Centro de massa espectral
DAF	Diacetato de fluoresceína
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
DO	Densidade óptica
dsRNA	<i>Double strand</i> RNA
DSS	Disuccinimidil suberato
DTT	Ditiotreitol
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
EC	Excitação-contração
EST	<i>Expressed sequence tag</i>
FCF	Forchlorfenuron
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GDP	Guanosina-5'-difosfato
GTP	Guanosina-5'-trifosfato
GTP γ S	Guanosina-5'(γ -tio)trifosfato
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IP	Iodeto de propídio
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
ITC	<i>Isothermal Titration Calorimetry</i>
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MM	Massa molecular
MP	Membrana plasmática
MRW	<i>Mean Residue Weight</i>
Ni-NTA	Resina de níquel e ácido nitrilotriacético
Pb	Pares de bases

PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEG	Polietilenoglicol
PIP ₂	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
RE	Retículo endoplasmático
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNAi	RNA de interferência
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RS	Retículo sarcoplasmático
RT-PCR	<i>Real-Time PCR</i>
SDS	Dodecil sulfato de Sódio
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SOCE	<i>Store-operated calcium entry</i>
STIM-1	<i>Stromal Interaction Molecule 1</i>
TFA	Ácido trifluoroacético
ThT	Tioflavina T
U	Unidades
u.a.	Unidade arbitrária
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO	25
1.1.1 Septinas	25
1.1.2 Estrutura das septinas	26
1.1.3 Septinas em diversos organismos.....	27
1.1.4 Septinas humanas.....	28
1.1.5 <i>Schistosoma mansoni</i> e esquistossomose.....	31
1.1.6 Estágios do ciclo de vida de <i>Schistosoma mansoni</i>	34
1.1.6.1 Ovos	34
1.1.6.2 Miracídeos e esporocistos	34
1.1.6.3 Cercárias	35
1.1.6.4 Esquistossômulos	36
1.1.6.5 Vermes adultos.....	37
1.1.7 Biologia molecular de <i>Schistosoma mansoni</i>	38
1.1.8 Objetivos e justificativa	39
1.2 MATERIAIS E MÉTODOS	40
1.2.1 Clonagem e expressão das septinas de <i>S. mansoni</i>	40
1.2.2 Purificação das septinas de <i>S. mansoni</i>	42
1.2.3 Construção do sistema de coexpressão.....	43
1.2.4 Purificação do complexo recombinante de septinas de <i>S. mansoni</i>	43
1.2.5 Avaliação do estado oligomérico das proteínas	44
1.2.6 Ensaio de atividade GTPásica das septinas de <i>S. mansoni</i>	45
1.2.7 Avaliação da estabilidade frente à variação de pH	46
1.2.8 Estudos de agregação e formação de fibras do tipo β -amilóides	47
1.2.9 Avaliação da ligação aos nucleotídeos de guanina	47
1.2.10 Identificação das Proteínas por Espectrometria de Massas (EM).....	48
1.2.11 Ensaios de cristalização e coleta de dados.....	49
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	50
1.3.1 Septinas de <i>Schistosoma mansoni</i> : identificação e análises bioinformáticas ...	50
1.3.2 Clonagem, expressão e purificação das septinas de <i>S. mansoni</i>	55
1.3.3 Avaliação do estado oligomérico das proteínas	59
1.3.4 Ensaio de atividade GTPásica.....	63
1.3.5 Caracterização biofísica inicial de <i>SmSEPT 7.2</i>	65

1.3.6	Avaliação da estabilidade conformacional frente à variação de pH.....	68
1.3.7	Estudos de agregação e formação de fibras do tipo β -amilóides.....	69
1.3.8	Avaliação da ligação aos nucleotídeos de guanina.....	72
1.3.9	Descrição da estrutura de <i>SmSEPT10G</i>	75
1.3.9.1	Deslizamento da fita β 3.....	81
1.3.10	Expressão, Purificação e Caracterização do complexo de septinas de <i>S. mansonii</i>	84
1.4	CONCLUSÕES DO CAPÍTULO 1	88
CAPÍTULO 2		
2.1	INTRODUÇÃO.....	91
2.1.1	RNA de interferência.....	91
2.1.2	RNA de interferência em <i>Schistosoma mansonii</i>	92
2.1.3	Forchlorfenuron, composto que afeta a dinâmica de septinas	94
2.1.4	Objetivos e justificativa.....	96
2.2	MATERIAIS E MÉTODOS	97
2.2.1	Obtenção de diferentes estágios do ciclo de vida de <i>S. mansonii</i>	97
2.2.2	Imunolocalização de septinas em <i>S. mansonii</i>	98
2.2.2.1	Produção e purificação de anticorpos anti-septinas	98
2.2.2.2	Extração de proteínas de vermes adultos e <i>Western blot</i>	99
2.2.2.3	Protocolo de Imunolocalização	100
2.2.3	RNA de interferência.....	101
2.2.3.1	<i>Primers</i> para a síntese de dsRNA e análises por RT-PCR.....	101
2.2.3.2	Síntese de dsRNAs.....	102
2.2.3.3	Eletroporação dos esquistossômulos	103
2.2.4	Análise da expressão gênica de septinas através de RT-PCR	103
2.2.5	Perfil de expressão de septinas de <i>S. mansonii</i> em diferentes estágios de seu ciclo de vida.....	104
2.2.6	Ensaio com forchlorfenuron, composto que afeta a dinâmica de septinas ..	105
2.2.7	Microscopia eletrônica de transmissão dos filamentos formados e influência de FCF na formação destes filamentos.....	106
2.2.8	Espalhamento dinâmico de luz dos complexos de septinas.....	106
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	107
2.3.1	Imunolocalização de septinas em <i>S. mansonii</i>	107
2.3.1.1	Imunolocalização de septinas em miracídios e esporocistos	109
2.3.1.2	Imunolocalização de septinas em cercárias	114
2.3.1.3	Imunolocalização de septinas em esquistossômulos.....	114
2.3.1.4	Imunolocalização de septinas em vermes adultos	117

2.3.2 Perfil de expressão de septinas de <i>S. mansoni</i> em diferentes estágios do ciclo de vida	118
2.3.3 RNA de interferência	121
2.3.4 Estudos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> com forchlorfenuron, composto que afeta a dinâmica de septinas.....	124
2.3.4.1 Influência de FCF na formação de filamentos de septinas de <i>S. mansoni in vitro</i>	124
2.3.4.2 Avaliação do efeito de FCF em diferentes estágios do ciclo de vida de <i>S. mansoni</i>	132
2.4 CONCLUSÕES DO CAPÍTULO 2	139
3 CONCLUSÕES GERAIS	141
REFERÊNCIAS	143
APÊNDICE A - Sequências das septinas de <i>S. mansoni</i> com domínios e motivos destacados	161
APÊNDICE B - Artigos produzidos durante o período de doutoramento.....	163

CAPÍTULO 1

Caracterização biofísica e estudos
estruturais de septinas de *S. mansoni*

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 Septinas

Septinas são pertencentes à grande família de proteínas que ligam o nucleotídeo de guanina. Foram inicialmente descritas em *Saccharomyces cerevisiae*, em 1971, por Hartwell¹, que identificou mutantes defectivos na divisão celular, particularmente na citocinese. As septinas identificadas (Cdc3, Cdc10, Cdc11, Cdc12) foram encontradas na forma de um heterofilamento, sendo este essencial para a formação do septo na citocinese, daí o nome posteriormente atribuído a esta família de proteínas, septinas, por seu papel na septação.²

As septinas são proteínas filogeneticamente conservadas entre os eucariotos, estando presentes desde leveduras, fungos e algas até complexos metazoários, incluindo o homem, embora ausentes em plantas. O número de genes correspondentes às septinas varia de 1 em algumas espécies de algas³ à 13 em humanos (SEPT1 até SEPT14).⁴ O aumento no número de septinas encontrado em humanos pode ser atribuído à maior variabilidade funcional dessas proteínas em humanos.⁵

Esta família de proteínas é frequentemente encontrada na forma de hetero-oligômeros, que se unem para formar filamentos. Os oligômeros e polímeros de septinas possuem características de componentes do citoesqueleto como a aparência fibrosa, seu alto grau de organização e associação física e funcional com microtúbulos e actina.^{6,7} Os filamentos de septinas estão envolvidos em várias funções celulares como citocinese¹, posicionamento do fuso de divisão⁸, controle do ciclo celular⁹, tráfego de vesículas¹⁰, entre outras.⁴ Além de fornecerem rigidez à membrana celular, os filamentos de septinas servem como suporte para recrutar proteínas para locais subcelulares específicos e podem ainda criar barreiras de difusão na membrana para estabelecer domínios celulares discretos.¹¹

Em células que não estão em divisão, como neurônios e espermatozóides, as septinas também contribuem para a morfogênese celular e compartimentalização celular, possivelmente por seu papel na formação de barreiras de difusão e suporte para a formação de complexos proteicos.¹² A expressão destas proteínas está intimamente relacionada à manutenção da montagem correta dos filamentos e das funções celulares normais. Alterações nas septinas em humanos, causadas por mutações ou mudanças na expressão, têm sido associadas a várias condições patológicas, como câncer e doenças neurológicas como a doença de Alzheimer e de Parkinson.¹³

Apesar do crescente interesse nesta família de proteínas, a diversidade e complexidade de funções que são atribuídas às septinas faz com que diversos dos seus papéis nas células ainda não sejam bem elucidados.

1.1.2 Estrutura das septinas

Septinas pertencem à superclasse das P-loop GTPases e compartilham uma estrutura básica: uma região N-terminal variável, um domínio GTPase, responsável pela ligação e (na maioria das vezes) hidrólise de GTP e uma região polibásica, situada na extremidade do domínio amino terminal, antes do início do domínio GTPase, a qual se atribui a associação de septinas com fosfolipídeos na membrana plasmática. Na maioria das septinas ainda há uma região *coiled-coil* no domínio C-terminal, que pode mediar interações septina-septina ^{2,14} (Figura 1).

O domínio GTPase possui três motivos conservados: G1, G3 e G4. G1 (GxxxxGK[ST]) forma um *loop* que interage com o grupo fosfato do nucleotídeo, sendo o mais conservado entre septinas (Figura 1). O motivo G3 (DxxG) se liga a Mg^{2+} e interage com fosfatos β e γ do GTP. Já o motivo G4 (xKxD) determina especificidade à ligação do GTP. ²

Também foram descritas regiões conservadas em septinas que não possuem uma função conhecida, como o elemento único de septinas (do inglês SUE, *Septin Unique Element*) identificado por Versele e Thorner ¹⁵, o qual consiste em uma região de 53 aminoácidos localizados na extremidade C-terminal do domínio GTPase. A análise de 162 septinas mostrou que cerca da metade dos resíduos desta região são conservados em 50-93% das septinas. ²

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura típica de septinas. Regiões da proteína representadas por retângulos indicam regiões conservadas em septinas. SUE- *Septin Unique Element*. Fonte: adaptado de Hall et al. ²

1.1.3 Septinas em diversos organismos

Saccharomyces cerevisiae foi o primeiro organismo em que esta família de proteínas foi descrita, denominadas CDC (*cell division cycle*) por serem responsáveis por defeitos na citocinese quando inativadas.¹

Sete septinas foram encontradas em *S. cerevisiae*. Duas são expressas durante a meiose (Spr3 e Spr28)^{16,17} e cinco são expressas em células mitóticas: Cdc3, Cdc10, Cdc11, Cdc12 e Shs1/Sep7, destas, apenas Shs1 se mostrou não essencial para a viabilidade celular. Já que mutantes dessas proteínas são comumente defectivos na citocinese e na formação dos filamentos constituídos por anéis de septinas, estas proteínas têm sido consideradas os constituintes primários dos filamentos encontrados no septo de divisão.¹⁸

As quatro septinas essenciais: Cdc3, Cdc10, Cdc11, Cdc12 formam um complexo hetero-oligomérico contendo duas cópias de cada proteína, formando um octâmero com a seguinte organização: Cdc11–Cdc12–Cdc3–Cdc10–Cdc10–Cdc3–Cdc12–Cdc11. O anel formado pelo filamento de septinas em *S. cerevisiae* foi associado a vários processos celulares, como divisão celular, controle do ciclo celular, e compartimentalização de organelas.^{18,19}

Caenorhabditis elegans possui dois genes que codificam septinas: *unc-59* e *unc-61*. A denominação *unc* deriva de *uncoordinated*, pois vermes mutantes para cada um dos genes de septinas (*unc-61* e *unc-59*) foram originalmente identificados por sua locomoção anormal.^{20,21}

Embora *C. elegans* apresente defeitos no desenvolvimento com a depleção de septinas, consegue sobreviver e se reproduzir, indicando que embora não sejam essenciais para a divisão celular, parecem fazer a citocinese mais robusta.²² Ambas as septinas de *C. elegans* são expressas em neurônios nas fases embrionárias e de larva, mas estão ausentes da maioria dos neurônios em adultos, o que sugere que estas proteínas possam estar envolvidas no desenvolvimento do verme. Além disso, já foi descrito que ambas estão envolvidas na orientação do axônio e gonadogênese.²³

UNC-59 e UNC-61 formam um complexo heterotetramérico UNC-59/UNC-61/UNC-61/UNC-59²⁴ que permite sua adequada localização e função.²⁵ Este complexo é capaz de se associar em estruturas altamente ordenadas em células e filamentos *in vitro*. *Drosophila melanogaster* apresenta cinco genes codificantes de septinas, o primeiro deles a ser identificado recebeu o nome de *pnut*, já que algumas células mutantes defectivas para este

gene, que apresentaram falha na citocinese, continham vários núcleos, como amendoim na casca.²⁶

As proteínas codificadas por estes cinco genes são: Pnut, Sep1, Sep2, Sep4, e Sep5. O complexo isolado de *D. melanogaster* possui apenas Pnut, Sep1 e Sep2, na proporção 1:1:1.²⁷ O modelo deste complexo consiste em um heterotrímero de homodímeros de septinas. Pnut, Sep1, e Sep2 se encontram concentradas no sulco de clivagem durante a citocinese, demonstrando sua importância neste processo. Além disso, as altas concentrações de septinas no sistema nervoso central de células de *Drosophila* indicaram que estas poderiam ter papéis no tráfego de vesículas, evidenciando pela primeira vez um papel não relacionado à citocinese.^{26,27}

1.1.4 Septinas humanas

A família de septinas humanas compreende 13 membros, os quais podem ser classificados em quatro subgrupos, de acordo com a identidade de sua sequência de aminoácidos: subgrupo SEPT3 (SEPT3, SEPT9 e SEPT12), subgrupo SEPT2 (SEPT2, SEPT1, SEPT4, SEPT5), subgrupo SEPT7 (SEPT7) e subgrupo SEPT6 (SEPT6, SEPT8, SEPT10, SEPT11, SEPT14). SEPT13 foi posteriormente caracterizada como um pseudogene.^{4,28} De acordo com Kinoshita²⁸, cada membro de um complexo de septinas pode ser substituído por outro membro pertencente ao mesmo subgrupo na estrutura de um heterofilamento. Por exemplo, SEPT1, SEPT2, SEPT4 ou SEPT5 poderiam formar um complexo com SEPT6/7. SEPT6 seria substituível por SEPT11, SEPT8, SEPT10 ou SEPT14. Enquanto SEPT7 é a única que não seria substituível, pois é a única em seu subgrupo. A divisão de septinas humanas nos subgrupos proposta por Kinoshita é apresentada na Figura 2.

Além disso, septinas humanas apresentam um complexo padrão de expressão e podem produzir um grande número de variantes de *splicing*. Os heterocomplexos de septinas possuem membros pertencentes a diferentes subgrupos em sua composição.⁵ Estes heterocomplexos podem apresentar-se hexaméricos ou octaméricos e associam-se para formar filamentos e outras estruturas com alto grau de organização.²⁹

Figura 2 - Análise filogenética de septinas humanas. Fonte: Kinoshita²⁸

Posteriormente, Cao et al³⁰ expandiu a classificação feita por Kinoshita ao verificar a presença de representantes de septinas nos quatro subgrupos pré-definidos para humanos em invertebrados. Tal classificação foi abrangida para os metazoários e foi sugerido que a emergência dos quatro subgrupos tenha sido anterior à divisão de invertebrados e vertebrados. A análise filogenética realizadas por Cao et al com nove representantes de metazoários é apresentada na Figura 3.

Phylogenetic analysis
by Neighbor-Joining method

Figura 3 - Análise filogenética de septinas em metazoários. Hs, *Homo sapiens*; Mm, *Mus musculus*; Gg, *Gallus gallus*; Xl, *Xenopus laevis*; Dr, *Danio rerio*; Ci, *Ciona intestinalis*; Sp, *Strongylocentrotus purpuratus*; Ce, *Caenorhabditis elegans*; Dm, *Drosophila melanogaster*. Fonte: Cao et al.³⁰

A redundância e possível plasticidade que as septinas humanas possuem podem contribuir para diversificar os complexos, mas ainda não é claro se estes complexos de diferentes composições têm funções distintas.²⁸

O filamento de septinas humanas SEPT6/SEPT7/SEPT2/SEPT2/SEPT6/SEPT7 composto por um hexâmero como unidade básica é o único complexo de septinas que possui a estrutura tridimensional descrita até o momento.³¹ Posteriormente, uma fração deste complexo de septinas foi identificada como octâmeros, com SEPT9 nas extremidades do hexâmero já descrito.²⁹

Dentre as funções atribuídas às septinas em humanos estão: citocinese e segregação dos cromossomos durante a mitose³², movimento celular e tráfego de vesículas¹⁰, remodelamento de membrana e participação em barreiras de difusão^{7,11} e apoptose.³³ Além de serem considerados novos componentes do citoesqueleto, sendo frequentemente encontradas em associação com filamentos de actina e tubulina.³⁴

Alterações na estrutura e/ou expressão de septinas têm sido associados com vários tipos de câncer. Algumas septinas têm sido identificadas em associação com MLL (*mixed lineage leucemia*) em leucemias³⁵ enquanto alguns genes de septinas são superexpressos em alguns tipos de câncer e inativos em outros. Além da associação de septinas com doenças neurodegenerativas.¹³

1.1.5 *Schistosoma mansoni* e esquistossomose

A esquistossomose é uma infecção antiga na humanidade, ovos de esquistossomos foram encontrados em múmias egípcias e chinesas. Os primeiros relatos da parasitose datam de 1847, no Japão e em 1852, no Egito. Em 1907, o inglês Sambon descreveu a espécie *Schistosoma mansoni*, independente deste, o brasileiro Pirajá da Silva descreveu a mesma espécie e a denominou *Schistosoma americanum*, mas coube a Sambon a denominação da espécie.^{36,37}

No Brasil, a introdução de *S. mansoni* é atribuída à importação de escravos africanos que traziam consigo o parasito. A presença de hospedeiros intermediários suscetíveis (caramujos do gênero *Biomphalaria*) permitiu o estabelecimento desta espécie no país.^{36,37}

A esquistossomose é hoje uma doença tropical negligenciada que afeta cerca de 210 milhões de pessoas em 76 países, atingindo principalmente países da África, Ásia e América Latina.^{38,39} O sucesso na erradicação deste parasito tem sido limitado, e, além disso, existe a preocupação quanto à emergência de resistência ao praziquantel, principal droga de combate à doença.⁴⁰ Além de a reinfecção ser muito comum em áreas endêmicas, onde o saneamento é precário.

Os principais agentes etiológicos da esquistossomose são *S. haematobium*, *S. mansoni*, *S. japonicum*, a Figura 4 ilustra a distribuição global da doença e as espécies associadas. *Schistosoma mansoni* é o principal agente etiológico da esquistossomose no continente americano.⁴¹

Figura 4 - Distribuição global da esquistossomose. Fonte: Gryseels et al.⁴¹

S. mansoni pertence ao Filo Platyhelminthes, à classe Trematoda, subclasse Digenea e família *Schistosomatidae*. Possui um ciclo de vida complexo, envolvendo vários estágios, e que incluem associação a um hospedeiro vertebrado e a outro invertebrado. É um platelminto dióico, ou seja, possui formas morfológicas distintas para os vermes adultos macho e fêmea.^{36,37}

O ciclo de vida deste parasito se inicia com ovos presentes em fezes de pessoas contaminadas, que passam a eclodir na presença de água limpa. Este processo libera o miracídio, que é uma larva ciliada que penetra no hospedeiro intermediário, os caramujos do gênero *Biomphalaria*. Neste hospedeiro, os miracídios se diferenciam em esporocistos, que, depois de um período de proliferação assexuada no caramujo, evoluem para um segundo estágio de larva aquática, a cercária, responsável pela infecção de humanos.^{36,37}

As cercárias, ao encontrarem um hospedeiro, penetram na pele e ao perderem a sua cauda neste processo, se transformam em esquistossômulos. Inicialmente estes esquistossômulos migram pela derme até o sistema circulatório. Em poucos dias se alojam nas veias do pulmão onde sofrem um processo de maturação e migram até o sistema porta-hepático para completar seu desenvolvimento e se tornarem vermes adultos.⁴¹

A maturidade sexual é atingida após 4 a 6 semanas, neste estágio a fêmea, menor, se aloja no sulco ventral do macho. Desta forma, a fêmea pode produzir até 3000 ovos por dia, a maioria destes penetra na parede intestinal, passa para o lúmen intestinal e é excretada nas fezes (reiniciando o ciclo em ambientes sem saneamento). Entretanto alguns ovos se direcionam para o fígado, onde desencadeiam uma resposta imune que evolui para a formação de um granuloma e fibrose peri-portal, uma das principais complicações da esquistossomose. O tempo de vida de um schistosoma adulto é geralmente de 3 a 5 anos, mas eles podem viver por até 30 anos no hospedeiro.⁴¹

O ciclo de vida das principais espécies de *Schistosoma* é representado na Figura 5.

Figura 5 - Ciclo de transmissão da esquistossomose. A) Vermes adultos pareados; B) Ovos (da direita para a esquerda, *S. haematobium*, *S. mansoni*, *S. japonicum*); C) Miracídeos; D) Caramujos hospedeiros intermediários (da esquerda para a direita, *Oncomelania*, *Biomphalaria*, *Bulinus*); E) Cercárias. Fonte: Gryseels et al.⁴¹

1.1.6 Estágios do ciclo de vida de *Schistosoma mansoni*

1.1.6.1 Ovos

Os ovos de *Schistosoma mansoni* possuem cerca de 150 μm de comprimento e 60 μm de diâmetro e apresentam um espinho lateral característico. Os ovos são colocados imaturos e levam cerca de sete dias para amadurecer, o ovo maduro é caracterizado pela presença de um miracídio formado, visível pela transparência da casca (Figura 6 B). Nas fezes do homem, 90 a 95% dos ovos são maduros e em contato com a água incham e eclodem, liberando os miracídios.^{36,37}

Figura 6 - Imagens de ovos maduros de *S. mansoni*. A) ovos de *Schistosoma mansoni* mantidos em meio de cultivo após extração do fígado de ratos infectados (Imagem obtida com baixa magnificação). B) Imagem em maior magnificação permitindo a observação do miracídio no interior dos ovos. Imagens adquiridas com um microscópio invertido Zeiss Axio Observer A.1 acoplado a uma câmera AxioCam ICc3 (Carl Zeiss) com objetivas de 5 e 40 x.

1.1.6.2 Miracídios e esporocistos

Os miracídios são larvas aquáticas de vida livre que possuem vida independente breve (poucas horas) a procura de um hospedeiro, caramujos do gênero *Biomphalaria*, no caso de *S. mansoni*.⁴¹

Após a penetração pelo tegumento do caramujo, os miracídios perdem o epitélio ciliado, as glândulas de penetração e outras estruturas. As células remanescentes se

reorganizam e, dentro de 48 horas, se transformam em um “saco” alongado, chamado de esporocisto primário, repleto de células germinativas.^{36,42}

Os esporocistos primários, pela multiplicação de suas células germinativas, produzirão esporocistos secundários. Estes esporocistos rompem as membranas dos primários e se dirigem para o hepatopâncreas e gônadas do caramujo. Nesses locais, cada esporocisto secundário produzirá um grande número de cercárias. No molusco, a formação de cercárias ocorre por reprodução assexuada e é estimado que um miracídio seja capaz de gerar até 100.000 cercárias, sempre do mesmo sexo.³⁶

Na Figura 7 podem ser observados miracídios (A) e esporocistos cultivados por dois dias (esporocistos primários), algumas placas epiteliais ciliadas liberadas pelos esporocistos encontram-se destacadas na Figura 7 B.

Figura 7 - Microscopia de campo claro de miracídios (A) e esporocistos (B). As placas epiteliais ciliadas liberadas pelos esporocistos apresentam-se distribuídas por toda a imagem, três delas encontram-se circuladas em vermelho (B). Imagens adquiridas com um microscópio invertido Zeiss Axio Observer A.1 acoplado a uma câmera AxioCam ICc3 (Carl Zeiss) com uma objetiva de 10 x.

1.1.6.3 Cercárias

As cercárias, assim como os miracídios, são larvas de vida livre que procuram um hospedeiro (Figura 8). A partir da quarta semana após a infecção do caramujo com miracídios, cercárias começam a ser liberadas, e vivem por até 72 h em água à busca de um hospedeiro definitivo adequado.⁴¹ Possuem cinco pares de glândulas de secreção. Três pares denominados pós-acetabulares e dois pré-acetabulares, tais glândulas ocupam a maioria do volume da cabeça das cercárias e atuam na liberação de proteases responsáveis pela hidrólise de proteínas presentes na pele do hospedeiro, sendo essenciais para sua penetração. As

cercárias apresentam uma cauda característica bifurcada na extremidade (Figura 8 B) que auxilia a penetração no hospedeiro, esta cauda é liberada assim que as cercárias entram no hospedeiro.⁴³

Figura 8 - Microscopia de campo claro de cercárias. A) Imagens de cercárias obtidas em baixa magnificação (objetiva de 5 x). É possível observar muitas cercárias sem cauda, a qual é facilmente perdida com a manipulação e cultivo destes organismos. B) Imagem de cercária em maior magnificação (objetiva de 20 x) que permite visualizar a cauda bifurcada. Imagens adquiridas com um microscópio invertido Zeiss Axio Observer A.1 acoplado a uma câmera AxioCam ICc3 (Carl Zeiss).

1.1.6.4 Esquistossômulos

O esquistossômulo é o estágio do ciclo de vida de *S. mansoni* que se desenvolve a partir da cercária, após a penetração no hospedeiro definitivo. Os esquistossômulos se adaptam às condições fisiológicas do meio interno, permanecem na pele por dois ou três dias, período em que terminam de eliminar enzimas líticas de suas glândulas. A migração dos esquistossômulos ocorre geralmente pelo sistema vascular sanguíneo e aqueles que conseguem penetrar nos vasos são transportados aos pulmões, onde se tornam mais delgados e longos (~ 400 µm de comprimento). Os esquistossômulos nas artérias pulmonares e nos capilares alveolares atingem o coração e são disseminados pelo organismo, aqueles que atingem o sistema porta intra-hepático sobrevivem e se transformam em vermes adultos após cerca de 30 dias da penetração no hospedeiro.^{36,37}

A Figura 9 A ilustra um esquistossômulo cultivado por dois dias enquanto é possível observar a aparência delgada e mais alongada dos esquistossômulos cultivados por quatorze dias na Figura 9 B.

Figura 9 - Microscopia de campo claro de esquistossômulos. A) Imagem de esquistossômulos cultivados por dois dias. B) Esquistossômulos cultivados por quatorze dias; é possível observar que estes são mais alongados. Imagens adquiridas com um microscópio invertido Zeiss Axio Observer A.1 acoplado a uma câmera AxioCam ICc3 (Carl Zeiss) com objetiva de 5 x.

1.1.6.5 Vermes adultos

Os vermes adultos, ilustrados na Figura 10, medem em torno de 6 a 13 mm de comprimento por 1,1 mm de largura, no caso dos machos (Figura 10 A) ou 10 a 20 mm de comprimento por 0,16 mm de largura, as fêmeas (Figura 10 B) e localizam-se no sistema porta hepático do hospedeiro definitivo. O macho apresenta coloração esbranquiçada com o tegumento recoberto de minúsculas projeções, os tubérculos, seu corpo é dividido em duas porções: anterior, na qual se encontra a ventosa oral e ventral (acetábulo), e a posterior, em que se localiza o canal ginecóforo, uma dobra longitudinal do corpo do verme onde a fêmea fica alojada. O macho possui de sete a nove massas testiculares e não possui órgão copulador, a cópula ocorre pela justaposição dos orifícios genitais feminino e masculino quando a fêmea se encontra no canal ginecóforo.^{36,37}

A fêmea apresenta tegumento liso e é mais fina e longa que o macho, tem a cor mais escura devido ao ceco com sangue semidigerido. Na parte anterior do corpo encontram-se a ventosa oral e ventral. A vulva e o útero (com um ou dois ovos) encontram-se em seguida e a parte posterior é ocupada pelas glândulas vitelinas e o ceco. Os vermes adultos nutrem-se de sangue venoso do hospedeiro.^{36,37}

Figura 10 - Microscopia de campo claro de verme adulto macho (A) e fêmea (B). Imagens adquiridas com um microscópio invertido Zeiss Axio Observer A.1 acoplado a uma câmera AxioCam ICc3 (Carl Zeiss) com objetiva de 5 x.

1.1.7 Biologia molecular de *Schistosoma mansoni*

Alguns dos maiores obstáculos à pesquisa deste parasito são a complexidade de seu ciclo de vida, a complexidade dos tecidos e a escassez de métodos genéticos e transgênicos para a manipulação de genes de interesse.⁴⁴ A recente publicação do genoma do *S. mansoni*⁽⁴⁵⁾ revelou que este possui um genoma relativamente grande e complexo, possuindo 363 milhões de bases (cerca de três vezes o tamanho do genoma de *C. elegans* e 1/10 do tamanho do genoma humano) divididas em oito pares de cromossomos, sendo sete pares de autossomos e um par de cromossomos sexuais. Sequências repetitivas compreendem 40% do genoma de *S. mansoni*.⁴⁵

Foram identificados 11.809 genes codificando 13.197 transcritos⁴⁵, o que tem permitido avanços na pesquisa com este parasito. Assim foi possível a identificação dos genes correspondentes às septinas neste organismo e o estudo das proteínas codificadas por estes genes.

1.1.8 Objetivos e justificativa

A variedade e complexidade de funções atribuídas às septinas torna o estudo desta família de proteínas bastante atrativo. A recente publicação do genoma de *S. mansoni* nos permitiu a identificação de septinas até então não descritas neste importante parasito, o que nos estimulou a iniciar o estudo de tais proteínas.

Os estudos descritos neste capítulo tiveram como objetivo a caracterização estrutural das septinas de *S. mansoni*, incluindo tanto estudos com septinas individuais quanto estudos com um complexo de septinas de *S. mansoni*.

Especificamente, buscou-se:

- i. Clonar, expressar em sistema heterólogo e purificar as septinas de *S. mansoni*;
- ii. Realizar estudos de estabilidade estrutural destas proteínas por dicroísmo circular e fluorescência;
- iii. Realizar ensaios de cristalização com as proteínas obtidas;
- iv. Verificar a tendência das proteínas estudadas em formar agregados e fibras do tipo β -amilóide;
- v. Avaliar a atividade GTPásica das septinas de *S. mansoni*, bem como a ligação destas proteínas aos nucleotídeos de guanina (GTP e GDP).
- vi. Coexpressar e copurificar diferentes septinas de *S. mansoni* e verificar a formação de complexos e filamentos por estas proteínas;
- vii. Caracterizar por meio de técnicas biofísicas o complexo obtido.

1.2 MATERIAIS E MÉTODOS

1.2.1 Clonagem e expressão das septinas de *S. mansoni*

Os cDNAs correspondentes a *SmSEPT5*, *SmSEPT10*, *SmSEPT7.1* e *SmSEPT7.2* foram amplificados por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se como molde cDNA obtido a partir de RNAm extraído de vermes adultos de *S. mansoni*.

Os *primers* utilizados (Tabela 1) para a reação de PCR foram sintetizados (IDT – Integrated DNA technologies) de forma a introduzir sítios de restrição e flanquear a região de interesse. Tais primers foram "desenhados" de acordo com sequências depositadas no *GeneBank*, com números de acesso: XM_002575418.1, XM_002574386.1, XM_002571778.1 e XM_002577258.1, correspondendo às septinas *SmSEPT5*, *SmSEPT10*, *SmSEPT7.1* e *SmSEPT7.2*, respectivamente e também de acordo com os transcritos contidos no banco de ESTs (tal procedimento é descrito em detalhes no item 1.3.1).

Tabela 1 - Primers utilizados nas reações de amplificação de *SmSEPT5*, *SmSEPT10*, *SmSEPT7.1* e *SmSEPT7.2*

Primer e enzima de restrição correspondente	Sequência
<i>SmSept5-Fw</i> (<i>NheI</i>)	5' <u>GCTAGCATG</u> GCA AAT ATT CCG CGT TTT GG 3'
<i>SmSept5-Rv</i> (<i>BamHI</i>)	5' <u>GGATCCTCAAGACGCTTGTG</u> ACCAGTTAC 3'
<i>SmSept10-Fw</i> (<i>NheI</i>)	5' <u>GCTAGCATGACTGCAGATGTTCT</u> AAAAGCATTG 3'
<i>SmSept10-Rv</i> (<i>BamHI</i>)	5' ACTAGCTGTACTCTCGTCAGGATCCTTATTTCC 3'
<i>SmSept7.1-Fw</i> (<i>NdeI</i>)	5' <u>CATATGGTGACTG</u> TAGTTTCTCG AAATGTC 3'
<i>SmSept7.1-Rv</i> (<i>BamHI</i>)	5' <u>GGATCCTCAAAATAATCCCTTGCGTTTAATTCG</u> 3'
<i>SmSept7.2-Fw</i> (<i>NdeI</i>)	5' <u>CATATGTCTTATCAGTCTCCACTTCACAATG</u> 3'
<i>SmSept7.2-Rv</i> (<i>BamHI</i>)	5' TCAAGGACATATTTTTTGGATCCTTAGAAAAGACC 3'

* As regiões sublinhadas correspondem ao sítio de reconhecimento da enzima de restrição.

Para a reação de amplificação dos transcritos foram utilizados 0,5 µg de cDNA, 0,2 µM de cada *primer*, 0,2 mM de dNTP, 5 unidades de *High Fidelity Enzyme Mix* (Fermentas), 5 µL de *High Fidelity Buffer* com MgCl₂ 10X, (Fermentas) e água Milli-Q para um volume final de 50 µL. A reação realizada em um termociclador (*Applied Biosystems*) consistiu de

uma desnaturação inicial do DNA por aquecimento a 94 °C por 3 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, realizados respectivamente a 94 °C (30 s), 55 °C (30 s) e 72 °C (2 min). Ao final dos 35 ciclos seguiu-se uma extensão final de 10 minutos e manutenção desta reação a 4 °C até o procedimento de purificação do produto amplificado.

A amplificação dos transcritos de interesse foi confirmada por eletroforese em gel de agarose (0,8%) e estes foram purificados utilizando-se o kit *Wizard SV gel and pCR clean up system* (Promega), segundo as orientações do fabricante.

Em seguida, estes transcritos foram inseridos no plasmídeo pTZ57R/T (Fermentas) por meio de ligação contendo 100 ng do produto de PCR, 80 ng do vetor, 1 µL do tampão de reação (10 X), 1 µL da enzima T4 DNA Ligase (5 u/ µL) e água Milli-Q para 10 µL totais. A reação foi incubada por 16 h a 4 °C.

Células de *E. coli* DH5- α , competentes por tratamento com CaCl₂ ⁴⁶, foram transformadas de modo a captarem o plasmídeo recombinante. Para isso, depois de incubadas com os plasmídeos por 30 minutos foram submetidas a um choque térmico, propagadas em meio de cultura LB (Luria-Bertani) por 1 h a 37 °C e plaqueadas em meio LB agar contendo ampicilina (50 µg/mL), IPTG (isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo) 0,3 mM e X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosídeo) 32 µg/mL. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 16 h.

As colônias brancas (clones positivos) foram selecionadas e, após crescimento por cerca de 16 h a 37 °C em meio LB contendo ampicilina (50 µg/mL), o DNA plasmidial destas células foi extraído utilizando-se o kit *Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification Systems* (Promega) de acordo com as orientações do fabricante.

A confirmação da presença do inserto de interesse foi realizada por análise de restrição, utilizando-se as enzimas *NheI* e *BamHI* (Fermentas) para *SmSEPT5* e *SmSEPT10* e *NdeI* e *BamHI* (Fermentas) para *SmSEPT7.1* e *SmSEPT7.2*. A reação de digestão foi preparada com 1 µg de DNA plasmidial, 10 U de cada enzima de restrição e tampão Tango (Fermentas), em concentração adequada para cada enzima, o volume da reação foi completado para 50 µL com água Milli-Q e incubado em estufa por 3 h.

Selecionado um clone positivo para cada proteína, estes foram submetidos à reação de sequenciamento utilizando-se o método de Sanger. ⁴⁷ Para isso foi utilizado um sequenciador automático 3130 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) e *primers* correspondentes à sequência do vetor pTZ57R/T. A sequência obtida foi analisada com o auxílio dos programas *Phred-Phrap* e BLAST.

A subclonagem dos cDNAs de interesse foi realizada de modo que estes fossem transferidos para o vetor de expressão em bactéria pET28a(+) (Novagem). Para isso foi realizada uma digestão dos insertos no vetor pTZ57R/T e a linearização do vetor pET28a(+) (com as mesmas enzimas usadas anteriormente). A purificação dos produtos de digestão, com a utilização do kit *Wizard SV gel and pCR clean up system* (Promega), e a ligação de cada inserto no vetor de expressão foi realizada seguindo o mesmo protocolo descrito anteriormente.

Confirmada a presença de cada inserto no vetor pET28a(+) por análise de restrição, os plasmídeos foram transformados em linhagem de expressão *E. coli* Rosetta (DE3). Uma colônia desta placa foi inoculada em 5 mL de meio LB contendo canamicina (50 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL). Após 16 h a 37 °C sob agitação (250 rpm), este pré-inóculo foi diluído na proporção 1:50 em meio de cultura LB contendo os mesmos antibióticos. As septinas foram então expressas por indução da suspensão celular com IPTG (0,4 mM) ao atingirem 0,6-0,8 de DO_{600 nm}, sendo a seguir incubadas por 16 h a 18 °C, sob agitação (250 rpm). A expressão das proteínas de interesse foi confirmada por SDS-PAGE (15%).

1.2.2 Purificação das septinas de *S. mansoni*

Após o período de expressão, a suspensão celular foi centrifugada a 10.000 g por 30 min a 4 °C. As células foram ressuspensas em 30 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contendo 800 mM de NaCl, 10% de glicerol e 5 mM de β-mercaptoetanol (tampão A). Alíquotas de 5 mL da suspensão celular foram lisadas por sonicação em 10 ciclos de 25 segundos, seguidos de 35 segundos de intervalo, em banho de gelo.

As proteínas solúveis foram separadas do *pellet* por centrifugação (20.000 g por 20 min a 4 °C). Seguiu-se a etapa de cromatografia de afinidade, em que o sobrenadante foi incubado em uma coluna (previamente equilibrada com o tampão A) com 2 mL de resina de Ni-NTA (Qiagen) por 30 min a 4 °C.

Após a passagem do sobrenadante, a resina foi lavada com 30 mL de tampão A, seguida por uma segunda lavagem com 30 mL de mesmo tampão, porém com uma menor concentração salina, 300 mM de NaCl (tampão B), e uma última lavagem foi realizada com 100 mL do tampão B, acrescido de 10 mM de imidazol. A eluição das proteínas de interesse foi realizada em 5 mL de tampão B contendo 500 mM de imidazol.

A etapa seguinte do processo de purificação consistiu em cromatografia de exclusão molecular, utilizando-se uma coluna Superdex 200 (HR 10/30 GE *Healthcare*) acoplada ao sistema *AKTA purifier* (GE *Healthcare*). Alíquotas de 1 mL foram aplicadas neste sistema e alíquotas também de 1 mL foram coletadas. O tampão B foi utilizado como fase móvel com um fluxo de 0,5 mL/min e a eluição das frações de interesse foi acompanhada por absorbância em 280 nm. Alíquotas foram retiradas em cada etapa do processo para avaliação por SDS-PAGE.

A determinação da concentração proteica foi realizada por medidas de absorbância a 280 nm, com base no coeficiente de extinção calculado a partir da sequência de aminoácidos das proteínas, utilizando-se o programa ProtParam.⁴⁸

1.2.3 Construção do sistema de coexpressão

A fim de verificar se as septinas de *S. mansoni* formavam heterocomplexos, um sistema de coexpressão foi construído através do uso de vetores bicistrônicos, (que possuem dois múltiplos sítios de clonagem). O cDNA que codifica *SmSEPT10* foi inserido no vetor pACYCDuet-1 (Novagen), nos sítios *BglII* e *XhoI*, enquanto *SmSEPT5* e *SmSEPT7.2* foram inseridos no vetor pETDuet-1, nos sítios *BglIII*, *XhoI* e *NcoI*, *BamHI*, respectivamente. Apenas a construção referente à *SmSEPT7.2* foi fusionada à uma cauda de histidina na extremidade N-terminal.

A linhagem competente de *E. coli* BL21 (DE3) foi cotransformada com os dois plasmídeos e as colônias crescidas em meio contendo cloranfenicol (34 µg/mL) e ampicilina (50 µg/mL). A expressão das proteínas foi realizada por indução com 0,4 mM de IPTG de uma suspensão celular em meio LB (Luria Broth - 2 a 6 litros de cultura) por 16 h a 18 °C.

1.2.4 Purificação do complexo recombinante de septinas de *S. mansoni*

A suspensão celular foi centrifugada (10.000 g por 30 min a 4 °C) e o *pellet* foi ressuspensão em 50 mL de tampão com a seguinte composição: 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 500

mM NaCl, 12% de glicerol, 10 mM β -mercaptoetanol (tampão C). As células foram submetidas ao mesmo processo de lise descrito no item 1.2.2 e então incubadas em coluna contendo 2 mL de resina de cobalto (TALON *Metal Affinity Resin*, BD Clontech). A purificação utilizando esta resina se mostrou mais eficiente quando comparada à purificação em coluna com resina de níquel. Seguiram-se etapas de lavagem com 50 mL de tampão C; 50 mL de tampão C contendo 0,2% de Tween-20; 50 mL de tampão C sem detergente; 10 mL de tampão contendo 4 mM de imidazol e eluição em tampão contendo 500 mM de imidazol. A etapa posterior de purificação por cromatografia de exclusão molecular foi também realizada utilizando-se a coluna Superdex 200 (HR 10/30 GE *Healthcare*) conforme descrito no item 1.2.2.

1.2.5 Avaliação do estado oligomérico das proteínas

A cromatografia de exclusão molecular ou filtração em gel nos permitiu, além de uma purificação adicional das proteínas de interesse, a obtenção da massa molecular aparente através do volume de eluição de cada proteína. Para isso foi construída uma curva de calibração utilizando-se dois *kits* contendo marcadores de massa molecular (GE *Healthcare*), de acordo com as instruções do fabricante, um contendo padrões de proteínas de alta massa molecular e o segundo correspondendo a proteínas de baixa massa molecular.

A curva de calibração foi construída em termos de K_{av} , calculado considerando-se o volume de eluição de cada proteína (V_e), (volume no qual a absorbância é máxima), o volume do *void* da coluna (V_o), correspondendo ao volume de eluição do *blue dextran* e o volume da coluna (V_c), igual a 24 mL, segundo a equação 1.

$$K_{av} = (V_e - V_o) / (V_c - V_o) \quad (1)$$

Para verificar se a presença de nucleotídeos alterava o estado oligomérico das proteínas, estas foram incubadas com um excesso de três vezes de GDP e GTP γ S (análogo não hidrolisável do GTP), por 1 h a 20 °C e então submetidas novamente à cromatografia de exclusão molecular da mesma forma descrita anteriormente.

Além disso, uma técnica adicional para a verificação do estado oligomérico das proteínas foi utilizada. Experimentos de *cross-linking* químico foram realizados com as

proteínas purificadas em tampão HEPES 50 mM pH 8,0, contendo 300 mM de NaCl, 10% de glicerol e 5 mM de β -mercaptoetanol.

Uma solução estoque (100 mM) de disuccinimidil suberato (DSS) foi preparada em dimetilsulfóxido (DMSO). 10 μ M de cada proteína foram incubados em banho de gelo por 1 h com DSS em concentrações de 0,5 a 5 mM. O produto de tais reações foi submetido à análise por eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE), em gel de poliacrilamida 10%.

1.2.6 Ensaio de atividade GTPásica das septinas de *S. mansoni*

Por meio de cromatografia de troca iônica, utilizando-se uma coluna de troca aniônica *Protein Pack DEAE-5PW*, 7,5 x 75 mm (*Waters*) acoplada a um sistema de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), foi possível separar os nucleotídeos GTP e GDP e desta forma avaliar a possível hidrólise do primeiro, bem como a presença destes nucleotídeos na proteína recombinante produzida.

O ensaio de atividade GTPásica foi realizado com três vezes excesso de GTP (15 μ M de cada proteína e 45 μ M de GTP) na presença de 5 mM de $MgCl_2$. A proteína foi incubada com o nucleotídeo a 20 °C e alíquotas foram retiradas e congeladas a -80 °C (para posterior análise) em diferentes intervalos de tempo.

Alíquotas também foram retiradas durante o procedimento de purificação (após a cromatografia de afinidade e após a cromatografia de exclusão molecular) e estas foram submetidas ao mesmo tratamento de extração de nucleotídeo: as proteínas foram inicialmente desnaturadas pela adição de $HClO_4$ (concentração final 0,5 M), deixadas 10 min em banho de gelo. Após centrifugação (10 min, 16.000 g 4 °C), o sobrenadante foi neutralizado e tamponado pela adição de K_2HPO_4 (concentração final 0,17 M), ácido acético (concentração final 0,5 M) e KOH (concentração final 0,5 M), as amostras foram congeladas a -20 °C até a análise.⁴⁹

Depois de descongeladas, as amostras foram centrifugadas (10 min, 16.000 g, a 4 °C) e alíquotas de 200 μ L foram aplicadas na coluna, submetidas a um gradiente de NaCl formado a partir da mistura do tampão 1 (Tris-HCl 50 mM pH 8,0) e tampão 2 (Tris-HCl 50 mM pH 8,0 com NaCl 1 M). A cromatografia foi realizada com um fluxo de 1 mL/min, a 25 °C e a eluição dos nucleotídeos foi monitorada pela absorbância a 253 nm.

1.2.7 Avaliação da estabilidade frente à variação de pH

As proteínas purificadas em tampão A foram diluídas dez vezes (a uma concentração de 5 μ M) em tampão acetato-fosfato-borato (20 mM) pH 2-12, (em intervalos de uma unidade) e incubadas por 12 h em banho de gelo. Após este período foram centrifugadas (10 min, 16.000 g) para a remoção de possíveis precipitados proteicos, e analisadas por dicroísmo circular (CD).

Os espectros de CD foram obtidos em um espectropolarímetro Jasco, modelo J-815, no intervalo de comprimento de onda 200-250 nm a 10 °C, utilizando-se uma cubeta de 0,1 cm de caminho óptico. Os espectros foram determinados como uma média de oito varreduras a uma velocidade de 100 nm.min⁻¹.

Os espectros foram convertidos para elipticidade molar média por resíduo (MRW - *Mean Residue Weight*) [$\theta_{\text{MRW}, \lambda}$], de acordo com a equação 2.⁵⁰

$$\theta_{\text{MRW}, \lambda} = \text{MRW} \times \theta_{\lambda} / 10 \times d \times c \quad (2)$$

Em que $\text{MRW} = M/(N-1)$, sendo M a massa molecular da proteína (em Da) e N o número de aminoácidos. θ_{λ} consiste na elipticidade observada (graus) no comprimento de onda λ , d corresponde ao caminho óptico (em cm) e c à concentração da proteína (g/mL).⁵⁰

A espectroscopia de fluorescência foi outra técnica utilizada para avaliar a estabilidade das proteínas em estudo frente à variação de pH. Para isso, a emissão de fluorescência do triptofano foi utilizada, sendo tais medidas realizadas em um espectrofluorímetro, modelo K2 ISS, utilizando-se uma cubeta de 0,5 cm de caminho óptico. Os triptofanos foram excitados em 295 nm a 10 °C e a emissão de fluorescência foi registrada de 300 a 450 nm. As fendas utilizadas foram de 2 mm para os comprimentos de onda de excitação e emissão. E um filtro de 305 nm foi também utilizado.

Os espectros obtidos foram analisados em termos do centro de massa espectral (CM), uma medida mais precisa do deslocamento do espectro de emissão, já que o espectro inteiro é considerado, não apenas o máximo de emissão. O CM foi calculado através da equação 3.⁵¹

$$CM = \Sigma \lambda_i F_i / \Sigma F_i \quad (3)$$

Em que F_i corresponde a intensidade de fluorescência no comprimento de onda λ_i e ΣF_i consiste no somatório da intensidade de fluorescência em todos os comprimentos de onda acessados, consistindo na área total do espectro.

1.2.8 Estudos de agregação e formação de fibras do tipo β -amilóides

O monitoramento da formação de agregados proteicos foi realizado pelo espalhamento de luz a ângulo fixo, utilizando um espectrofluorímetro, modelo K2 ISS, para este fim. 5 μ M de cada proteína em tampão B foram adicionados à cubeta e o espalhamento de luz no comprimento de onda de 350 nm foi observado (os comprimentos de onda de emissão e excitação foram 350 nm) a um ângulo fixo de 90 ° em relação à luz incidente durante 90 minutos. O mesmo experimento foi repetido em temperaturas crescentes: 15 °C, 30 °C, 37 °C e 45 °C.

A fim de determinar a natureza dos agregados, medidas complementares ao experimento de espalhamento de luz foram realizadas para o monitoramento de formação de fibras do tipo β -amilóides, utilizando-se uma sonda específica para a detecção de tais fibras, a Tioflavina T (ThT).

A ThT (50 μ M) foi adicionada às proteínas (5 μ M) e excitada a um comprimento de onda de 450 nm, sendo sua emissão de fluorescência registrada a 482 nm por 90 min. O experimento foi realizado também nas temperaturas: 15 °C, 30 °C, 37 °C e 45 °C.

1.2.9 Avaliação da ligação aos nucleotídeos de guanina

A afinidade das proteínas de interesse por seus ligantes foi avaliada por calorimetria de titulação isotérmica (ITC), para a obtenção dos parâmetros termodinâmicos destas ligações.

Um microcalorímetro VP-ITC (Microcal) foi utilizado. As proteínas purificadas em tampão B, (10-20 μ M) foram adicionadas a uma cela de amostra de 1,4 mL, em que foi realizada a titulação com o ligante presente na seringa de injeção (2-3 mM), a 18°C e sob agitação constante de 255 rpm. Após 35-45 injeções de 5 μ L (com intervalo de 180 segundos entre as injeções) e observada a saturação do sistema (quando não mais se observou a troca de calor), as constantes foram obtidas utilizando-se o software *Origin* específico para análises de dados de ITC (Microcal LLC ITC).

Todas as soluções foram desgaseificadas por 5 min (*Termovac* - Microcal) para evitar a interferência de bolhas durante as medidas. Controles foram realizados com os ligantes titulados em tampão, nas mesmas condições utilizadas anteriormente, de forma que o calor de diluição destes fosse subtraído do calor de ligação dos nucleotídeos no tratamento dos dados. A cela de referência foi preenchida com água.

1.2.10 Identificação das Proteínas por Espectrometria de Massas (EM)

As amostras foram preparadas de acordo com o protocolo de digestão em gel do *Biological mass spectrometry laboratory*.⁵² Resumidamente, o gel de poliacrilamida contendo amostras das proteínas purificadas foi corado com *Bio-Safe Coomassie Blue G250* (Bio-Rad) durante 1 h e descorado com água. As bandas correspondentes às proteínas de interesse foram recortadas e descoradas com lavagens sucessivas de acetonitrila (ACN) e água na proporção 50:50, seguida por uma desidratação do gel com ACN e reidratação com NH_4HCO_3 (100 mM).

Seguiram-se etapas de redução (com ditioneitol) para redução de pontes dissulfeto e alquilação (com iodoacetamida) para evitar a reoxidação dos grupos tióis.. Depois de novas etapas de lavagem com bicarbonato de amônio, ACN e água e por fim desidratação com ACN, o gel foi reidratado com tripsina (*Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade* - Promega) a uma concentração 20 ng/ μ L em NH_4HCO_3 50 mM.

A digestão das proteínas com tripsina foi realizada a 37 °C por 16 h. Seguiram-se os passos de extração dos peptídeos e acidificação com ácido trifluoroacético (TFA) 0,1%. Os peptídeos foram ainda purificados utilizando-se *Reverse-Phase ZipTip*, segundo as instruções do fabricante. Esta etapa consiste em cromatografia de fase reversa, com a fase estacionária (sílica C_{18}) contida na ponta de uma ponteira de 100 μ L, o que permitiu a purificação dos

peptídeos, de modo que estes puderam ser injetados diretamente no espectrômetro de massas, micrOTOF-QII (Bruker).

1.2.11 Ensaios de cristalização e coleta de dados

Os ensaios de cristalização foram realizados pelo método da difusão de vapor em gota suspensa. Foi realizado um *screening* inicial com a utilização de *kits* comerciais, como o PEG Suite, PEG II Suit e o Classic II (Qiagen) em um robô de cristalização. Condições selecionadas pela presença de cristais foram repetidas, assim como variações de cada condição, as quais foram preparadas manualmente. Dentre as condições que apresentaram cristais destacaram-se as compostas por PEG e CH₃COONa.

Em uma placa de 24 poços foram adicionadas soluções de diferentes composições em que foram variadas principalmente a porcentagem de PEG na solução, a concentração de acetato de sódio e o pH do tampão. Em uma lamínula foi adicionada uma gota de 2 µL de *SmSEPT10G* (única proteína que apresentou cristais nas condições estudadas) em tampão B e 2 µL da solução de cada reservatório, a lamínula foi colocada sobre cada poço. A vedação, feita com graxa, foi realizada para permitir a troca de vapor e a formação dos cristais.

SmSEPT10G, única proteína que apresentou o crescimento de cristais nas condições estudadas, foi utilizada a 3,5 mg/mL na forma apo, com a adição de GDP (2 mM) ou GTP (2 mM) e MgCl₂ (5 mM). Dentre as condições testadas, a solução de acetato de sódio 0,2 M e PEG (3350) 25% foi a que possibilitou o crescimento de cristais de boa qualidade que resultaram nas estruturas obtidas.

Após 24 h a 20 °C os cristais foram brevemente transferidos para uma solução crioprotetora e congelados em nitrogênio líquido. Os dados de difração de raios X foram coletados no *Diamond Light Source* usando as linhas I24 (para *SmSEPT10G* ligada ao GDP) e I04-1 (para *SmSEPT10G* ligada ao GTP).

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

1.3.1 Septinas de *Schistosoma mansoni*: identificação e análises bioinformáticas

Realizamos uma busca por septinas no genoma de *S. mansoni* utilizando o programa tBLASTn e sequências proteicas de septinas humanas para interrogar o banco de dados. Quatro sequências foram identificadas: Smp_041060, Smp_060070, Smp_003620 e Smp_029890.

Eventuais discrepâncias entre a predição dos cDNAs e dados dos transcritos foram avaliadas. Para isso o banco de dados de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) de *S. mansoni* foi interrogado em buscas (BLASTn) utilizando as quatro septinas de *S. mansoni*. Desta forma foi detectado que Smp_041060 possuía bases na extremidade 5' que não correspondiam a nenhuma EST, enquanto duas sequências de EST (AM042809 e AM043866) indicavam uma extremidade 5' diferente, a qual foi utilizada para estabelecer a sequência real deste transcrito. Tal sequência foi confirmada por transcrição reversa-PCR utilizando *primers* do transcrito proposto e sequenciamento do produto de amplificação. As sequências das outras três septinas foram verificadas da mesma forma descrita nas predições gênicas, não sendo encontradas discrepâncias.

As quatro septinas de *S. mansoni* identificadas foram nomeadas: SmSEPT5, SmSEPT10, SmSEPT7.1 e SmSEPT7.2, pela similaridade na sequência de aminoácidos com septinas humanas SEPT5, SEPT10 e SEPT7, respectivamente. Sendo que SmSEPT5 apresentou 57% de identidade com SEPT5 humana, SmSEPT10 apresentou 65% de identidade com SEPT10 humana e SmSEPT7.1 e SmSEPT7.2 mostraram respectivamente 47% e 55% de identidade com SEPT7 humana. As sequências de septinas de *S. mansoni* foram depositadas no *GenBank* com os seguintes números de acesso KC916723, KC916724, KC916725 and KC916726, correspondentes a SmSEPT5, SmSEPT7.1, SmSEPT7.2 e SmSEPT10, respectivamente.

Análises das sequências das septinas de *S. mansoni* revelaram a presença de domínios e motivos preditos para septinas (Figura 11). As quatro proteínas possuem o domínio N-terminal variável, os motivos G1, G3, G4 e o elemento único de septinas (SUE, na sigla em inglês) no domínio GTPase, além de um domínio C-terminal com uma região predita de

formar *coiled-coil*, segundo o programa *Coils2*.⁵³ No Apêndice A encontram-se as sequências das quatro septinas de *S. mansoni* com os domínios e motivos destacados, enquanto uma representação de tais domínios é apresentada na Figura 11.

Figura 11 - Representação esquemática dos motivos proteicos e domínios presentes nas septinas de *S. mansoni*. Região N-terminal à extrema esquerda; região polibásica (PB); domínio GTPase; elemento único de septinas (SUE, da sigla em inglês, *Septin Unique Element*); *coiled-coil* (CC) na região C terminal.

Um alinhamento múltiplo com sequências de septinas humanas e de *S. mansoni* foi realizado utilizando-se o programa ClustalX2⁵⁴, sendo possível notar os motivos conservados nas proteínas de *S. mansoni*, destacados na Figura 12.

Figura 12 - Alinhamento múltiplo das sequências do domínio GTPase das septinas de *S. mansoni* e humanas. O programa ClustalX2 foi utilizado para alinhar as sequências com os parâmetros padrões do programa. Amino ácidos idênticos ou similares são destacados em preto ou cinza, respectivamente. As posições dos amino ácidos são indicadas e os motivos relevantes estão destacados.

Análises filogenéticas foram realizadas com sequências de septinas pertencentes a diferentes organismos. Representantes de protostômios (*Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* e *Schistosoma mansoni*) e deuterostômios (*Strongylocentrotus purpuratus*, *Ciona intestinalis* e *Homo sapiens*) foram analisados (Figura 13), além de membros do filo dos platelmintos pertencentes às classes Trematoda e Cestoda (Figura 14). Alinhamentos múltiplos de sequências do domínio GTPase de septinas destes organismos foram realizados com o programa ClustalX2. As Análises filogenéticas foram realizadas utilizando inferência Bayesiana com o programa MrBayes versão 3.1.2⁵⁵ e os parâmetros padrões do programa. A árvore resultante foi visualizada com o auxílio do programa TreeView.⁵⁶

Figura 13 - Análise filogenética de septinas de organismos deuterostômios e protostômios, incluindo *Schistosoma mansoni*. Árvore filogenética baseada em inferência Bayesiana gerada a partir de alinhamento múltiplo do domínio GTPase conservado de *S. mansoni*, dois outros informativos representantes dos protostômios (*C. elegans* e *D. melanogaster*) e três deuterostômios: o homem, o equinodermo *Strongylocentrotus purpuratus* e o urocordado *Ciona intestinalis*. Os números nos nós representam as probabilidades posteriores calculadas pelo programa MrBayes. Os quatro subgrupos de septinas estão agrupados pelas linhas pontilhadas. As espécies são identificadas pelos círculos de diferentes cores indicadas no painel inferior.

Análises filogenéticas prévias de septinas de metazoários, incluindo o equinodermo *Strongylocentrotus purpuratus* e o urocordado *Ciona intestinalis* mostraram que estes organismos possuem ortólogos de septinas que se encaixam nos quarto subgrupos humanos³⁰, tais organismos foram selecionados por ocuparem posições importantes em relação à evolução dos vertebrados. Os deuterostômios compreendem três grandes filos: Equinodermos, Hemicordados e Cordados⁵⁷, *Strongylocentrotus purpuratus*, sendo um representante dos Equinodermos, é um organismo modelo por pertencer a um dos filos mais próximos dos cordados.⁵⁸ Os cordados divergiram em três subfilos: Urocordados, Cefalocordados e

Vertebrados, o que torna *C. intestinalis* um dos invertebrados mais próximos dos vertebrados.

57

A presença de representantes dos quatro subgrupos de septinas humanas nestes organismos sugere que a emergência dos quatro subgrupos ocorreu antes da separação entre vertebrados e invertebrados³⁰ e que a expansão do número de genes nos vertebrados foi principalmente devido à duplicação gênica.⁵⁹

Em nossas análises estes mesmos representantes de deuterostômios foram utilizados, juntamente com *H. sapiens*, além dos representantes invertebrados protostômios *C. elegans* e *D. melanogaster*, bem como as novas septinas de *Schistosoma mansoni* (Figura 13).

É interessante observar que *S. mansoni* possui representantes de septinas nos três grupos que formam o filamento melhor caracterizado em humanos, o filamento SEPT2–SEPT6–SEPT7, o que sugere que as septinas de *S. mansoni* possam se organizar de forma similar àquela encontrada em humanos. Além disso, as septinas humanas apresentam vários membros dentro de cada subgrupo, indicando a possível especialização adquirida por membros adicionais desta família de proteínas e sugerindo que as proteínas de *Schistosoma* possam representar um protótipo do filamento ancestral existente antes da diversificação das septinas humanas.

Adicionalmente, é observada a ausência de membros do subgrupo da septina 3 em *S. mansoni*, fato que foi também observado nos outros protostômios analisados. A ausência de representante do subgrupo da SEPT3 já tinha sido anteriormente reportada para *C. elegans* e *D. melanogaster*³⁰ e pode ter sido causada por um evento de deleção em um ancestral comum destes organismos.

Interessantemente, *S. mansoni* apresentou uma possível duplicação gênica, que resultou em dois membros pertencentes ao subgrupo da septina 7, único subgrupo que apresenta apenas uma septina humana.

Análise filogenética realizada com organismos mais próximos de *S. mansoni*, todos pertencentes ao filo dos platelmintos, revelou a mesma distribuição de septinas nos subgrupos: um representante nos subgrupos SEPT2, cuja maior identidade foi com SEPT5, representada, portanto, como pertencente ao subgrupo SEPT5 na Figura 14; um representante do subgrupo de SEPT6 (indicado na Figura 14 como subgrupo SEPT10) e dois representantes do subgrupo SEPT7 (Figura 14). Tais dados indicam a duplicação do gene do subgrupo SEPT7 deve ter ocorrido na base do filo platelminto.

Figura 14 - Análise filogenética de septinas de platelmintos. Árvore filogenética gerada pelo método de inferência Bayesiana a partir do alinhamento múltiplo do domínio GTPase de septinas dos trematódes *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum* e dos cestódes *Echinococcus multilocularis*, *E. granulosus*, *Taenia solium* and *Hymenolepis microstoma*. Os números nos nós representam as probabilidades posteriores calculadas pelo programa MrBayes. Os subgrupos de septinas estão agrupados pelas linhas pontilhadas. As espécies são identificadas pelos círculos de diferentes cores indicadas no painel inferior.

1.3.2 Clonagem, expressão e purificação das septinas de *S. mansoni*

Os cDNAs correspondentes aos transcritos das quatro septinas de *S. mansoni* foram amplificados por reação de transcrição reversa-PCR e produtos de tamanhos compatíveis com os esperados foram obtidos (Figura 15). Estes cDNAs foram clonados no vetor de propagação pTZ57R/T, sequenciados e posteriormente subclonados em vetor de expressão pET28a(+). A

análise de restrição que confirmou a presença dos insertos de interesse na construção final é mostrada na Figura 16.

Figura 15 - Amplificação dos cDNAs *SmSept10* (b), *SmSept7.1* (c), *SmSept7.2* (d), e *SmSept5* (e). Eletroforese em gel de agarose dos produtos da reação de transcrição reversa-PCR utilizando *primers* específicos para cada septina. Os tamanhos correspondentes dos cDNAs são 1240, 1533, 1497 e 1353 pares de bases (pb) para *SmSept10*, *SmSept7.1*, *SmSept7.2* e *SmSept 5*, respectivamente. Padrão Gene Ruler 1 kb DNA Ladder (Fermentas) (a).

Figura 16 - Análises de restrição dos clones de septinas de *S. mansoni*. Eletroforese em gel de agarose dos produtos da digestão com enzimas de restrição para liberação dos fragmentos clonados em vetores de expressão. A) *SmSept5*; B) *SmSept10*; C) *SmSept7.1* e *SmSept7.2* em pET-28a(+) (5369 pb).

Foram realizados experimentos de expressão em sistema heterólogo com as quatro construções, mas não foi possível detectar a expressão de *SmSEPT7.1*, enquanto *SmSEPT7.2* apresentou-se pouco solúvel. Tal resultado pode ser explicado pela tendência destas proteínas em se associarem na forma de hetero-oligômeros, sendo que muitas vezes as proteínas expressas individualmente resultam em produtos instáveis ou insolúveis. Uma possível solução para este problema é a coexpressão das diversas septinas para a formação de heterocomplexos, o que frequentemente resulta em produtos solúveis.^{7,60,61} Desta forma, optou-se neste trabalho pela caracterização biofísica das septinas que foram conseguidas na

forma solúvel individualmente (*SmSEPT5* e *SmSEPT10*), e pela construção de um sistema de coexpressão (Descrito na seção 1.3.11).

As proteínas recombinantes obtidas (*SmSEPT5* e *SmSEPT10*) foram purificadas em coluna de afinidade contendo níquel imobilizado (Ni-NTA), já que foram produzidas como proteínas de fusão a um hexapeptídeo de histidina na porção N-terminal, e submetidas a uma purificação adicional em cromatografia de exclusão molecular (Superdex 200).

O rendimento da purificação foi estimado em 15-20 mg/L para *SmSEPT5* e 10 mg/L para *SmSEPT10*. As frações resultantes do procedimento de purificação foram analisadas por SDS-PAGE para avaliação da pureza e por espectroscopia de dicroísmo circular (CD) e espectroscopia de fluorescência para a avaliação do estado de enovelamento proteico.

As análises de SDS-PAGE revelaram que ambas as proteínas foram obtidas com um grau elevado de pureza e massa molecular próxima a esperada, 53 kDa para *SmSEPT5* (Figura 15 A) e 50 kDa para *SmSEPT10* e (Figuras 17 B).

Figura 17 - Análises de SDS-PAGE da expressão e purificação de *SmSEPT5* (A) e *SmSEPT10* (B). a) padrões MM; b) culturas não induzidas; c) culturas após indução com 0,4 mM de IPTG d) proteínas purificadas.

De forma a avaliar se as proteínas obtidas encontravam-se enoveladas, as técnicas de dicroísmo circular (CD) e espectroscopia de fluorescência foram utilizadas.

Os espectros de CD obtidos para as duas proteínas sugerem a presença de estruturas em α -hélice (Fig. 18 A e 19 A), pois estas são caracterizadas por um grande pico positivo em torno de 190 nm e dois menores, negativos, em torno de 208 e 222 nm. Enquanto folhas β têm um pico positivo em 195 nm e um negativo em 215 nm.^{50,62} O fato de não terem sido observados picos referentes a folhas β não significa que as proteínas em estudo não contenham estruturas nesta forma, pois os espectros de estruturas na forma de α -hélices têm uma magnitude maior que os provenientes de folhas β , assim as contribuições de α -hélices tendem a sobrepor as contribuições de folhas β .

Figura 18 - Espectro de CD (A) e Emissão de fluorescência dos triptofanos (B) de *SmSEPT5*. Os espectros foram obtidos com 5 μ M de proteína em tampão B.

Figura 19 - Espectros de CD (A) e Emissão de fluorescência (B) de *SmSEPT10*. Os espectros foram obtidos com 5 μ M de proteína em tampão B.

Os espectros de CD nos permitem concluir que as proteínas *SmSEPT5* e *SmSEPT10* encontravam-se enoveladas, em termos de estrutura secundária, mas as informações que podem ser retiradas do espectro são dependentes do número de transições espectrais que podem ser observadas. Se a estrutura secundária a ser estimada é resultante de um espectro que contém dados até 200 nm, a única informação que pode ser obtida é que fração da proteína apresenta estrutura em α -hélice. Se as informações extraídas deste espectro contêm mais de duas formas estruturais, como α -hélices, folhas β e voltas, há mais componentes que os dados suportam.⁶³

O estudo por espectroscopia de fluorescência fornece informações sobre a estrutura terciária da proteína, pois através da emissão de fluorescência do triptofano, sonda intrínseca de fluorescência, pode-se inferir se este resíduo está “enterrado” na estrutura da proteína ou se está exposto (ou parcialmente exposto) ao solvente, uma vez que sua fluorescência é sensível ao ambiente químico que o cerca.⁶⁴

Foi possível realizar experimentos de fluorescência utilizando o triptofano como sonda intrínseca devido a presença de dois resíduos de triptofano em *SmSEPT5* e um em *SmSEPT10*. Os espectros de fluorescência obtidos para ambas as proteínas (Fig. 18 B e 19 B) mostram um máximo de emissão de fluorescência em 335 nm, que corresponde a este aminoácido no interior de proteínas⁶⁴, sugerindo que as regiões nas quais estão presentes os triptofanos apresentem alto grau de estruturação.

1.3.3 Avaliação do estado oligomérico das proteínas

Separações mais discriminativas com base no tamanho podem ser conseguidas pela técnica de cromatografia de filtração em gel, ou de exclusão molecular. Através desta técnica foi possível estimar a massa molecular aparente das proteínas estudadas, pois a migração das partículas através dos poros da coluna faz com que haja uma separação de acordo com o volume hidrodinâmico destas. A coluna utilizada, Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare), é composta de agarose e dextran e possui um limite de separação 10-600 kDa (para proteínas globulares), permitindo uma separação eficiente das proteínas de interesse.

SmSEPT5 e *SmSEPT10* foram submetidas à cromatografia de exclusão molecular, o que resultou em cromatogramas característicos de amostras homogêneas, pois predominantemente um pico foi detectado, sugerindo a existência de um único estado de oligomerização para ambas as proteínas (Figura 20).

Figura 20 - Perfil cromatográfico de *SmSEPT5* (A) e *SmSEPT10* (B). Cromatogramas obtidos em coluna de exclusão molecular Superdex 200.

A partir do volume de eluição de cada proteína e da curva de calibração, uma massa molecular aparente pôde ser calculada para *SmSEPT5* e *SmSEPT10*.

A curva de calibração obtida, bem como os perfis cromatográficos dos padrões utilizados e das proteínas de interesse são ilustrados na Figura 21. Através desta curva de calibração, foram estimadas as massas de 116 kDa e 193 kDa para *SmSEPT5* e *SmSEPT10*, respectivamente. As massas relativas aos monômeros de *SmSEPT5* e *SmSEPT10* são de 53,8 kDa e 50,5 kDa respectivamente.

Figura 21 - Estimativa de massa molecular das proteínas SmSEPT5 e SmSEPT10 utilizando cromatografia de exclusão molecular. A) Curva de calibração em coluna Superdex 200 obtida a partir da regressão linear dos volumes de eluição de proteínas padrões; os resultados foram expressos em termos de Kav (eq. 1) por log da massa molecular; B) Perfil cromatográfico dos padrões utilizados para a construção da curva, juntamente com as proteínas de interesse: — Aldolase (158 kDa) e Ribonuclease (13,7 kDa); — Aprotinina (6,5 kDa) e Conalbumina (75 kDa); — Ferritina (440 kDa) e Anidrase Carbonica (29 kDa); — Ovalbumina (44 kDa); — Ferritina (440 kDa); — SmSEPT10; — SmSEPT5.

Os padrões utilizados para a construção da curva de calibração se referem a proteínas globulares e determinações de massas moleculares precisas requerem padrões com a mesma relação entre volume hidrodinâmico e massa molecular que as substâncias de interesse. Como essa relação não é a mesma para todas as proteínas, apenas uma medida aproximada pôde ser obtida, o que torna essencial o uso de uma segunda técnica para a determinação do estado oligomérico das proteínas de interesse.

A segunda técnica utilizada para a determinação do estado oligomérico das proteínas foi a de *cross-linking*. Esta técnica envolve o uso de um reagente bifuncional contendo grupos finais reativos, que reagem com grupos funcionais específicos (como aminas primárias ou sulfidrilas) de resíduos de aminoácidos, formando ligações covalentes entre proteínas que interagem fisicamente, ou seja, entre cadeias polipeptídicas que se encontram fisicamente próximas.⁶⁵

O reagente utilizado foi o disuccinimidil suberato (DSS), um éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) homobifuncional. Os grupos funcionais deste reagente são amino-reativos, reagem com aminas primárias presentes na extremidade N-terminal de cada cadeia polipeptídica e nos resíduos de lisina das proteínas, formando ligações amidas estáveis. Assim, depois da reação, a massa molecular da proteína em seu estado nativo pode ser

determinada por eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE). O gel de poliacrilamida resultante é apresentado na Figura 22.

Figura 22 - Análise do estado oligomérico de *SmSEPT5* e *SmSEPT10* por reações de *cross-linking*. Gel de poliacrilamida 10% mostrando: a) *SmSEPT10* (10 µM) controle (sem adição de DSS); b) *SmSEPT10* + 0,5 mM DSS; c) *SmSEPT10* + 5 mM DSS; d) Padrão de alta massa molecular; e) *SmSEPT5* (10 µM) controle (sem adição de DSS); f) *SmSEPT5* + 0,5 mM DSS; g) *SmSEPT5* + 5 mM DSS.

Como se pode observar, as bandas relativas à *SmSEPT5* e *SmSEPT10* encontram-se entre as bandas dos padrões com massas de 97 e 116 kDa. O que corresponde à massa da forma dimérica para ambas as proteínas, sendo esta de 107,6 kDa para *SmSEPT5* e 101,1 kDa para *SmSEPT10*. Estes resultados concordam com os obtidos para *SmSEPT5* pela técnica de cromatografia de filtração em gel, cuja massa estimada (116kDa) é compatível com um dímero desta proteína. Já a massa de *SmSEPT10*, 193 kDa, pode ter sido superestimada se considerarmos que ela se encontra na forma dimérica, como determinado pela reação de *cross-linking*. Uma possível explicação para esta discrepância é o fato de a curva de calibração ter sido construída com padrões de proteínas globulares, conforme explicitado anteriormente.

As proteínas foram ainda incubadas com seus ligantes (GDP e GTP γ S) para que fosse avaliada a possível mudança no estado oligomérico na presença destes. A possível mudança foi verificada pela técnica de cromatografia de exclusão molecular. Conforme pode ser observado na Figura 23, o mesmo volume de eluição foi obtido para *SmSEPT5* e *SmSEPT10* na presença dos dois ligantes, indicando que, nas condições analisadas, a presença do nucleotídeo não influenciou o estado oligomérico destas proteínas.

Figura 23 - Avaliação da influência da ligação de nucleotídeos de guanina no estado oligomérico de septinas de *S. mansoni*. Perfil cromatográfico em coluna de exclusão molecular das proteínas a uma concentração de 15 μ M. *SmSEPT5* (A) e *SmSEPT10* (B) na presença de GDP e GTP γ S (45 μ M).

1.3.4 Ensaio de atividade GTPásica

Antes da realização dos ensaios de atividade GTPásica foi necessário avaliar se as proteínas recombinantes obtidas encontravam-se ligadas aos nucleotídeos após o processo de purificação, para isso as proteínas foram desnaturadas e os possíveis nucleotídeos ligados foram identificados por cromatografia de troca iônica.

A Figura 24 ilustra o perfil de eluição dos nucleotídeos, pelo monitoramento da absorbância a 253 nm, para cada proteína após cada uma das duas etapas de purificação, bem como um controle contendo o tampão acrescido de ambos os nucleotídeos para fins de comparação com o perfil de eluição dos nucleotídeos.

Como pode ser observado, *SmSEPT5*, após a primeira etapa de purificação, encontrava-se ligada aos nucleotídeos (GDP e GTP), mas estes foram perdidos durante o procedimento adicional de purificação, sugerindo uma baixa afinidade da proteína pelos ligantes (Figura 24 A). Não foi detectada a presença de nucleotídeos ligados à *SmSEPT10* (Figura 24 B).

Figura 24 - Avaliação do conteúdo de nucleotídeo de *SmSEPT5* (A) e *SmSEPT10* (B). Perfil cromatográfico dos nucleotídeos de guanina em coluna de troca aniônica *DEAE-5PW*: — Conteúdo de nucleotídeo extraído das proteínas após primeira etapa de purificação (Ni-NTA); — Conteúdo de nucleotídeo extraído das proteínas após segunda etapa de purificação (Superdex 200) — tampão B contendo GTP e GDP (10 μ M).

A avaliação da atividade GTPásica de ambas as proteínas foi avaliada também por cromatografia de troca iônica, que permitiu a identificação dos nucleotídeos liberados após incubação de cada proteína com excesso de GTP.

SmSEPT5 (15 μ M) foi capaz de hidrolisar todo o conteúdo de nucleotídeo adicionado, 45 μ M, em cerca de 3 horas de reação (Figura 25 A), enquanto *SmSEPT10* não apresentou atividade GTPásica detectável após 24 h de incubação com GTP (Figura 25 B).

O fato de *SmSEPT10* não apresentar atividade não significa que ela esteja inativa, pois já foi relatada a falta de atividade GTPásica em outras septinas. Em *S. cerevisiae*, ao se investigar a atividade GTPásica de Cdc3, Cdc10, Cdc11 e Cdc12, verificou-se que apenas Cdc10 e Cdc12 apresentavam atividade detectável.⁶⁶ Adicionalmente, Sirajuddin et al.⁶⁷ sugerem que septinas humanas pertencentes ao subgrupo da SEPT6 não são capazes de hidrolisar GTP, o que foi associado à ausência de um aminoácido conservado, a treonina na posição 78 (Thr-78), de acordo com a sequência de SEPT2. Cdc3 e Cdc11, que não apresentaram atividade GTPásica em *S. cerevisiae*, também não possuem este aminoácido conservado.⁶⁷

SmSEPT10, que pertence ao subgrupo da SEPT6, não possui a treonina conservada na posição correspondente à Thr-78 de SEPT2. Portanto, em face aos resultados observados para septinas humanas relacionadas, não seria esperado que *SmSEPT10* possuísse atividade GTPásica.

Figura 25 - Teste de atividade GTPásica. (A) *SmSEPT5* (15 μ M) após 5 h de incubação com GTP (45 μ M); (B) *SmSEPT10* (15 μ M) após 24 h de incubação com GTP. Perfil cromatográfico dos nucleotídeos de guanina extraídos das proteínas, em diferentes intervalos de tempo, em coluna de troca aniônica.

1.3.5 Caracterização biofísica inicial de *SmSEPT7.2*

SmSEPT7.2 apresentou baixa solubilidade quando expressa individualmente (Figura 26). A expressão desta proteína foi realizada em dois litros de cultura e o protocolo de expressão e purificação foi o mesmo descrito no item 1.2.2.

Figura 26 - Análises de SDS-PAGE da expressão e purificação de *SmSEPT7.2*. (A) Análise da solubilidade de *SmSEPT7.2*: a) cultura não induzida; b) cultura induzida; c) pellet; d) sobrenadante. (B) *SmSEPT7.2* após eluição da coluna de Ni-NTA (a) e após a segunda etapa de purificação por cromatografia de filtração em gel (b).

O perfil cromatográfico (Figura 27) indica a presença de mais de uma forma oligomérica em solução. Enquanto análises de dicroísmo circular (Figura 28 A) e emissão de

fluorescência dos triptofanos (Figura 28 B) (feitas com as frações 12-13, correspondentes ao segundo pico do cromatograma da Figura 27), indicam que a proteína apresenta estrutura secundária e seus triptofanos encontram-se, ao menos parcialmente, “enterrados” na estrutura da proteína (*SmSEPT7.2* possui cinco triptofanos em sua sequência).

Figura 27 - Perfil cromatográfico de *SmSEPT7.2* em coluna Superdex 200.

Figura 28 - Espectro de CD (A) e Emissão de fluorescência dos triptofanos (B) de *SmSEPT7.2*. Os espectros foram obtidos com 3 μ M de proteína em tampão B.

Foi realizado teste de atividade GTPásica para esta proteína após a verificação de que esta era purificada na ausência de nucleotídeo ligado, como observado para *SmSEPT5* e *SmSEPT10*. Tal experimento revelou que esta proteína possui atividade GTPásica (Figura 29), que foi detectada apenas após longo período de incubação com GTP (20 h). A baixa atividade detectada pode estar relacionada à pequena quantidade de proteína conseguida e à

instabilidade da amostra, com a presença de mais de uma forma oligomérica e possíveis agregados.

Figura 29 - Teste de atividade GTPásica para *SmSEPT7.2*. Perfil cromatográfico dos nucleotídeos de guanina extraídos das proteínas em diferentes intervalos de tempo e detectados por absorbância em 253 nm em cromatografia de troca iônica. 10 μ M de GTP e 5 mM de $MgCl_2$ adicionados a 3 μ M de *SmSEPT7.2*.

A baixa solubilidade e, conseqüentemente, o baixo rendimento obtido para esta proteína, cerca de 0,5 mg/L, limitou os estudos biofísicos realizados com esta proteína.

Os testes de expressão realizados com as quatro septinas de *S. mansoni* nos permitiram selecionar duas delas, *SmSEPT5* e *SmSEPT10* para fazer as demais caracterizações biofísicas e ensaios de cristalização. Estas proteínas foram obtidas na fração solúvel e com maior rendimento, quando comparadas com *SmSEPT7.2*, que possui grande parte da proteína expressa na fração insolúvel, enquanto *SmSEPT7.1* não apresentou expressão detectável. Tentativas de diminuir a temperatura de expressão, a concentração de indutor (IPTG) ou a expressão de construção da proteína sem o domínio N-terminal (*SmSEPT7.2GC*) não resultaram em um aumento de solubilidade desta proteína.

Construções contendo apenas o domínio GTPase de *SmSEPT5* e *SmSEPT10* foram também obtidas com o auxílio do aluno de iniciação científica Yuri Volpato Santos e foram denominadas *SmSEPT5G* e *SmSEPT10G*. Devido à alta estabilidade e rendimento de *SmSEPT10G*, esta foi utilizada nos experimentos de ITC e ensaios de cristalização apresentados nos itens 1.3.9 e 1.3.10.

1.3.6 Avaliação da estabilidade conformacional frente à variação de pH

A determinação da estabilidade conformacional de uma proteína é um fator importante para o entendimento das interações que a estabilizam. A desnaturação induzida por pH ocorre pela protonação ou desprotonação de alguns sítios, como -OH, -COOH e -NH₂. Assim, diferentemente do desenovelamento induzido por temperatura ou por agentes caotrópicos, o desenovelamento induzido por pH é atingido pela perturbação de alguns resíduos e um desenovelamento completo não é esperado.^{68,69} O desenovelamento parcial muitas vezes observado em pHs extremos é um indício de que repulsões eletrostáticas muitas vezes não conseguem superar as interações que favorecem o enovelamento como interações hidrofóbicas, de van der Waals ou ligações dissulfetos.^{69,70}

SmSEPT5 e *SmSEPT10* mostraram-se bastante estáveis em função do pH, tanto em termos de estrutura secundária, acessada pelos espectros de CD (Figura 30), como em relação à estrutura terciária, monitorada por fluorescência intrínseca dos resíduos de triptofano (Figura 30).

Os estudos de dicroísmo circular mostraram distorções no espectro apenas em pHs extremamente básicos (Figura 30, pHs 11 e 12), para ambas as proteínas. Da mesma forma, as análises de emissão de fluorescência dos triptofanos mostraram que o centro de massa espectral apenas teve um aumento em pHs 11 e 12 (Figura 31), indicando que um desenovelamento parcial, tanto na estrutura terciária quanto secundária, ocorreu apenas nestes pHs.

Figura 30 - Análise da estabilidade da estrutura secundária das proteínas em função do pH por espectroscopia de dicroísmo circular. Espectros de dicroísmo circular em diferentes pHs: — pH 2; — pH 3; — pH 4; — pH 5; — pH 6; — pH 7; — pH 8; — pH 9; — pH 10; — pH 11; — pH 12. (A) *SmSEPT5* (5 μ M) e (B) *SmSEPT10* (5 μ M).

Figura 31 - Análise da estabilidade da estrutura terciária das proteínas em função do pH por espectroscopia de fluorescência. Centro de massa espectral em função do pH para: (A) *SmSEPT5* (5 μ M) e (B) *SmSEPT10* (5 μ M).

1.3.7 Estudos de agregação e formação de fibras do tipo β -amilóides

A estabilidade das proteínas em função da temperatura foi avaliada por meio de medidas de espalhamento de luz a ângulo fixo. A formação de agregados moleculares foi detectada pelo aumento no espalhamento de luz. Tais experimentos revelaram que o aumento da temperatura proporciona a agregação das proteínas *SmSEPT5* e *SmSEPT10*. *SmSEPT5* se mostrou mais sensível à temperatura, a partir de 30 °C foi observada a formação de agregados

proteicos; para *SmSEPT10* este fenômeno foi somente observado a partir de 37 °C (Figura 32).

Figura 32 - Análises de agregação proteica por espalhamento de luz a ângulo fixo. As medidas foram efetuadas durante 90 minutos em diferentes temperaturas: 15, 30, 37 e 45 °C. A) *SmSEPT5* (5 μM); B) *SmSEPT10* (5 μM).

De forma a verificar se os agregados formados encontravam-se organizados na forma de fibras do tipo β -amilóides, a sonda Thioflavina-T (ThT) foi utilizada. Amilóides têm uma arquitetura "*cross- β* " comum, consistindo de camadas de folhas β , perpendiculares ao eixo da fibra. A utilização de corantes para detectar a presença de fibras amilóides é possível porque a ligação a estes corantes é relacionada à presença de estruturas *cross- β* das fibras. ThT é um dos corantes amilóides mais utilizados, se ligando especificamente a amilóides e exibindo um grande aumento em sua fluorescência após esta ligação.⁷¹

Acredita-se que o aumento observado na fluorescência desta sonda é originado pela imobilização seletiva de um subconjunto de conformeros de ThT, pois em solução os anéis benzilamina e benzotiazol possuem rotação livre em torno da ligação de carbono compartilhada (Figura 33), devido à baixa barreira de energia, o que faz com que estados excitados gerados sejam rapidamente suprimidos, causando uma baixa emissão de fluorescência para o ThT livre. Mas, ao se ligar às fibras amilóides, há uma imobilização da rotação do ThT, o que preserva o estado excitado, resultando em um maior rendimento quântico de fluorescência.⁷²

Figura 33 - Estrutura da Tioflavina T com os dois planos de rotação destacados. Fonte: Biancalana et al.⁷²

Os agregados de septinas de *S. mansoni* formados com o aumento da temperatura mostraram aumento da fluorescência da sonda ThT, indicando que os agregados estavam organizados na forma de fibras do tipo β -amilóide. A formação de fibras para *SmSEPT5* foi observada a partir de 30 °C (Figura 34 A) e a partir de 37 °C para *SmSEPT10* (Figura 34 B), concordando com os resultados de espalhamento de luz. Tais experimentos foram importantes para a avaliação da estabilidade térmica das proteínas estudadas, sendo verificado que a temperatura é um importante fator que leva à agregação destas proteínas.

Figura 34 - Monitoramento da formação de fibras do tipo β -amilóide por emissão de fluorescência da sonda Tioflavina T (ThT). As medidas foram realizadas durante 90 minutos em diferentes temperaturas: 15, 30, 37 e 45 °C . A) *SmSEPT5* (5 μ M); B) *SmSEPT10* (5 μ M).

1.3.8 Avaliação da ligação aos nucleotídeos de guanina

As afinidades das proteínas *SmSEPT5* e *SmSEPT10* pelos ligantes foram avaliadas por calorimetria de titulação isotérmica, utilizando-se um microcalorímetro.

SmSEPT5 (10 μ M), ao ser titulada com 0,25 mM de GTP γ S (Figura 35 A) e 3 mM de GDP (Figura 35 B) mostrou curvas de titulação características de reações exotérmicas. A partir destas curvas, parâmetros termodinâmicos como a constante de associação (K_a), constante de dissociação (K_d) e a variação de entalpia (ΔH) puderam ser obtidos utilizando-se o *software* Microcal[®] ITC Origin[™]. As curvas foram ajustadas ao modelo de ligação de um sítio e a estequiometria da reação (n) foi fixada em 1, já que estas proteínas possuem um sítio de ligação.

Este procedimento de fixar o n foi necessário devido à baixa afinidade das proteínas pelo ligante, o que resulta em um valor de c ($K_a[M]_0$) menor que 1, que não corresponde à faixa desejada de c , entre 1-1000, para a obtenção de curvas de titulação a partir das quais se possa determinar simultaneamente ΔH , K_a , e n .

O formato da isoterma de ligação é determinado pelo parâmetro c , para valores de c abaixo de 10, a inflexão da curva (que fornece o n) se torna mal definida e a estequiometria da reação não pode mais ser determinada experimentalmente, assim o formato desta curva não

consegue fornecer os três parâmetros (n , ΔH , K_a) pelo ajuste adequado das equações na curva, por isso se tornou necessária a fixação do parâmetro n para o ajuste das curvas.

A fixação do parâmetro n tem sido uma prática usual para proteínas com $c < 1$ e tem se mostrado que este procedimento não altera as constantes calculadas.⁷³

Apenas a curva resultante da titulação de *SmSEPT5* com GTP γ S possui um valor de c no intervalo desejado ($c = 9$), as demais titulações têm um c em torno de 0,2, o que tornou necessária a fixação do parâmetro n .^{73,74}

Figura 35 - Isotermas de ligação de *SmSEPT5*. A) *SmSEPT5* (10 μM) em tampão B titulada com 0,25 mM de GTP γ S; B) *SmSEPT5* (10 μM), em tampão B titulada com 3 mM de GDP. Cada titulação foi realizada com 35 injeções de 5 μL do ligante para que a saturação do sistema fosse observada.

Para verificar a afinidade de *SmSEPT10* por GTP e GDP foi utilizada outra construção desta proteína, compreendendo apenas o domínio GTPase, denominada *SmSEPT10G*. Esta construção mostrou um rendimento bastante superior ao da proteína inteira (35 mg/L), mostrando-se assim mais adequada à realização dos experimentos de ITC, que requerem grande quantidade de proteína.

A Figura 36 A ilustra a isoterma de ligação obtidas para *SmSEPT10G* (24 μM) e GTP (2 mM) e a Figura 36 B a isoterma de ligação de *SmSEPT10G* (15 μM) ao GDP (3 mM).

Neste caso, não foi necessário o uso de GTP γ S, pois como foi verificado que *Sm*SEPT10 não hidrolisa GTP, este pode ser utilizado nos experimentos de ITC, não havendo interferência do calor de hidrólise do GTP.

Figura 36 - Isotermas de ligação de *Sm*SEPT10G. A) *Sm*SEPT10G (24 μ M), em tampão B, titulada com 2 mM de GTP; B) *Sm*SEPT10G (15 μ M) titulada com 3 mM de GDP. Cada titulação foi realizada com 45 injeções de 5 μ L do ligante para que a saturação do sistema fosse observada.

A Tabela 2 apresenta os valores obtidos para os parâmetros termodinâmicos da reação de ligação de *Sm*SEPT5 e *Sm*SEPT10G aos nucleotídeos de guanina.

Tabela 2 – Parâmetros termodinâmicos obtidos a partir das curvas de titulação *Sm*SEPT5 e *Sm*SEPT10G com seus ligantes

	K_d (M)	ΔH (cal/mol)
<i>Sm</i> SEPT5 (GTP γ S)	$1,1 \times 10^{-6} \pm 0,08 \times 10^{-6}$	$-1,29 \times 10^4 \pm 164,6$
<i>Sm</i> SEPT5 (GDP)	$1,55 \times 10^{-4} \pm 0,02 \times 10^{-4}$	$-4,612 \times 10^3 \pm 37,38$
<i>Sm</i> SEPT10G (GTP)	$1,15 \times 10^{-4} \pm 0,05 \times 10^{-4}$	$-3,979 \times 10^3 \pm 89,25$
<i>Sm</i> SEPT10G (GDP)	$1,46 \times 10^{-4} \pm 0,05 \times 10^{-4}$	$-2,889 \times 10^3 \pm 78,44$

*Sm*SEPT5 apresentou uma afinidade ao GTP γ S bastante superior à afinidade ao GDP, com um K_d (1,1 μ M) comparável ao obtido para SEPT2 humana (0,28 μ M)⁽⁷⁵⁾, na presença

de 5 mM de $MgCl_2$. Complexos formados por de septinas de *S. cerevisiae*, Cdc3-Cdc12; Cdc3,-Cdc11-Cdc12 e Cdc3,-Cdc10-Cdc12, apresentaram valores de K_d de 5,6 μM , 6,2 μM e 6,9 μM .⁶⁰ Assim, a ligação de *SmSEPT5* ao $GTP\gamma S$ possui uma afinidade semelhante à já descrita para outras septinas, enquanto a ligação ao GDP, com $K_d = 1,55 \times 10^{-4} M$, mostrou uma afinidade duas ordens de grandeza menor que as descritas para SEPT2 (1,72 μM)⁷⁵ e Cdc3-Cdc12 (2,1 μM).⁶⁰

SmSEPT10G apresentou uma afinidade semelhante por GTP e por GDP, com um K_d de cerca de $1 \times 10^{-4} M$, semelhante ao obtido para a ligação de *SmSEPT5* ao GDP e, portanto, inferior àquelas relatadas para outras septinas.

A influência do cofator na ligação aos nucleotídeos de guanina foi também avaliada. As titulações com $GTP\gamma S$ foram sempre realizadas na presença de 5 mM de $MgCl_2$, pois foi verificada que na ausência deste cofator, a ligação ao $GTP\gamma S$ ou ao GTP, no caso de *SmSEPT10G*, não era observada (dados não mostrados).

Entretanto, a ligação a GDP, para ambas as proteínas, não se mostrou dependente da presença de Mg^{2+} , sendo que as curvas de titulação foram obtidas na ausência deste. Estes resultados concordam com os apresentados por Huang et al.⁷⁵, que concluíram que a ligação de SEPT2 ao $GTP\gamma S$ era dependente da concentração de Mg^{2+} utilizada, enquanto a ligação desta proteína ao GDP não era influenciada pela concentração de Mg^{2+} (0,01-5 mM).⁷⁵ Além disso, Zang et al relataram que algumas Rho GTPases (Cdc42, RhoA e Rac1) se ligam a GDP e $GTP\gamma S$ na ausência de Mg^{2+} , com constantes de afinidade semelhantes àquelas obtidas na presença deste cofator⁷⁶, de modo semelhante ao que foi observado para a ligação de GDP a *SmSEPT10G* e *SmSEPT5*.

1.3.9 Descrição da estrutura de *SmSEPT10G*

Ensaio cristalográfico inicial utilizando as construções inteiras de *SmSEPT5* e *SmSEPT10* não resultaram em cristais destas proteínas. Assim, optamos pela construção de regiões truncadas destas proteínas contendo apenas o domínio GTPase, pois estudos anteriores com septinas revelaram que tais construções apresentam maior estabilidade, que possibilitaram a obtenção de informações estruturais destas proteínas.⁷⁷⁻⁷⁹

A construção *SmSEPT10G* resultou nos cristais observados na Figura 37.

Figura 37 - Cristais de *SmSEPT10*. Cristais obtidos com 3,5 mg/mL de *SmSEPT10G* e 2 mM de GDP, condição de cristalização: CH₃COONa 0,2 M e PEG 3350 25%.

A estrutura tridimensional de *SmSEPT10G* foi determinada a partir dos dados de difração de seus cristais. Os experimentos de difração e a interpretação dos resultados destes experimentos foram realizados em colaboração com o Dr. Humberto D'Muniz Pereira e o Prof. Dr. Richard C. Garratt.

A estrutura *SmSEPT10G*-GDP foi resolvida por substituição molecular utilizando-se o programa Phaser e o domínio GTPase da SEPT2 humana como modelo (PDB id 2QNR). *SmSEPT10G*-GTP foi resolvida também por substituição molecular utilizando as coordenadas previamente refinadas para *SmSEPT10*-GDP. *SmSEPT10G* ligada ao GTP e ao GDP foram cristalizadas no grupo espacial C2 com dois monômeros na unidade assimétrica. As estruturas foram refinadas a 1,93 Å (quando ligada à GDP) e 2,1 Å (quando ligada à GTP), sendo esta a melhor resolução reportada até o momento para uma septina.

Os resultados relativos à coleta de dados e os parâmetros do processamento encontram-se na Tabela 3. As estruturas foram depositadas no *Protein Data Bank* (PDB) sob os códigos 4KV9 e 4KVA para as formas ligadas ao GDP e GTP, respectivamente.

Tabela 3 – Coleta de dados e parâmetros de refinamento

Coleta de dados	<i>Sm</i> SEPT10G (GDP)	<i>Sm</i> SEPT10G (GTP)
Space group	C121	C121
Cell dimensions (Å) <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> , β	160.90, 45.04, 95.49, 112.17	160.80, 47.04, 95.48, 112.61
Detector	PILATUS 6M	PILATUS 2M
X-ray source	DLS I24	DLS I04-1
Wavelength (Å)	0.9686	0.9200
Resolution range (Å)	26.17 - 1.93 (1.98-1.93)	74.22 - 2.14 (2.20-2.14)
Redundancy	4.0 (3.6)	4.8 (5.0)
<i>R</i> _{merge} (%)*	4.8 (63.3)	8.8 (78.5)
<i>R</i> _{pim} (%)*	2.9 (54.0)	5.0 (43.5)
Completeness (%)	97.6 (96.3)	99.0 (99.5)
Total reflections	189605 (12206)	173158 (13112)
Unique reflections	47003 (3421)	36342 (2643)
<i>I</i> / σ (<i>I</i>)	10.0 (2.0)	9.9 (2.4)
Refinement parameters		
Reflections used for refinement	46962	36333
<i>R</i> (%)**	18.51	18.68
<i>R</i> _{Free} (%)**	21.70	22.12
No. of protein atoms	3968	4019
No. of water molecules	129	193
<i>B</i> (Å ²)		
Protein	53.98	43.93
Ligands	39.03	32.37
Water	49.34	41.29
Error estimates		
Coordinate Error (Å)	0.25	0.26
Phase error (°)	28.78	24.99
DPI Cruickshank	0.12	0.16
Molprobability all-atom clashcore	2.88	2.35
RMSD from ideal geometry		
r.m.s. bond lengths (Å)	0.007	0.002
r.m.s. bond angles (°)	1.041	0.592
Ramachandran Plot		
Most favored region (%)	96.75	97.96
Residues in disallowed regions (%)	0.0	0.0
PDB ID	4KV9	4KVA

*Sm*SEPT10 apresentou enovelamento característico de septinas, baseado em pequenas GTPases, com 6 fitas- β centrais. Além da extensão conhecida como elemento único de septinas (SUE), que compreende as fitas- β 9, 10, 7 e 8 (nesta ordem) e α -hélices 5 e 6. β 2 é a única fita que se encontra antiparalela em relação a todas as demais e era pobremente definida em todas as estruturas de septinas anteriores. Em *Sm*SEPT10 foi possível observar claramente

a densidade nesta fita, tanto na estrutura com GTP quanto com GDP ligado, devido à alta resolução alcançada (Figura 38).

Figura 38 - Estrutura de *SmSEPT10G*. Dois monômeros contidos na unidade assimétrica do cristal. As α -hélices e fitas β encontram-se numeradas no monômero da direita; α -hélices são representadas em vermelho e fitas β em azul.

Estruturas secundárias correspondentes ao SUE estão presentes nas duas interfaces, G e NC, a partir das quais um filamento foi formado no cristal, tal filamento é idêntico nas estruturas ligadas à GDP e GTP e também à observada para a única estrutura de um complexo de septinas.³¹ Além disso, filamentos semelhantes são observados quando septinas individuais são cristalizadas, como no caso de SEPT3, SEPT7 e SEPT2, ligadas a GDP.^{31,79,80}

Os nucleotídeos são encontrados ligados ao sítio de ligação da interface G. A Figura 39 detalha as interações específicas feitas por uma das subunidades do complexo ligado a GTP. Os resíduos 48-55 do P-loop, correspondentes ao motivo G1, são responsáveis pelas interações mais importantes envolvidas na estabilização dos fosfatos dos nucleotídeos.⁸¹

Em septinas, o loop é estendido para incluir a cadeia lateral de Thr56, que coordena o fosfato- α do nucleotídeo nas formas ligadas a GDP e GTP. Lys54 se situa entre os fosfatos β e γ na estrutura ligada a GTP enquanto Thr50 interage somente com o fosfato γ via uma molécula de água (w60), esta molécula de água faz uma ligação de hidrogênio com a amida pertencente à cadeia principal da glicina invariante do motivo G3 (DxxG), a Gly103, pertencente ao switch II. Thr50 é encontrada apenas no subgrupo da SEPT6, ao qual

*Sm*SEPT10 pertence, nos demais subgrupos a posição deste resíduo é ocupada por uma serina (Figura 39).

Figura 39 - Resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação de *Sm*SEPT10G a GTP e ao Mg^{2+} . GTP é representado no centro da figura, com a cadeia carbônica em roxo. Átomos de carbono são representados pela cor preta, nitrogênios pela cor azul, oxigênios são mostrados em vermelho, moléculas de água em azul claro e Mg^{2+} em verde; os átomos de hidrogênio foram omitidos para facilitar a visualização.

Ainda é possível observar na Figura 39 que o íon Mg^{2+} , que se encontra presente apenas no complexo com GTP, está diretamente ligado pela Ser55 do P-loop, dois oxigênios dos fosfatos β e γ , duas moléculas de água e pelo Glu100 da extremidade C-terminal da fita β 3, que substitui o Asp tipicamente encontrado no motivo G3. No complexo com GDP, devido à falta do Mg^{2+} , este ácido glutâmico é liberado na região do switch II, assim como a molécula de água, w60, que é perdida devido à ausência do fosfato γ .

Interessantemente, o switch I não participa na ligação do Mg^{2+} , o que é diferente do observado para SEPT2 ligada a GppNHp⁶⁷ e SEPT3 ligada a GDP⁸⁰, em que o switch I se encontra diretamente envolvido via cadeia lateral da Thr78 e Thr102, respectivamente. O subgrupo da SEPT6 é o único que não possui este resíduo conservado e que possui uma

deleção de cinco resíduos anteriores a este, como consequência, *SmSEPT10* não segue o mecanismo *loaded spring* (representado na Figura 40) que envolve a participação do switch I na ligação do Mg^{2+} e no fosfato- γ .⁸²

Figura 40 - Diagrama esquemático do mecanismo universal *loaded spring*. Os switches I e II estão ligados ao fosfato- γ pelo grupo amida dos resíduos Thr e Gly (relativos à proteína Ras). A liberação do fosfato- γ após hidrólise do GTP permite que as regiões dos switches "relaxem" e adotem uma conformação diferente. Fonte: Vetter & Wittinghoffer.⁸²

O homólogo a esta treonina conservada em *SmSEPT10* é desordenado no complexo com GTP e a coordenação resultante do íon magnésio é diferente da descrita para outras septinas (Figura 41), além de um dos ligantes do Mg^{2+} ser diferente (Glu ocupa o lugar da treonina), a posição da coordenação neste íon também é diferente devido a uma troca com uma molécula de água. A Figura 41 além de comparar a coordenação do Mg^{2+} em *SmSEPT10* (A) e SEPT2 (B) também mostra a sobreposição da região correspondente ao switch I em *SmSEPT10* (vermelho) e SEPT2 (amarelo) em que fica clara a distância do switch I em *SmSEPT10* do íon Mg^{2+} (Fig. 41 C).

Figura 41 - Resíduos de aminoácidos envolvidos na coordenação do íon Mg^{2+} por *SmSEPT10* (A) e SEPT2 (B). O íon Mg^{2+} é representado em verde. As esferas vermelhas em A e B representam as moléculas de água coordenadas a este íon. C) sobreposição das regiões correspondentes ao switch I em SEPT2 (amarelo) e em *SmSEPT10* (vermelho).

A ausência de atividade GTPásica observada para *SmSEPT10* (discutida em detalhes no item 1.3.4) e atribuída à ausência do aminoácido conservado equivalente à Thr78 é ainda suportada pela completa falta de participação do switch I na ligação do nucleotídeo na ausência deste resíduo.

1.3.9.1 Deslizamento da fita $\beta 3$

A alta resolução obtida nos permitiu pela primeira vez a descrição de resíduos pertencentes a regiões ainda pobremente descritas em septinas devido aos limites de resolução, com destaque para a fita $\beta 2$, situada na extremidade da folha- β principal e a única antiparalela em relação às demais.

A principal e mais impressionante diferença se deu entre as estruturas ligadas a GDP e a GTP, a sobreposição das duas estruturas deixa claro um deslizamento da fita $\beta 3$ em relação às fitas adjacentes ($\beta 1$ e $\beta 2$) por exatamente dois resíduos (cerca de 6 Å). Os mapas de densidade eletrônica da fita $\beta 3$ para as estruturas ligadas ao GDP e ao GTP são apresentados na Figura 42, com destaque para o deslizamento por dois resíduos observado com a comparação destas estruturas.

Figura 42 - Densidade eletrônica da fita $\beta 3$. Mapas de densidade eletrônica para a fita $\beta 3$ em *SmSEPT10*-GDP (A) e *SmSEPT10*-GTP (B), nesta última os resíduos se encontram deslocados por dois (setas vermelhas) de forma que Glu100 fique em uma posição em que coordena o íon Mg^{2+} . O deslizamento desta fita parece ter sido facilitado pela existência da sequência repetitiva Lys-Leu-Lys-Leu (sublinhada).

A sequência de aminoácidos de *SmSEPT10* parece ter facilitado o deslizamento pela presença da sequência repetitiva Lys-Leu-Lys-Leu nesta fita. O deslizamento observado na fita de *SmSEPT10* faz com que Lys93 e Leu94 no complexo com GDP assumam as posições ocupadas por Lys95 e Leu96 no complexo com GTP (Figura 42).

Como consequência deste deslizamento, o loop $\beta 2/\beta 3$ é estendido na estrutura com GTP e ao mesmo tempo o loop que sai da fita $\beta 3$ e leva ao switch II é reduzido (Figura 43) e $\beta 2$ e $\beta 3$ se encontram estendidas na direção da interface NC na presença de GTP. As ligações de hidrogênio relativas a esta região da proteína em ambos os complexos também diferem, as 18 ligações de hidrogênio presentes nos dois lados da fita $\beta 3$ no complexo com GTP são substituída por 19 após o deslizamento da hélice no complexo com GDP.

Figura 43 - Sobreposição das estruturas de *SmSEPT10G* ligadas a GTP e GDP. É possível notar o deslizamento da fita $\beta 3$ (destacada em amarelo) quando as estruturas ligadas a GTP (azul escuro e fita $\beta 3$ em amarelo) e GDP (azul claro e fita $\beta 3$ em laranja) são sobrepostas.

A presença do íon Mg^{2+} no complexo com GTP parece ter sido crítica para a observação do deslizamento da fita, Mg^{2+} é coordenado pelo resíduo Glu100, da fita $\beta 3$. No complexo com GDP, que não contém o metal, Glu100 é deslocado para o loop que sai de $\beta 3$ e leva ao switch II. Tal observação é consistente com o fato de a estrutura da septina humana SEPT3⁸⁰ no complexo com GDP e Mg^{2+} apresentar a fita $\beta 3$ deslocada de forma equivalente ao complexo com GTP descrito aqui. A estrutura da SEPT6 do heterofilamento³¹ é a única ligada a GTP e não a GDP e apesar dos limites de resolução, a posição das fitas β foi interpretada da mesma forma que observado aqui para as fitas $\beta 1$ e $\beta 3$ no complexo *SmSEPT10G* com GTP.

Observações semelhantes foram reportadas em outros sistemas, em que foi observado o deslizamento da fita como um mecanismo de ativação.⁸³⁻⁸⁶ O exemplo mais relevante é encontrado para proteínas da família das Arfs (fator de ribosilação de ADP), que assim como

septinas, são GTPases envolvidas em eventos de remodelamento de membrana associados com o transporte de vesículas intracelulares.^{87,88} A associação destas proteínas às membranas depende da exposição de um grupo miristoil no N-terminal, que é dependente da presença de GTP e não de GDP. A atividade de Arf1 e Arf6 é controlada pela hidrólise de GTP, que leva a um deslizamento da fita $\beta 3$ análogo ao descrito para *SmSEPT10*, com a diferença de no caso destas Arfs, a fita $\beta 2$ acompanha a $\beta 3$ e ambas deslizam como um corpo rígido em relação à $\beta 1$.⁸⁹⁻⁹²

Ambas as proteínas têm uma α -hélice no N-terminal que precede a fita $\beta 1$. Em septinas, esta hélice (hélice $\alpha 0$) corresponde à região polibásica, conhecida por participar da associação com membranas.⁹³ A orientação desta hélice é extremamente diferente nos complexos de Arf com GDP e GTP, sendo enovelada atrás da estrutura na forma ligada a GDP e exposta na forma ligada a GTP. Esta mudança conformacional controla a associação com membranas e envolve tanto o grupo N-miristoil como resíduos hidrofóbicos e básicos da hélice.⁹⁴ No complexo de septinas SEPT2/6/7, a hélice $\alpha 0$ esta presente, embora com baixa resolução, e a partir desta estrutura é possível afirmar que o deslocamento da fita na estrutura ligada a GTP em *SmSEPT10* causaria um impedimento estérico e forçaria a hélice em uma conformação diferente, de forma análoga à observada para as Arfs.

A semelhança na estrutura e função destas duas famílias de proteínas é altamente sugestiva de um mecanismo similar de ação. Portanto, é sugerido que o deslizamento da fita $\beta 3$ observado em *SmSEPT10* seja parte integral do mecanismo pelo qual septinas se associem e desassociem de membranas, o que implica que a importância da ligação e hidrólise de GTP é relacionada à associação a membranas e não a formação de filamentos, o que concorda com os resultados de Zhang et al.⁹³, em que a ligação dos nucleotídeos de guanina é associada com a afinidade de septinas por PIP_2 . Deve-se notar que ao contrário das septinas, as Arfs são ativas como monômeros e não formam filamentos, o que pode implicar em diferenças no significado biológico das mudanças conformacionais análogas observadas.

De acordo com a estrutura observada em complexos humanos, membros do subgrupo de SEPT6 ocupam a posição central no heterofilamento, interagindo com membros de SEPT2 via interface G e com SEPT7 via interface NC. Assumindo que os heterofilamentos de septinas de schistosoma apresentem uma estrutura semelhante, conclui-se que as interfaces presentes no filamento formado em nossa estrutura (Figura 44) devem ser consideradas promíscuas, uma vez que não são preditas de existir fisiologicamente. Serrão et al.⁷⁹ reportam a promiscuidade das interações nas interfaces de SEPT7 e acreditamos que este é um fenômeno genérico observado em septinas.

Figura 44 – Homofilamento de *SmSEPT10G* presente no cristal.

1.3.10 Expressão, Purificação e Caracterização do complexo de septinas de *S. mansoni*

O sistema de coexpressão construído para *SmSEPT5*, *SmSEPT10* e *SmSEPT7.2* teve como objetivo o estudo de heterofilamentos supostamente formados por estas proteínas.

Septinas de *S. mansoni* apresentam todos os domínios e motivos conservados comumente encontrados em septinas e, portanto, era esperado que estas formassem heterofilamentos, conforme descrito para outras espécies.¹² As três proteínas foram coexpressas e apenas *SmSEPT7.2* encontrava-se fusionada a uma cauda de histidina no N-terminal. Considerando que apenas esta proteína se ligaria à coluna de cobalto, a copurificação das três proteínas seria o primeiro indício de interação das mesmas.

O complexo foi coexpresso e copurificado com sucesso, pois análises de SDS-PAGE revelaram a presença das três proteínas com massas moleculares compatíveis com *SmSEPT5* (51.3 kDa), *SmSEPT10* (48.1 kDa) e *SmSEPT7.2* (59.2 kDa) (Figura 45 A).

O complexo purificado apresentava estrutura secundária, conforme acessado por espectroscopia de dicroísmo circular (Figura 45 B).

Figura 45 - Análises de SDS-PAGE e CD do complexo *SmSEPT5/10/7.2*. A) Gel de poliacrilamida 15%: a) padrões de MM; b) As três bandas correspondentes ao complexo de septinas após a segunda etapa de purificação: *SmSEPT5* (51.3 kDa), *SmSEPT10* (48.1 kDa) e *SmSEPT7.2* (59.2 kDa). B) Espectro de dicroísmo circular do complexo *SmSEPT5/10/7.2* (0,2 mg/mL) em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0; NaCl 500 mM; glicerol 10% e β-mercaptoetanol 5 mM.

O perfil cromatográfico em coluna de exclusão molecular obtido para o complexo é apresentado na Figura 46 A. Podem-se distinguir três picos no cromatograma, sendo que as frações correspondentes a cada pico foram analisadas por SDS-PAGE (Figura 46 B).

Podemos inferir com base nas bandas presentes no gel de poliacrilamida e pelo cromatograma que o primeiro pico corresponde a agregados proteicos, pois foi eluído no volume morto da coluna (*void*). Estes agregados são constituídos principalmente por *SmSEPT7.2*, já que esta é a proteína com maior massa molecular dentre as 3 no complexo (59 kDa) e a análise de SDS-PAGE correspondente à esta fração resultou na banda com maior massa.

O segundo pico, com uma massa estimada em 406,13 kDa, pela cromatografia de exclusão molecular, corresponde ao complexo de interesse, sendo possível visualizar três bandas no gel de poliacrilamida com massas moleculares compatíveis com as proteínas de interesse: *SmSEPT7.2* (59.2 kDa), *SmSEPT5* (51.3 kDa) e *SmSEPT10* (48.1 kDa).

O terceiro pico, com uma massa estimada em 136,28 kDa, consiste principalmente de excesso de *SmSEPT7.2*. Esta, por estar com a cauda de hexahistidina, estaria sendo purificada em excesso, pois, possivelmente, uma parte dela não interagiu com as outras septinas, sendo eluída isoladamente. Segundo a estimativa de massa molecular pela cromatografia de exclusão molecular (136 kDa), o estado oligomérico de *SmSEPT7.2* parece ser também compatível com dímeros, já que a massa de seu dímero é de 118,37 kDa.

Figura 46 - Purificação do complexo *SmSEPT5/10/7.2*. A) Perfil cromatográfico do complexo de septinas de *S. mansoni*; B) Gel de poliacrilamida 15% contendo as frações eluídas da coluna Superdex 200: a) padrão de massa molecular; b-i frações correspondentes aos volumes 8-15 mL, respectivamente. As massas moleculares de *SmSEPT7.2*, *SmSEPT5* e *SmSEPT10* são 59.2 kDa, 51.3 kDa e 48.1 kDa, respectivamente. A banda de maior massa presente no gel corresponde a uma proteína copurificada com o complexo, possivelmente GroEL, identificada também em outras preparações de complexos de septinas em nosso grupo.

Com o intuito de confirmar se as bandas presentes no gel de poliacrilamida correspondiam a *SmSEPT5*, *SmSEPT10* e *SmSEPT7.2*, uma análise por espectrometria de massas foi realizada com amostras extraídas do gel de poliacrilamida. As bandas referentes a cada uma das três septinas foram recortadas do gel e tripsinizadas conforme protocolo descrito no item 1.2.11.

Na Figura 47 é apresentado o espectro de massas obtido a partir da infusão direta da reação de tripsinização da solução contendo as três proteínas de interesse.

Figura 47 - Espectro de massas do complexo formado por *SmSEPT5*, *SmSEPT10* e *SmSEPT7.2* após digestão com tripsina.

As análises das massas dos picos detectados nos experimentos, bem como seus respectivos espectros de fragmentação foram realizadas com o programa MASCOT, utilizando como base de dados para a busca todas as proteínas deduzidas a partir do genoma do *S. mansoni*. Os únicos três *hits* identificados por este programa foram as proteínas com os códigos Smp_060070; Smp_029890 e Smp_041060, que correspondem à *SmSEPT7.2*; *SmSEPT10* e *SmSEPT5*, respectivamente. É possível notar que obtivemos identificações de peptídeos com alto grau de significância para as três septinas, confirmando assim a presença das três no complexo proteico purificado (Tabela 4).

Tabela 4 - Lista de peptídeos identificados por espectrometria de massas

Peptídeo	Septina	Score	Expect*
VPFAVVGANTLITNNAGVR	<i>SmSEPT7.2</i>	67	1,00E-05
YLLLSVYMQLR	<i>SmSEPT7.2</i>	66	1,00E-05
SYPWGIVEVENMDHNDFAAIR	<i>SmSEPT7.2</i>	59	4,30E-05
FDDYISGESR	<i>SmSEPT7.2</i>	47	1,60E-03
STFVNSLFLSEVYNTDHPGPSK	<i>SmSEPT7.2</i>	40	3,80E-03
EWDIGAEIGTNGPTLGLGER	<i>SmSEPT7.2</i>	37	8,20E-03
FLEEEIAAFER	<i>SmSEPT10</i>	61	6,10E-05
VNVIPVIAK**	<i>SmSEPT10</i>	17	1,7
EGGTGFEAIVDQDSLLK	<i>SmSEPT5</i>	41	4,00E-03
VNIVPVIAK**	<i>SmSEPT5</i>	17	1,7

*E-value calculado pelo programa MASCOT.

**Peptídeos identificados com score idêntico pertencentes ao mesmo espectro de fragmentação.

Desta forma, foi possível confirmar que as septinas de *S. mansoni* interagem, se organizando na forma de complexos. Este complexo parece ser análogo aos descritos em

humanos, sendo formado por septinas pertencentes a diferentes grupos, o que pode representar uma configuração ancestral das septinas, que posteriormente se diversificaram.

Assim, o estudo deste complexo pode fornecer informações sobre o funcionamento das septinas em *S. mansoni*, bem como a possibilidade de se estabelecer correlações funcionais com septinas de outros organismos.

1.4 CONCLUSÕES DO CAPÍTULO 1

A caracterização estrutural de septinas de *Schistosoma mansoni*, objetivo principal deste capítulo, foi conseguida com sucesso. A partir dos resultados apresentados aqui se pôde estabelecer correlações entre as septinas estudadas e àquelas pertencentes a outros organismos, além de resultados inéditos que esperamos poder contribuir também para o entendimento de septinas em outros organismos.

As análises de bioinformática juntamente com a caracterização biofísica de *SmSEPT5* e *SmSEPT10* revelaram que a conservação desta família de proteínas, refletida na alta identidade entre suas sequências, resultaram em uma série de propriedades biofísicas também compartilhadas por estas proteínas, como a alta tendência a agregação, propensão a se organizar na forma de heterofilamentos e ausência de atividade GTPásica em membros do subgrupo da SEPT6.

Um dos resultados mais relevantes deste capítulo foi conseguido pela obtenção da estrutura cristalográfica de *SmSEPT10G*, cuja resolução (a maior obtida até o momento para esta família de proteínas) nos permitiu verificar propriedades até então desconhecidas para septinas, como o deslizamento de uma das fitas β no domínio GTPase dependente do nucleotídeo ligado. Tal observação auxilia na elucidação do papel dos nucleotídeos nestas proteínas e no impacto desta ligação na estrutura de septinas, podendo também ter implicações no mecanismo de ativação destas proteínas, não só em *S. mansoni*, mas em septinas de outros organismos.

CAPÍTULO 2

Estudos Funcionais de septinas de *Schistosoma mansoni*

2.1 INTRODUÇÃO

No primeiro capítulo desta tese foi descrito pela primeira vez um estudo estrutural de septinas de *S. mansoni*, bem como a primeira caracterização de um complexo de septinas presente neste organismo. Para que uma caracterização mais completa das septinas de *S. mansoni* fosse conseguida, estudos funcionais de tais proteínas se mostraram essenciais.

Especificamente, são descritos neste capítulo os primeiros estudos funcionais com septinas de *S. mansoni*, que consistiram em experimentos de RNA de interferência com o objetivo de silenciar os quatro transcritos em estudo e avaliar o impacto de tal silenciamento na morfologia e viabilidade de esquistossômulos. Experimentos com um composto que afeta a dinâmica de septinas para a avaliação do fenótipo resultante em vermes adultos, cercárias e miracídios foram também realizados. Além de experimentos de imunolocalização em diferentes estágios do ciclo de vida de *S. mansoni* e a avaliação do perfil de expressão dos quatro transcritos codificadores de septinas em sete estágios do ciclo de vida do parasito.

Este capítulo contém os resultados adquiridos durante estágio na *George Washington University*, sob a orientação do Prof. Dr. Paul Brindley. O grupo do Prof. Dr. Paul Brindley tem se destacado nesta área, através do uso da técnica de RNAi para inativar produtos de vários genes em *S. mansoni*, além de estudos pioneiros para a obtenção de transgênicos deste parasito.^{95,96}

2.1.1 RNA de interferência

RNA de interferência consiste em uma técnica amplamente utilizada para a elucidação de funções de proteínas, o que é conseguido por meio da destruição específica de RNA mensageiro correspondente a um transcrito alvo, através da adição de RNA fita dupla (dsRNA, *double strand RNA*) correspondente àquela sequência.⁹⁷

O trabalho seminal de Fire et al, em 1998, demonstrou que a adição de RNA dupla fita em *C. elegans* resultava em um silenciamento gene-específico.⁹⁸ A descoberta teve como base a observação prévia de silenciamento parcial de genes pela adição de RNA fita simples (antisense ou senso).⁹⁹⁻¹⁰¹ Fire et al demonstraram que o efeito previamente observado era

causado por contaminação nas preparações de RNA fita simples com RNA fita dupla, responsável pelo silenciamento.⁹⁸

A maquinaria celular responsável por este efeito usa a informação contida na sequência do dsRNA para gerar um complexo proteína-RNA que destrói o RNAm correspondente, o que faz com que o sistema seja altamente específico.¹⁰² O papel deste sistema em animais e plantas tem sido atribuído à manutenção da integridade do genoma pela supressão da mobilidade de transposons e da acumulação de sequências repetitivas de DNA nas células germinativas, além de atuar como um mecanismo de defesa contra infecções virais, pois durante o processo de duplicação, alguns vírus e transposons geram dsRNA, que é reconhecido e degradado pela célula hospedeira.^{103,104} O sistema de RNA de interferência também se mostrou envolvido no controle da expressão de genes endógenos.¹⁰⁵

O mecanismo de RNA de interferência pode ser dividido em duas etapas principais. Na primeira, dsRNA é reconhecido e clivado pela enzima Dicer em dsRNA menores, chamados de siRNA (*small interfering RNA*) que possuem de 21 a 23 nucleotídeos.^{102,106} Dicer é uma proteína multidomínio que compreende um domínio RNA helicase dependente de ATP, um domínio Piwi/ArgonAUTA/Zwille (PAZ), dois domínios RNase III adjacentes e um domínio de ligação ao dsRNA.¹⁰⁵

Os siRNAs resultantes do processamento pela Dicer seguem para a segunda etapa, na qual são incorporados em um complexo multiproteína chamado RISC (*RNA-induced silencing complex*). O complexo RISC é encontrado nas formas ativa e inativa; inicialmente siRNA precisa ser fita dupla para ser reconhecido e ligar-se ao complexo, após a separação das fitas por uma helicase do complexo, a forma ativa, denominada RISC*¹⁰⁷ apresenta-se associada apenas a fita antisenso do siRNA que reconhece especificamente RNAm com sequência complementar, que é clivado e degradado.¹⁰⁸

2.1.2 RNA de interferência em *Schistosoma mansoni*

RNAi tem sido descrito em diferentes organismos incluindo vertebrados¹⁰⁹, plantas¹¹⁰, fungos¹¹¹, insetos¹¹², nematodAs¹⁰³ e platelmintos.¹¹³ Em organismos como *Schistosoma mansoni* este sistema se torna particularmente atrativo devido às limitadas técnicas de manipulação genéticas disponíveis. Os maiores obstáculos ao avanço na manipulação genética deste organismo consistem em seu complexo ciclo de vida, tecidos

multicelulares e organização complexa, na ausência de linhagens de células imortalizadas e na inability de manter todo o ciclo de vida *in vitro*. Além disso, os estágios do ciclo de vida são extremamente diferentes em aparência, estrutura, número de células e morfologia.⁴⁴

A publicação do genoma e transcriptoma do *S. mansoni* permitiram a identificação de várias proteínas participantes da maquinaria de RNA de interferência.¹¹⁴ Uma proteína homóloga à Dicer, denominada SmDicer foi caracterizada e contém todos os domínios característicos para esta proteína e com 2641 aminoácidos consiste na maior proteína Dicer já descrita.¹¹⁵ Além disso, trabalhos de supressão de genes em *Schistosoma mansoni* demonstraram a aplicabilidade da técnica e a existência da maquinaria celular responsável pelo processo de RNA de interferência.¹¹⁶

A busca por proteínas homologas acoplada à identificação de proteínas-chave na via de degradação de dsRNA em *Schistosoma mansoni* permitiu a Krautz-Peterson et al a proposição de um esquema desta via, representado na Figura 48.¹¹⁶

A via se inicia com a captação de dsRNA exógeno (Figura 48 i) pela proteína SmSID-1 (homóloga à proteína SID-1 de *C. elegans* necessária para a captação de dsRNA), o dsRNA se liga à SmDicer e a uma proteína ligadora de RNA (Parceira da Dicer) que leva à clivagem do dsRNA e à geração de siRNA (Figura 48 ii). A dupla fita de siRNA é desfeita após a ligação ao RISC. O complexo RISC contém uma proteína argonauta, que constitui o centro catalítico do complexo¹¹⁷ e pode ter vários parceiros de ligação (Figura 48 iii). O RISC, carregado então com um única fica de RNA procura RNAm alvos, os quais serão clivados.¹¹⁶

Figura 48 - Via de RNA de interferência proposta em *Schistosoma mansoni*. DsRNA é captado via SmSID-1 (i), é ligado ao complexo SmDicer/Parceiro da Dicer (ii) e clivado em siRNA, que é então ligado ao complexo RISC contendo Argonauta (SmAgo) e proteínas parceiras (iii). RNAm homólogo ao siRNA contido em RISC é identificado e clivado (iv). Fonte: Krautz-Peterson et al.¹¹⁶

A técnica de RNA de interferência tem sido realizada com sucesso em várias etapas do ciclo de vida do *S. mansoni*, pois embora ainda não se consiga obter todas as fases deste parasito *in vitro*, estas são obtidas em laboratório por meio da infecção de camundongos e caramujos como hospedeiros.⁴⁴ RNAi tem apresentado resultados promissores na elucidação da função de proteínas em diversas áreas da biologia do schistosoma, incluindo sistema digestório¹¹⁸⁻¹²¹ e desenvolvimento de diferentes estágios do parasito.^{122,123}

2.1.3 Forchlorfenuron, composto que afeta a dinâmica de septinas

Além do uso de técnicas de manipulação genética para o estudo de funções de proteínas, a busca por inibidores ou moléculas que afetem especificamente a função de uma proteína se torna extremamente útil na elucidação de sua função. Algumas estruturas do citoesqueleto possuem inibidores específicos, como é o caso de actina e tubulina, cuja

polimerização pode ser inibida com o uso de latrunculina ¹²⁴ e tiabendazol ¹²⁵, respectivamente.

Embora não tenha sido identificado até o momento nenhum inibidor específico da polimerização de septinas, forchlorfenuron (FCF) tem sido utilizado para o estudo destas proteínas em células de mamíferos ¹²⁶, leveduras ¹²⁷, fungos ¹²⁸ e algas ¹²⁹, pois afeta a dinâmica destas proteínas, por um mecanismo ainda desconhecido.

Forchlorfenuron ou N-(2-cloro-4-piridil)-N'-feniluréia ($C_{12}H_{10}ClN_3O$) é uma citocinina sintética ^{130,131}; consiste em uma pequena molécula cuja estrutura é mostrada na Figura 49. Citocininas são hormônios vegetais envolvidos em vários processos importantes associados com o crescimento e desenvolvimento das plantas, sendo amplamente utilizados na agricultura. ¹³²

Figura 49 - Estrutura química de forchlorfenuron (FCF).

Iwase et al, em 2004, reportaram a inibição da citocinese em *S. cerevisiae* mediante tratamento com FCF, o que os levou a investigar a relação entre FCF e septinas. Neste trabalho, FCF induziu a formação anormal de filamentos de septinas fora do sulco de divisão, processo que se mostrou imediato e reversível, enquanto a distribuição de actina não foi alterada após o tratamento com FCF. ¹²⁷

No subsequente trabalho envolvendo FCF e septinas, em 2008, Hu et al avaliaram os efeitos de FCF em células de mamíferos e revelaram que a organização de septinas também se mostrou afetada de uma forma reversível. Experimentos de FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) revelaram que as fibras de septinas induzidas por FCF eram mais estáveis, tal estabilização dos filamentos afeta diretamente a função de septinas, já que estas estruturas são altamente dinâmicas, reflexo em grande parte da associação de complexos de septinas em filamentos. Defeitos mitóticos e de migração celular foram também observados em células tratadas com FCF, os quais foram considerados fenocópia dos efeitos observados por RNAi no mesmo estudo. ¹²⁶

A especificidade de FCF foi avaliada a partir de estudos de polimerização de actina e tubulina, em que FCF não apresentou efeito detectável. Experimentos *in vitro* revelaram que a

polimerização do complexo de septinas humanas SEPT2/6/7 na presença de FCF resultava em filamentos mais largos e densos, conforme acessado por microscopia eletrônica de transmissão.¹²⁶

O mais recente trabalho que procura explicar o efeito de FCF em septinas data de 2010, em que DeMay et al trataram o fungo filamentoso *Ashbya gossypii* com FCF e chegaram a conclusões similares. A indução da formação de fibras estáveis de septinas, as quais eram desfeitas com a remoção de FCF.¹²⁸

A partir de então FCF tem sido empregado como ferramenta para a elucidação da função de septinas.^{129,133-136} Em alguns trabalhos RNAi foi utilizado paralelamente ao FCF e o efeito observado por ambos se mostrou equivalente^{126,133} enquanto a utilização de FCF em conjunto com RNAi, recentemente reportada, maximizou o efeito observado quando comparado aos dois métodos utilizados separadamente.¹³⁶ Apesar da crescente utilização deste composto, o mecanismo pelo qual FCF afeta septinas permanece por ser elucidado.

2.1.4 Objetivos e justificativa

Este capítulo tem como foco a caracterização funcional de septinas de *S. mansoni*, que juntamente com os estudos estruturais apresentados no primeiro capítulo visa abranger o conhecimento desta complexa família de proteínas.

Os objetivos específicos do presente capítulo foram:

- i. Realizar a imunolocalização das septinas *SmSEPT5* e *SmSEPT10* em diversos estágios do ciclo de vida de *S. mansoni* utilizando microscopia confocal.
- ii. Avaliar o nível de expressão de cada um dos transcritos codificadores de septinas (*SmSept5*, *SmSept10*, *SmSept7.1* e *SmSept7.2*) em diferentes estágios do ciclo de vida de *S. mansoni* pela técnica de *Real-Time* PCR (RT-PCR).
- iii. Realizar experimentos de RNA de interferência com o intuito de avaliar o *knockdown* dos transcritos de interesse e o possível efeito fenotípico da supressão destes transcritos em esquistossômulos.
- iv. Avaliar o efeito fenotípico de FCF, composto que estabiliza os filamentos de septinas, em diferentes estágios do ciclo de vida do parasito.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Obtenção de diferentes estágios do ciclo de vida de *S. mansoni*

Camundongos fêmeas Swiss Webster e caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* infectados com a linhagem NMRI (Porto Rico) de *Schistosoma mansoni* foram fornecidos por Dr. Fred Lewis, do *Biomedical Research Institute*, Rockville, MD.

Vermes adultos foram recuperados dos camundongos infectados por perfusão da veia porta, conforme ilustrado na Figura 50. Após etapas de lavagem em PBS (*Phosphate Buffered Saline*), os vermes adultos foram cultivados a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂ em DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) suplementado com 10% de soro fetal bovino e penicilina/estreptomicina.⁴⁴

Figura 50 - Esquema do aparato de perfusão para coletar vermes adultos de *S. mansoni* da veia porta hepática de camundongos. Fonte: Lewis¹³⁷

Cercárias foram obtidas a partir dos caramujos infectados por exposição destes à luz, sendo imediatamente utilizadas após algumas lavagens com PBS ou submetidas à transformação em esquistossômulos.

Os esquistossômulos foram obtidos a partir de cercárias por transformação mecânica. Cercárias foram concentradas por centrifugação (1.000 g/15 min) e lavadas com PBS três

vezes. As caudas das cercárias foram removidas através de trinta passagens das mesmas por uma agulha (22 gauge) acoplada a duas seringas e em seguida, os esquistossômulos foram separados das caudas por centrifugação em gradiente de Percoll. Os esquistossômulos foram então lavados três vezes com PBS e cultivados em *Basch's medium* a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂.⁴⁴

Os ovos foram recuperados dos fígados dos camundongos. Após várias etapas de lavagem com PBS e separação por gradiente de Percoll, a eclosão dos ovos foi realizada em água pela exposição destes à luz.^{44,138} Os miracídios então colectados foram utilizados imediatamente nos experimentos ou colocados em meio de cultura específico em uma placa de 6 poços dentro de uma câmara de hipóxia, para que a transformação em esporocistos primários pudesse ocorrer. Os protocolos encontram-se descritos em detalhes em Mann et al.⁴⁴

Todos os protocolos descritos aqui foram aprovados pelo *Institutional Animal Care and Use Committee* da *George Washington University*.

2.2.2 Imunolocalização de septinas em *S. mansoni*

2.2.2.1 Produção e purificação de anticorpos anti-septinas

Anticorpos anti-*SmSEPT5* e anti-*SmSEPT10* foram produzidos em colaboração com a Prof^a. Dr^a Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo, que forneceu o soro do sangue de camundongos após imunização destes animais com as respectivas proteínas purificadas.

Os anticorpos policlonais produzidos foram purificados do soro por cromatografia de afinidade em que as proteínas purificadas (*SmSEPT5* e *SmSEPT10*) foram imobilizadas em uma resina de NHS HiTrap (GE Healthcare Life Sciences). A purificação dos anticorpos foi realizada de acordo com as instruções do fabricante.

2.2.2.2 Extração de proteínas de vermes adultos e *Western blot*

Análises de *Western blot* foram realizadas com extratos de vermes adultos e com as proteínas recombinantes para verificar se os anticorpos produzidos e purificados eram ativos e específicos para *SmSEPT5* e *SmSEPT10*.

A extração de proteínas de vermes adultos foi realizada segundo modificações do protocolo descrito por Inoue et al.¹³⁹ para extração de proteínas de citoesqueleto. 50 mg de vermes adultos foram homogeneizados em tampão de solubilização (10 mM PIPES pH 8,0; 50 mM KCl, 10 mM EGTA; 3 mM MgCl₂; 2 M glicerol) e centrifugados (15 min, 800 g a 4 °C). O sobrenadante foi separado e submetido à nova etapa de centrifugação a 10.000 g por 30 min a 4 °C. O pellet foi lavado com tampão de solubilização contendo 1% de Triton X-100 e novamente centrifugado. O sobrenadante foi então submetido a análises de SDS-PAGE e *Western blot*.

O protocolo de *Western blot* se iniciou com análise de SDS-PAGE das proteínas extraídas de vermes adultos, seguida pela transferência destas proteínas do gel de poliacrilamida para uma membrana de nitrocelulose. A transferência foi realizada com a utilização do equipamento *Trans-blot Semi-dry Transfer cell* (Bio-Rad). Tal procedimento foi iniciado pela imersão do gel de poliacrilamida, da membrana de nitrocelulose e dos filtros (*Extra thick blot paper* - Bio-Rad) em tampão de transferência (20 mM Tris, 50 mM glicina, 17% metanol) por 15 minutos, seguido pela montagem do “sanduíche”: o papel de filtro foi colocado no equipamento, a membrana de nitrocelulose foi adicionada sobre o filtro e sobre esta foi adicionado o gel, seguido por outro filtro. O equipamento foi então fechado e a transferência das proteínas para a membrana foi feita por 30 min a 10 V.

Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi lavada por três vezes de 15 min com TBS-T (Tris 10 mM, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20) e incubada com o reagente de bloqueio (5% de leite desnatado em TBS-T) por 2 h a 4 °C. Todas as incubações foram realizadas sob agitação a 4 °C e todas as lavagens por três vezes de 15 min. Descartado o reagente de bloqueio, a membrana foi lavada e incubada com o anticorpo primário (diluição 1:1000) por 2 h, seguida de lavagem e incubação com o anticorpo secundário *goat anti-mouse IgG-Alkaline Phosphatase* (Sigma-aldrich) (diluição 1:5000) por 2 h. A membrana foi então lavada e a revelação foi feita com a utilização do *Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate kit* (Bio-Rad), de acordo com as instruções do fabricante.

2.2.2.3 Protocolo de Imunolocalização

Diferentes estágios do ciclo de vida de *S. mansoni* foram submetidos à imunolocalização de *SmSEPT10* e *SmSEPT5*, cujos anticorpos primários foram produzidos em camundongos e purificados em colunas HiTrap™ contendo as respectivas proteínas recombinantes imobilizadas. Os estágios estudados foram: miracídios, esporocistos, cercárias, esquistossômulos cultivados por dois dias, esquistossômulos cultivados por quatorze dias e vermes adultos machos e fêmeas.

O protocolo para a imunolocalização foi o mesmo para os diferentes estágios: os organismos foram divididos em grupos e colocados em um inserto contendo poros de 8 µm em uma placa de 24 poços. Os organismos foram lavados três vezes com 500 µL de PBS contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T) antes da fixação com paraformaldeído 4% em PBS (diluído a partir de um estoque 16%) realizada a 4 °C por 16 h.

Após a fixação, os organismos foram submetidos à permeabilização, em que foram tratados com acetona por 5 min a temperatura ambiente seguida por três lavagens com PBS-T e uma nova etapa de permeabilização com Triton-X 0,2% em PBS.

A etapa de bloqueio foi realizada após três lavagens com PBS-T, por incubação a 4 °C por 16 h em 5% de soro de cabra. Sem lavagens, as amostras foram incubadas com o anticorpo primário por 72 h a 4 °C com agitação, lavadas 3 vezes com PBS-T e submetidas a uma nova etapa de bloqueio por 20 min em 5% de soro de cabra a temperatura ambiente.

O anticorpo secundário (Alexa Fluor 633 *goat anti-mouse IgG* - Invitrogen) foi adicionado à solução de bloqueio (diluição 1:300) e incubado por 90 minutos a 37 °C. Após três lavagens em PBS-T as amostras foram coradas com 300 nM de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) por 30 min a temperatura ambiente, seguida por três lavagens em PBS-T e coloração com faloidina (para corar os filamentos de actina) conjugada com o fluoróforo Alexa Fluor 567 (Invitrogen). Após três lavagens em PBS os slides foram montados utilizando-se Fluoromount-GT (Electron microscopy sciences).

Controles foram incluídos em todos os grupos, estes foram incubados apenas com o anticorpo secundário e a etapa de incubação com o anticorpo primário foi substituída por incubação com PBS.

As imagens foram obtidas utilizando-se um microscópio confocal Zeiss 710, utilizando uma objetiva Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC objective (Carl Zeiss). As imagens foram escaneadas sequencialmente com lasers de 405 nm (filtro de emissão 410-585

nm), para a aquisição do sinal correspondente à coloração com DAPI, de 561 nm (filtro de emissão 572-630 nm) e 633 nm (filtro de emissão 638-747 nm) para a captura dos sinais referentes à faloidina e anti-*SmSEPT5* ou *SmSEPT10*, respectivamente. As imagens foram capturadas com uma resolução de 1024x1024 pixels, sendo a dimensão de cada pixel 0.132 μm . A manipulação das imagens foi feita com o software Zen 2009 (Carl Zeiss), tais manipulações consistiram em ajustes no brilho, cortes, magnificação de regiões específicas das imagens e adição de barras de escala. Imagens obtidas a partir de controles somente com o anticorpo secundários foram submetidas aos mesmos procedimentos.

2.2.3 RNA de interferência

2.2.3.1 *Primers* para a síntese de dsRNA e análises por RT-PCR

Para os experimentos de RNAi dois pares de *primers* foram adquiridos para cada transcrito de septina. Os primeiros, denominados *primers* RT, foram necessários para que a transcrição destes genes pudesse ser avaliada por RT-PCR, estes foram “desenhados” nas junções de dois éxons para evitar a amplificação de produtos provenientes de possíveis contaminações com DNA genômico. Os produtos das amplificações destes *primers* resultaram em *amplicons* com cerca de 100 pb. Os segundos, denominados *primers* T7 (por conter a região promotora da T7 RNA polimerase) correspondem àqueles necessários para a síntese dos dsRNAs, tais *primers* foram utilizados na síntese do DNA molde da reação de transcrição reversa para a produção de dsRNAs. Os *primers* utilizados resultaram em dsRNA de 659, 661, 670 e 672 pares de bases para *SmSept5*, *SmSept10*, *SmSept7.1* e *SmSept7.2*, respectivamente.

Na Tabela 5 constam as sequências dos *primers* RT e T7 para os quatro cDNAs de interesse. Os *primers* dos genes de referência, α -tubulina e GAPDH, bem como os *primers* utilizados na síntese do controle contendo RNA dupla fita de um gene irrelevante, a luciferase (*dsluc*), foram também incluídos na Tabela 5.

Tabela 5 - Primers utilizados na síntese dos dsRNA (T7) e nas análises dos níveis de transcrição dos genes por RT-PCR (RT)

Primer	Sequência
RT- <i>SmSept5-Fw</i>	5' GGAAGTGGCTTTGAGGCTATTG 3'
RT- <i>SmSept5-Rv</i>	5' TGTTCTTGCATTTTACTCATTAGTTGTTG 3'
T7- <i>SmSept5-Fw</i>	5' <u>TAATACGACTCACTATAGGGTCCGCGTTTTGGGGTTTCTGCT</u> 3'
T7- <i>SmSept5-Rv</i>	5' <u>TAATACGACTCACTATAGGGTGACTTTATGTTGAAGACGGCGCA</u> 3'
RT- <i>SmSept10-Fw</i>	5' CGACGTCAACGCTTAATCGA 3'
RT- <i>SmSept10-Rv</i>	5' CTTTAACACGCTGAACAAACATTTG 3'
T7- <i>SmSept10-Fw</i>	5' <u>TAATACGACTCACTATAGGGTGGGCATGTTGGCTTCGACAGT</u> 3'
T7- <i>SmSept10-Rv</i>	5' <u>TAATACGACTCACTATAGGGGCTACCCACAACAGCGAATG</u> 3'
RT- <i>SmSept7.1-Fw</i>	5' GGGTTTTGTGTTCAATCTTATGATTACT 3'
RT- <i>SmSept7.1-Rv</i>	5' GATGGACCAGGATAATCAGTGTTG 3'
T7- <i>SmSept7.1-Fw</i>	5' <u>TAATACGACTCACTATAGGGCTCCTAATGGGCATGGTTTGCATCA</u> 3'
T7- <i>SmSept7.1-Rv</i>	5' <u>TAATACGACTCACTATAGGGTCAGCACGTTCCACAAGATCACG</u> 3'
RT- <i>SmSept7.2-Fw</i>	5' CGCGTTTCGATGATTACATATCTG 3'
RT- <i>SmSept7.2-Rv</i>	5' GGAGCAATAAAGTAAATGCATGCA 3'
T7- <i>SmSept7.2-Fw</i>	5' <u>TAATACGACTCACTATAGGGAATCCCCGTGATCGCTAAAGCTG</u> 3'
T7- <i>SmSept7.2-Rv</i>	5' <u>TAATACGACTCACTATAGGGTGCACGTCGAGCAGCTTCTTGTT</u> 3'
RT- <i>Sma-tubulina-Fw</i>	5' GTGCTGTATGTATGTAAAGTA 3'
RT- <i>Sma-tubulina-Rv</i>	5' CGTGCTTCAGTAAAT TCA 3'
RT- <i>SmGAPDH-Fw</i>	5' TGTGAAAGAGATCCAGCAAAC 3'
RT- <i>SmGAPDH-Rv</i>	5' GATATTACCTGAGCTTTATCAATGG 3'
T7- <i>Luciferase-Fw</i>	5' <u>TAATACGACTCACTATAGGTGCGCCCGCGAACGACATTTA</u> 3'
T7- <i>Luciferase-Rv</i>	5' <u>TAATACGACTCACTATAGGGCAACCGCTTCCCCGACTTCCTTA</u> 3'

* As regiões sublinhadas correspondem à sequência promotora da T7 RNA polimerase.

2.2.3.2 Síntese de dsRNAs

Para a síntese dos dsRNAs, DNA molde foi sintetizado para cada transcrito através de PCR utilizando os *primers* T7 e os clones de cada cDNA em pET28a (como molde). Para a síntese do controle dsluc, foram utilizados os *primers* T7-Luciferase (Tabela 5) e o plasmídeo pGL3 (Promega) contendo a sequência da luciferase de *Photinus pyralis*. Como o *kit Megascript*, utilizado para a síntese dos dsRNAs, contém a enzima T7 RNA polimerase, os *primers* utilizados continham a sequência do promotor da T7 RNA polimerase (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'). Após a PCR utilizando gradiente de temperaturas (55-65°C) para determinar a melhor temperatura de anelamento para a produção de cada DNA molde, uma nova PCR foi realizada para cada transcrito com as seguintes etapas: 94 °C (30 min); 94 °C (1 min); (55-65 °C de acordo com o transcrito); 72 °C (1,5 min); 72 °C (10 min).

RNAs fitas duplas correspondentes aos transcritos dos quatro genes de interesse foram sintetizados utilizando o *kit Megascript RNAi* de acordo com as instruções do fabricante (Ambion). Tal protocolo consistiu na reação de transcrição reversa utilizando DNA molde específico para cada cDNA e o posterior anelamento das fitas de RNA para a produção de dsRNA. Além dos quatro cDNAs de interesse, o controle *dsluc*, que consiste em um transcrito irrelevante (que codifica luciferase) foi adicionado aos experimentos para avaliar a possível toxicidade relacionada à adição de RNA dupla fita aos organismos.

A integridade do DNA molde, bem como dos dsRNAs foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% e a concentração determinada espectrofotometricamente utilizando-se o NanoDrop (ND-1000, NanoDrop Technologies).

2.2.3.3 Eletroporação dos esquistossômulos

Os esquistossômulos foram removidos da cultura, divididos em três grupos de cerca de 8000 esquistossômulos e submetidos à eletroporação para a incorporação dos dsRNAs. 30 µg de cada dsRNA foram adicionados ao primeiro grupo (*dssept*); 120 µg de dsRNA correspondendo à luciferase foram adicionados ao grupo controle (grupo *dsluc*) e ao terceiro grupo não foi adicionado dsRNA (grupo *mock*).

Os esquistossômulos foram submetidos à eletroporação utilizando um único pulso de onda quadrada de 20 ms a 125 V. Após a eletroporação, os parasitos foram transferidos para o meio de cultivo (pré-aquecido) e mantidos em cultura a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂.

2.2.4 Análise da expressão gênica de septinas através de RT-PCR

A expressão endógena de *SmSept5*, *SmSept10*, *SmSept7.1* e *SmSept7.2* foi determinada através de reações de qPCR (PCR quantitativo). Inicialmente foi realizada extração de RNA utilizando-se o *kit RNAqueus-Micro* (Ambion), de acordo com as instruções do fabricante. Qualquer DNA restante foi removido por digestão com DNase (Ambion).

cDNA foi sintetizado utilizando o kit para a síntese de cDNA *iScript* (BioRad) de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA obtido foi utilizado como molde para reações de PCR quantitativa em tempo real (RT-PCR ou qPCR).

A técnica de qPCR foi realizada em um termociclador (iCycler, Bio-Rad) acoplado a um detector Bio-Rad iQ5. Placas de 96 poços foram utilizadas e cada reação continha 0,3 µM de cada *primer*, 2 µL de cDNA e 10 µL de *iQ SYBR Green Supermix* (Bio-Rad); o volume foi completado para 20 µL com água.

As reações foram feitas em triplicata e o protocolo de amplificação utilizado foi: desnaturação inicial a 95 °C por 3 min e 40 ciclos de 30 s a 95 °C e 30 s a 55 °C. A especificidade dos produtos de PCR foi verificada por meio de curva de fusão (*melting curve*) segundo o protocolo: 1 min a 95 °C, 1 min a 55 °C e uma rampa de aquecimento de 55 a 95 °C com uma taxa de aquecimento de 1 °C/min.

A quantificação relativa foi utilizada para analisar os resultados referentes aos experimentos de RNAi, por meio do método do $2^{-\Delta\Delta C_t}$.¹⁴⁰ A quantificação absoluta, realizada por meio de curva de calibração, foi o método de escolha para a análise do perfil de expressão gênica em diferentes estágios.¹⁴¹ A eficiência dos *primers* foi calculada a partir do coeficiente angular resultante das curvas de calibração de acordo com a equação 6:

$$E = 10^{(-1/\alpha)} \quad (6)$$

Em que α representa o coeficiente angular da reta.

2.2.5 Perfil de expressão de septinas de *S. mansoni* em diferentes estágios de seu ciclo de vida

A quantificação dos níveis de transcrição de septinas de *S. mansoni* foi avaliada por qPCR nos diferentes estágios do ciclo de vida deste organismo. Inicialmente foi realizada extração de RNA total de ovos, miracídios, esporocistos cultivados por dois dias, cercárias, esquistossômulos cultivados por dois dias, esquistossômulos cultivados por quatorze dias, vermes adultos machos e fêmeas. A extração de RNA e síntese de cDNA foram realizadas utilizando-se os mesmos *kits* descritos no item anterior (2.2.4). cDNA foi sintetizado a partir de 150 ng de RNA para todas as amostras. A concentração, pureza e integridade do RNA

foram analisadas utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop 1000 e o Agilent 2100 Bioanalyzer.

Quantificação absoluta foi utilizada por meio da construção de uma curva de calibração para cada cDNA através de diluição seriada (10^1 - 10^{-5} ng) de plasmídios contendo os cDNAs de interesse. Cada curva de calibração foi realizada na mesma placa de 96 poços das reações contendo cDNAs dos diferentes estágios, para evitar variações nas condições de amplificação entre diferentes corridas.¹⁴² As condições de amplificação foram as mesmas descritas no item anterior (2.2.4). O número de cópias de cada septina foi calculado pela relação entre a massa molecular de cada clone e a constante de Avogadro e estimado para cada reação por interpolação do sinal de fluorescência de cada amostra na curva de calibração. Duas replicas biológicas foram realizadas e todas as reações foram feitas em triplicatas. As reações foram normalizadas por ng de RNA total.

2.2.6 Ensaios com forchlorfenuron, composto que afeta a dinâmica de septinas

Forchlorfenuron (FCF) (Sigma-Aldrich) foi adicionado em diferentes estágios do ciclo de vida de *S. mansoni* (cercárias, vermes adultos e miracídios) em concentrações variando de 50 a 500 μ M. Uma solução estoque de FCF (250 mM) foi preparada em DMSO e a partir desta diferentes concentrações foram adicionadas diretamente ao meio de cultivo. Apenas os experimentos com miracídios foram realizados em água. Grupos controle contendo apenas DMSO foram incluídos em todos os experimentos.

Para avaliar a reversibilidade do efeito de FCF, a remoção deste composto foi feita pela transferência dos organismos para novo meio de cultura, sem a adição de FCF.

A alteração no fenótipo foi avaliada utilizando-se o microscópio invertido Zeiss Axio Observer A1 acoplado a uma camera digital (AxioCam ICc3, Zeiss).

De forma a acessar a viabilidade dos organismos, algumas amostras foram removidas do meio de cultura e incubadas com os fluoróforos diacetato de fluoresceína (DAF), a 2,0 μ g/ml, que cora as células vivas e com iodeto de propídio (IP) que cora as células mortas, de acordo com o protocolo descrito por Peak et al.¹⁴³

2.2.7 Microscopia eletrônica de transmissão dos filamentos formados e influência de FCF na formação destes filamentos

Os experimentos de MET dos complexos de septinas de *S. mansoni* foram realizados em colaboração com o Dr. Vitold Galkin, da Universidade de Virgínia. Para estas análises, 2,2 mg/mL do complexo purificado (de acordo com o item 1.2.4) foram dialisados contra 15 mM de Tris-HCl pH 8,0; 40 mM de NaCl; 2 mM de MgCl₂; 0,5 mM de GTP e 2 mM de ditioneitol (DTT) na presença de 25 ou 75 µM de FCF ou de DMSO.

A polimerização foi acompanhada aplicando-se alíquotas de 10 µL em grades de carbono e as corando com acetato de uranila 2% (a técnica de *negative staining* foi utilizada). As amostras foram examinadas em um microscópio eletrônico de transmissão Tecnai-12 (FEI) a 80 keV.

2.2.8 Espalhamento dinâmico de luz dos complexos de septinas

O complexo de septinas (0,2 mg/mL) em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 500 mM, glycerol 12% e β-mercaptoethanol 10 mM contendo 5 mM de GTP foi dialisado contra tampão Tris-HCl 15 mM pH 8,0, NaCl 40 mM, e ditioneitol (DTT) 15 mM na presença de 75 µM de FCF ou DMSO por 30 min a 4 °C. Medidas de espalhamento dinâmico de luz (do inglês, DLS *Dynamic Light Scattering*) foram realizadas em um instrumento Zetasizer µV (Malvern Instruments) com um laser de 830 nm e os resultados foram analisados por meio do software Zetasizer versão 6.32. As amostras foram adicionadas a uma cubeta de quartzo de 12 µL e a luz espalhada foi medida a um ângulo de 90°, a 22°.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

2.3.1 Imunolocalização de septinas em *S. mansoni*

Com o intuito de avaliar a distribuição de septinas nos diferentes tecidos de *S. mansoni* e obter indícios sobre sua função, experimentos de imunolocalização foram realizados. A especificidade dos anticorpos produzidos e purificados foi avaliada por meio da técnica de *Western blot*. Análises das proteínas recombinantes *SmSEPT5* e *SmSEPT10* mostraram um fraco reconhecimento cruzado entre estas proteínas. Anti-*SmSEPT5* reconheceu fortemente *SmSEPT5* (0,5 μ M) e fracamente *SmSEPT10* (0,5 μ M) enquanto anti-*SmSEPT10* reconheceu *SmSEPT10* e ainda uma fraca banda correspondente à *SmSEPT5* (Figura 51 A e C). Entretanto, o reconhecimento de proteínas em extratos de vermes adultos se mostrou específico e banda única foi detectada com anti-*SmSEPT5* ou anti-*SmSEPT10*, demonstrando a especificidade dos anticorpos produzidos em amostras biológicas (Figura 51 B e D).

O reconhecimento inespecífico pode ter sido devido à alta concentração das proteínas recombinantes utilizadas no experimento de *Western blot*. Além disso, a presença de uma pequena imunoreatividade cruzada era de fato esperada devido ao fato de os anticorpos serem policlonais, o que possibilita o reconhecimento de alguns epítomos comuns a diferentes septinas por uma fração dos anticorpos presentes devido ao grau de similaridade entre as proteínas.

Figura 51 - Análises de Western blot para avaliação da especificidade dos anticorpos produzidos. A) Anti-*SmSEPT5* reconhece fortemente a proteína recombinante *SmSEPT5* (0,5 μ M) na primeira coluna com 53.8 kDa e fracamente *SmSEPT10* (0,5 μ M) com 50.5 kDa na segunda coluna. B) Anti-*SmSEPT5* reconhece uma única banda, com a massa molecular esperada, no extrato de vermes adultos. C) Anti-*SmSEPT10* reconhece fortemente *SmSEPT10* (0,5 μ M) na segunda coluna e uma banda fraca foi detectada na primeira coluna, correspondendo a *SmSEPT5* (0,5 μ M). D) Anti-*SmSEPT10* reconhece uma única banda, com a massa molecular esperada, no extrato de vermes adultos.

Os experimentos de imunolocalização revelaram o mesmo perfil de localização de septinas independentemente do anticorpo utilizado (anti-*SmSEPT5* ou anti-*SmSEPT10*) para todos os estágios estudados, o que é condizente com a formação de heterocomplexos por estas proteínas. Assim, as imagens selecionadas e mostradas aqui foram adquiridas com anti-*SmSEPT5* ou anti-*SmSEPT10*, sendo indicado na legenda qual o anticorpo utilizado. Para facilitar a interpretação do sinal observado, os organismos foram também marcados com faloidina, que cora os filamentos de actina e com DAPI, que marca os núcleos das células.

Experimentos controle (incubados apenas com o anticorpo secundário) apresentaram sinal no canal referente às septinas que, apesar de detectável, se apresentou bastante inferior ao sinal observado na presença de anticorpos anti-septinas (Figura 52).

Figura 52 - Imagem representativa de um experimento controle em miracídeos. (A) Estrutura de F-actina em miracídeos corados com faloidina. (B) Canal referente ao laser 633 nm após incubação dos miracídeos apenas com o anticorpo secundário (Alexa Fluor 633 goat anti-mouse IgG). Amostras controle de outros estágios apresentaram níveis semelhantes de background neste canal.

2.3.1.1 Imunolocalização de septinas em miracídeos e esporocistos

A microscopia confocal utilizada permitiu a visualização dos organismos em diferentes cortes, o que possibilitou a precisa localização de septinas em diferentes tecidos. Em miracídeos e esporocistos, septinas apresentaram uma localização diferencial em camadas superficiais e em camadas internas. Em miracídeos, septinas foram localizadas nas placas epiteliais, que contém os cílios responsáveis pela locomoção desta larva de vida livre (Figura 53 C). Em esporocistos, a ausência das placas epiteliais ciliadas permitiu a observação de septinas em fibras musculares circulares e longitudinais (Fig. 53 D), em que também foram observados filamentos de actina (Fig. 53 B).

Figura 53 - Imunolocalização de septinas em camadas superficiais de miracídios e esporocistos. Painéis (A) e (C) representam uma seção superficial de miracídios e (B) e (D) camada superficial de esporocistos. Os painéis verdes (A) e (B) representam F-actina marcada com faloidina. Os painéis vermelhos (C) e (D) representam estruturas de septinas marcadas com anti-*SmSEPT10*. As regiões destacadas à extrema esquerda correspondem a uma placa epitelial de um miracídio (C) e à região equivalente marcada com faloidina (A). Barra de escala, 20 μ m.

Os cílios são estruturas altamente conservadas entre eucariotos.¹⁴⁴ As estruturas que mais se destacam nos cílios são os axonemas, que consistem basicamente em microtúbulos organizados na forma de heterodímeros de α e β tubulina, perifericamente localizados na célula. Cílios primários, em sua maioria não móveis, têm a estrutura 9 + 0, que se refere a nove pares de microtúbulos perifericamente localizados e a ausência do par de microtúbulos central, encontrada em cílios móveis ou cílios secundários, em sua maioria com a estrutura 9 + 2.¹⁴⁵

Os miracídios de *S. mansoni* possuem a superfície coberta por placas epiteliais ciliadas e estudos da ultraestrutura dos miracídios revelaram que a estrutura destes cílios é condizente com a de cílios móveis com organização de microtúbulos na forma 9 + 2.^{146,147} Esse tipo de cílio move fluidos e células e é responsável pela locomoção dos miracídios, enquanto os cílios

primários são responsáveis pela transdução de sinais em resposta a estímulos e pela regulação de vias de sinalização importantes para o desenvolvimento (Revisado em Goetz et al ¹⁴⁸).

Uma característica importante dos cílios é sua compartimentalização, em parte devido à singular composição de sua membrana. O transporte de proteínas entre o citoplasma e o cílio é regulado ¹⁴⁹ e a regulação de entrada e saída de proteínas ciliares depende de proteínas presentes na base ciliar, que constituem uma barreira de difusão que previne o tráfego não específico de proteínas para dentro ou fora do cílio. ¹⁵⁰

O envolvimento de septinas na ciliogênese foi previamente reportado em células de mamíferos e em embriões de *Xenopus*.^{135,151} SEPT2 se mostrou localizada na base do axonema em célula de mamíferos e em embriões de *Xenopus* e sua depleção resultou em falha na ciliogênese, enquanto as células que conseguiram formar pequenos cílios apresentaram aumento na mobilidade difusional de proteínas de membranas ciliares, conforme detectado em experimentos de fotodegradação. ¹⁵¹ Tais experimentos indicaram que septinas são componentes importantes das barreiras de difusão na base dos cílios.

Diante disso nós sugerimos que a presença de septinas nas placas epiteliais de miracídios possa ser responsável por função análoga àquela já descrita em outros organismos, estando envolvida na composição de barreiras de difusão nestas estruturas.

Análises de camadas mais internas destes estágios revelaram a presença de septinas em células germinativas (Figura 54). A presença de inúmeras células germinativas é característica marcante de miracídios e esporocistos, em que ocorre o processo de reprodução assexuada. Estas células possuem núcleos grandes, (3 μm) com o nucléolo proeminente e pouca heterocromatina ¹⁴⁶ como pode ser observado na Figura 54.

Figura 54 - Imunolocalização de septinas em camada interna de miracídios e esporocistos. Septinas estão predominantemente localizadas em células germinativas de miracídios e esporocistos nas camadas interiores destes organismos. A coloração em azul se refere à coloração com DAPI, que cora os núcleos das células; em verde são representados os filamentos de actina, corados com faloidina e a coloração vermelha é referente ao sinal do anticorpo anti-*SmSEPT5*. Barra de escala, 20 μ m.

É interessante notar que as áreas fortemente marcadas com anticorpos anti-septinas nas células germinativas não apresentaram sinal detectável na marcação com faloidina, indicando que estas duas proteínas estruturais, septinas e actinas, podem não agir conjuntamente nestas estruturas. A ausência de sinal referente à actina em células germinativas também é observável em outros estudos em que miracídios e esporocistos foram marcados com faloidina.¹⁵²⁻¹⁵⁴ Entretanto, Collins et al.¹⁵² reportaram a presença de outra proteína componente do citoesqueleto em células germinativas de miracídios, β -tubulina, cuja marcação interessante mostrou um padrão semelhante ao verificado aqui para septinas, o que sugere uma possível coexpressão destas duas estruturas, já que a associação de septinas e microtúbulos tem sido extensivamente relatada.^{6,155-157}

Como o papel mais bem estabelecido de septinas é na citocinese, é sugerido que a presença destas proteínas nas células germinativas de miracídios e esporocistos possa estar relacionada à atividade mitótica destas células, já que estes estágios são caracterizados por reprodução assexuada.

O conjunto de imagens capturadas em cortes transversais ao longo do eixo Z permitiu a projeção de imagens de miracídios (Figura 55) e esporocistos (Figura 56) e a representação destes organismos em três dimensões, o que possibilitou uma visão geral dos três canais avaliados por todo o organismo.

Figura 55 - Imunolocalização de septinas em miracídeos. Série de 28 seções ópticas tiradas a cada 0,5 μm e projetadas no eixo Z com o software Zen. (A) Projeções de núcleos corados com DAPI (azul), F-actina marcada com faloidina (verde), e septinas marcadas com anti-*SmSEPT5* (vermelho); (B) Projeção individual dos núcleos; (C) Projeção das várias camadas coradas com faloidina; (D) Projeção individual da marcação de septinas com anti-*SmSEPT5*. As barras coloridas representam a profundidade, as barras brancas, o comprimento, 20 μm .

Figura 56 - Imunolocalização de septinas em esporocistos primários. Série de 28 seções ópticas tiradas a cada 0,5 μm e projetadas no eixo Z com o software Zen. (A) Projeções de núcleos corados com DAPI (azul), F-actina marcada com faloidina (verde), e septinas marcadas com anti-*SmSEPT5* (vermelho); (B) Projeção individual dos núcleos; (C) Projeção das várias camadas coradas com faloidina; (D) Projeção individual da marcação de septinas com anti-*SmSEPT5*. As barras coloridas representam a profundidade, as barras brancas, o comprimento, 20 μm .

2.3.1.2 Imunolocalização de septinas em cercárias

Os experimentos de imunolocalização com anticorpos anti-*SmSEPT5* e anti-*SmSEPT10* em cercárias resultaram também no mesmo perfil de localização, sendo apresentadas imagens obtidas com anti-*SmSEPT10*. A presença predominante de septinas nos ductos dos protonefrídios (Figura 57) foi observada, tais ductos se estendem lateralmente dos dois lados da larva e suas extremidades são conectadas às células-flama (Fig. 57 A setas), que possuem estruturas ricas em actina.¹⁵³

Figura 57 - Imagens representativas da imunolocalização de septinas em cercárias. (A-B) Seções ópticas de cercárias marcadas com faloidina (verde) e anti-*SmSEPT10* (vermelho) revela a presença de septinas em ductos conectados às células-flama, indicadas por setas no painel A. Barra de escala, 20 μ m.

Os protonefrídios são estruturas excretoras e osmorregulatórias formadas por células-flama localizadas periféricamente, por túbulos coletores, uma bexiga e nefredióporos ou poros excretores.¹⁵⁸ Septinas apresentaram-se prevalentemente localizadas nos tubos coletores deste sistema, embora a função destas proteínas nos protonefrídios de cercárias permaneça por ser elucidada.

2.3.1.3 Imunolocalização de septinas em esquistossômulos

Imagens referentes à imunolocalização de esquistossômulos cultivados por dois dias são apresentadas nas Figuras 58 e 59, enquanto imunolocalização de septinas em esquistossômulos cultivados por quatorze dias são apresentadas nas Figuras 60 e 61.

Figura 58 - Imunolocalização de septinas em esquistossômulos cultivados por dois dias: Seção superficial. Seção transversal referente a uma camada superficial de esquistossômulos cultivados por dois dias. (A) Coloração com DAPI, para visualização dos núcleos; (B) Marcação dos filamentos de actina com faloidina; (C) Marcação de septinas com anti-*SmSEPT5*; (D) Representação dos três sinais anteriores sobrepostos. Barra de escala, 20 μ m.

Figura 59 - Imunolocalização de septinas em esquistossômulos cultivados por dois dias: Seção interna. Seção transversal referente a uma camada interna de esquistossômulos cultivados por dois dias. (A) Coloração com DAPI, para visualização dos núcleos; (B) Marcação dos filamentos de actina com faloidina; (C) Marcação de septinas com anti-*SmSEPT5*; (D) Representação dos três sinais anteriores sobrepostos. Barra de escala, 20 μ m.

Figura 60 - Imunolocalização de septinas em esquistossômulos cultivados por 14 dias: Seção superficial. Seção transversal referente a uma camada superficial de esquistossômulos cultivados por 14 dias. (A) Coloração com DAPI, para visualização dos núcleos; (B) Marcação dos filamentos de actina com faloidina; (C) Marcação de septinas com anti-*SmSEPT5*; (D) Representação dos três sinais anteriores sobrepostos. Barra de escala, 20 μ m.

Figura 61 - Imunolocalização de septinas em esquistossômulos cultivados por 14 dias: Seção interna. Seção transversal referente a uma camada interna de esquistossômulos cultivados por 14 dias. (A) Coloração com DAPI, para visualização dos núcleos; (B) Marcação dos filamentos de actina com faloidina; (C) Marcação de septinas com anti-*SmSEPT5*; (D) Representação dos três sinais anteriores sobrepostos. Barra de escala, 20 μ m.

A presença de septinas em estruturas musculares de esquistossômulos (Figuras 58 e 60 C), também bastante evidente em esporocistos, (Figura 53 D) e a colocalização observada com os filamentos de actina (Figuras 58 e 60 D) sugere que estas duas proteínas estruturais estejam associadas em *S. mansoni*, como extensivamente reportado em outros organismos.
7,159,160

Filamentos de actina e septinas foram reportados como interdependentes, sendo que a ruptura de uma das estruturas afetou diretamente a outra⁷. A interação entre as duas proteínas não é direta, mas sim mediada por uma proteína adaptadora. Durante a divisão celular, anillina se mostrou intermediadora desta interação em *Xenopus laevis*, *Drosophila melanogaster* e células de mamíferos.^{7,161} Por sua localização ser principalmente restrita ao núcleo, não é predito que anillina seja mediadora desta interação em células durante a interfase, e é hipotizado que septinas sejam recrutadas por outra proteína adaptadora, até agora desconhecida, para que se associem indiretamente aos filamentos de actina.

Identificamos em *S. mansoni*, uma proteína com relativa similaridade à anilina de *Xenopus laevis*, com 43% de similaridade em uma busca utilizando o BLASTp; esta proteína, com número de acesso XP_002576415.1 possui o domínio PH (domínio homólogo à pleckstrina) que esta envolvido na ligação à lipídios e às septinas.⁷ Assim, e é sugerido que esta proteína possa desempenhar uma função análoga e atuar como intermediadora da interação entre septinas e actina durante a divisão celular em *S. mansoni*.

Em camadas mais internas de esquistossômulos, septinas se mostraram presentes em todo o organismo, em esquistossômulos cultivados por 14 dias, a localização de septinas na periferia das células se torna aparente (Figura 61 C). A projeção das várias camadas acessadas neste estágio (Figura 62) revelou a presença ubíqua de septinas (Figura 62 D) e a localização de actina predominantemente nas estruturas musculares e digestivas de esquistossômulos. A expressão ubíqua de septinas já foi relatada para algumas septinas humanas em uma diversidade de tecidos estudados, enquanto outras parecem apresentar maior nível de expressão em um tecido em particular, como no cérebro.⁵

Figura 62 - Imunolocalização de septinas em esquistossômulos de *S. mansoni* cultivados por 14 dias. Série de 40 seções ópticas tiradas a cada 0,5 μm e projetadas no eixo Z com o software Zen. (A) Projeções de núcleos corados com DAPI (azul), F-actina marcada com faloidina (verde), e septinas marcadas com anti-*SmSEPT5* (vermelho); (B) Projeção individual dos núcleos; (C) Projeção das várias camadas coradas com faloidina; (D) Projeção individual da marcação de septinas com anti-*SmSEPT5*. As barras coloridas representam a profundidade, as barras brancas, o comprimento, 20 μm .

2.3.1.4 Imunolocalização de septinas em vermes adultos

O protocolo de imunolocalização em vermes adultos se mostrou menos eficiente provavelmente devido à barreira imposta à entrada dos anticorpos pela espessa camada muscular subtegumental presente nestes organismos, o que resultou em um sinal mais baixo e poucas informações sobre a localização de septinas. Uma imagem representativa de imunolocalização em vermes adultos é apresentada na Figura 63.

Figura 63 - Imagem representativa da imunolocalização de septinas em vermes adultos. (A) Coloração dos núcleos com DAPI; (B) Coloração dos filamentos de actina com faloidina; (C) Marcação de septinas com anti-*SmSEPT5*; (D) Representação dos três sinais anteriores sobrepostos.

2.3.2 Perfil de expressão de septinas de *S. mansoni* em diferentes estágios do ciclo de vida

O perfil de expressão de cada um dos transcritos correspondentes às diferentes septinas foi realizado em diferentes estágios do ciclo de vida de *S. mansoni* utilizando-se a técnica de RT-PCR.

RNA foi isolado de cada estágio e sua integridade foi verificada utilizando-se o aparelho de eletroforese capilar Bioanalyzer. A Figura 64 A ilustra a reconstrução de um gel das amostras baseada nas leituras realizada pelo aparelho, enquanto a Figura 64 B apresenta o eletroferograma das mesmas amostras.

Figura 64 - Análise da integridade dos RNAs extraídos de diferentes estágios do ciclo vida de *S. mansoni*.

A) Simulação do gel das amostras, os números de 1 a 8 referem-se respectivamente à: ovos, miracídeos, esporocistos, cercárias, esquistossômulos cultivados por dois dias, esquistossômulos cultivados por 14 dias, vermes adultos fêmeas e machos. B) Eletroferograma das mesmas amostras.

A presença de um único pico à direita da Figura 64 B (o pico à esquerda é referente ao marcador) é indicativa de amostra de RNA íntegro, como é o caso das amostras de 2-7. Isso ocorre porque diferentemente de outros organismos, o schistosoma apresenta um *gap* na sequência do rRNA 28S, o que leva à dissociação deste RNA em dois fragmentos de mesmo tamanho em condições desnaturantes. Desta forma em condições não desnaturantes o rRNA de *S. mansoni* pode ser separado nas moléculas 28S e 18S, mas em condições desnaturantes, o rRNA 28S se divide em dois fragmentos com a massa aproximadamente igual a do rRNA 18S,¹⁶² sendo possível a detecção de um pico único nos experimentos de eletroforese

apresentados na Figura 64 B A única amostra que continha RNA degradado era a de ovos, a qual foi desconsiderada nas demais análises.

Além de assegurar a integridade das amostras, o bioanalyzer fornece uma medida confiável da concentração de RNA nas amostras. Esta medida é crítica para nossas análises visto que utilizamos RT-PCR e quantificação absoluta (por meio de curva de calibração para cada cDNA).¹⁶³ Optamos por este tipo de abordagem ao invés da utilização da quantificação relativa pois esta última requer um gene de referência, o que é dificultado em experimentos envolvendo os diferentes estágios de *S. mansoni*, já que ainda não foi reportado um gene de referência que apresentasse expressão constante em todos os estágios.^{164,165} Foram também realizadas medidas da eficiência de cada um dos quatro pares de *primers* utilizados e todos eles apresentaram eficiência de $100\% \pm 5\%$. Além disso, as curvas de fusão dos produtos de amplificação (*melting curves*) apresentaram picos únicos, indicando a presença de um único produto de amplificação em cada reação (não mostrados).

Na Figura 65 são apresentados os resultados do perfil de expressão para cada um dos genes em estudo.

Figura 65- Perfil de expressão das septinas de *S. mansoni*. Quantificação de RNAs utilizando Real-Time PCR e quantificação absoluta dos transcritos: *SmSEPT 5* (A), *SmSEPT 10* (B), *SmSEPT 7.1* (C), *SmSEPT7.2* (D) em diferentes estágios do ciclo de vida de *Schistosoma mansoni*, da esquerda para direita: Miracídios, esporocistos, cercárias, esquistossômulos cultivados por 2 dias, esquistossômulos cultivados por 14 dias, vermes adultos fêmeas e machos.

As análises de qPCR nos diferentes estágios do ciclo de vida de *S. mansoni* revelaram que estas proteínas são expressas em todos os estágios analisados (Figura 65) e que o perfil de expressão das quatro proteínas é semelhante, sugerindo que elas atuam conjuntamente. Além disso, é possível notar que os esquistossômulos cultivados por 14 dias apresentaram um aumento significativo no nível de transcritos para as quatro septinas em relação a todos os outros estágios.

Estudos sobre o cultivo de esquistossômulos *in vitro* revelaram que durante os primeiros dias em cultivo, divisão celular não foi detectada, sendo esta observada a partir do quarto dia.^{166,167} Ao avaliar a expressão de luciferase sob o controle do promotor de actina em diferentes intervalos de tempo, Correnti et al.¹⁶⁷ verificaram que a expressão deste gene era aumentada em esquistossômulos após 10 dias em cultura, quando a larva apresenta intenso crescimento.

Podemos notar que os quatro genes de septinas avaliados possuem aumento nos níveis de RNA em esquistossômulos cultivados por 14 dias, o que sugere uma correlação do aumento da expressão desta proteína com o crescimento do organismo. Uma vez que septinas possuem um papel bem estabelecido no processo de citocinese, esta correlação sugere a conservação deste papel primordial em *S. mansoni*. Além disso, como actina também apresenta altos níveis de expressão neste estágio¹⁶⁷ e foi observada a colocalização destas proteínas em *S. mansoni* (item 2.3.1) é sugerido que a expressão destas duas proteínas estruturais (septinas e actina) possam estar coordenadas, já que estas podem apresentar papéis associados no desenvolvimento de *S. mansoni*.

2.3.3 RNA de interferência

Experimentos de RNA de interferência, cujos alvos foram os transcritos de septinas em *S. mansoni*, foram realizados com o intuito de verificar eventuais mudanças fenotípicas derivadas da supressão destes transcritos. Após a eletroporação, os esquistossômulos foram acompanhados através de observação por microscopia óptica em diferentes intervalos de tempo (3, 7 e 14 dias) para a avaliação de possíveis alterações no fenótipo dos organismos. Após cada período de avaliação, uma extração de RNA era realizada para avaliar a supressão dos transcritos de interesse através de PCR em tempo real.

As Figuras 66 e 67 mostram a redução nos níveis de RNAm de septinas quando comparados aos níveis de RNAm dos controles mock (sem adição de dsRNA) e dsluc (com a adição dsRNA codificando luciferase) após 3 dias e 7 dias da adição dos dsRNAs, respectivamente. Nestes experimentos a quantificação relativa foi realizada e α -tubulina e GAPDH foram utilizados como genes de referência.

Após três dias na presença dos dsRNA, uma modesta redução nos níveis de transcritos foi percebida para os genes de interesse (Figura 66), em torno de 15-20%. Após sete dias, os níveis de supressão foram maiores, em torno de 40%, estes foram os maiores níveis de supressão obtidos (Figura 67). Duas semanas de incubação não resultaram em um aumento nos níveis de supressão dos transcritos, tais níveis se mantiveram semelhantes aos observados para uma semana (não mostrados).

Figura 66 - Análise da redução dos níveis de RNAm das septinas de *S. mansoni* após três dias da eletroporação com dsRNA. Níveis de expressão dos transcritos relativos as quatro septinas acessados por quantificação relativa utilizando α -tubulina e GAPDH como genes normalizadores. O primeiro grupo corresponde ao grupo controle *mock*, em que não foi adicionado dsRNA, ao segundo grupo foram adicionados 120 μ g de dsRNA de um gene irrelevante (*luc*), ao último grupo, 30 μ g de dsRNA para cada septina foram adicionados (um total de 120 μ g).

Figura 67 - Análise da redução dos níveis de RNAm das septinas de *S. mansoni* após sete dias da eletroporação com dsRNA. Níveis de expressão dos transcritos relativos as quatro septinas acessados por quantificação relativa utilizando α -tubulina e GAPDH como genes normalizadores. O primeiro grupo corresponde ao grupo controle *mock*, em que não foi adicionado dsRNA, ao segundo grupo foram adicionados 120 μ g de dsRNA de um gene irrelevante (*luc*), ao último grupo, 30 μ g de dsRNA para cada septina foram adicionados (um total de 120 μ g).

Nas condições avaliadas não foi possível verificar alterações fenotípicas nos esquistossômulos. A máxima redução conseguida nos níveis de RNAm foi em torno de 40%, sendo variável de acordo com o gene estudado, de 25-45%. As condições experimentais foram otimizadas de forma a tentar maximizar a supressão observada, dentre os parâmetros estudados encontram-se: a concentração de dsRNA adicionado, o número de esquistossômulos em cada grupo, o tempo de resposta e a adição de dsRNA correspondente a apenas uma septina ao invés das quatro. Entretanto, a otimização das condições não resultou em uma redução maior que 45% nos níveis de RNAm referentes às septinas.

RNAi, além de ser uma técnica que requer uma exaustiva otimização do sistema, já que contém inúmeras variáveis, mostrou também ser altamente dependente do gene estudado em *S. mansoni*.^{113,168} Enquanto alguns genes apresentaram altos níveis de supressão, em torno de 80%, outros tiveram seus níveis de transcrição inalterados com a adição de dsRNA.^{113,121,168}

Stefanic et al.¹¹³ sugeriram que a variabilidade na resposta ao RNAi é inerente, pois após minuciosa padronização das condições experimentais, resposta diferente foi observada entre os transcritos estudados. Aqueles que são expressos no sistema digestório e no

tegumento se mostraram mais suscetíveis à ação do dsRNA, provavelmente por serem regiões mais expostas. Especificamente, a maior suscetibilidade dos genes expressos no sistema digestório pode ser atribuída à ingestão do material exógeno (dsRNA) pelo parasito.¹¹³

Em nosso estudo, a exposição foi feita através de longo dsRNA (~ 600 pb), que após a clivagem pela enzima dicer, resulta em pequenos siRNA (do inglês, *short interfering RNA*)¹¹⁵ de sequências imprevisíveis. A escolha deste dsRNA teve como objetivo a obtenção de uma variedade maior de siRNA. Outra abordagem seria o emprego direto de siRNA previamente sintetizados.

2.3.4 Estudos *in vitro* e *in vivo* com forchlorfenuron, composto que afeta a dinâmica de septinas

2.3.4.1 Influência de FCF na formação de filamentos de septinas de *S. mansoni* *in vitro*

Forchlorfenuron (FCF) tem sido descrito como inibidor da dinâmica de septinas em células de mamíferos, leveduras e fungos.¹²⁶⁻¹²⁸ Este composto foi empregado no presente trabalho com o objetivo de obter informações sobre a função desta família de proteínas em *S. mansoni*, o que não foi conseguido pela técnica de RNAi.

Com o intuito de verificar se o composto apresentava efeito em septinas de *S. mansoni*, experimentos *in vitro* foram realizados utilizando o complexo de septinas de *S. mansoni* produzido (descrito no item 1.3.11).

Inicialmente, foi importante verificar se septinas de *S. mansoni* também possuíam a tendência de se polimerizar e formar filamentos *in vitro*, como reportado para septinas de outros organismos.⁵⁹ Para isso, complexos recombinantes purificados de septinas de *S. mansoni* foram dialisados contra tampão com baixa força iônica para desencadear a polimerização, que foi verificado por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Tais análises foram realizadas em colaboração com o Dr. Vitold Galkin, da Universidade de Virginia.

A Figura 68 ilustra micrografias obtidas com o complexo recombinante. A amostra apresentou um conjunto heterogêneo de estados oligoméricos, composto por monômeros, dímeros, tetrâmeros (Fig. 68 C), além de agregados proteicos (Fig. 68 B), os complexos foram polimerizados em filamentos (Fig. 68 D), que evoluíram para feixes maduros (Fig. 68 E).

Figura 68 - Septinas de *S. mansoni* se associam para formar filamentos *in vitro* A) SDS-PAGE das proteínas presentes no complexo: *SmSEPT5* (51.3 kDa), *SmSEPT10* (48.1 kDa) e *SmSEPT7.2* (59.2 kDa), a banda de maior massa presente corresponde a uma proteína copurificada com o complexo, possivelmente GroEL, indicadas por setas vermelhas em C; (B-E) Micrografias de complexos de septinas de *S. mansoni*. B) Agregados proteicos encontrados na amostra; C) Mistura de formas oligoméricas do complexo: monômeros, dímeros e tetrâmeros; D) Formação de filamentos de septinas; E) Feixe de filamentos maduro.

O complexo formado por septinas de *S. mansoni*, composto por ortólogos de membros que compõe o complexo humano mais bem caracterizado, apresentou capacidade de se polimerizar (Fig. 68 D-E), e os feixes formados se mostraram semelhantes aos observados em septinas de outros organismos,^{7,15,24} o que sugere que estas proteínas mantêm uma forma conservada de organização.

Após a verificação de que as septinas de *S. mansoni* eram capazes de formar filamentos, a influência de FCF nesta polimerização foi avaliada. Os complexos purificados foram dialisados na ausência e na presença de FCF (25 ou 75 μ M) no tampão de diálise e a polimerização foi acompanhada por microscopia eletrônica de transmissão em diferentes intervalos de tempo (Figuras 69 e 70).

As micrografias das Figuras 69 e 70 representam dois experimentos independentes utilizando 25 μ M de FCF e 75 μ M de FCF, respectivamente.

Os complexos observados no primeiro minuto de diálise (Figura 69 A e F), na presença de 25 μ M de FCF, se organizaram em filamentos, observáveis após 20 minutos de diálise. Após este período, a presença de inúmeros filamentos longos foi observada quando FCF estava presente no tampão de diálise (Figura 69 G), na ausência deste, poucos filamentos foram observados (Figura 69 B), indicando que a presença do composto acelerou a polimerização dos complexos. Após 3 h, feixes maduros foram formados, independente da presença de FCF (Fig. 69 C-E e H-I), a morfologia de tais estruturas se mostrou inalterada na presença de FCF, o que sugere que o composto estaria agindo na etapa inicial de polimerização dos complexos, mas que não alteraria a forma como estas proteínas interagem para a formação de estrutura de mais alta ordem, como anéis.

Figura 69 - Influência de FCF (25 μ M) na polimerização de septinas de *Schistosoma mansoni* *in vitro*. Micrografias de complexos de septinas de *Schistosoma mansoni* utilizando a técnica de coloração negativa. Amostras visualizadas após diálise em tampão de baixa força iônica (40 mM NaCl) com 25 μ M de FCF (F-I) ou DMSO (A-E) por: 1 min (A, F), 20 min (B, G) e 3 h (C-E, H, I). A diversidade de estruturas formadas por septinas de *S. mansoni* é evidente após 3 h de diálise. As imagens apresentam-se em dois níveis de magnificação, a barra de escala dos painéis de cima representa 100 nm, dos de baixo, 500 nm, exceto os painéis C e E, cujos painéis superiores apresentam barras de escala de 200 nm e os de baixo, 500 nm.

Resultado semelhante foi observado com maior concentração de FCF no tampão de diálise, 75 μ M (Figura 70). Após 30 minutos a maioria das septinas se encontrava na forma de oligômeros e poucos pontos de polimerização foram observados na amostra controle (Figura 70 B, setas). Na presença de FCF a polimerização foi acelerada e filamentos foram observados para o mesmo período de diálise. Após 1 h, filamentos estavam presentes também na amostra controle (com a adição de DMSO no tampão de diálise, Figura 70 D) enquanto na presença de FCF, feixes maduros foram observados (Figura 70 E). Duas horas após o início da diálise, feixes semelhantes foram encontrados nos tubos controle e com FCF, representados na Figura 70 F.

Figura 70 - Influência de FCF (75 μ M) na polimerização de septinas de *Schistosoma mansoni* *in vitro*. Micrografias de complexos de septinas de *Schistosoma mansoni* utilizando a técnica de coloração negativa. Amostras visualizadas após diálise em tampão de baixa força iônica (40 mM NaCl) com 75 μ M de FCF (C,E) ou DMSO (A, B, D, F) por: 30 min (B, C), 60 min (D, E) e 120 min (F). Algumas imagens são mostradas em dois níveis de magnificação, no painel de cima a barra de escala representa 100 nm, nos de baixo, 200 nm.

Além disso, também é notável que septinas de *S. mansoni* formam dois tipos de feixes, retos e curvos (Figura 71). Interessantemente, os filamentos de septinas conseguem trocar de uma forma à outra, no mesmo feixe. Os diferentes tipos de estrutura, embora aparentes nas Figuras 69 e 70, encontram-se destacados na Figura 71.

Figura 71 - Tipos de estruturas encontradas em filamentos de septinas de *S. mansoni*. Feixes retos são apresentados nos painéis A e C, enquanto feixes curvos são aparentes no painel B. O painel D ilustra um ponto em que um feixe reto se curva, apontado pela seta verde.

A variabilidade de estruturas de maior ordem formada por septinas já foi relatada. Kinoshita et al.⁷ ao verificar a interdependência entre filamentos de actina e septinas observaram a reorganização estrutural de septinas após o rompimento de filamentos de actina com citocalasina; as septinas organizadas em feixes lineares longos passaram a ser encontradas na forma de anéis. Tal reestruturação, segundo os autores, poderia representar uma forma de armazenamento padrão de septinas, pois as formas em anéis desapareceram e as septinas voltam a se organizar na forma de estruturas lineares após a remoção da citocalasina e reestabelecimento dos filamentos de actina. Os mesmos tipos de estruturas de septinas (em

longos filamentos e anéis) foram observados em *S. mansoni*, o que indica que estas proteínas têm uma forma conservada de organização em diferentes organismos.

Adicionalmente à microscopia eletrônica de transmissão, o espalhamento dinâmico de luz (DLS) foi utilizado para avaliar o efeito de FCF na polimerização do complexo de septinas estudado. Medidas de DLS foram realizadas para avaliar os estágios iniciais de polimerização. Distribuições dos tamanhos de partículas foram obtidas para o complexo antes da diálise e após a diálise, na presença e ausência de FCF.

Após 30 minutos de diálise, partículas maiores estavam presentes nas amostras com ou sem a adição de FCF, quando comparadas aos complexos mantidos à alta força iônica (Figura 72). As maiores partículas em solução foram encontradas quando FCF estava presente no tampão de diálise e, portanto, podemos inferir que FCF provocou um aumento na velocidade de polimerização destas proteínas.

Figura 72 - Medidas de DLS indicam que FCF aumenta a velocidade de polimerização de septinas de *S. mansoni*. Distribuição de partículas por volume de complexos de septinas mantidos em alta força iônica (vermelho) e após 30 minutos de diálise em tampão de baixa força iônica (40 mM NaCl) contendo DMSO (azul) ou 75 μ M de FCF (preto).

Portanto, os experimentos de MET e DLS indicaram que septinas de *S. mansoni* se polimerizam rapidamente quando a força iônica do meio é diminuída, e que a presença de FCF aumenta a velocidade de polimerização destas proteínas.

2.3.4.2 Avaliação do efeito de FCF em diferentes estágios do ciclo de vida de *S. mansoni*

A capacidade de FCF de alterar a polimerização de septinas em *S. mansoni* nos levou a realizar experimentos adicionais com este composto para verificar seu possível efeito fenotípico no parasito. A adição de FCF ao meio de cultura resultou em um efeito interessante em vermes adultos, cercárias e miracídios: estes se tornaram paralisados, movimento dos organismos não foi detectado por observação microscópica.

O efeito da de FCF se mostrou dose e tempo-dependente. Cercárias foram incubadas com 100 a 500 μM de FCF e o efeito se tornou aparente em concentrações maiores que 200 μM , quando avaliado por até 24 h. Nesta concentração (200 μM), a redução no movimento dos organismos, particularmente evidente pela perda de função motora da cauda, foi observada após cerca de 3 h de incubação, embora a total paralisia tenha sido observada após 24 h de incubação. Enquanto em altas concentrações (500 μM) o efeito foi acelerado, as cercárias se tornaram paralisadas em cerca de 10 min após a adição de FCF.

Vermes adultos apresentaram redução de movimento a partir de 3 h em 300 μM de FCF, e em 500 μM de FCF, a paralisia se tornou evidente em cerca de 10 minutos. Grupos controle contendo DMSO adicionado no meio de cultivo apresentaram movimentação normal, nenhum deles apresentou redução no movimento ou paralisia quando comparados com grupos sem a adição de DMSO.

Os miracídios se mostraram mais sensíveis à ação do FCF, após cerca de 30 minutos na presença de 50 μM de FCF, estes organismos, que são caracterizados por nadarem ativamente à procura do hospedeiro, reduziram consideravelmente sua velocidade. Após 30 minutos em 200 μM de FCF, os miracídios se encontravam aglomerados e pouco movimento foi detectado. Com o intuito de avaliar a viabilidade dos miracídios frente ao tratamento com FCF, coloração com iodeto de propídio (IP) e diacetato de fluoresceína (DAF) foi realizada após 1 h em contato com 200 μM de FCF. Foi possível observar que os miracídios começaram a morrer, pois muitos se apresentaram permeáveis ao corante IP (vermelho), enquanto outros ainda permaneceram vivos (verdes) (Figura 73).

Figura 73 - Viabilidade de miracídeos após 1h de exposição a 200 μ M de FCF. A) Coloração com iodeto de propídio (2,0 μ g/ml), em vermelho, cora as células mortas enquanto diacetato de fluoresceína (0,5 μ g/ml), em verde, cora as células vivas. B) Microscopia de campo claro dos mesmos miracídeos. Barra de escala, 100 μ m.

O fato mais notável é que a ação deste composto era imediatamente revertida quando os organismos eram retirados do meio de cultura contendo FCF. Esta reversibilidade imediata sugere uma ação bastante específica deste composto e não simplesmente uma ação tóxica. A reversibilidade não foi verificada apenas em miracídeos, já que este estágio se mostrou bastante sensível à ação de FCF. Além disso, os miracídeos constituem um estágio de difícil manipulação pela extrema sensibilidade apresentada por estes organismos, que possuem vida breve *in vitro* a não ser que sua transformação em esporocistos seja induzida.

Cercárias e vermes adultos apresentaram a recuperação do movimento com a remoção de FCF após até 24 h de exposição ao composto (a 200 e 300 μ M, respectivamente). Quando expostos a concentrações mais altas de FCF, 500 μ M, o movimento só era recuperado se o mesmo fosse incubado por apenas algumas horas (2-3 h) com o composto. Em concentrações mais baixas de FCF (50-100 μ M) não foram observados efeitos visíveis em vermes adultos e em cercárias quando avaliados em até 24 h. Por outro lado, 1 mM de FCF apresentou efeito letal em cercárias após cerca de 10 minutos de exposição.

A Tabela 6 apresenta um resumo dos fenótipos observados com o tratamento dos organismos com FCF em diferentes concentrações e intervalos de tempo.

Tabela 6 - Efeitos do tratamento com FCF em diferentes estágios do ciclo de vida de *Schistosoma mansoni*

	FCF	10 min	30 min	1 h	3 h	24 h	2-3h removido*	24h removido*
Vermes adultos	<100 µM	No	No	No	No	No		
	300 µM	No	No	No	P	P	Rec.	Rec.
	500 µM	P	P	P	P	Morte	Rec.	
Cercárias	<100 µM	No	No	No	No	No		
	200 µM	No	No	L	P	P	Rec.	Rec.
	500 µM	P	P	P	P	Morte	Rec.	
Miracídeos	50 µM	L	L					
	200 µM	L	P	Morte				

No: organismos com movimentação normal; P: Paralisia; Rec: Recuperação dos movimentos; L: Movimentação anormal, os organismos se apresentaram mais lentos.

*Fenótipo observado após incubação com FCF pelo período indicado, seguido pela substituição por meio de cultura sem a presença do composto.

A reversibilidade do efeito de FCF em septinas de células de mamíferos, leveduras e fungos também foi verificada.¹²⁶⁻¹²⁸ Hu et al¹²⁶ relataram a mudança na organização de SEPT2 em células HeLa, de fibras curtas e finas para fibras longas e de maior espessura na presença de FCF, tais efeitos também se mostraram dose-dependentes e reversíveis.

Em *S. cerevisiae*, FCF induziu o aparecimento de filamentos de septinas fora do sulco de divisão, que desapareceram após a remoção do composto.¹²⁷ No fungo filamentoso *Ashbya gossypii*, estruturas ectópicas (fora da localização normal) foram também encontradas.¹²⁸ Estas estruturas induzidas por FCF se mostraram estáveis e ao contrário de filamentos de septinas não induzidos por FCF, os novos filamentos formados não se recuperaram da fotodegradação, indicando que tais filamentos não apresentavam a dinâmica inerente aos filamentos de septinas.¹²⁸ Portanto, FCF foi considerado um composto estabilizador de septinas, impedindo a dinâmica das mesmas. Apesar de estáveis, as fibras induzidas por FCF foram dissolvidas prontamente após a remoção do composto, indicando que FCF é necessário para a indução e manutenção das novas fibras de septinas formadas.¹²⁸

Tais estudos verificaram também a especificidade de FCF, ao verificar que outras estruturas do citoesqueleto, como actina e tubulina, permaneciam inalteradas com a adição de FCF.¹²⁶⁻¹²⁸

No presente trabalho, o impacto de FCF em filamentos de actina foi também verificado. Após 3 h em contato com 500 µM, cercárias foram marcadas com faloidina e a estrutura dos filamentos de actina não foi visivelmente afetada (Figura 74).

Figura 74 – Cercária marcada com faloidina após tratamento com FCF. Seção transversal obtida por microscopia confocal de cercária corada com faloidina após 3 h em contato com 500 μ M de FCF ilustra os filamentos de actina. Barra de escala, 20 μ m.

O efeito drástico de redução da atividade motora de *S. mansoni* e a total reversibilidade deste efeito foram considerados intrigantes. Hu et al ¹²⁶ reportaram a diminuição da migração celular após tratamento com FCF, mesmo efeito obtido após depleção de SEPT2 nas mesmas células. A motilidade de linfócitos T também se mostrou seriamente afetada pela depleção de septinas e foi sugerido que os filamentos de septinas poderiam funcionar como um *corset* molecular, provendo rigidez ao cortex celular para suportar a eficiente locomoção destas células. Foi também sugerido que septinas atuassem em conjunto com actina e miosina durante a motilidade destas células. ¹⁶⁹

Devido ao fato de septinas e actina se colocalizarem em estruturas musculares de vários estágios do ciclo de vida de *S. mansoni* (Fig. 53, 58 e 60), é possível especular que o fenótipo de paralisia observado possa ser resultado da interferência de FCF na dinâmica de septinas contidas na estrutura muscular do parasito. Entretanto, o recente trabalho de Sharma et al ¹³⁶, relacionando septinas à entrada de Ca^{2+} nas células pela via SOCE (*Store-operated calcium entry*) nos levou a propor uma nova hipótese para explicar a paralisia observada em *S. mansoni* mediante tratamento com FCF. O fenômeno observado pode estar relacionado à limitação da entrada de Ca^{2+} nas células de *S. mansoni*, o que poderia comprometer sua contração muscular.

SOCE é uma via de entrada de cálcio regulada por receptor que é ativada em resposta à depleção de cálcio do retículo endoplasmático (RE) (o depósito de cálcio de células não excitáveis), o que desencadeia uma série de eventos que causam a formação transiente e ativação destes canais de cálcio. ¹⁷⁰ A depleção de Ca^{2+} é “percebida” pela molécula de interação estromal-1 (STIM-1 *Stromal Interaction Molecule 1*), que se oligomeriza e se

transloca às junções adjacentes à membrana plasmática (MP) para interagir com canais de ORAI1 (unidades formadoras dos poros na MP nesta via) e abrir estes canais permitindo a entrada de cálcio via SOCE. A entrada de cálcio por esta via está envolvida em processos de sinalização que controlam várias funções celulares como proliferação, crescimento e migração.^{171,172}

Sharma et al. demonstraram que o tratamento de células HeLa com siSEPT (*small interfering RNA* para SEPT4) resultou em uma redução seletiva de SOCE, indicando que septinas são reguladores essenciais para esta via de entrada de cálcio nas células. Propuseram que tais efeitos pudessem ser mediados pela ligação de septinas ao fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) na membrana plasmática, já que os filamentos de septinas e PIP₂ se rearranjaram localmente na junção do RE com a MP antes e durante a formação do complexo STIM1-ORAI1. Septinas se mostraram necessárias para a organização adequada de ORAI1 na membrana plasmática e na aproximação de STIM1 às junções do retículo endoplasmático com a membrana plasmática.¹³⁶

Ainda no trabalho de Sharma et al, a incubação de células HeLa com 100-200 µM de FCF reduziu consideravelmente o influxo de Ca²⁺ via SOCE, a imobilização dos filamentos de septinas com FCF inibiu a formação de clusters de ORAI1, a colocalização de STIM1 e ORAI1 e conseqüentemente, o influxo de Ca²⁺ por esta via. A combinação de FCF e RNAi mostrou um efeito maior na redução do influxo de Ca²⁺ pelos mesmos canais.¹³⁶

No presente trabalho, de modo a explicar o efeito de FCF em *Schistosoma mansoni*, o interesse nestes canais de cálcio é voltado para as fibras musculares esqueléticas. SOCE é mais bem descrito em células não excitáveis (que não requerem uma liberação rápida de cálcio), enquanto seu papel em células excitáveis é menos claro.¹⁷³

Grandes flutuações nos níveis de cálcio são necessárias para a contração muscular, o que requer o acoplamento excitação-contração (EC), um processo pelo qual mudanças no potencial de membrana provocam a liberação de Ca²⁺ do retículo sarcoplasmático (RS) em resposta à estimulação dos receptores de rianodina.¹⁷⁴ Assim acreditava-se que o cálcio intracelular (contido no RS) era o único responsável pelo processo de contração muscular, entretanto SOCE foi identificado em músculo esquelético^{175,176}, e as proteínas que fazem parte desta via (STIM1 e ORAI1) expressas em altos níveis^{177,178} nestes tecidos. Camundongos apresentando depleção de STIM1 ou ORAI1 apresentaram miopatias¹⁷⁸ e pacientes com mutações em STIM1 apresentaram hipotonia muscular e miopatia.^{179,180}

Foi sugerida a contribuição desta via no reabastecimento dos depósitos intracelulares de cálcio em músculo submetido à estimulação repetida¹⁷⁸, já que a depleção de Ca²⁺ do RS

necessária para ativar a via SOCE é atingida apenas após longos períodos de acoplamento EC em uma fibra muscular esquelética saudável.¹⁷³ Além disso, foi também proposto um papel regulatório para a entrada de cálcio via SOCE no acoplamento EC¹⁷³, já que em outras células a entrada de cálcio por esta via é atribuída exclusivamente à ativação de certos processos celulares.¹⁸¹

No músculo esquelético, SOCE tem propriedades diferentes das observadas em células não excitáveis. A ativação de SOCE em células musculares é mais rápida que em células não excitáveis. A oligomerização de STIM1 e redistribuição nas junções do RE com a MP em linfócitos T resultam em um tempo de cerca de 1 min entre a depleção de Ca^{2+} e a ativação do canal. Entretanto, em células do músculo esquelético, a presença extensiva de contatos pré-formados do SR com o sistema de tubulos-t contendo STIM1 e ORAI1 pré-localizadas faz com que a ativação de SOCE em músculos esqueléticos seja rápida, sendo ativado em menos de 1 segundo após a depleção de Ca^{2+} .¹⁸²

A cinética mais rápida de SOCE no músculo esquelético é atribuída a fatores como a pré-agregação das proteínas STIM1, que se encontram pré-acopladas aos canais ORAI1 mesmo na ausência de depleção de Ca^{2+} .¹⁸² e a uma isoforma de splicing mais longa de STIM1 encontrada predominantemente no músculo esquelético, STIM1L, que mostrou se associar com actina.¹⁸³ Neste mesmo trabalho, Darbellay et al mostram que a despolimerização de actina desfaz o complexo STIM1L-ORAI1 e retarda a ativação de SOCE, sendo concluído que a interação STIM1L-actina estabiliza os complexos pré-formados que permitem a rápida ativação de SOCE em células musculares esqueléticas.¹⁸³

SOCE é uma via evolutivamente conservada. Em *Schistosoma mansoni* existem ortólogos para as proteínas STIM1 e ORAI1.¹⁸⁴ O ortólogo de ORAI1 (número de acesso XP_002578838) apresentou 52% de identidade com ORAI1 humana (número de acesso AAH13386.1). Enquanto o ortólogo de STIM1 em *Schistosoma mansoni* (número de acesso XP_002580464) possui 41% de identidade com STIM1 humana (isoforma 2 número de acesso NP_003147.2).

Os canais de influxo de Ca^{2+} são importantes para a contração muscular e para a viabilidade de *S. mansoni*.¹⁸⁵ O principal medicamento contra esquistossomose, o praziquantel, afeta a homeostase de Ca^{2+} em vermes adultos, embora o alvo molecular desta droga ainda não seja conhecido e pouco se sabe sobre estes canais de influxo de Ca^{2+} na membrana plasmática do parasito.¹⁸⁴⁻¹⁸⁶

Blair et al¹⁸⁷ reportaram os efeitos de Mg^{2+} no meio de cultura em *S. mansoni* cuja contração muscular foi induzida com praziquantel. Em meio contendo alta taxa $\text{Mg}^{2+}:\text{Ca}^{2+}$

(75:1), vermes adultos de *S. mansoni* se contraíram por indução com praziquantel e em seguida entraram em um estado de paralisia flácida, na qual não responderam a estímulos. A paralisia flácida observada se mostrou dependente da taxa $Mg^{2+}:Ca^{2+}$ no meio e não da concentração absoluta de Mg^{2+} , pois em razões menores que 7,5:1 tal efeito não foi observado, o que segundo os autores indica uma interação competitiva entre Mg^{2+} e Ca^{2+} extracelulares.

No mesmo trabalho, a exposição dos parasitos a alta taxa $Mg^{2+}:Ca^{2+}$ diminuiu significativamente o tônus muscular, enquanto a remoção do excesso de Mg^{2+} resultou em uma rápida recuperação do tônus muscular, portanto o efeito do excesso de Mg^{2+} se mostrou rapidamente reversível. Este experimento ilustra a sensibilidade dos parasitos ao serem retornados para um meio com uma taxa equivalente $Mg^{2+}:Ca^{2+}$ quando não estão no estado de paralisia flácida. Ao atingirem tal estado esta sensibilidade foi perdida, sendo recuperada pela elevação da concentração de Ca^{2+} no meio ou pela inclusão de cálcio ionóforo, tratamentos que causam o aumento no influxo de Ca^{2+} no parasito.¹⁸⁷

Portanto, a redução na permeabilidade ao Ca^{2+} pela membrana plasmática do parasito parece ser a base para a paralisia flácida. Além disso, foi também observado que os parasitos que estavam no estado de paralisia flácida captaram menos Ca^{2+} extracelular quando retornados a um meio com taxas normais $Mg^{2+}:Ca^{2+}$ quando comparados aos parasitos que não entraram no estado de paralisia flácida, suportando a hipótese de redução na permeabilidade ao Ca^{2+} extracelular.

Desta forma, a contração muscular de *S. mansoni* parece não depender inteiramente de depósitos de cálcio intracelulares. Foi reportado ainda que parasitos intactos não conseguem manter o tônus muscular em um meio com ausência de Ca^{2+} e, da mesma forma, que fibras musculares isoladas de *S. mansoni* não se contraem na ausência de Ca^{2+} .¹⁸⁷

A contração muscular estimulada pela família de neuropeptídios FLPs se mostrou dependente da captação de Ca^{2+} extracelulares, apesar de haver estoques de Ca^{2+} intracelulares suficientes para suportar a contração.¹⁸⁸

Estudos envolvendo os canais de Ca^{2+} operados por voltagem em *S. mansoni* demonstraram que estes mediam o influxo de Ca^{2+} extracelular para as fibras musculares do parasito, que juntamente com a mobilização de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático contribuem para a contração muscular.¹⁸⁹ Embora *S. mansoni* apresente proteínas ortólogas a STIM1 e ORAI1, o papel de SOCE na contração muscular ainda não foi explorado, mas diante da dependência de Ca^{2+} extracelular para a contração muscular deste organismo, é possível que

esta via seja importante para este processo e que a imobilização dos filamentos de septinas por FCF afete a entrada de Ca^{2+} nas células, comprometendo a contração muscular.

Outra evidência do possível comprometimento da entrada de Ca^{2+} extracelular é a rápida reversibilidade observada com a remoção de FCF, semelhante àquela reportada por Blair et al.¹⁸⁷ quando *S. mansoni* era transferido de um meio com alta concentração de Mg^{2+} para meio com concentrações equivalentes de Mg^{2+} e Ca^{2+} .

2.4 CONCLUSÕES DO CAPÍTULO 2

Os estudos funcionais iniciais de septinas de *Schistosoma mansoni* apresentados neste capítulo consistiram na primeira etapa em direção à elucidação da função de septinas em platelmintos e revelaram uma série de resultados interessantes.

A presença de septinas em todos os estágios do ciclo de vida do parasito e a semelhança no perfil de expressão das quatro proteínas nos diferentes estágios são indícios da ação conjunta destas proteínas. Além disso, estudos *in vitro* com o complexo recombinante de septinas demonstraram a capacidade de formação de filamentos pelas proteínas produzidas, o que suporta a hipótese de ação conjunta destas proteínas. A forma de organização de septinas em complexos, que se unem para formar filamentos é condizente com a estruturação de septinas em outros organismos e pode fazer de *S. mansoni* um modelo de complexo de septinas ancestral.

Os experimentos de imunolocalização em diferentes estágios do ciclo de vida de *S. mansoni* refletiram a variedade de processos celulares em que estas proteínas podem estar envolvidas, como na citocinese, ciliogênese e na composição de fibras musculares. Tais experimentos indicaram que apesar de possuir um número menor de membros, a família de septinas de *S. mansoni* também pode estar relacionada a inúmeras funções, como observado em outros organismos.

Os estudos *in vitro* com o complexo recombinante de septinas de *S. mansoni*, além de demonstrarem a capacidade de formação de filamentos pelas proteínas produzidas, indicaram que FCF aumenta a velocidade de polimerização dos complexos, contribuindo na elucidação do mecanismo de ação de FCF em septinas, ainda pouco conhecido.

O fenótipo impressionante de paralisia observado após o tratamento de vermes adultos, cercárias e miracídios com FCF indica que septinas são importantes para o processo

de contração muscular do parasito, possivelmente pela diminuição da entrada de Ca^{2+} nas células via SOCE, hipótese esta que instiga futuros trabalhos na área. Além do efeito de FCF na viabilidade do parasito, que torna possível o estudo deste composto e de seus derivados como potenciais drogas para o tratamento da esquistossomose.

3 CONCLUSÕES GERAIS

Nesta tese são apresentados os primeiros estudos de septinas em um organismo do filo dos platelmintos. Os presentes resultados contribuem para a elucidação estrutural e funcional de septinas não apenas em *S. mansoni*, pois a conservação destas proteínas pode levar a papéis análogos em diferentes organismos, como já observado para septinas.

Dentre as conclusões do primeiro capítulo, sugerimos que o deslocamento da fita $\beta 3$ possa estar envolvido na associação destas proteínas a membranas, tal hipótese pode ser associada à hipótese do segundo capítulo, de que estas proteínas possam estar envolvidas no remodelamento da membrana plasmática e, conseqüentemente, atuando localmente no recrutamento de proteínas específicas para a formação de um canal de Ca^{2+} (SOCE).

Desta forma é importante destacar a importância do andamento conjunto de estudos estruturais e funcionais de proteínas para a elucidação de sua função, sendo considerada bastante significativa a contribuição dada por este trabalho à área das septinas e à área de *Schistosoma mansoni*.

REFERÊNCIAS

- 1 HARTWELL, L. Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. **Experimental Cell Research**, v. 69, n. 2, p. 265-276, 1971.
- 2 HALL, P. A.; RUSSEL, S. E. H.; PRINGLE, J. R. (Ed). **The Septins**. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd., 2008.
- 3 NISHIHAMA, R.; ONISHI, M.; PRINGLE, J. R. New insights into the phylogenetic distribution and evolutionary origins of the septins. **Biological Chemistry**, v. 392, n. 8-9, p. 681-687, 2011.
- 4 ESTEY, M. P.; KIM, M. S.; TRIMBLE, W. S. Septins. **Current Biology**, v. 21, n. 10, p. R384-R387, 2011.
- 5 HALL, P. A.; JUNG, K.; HILLAN, K. J. et al. Expression profiling the human septin gene family. **Journal of Pathology**, v. 206, n. 3, p. 269–278, 2005.
- 6 SPILIOTIS, E. T. Regulation of microtubule organization and functions by septin GTPases. **Cytoskeleton**, v. 67, n. 6, p. 339–345, 2010.
- 7 KINOSHITA, M.; FIELD, C. M.; COUGHLIN, M. L. et al. Self and actin template assembly of mammalian septins. **Developmental Cell**, v. 3, n. 6, p. 791-802, 2002.
- 8 CID, V. J. JIMÉNEZ, J. MOLINA, M. et al. Orchestrating the cell cycle in yeast: sequential localization of key mitotic regulators at the spindle pole and the bud neck. **Microbiology**, v. 148, n. 9, p. 2647-2659, 2002.
- 9 BARRAL, Y.; PARRA, M.; BIDLINGMAIER, S. et al. Nim1-related kinases coordinate cell cycle progression with the organization of the peripheral cytoskeleton in yeast. **Genes & Development**, v. 13, n. 2, p. 176-187, 1999.
- 10 KARTMANN, B.; ROTH, D. Novel roles for mammalian septins: from vesicle trafficking to oncogenesis. **Journal of Cell Science**, v. 114, n. 5, p. 839-844, 2001.
- 11 KINOSHITA, M. Diversity of septin scaffolds. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 18, n. 1, p. 54-60, 2006.

- 12 BARRAL, Y.; KINOSHITA, M. Structural insights shed light onto septin assemblies and function. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 20, n. 1, p. 12-18, 2008.
- 13 PETERSON, E. A.; PETTY, E. M. Conquering the complex world of human septins: implications for health and disease. **Clinical Genetics**, v. 77, n. 6, p. 511-524, 2010.
- 14 WEIRICH, C. S.; ERZBERGER, J. P.; BARRAL, Y. The septin family of GTPases: architecture and dynamics. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 6, p. 478-489, 2008.
- 15 VERSELE, M.; THORNER, J. Some assembly required: yeast septins provide the instruction manual. **Trends in Cell Biology**, v. 15, n. 8, p. 414-424, 2005.
- 16 FARES, H.; GOETSCH, L.; PRINGLE, J. R. Identification of a developmentally regulated septin and involvement of the septins in spore formation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Cell Biology**, v. 132, n. 3, p. 399-411, 1996.
- 17 DE VIRGILIO, C.; DEMARINI, D. J.; PRINGLE, J. R. SPR28, a sixth member of the septin gene family in *Saccharomyces cerevisiae* that is expressed specifically in sporulating cells. **Microbiology**, v. 142, n. 10, p. 2897-2905, 1996.
- 18 BERTIN, A.; MCMURRAY, M. A.; GROB, P. et al. *Saccharomyces cerevisiae* septins: supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 24, p. 8274-8279, 2008.
- 19 OH, Y.; BI, E. Septin structure and function in yeast and beyond. **Trends in Cell Biology**, v. 21, n. 3, p. 141-148, 2011.
- 20 SULSTON, J. E.; ROBERT HORVITZ, H. Abnormal cell lineages in mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Developmental Biology**, v. 82, n. 1, p. 41-55, 1981.
- 21 WHITE, J. G.; HORVITZ, H. R.; SULSTON, J. E. Neurone differentiation in cell lineage mutants of *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 297, p. 584-587, 1982. doi:10.1038/297584a0
- 22 MADDOX, A. S.; LEWELLYN, L.; DESAI, A. et al. Anillin and the septins promote asymmetric ingression of the cytokinetic furrow. **Developmental Cell**, v. 12, n. 5, p. 827-835, 2007.

- 23 FINGER, F. P.; KOPISEH, K. R.; WHITE, J. G. A role for septins in cellular and axonal migration in *C. elegans*. **Developmental Biology**, v. 261, n. 1, p. 220-234, 2003.
- 24 JOHN, C. M.; HITE, R. K.; WEIRICH, C. S. et al. The *Caenorhabditis elegans* septin complex is nonpolar. **EMBO Journal**, v. 26, n. 14, p. 3296-3307, 2007.
- 25 NGUYEN, T. Q.; SAWA, H.; OKANO, H. et al. The *C. elegans* septin genes, *unc-59* and *unc-61*, are required for normal postembryonic cytokinesis and morphogenesis but have no essential function in embryogenesis. **Journal of Cell Science**, v. 113, n. 21, p. 3825-3837, 2000.
- 26 NEUFELD, T.; RUBIN, G. The *Drosophila peanut* gene is required for cytokinesis and encodes a protein similar to yeast putative bud neck filament proteins. **Cell**, v. 77, n. 3, p. 371-379, 1994.
- 27 FIELD, C. M.; AL-AWAR, O.; ROSENBLATT, J. et al. A purified *Drosophila* septin complex forms filaments and exhibits GTPase activity. **Journal of Cell Biology**, v. 133, n. 3, p. 605-616, 1996.
- 28 KINOSHITA, M. Assembly of mammalian septins. **Journal of Biochemistry**, v. 134, n. 4, p. 491-496, 2003.
- 29 SELLIN, M. E.; SANDBLAD, L.; STENMARK, S. et al. Deciphering the rules governing assembly order of mammalian septin complexes. **Molecular Biology of the Cell**, v. 22, n. 17, p. 3152-3164, 2011.
- 30 CAO, L.; DING, X.; YU, W. et al. Phylogenetic and evolutionary analysis of the septin protein family in metazoan. **FEBS Letters**, v. 581, n. 28, p. 5526-5532, 2007.
- 31 SIRAJUDDIN, M.; FARKASOVSKY, M.; HAUER, F. et al. Structural insight into filament formation by mammalian septins. **Nature**, v. 449, n. 7160, p. 311-315, 2007.
- 32 SPILOTIS, E. T. A mitotic septin scaffold required for mammalian chromosome congression and segregation. **Science**, v. 307, n. 5716, p. 1781-1785, 2005.
- 33 LARISCH, S.; YI, Y.; LOTAN, R. et al. A novel mitochondrial septin-like protein, ARTS, mediates apoptosis dependent on its P-loop motif. **Nature Cell Biology**, v. 2, n. 12, p. 15-21, 2000.

- 34 MOSTOWY, S.; COSSART, P. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, p. 183-194, 2012. doi:10.1038/nrm3284
- 35 CERVEIRA, N.; BIZARRO, S.; TEIXEIRA, M. R. MLL-SEPTIN gene fusions in hematological malignancies. **Biological Chemistry**, v. 392, n. 8-9, p. 713-724, 2011.
- 36 CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. (Ed). **Parasitologia humana**. 2.ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2002. p.212-221.
- 37 NEVES, D. P. (Ed). **Parasitologia humana**. 11ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. p.193-212.
- 38 NAHUM, L. A.; MOURÃO, M. M.; OLIVEIRA, G. New frontiers in *Schistosoma* genomics and transcriptomics. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, p. 1-11, 2012. doi.org/10.1155/2012/849132.
- 39 KING, C. H.; DICKMAN, K.; TISCH, D. J. Reassessment of the cost of chronic helminthic infection: a meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis. **Lancet**, v. 365, n. 9470, p. 1561–1569, 2005.
- 40 DOENHOFF, M. J.; KUSEL, J. R.; COLES, G. C. et al. Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 5, p. 465-469, 2002.
- 41 GRYSEELS, B.; POLMAN, K.; CLERINX, J. et al. Human schistosomiasis. **Lancet**, v. 368, n. 9541, p. 1106-1118, 2006.
- 42 BASCH, P. F.; DICONZA, J. J. The miracidium-sporocyst transition in *Schistosoma mansoni*: surface changes in vitro with ultrastructural correlation. **Journal of Parasitology**, v. 60, n. 6, p. 935-941, 1974.
- 43 SALTER, J. P. Cercarial elastase is encoded by a functionally conserved gene family across multiple species of schistosomes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 27, p. 24618-24624, 2002.
- 44 MANN, V. H.; MORALES, M. E.; RINALDI, G. et al. Culture for genetic manipulation of developmental stages of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, v. 137, n. 03, p. 451-62, 2009.

- 45 BERRIMAN, M.; HAAS, B. J.; LOVERDE, P. T. et al. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. **Nature**, v. 460, n. 7253, p. 352-358, 2009.
- 46 SAMBROOK, J.; FRITISH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3. ed. New York: CSHS Press, 2001.
- 47 SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5473-5467, 1977.
- 48 GASTEIGER E.; HOOGLAND C.; GATTIKER A. et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In. WALKER, J. M. **The proteomics protocols handbook**. New York: Humana Press, 2005. p.571-607.
- 49 SECKLER, R.; WUG, G.-M.; TIMASHEFF, S. N. Interactions of tubulin with guanylyl-(P-y-Methylene)diphosphonate: formation and assembly of a stoichiometric complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 13, n. 5, p. 7655-7661, 1990.
- 50 KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics**, v. 1751, n. 2, p. 119-139, 2005.
- 51 FERRAO-GONZALES, A. D.; SOUTO, S. O.; SILVA, J. L. et al. The preaggregated state of an amyloidogenic protein: Hydrostatic pressure converts native transthyretin into the amyloidogenic state. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 12, p. 6445– 6450, 2000.
- 52 PROTOCOLS: In-Gel Digestion. UWO Biological Mass Spectrometry Laboratory, 2008. Disponível em: <http://www.biochem.uwo.ca/wits/bmsl/in-gel_digestion.html>. Acesso em: fev.2011.
- 53 LUPAS, A.; VAN DYKE, M.; STOCK, J. Predicting coiled coils from protein sequences. **Science**, v. 252, n. 5009, p. 1162-1164, 1991.
- 54 LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, 2007.
- 55 RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 12, p. 1572-1574, 2003.

- 56 PAGE, R. D. Visualizing phylogenetic trees using treeview. In: BAXEVANIS, A. et al. (Ed.) **Current protocols in bioinformatics**. New York: John Wiley and Sons, 2002. p. 6.2.1–6.2.15. doi: 10.1002/0471250953.bi0602s01.
- 57 DEHAL, P.; SATOU, Y.; CAMPBELL, R. K. et al. The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins. **Science**, v. 298, n. 5601, p. 2157–2167, 2002.
- 58 SODERGREN, E.; WEINSTOCK, G. M.; DAVIDSON, E. H. et al. The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. **Science**, v. 314, n. 5801, p. 941–952, 2006.
- 59 CAO, L.; YU, W.; WU, Y. et al. The evolution, complex structures and function of septin proteins. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 66, n. 20, p. 3309–3323, 2009.
- 60 FARKASOVSKY, M.; HERTER, P.; VOSS, B. et al. Nucleotide binding and filament assembly of recombinant yeast septin complexes. **Biological Chemistry**, v. 386, n. 7, p. 643–656, 2005.
- 61 JOBERTY, G.; PERLUNGHER, R. R. SHEFFIELD, P. J. et al. Borg proteins control septin organization and are negatively regulated by Cdc42. **Nature Cell Biology**, v. 3, n. 10, p. 861–866, 2001.
- 62 RANJBAR, B.; GILL, P. Circular dichroism techniques: biomolecular and nanostructural analyses- a review. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 74, n. 2, p. 101–120, 2009.
- 63 WALLACE, B. A.; JANES, R. W. (Ed) **Modern techniques for circular dichroism and synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy**. Amsterdam: IOS Press BV, 2009. v.1.
- 64 VIVIAN, J. T.; CALLIS, P. R. Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. **Biophysical Journal**, v. 80, n. 5, p. 2093–2109, 2001.
- 65 MÄDLER, S.; BICH, C.; TOUBOUL, D. et al. Chemical cross-linking with NHS esters: a systematic study on amino acid reactivities. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 44, n. 5, p. 694–706, 2009.
- 66 VERSELE, M. Septin collar formation in budding yeast requires GTP binding and direct phosphorylation by the PAK, Cla4. **Journal of Cell Biology**, v. 164, n. 5, p. 701–715, 2004.

67 SIRAJUDDIN, M.; FARKASOVSKY, M.; ZENT, E. et al. GTP-induced conformational changes in septins and implications for function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 39, p. 16592-16597, 2009.

68 EFTINK, M. R.; IONESCU, R. Thermodynamics of protein unfolding: questions pertinent to testing the validity of the two-state model. **Biophysical Chemistry**, v. 64, n.1-3, p. 175-197, 1997.

69 KHAN, F.; AHMAD, A.; KHAN, M. I. Chemical, thermal and pH-induced equilibrium unfolding studies of fusarium solani lectin. **IUBMB Life**, v. 59, n.1, p. 34-43, 2007.

70 FINK, A. L.; CALCIANO, L. J.; GOTO, Y. et al. Classification of acid denaturation of proteins: intermediates and unfolded states. **Biochemistry**, v. 33, n. 41, p. 12504-12511, 1994.

71 GROENNING, M. Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils-current status. **Journal of Chemical Biology**, v. 3, n. 1, p. 1-18, 2010.

72 BIANCALANA, M.; KOIDE, S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics**, v. 1804, n. 7, p. 1405-1412, 2010.

73 TELLINGHUISEN, J. Isothermal titration calorimetry at very low c. **Analytical Biochemistry**, v. 373, n. 2, p. 395-397, 2008.

74 TELLINGHUISEN, J. Optimizing experimental parameters in isothermal titration calorimetry: variable volume procedures. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 11531-11537, 2007.

75 HUANG, Y.W.; SURKA, M. C.; REYNAUD, D. et al. GTP binding and hydrolysis kinetics of human septin 2. **FEBS Journal**, v. 273, n. 14, p. 3248-3260, 2006.

76 ZHANG, B. The role of Mg^{2+} cofactor in the guanine nucleotide exchange and GTP hydrolysis reactions of Rho family GTP-binding proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 33, p. 25299-25307, 2000.

77 GARCIA, W.; RODRIGUES, N. C.; DE OLIVEIRA NETO, M. et al. The stability and aggregation properties of the GTPase domain from human SEPT4. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1784, n. 11, p. 1720-1727, 2008.

- 78 ZENT, E.; VETTER, I.; WITTINGHOFER, A. Structural and biochemical properties of Sept7, a unique septin required for filament formation. **Biological Chemistry**, v. 392, n. 8-9, p. 791-797, 2011.
- 79 SERRÃO, V. H. B.; ALESSANDRO, F.; CALDAS, V. E. A. et al. Promiscuous interactions of human septins: the GTP binding domain of SEPT7 forms filaments within the crystal. **FEBS Letters**, v. 585, n. 24, p. 3868-3873, 2011.
- 80 MACEDO, J.N.A.; VALADARES, N.F.; MARQUES, I.A. et al. The structure and properties of septin 3: a possible missing link in septin filament formation. **Biochemical Journal**, v. 450, n. 1, p. 95-105, 2013.
- 81 WALKER, J. E.; SARASTE, M.; RUNSWICK, M. J. et al. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. **EMBO Journal**, v. 1, n. 8, p. 945-951, 1982.
- 82 VETTER, I. R.; WITTINGHOFER, A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. **Science**, v. 294, n. 5545, p. 1299-1304, 2001.
- 83 EIGENBROT, C.; KIRCHHOFER, D.; DENNIS, M. S. et al. The factor VII zymogen structure reveals reregistration of β -Strands during activation. **Structure**, v. 9, n. 7, p. 627-636, 2001.
- 84 VAN BOXEL, G. I.; HOLMES, S.; FUGGER, L. et al. An alternative conformation of the t-cell receptor α constant region. **Journal of Molecular Biology**, v. 400, n. 4, p. 828-837, 2010.
- 85 ENEQVIST, T.; ANDERSSON, K.; OLOFSSON, A. et al. The β -Slip: a novel concept in transthyretin amyloidosis. **Molecular Cell**, v. 6, n. 5, p. 1207-1218, 2000.
- 86 PETKOVA, A. T.; BUNTKOWSKY, G.; DYDA, F. et al. Solid state NMR reveals a pH-dependent antiparallel β -Sheet registry in fibrils formed by a β -amyloid peptide. **Journal of Molecular Biology**, v. 335, n. 1, p. 247-260, 2004.
- 87 D'SOUZA-SCHOREY, C.; CHAVRIER, P. ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 5, p. 347-358, 2006.

- 88 GILLINGHAM, A. K.; MUNRO, S. The small G proteins of the Arf family and their regulators. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 23, n. 1, p. 579-611, 2007.
- 89 AMOR, J. C.; HARRISON, D. H.; KAHN, R. A. et al. Structure of the human ADP-ribosylation factor 1 complexed with GDP. **Nature**, v. 372, p. 704-708, 1994. doi:10.1038/372704a0.
- 90 GREASLEY, S. E.; JHOTI, H.; TEAHAN, C. et al. The structure of rat ADP-ribosylation factor-1 (ARF-1) complexed to GDP determined from two different crystal forms. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 2, n. 9, p. 797-806, 1995.
- 91 GOLDBERG, J. Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching. **Cell**, v. 95, n. 2, p. 237-248, 1998.
- 92 PASQUALATO, S.; RENAULT, L.; CHERFILS, J. Arf, Arl, Arp and Sar proteins a family of GTP-binding proteins with a structural device for front-back communication. **EMBO reports**, v. 3, n. 11, p. 1035-1041, 2002.
- 93 ZHANG, J. S.; KONG, C.; XIE, H. et al. Phosphatidyl inositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP. **Current Biology**, v. 9, n. 24, p. 1458-1467, 1999.
- 94 ANTONNY, B.; BÉRAUD-DUFOUR, S.; CHARDIN, P. et al. N-terminal hydrophobic residues of the G-protein ADP-ribosylation factor-1 insert into membrane phospholipids upon GDP to GTP exchange. **Biochemistry**, v. 36, n. 15, p. 4675-4684, 1997.
- 95 BRINDLEY, P. J.; PEARCE, E. J. Genetic manipulation of schistosomes. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 5, p. 465-473, 2007.
- 96 KALINNA, B. H.; BRINDLEY, P. J. Manipulating the manipulators: advances in parasitic helminth transgenesis and RNAi. **Trends in Parasitology**, v. 23, n. 5, p. 197-204, 2007.
- 97 SHARP, P. A. RNA interference--2001. **Genes & Development**, v. 15, n. 5, p. 485-490, 2001.
- 98 FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 806-811, 1998.

- 99 GUO, S.; KEMPHUES, K. J. *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. **Cell**, v. 81, n. 4, p. 611–620, 1995.
- 100 NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. **Plant Cell**, v. 2, n. 5, p. 279–289, 1990.
- 101 ROMANO, N.; MACINO, G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. **Molecular Microbiology**, v. 6, n. 22, p. 3343–3353, 1992.
- 102 ZAMORE, P.; TUSCHL, T.; SHARP, P. et al. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. **Cell**, v. 101, n. 1, p. 25–33, 2000.
- 103 KETTING, R. F.; PLASTERK, R. H. A genetic link between co-suppression and RNA interference in *C. elegans*. **Nature**, v. 404, n. 6775, p. 296–298, 2000.
- 104 ARAVIN A. A.; NAUMOVA N.M.; TULIN, A.V. et al. Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline. **Current Biology**, v. 11, n. 13, p. 1017–1027, 2001.
- 105 TAYLOR, D. W.; MA, E.; SHIGEMATSU, H. et al. Substrate-specific structural rearrangements of human Dicer. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 20, n. 6, p. 662–670, 2013.
- 106 BERNSTEIN, E.; CAUDY, A. A.; HAMMOND, S. M. et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. **Nature**, v. 409, n. 6818, p. 363–366, 2001.
- 107 NYKANEN, A.; HALEY, B.; ZAMORE, P. D. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. **Cell**, v. 107, n. 3, p. 309–321, 2001.
- 108 MARTINEZ, J.; PATKANIOWSKA, A.; URLAUB, H. et al. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. **Cell**, v. 110, n. 5, p. 563–574, 2002.
- 109 BANTOUNAS, I. RNA interference and the use of small interfering RNA to study gene function in mammalian systems. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 33, n. 3, p. 545–557, 2004.

- 110 ANGAJI, S. A.; HEDAYATI, S. S.; HOSEIN, R. et al. Application of RNA interference in plants. **Plant Omics Journal**, v. 3, n. 3, p. 77-84, 2010.
- 111 DANG, Y.; YANG, Q.; XUE, Z. et al. RNA interference in fungi: pathways, functions, and applications. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 9, p. 1148-1155, 2011.
- 112 SOMMA, M. P. Molecular dissection of cytokinesis by RNA interference in drosophila cultured cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, n. 7, p. 2448-2460, 2002.
- 113 ŠTEFANIĆ, S.; DVOŘÁK, J.; HORN, M. et al. RNA Interference in *Schistosoma mansoni* schistosomula: selectivity, sensitivity and operation for larger-scale screening. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 10, p. e850, 2010.
- 114 GOMES, M. S.; CABRAL, F. J.; JANNOTTI-PASSOS, L. K. et al. Preliminary analysis of miRNA pathway in *Schistosoma mansoni*. **Parasitology International**, v. 58, n. 1, p. 61-68, 2009.
- 115 KRAUTZ-PETERSON, G.; SKELLY, P. J. *Schistosoma mansoni*: the dicer gene and its expression. **Experimental Parasitology**, v. 118, n. 1, p. 122-128, 2008.
- 116 KRAUTZ-PETERSON, G.; BHARDWAJ, R.; FAGHIRI, Z. et al. RNA interference in schistosomes: machinery and methodology. **Parasitology**, v. 137, n. 03, p. 485, 2009.
- 117 RIVAS, F. V.; TOLIA, N. H.; SONG, J.J. et al. Purified argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 12, n. 4, p. 340-349, 2005.
- 118 SKELLY, P. J.; DA'DARA, A.; HARN, D. A. Suppression of cathepsin B expression in *Schistosoma mansoni* by RNA interference. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 4, p. 363-369, 2003.
- 119 CORRENTI, J. M.; BRINDLEY, P. J.; PEARCE, E. J. Long-term suppression of cathepsin B levels by RNA interference retards schistosome growth. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 209-215, 2005.
- 120 DELCROIX, M.SAJID, M.CAFFREY, C. R. et al. A multienzyme network functions in intestinal protein digestion by a platyhelminth parasite. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 39316-39329, 2006. doi:10.1074/jbc.M607128200.

- 121 MORALES, M. E.; RINALDI, G.; GOBERT, G. N. et al. RNA interference of *Schistosoma mansoni* cathepsin D, the apical enzyme of the hemoglobin proteolysis cascade. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 157, n. 2, p. 160-168, 2008.
- 122 DINGUIRARD, N.; YOSHINO, T. P. Potential role of a CD36-like class B scavenger receptor in the binding of modified low-density lipoprotein (acLDL) to the tegumental surface of *Schistosoma mansoni* sporocysts. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 146, n. 2, p. 219-230, 2006.
- 123 RINALDI, G.; MORALES, M. E.; ALREFAEI, Y. N. et al. RNA interference targeting leucine aminopeptidase blocks hatching of *Schistosoma mansoni* eggs. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 167, n. 2, p. 118-126, 2009.
- 124 COUÉ, M.; BRENNER, S. L.; SPECTOR, I. et al. Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. **FEBS Letters**, v. 213, n. 2, p. 316-318 1987.
- 125 FRIEDMAN, P. A.; PLATZER, E. G. Interaction of anthelmintic benzimidazoles and benzimidazole derivatives with bovine brain tubulin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 544, n. 3, p. 605-14, 1978.
- 126 HU, Q.; NELSON, W. J.; SPILIOTIS, E. T. Forchlorfenuron alters mammalian septin assembly, organization, and dynamics. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 43, p. 29563-29571, 2008.
- 127 IWASE, M.; OKADA, S.; OGUCHI, T. et al. Forchlorfenuron, a phenylurea cytokinin, disturbs septin organization in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genes and Genetic Systems**, v. 79, n. 4, p. 199-206, 2004.
- 128 DEMAY, B. S.; MESEROLL, R. A.; OCCHIPINTI, P. et al. Cellular requirements for the small molecule forchlorfenuron to stabilize the septin cytoskeleton. **Cytoskeleton**, v. 67, n. 6, p. 383-399, 2010.
- 129 YAMAZAKI, T.; OWARI, S.; OTA, S. et al. Localization and evolution of septins in algae. **Plant Journal**, v. 74, n. 4, p. 605-614, 2013.
- 130 TAKAHASHI, S.; SHUDO, K.; OKAMOTO, T. et al. Cytokinin activity of N-phenyl-N'-(4-pyridyl)urea derivatives. **Phytochemistry**, v. 17, n. 8, p. 1201-1207, 1978.
- 131 ALINA, B. Effect of forchlorfenuron (CPPU) combined with NAA and carbaryl on fruit set and fruit characteristics in two apple cultivars. **Acta Horticulturae**, v. 463, p. 287-294,

1998. Disponível em: <http://www.actahort.org/books/463/463_35.htm>. Acesso em: jan.2013.

132 MA, Q. H. Genetic engineering of cytokinins and their application to agriculture. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 213-232, 2008.

133 WASIK, A. A.; POLIANSKYTE-PRAUSE, Z.; DONG, M. Q. et al. Septin 7 forms a complex with CD2AP and nephrin and regulates glucose transporter trafficking. **Molecular Biology of the Cell**, v. 23, n. 17, p. 3370-3379, 2012.

134 HAGIWARA, A. TANAKA, Y. HIKAWA, R. et al. Submembranous septins as relatively stable components of actin-based membrane skeleton. **Cytoskeleton**, v. 68, n. 9, p. 512-525, 2011.

135 KIM, S. K.; SHINDO, A.; PARK, T. J. et al. Planar cell polarity acts through septins to control collective cell movement and ciliogenesis. **Science**, v. 329, n. 5997, p. 1337-1340, 2010.

136 SHARMA, S.; QUINTANA, A.; FINDLAY, G. M. et al. An siRNA screen for NFAT activation identifies septins as coordinators of store-operated Ca^{2+} entry. **Nature**, v. 499, n. 7457, p. 238-242, 2013.

137 LEWIS, F. Schistosomiasis. In: BAXEVANIS, A. et al. (Ed.) **Current protocols in immunology**. New York: John Wiley and Sons, 2001. p. 19.1.1-19.1.28. doi:10.1002/0471142735.im1901s28.

138 DALTON, J. P.; DAY, S. R.; DREW, A. C. et al. A method for the isolation of schistosome eggs and miracidia free of contaminating host tissues. **Parasitology**, v. 115, n. 1, p. 29-32, 1997.

139 INOUE, T.; PECEN, P.; MADDALA, R. et al. Characterization of cytoskeleton-enriched protein fraction of the trabecular meshwork and ciliary muscle cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 51, n. 12, p. 6461-6471, 2010.

140 LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta\text{CT}$ method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

141 BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 25, n. 2, p. 169-193, 2000.

- 142 GINZINGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, v. 30, n. 6, p. 503-512, 2002.
- 143 PEAK, E.; CHALMERS, I. W.; HOFFMANN, K. F. Development and validation of a quantitative, high-throughput, fluorescent-based bioassay to detect schistosoma viability. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 7, p. e759, 2010.
- 144 FISCH, C.; DUPUIS-WILLIAMS, P. Ultrastructure of cilia and flagella - back to the future! **Biology of the Cell**, v. 103, n. 6, p. 249-270, 2011.
- 145 PRAETORIUS, H. A.; SPRING, K. R. A physiological view of the primary cilium. **Annual Review of Physiology**, v. 67, n. 1, p. 515-529, 2005.
- 146 PAN, S. C. The fine structure of the miracidium of *Schistosoma mansoni*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 36, n. 3, p. 307-372, 1980.
- 147 TAKAHASHI, H.; MITSUI, Y.; AWAZAWA, T. et al. Control of ciliary activities of *Schistosoma mansoni* miracidia using triton-extracted parasites. **Journal of Parasitology**, v. 81, n. 5, p. 747-752, 1995.
- 148 GOETZ, S. C.; ANDERSON, K. V. The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 5, p. 331-344, 2010.
- 149 NACHURY, M. V.; SEELEY, E. S.; JIN, H. Trafficking to the ciliary membrane: how to get across the periciliary diffusion barrier? **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 26, n. 1, p. 59-87, 2010.
- 150 HU, Q.; NELSON, W. J. Ciliary diffusion barrier: the gatekeeper for the primary cilium compartment. **Cytoskeleton**, v. 68, n. 6, p. 313-324, 2011.
- 151 HU, Q.; MILENKOVIC, L.; JIN, H. et al. A septin diffusion barrier at the base of the primary cilium maintains ciliary membrane protein distribution. **Science**, v. 329, n. 5990, p. 436-439, 2010.
- 152 COLLINS III, J. J.; KING, R. S.; COGSWELL, A. et al. An atlas for *Schistosoma mansoni* organs and life-cycle stages using cell type-specific markers and confocal microscopy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 3, p. e1009, 2011.

- 153 BAHIA, D.; AVELAR, L. G. A.; VIGOROSI, F. et al. The distribution of motor proteins in the muscles and flame cells of the *Schistosoma mansoni* miracidium and primary sporocyst. **Parasitology**, v. 133, n. 03, p. 321, 2006.
- 154 PETERSON, N. A.; HOKKE, C. H.; DEELDER, A. M. et al. Glycotope analysis in miracidia and primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*: differential expression during the miracidium-to-sporocyst transformation. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 12, p. 1331-1344, 2009.
- 155 NAGATA, K.; KAWAJIRI, A.; MATSUI S et al. Filament formation of MSF-A, a mammalian septin, in human mammary epithelial cells depends on interactions with microtubules. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 20, p. 18538-18543, 2003.
- 156 VEGA, I. E.; HSU, S. C. The septin protein Nedd5 associates with both the exocyst complex and microtubules and disruption of its GTPase activity promotes aberrant neurite sprouting in PC12 cells. **NeuroReport**, v. 14, n. 1, p. 31-37, 2003.
- 157 SPILIOTIS, E. T.; HUNT, S. J.; HU, Q. et al. Epithelial polarity requires septin coupling of vesicle transport to polyglutamylated microtubules. **Journal of Cell Biology**, v. 180, n. 2, p. 295-303, 2008.
- 158 DORSEY, C. H.; COUSIN, C. E.; LEWIS, F. A. et al. Ultrastructure of the *Schistosoma mansoni* cercariae. **Micron**, v. 33, n. 3, p. 279-323, 2002.
- 159 KINOSHITA, M.; KUMAR, S.; MIZOGUCHI, A. et al. Nedd5, a mammalian septin, is a novel cytoskeletal component interacting with actin-based structures. **Genes & Development**, v. 11, n. 12, p. 1535-1547, 1997.
- 160 FARES, H.; PEIFER, M.; PRINGLE, J. R. Localization and possible functions of *Drosophila* septins. **Molecular Biology of the Cell**, v. 6, n. 12, p. 1843-1859, 1995.
- 161 D'AVINO, P. P.; TAKEDA, T.; CAPALBO, L. et al. Interaction between Anillin and RacGAP50C connects the actomyosin contractile ring with spindle microtubules at the cell division site. **Journal of Cell Science**, v. 121, n. 8, p. 1151-1158, 2008.
- 162 VAN KEULEN, H.; LOVERDE, P.T.; BOBEK, L.A. et al. Organization of the ribosomal RNA genes in *Schistosoma mansoni*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 15, n. 2, p. 215-30, 1985.

- 163 PFAFFL, M. W.; HAGELEIT, M. Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 4, p. 275–282, 2001.
- 164 MARELLI, S. P.; TEROVA, G.; COZZI, M. C. et al. Gene expression of hepatic glucocorticoid receptor NR3C1 and correlation with plasmatic corticosterone in italian chickens. **Animal Biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 140-148, 2010.
- 165 LONČAR, J.; POPOVIĆ, M.; ZAJA, R. et al. Gene expression analysis of the ABC efflux transporters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 151, n. 2, p. 209-215, 2010.
- 166 CLEGG, J. A.; SMITHERS, S. R. The effects of immune *Rhesus* monkey serum on schistosomula of *Schistosoma mansoni* during cultivation in vitro. **International Journal for Parasitology**, v. 2, n. 1, p. 79-98, 1972.
- 167 CORRENTI, J. M.; JUNG, E.; FREITAS, T. C. et al. Transfection of *Schistosoma mansoni* by electroporation and the description of a new promoter sequence for transgene expression. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1107-1115, 2007.
- 168 DE MORAES MOURÃO, M.; DINGUIRARD, N.; FRANCO, G. R. et al. Phenotypic screen of early-developing larvae of the blood fluke, *Schistosoma mansoni*, using RNA interference. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 8, p. e502, 2009.
- 169 TOOLEY, A. J.; GILDEN, J.; JACOBELLI, J. et al. Amoeboid T lymphocytes require the septin cytoskeleton for cortical integrity and persistent motility. **Nature Cell Biology**, v. 11, n. 1, p. 17-26, 2008.
- 170 PUTNEY, J. W. J. A model for receptor-regulated calcium entry. **Cell Calcium**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 1986.
- 171 TREBAK, M.; ZHANG, W.; RUHLE, B. et al. What role for store-operated Ca^{2+} entry in muscle? **Microcirculation**, v. 20, n. 4, p. 330-336, 2013.
- 172 CAHALAN, M. D. STIMulating store-operated Ca^{2+} entry. **Nature Cell Biology**, v. 11, n. 6, p. 669-677, 2009.
- 173 LAUNIKONIS, B. S.; MURPHY, R. M.; EDWARDS, J. N. Toward the roles of store-operated Ca^{2+} entry in skeletal muscle. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 460, n. 5, p. 813-823, 2010.

- 174 HAMILTON, S. L. Ryanodine receptors. **Cell Calcium**, v. 38, n.3-4, p. 253-260, 2005.
- 175 MACLENNAN, D. H. Ca^{2+} signalling and muscle disease. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5291-5297, 2000.
- 176 KUREBAYASHI, N.; OGAWA, Y. Depletion of Ca^{2+} in the sarcoplasmic reticulum stimulates Ca^{2+} entry into mouse skeletal muscle fibres. **Journal of Physiology**, v. 533, n. 1, p. 185–199, 2001.
- 177 KIVILUOTO, S.; DECUYPERE, J.-P.; DE SMEDT, H. et al. STIM1 as a key regulator for Ca^{2+} homeostasis in skeletal-muscle development and function. **Skeletal Muscle**, v. 1, p. 16, 2011. doi: 10.1186/2044-5040-1-16.
- 178 STIBER, J.; HAWKINS, A.; ZHANG, Z.-S. et al. STIM1 signalling controls store-operated calcium entry required for development and contractile function in skeletal muscle. **Nature Cell Biology**, v. 10, n. 6, p. 688-697, 2008.
- 179 MCCARL, C.-A.; PICARD, C.; KHALIL, S. et al. ORAI1 deficiency and lack of store-operated Ca^{2+} entry cause immunodeficiency, myopathy, and ectodermal dysplasia. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 124, n. 6, p. 1311-1318.e7, 2009.
- 180 PICARD, C.; MCCARL, C. A.; PAPOLOS, A. et al. STIM1 mutation associated with a syndrome of immunodeficiency and autoimmunity. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 19, p. 1971–1980, 2009.
- 181 NG, S. W.; DI CAPITE, J.; SINGARAVELU, K. et al. Sustained activation of the tyrosine kinase Syk by antigen in mast cells requires local Ca^{2+} influx through Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channels. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 46, p. 31348-31355, 2008.
- 182 DIRKSEN, R. T. Checking your SOCCs and feet: the molecular mechanisms of Ca^{2+} entry in skeletal muscle. **Journal of Physiology**, v. 587, n. 13, p. 3139-3147, 2009.
- 183 DARBELLAY, B.; ARNAUDEAU, S.; BADER, C. R. et al. STIM1L is a new actin-binding splice variant involved in fast repetitive Ca^{2+} release. **Journal of Cell Biology**, v. 194, n. 2, p. 335-346, 2011.

184 PROLE, D. L.; TAYLOR, C. W. Identification of intracellular and plasma membrane calcium channel homologues in pathogenic parasites. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, p. e26218, 2011.

185 GREENBERG, R. M. Ca^{2+} signalling, voltage-gated Ca^{2+} channels and praziquantel in flatworm neuromusculature. **Parasitology**, v. 131, n. S1, p. S97-108, 2005.

186 DOENHOFF, M. J.; CIOLI, D.; UTZINGER, J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 21, n. 6, p. 659-667, 2008.

187 BLAIR, K. L.; BENNETT, J. L.; PAX, R. A. Praziquantel: physiological evidence for its site(s) of action in magnesium-paralysed *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, v. 104, n. 1, p. 59-66, 1992.

188 NOVOZHILOVA, E.; KIMBER, M. J.; QIAN, H. et al. FMRFamide-Like Peptides (FLPs) enhance voltage-gated calcium currents to elicit muscle contraction in the human parasite *Schistosoma mansoni*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 8, p. e790, 2010.

189 MENDONÇA-SILVA, D. L.; NOVOZHILOVA, E.; COBBETT, P. J. R. et al. Role of calcium influx through voltage-operated calcium channels and of calcium mobilization in the physiology of *Schistosoma mansoni* muscle contractions. **Parasitology**, v. 133, n. 01, p. 67, 2006.

APÊNDICE A - Sequências das septinas de *S. mansoni* com domínios e motivos destacados

N-terminal

Região Polibásica

GTPase

G1 (GxxxxGKST)

G3 (DxxG)

G4 (xKxD)

SUE (*Septin Unique Element*)

C-terminal

Coiled-Coil

SmSEPT5 Número de acesso (NCBI) KC916723

MANIPRFGVSAKYRGKVDAEETNTTKSGSRYFSGSSTNSHTGSSRAEDVSRSDSVYSSNIEE
 DARLGFANLPEQMHRKAVKKGFNFTLMVVGESGLGKSTLINSLFVQDLYKDREIEANNRIQ
 STTQIEKRQIELDERGVKLRLTVVDTPGFGDAVNCNDCWKPIEDYIDSTFEQYFKDECGLNR
 KNIHDHRVHCCLYFISPYGHGLRQIDVEFMRLQHKVNIVPVIKADALTANELRAFKERIM
 TDFDRYKIDIYRLPECDSDDEDEIKRLDKEIKAVLPFAVVGSNVCVIDLDGSRRARGRQYPWG
 SVEVENSRHCDFTKLRIFLKTHMQDLKDMTLDVHYENYRAKYITERMSKRQSDRREGVNTG
 ALARLEKEGGTGFEAIVDQDSLLKQKEEELQRMQQLMSKMQEQLKRNTNVVPNPSVSLNNGT
 GNAQSSPIPVGTGQQAS

SmSEPT7.1 Número de acesso (NCBI) KC916724

MVTVVSARNVMIKMEGSSGISPSVDHKVQDSSTQKPIGDLNHRPVMACNDTNRFGPQNNTYNN
 SSGSMKALPTDRLVTKVGANLPNQIHRKAVRRGFVFNLMITGSSGLGKSTFINSLFCADI
 YNTDYPGSRRSYSSGTCVDSRTFALSEANVSLILTIIIDTPGFGSELDNSSSWKPLVKYIDS
 RFESYLRAELNVSRTVVGSGATYQPGLPNDQRVHLCLYFISPNGHGLHQLDIETLKQLHNRV
 NVVVIIKADSLTPDECSQFKQITILQELHNHNKLYDFPESVAKLGGADESYSINEIRHARG
 RQPFVAVTSSNNLVTLPDGRKVNRSYPWGVVECDNLAHNDFKALKHLLMSVHLQDLIDVTHH
 VHYTNYFSSRLTSIAEASKFLATEDSREPLSQLETERLAHQKRLAKLESEMENVFEQKVHER
 TNKLIETERDLVERAEQSEKHILIQLTEFEKRRQEFEDERAIWEAENRESLEALQ
 IIPDRGDFIKDKFRIKRKGLE

SmSEPT7.2 Número de acesso (NCBI) KC916725

MSYQSPLHNGASKRSVYLGKDGLPNLES�KIQSKDSNADREFKIDSGAHVNSAATALANGIS
SVEGYVGYSNLPNQIYRKAVRKGFEFNVLVVGESGVGKSTFVNSLFLSEVYNTDHPGPSKRQ
RKTTCVQSHTVILKENG VYLKLNLI DTPGFGDCVDNTNCWQPVL DYIISRFD DYISGESRVN
RPCQNIPDQRVHACIYFIAPTGHSLKPLDIEFLSRIQDKVNVIPVIAKADTLTPEECRDFKK
TILSDLASRKIRVFEFVDPPECSDRSNDEELVKLRRLRDRVPFAVVGANTLITNNAGVRVRA
RSYPWGIVEVENMDHNDFAAIRYLLLSVYMQELRDVTHNVHYENYRNAKLSGIALESHFQTR
DGKDPMALMEAEKKEHEAKMRKMEAEMEAVFDQKVEEKNQKLRELESDLMRRVEQMREQLKA
QELEQEAARRAFELERQNWEENWREWDIGAEIGTNGPTLGLGERVMNEVIKERVKTEKKKGLF

SmSEPT10 Número de acesso (NCBI) KC916726

MTADVLKALPPDVRTLKLSGHVGFDSLDPQLVNKAISQGFVFNILCVGETGIGKSTLLETLEF
NQKFDFSPSTHDLTDPKLKAVTYDLKEANVKLKLTVVETCGYGDQINKENNIKPVVDYIDNQ
FENYLQEELKMKRSMQAFHDTRVHVCLYFIAPTGHSLKSIDL VAMKKLENKVNIPVIAKSD
TITKSELQKFKARILSEIQSNEIGIYQFPTDDEAVSETNSVMNQHIPFAVVGSSSEEVKINGK
TVRVRQYPWGSVQVENENHCDFVRLREMLLRVNMEDLRERTHG VHYETYRRQR LIEMGFRDD
EKMSLQETYEKRRELQRKELQQKEEEMRQMFVQRVKEKEQVLKEAERELQTKFESLKKTHAE
EKKKLEEKRFLEEEIAAFERRKQLAEQARQGNLTMKKRK

APÊNDICE B - Artigos produzidos durante o período de doutoramento

1- Septins of platyhelminths: identification, phylogeny, expression and localization among developmental stages of *Schistosoma mansoni*. **Ana E. Zeraik**, Gabriel Rinaldi, Victoria H. Mann, Anastas Popratiloff, Ana P.U. Araujo, Ricardo DeMarco, Paul J. Brindley. PLOS Neglected Tropical Diseases (In press)

2- Crystal structure of a *Schistosoma mansoni* septin reveals the phenomenon of strand slippage in septins dependent on nucleotide binding. **Ana E. Zeraik**, Humberto M. Pereira, Yuri V. Santos, José Brandão-Neto, Maiara S. Santos, Luiz A. Colnago, Richard C. Garratt, Ana P. U. Araújo, Ricardo DeMarco
Submetido para Journal of Biological Chemistry

3- *Schistosoma mansoni* developmental stages are reversibly paralyzed by Forchlorfenuron, a phenylurea cytokinin that affects septins. **Ana E. Zeraik**, Vitold E. Galkin, Gabriel Rinaldi, Richard C. Garratt, Michael J. Smout, Victoria H. Mann, Ana P.U. Araujo, Ricardo DeMarco, Paul J. Brindley
Submetido para International Journal for Parasitology.