

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Caracterização de genes regulados pelas vias das MAP quinases e triagem de inibidores para o desenvolvimento de novos fármacos contra o *Schistosoma mansoni*

por

Izabella Cristina Andrade Batista

Belo Horizonte
2020

TESE

DCS – IRR

I. C. A. BATISTA

2020

IZABELLA CRISTINA ANDRADE BATISTA

Caracterização de genes regulados pelas vias das MAP quinases e triagem de inibidores para o desenvolvimento de novos fármacos contra o *Schistosoma mansoni*

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências na área de concentração Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática.

Orientação: Dra. Marina de Moraes Mourão
Dr. Carlos Eduardo Calzavara Silva

Belo Horizonte

2020

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do IRR
CRB/6 1975

B333c
2020

Batista, Izabella Cristina Andrade.

Caracterização de genes regulados pelas vias das MAP quinases e triagem de inibidores para o desenvolvimento de novos fármacos contra o *Schistosoma mansoni* / Izabella Cristina Andrade Batista– Belo Horizonte, 2020.

XX, 220 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 164- 176

Tese (Doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática

1. *Schistosoma mansoni* 2. RNA de interferência 3. Proteína quinase I. Título. II. Mourão, Marina Moraes (Orientação). III. Silva, Carlos Eduardo Calzavara (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.963

IZABELLA CRISTINA ANDRADE BATISTA

Caracterização de genes regulados pelas vias das MAP quinases e triagem de inibidores para o desenvolvimento de novos fármacos contra o *Schistosoma mansoni*

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências na área de concentração Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática.

Orientação: Dra. Marina de Moraes Mourão
Dr. Carlos Eduardo Calzavara Silva

Banca Examinadora

Dr^a. Marina de Moraes Mourão IRR – FIOCRUZ MINAS Presidente

Dr. Carlos Eduardo Calzavara Silva IRR – FIOCRUZ MINAS Presidente

Dr^a. Flora Satiko Kano IRR – FIOCRUZ (Titular)

Dr. Policarpo Ademar Sales Júnior IRR – FIOCRUZ (Titular)

Dr^a. Bárbara de Castro Pimentel Figueiredo UFBA (Titular)

Dr. Ricardo Nascimento Araújo UFMG (Titular)

Dr^a. Silvane Maria Fonseca Murta IRR – FIOCRUZ MINAS (Suplente)

Tese defendida e aprovada em Belo Horizonte, 28/07/2020.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo.
Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas
admiráveis”.

(José de Alencar)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus orientadores. Marina, muito obrigada por ter aceitado trabalhar comigo mesmo sabendo que seria um grande desafio. Agradeço por você ter compartilhado comigo todo seu conhecimento, pela paciência e pela confiança. Você foi muito mais que uma orientadora, foi psicóloga, amiga e serviu de grande exemplo para mim. Cadu, muito obrigada por acompanhar os meus primeiros passos na pesquisa, por todos os ensinamentos, pelo incentivo e pelos conselhos. Além de ter sido um grande professor, foi um grande amigo nos momentos de descontração.

Franco Falcone, thank you for the opportunity to work in your laboratory at Nottingham University and for all the knowledge that I acquired with you! Thank you for making everything seem easier even though I was thousands of kilometers from home.

À Maria Arruda uma mulher incrível que me ajudou muito nos preparativos e durante o meu doutorado sanduíche.

À Naiara... Um dos melhores presentes que minha experiência em Nottingham me trouxe. Já passamos por tantas coisas juntas que apesar de te conhecer há apenas quatro anos, parece que te conheço há uma vida! Obrigada pelo companheirismo, pela amizade, pelas horas de trabalho compartilhadas e por ter sido uma housemate incrível. E ainda me deu um presente que deixou minha vida muito mais alegre enquanto estávamos tão longe de casa, a Alice! Obrigada por terem entrado em minha vida!

I also need to thank special people who crossed my path during my sandwich doctorate who made me discover that friendship is not how long you have been together, it's how you value each other. Karina, Marina, Kylie, Paola, Matias, Marion, Vasiliki, Maren, thanks for making everything easier.

À Roberta Caldeira e ao Omar Carvalho por terem aberto as portas do HMM para que eu pudesse executar meus experimentos e concluir esta etapa tão importante da minha carreira científica.

Agradeço à querida amiga Sandra. Muito obrigada pela amizade, por todos os ensinamentos, por toda disponibilidade e boa vontade de sempre me ajudar! Você é uma verdadeira fonte de inspiração para mim!

À Fê, uma grande amiga que fiz durante essa jornada e foi com quem compartilhei tantos momentos... Desde longos finais de semana e feriados de trabalho, até o nosso casamento. Obrigada por estar comigo nos meus surtos de ansiedade e demorados desabafos até nas rodas de meditação. Sou muito grata por você ter entrado na minha vida e por estar

sempre comigo!

À Amanda, uma amiga incrível, que entrou na minha vida para deixar meus dias mais alegres e leves! Obrigada por compartilhar essa energia incrível que você leva com você!

Agradeço aos grandes amigos que fiz durante esta caminhada. Felipe, Isabela, Silvia, Gabi, Sarah, Chris, Flória, Clara, muito obrigada pela amizade, pelas conversas, pelo apoio, carinho e colaboração. Essa caminhada ficou mais prazerosa com vocês ao meu lado.

Agradeço aos grandes amigos do LICM, Eneida, Stella, Camila, Jorge, Jacque, Lu, Vitor, Pri, Emerson, que sempre torceram por mim e me deram muita força.

Ao Juliano, à Lídia e a Cíntia por toda boa vontade e por serem tão prestativos. Vocês foram fundamentais no desenvolvimento deste projeto.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde IRR por todo aprendizado que adquiri e por todo auxílio.

Ao Moluscário Lobato Paraense do IRR, pelo fornecimento dos parasitos.

À Viviane dos Santos da Plataforma PDTIS de PCR em Tempo Real do IRR, por todos ensinamentos, boa vontade e pelos serviços prestados.

À Anna Christina Salim da Plataforma PDTIS de Sequenciamento do IRR por ser sempre muito prestativa e sempre auxiliar no que fosse preciso.

À Fernanda Trindade, à Ana Carolina Peixoto e a todos os funcionários do BIOP e do BIOTEX por nos fornecer os animais utilizados nos experimentos.

À Camila Carvalho, da Plataforma PDTIS de Microscopia e Microanálise de Imagens, por toda ajuda e pelos serviços prestados.

Ao Markus Kohlhoff da Plataforma PDTIS de Bioprospecção por toda paciência e ajuda no desenvolvimento dos experimentos de HPLC.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ pelo suporte técnico-científico e financeiro e pela disponibilidade de espaço para execução deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Em especial...

Agradeço à minha família pelo amor, incentivo, por me ensinarem a ter perseverança e por me fazerem ter orgulho da profissão que escolhi mesmo nos momentos mais difíceis. Sem o apoio de vocês não chegaria aonde cheguei!

Ao meu marido Breno, que sempre me apoiou incondicionalmente e me ajudou a ser firme. Obrigada por muitas vezes ter aberto mão da minha companhia sem questionar, por me

aturar nos momentos de estresse, ansiedade e nervosismo. Obrigada pelo amor, companheirismo e principalmente, pela paciência. Tudo fica mais fácil com você ao meu lado.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho!

RESUMO

Schistosoma mansoni utiliza sinais extracelulares específicos para gerar respostas celulares apropriadas para se desenvolver e sobreviver no corpo do seu hospedeiro. Nesse contexto, a transdução de sinal envolvendo proteínas quinases eucarióticas (ePKs) tem papéis essenciais em mecanismos reguladores. Recentemente, nosso grupo mostrou que as Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs), como SmERK1, SmERK2, Smp38 e SmJNK, estão envolvidas na reprodução/oviposição, sobrevivência e desenvolvimento do parasito, indicando que essas MAPKs podem ser alvos promissores para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da esquistossomose. Dados de RNASeq também demonstraram que as vias de Smp38 e SmJNK regulam a expressão de um grande conjunto de genes, dentre eles dois genes importantes para o ciclo de vida do parasito: (1) proteína de ligação ao RNAm do inibidor do ativador do plasminogênio 1 (*SmPAI-RBP1*), responsável pela estabilidade/regulação do PAI-1, que funciona como o principal inibidor do ativador do plasminogênio tecidual (tPA) e da uroquinase (uPA) e, portanto, da fibrinólise; e (2) hipoxantina-guanina fosforibosiltransferases (SmHGPRases), uma família de enzimas chave (codificada por cinco genes diferentes) para via de salvação de purinas, uma vez que o parasito não tem a capacidade de realizar a síntese *de novo* de purinas. Dessa forma, este trabalho procurou identificar compostos ativos e específicos para as MAPKs de *S. mansoni* e caracterizar SmPAI-RBP1 e SmHGPRases, pois esses dois genes poderiam ser alvos de drogas mais específicos contra a esquistossomose. Primeiramente, para verificar a atividade das PKs e, posteriormente, realizar a triagem de moléculas usando inibidores das mesmas, as proteínas SmERK1, SmERK2 e SmJNK foram expressas para validar um ensaio de atividade protéica com base na investigação do sítio de ligação ao ATP usando a detecção de polarização da fluorescência através do uso de uma sonda denominada BODIPY® FL ATP- γ -S. Como alternativa a este teste, também realizamos uma triagem *in silico* para priorização de moléculas disponíveis na *Managed Chemical Compound Collection* (MCCC) por “*docking*” para prever ligações das moléculas ao sítio de ligação ao ATP de cada PK do *S. mansoni* e dos ortólogos correspondentes em humanos para posterior teste *in vitro*. Além disso, os papéis funcionais de SmHGPRases e SmPAI-RBP1 foram caracterizados usando RNA de interferência e quantificação da atividade de proteínas. Neste trabalho, conseguimos expressar todas as PKs e purificar SmJNK e SmERK1. Também desenvolvemos um ensaio baseado em polarização de fluorescência da luz para verificar a capacidade de ligação das PKs ao ATP e validamos a triagem como um método “high-throughput” usando moléculas preditas em se ligar ao sítio de ligação ao ATP da PKA. Além disso, a priorização de compostos usando o “*docking*” *in silico* provou ser uma ferramenta muito útil. De 80.000 moléculas do MCCC, 140 foram selecionadas, dentre essas, 61 foram ativas, sendo nove para SmERK1, uma para SmERK2, doze para Smp38, cinco para JNK e 36 para todas as PKs. Além disso, usando inibidores preditos para Smp38 e SmJNK, confirmamos experimentalmente que a via Smp38 regula *SmHGPRase 1*, *SmHGPRase 3* e *SmPAI-RBP1* e a via SmJNK regula *SmPAI-RBP1*. Nossos resultados também sugerem que a atividade de SmHGPRases tem um papel essencial no desenvolvimento de esporocistos e esquistossômulos, uma vez que diferenças significativas na viabilidade, tamanho e/ou forma foram observadas após silenciamento *in vitro*. Além disso, o silenciamento de *SmHGPRases* influenciou o desenvolvimento do ovário e a maturação dos ovos em fêmeas recuperadas de infecções em mamíferos, promovendo também alterações de movimento nos vermes silenciados *in vitro*. Além disso, o SmPAI-RBP1 pode estar envolvido no desenvolvimento de esporocistos e esquistossômulos, e também pode estar relacionado a danos no tegumento em machos nos quais a altura dos tubérculos foi reduzida. Concluindo, este estudo forneceu ferramentas úteis para descoberta de possíveis novos fármacos tendo como alvos PKs de *S. mansoni* e de outros organismos,

identificando um grande número de moléculas ativas para diferentes estágios de vida do *S. mansoni* e também contribuiu para elucidar os papéis funcionais de genes essenciais para o ciclo de vida do *S. mansoni*.

Palavras-chave: *S. mansoni*; RNA de interferência; Proteína quinase.

ABSTRACT

Schistosoma mansoni relies in specific environmental extracellular signals to generate appropriate cellular responses to develop and survive. In this context, signal transduction involving eukaryotic protein kinases (ePKs) has essential roles in regulatory mechanisms. Recently, our group have demonstrated that Mitogen Activated Protein Kinases (MAPKs), such as SmERK1, SmERK2, Smp38 and SmJNK, are involved in parasite reproduction/oviposition, survival and development, indicating that these PKs may be of interest as targets for the development of new drugs to treat schistosomiasis. RNASeq data also demonstrated that Smp38 and SmJNK pathway regulate the expression of a large set of genes, among them, two important genes for the parasite life cycle: (1) plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein (*SmPAI-RBP1*), responsible for the stability/regulation of the PAI-1, that functions as the principal inhibitor of tissue plasminogen activator (tPA) and urokinase (uPA) and hence fibrinolysis; and (2) hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferases (*SmHGPRTases*), a key enzyme family (encoded by five different genes) in the purine-salvage pathway, since the parasite does not carry synthesis *de novo* of purine. This work sought to identify active and specific compounds to the MAPKs of *S. mansoni* and to characterize *SmPAI-RBP1* and *SmHGPRTases* as those two genes could result as more specific drug targets against schistosomes. First, to verify ePKs activity and, posteriorly, perform compounds screening using PKs inhibitors, we aimed to express and purify SmERK1, SmERK2 and SmJNK proteins to validate a protein activity assay based on the ATP binding site interrogation using fluorescence polarisation detection through the use of a probe, named BODIPY® FL ATP- γ -S. Alternatively, we also performed an *in silico* screening prioritizing compounds by compound docking to the ATP binding site of each *S. mansoni*'s PK and the corresponding human orthologs. Thus, the PKs were modeled and the docking was accomplished using compounds available on Managed Chemical Compound Collection (MCCC). Additionally, *SmHGPRTases* and *SmPAI-RBP1* functional roles were characterized using RNA interference and protein activity quantification. In this work, we were able to express all the PKs and purify SmJNK and SmERK. We also developed a fluorescence polarization based assay to verify the binding capabilities of PKs to ATP and validated the screening as a high-throughput method using a set of small molecules predicted to dock into the ATP-binding site of PKA. Besides that, the prioritizing of compounds using *in silico* docking proved to be a very useful tool. From approximately 80,000 compounds from the MCCC, 140 were selected, from those, 61 compounds were active: nine for SmERK1, one for SmERK2, twelve for Smp38, five for JNK and 36 for all PKs. Additionally, using predicted inhibitors for Smp38 and SmJNK, we also confirmed that Smp38 pathway regulates the *SmHGPRTase 1*, *SmHGPRTase 3* and *SmPAI-RBP1* and SmJNK pathway regulates *SmPAI-RBP1*. Our results also suggest that *SmHGPRTases* activity has an essential role in sporocyst and schistosomula development since significant differences in viability, size, and/or shape were observed after the knockdown *in vitro*. Also, the *SmHGPRTase*-knockdown in schistosomula influences the development of the ovary and egg maturation in female adult worms recovered from mammalian infection and promote movement alterations in the worms knocked-down *in vitro*. Moreover, *SmPAI-RBP1* may be involved in sporocyst and schistosomula development, and may also be related to tegument damage in adult male worms in which the tubercles' height were reduced. Concluding, this study provided useful tools to discover potential new drugs against PKs targets from *S. mansoni* and other organisms, identified a large number of potential hit compounds against *Schistosoma*, and contributed to elucidate the functional roles of essential genes for *S. mansoni*.

Key-words: *S. mansoni*; RNA interference; Kinase protein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição global da esquistossomose no ano de 2016.....	22
Figura 2 - Ciclo de vida do <i>S. mansoni</i>	23
Figura 3 - Mecanismo de silenciamento gênico por RNAi.	27
Figura 4 - Via da fibrinólise.	33
Figura 5 - Via de salvação de purina.	36
Figura 6 - Esquema geral de trabalho.	41
Figura 7 - Representação esquemática dos mapas do vetor de expressão pCold-GST contendo as PKs de interesse.	44
Figura 8 - Funcionamento da sonda BODIPY™ FL ATP-γ-S como ligante de PKs.	51
Figura 9 - Alterações fenotípicas em esquistossômulos expostos às moléculas preditas como inibidoras de PKs.	55
Figura 10 - Alinhamento das sequências dos domínios das proteínas ERKs de humanos e <i>S. mansoni</i>	71
Figura 11 - Alinhamento das sequências dos domínios da proteína p38 de humanos e <i>S. mansoni</i>	74
Figura 12 - Alinhamento das sequências dos domínios das proteínas JNK de humanos e <i>S. mansoni</i>	75
Figura 13 - Modelagem das proteínas SmERK1 e ERK 1, 2, 3, 4 e 7 de humanos.	76
Figura 14 - Modelagem das proteínas SmERK2 e ERK 1, 2, 3, 4 e 7 de humanos.	77
Figura 15 - Modelagem das proteínas Smp38 e das proteína humanas p38α, p38β, p38δ e p38γ.	78
Figura 16 - Modelagem das proteínas SmJNK e a proteína humana JNK 1, 2 e 3.	79
Figura 17 - Extração do DNA plasmidial dos clones transformados com o vetor pCold-GST clonado com Smp38, SmJNK, SmERK1 e SmERK2.	80
Figura 18 - Verificação da expressão das PKs Smp38, SmJNK, SmERK1 e SmERK2.	81
Figura 19 - Otimização da expressão das PKs SmJNK, SmERK1 e SmERK2.	82
Figura 20 - Purificação em pequena escala das proteínas SmJNK e SmERK1 em fusão com a proteína GST.	84
Figura 21 - Clivagem da proteína de fusão GST da proteína SmJNK.	85
Figura 22 - “Docking” mostrando a ligação entre o ATP e a sonda BODIPY FL ATP-γ-S com o sítio de ligação ao ATP da PKA.	87
Figura 23 - Curva resposta da concentração de sonda BODIPY FL ATP-Y-S medida pela polarização da fluorescência da luz (mP).	88
Figura 24 - Avaliação da polarização da fluorescência na presença da PKA.	89
Figura 25 - Ensaio de competição entre a sonda BODIPY FL ATP-Y-S e o inibidor H7 na presença de PKA.	90
Figura 26 - Capacidade de ligação da sonda BODIPY FL ATP-Y-S à proteína recombinante SmJNK.	91
Figura 27 - Análise da ligação das moléculas à PKA através de docking utilizando duas funções diferentes: <i>ChemScore Kinase</i> e <i>ChemPLP Score</i>	93
Figura 28 - Triagem de moléculas para avaliar a capacidade das mesmas de inibir a ligação entre a sonda e a PKA comercial.	95
Figura 29 - Predição da ligação das moléculas B5 e B8 em PKA.	96
Figura 30 – Taxa de sobrevivência de esquistossômulos expostos a moléculas ativas da MCCC na concentração de 20 μM.	100
Figura 31 - Alterações morfológicas de esquistossômulos expostos a moléculas ativas da MCCC na concentração de 20 μM.	102

Figura 32 – Taxa de sobrevivência de esquistossômulos expostos a moléculas ativas da MCCC na concentração de 10 µM.	103
Figura 33 - Alterações morfológicas de esquistossômulos expostos a moléculas ativas da MCCC na concentração de 10 µM.	104
Figura 34 - Avaliação da motilidade de vermes adultos machos e fêmeas expostos às moléculas preditas como inibidoras de SmERK1.	107
Figura 35 - Avaliação da motilidade de vermes adultos fêmeas expostos às moléculas preditas como inibidoras de SmERK2.	109
Figura 36 - Avaliação da motilidade de vermes adultos machos e fêmeas expostos às moléculas preditas como inibidoras de Smp38.	111
Figura 37 - Avaliação da motilidade de vermes adultos machos e fêmeas expostos às moléculas preditas como inibidoras de SmJNK.	113
Figura 38 - Avaliação da motilidade de vermes adultos machos e fêmeas expostos às moléculas preditas como inibidoras de todas as PKs alvo deste estudo.	115
Figura 39 - Diagrama de Venn dos compostos ativos em esquistossômulos e em vermes adultos machos e fêmeas.	117
Figura 40 - Validação das vias das MAPKs Smp38 e SmJNK na regulação de <i>SmHGPRTase 1</i> , <i>SmHGPRTase 2/4/5</i> , <i>SmHGPRTase 3</i> e /ou <i>SmPAI-RBP1</i>	123
Figura 41 - Alinhamento das sequências dos domínios das proteínas HGPRTases de humanos e do <i>S. mansoni</i>	127
Figura 42 - Alinhamento das sequências dos domínios das proteínas PAI-RBP1 de humanos e do <i>S. mansoni</i>	128
Figura 43 - Modelagem das proteínas HGPRTases encontradas em <i>S. mansoni</i> e em humanos.	129
Figura 44 - Perfil de expressão dos genes <i>SmHGPRTase 1</i> , <i>SmHGPRTase 2/4/5</i> , <i>SmHGPRTase 3</i> e <i>SmPAI-RBP1</i> nos diferentes estágios de vida do <i>S. mansoni</i>	132
Figura 45 - Verificação da amplificação dos fragmentos dos transcritos que codificam para as proteínas SmPAI-RBP1 e SmHGPRTases.	134
Figura 46 - Síntese de dsRNAs para os genes <i>SmHGPRTase 1</i> , <i>SmHGPRTase 2/4/5</i> , <i>SmHGPRTase 3</i> e <i>SmPAI-RBP1</i>	135
Figura 47 - Níveis de transcritos dos genes <i>SmHGPRTase 1</i> , <i>SmHGPRTase 2/4/5</i> e <i>SmHGPRTase 3</i> em relação aos grupos controle, não tratado e inespecífico, em esporocistos, esquistossômulos e verme adultos expostos aos dsRNAs específicos após 2, 3 ou 4 e 7 dias.	137
Figura 48 - Dosagem de adenosina em esporocistos, esquistossômulos e vermes adultos.	140
Figura 49 - Viabilidade de esporocistos expostos aos dsRNAs da <i>SmHGPRTase 1</i> , <i>SmHGPRTase 2/4/5</i> e <i>SmHGPRTase 3</i>	142
Figura 50 - Alterações fenotípicas de esquistossômulos expostos aos dsRNAs da <i>SmHGPRTase 1</i> , <i>SmHGPRTase 2/4/5</i> e <i>SmHGPRTase 3</i>	143
Figura 51 - Avaliação da motilidade de vermes adultos expostos aos dsRNAs de <i>SmHGPRTase 1</i> , <i>SmHGPRTase 2/4/5</i> e <i>SmHGPRTase 3</i> por eletroporação.	144
Figura 52 - Níveis de transcritos do gene <i>SmPAI-RBP1</i> em relação aos controles, não tratado e inespecífico, em esporocistos expostos ao dsRNA específico.	146
Figura 53 - Avaliação da atividade da plasmina nos diferentes estágios de vida do parasito silenciado.	148
Figura 54 - Alterações fenotípicas de esporocistos expostos ao dsRNA específico para <i>SmPAI-RBP1</i>	149

Figura 55 - Alterações fenotípicas de esquistossômulos expostos ao dsRNA específico para SmPAI-RBP1.	150
Figura 56 - Avaliação da motilidade de vermes adultos expostos aos dsRNAs de SmPAI-RBP1 por eletroporação.	151
Figura 57 - Vermes adultos recuperados 42 dias após infecção de camundongos com esquistossômulos expostos aos dsRNAs para SmHGPRases e SmPAI-RBP1.	152
Figura 58 - Contagem do número de ovos encontrados nos fígados e intestinos de camundongos infectados com esquistossômulos expostos aos SmHGPRases-dsRNAs e SmPAI-RBP1-dsRNAs.	154
Figura 59 - Avaliação da maturação de ovos presentes no íleo de camundongos infectados com parasitos expostos à combinação dos SmHGPRases-dsRNAs.	155
Figura 60 - Avaliação da maturação de ovos presentes no íleo de camundongos infectados com parasitos expostos ao SmPAI-RBP1-dsRNA.	156
Figura 61 - Vermes adultos fêmeas recuperadas de camundongos infectados com esquistossômulos silenciados para SmHGPRases.	157
Figura 62 - Vermes adultos machos recuperados de camundongos infectados com esquistossômulos silenciados para SmPAI-RBP1.	158

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Identificadores do <i>Protein Data Bank</i> (PDB) das proteínas humanas correspondentes as proteínas de <i>S. mansoni</i> utilizadas neste estudo.....	42
Quadro 2 - Iniciadores específicos utilizados no sequenciamento para verificação da inserção correta das sequências no vetor de expressão.....	47
Quadro 3 - Iniciadores específicos para proteínas utilizadas neste estudo para realização da síntese de dsRNA e RT-qPCR e tamanho do fragmento amplificado (em letras minúsculas estão as sequências do promotor de T7 e em letras maiúsculas as sequências dos iniciadores específicas para cada gene).....	58
Quadro 4 - Porcentagem de identidade dos domínios quinase entre as proteínas ERK encontradas no <i>S. mansoni</i> e no humano.....	70
Quadro 5 - Porcentagem de identidade dos domínios quinase entre as proteínas p38 encontradas no <i>S. mansoni</i> e no humano.....	72
Quadro 6 - Porcentagem de identidade dos domínios quinase entre as proteínas JNK encontradas em <i>S. mansoni</i> e no humano.....	73
Quadro 7 - Lista de moléculas selecionadas para triagem <i>in vitro</i> tendo como alvo as PKs SmERK1, SmERK2, SmJNK e Smp38.....	98
Quadro 8 - Lista de moléculas selecionadas para triagem <i>in vitro</i> tendo como alvo todas as PKs.....	99
Quadro 9 - Porcentagem de identidade dos domínios fosforibosiltransferase entre as proteínas HGPRases encontradas no <i>S. mansoni</i> e no humano.....	125
Quadro 10 - Porcentagem de identidade dos domínios hialurona/ligante de mRNA entre as proteínas PAI-RBP1 encontradas no <i>S. mansoni</i> e no humano.....	126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das proteínas quinase. As proteínas quinase são classificadas de acordo com o aminoácido que elas fosforilam.....	29
Tabela 2. Comparação dos “scores” obtidos pelo <i>ChemScore Kinase</i> e <i>ChemPLP Score</i> utilizando 17 moléculas diferentes.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGO2 – Argonauta
ANOVA – Análise de Variância
ATF-2 – Ativador do fator de transcrição 2
ATP – Trifosfato de adenosina
CCDC – *Cambridge Crystallographic Data Centre*
cDNA – Ácido desoxirribonucléico complementar
COX – Citocromo Oxidase I
Ct – Cycle threshold
DMEM – Meio Dulbecco's modified Eagle's
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido desoxirribonucléico
dNTP – Deoxinucleosídeo trifosfato
DO₆₀₀ – Densidade ótica a 600 nm
dsRNA – RNA de dupla fita
DTT – Ditioneitol
ePK – Proteína quinase eucariótica
ERK1 – Extracellular signal regulated-kinase 1
ERK2 – Extracellular signal regulated-kinase 2
g – Força centrífuga
GFP – proteína fluorescente verde
GST – Glutathione-S-Transferase
GOLD – *Genetic Optimization for Ligand Docking*
HGPRtase – hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase
HPLC – High performance liquid chromatography
IPTG – isopropil β-d-1-tiogalactopiranosida
JNK – c-Jun N-terminal kinase
Kb – Kilobases
KDa – Kilodaltons
MAFFT – Multiple Alignment using Fast Fourier Transform
MAPKs – Mitogen-activated protein kinase
MCCC – Managed Chemical Compound Collection
Mg – Magnésio
mP – Unidades de milipolarização
mRNA – RNA mensageiro
μg, g, Kg – micrograma, grama, kilograma
μL, mL, L – microlitro, mililitro, litro
nM, μM, mM, M – nanomolar, micromolar, milimolar, molar
nm – nanômetros
NCBI – National Center for Biotechnology Information
PA – Ativadores de plasminogênio
PAI-1 – Inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1
PAI-RBP1 – Proteína ligante de RNAm do inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1
pb – pares de base
PBS – Solução salina fosfatada
PCE – Programa de controle da esquistossomose

PCR – Reação em cadeia da polimerase
PFA- paraformaldeído
PDB – Protein data bank
pH – potencial de hidrogênio
PKA – Proteína kinase A
PLMG – Plasminogênio
PRPP – 5-fosforibosil 1-pirofosfato
PZQ – Praziquantel
qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
RISC – RNA-Induced Silencing Complex
RNAi – técnica de interferência por RNA
RNase – Ribonuclease
RNaseH – Ribonuclease H
RNASeq – Sequenciamento em massa de cDNA (RNA sequencing)
rpm – Rotações por minuto
RPMI – Meio Roswell Park Memorial Institute
RT – Transcrição reversa
SDS – Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil- sulfato de sódio
siRNA – Pequeno RNA inibidor
SmAtp10 - proteína relacionada a actina 10 do *S. mansoni*
SmERK1 - Extracellular signal regulated-kinase 1 de *S. mansoni*
SmERK2 - Extracellular signal regulated-kinase 2 de *S. mansoni*
SmHGPRase – hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase de *S. mansoni*
SmPAI-1 – Inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 de *S. mansoni*
SmPAI-RBP1 – Proteína ligante de RNAm do inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 de *S. mansoni*
SmJNK – c-Jun N-terminal kinase de *S. mansoni*
Smp38 – p38 MAPK de *S. mansoni*
TBE – Tris-borato de EDTA
Thr-Glu-Tyr – Treonina - Ácido glutâmico - Tirosina
Thr-Gly-Tyr – Treonina - Glicina - Tirosina
Thr-Pro-Tyr – Treonina - Prolina - Tirosina
t-PA – Ativador de plasminogênio tecidual
U – Unidade
uPA – Uroquinase
WHO – World Health Organization

Sumário

1.1.	A esquistossomose	21
1.2.	<i>Schistosoma mansoni</i> : principais características e ciclo biológico	23
1.3.	Tratamento e patogênese da esquistossomose	25
1.4.	Caracterização de genes do <i>S. mansoni</i> por RNA de interferência	26
1.5.	Proteínas alvo do estudo	28
1.5.1.	Proteínas quinase.....	28
1.5.2.	SmERK1/SmERK2	29
1.5.3.	Smp38.....	30
1.5.4.	SmJNK.....	31
1.5.5.	Proteínas reguladas pela via das MAPKs	32
2.	JUSTIFICATIVA.....	37
3.	OBJETIVOS.....	38
3.1.	Objetivo geral	38
3.2.	Objetivos específicos	38
4.	METODOLOGIA	39
4.1.	Seleção das proteínas utilizadas neste estudo	39
4.2.	Análises <i>in silico</i>	41
4.3.	Produção das proteínas quinases SmERK1, SmERK2 e SmJNK em sistema bacteriano 42	
4.3.1.	Preparação de bactérias <i>Escherichia coli</i> DH5 α , BL21 DE3 e <i>ArcticExpress</i> competentes.....	42
4.3.2.	Amplificação do plasmídeo pCold-GST clonado com cada uma das sequências que codificam para as PKs SmERK1 e SmERK2, Smp38 e SmJNK.	43
4.3.3.	Extração plasmídial do vetor pCold-GST clonado com cada uma das sequências que codificam para as PKs SmERK1, SmERK2 e SmJNK por meio de lise alcalina (Miniprep).....	46
4.3.4.	Sequenciamento das construções plasmidiais	46
4.3.5.	Expressão das PKs por indução com IPTG	47
4.3.6.	Lise bacteriana.....	48
4.3.7.	Purificação das PKs por cromatografia de afinidade	48
4.3.8.	Dessanilização das PKs purificadas	49
4.3.9.	Dosagem de proteínas por BCA	49
4.3.10.	Clivagem da proteína de fusão GST das proteínas quinases purificadas	49
4.4.	Padronização de um ensaio para análise da atividade das proteínas quinases e triagem de drogas	49

4.4.1.	Análise da capacidade da sonda <i>BODIPYTM FL ATP-γ-S</i> se ligar a proteína quinase A comercial <i>in silico</i>	50
4.4.2.	Análise da polarização da fluorescência da sonda <i>BODIPYTM FL ATP-γ-S</i>	50
4.4.3.	Análise da ligação da <i>BODIPYTM FL ATP-γ-S</i> e do inibidor H7 à PKA	52
4.4.4.	Análise da ligação da sonda <i>BODIPYTM FL ATP-γ-S</i> à SmJNK recombinante....	52
4.4.5.	Análise de “docking” da PKA contra compostos disponíveis na Managed Chemical Compound Collection (MCCC)	52
4.5.	Triagem de moléculas preditas como inibidoras de PKs	53
4.5.1.	“Docking” molecular das PKs SmERK1, SmERK2, Smp38 e SmJNK e priorização de moléculas da MCCC	53
4.5.2.	Material biológico – Parasitos	54
4.5.2.1.	Teste das moléculas em esquistossômulos e vermes adultos <i>in vitro</i>	55
4.6.	Validação de alvos moleculares.....	56
4.6.1.	Verificação dos genes regulados por vias de sinalização de SmJNK e Smp38	56
4.6.2.	Desenho de iniciadores específicos para amplificação dos alvos moleculares utilizados neste estudo.....	57
4.6.3.	Amplificação, clonagem e seqüenciamento dos transcritos que codificam para as proteínas SmPAI-RBP1 e SmHGPRases e para o gene inespecífico GFP.....	58
4.6.4.	Síntese de dsRNA	59
4.6.5.	Exposição dos parasitos aos dsRNAs <i>in vitro</i>	60
4.6.6.	Avaliação da ativação do plasminogênio.....	65
4.6.7.	Dosagem de adenosina por HPLC	65
4.6.8.	Experimentos <i>in vivo</i>	66
4.6.8.1.	Obtenção dos animais experimentais	66
4.6.8.2.	Infecção de camundongos com esquistossômulos expostos aos dsRNAs.....	67
4.7.	Análises estatísticas	68
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
5.1.	Comparação <i>in silico</i> da das proteínas SmERK1, SmERK2, Smp38 e SmJNK de <i>S. mansoni</i> com os ortólogos do hospedeiro vertebrado humano.....	69
5.2.	Expressão e purificação de Smp38, SmJNK, SmERK1 e SmERK2 recombinates	80
5.3.	Desenvolvimento de um ensaio para análise da atividade das PKs recombinantes e triagem de moléculas disponíveis na MCCC	85
5.3.1.	Confirmação por “docking” da ligação do ATP e da sonda <i>BODIPY FL ATP-γ-S</i> ao sítio de ligação do ATP da PKA.....	85
5.3.2.	Análise da ligação de <i>BODIPYTM FL ATP-γ-S</i> e do inibidor H7 à PKA.....	87

5.3.3.	Análise de “ <i>docking</i> ” da PKA contra moléculas disponíveis na <i>Managed Chemical Compound Library</i> (MCCC) da Universidade de Nottingham.....	92
5.4.	Priorização <i>in silico</i> de moléculas pertencentes à biblioteca MCCC contra as PKs SmERK1, SmERK2, Smp38 e SmJNK.....	97
5.5.	Triagem <i>in vitro</i> de moléculas pertencentes à biblioteca MCCC contra as PKs SmERK1, SmERK2, Smp38 e SmJNK em esquistossômulos.....	99
5.6.	Triagem <i>in vitro</i> de moléculas pertencentes à biblioteca MCCC contra as PKs SmERK1, SmERK2, Smp38 e SmJNK em vermes adultos.....	105
5.7.	Confirmação da regulação da expressão de <i>SmHGPRTase 1</i> , <i>SmHGPRTase 3</i> e <i>SmPAI-RBP1</i> por MAPKs.....	121
5.8.	Comparação das proteínas SmHGPRTases e SmPAI-RBP1 de <i>S. mansoni</i> com os ortólogos do hospedeiro vertebrado humano.....	124
5.9.	Perfil de expressão de <i>SmHGPRTases 1</i> , <i>SmHGPRTases 2/4/5</i> , <i>SmHGPRTases 3</i> e <i>SmPAI-RBP1</i> nos diferentes estágios de vida do <i>S. mansoni</i>	130
5.10.	Caracterização funcional de SmPAI-RBP1, SmHGPRTases 1, SmHGPRTases 2/4/5 e SmHGPRTases 3 por RNA de interferência.....	133
5.10.1.	Silenciamento dos genes <i>SmHGPRTase 1</i> , <i>SmHGPRTase 2/4/5</i> e <i>SmHGPRTase 3</i> em esporocistos, esquistossômulos e vermes adultos.....	135
5.10.2.	Dosagem de adenosina para avaliação da atividade enzimática das SmHGPRTases	139
5.10.3.	Análises de viabilidade de esporocistos, esquistossômulos e vermes adultos silenciados para as <i>SmHGPRTases</i>	140
5.10.4.	Silenciamento do gene <i>SmPAI-RBP1</i> em esporocistos, esquistossômulos e vermes adultos	145
5.10.5.	Avaliação da atividade da plasmina em esporocistos, esquistossômulos e vermes adultos silenciados para o gene <i>SmPAI-RBP1</i>	146
5.10.6.	Análises de viabilidade de esporocistos, esquistossômulos e vermes adultos silenciados para as <i>SmPAI-RBP1</i>	148
5.11.	Avaliação do papel funcional de SmPAI-RBP1 e SmHGPRTases no estabelecimento e desenvolvimento da infecção causada pelo <i>S. mansoni</i> em camundongos.....	151
6.	CONCLUSÕES.....	161
7.	PERSPECTIVAS.....	163
	REFERÊNCIAS.....	164
	APÊNDICES.....	177
	ANEXOS.....	219

1. INTRODUÇÃO

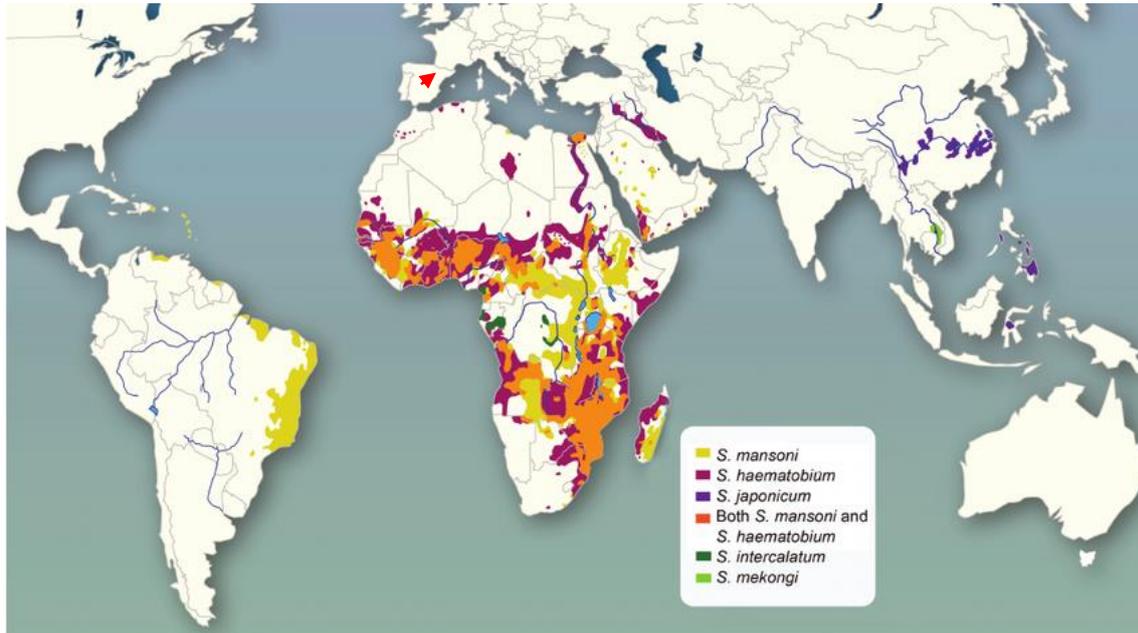
1.1. A esquistossomose

A esquistossomose é uma doença parasitária causada por trematódeos que pertencem à família *Schistosomatidae*. Ela é considerada uma doença tropical negligenciada, sendo a segunda mais importante doença parasitária em termos econômicos, perdendo apenas para a malária (WAKNINE-GRINBERG *et al.*, 2010).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a transmissão da esquistossomose já foi reportada em 78 países, sendo que 52 deles necessitam de quimioterapia em massa para combate da morbidade e cronicidade da doença. Estima-se que mais de 700 milhões de pessoas vivam nessas áreas endêmicas, sob o risco de infecção, e aproximadamente 229 milhões de pessoas precisaram de quimioterapia no ano de 2018 (WHO, 2018).

Várias espécies de *Schistosoma* já foram descritas, dentre elas as principais causadoras da doença no homem: *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum* (causadores da esquistossomose intestinal) e *Schistosoma haematobium* (causadores da esquistossomose urinária). O *S. mansoni* é encontrado principalmente na África sub-Saariana, Brasil, Suriname, Venezuela e Caribe, com menor frequência no Egito e península da Arábia. *S. haematobium* tem maior prevalência na África sub-Saariana, Egito, Sudão e península da Arábia. *S. japonicum* encontra-se ao longo dos lagos e rios centrais da China, em Mindanao, Leyte, em algumas outras ilhas das Filipinas e em pequenas regiões na Indonésia. Além disso, *S. mekongi* e *S. intercalatum* são duas espécies com importância local, causando esquistossomose intestinal no sudeste da Ásia e no centro e oeste África, respectivamente (GRYSEELS, 2012; GRYSEELS *et al.*, 2006) (Figura 1).

Figura 1 - Distribuição global da esquistossomose no ano de 2016.



Mapa representando a distribuição da esquistossomose no mundo. Cada espécie causadora dessa doença está representada por uma cor diferente no mapa: *S. mansoni* em amarelo, *S. haematobium* em roxo, *S. japonicum* em azul, *S. mansoni* e *S. haematobium* em laranja, *S. intercalatum* em verde escuro e *S. mekongi* em verde claro. Destaca-se no mapa as ilhas Guadalupe, Martinica e a ilha de Córsega na França (seta vermelha), onde a esquistossomose foi recentemente relatada. Figura adaptada da referência (WEERAKOON *et al.*, 2015).

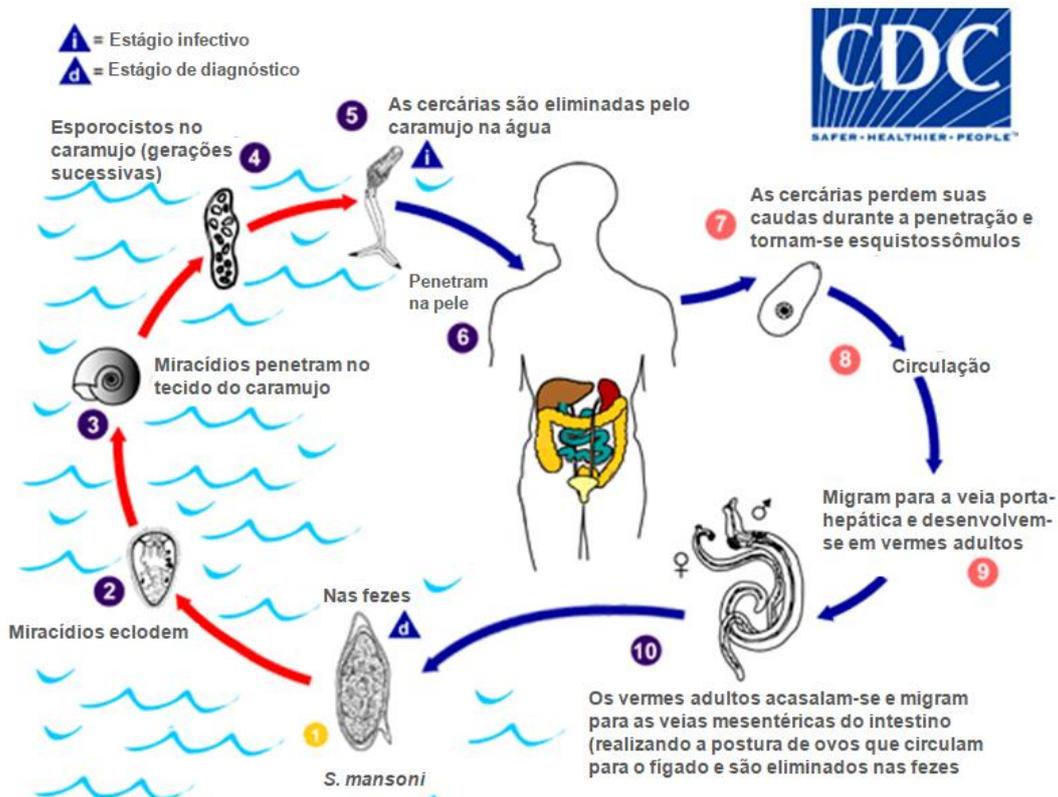
Casos de transmissão da esquistossomose têm sido identificados também na Europa, local onde a doença já havia sido eliminada na década de 1960. Em 2014, foi relatada uma infecção causada pelo *S. haematobium* no sul da Córsega, na França (HOLTFRETER *et al.*, 2014). Depois disso, mais 10 casos foram identificados na mesma localidade (BERRY *et al.*, 2016). Tais dados demonstram que a esquistossomose está longe de ser controlada.

Estudos recentes determinaram a distribuição espacial de *S. mansoni* (única espécie de *Schistosoma* encontrada no Brasil) em vários estados do Brasil associando seu risco a variáveis ambientais e/ou determinantes sociais. A maior prevalência de *S. mansoni* foi encontrada no Norte e Nordeste, provavelmente explicada por áreas adequadas para proliferação de seus hospedeiros intermediários. As menores taxas de prevalência foram vistas no Centro-Oeste, Sul e parte do Sudeste (exceto Minas Gerais) (SCHOLTE *et al.*, 2014).

1.2. *Schistosoma mansoni*: principais características e ciclo biológico

A espécie *S. mansoni* representa um grupo taxonômico de parasitos digenéticos, pertencentes ao filo Platyhelminthes, classe Trematoda, ordem Digenea, família Schistosomatidae e gênero *Schistosoma*. Eles são endoparasitas de vertebrados, possuem corpo achatado dorso-ventralmente, de simetria bilateral. Os órgãos de fixação são constituídos por duas ventosas: a mais anterior, oral, onde se encontra a abertura bucal; e a ventral ou acetábulo. O sistema digestivo termina em fundo cego, isto é, não possuem ânus. Este parasito se diferencia dos demais trematódeos hermafroditas, por apresentar dimorfismo sexual acentuado (BASCH, 1990). *S. mansoni* é amplamente abundante e sua ocorrência está associada à expressiva distribuição de espécies de moluscos do gênero *Biomphalaria* susceptíveis à infecção (MORGAN *et al.*, 2001).

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



O ciclo de vida do parasito é considerado complexo e inclui estágios aquáticos de vida livre, além de estágios parasitários que requerem a presença de hospedeiros intermediários e hospedeiros vertebrados definitivos, dentre eles o homem. * Figura adaptada de CDC.

Como é representado na Figura 2, o ciclo desses parasitos se mantém quando ovos excretados nas fezes do hospedeiro humano infectado entram em contato com a água (1), induzindo a eclosão dos miracídios (2) (larvas ciliadas de natação livre). Os miracídios

buscam o hospedeiro intermediário, caramujos do gênero *Biomphalaria*, utilizando estímulos químicos e luminosos (3). Após penetrarem no hospedeiro intermediário, os miracídios se multiplicam assexuadamente em esporocistos multicelulares e, mais tarde, em cercárias (estágio larval de natação livre) (5) (HAN *et al.*, 2009). Essas cercárias são liberadas em ambientes aquáticos a partir de um hospedeiro intermediário infectado, e utilizam uma variedade de estímulos ambientais, para encontrar seu hospedeiro definitivo (6) (HAAS *et al.*, 1997). Quando isso acontece, as cercárias penetram na pele do hospedeiro definitivo e se transformam em esquistossômulos (7), que ao caírem na corrente sanguínea (8), se alojam nos pulmões e depois no sistema porta-hepático (9). Somente quando alcançam o sistema porta-intra-hepático se diferenciam em vermes adultos dióicos (10). Quatro semanas após a infecção, a maioria dos vermes encontra-se maduros e prontos para se acasalarem. Os vermes acasalados deslocam-se ativamente contra a corrente circulatória do sistema porta e migram para as veias mesentéricas (BOAG; NEWTON; GASSER, 2001; NATION *et al.*, 2020). Cerca de 300 ovos de *S. mansoni* são liberados a cada dia, por casal de vermes, em espécies de roedores infectados, sendo que este número pode aumentar em primatas. O ovo de *S. mansoni* é caracterizado pela presença de uma espícula lateral (CHEEVER *et al.*, 1994).

Para que o *S. mansoni* consiga viver por tanto tempo no corpo do seu hospedeiro, foi necessário o desenvolvimento de diversos mecanismos para que ele conseguisse escapar do sistema imune e interagir com hormônios do hospedeiro para favorecer seu estabelecimento, crescimento e reprodução (ESCOBEDO *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2019). Um recente estudo realizado utilizando abordagens computacionais que predizem redes de interações existentes entre proteínas do *S. mansoni* e proteínas humanas identificou 24 processos biológicos envolvidos nesta interação, dentre eles alguns estão relacionados com processos que ocorrem no tecido sanguíneo, principalmente na inibição do processo de coagulação, regulação da atividade de proteases e adesão e migração celular. Além disso, associações moleculares também foram preditas através da análise do proteoma do hospedeiro humano e do *S. mansoni*. Foram identificadas 1.096 interações nos diferentes tecidos que o parasito apresenta tropismo (114 no intestino, 191 no pulmão, 195 no sangue, 443 no fígado e 153 na pele) (CUESTA-ASTROZ *et al.*, 2019). Dessa forma, o estudo molecular das interações parasito-hospedeiro é essencial para entendermos a infecção e adaptação do parasito ao corpo do homem, além de gerar conhecimento para compreendermos os modos de prevenção e tratamento de diversas doenças infecciosas.

1.3. Tratamento e patogênese da esquistosomose

A infecção por *S. mansoni* pode se manifestar clinicamente de quatro formas diferentes: a forma aguda e três formas crônicas (intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica) (GALVÃO-CASTRO *et al.*, 1981; HAZENBOS *et al.*, 1998). A dermatite cercariana ocorre logo após o contato com as cercarias e pode-se observar manifestações pruriginosas na pele, de duração geralmente transitória, que cedem quase sempre espontaneamente. Esta manifestação clínica decorre da entrada de cercárias que penetraram na pele e dura, em geral, 24 a 72 horas podendo estender-se por até 15 dias (LAMBERTUCCI, 1993). A fase aguda da doença ocorre várias semanas após a penetração das cercárias do *Schistosoma* na pele do homem e está relacionada à migração dos esquistossômulos dentro do corpo do hospedeiro e posterior deposição de ovos em seus tecidos. Os sintomas podem incluir febre, mal-estar, mialgia, fadiga, tosse e diarreia (GRAY *et al.*, 2011). Durante a fase crônica da infecção, estudos mostram que a patologia é desencadeada principalmente pelos granulomas formados por meio de uma reação imunológica em resposta aos ovos do parasito retidos nos tecidos do hospedeiro. Antígenos solúveis do ovo induzem uma reação granulomatosa por meio de uma resposta imune de hipersensibilidade retardada mediada por células T CD4⁺ (GRAY *et al.*, 2011; HESSE *et al.*, 2000; WARREN; DOMINGO; COWAN, 1967).

No Brasil, ocorreu uma importante mudança no quadro da esquistosomose em razão dos programas de controle implementados, como o Programa de Controle da Esquistosomose – PCE (KATZ, 1998; MACHADO, 1982). Esses programas visam a redução da morbidade e mortalidade da parasitose e têm contribuído para a redução da prevalência e das formas graves da esquistosomose, mas não têm impedido que novos focos da doença apareçam. Os métodos de controle disponíveis consistem em implementação de saneamento básico, melhorias no tratamento de água, controle dos hospedeiros intermediários e quimioterapia contra as infecções em humanos (FENWICK; WEBSTER, 2006; FENWICK; WEBSTER; BOSQUE-OLIVA; BLAIR *et al.*, 2009).

No momento, o Praziquantel® (PZQ) é a única droga disponível para o tratamento dos pacientes infectados por ser uma droga de baixo custo, administrada em dose única e que pode ser utilizada no tratamento contra todas as espécies de *Schistosoma* (CIOLI; PICAMATTOCCIA, 2003; DOENHOFF *et al.*, 2009). No entanto, a dependência de um único medicamento para tratar uma população de mais de 200 milhões de pessoas infectadas e mais de 700 milhões de pessoas em risco em três continentes pode ocasionar o surgimento de parasitos resistentes a esta droga no campo, como já foi visto em laboratório (BOTROS;

BENNETT, 2007; COELI *et al.*, 2013). Além disso, o PZQ não age nos vermes em estágios migratórios nem em fases juvenis, apenas em vermes adultos (SABAH *et al.*, 1986). Dessa forma, a necessidade de buscar alternativas ao PZQ, incluindo o desenvolvimento de medicamentos que podem ser utilizados em combinação com o mesmo vem sendo cada vez maior (CAFFREY, 2007; MÄDER *et al.*, 2018).

O avanço da tecnologia, juntamente com o desenvolvimento de poderosas ferramentas, métodos computacionais e uma série de novos estudos proteômicos, permitiram uma abordagem mais objetiva para propor alvos de drogas e candidatos a vacinas. (DEMARCO; VERJOVSKI-ALMEIDA, 2009; NAHUM; MOURÃO; OLIVEIRA, 2012).

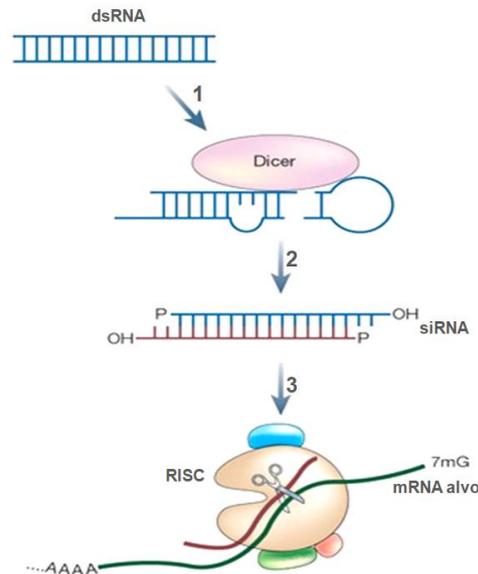
Existem duas estratégias que são mais utilizadas na descoberta de novas drogas. A abordagem empírica que é baseada na busca aleatória de compostos diferentes e a abordagem racional, que propõe identificar um alvo biológico e, posteriormente, buscar um inibidor específico para esse alvo (TAVARES *et al.*, 2016).

O padrão ouro utilizado na triagem de drogas é a análise de alterações no fenótipo e na viabilidade do verme em microscópio (ABDULLA *et al.*, 2009). Entretanto, atualmente, novas metodologias baseadas em triagem “*high-throughput*” (HTS) vêm sendo utilizadas para reduzir a subjetividade e o tempo gasto nas análises. O método HTS baseia-se na triagem simultânea de um grande número de compostos. Esses novos métodos monitoram o parasito por vídeo, impedância, atividade enzimática, colorimetria e fluorimetria, entre outros (AGUIAR *et al.*, 2017; INGLESE *et al.*, 2007; MOREIRA *et al.*, 2020; SOUFAN *et al.*, 2015; TAVARES *et al.*, 2016).

1.4. Caracterização de genes do *S. mansoni* por RNA de interferência

A expansão do acesso aos bancos de dados genômicos do *S. mansoni* foi muito útil para a descoberta de novas drogas contra esse parasito, além de ser possível desenvolver diferentes métodos para acessar a função de genes e aumentar a perspectiva de compreender a biologia do *Schistosoma* e os processos envolvidos na interação parasito-hospedeiro (NAHUM; MOURÃO; OLIVEIRA, 2012). Entretanto, poucas ferramentas de genômica funcional estão disponíveis para *Schistosoma*. Dessa forma, o silenciamento gênico por RNA de interferência (RNAi), a única ferramenta difundida para validação gênica no parasito, é proposta nesse trabalho para o estudo funcional de genes de *S. mansoni*.

Figura 3 - Mecanismo de silenciamento gênico por RNAi.



Moléculas de RNA de fita dupla (dsRNAs) se ligam ao complexo protéico Dicer (1) e são clivadas por ele em pequenos fragmentos (siRNAs) (2). Uma das fitas dos siRNAs se liga a outro complexo chamado RISC, que é guiado ao RNAm alvo (3). Quando o mRNA se liga a este complexo, ele é clivado pela endonuclease Argonata 2 e é degradado por RNases. Como consequência, a proteína deixa de ser expressa (VIDALIN *et al.*, 2009).

Resumidamente, o mecanismo de silenciamento gênico através de RNAi acontece quando o complexo protéico Dicer cliva o dsRNA, que são longos RNAs de fita dupla, em pequenos fragmentos de RNAs também de fita dupla (siRNAs). Posteriormente, outro complexo protéico, RISC (do inglês, *RNA-induced silencing complex*), é guiado pelos siRNAs para o mRNA alvo complementar a ele. Como resultado, o mRNA alvo é clivado em um local específico por uma endonuclease conhecida como Argonata 2 (Ago2). Após a clivagem, o RNA alvo perde os elementos que normalmente são responsáveis por sua estabilidade e é rapidamente degradado pelas RNases. Dessa forma, a proteína codificada não é mais sintetizada (HAMILTON; BAULCOMBE, 1999; KURRECK, 2009; VIDALIN *et al.*, 2009) (Figura 3).

Desde 2003 a técnica de RNAi está sendo aplicada em *Schistosoma* para estudar funções gênicas e/ou identificar potenciais alvos para o desenvolvimento de drogas (BOYLE *et al.*, 2003; SKELLY; DA'DARA; HARN, 2003) e tem se mostrado eficiente em diferentes fases do desenvolvimento do parasito (ANDRADE *et al.*, 2014; LONG *et al.*, 2016; MOURÃO *et al.*, 2009).

O efeito do silenciamento gênico por RNAi é considerado temporário e pode durar tempos variados dependendo da espécie em questão (WATANABE *et al.*, 2004). Além disso, após o

silenciamento, a alteração na quantidade de proteína pode variar de acordo com a meia-vida da proteína-alvo, o organismo que está sendo estudado e da sequência utilizada para a síntese dos dsRNAs. A eficiência desses dsRNAs dependerá de sua estabilidade termodinâmica e acessibilidade para ligar-se ao transcrito alvo. Portanto, para trabalhar com a técnica de RNAi é preciso ter em mente que, na maioria das vezes, o gene alvo não é completamente silenciado e observa-se apenas um decréscimo na quantidade de transcritos. Assim o efeito da utilização de RNAi é referido como “*knockdown*” (KURRECK, 2009).

1.5. Proteínas alvo do estudo

1.5.1. Proteínas quinase

O *Schistosoma* pode sobreviver por anos ou décadas no hospedeiro definitivo e passa por diversas fases e ambientes durante seu ciclo de vida, portanto, mudanças fisiológicas, morfológicas e bioquímicas estimuladas por sinais do ambiente precisam ocorrer, a fim de garantir sua adaptação e o estabelecimento da infecção nos diferentes hospedeiros (LOVERDE *et al.*, 2004). Além de estratégias para inibir ou modular as respostas imunes do hospedeiro, a manutenção da homeostase e adaptações celulares complexas, o *S. mansoni* integra sinais extracelulares específicos para gerar uma resposta celular apropriada (HAN *et al.*, 2009). As proteínas quinase eucarióticas (ePKs) representam uma das maiores famílias gênicas em eucariotos e passaram a ser consideradas o segundo grupo de proteínas mais estudado para o desenvolvimento de drogas (COHEN, 2002). Isso se deve ao fato de que são enzimas mediadoras de sinais em resposta a estímulos externos que controlam funções biológicas essenciais, tais como: replicação, controle do ciclo celular, transcrição gênica, rearranjos do citoesqueleto, apoptose, estresse oxidativo e metabolismo energético. Em 2011, foi descrito que 1,9% do proteoma predito de *S. mansoni* correspondia à proteínas quinase (ANDRADE *et al.*, 2011). Analisando versões mais recentes do genoma do *S. mansoni*, foram identificadas 351 quinases transcritas em vermes adultos, das quais 268 representam as PKs e 83 não-PKs (utilizam substratos diferentes de proteínas) (GREVELDING; LANGNER; DISSOUS, 2018). De todas estas PKs, apenas 12% delas possuem estudos experimentais, mostrando a necessidade de mais estudos com foco nestas proteínas que devem exercer um papel importante no desenvolvimento do parasito.

As ePKs atuam fosforilando outras proteínas. Isso ocorre através da transferência de um grupo fosfato a partir de uma molécula de ATP para aminoácidos específicos de substratos

que possuam o grupo hidroxila livre. O fosfato é carregado negativamente, o que leva à mudança na conformação da proteína, causando modificações na sua estrutura e consequentemente na sua atividade (HANKS; QUINN; HUNTER, 1988). As ePKs são classificadas em diferentes grupos (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação das proteínas quinase. As proteínas quinase são classificadas de acordo com o aminoácido que elas fosforilam. Adaptado de (HANKS; QUINN; HUNTER, 1988).

Superfamília	Classe	Grupo
Proteína quinases eucarióticas (ePKs)	Serina/Treonina quinases	AGC
		CaMK
		CMGC
		STE
		CK1
	Tirosina quinases	TK RGC
Proteína quinases atípicas (aPKs)	Híbridas	TK-like Outras
	Atípicas	

As MAPKs (do inglês, Mitogen-Activated Protein Kinases) compreendem uma família de ePKs que possuem um dos sistemas de sinalização mais bem caracterizados em diversos organismos. MAPKs fosforilam resíduos específicos de serina ou treonina na proteína alvo e regulam atividades celulares diversas como expressão gênica, mitose, movimento, metabolismo e apoptose (JOHNSON; LAPADAT, 2002).

Dentre as MAPKs estudadas neste trabalho, estão SmERK1/SmERK2, Smp38 e SmJNK.

1.5.2. SmERK1/SmERK2

Em planárias, a ativação da via de sinalização ERK (do inglês, *extracellular signal-regulated kinase*) induz as células-tronco a saírem do estado proliferativo e entrarem no estado de diferenciação, desempenhando um papel fundamental na dinâmica dessas células durante a regeneração (TASAKI *et al.*, 2011). Em *Caenorhabditis elegans*, a via de sinalização mediada por ERK promove sua longevidade e é necessária para múltiplos eventos de desenvolvimento, incluindo a indução da diferenciação das células vulvares, uterinas e espiculares e a indução da meiose da linhagem germinativa (OKUYAMA *et al.*, 2010; SUNDARAM, 2006). Em *S. mansoni*, estudos mostraram que o fator de crescimento

epidérmico humano pode ativar a via Ras/ERK, que induz a meiose em oócitos (VICOONE *et al.*, 2004). Além disso, também em *S. mansoni*, já foi mostrado que a sinalização de SmERK1/SmERK2 depende da correta organização de domínios de sinalização especializados, chamados de jangadas lipídicas. Este mesmo estudo mostrou, através da utilização de inibidores específicos, que esquistossômulos que tiveram estas proteínas inibidas reduziram sua motilidade em quase 100% após 24h de exposição ao inibidor U0126. Ainda, utilizando este mesmo inibidor, os esquistossômulos apresentaram alterações fenotípicas, caracterizadas pelo surgimento de granulações, região central escura e corpo segmentado (RESSURREIÇÃO *et al.*, 2016).

Um estudo realizado por nosso grupo também mostrou que SmERK1/SmERK2 estão envolvidas na reprodução do parasito, uma vez que o silenciamento gênico provocou uma redução na produção de ovos e desenvolvimento de ovários e oócitos em vermes adultos (ANDRADE *et al.*, 2014).

1.5.3. Smp38

A via de sinalização da MAPK p38 é evolutivamente conservada e é caracterizada por responder a uma variedade de estresses (HAN *et al.*, 1994). A via de p38 é conhecida por desempenhar um papel central nas respostas inflamatórias em mamíferos, e devido sua importância para a sobrevivência de diferentes organismos, vem sendo extensivamente estudada (HAN *et al.*, 1994; ONO; HAN, 2000). Estudos realizados em *Drosophila melanogaster* revelaram que a resposta ao estresse mediada pela via de p38 faz parte da imunidade inata dessas moscas (CHEN *et al.*, 2010). Em *C. elegans*, a MAPK p38 também está relacionada com a resposta ao estresse oxidativo e a ativação da imunidade inata, além de estar relacionada com sua longevidade (FLETCHER *et al.*, 2019; INOUE *et al.*, 2005; SHIVERS *et al.*, 2010; TROEMEL *et al.*, 2006; VERMA *et al.*, 2018). Além disso, estudos recentes mostraram a direta relação da MAPK p38 com tecidos reprodutivos em humanos. Foi visto que o estresse oxidativo desempenha um papel importante na remodelação do tecido uterino durante a gravidez (COX; REDMAN, 2017; SHELLER-MILLER *et al.*, 2018).

Em *S. mansoni*, Smp38 exerce um importante papel no desenvolvimento das estruturas reprodutoras, na sobrevivência dos parasitos ao estresse oxidativo e na maturação dos ovos (AVELAR *et al.*, 2019). Além disso, estudos mostraram que p38 MAPK de *S. mansoni* é essencial no controle do batimento ciliar de miracídios e na transformação de miracídios em esporocistos (RESSURREIÇÃO *et al.*, 2011a; b). Dados obtidos com a realização de

RNASeq também indicam que Smp38 regula as vias essenciais de sinalização para o estabelecimento da homeostase do parasito, incluindo genes relacionados à defesa antioxidante, composição estrutural dos ribossomos, spliceossomos, citoesqueleto, bem como as vias do metabolismo das purinas e pirimidinas (AVELAR *et al.*, 2019).

1.5.4. SmJNK

Em diferentes organismos, a morte celular é amplamente regulada por ligantes extracelulares, sendo que uma das principais vias reguladoras da apoptose é a via de JNK (do inglês, *c-Jun N-terminal kinase*) (DHANASEKARAN; REDDY, 2008; 2017; WU *et al.*, 2019). Esta via também está envolvida em muitos outros processos biológicos, como regulação do tempo de vida de *Drosophilas* através da via de transdução do sinal de insulina (BITEAU *et al.*, 2011) e na morfogênese dos apêndices dorsais e de suas estruturas reprodutoras (SUZANNE; PERRIMON; NOSELLI, 2001). Ainda em *Drosophilas*, já foi descrito que JNK está relacionado com a regulação do tamanho dos órgãos durante o desenvolvimento dos mesmos (WILLSEY *et al.*, 2016). Em *C. elegans*, estudos demonstraram a relação direta da via de sinalização de JNK com sua resposta ao estresse causado por metais pesados (HATTORI *et al.*, 2013) e com sua longevidade (NEGI; SHUKLA; KHAN; PANDEY, 2016). Já foi demonstrado também seu papel na maturação de ovócitos e embriogênese de *Xenopus laevis* (BAGOWSKI; XIONG; FERRELL, 2001) e na montagem do fuso durante a maturação meiótica de oócitos em camundongos (HUANG *et al.*, 2011).

Estudos funcionais do nosso grupo demonstraram que JNK é importante para o estabelecimento da infecção causada pelo *S. mansoni* no hospedeiro mamífero. Essa proteína também parece estar envolvida na manutenção da integridade do tegumento em vermes adultos machos e na maturação dos órgãos vitelínicos em fêmeas (ANDRADE *et al.*, 2014). O que corrobora com outro estudo que mostra que SmJNK pode estar relacionada à produção de ovos *in vitro* (GAVA *et al.*, 2019). A análise do transcriptoma de esquistossômulos silenciados para *SmJNK*, demonstrou que essa via regula diferentes genes, entre os quais, genes envolvidos no metabolismo de nucleotídeos de purina, genes que codificam proteínas de ligação a ácidos nucléicos e genes que codificam proteínas envolvidas nas vias de fagossomos e spliceossomos (GAVA *et al.*, 2019).

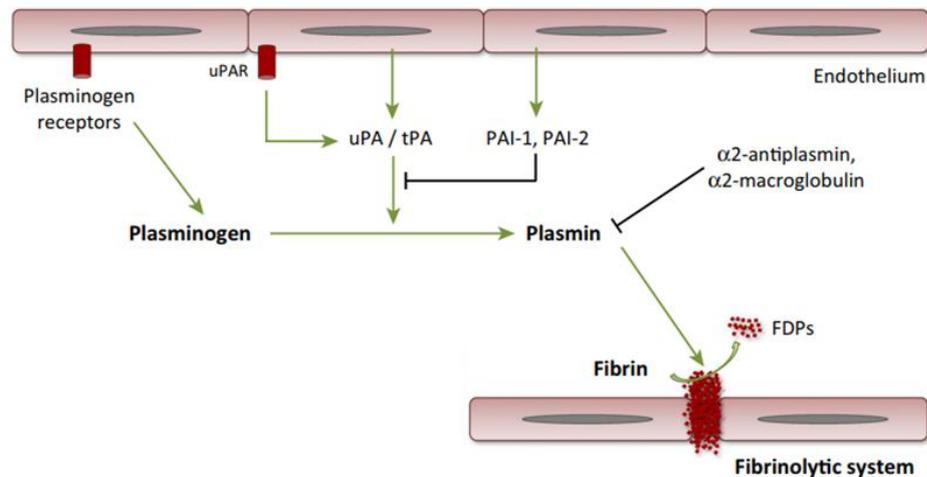
1.5.5. Proteínas reguladas pela via das MAPKs

Como mencionado anteriormente, estudos recentes mostraram a importância das vias de sinalização SmJNK e Smp38 MAPK para o desenvolvimento, a reprodução e a sobrevivência do *S. mansoni* (AVELAR *et al.*, 2019; GAVA *et al.*, 2019). Através de estudos utilizando RNASeq, foi visto que ambas as vias regulam a expressão de um grande número de genes. Dentre os muitos genes, a regulação positiva das vias de sinalização de Smp38 e SmJNK promove aumento da expressão do gene que codifica a proteína ligante ao mRNA do inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-RBP1) em *S. mansoni* e, quando silenciado, foi visto uma regulação negativa (GAVA *et al.*, 2019). A inibição de PAI-RBP1 pode causar um desbalanço na via fibrinolítica do parasito, fazendo com que ele apresente dificuldades de alimentação e de locomoção. A via da MAPK p38 também regula a expressão da enzima hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase em *S. mansoni* (AVELAR *et al.*, 2019). A inibição dessa enzima poderia interferir na replicação celular e na síntese de RNA e DNA do parasito.

1.5.5.1. Proteína de ligação ao RNA do inibidor do ativador do plasminogênio

Ativadores de plasminogênio (PA) são serina proteases que catalisam a conversão da pró-enzima inativa plasminogênio em plasmina. A plasmina é a principal enzima fibrinolítica no sangue tendo como função a lise dos coágulos de fibrina. A maior parte dos PAs são regulados pelo inibidor do ativador do plasminogênio do tipo 1 (PAI-RBP1) como é mostrado na Figura 4 (HEATON *et al.*, 2001). O PAI-1 é uma proteína importante da via de coagulação e é secretado como um inibidor de protease ativo, mas converte-se rapidamente em uma forma latente inativa, que pode ser reativada pela exposição a agentes caotrópicos ou fosfolípidios (RAU; BEAULIEU; HUNTINGTON; CHURCH, 2007).

Figura 4 - Via da fibrinólise.



A fibrina é o substrato para o início da via fibrinolítica, cujo resultado final é a dissolução dos coágulos. O principal componente da fibrinólise é a plasmina, a forma ativa do plasminogênio. Este processo é iniciado pela liberação do ativador do plasminogênio tecidual (tPA) ou ativador do plasminogênio uroquinase (uPA) das células endoteliais no local do dano vascular e essa ativação é regulada pelo inibidor do ativador de plasminogênio (PAI-1). Abreviações: FDPs, produtos da degradação de fibrina; PAI-1, inibidor do ativador do plasminogênio-1; tPA, ativador do plasminogênio tecidual; uPA, ativador de plasminogênio tipo uroquinase; uPAR, receptor do ativador do plasminogênio tipo uroquinase (GONZÁLEZ-MIGUEL *et al.*, 2015).

A SERBP1 ou PAI-RBP1 é uma proteína de ligação ao mRNA do gene *PAI 1* codificada pelo gene *SERBP1*, foi recentemente descoberta e está localizado no cromossomo 1p31 em humanos e no cromossomo 6 do *S. mansoni*. Estudos anteriores mostraram que o local de ligação ao mRNA do PAI-1 é uma sequência cíclica responsiva a nucleotídeos, e a atividade de ligação do PAI-RBP1 pode ser influenciada pelo seu estado de fosforilação. O controle da estabilidade do mRNA é um componente importante da regulação da expressão gênica (HEATON *et al.*, 2001). Isso pode ser explicado, pois aquele gene cujo mRNA apresenta maior estabilidade, gerará maior acúmulo dos transcritos no citoplasma celular. A tradução de tais transcritos resultará em maior produção da proteína codificada (SHOSHANI; CLEVELAND, 2020).

A plasmina (forma ativa do plasminogênio) exibe alta atividade proteolítica de amplo espectro e degrada tanto a fibrina quanto componentes da matriz extracelular e tecido conjuntivo. Por conseguinte, o recrutamento desta enzima por qualquer patógeno presente no sangue, poderia ser um mecanismo eficaz para evitar possível imobilização pela rede de coágulos de fibrina e também ajudar o patógeno em sua disseminação e estabilização no hospedeiro por meio da degradação dos diferentes componentes da matriz extracelular (SUN, 2006). Outras funções relacionadas aos mecanismos de sobrevivência desses patógenos como a degradação de imunoglobulinas e componentes do complemento, a ativação de

metaloproteinases de matriz, a estimulação da aderência e invasão, bem como a degradação de proteínas para a nutrição, também têm sido sugeridas como sendo o resultado da interação entre patógenos e o sistema fibrinolítico de seus hospedeiros. Além disso, esta interação pode estar diretamente ligada a habilidade do parasito se mover livremente pelo sistema circulatório do hospedeiro e se alimentar sem dificuldades, como é o caso dos schistosomas (FIGUEIREDO *et al.*, 2015; PIROVICH; DA'DARA; SKELLY, 2020).

O *S. mansoni* é capaz de sobreviver por longos períodos nos vasos sanguíneos do seu hospedeiro definitivo sem induzir coágulos sanguíneos estáveis. Vários mecanismos têm sido propostos para explicar esta capacidade do mesmo, bem como sua capacidade de promover a lise de coágulos sanguíneos formados ao seu redor (DA'DARA; SKELLY, 2014; PIROVICH; DA'DARA; SKELLY, 2020). Estudos que avaliam a capacidade dos parasitos utilizarem os componentes do sistema fibrinolítico do próprio hospedeiro foram realizados e foi visto que o *S. bovis* macho pode se ligar ao plasminogênio do hospedeiro e promover sua conversão em plasmina para impedir a formação estável de coágulos sanguíneos (RAMAJO-HERNÁNDEZ *et al.*, 2007).

Dessa forma, um bom alvo para desenvolvimento de drogas contra o *S. mansoni* seriam os componentes da via fibrinolítica do parasito, já que qualquer alteração na mesma poderia ser crucial para a sobrevivência do verme no hospedeiro. Assim, um importante regulador dessa via é o PAI-1 que, como explicado anteriormente, são responsáveis por inibir os ativadores de plasminogênio. Dessa forma, por ser regulada pelas MAPK quinases, sendo talvez um fator chave na biologia do parasito, a proteína responsável por estabilizar o mRNA de PAI-1 (PAI-RBP1) foi escolhida para este estudo.

1.5.5.2. Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase

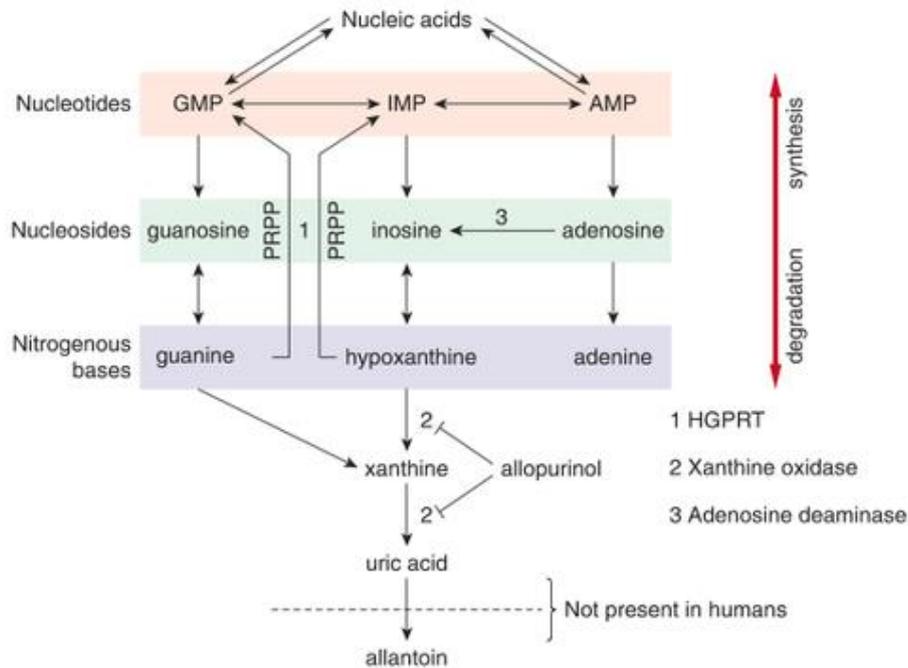
1.5.5.2.1. Metabolismo dos nucleotídeos

Os nucleotídeos são constituídos de um grupamento fosfato, um açúcar (em geral uma pentose: ribose ou 2'-desoxirribose) e de uma base púrica ou pirimídica. As bases púricas possuem um anel pirimidina ligado a um anel imidazol, sendo elas: adenina, guanina, hipoxantina e xantina. As bases pirimídicas possuem um anel heterocíclico, sendo elas: citosina, uracila, timina e ácido orótico (NELSON & COX, 2011).

Nas células, a quantidade de nucleotídeos é bem menor do que as quantidades requeridas para síntese do DNA. Dessa forma, a síntese de nucleotídeos precisa ocorrer paralelamente à síntese de ácidos nucléicos (NELSON & COX, 2011).

Os nucleotídeos podem ser sintetizados de duas formas diferentes: pela via *de novo* ou pelas vias de salvação. As vias *de novo* para biossíntese de purinas e pirimidinas são bem parecidas dentre todos os seres vivos e utilizam como precursores metabólicos: aminoácidos, ribose 5-fosfato, CO₂ e NH₃. As bases livres não são intermediários utilizados pelas vias de síntese *de novo*, pois as bases não são sintetizadas previamente ao seu acoplamento à ribose, mas sim, acopladas ao grupo 5-fosfo-ribosil do nucleotídeo. As vias de salvação reutilizam as bases livres e nucleosídeos liberados na quebra de ácidos nucléicos. A hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HGPRTase) é uma enzima chave da via de salvação de purinas que catalisa a transferência reversível, dependente de magnésio, de um grupo fosforibosil do 5-fosfo- α -D-ribosil-pirofosfato (PRPP) para uma base purina (hipoxantina ou guanina) para formar o ribonucleotídeo purina, inosina monofosfato ou guanosina monofosfato, liberando pirofosfato (KAPPOCK; EALICK; STUBBE, 2000) (Figura 5).

Figura 5 - Via de salvação de purina.



Na via de salvação de purinas, nucleotídeos são sintetizados a partir da recuperação de bases e nucleosídeos que se formam durante a degradação do RNA e/ou DNA.

1.5.5.2.2. Metabolismo de nucleotídeos no *S. mansoni*

Vermes adultos de *S. mansoni* parecem ser incapazes de incorporar ^{14}C -glicina ao anel púrico, mostrando a dependência de um suprimento externo de bases pré-formadas para síntese de nucleotídeos e a perda da via *de novo* de síntese de purinas (SENFT; CRABTREE, 1977). Devido ao fato de que *S. mansoni* depende integralmente da via de salvação para gerar purinas, enzimas envolvidas nesta via se tornam bons alvos para desenvolvimento de novas drogas. Uma delas seria a enzima HGPRTase, que como explicado anteriormente, representa uma das enzimas críticas da via do metabolismo de purinas do parasito para fornecer nucleotídeos de guanina e hipoxantina. A conformação das enzimas humana e de *Schistosoma* já foram estudadas por dicroísmo circular (YUAN *et al.*, 1993) e a estrutura de cristal da SmHGRPTase 1 também já foi descrita e foram identificadas quatro substituições em seu sítio ativo comparando com a estrutura correspondente em humanos (ROMANELLO *et al.*, 2019). As diferenças existentes indicam as HGPRTases como um promissor alvo para a quimioterapia anti-*Schistosoma*.

2. JUSTIFICATIVA

Devido aos registros de resistência ao Praziquantel®, do insucesso na erradicação da doença dos programas de controle em áreas de alta prevalência e da ausência de medicamentos alternativos de alta eficácia, a esquistossomose continua sendo uma das doenças infecciosas e parasitárias mais prevalentes no mundo, sendo responsável por altos índices de morbidade e mortalidade, gerando perdas econômicas significativas, especialmente em países em desenvolvimento. Por isso, a busca por um novo fármaco para combate da esquistossomose se torna uma prioridade. Como já foi demonstrado por nosso grupo de pesquisa, as proteínas quinase SmERK1, SmERK2, SmJNK e Smp38 se mostraram essenciais para o desenvolvimento e sobrevivência do parasito *S. mansoni* no corpo do seu hospedeiro definitivo, sendo consideradas potenciais alvos de drogas. Esses alvos regulam muitos genes que são importantes para a sobrevivência do parasito no hospedeiro humano. Dessa forma, seria interessante o entendimento da função de genes que são regulados por essas PKs, principalmente os que já se mostraram essenciais para o ciclo de vida do parasito. Além do conhecimento sobre a biologia do parasito e sua interação com o hospedeiro, esses alvos podem ser mais específicos e utilizados futuramente em estudos para o tratamento e controle da esquistossomose. Diante do exposto, as hipóteses deste estudo são:

- 1- Testes que avaliam a polarização da fluorescência de uma sonda análoga ao ATP são passíveis de serem aplicados em avaliações de atividade de PKs e em triagem de drogas para *S. mansoni* tendo como alvo PKs.
- 2- Moléculas preditas por “docking” são capazes de se ligar ao sítio de ligação de PKs e causar sua inibição.
- 3- Proteínas reguladas por MAPKs do *S. mansoni* são importantes para o ciclo de vida do parasito, sendo, portanto, mais específicos e bons alvos para desenvolvimento de fármacos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Triar inibidores ativos de MAPKs em busca de potenciais novos fármacos contra a esquistossomose e elucidar o papel biológico de proteínas reguladas pela SmJNK e pela Smp38 no ciclo de vida do *S. mansoni*.

3.2. Objetivos específicos

- Comparar *in silico* as sequências e as estruturas protéicas de ERK1, ERK2, JNK, p38 HGPRTase e PAI-RBP1 do *S. mansoni* com as proteínas correspondentes em humanos.
- Expressar e purificar as proteínas quinases SmERK1, SmERK2, Smp38 e SmJNK.
- Desenvolver e validar um teste de atividade de ePKs para a realização de triagem em “high-throughput” de drogas em proteínas recombinantes.
- Realizar triagem *in silico* e *in vitro* para as PKs SmERK1, SmERK2, Smp38 e SmJNK com moléculas pertencentes à biblioteca *Managed Chemical Compound Collection* (MCCC).
- Validar a regulação dos genes *SmHGPRTase 1* e *SmPAI-RBP1* pelas MAPKs SmJNK e Smp38.
- Avaliar os níveis de expressão dos genes *SmHGPRTase 1*, *SmHGPRTase 2/4/5*, *SmHGPRTase 3* e *SmPAI-RBP1* nas diferentes fases do parasito.
- Elucidar o papel biológico das proteínas SmPAI-RBP1 e SmHGPRTase no ciclo de vida do *S. mansoni*.

4. METODOLOGIA

4.1. Seleção das proteínas utilizadas neste estudo

Este trabalho pode ser dividido em três partes: Parte I – Validação de um teste de atividade de ePKs para a realização de triagem em “*high-throughput*” de drogas em proteínas recombinantes. Parte II - triagem *in silico* e *in vitro* de moléculas com potencial de atuar como inibidores das PKs SmERK1, SmERK2, Smp38 e SmJNK. Parte III - Caracterização das proteínas SmPAI-RBP1 e SmHGPRase. A primeira etapa do trabalho foi desenvolvida em parceria com a Universidade de Nottingham e está descrita nos itens 4.3 e 4.4 da metodologia. Para essa etapa, primeiramente, foram selecionadas proteínas quinases da via de sinalização de MAPKs: SmERK1 (Smp_142050), SmERK2 (Smp_047900), Smp38 (Smp_133020) e SmJNK (Smp_172240). Essa escolha foi feita a partir de resultados previamente obtidos em estudos do nosso grupo de pesquisa que mostraram que estes alvos seriam importantes para o desenvolvimento e reprodução do parasito (ANDRADE *et al.*, 2014; AVELAR *et al.*, 2019; GAVA *et al.*, 2019). Portanto, para que fosse possível a triagem de uma biblioteca contendo aproximadamente 80.000 moléculas, incluindo as quatro MAPKs, buscamos o desenvolvimento de um novo teste de triagem em “*high-throughput*” em proteína quinases recombinantes e que tivesse preço acessível.

Para a realização da segunda etapa, as análises de “*docking*” dos compostos foram feitas por colaboradores da Universidade de Nottingham e estão descrito no item 4.5.1. A validação experimental destes compostos foi realizada no Instituto René Rachou e está descrita no item 4.5.2.

A terceira parte deste projeto foi desenvolvida no Instituto René Rachou e está descrita no item 4.6 e consiste na caracterização de proteínas reguladas pelas vias de sinalização de MAPKs do *S. mansoni*, sendo elas:

1. Proteína ligante do mRNA do Inibidor do Ativador do Plasminogênio- PAI-RBP1

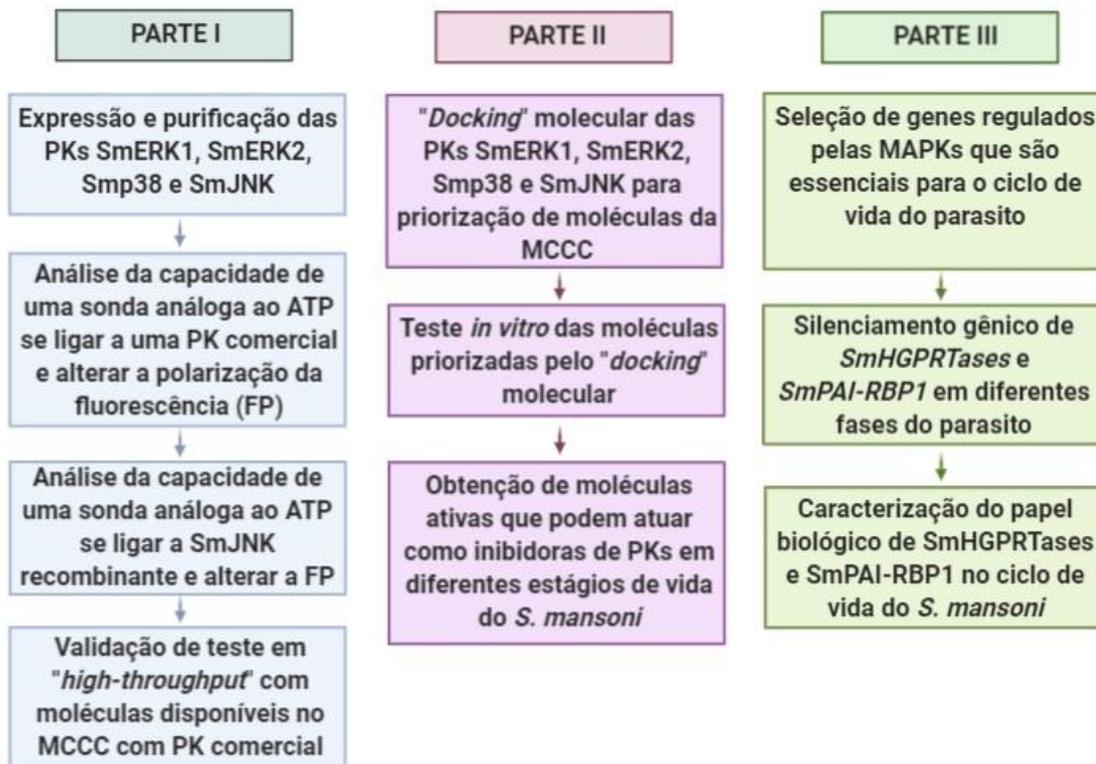
O PAI-RBP1 (Smp_009310) foi selecionado visto que estudos prévios feitos por RNASeq mostraram que as vias de sinalização de Smp38 e SmJNK estão diretamente ligadas a expressão de PAI-RBP1 (AVELAR *et al.*, 2019; GAVA; TAVARES *et al.*, 2019). A diminuição de PAI-RBP1, portanto, atua diretamente na função de PAI-1, desestabilizando o mRNA, que é direcionado à degradação (HEATON *et al.*, 2001). Dessa forma alguma

alteração nesta via pode interferir diretamente na alimentação e motilidade do verme no hospedeiro.

2. Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase - HGPRTase

Dados obtidos através de RNASeq, mostraram que a via de sinalização de Smp38 também regula a expressão de *SmHGPRTase 1* (AVELAR *et al.*, 2019). Estas proteínas representam uma família de enzimas críticas da via do metabolismo de purinas do parasito para fornecer nucleotídeos de guanina. Dada à ausência de biossíntese de purinas *de novo* em *S. mansoni* (SENFT; CRABTREE, 1977) propomos a caracterização funcional das HGPRTases usando RNAi. No entanto, *S. mansoni* apresenta cinco genes diferentes que codificam as SmHGPRTases: Smp_103560 (compreendendo duas isoformas Smp_103560.1 e Smp_103560.2), Smp_148820, Smp_168500, Smp_312580 e Smp_332640; de agora em diante referidos como *SmHGPRTase 1*, *SmHGPRTase 2*, *SmHGPRTase 3*, *SmHGPRTase 4* e *SmHGPRTase 5*. Portanto, para que pudéssemos avaliar o papel da SmHGPRTase 1 utilizamos RNAi e silenciámos todas as diferentes SmHGPRTases, uma vez que uma poderia assumir a função da outra. Como a sequência de *SmHGPRTase 2* é muito semelhante às *SmHGPRTases 4* e *5*, usamos apenas um RNA de fita dupla (dsRNA) direcionado aos três genes para realização do silenciamento destes genes, portanto, os resultados relacionados a esses genes são representados como *SmHGPRTase 2/4/5*.

Figura 6 - Esquema geral de trabalho.



Fluxograma representando o esquema geral de trabalho realizado neste estudo, que foi realizado em três partes. Parte I, representada em azul, Parte II em roxo e Parte III em verde.

4.2. Análises *in silico*

As seqüências de proteínas ERK1, ERK2, JNK, p38, HGPRTase e PAI-RBP1 de *S. mansoni* utilizadas neste estudo foram obtidas a partir de suas seqüências codificantes preditas na versão 7 do genoma de *S. mansoni* depositadas no banco de dados *WormBase Parasite* (https://parasite.wormbase.org/Schistosoma_mansoni_prjea36577/Info/Index/) e as seqüências para proteínas humanas foram obtidas no banco de dados Uniprot (<https://www.uniprot.org>). A análise dos domínios de cada uma dessas proteínas foi realizada no Pfam (<https://pfam.xfam.org/>).

Para análise de identidade entre os domínios das proteínas encontradas no *S. mansoni* e em seres humanos foi feito um alinhamento utilizando o *default* do software MAFFT (<https://mafft.cbrc.jp/>) (KATO; ROZEWICKI; YAMADA, 2019). O resultado do alinhamento foi salvo em formato fasta, e a porcentagem de identidade foi calculada utilizando o *default* do software Jalview (<http://www.jalview.org>) (WATERHOUSE *et al.*, 2009).

As modelagens das proteínas utilizadas no estudo foram realizadas para comparação da estrutura das proteínas de *S. mansoni* e seu hospedeiro definitivo, o homem. Para isso, primeiramente as proteínas foram modeladas no servidor *Phyre 2* (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>), utilizando os parâmetros padrões disponíveis no programa no modo *Intensive* (KELLEY *et al.*, 2015). Depois da modelagem, suas estruturas foram alinhadas para sobreposição e comparação com a proteína correspondente em humanos, através da utilização do programa Chimera 1.13.1 (PETTERSEN *et al.*, 2004). As proteínas humanas foram obtidas pelo *Protein Data Bank* (PDB) (<https://www.rcsb.org/>) (Quadro 1), no entanto, as proteínas ERK4 e ERK7 não tinham seus modelos disponíveis no PDB, por isso elas também foram modeladas utilizando o *Phyre 2* e o modelo predito foi utilizado para a sobreposição das proteínas.

Quadro 1. Identificadores do *Protein Data Bank* (PDB) das proteínas humanas correspondentes as proteínas de *S. mansoni* utilizadas neste estudo.

Proteína do hospedeiro humano	Identificador no PDB
ERK1	2ZOQ
ERK2	6OPH
ERK3	2I6L
JNK1	4QTD
JNK2	3E7O
JNK3	2ZDT
p38 α	3BV2
p38 β	3GP0
p38 δ	1CM8
p38 γ	3COI
HGPRTase	5W8V

4.3. Produção das proteínas quinases SmERK1, SmERK2 e SmJNK em sistema bacteriano

4.3.1. Preparação de bactérias *Escherichia coli* DH5 α , BL21 DE3 e *ArcticExpress* competentes

Para o preparo de bactérias competentes para a transformação, uma alíquota de 50 μ L de culturas das bactérias *E. coli* DH5 α , BL21 selvagens foram inoculadas em tubos cônicos de 50 mL contendo 5 mL de meio Luria Broth (meio LB) (Sigma-Aldrich) sem antibiótico. Os

tubos foram incubados em agitador orbital a 200 rpm a 37°C por 16 a 18 horas. No dia seguinte, 1 mL de cultura foi inoculado em Erlenmayer de 500 ml contendo 100 mL de meio LB sem antibiótico incubado em agitador orbital a 200 rpm a 37°C, até que fosse obtida uma densidade óptica a 600 nm (DO_{600nm}) entre 0,4 e 0,6. Posteriormente, a cultura foi transferida para tubos cônicos de 50 mL e deixada por 15 minutos em banho de gelo e, em seguida, centrifugada por 15 minutos a 3000 rpm a 4°C. O pellet bacteriano foi delicadamente ressuspensionado em 25 mL de solução de cloreto de cálcio ($CaCl_2$, 0,1M – Vetec; HEPES, 0,1M – Sigma-Aldrich) gelada e deixado em banho de gelo por mais 20 minutos. Novamente, foi feita a centrifugação por 15 minutos a 3000 rpm a 4°C e o sobrenadante foi descartado. Após, o pellet foi dissolvido delicadamente em 1 mL de $CaCl_2$ /glicerina ($CaCl_2$ a 0,1 M; glicerina a 15% – Synth) gelada e alíquotas de 50 μ L foram distribuídas em microtubos de 0,6 mL, previamente resfriados em banho de gelo. As bactérias competentes foram armazenadas a -70°C até momento do uso.

4.3.2. Amplificação do plasmídio pCold-GST clonado com cada uma das seqüências que codificam para as PKs SmERK1 e SmERK2, Smp38 e SmJNK.

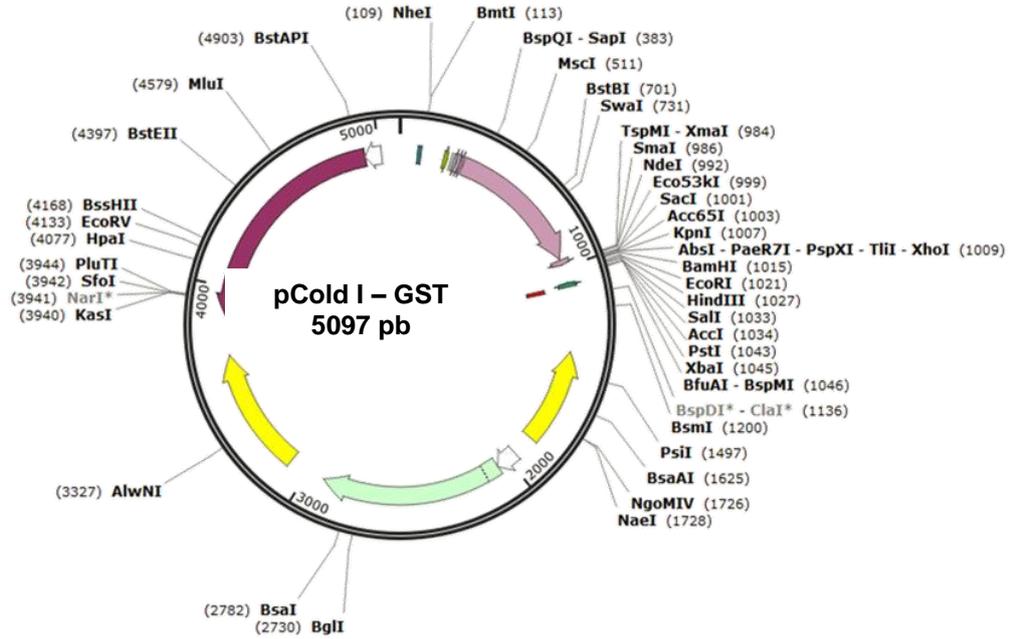
As seqüências que codificam as PKs selecionadas, foram sintetizadas comercialmente na *GenScript – Custom gene service* (Nova Jersey, EUA) (www.genscript.com) inseridas no plasmídio pCold-GST nos sítios de restrição das enzimas *SacI* e *XbaI*.

Para obtenção de DNA plasmidial das construções pCold-GST_SmERK1, pCold-GST_SmERK2, pCold-GST_Smp38 e pCold-GST_SmJNK (Figura 7 B-E), tais plasmídeos foram amplificados na bactéria *E. coli* DH5 α . Para tal, estas bactérias competentes foram transformadas com 50 ng de cada construção plasmidial.

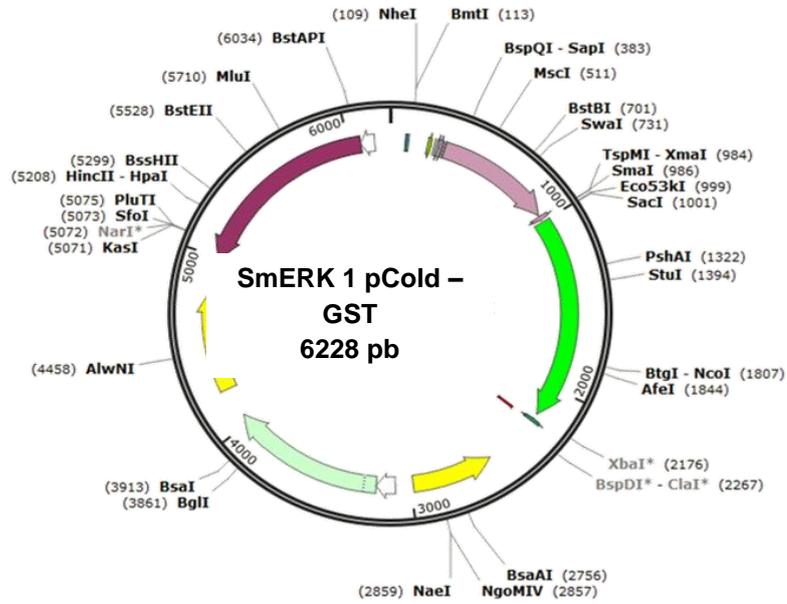
Em todos os experimentos de transformação foi utilizado o método químico. Aos tubos contendo 50 μ L de bactérias competentes, foram adicionados os plasmídeos de interesse e estes incubados em banho de gelo por 30 minutos. Em seguida as bactérias foram submetidas a um choque térmico a 42°C por 2 minutos e resfriadas em banho de gelo por 5 minutos. Todo o volume foi transferido para tubos de 2 mL contendo 950 μ L de meio LB. Em seguida, as bactérias foram incubadas a 37°C, a 200 rpm em agitador orbital, por 1 hora. Para plaquear, 100 μ L da cultura de bactérias foram transferidos para placa contendo LB-ágar (Sigma-Aldrich) adicionado de 100 μ g/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich). As placas foram incubadas a 37°C em estufa microbiológica por 16 a 18 horas.

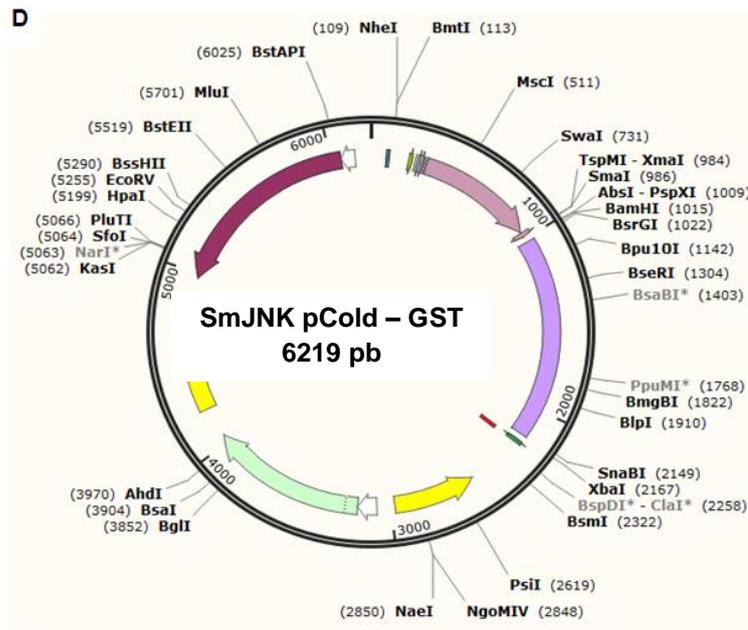
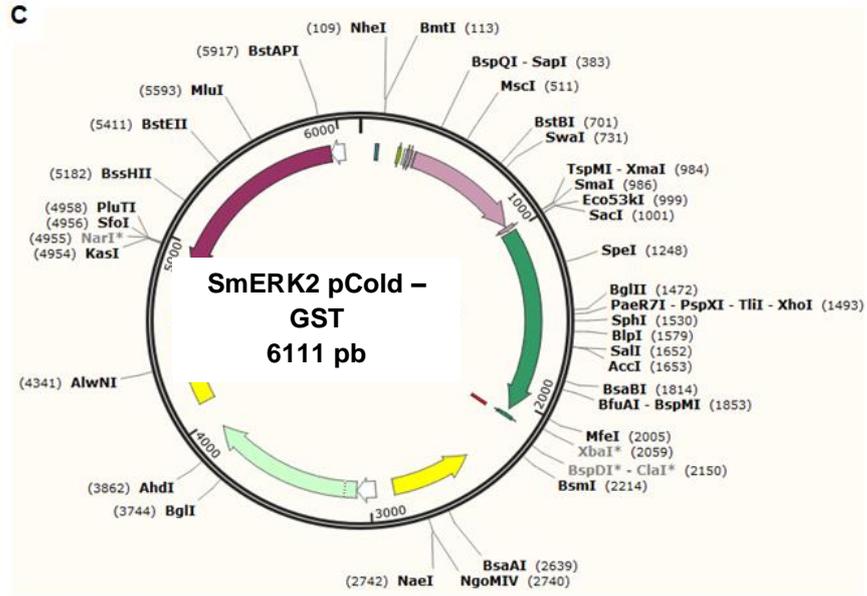
Figura 7 - Representação esquemática dos mapas do vetor de expressão pCold-GST contendo as PKs de interesse.

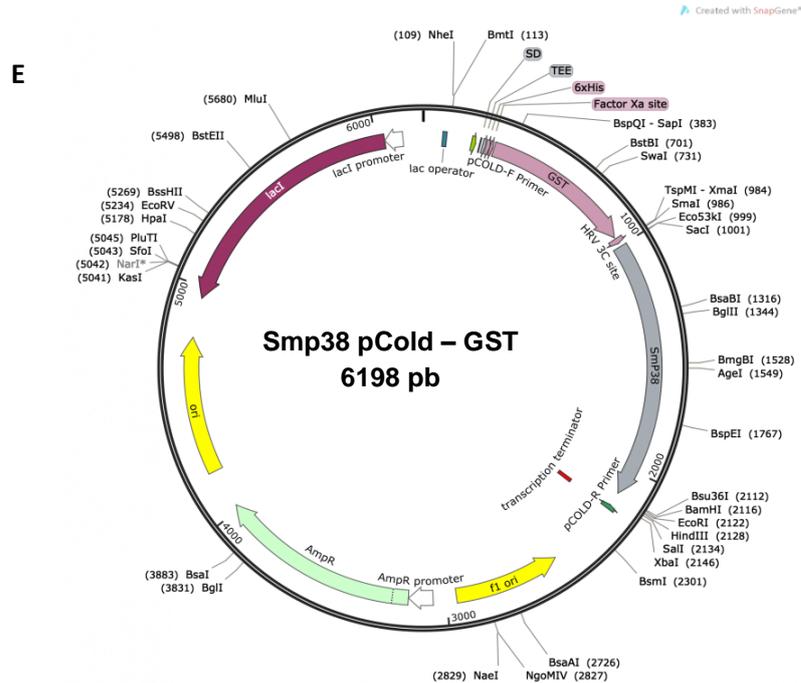
A



B







A: pCold-GST. B-C: As sequências de cada uma das PKs utilizadas neste estudo foram sintetizadas comercialmente no vetor de expressão pCold-GST que possuem resistência à ampicilina (verde) e tem como promotor *cspA* que é ativado pelo choque térmico (frio). Possui também a incorporação da glutationa S-transferase 26 (GST26) de *S. japonicum* como uma proteína de fusão solúvel em sua porção N-terminal (rosa), e apresentam tamanhos moleculares de: pCold-GST: 5097 pb; pCold-GST_SmERK1: 6228 pb; pCold-GST_SmERK2: 6111 pb; pCold-GST_SmJNK: 6219 pb, pCold-GST_Smp38: 6198 pb.

4.3.3. Extração plasmidial do vetor pCold-GST clonado com cada uma das sequências que codificam para as PKs SmERK1, SmERK2 e SmJNK por meio de lise alcalina (Miniprep)

Para extração do DNA plasmidial, os clones transformantes foram inoculados em 5 mL de meio LB (Sigma-Aldrich) adicionados de 100 µg/mL ampicilina (Sigma-Aldrich) e incubadas por 16 a 18 horas a 37°C, a 200 rpm. Os DNAs plasmidiais foram obtidos utilizando-se o kit QIAprep Miniprep (Qiagen) de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. As preparações de DNAs plasmidiais obtidas foram quantificadas por espectrofotometria no Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) e armazenadas a -20°C.

4.3.4. Sequenciamento das construções plasmidiais

As construções plasmidiais foram submetidas a uma reação de sequenciamento para verificarmos se a inserção das sequências no vetor de expressão foi correta.

O sequenciamento foi realizado pela companhia *Source BioScience* utilizando os iniciadores específicos para o vetor pCold-GST (Quadro 2).

Quadro 2: Iniciadores específicos utilizados no sequenciamento para verificação da inserção correta das sequências no vetor de expressão

INICIADOR	SEQUÊNCIA
pCold-GST senso	5'acgccatcgcgcgaaagg3'
pCold-GST anti-senso	5'acgcgatcgattattttctctg 3'

4.3.5. Expressão das PKs por indução com IPTG

A verificação da expressão das PKs foi feita inicialmente pela indução com 1 mM de isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (Thermo Fisher Scientific). Depois que foi confirmada a expressão das mesmas através de eletroforese, diferentes concentrações de IPTG também foram utilizadas (0,05 mM; 0,1mM; 0,5mM) para otimização do experimento. Para isso, os clones selecionados foram inoculados em tubos cônicos de 50 mL, contendo 3 mL de meio LB líquido adicionados de ampicilina (100 μ g/mL) (Sigma-Aldrich). As culturas foram incubadas a 37°C por 18 horas sob agitação a 200 rpm em agitador orbital. Após a incubação, 100 μ L de cultura das bactérias transformadas com cada um dos clones, foram inoculados em tubos cônicos de 50 mL, contendo 10 mL de meio LB líquido (Sigma-Aldrich) adicionado de ampicilina (100 μ g/mL) (Sigma-Aldrich) para a expressão em pequena escala. As culturas foram incubadas a 37°C por cerca de 2 horas sob agitação a 200 rpm em agitador orbital até atingirem a densidade óptica (DO₆₀₀) entre 0,4 e 0,6. Antes de induzir a expressão, foi retirado em um tubo controle, 1 mL da cultura que foi centrifugado por 5 minutos a 14000 rpm e o volume restante foi resfriado em banho de gelo por 30 minutos. A expressão de proteínas foi induzida através da adição de IPTG ao meio a 15°C por 16 a 18 horas. Posteriormente, 1 mL da cultura foi centrifugada por 5 minutos a 14000 rpm para análise da expressão. Após centrifugação, o *pellet* bacteriano foi dissolvido em 50-200 μ L de tampão de amostra 2X (60 mM Tris HCl; 10% glicerol, 2% SDS, 0.0025% azul de bromofenol; pH 6.8) e aquecido a 100°C por 5 minutos para análise em SDS-PAGE (*Long shelf life Mini-PROTEAN® TGX*). Os géis foram corados com *InstantBlue* (Expedeon) por 30 minutos e incubados em água destilada por cerca de 18 horas a 4°C.

Após a verificação da expressão das PKs, repetiu-se este processo, porém em larga escala, utilizando 1 L de meio LB (Sigma-Aldrich).

4.3.6. Lise bacteriana

Após a indução da expressão, as células foram centrifugadas por 15 minutos a 3200 rpm, ressuspensas com um tampão de ligação contendo PBS (Na_2HPO_4 10 mM; NaCl 140 mM) pH 7,4, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Lisozima e um comprimido a cada 50 mL do lisado do inibidor de protease *cOmplete Protease Inhibitor Tablets* (Roche Life Science) e incubadas a 37°C por 15 minutos sob agitação a 200 rpm. As amostras foram então congeladas em nitrogênio líquido e descongeladas a 37°C em banho maria por 3 vezes. Além disso, as amostras foram sonicadas em gelo com pulsos de 30 seg e descanso de 1 minuto por 5 vezes.

As amostras foram centrifugadas a 3200 rpm por 15 minutos e o pellet e o sobrenadante foram analisados em SDS-PAGE (*Mini-PROTEAN® TGX precast gels* – Bio-rad).

4.3.7. Purificação das PKs por cromatografia de afinidade

A purificação das PKs foi feita em condições nativas utilizando o equipamento AKTA (GE Healthcare). Após a lise bacteriana, as células foram centrifugadas por 1 hora, 3200 rpm a 4°C e o sobrenadante foi submetido a purificação por cromatografia de afinidade, utilizando uma resina de Glutathione Sefarose (GStrap HP) (GE Healthcare). Para isso, primeiramente a coluna foi equilibrada com cinco volumes da coluna de solução de ligação (Tris-HCl 50 mM, NaCl 0.15 M, pH 7.5) para que, posteriormente, a proteína pudesse ser adicionada. Depois que todo o lisado bacteriano contendo a proteína passou pela coluna, a mesma foi lavada com a solução de ligação até que a absorbância atingisse uma constante basal (geralmente 10 a 15 volumes da coluna). Em seguida, as proteínas foram eluídas com 20 volumes da coluna de solução de eluição (Tris/HCl 50 mM; Glutathione reduzida 20 mM; DTT 1 mM) fracionadamente (20 tubos de 1,5 mL). A solução contendo as proteínas que não ligaram na coluna, assim como as lavagens foram coletadas para análise em SDS-PAGE. A coluna contendo uma resina de níquel, HisTrap HP (GE Healthcare), também foi utilizada na tentativa de otimizar a purificação. Para isso, primeiramente a coluna foi equilibrada com cinco volumes da coluna com a solução de ligação (NaH_2PO_4 20 mM; NaCl 0.5 M; imidazol 5 mM, pH 7.4) e em seguida a solução contendo as proteínas de interesse passaram por ela. Posteriormente foi realizada a lavagem com a solução de ligação, como descrito acima, e logo depois a eluição foi feita com 20 volumes de uma solução contendo NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 0.5 M e 0.5 M imidazole, pH 7.4 fracionadamente (20 tubos de 1,5 mL). As mesmas amostras citadas acima foram retiradas para análise em SDS-PAGE.

4.3.8. Dessanilização das PKs purificadas

Para a dosagem das proteínas utilizando o BCA – *Protein assay kit* (Pierce), foi necessário a realização da dessanilização das mesmas, já que a solução de 20 mM de glutatona estava interferindo no ensaio. Primeiramente, as proteínas foram concentradas por centrifugação a 4000 g, a 4°C por 20 minutos utilizando o *Amicon ULtra centrifugal filter* (Merck Millipore) de 10 KDa. A solução que ficou retida no filtro foi coletada e submetida a dessanilização utilizando o *Disposable PD 10 Desalting Columns* (GE Healthcare). Depois que 2,5 mL da proteína foi adicionada a coluna de dessanilização, esperou-se que ela descesse toda por gravidade. Em seguida, foram feitas três lavagens com PBS que foram coletadas em tubos separados, e a quarta lavagem seria a proteína de interesse dessalinizada.

4.3.9. Dosagem de proteínas por BCA

Para dosagem das proteínas purificadas foi utilizado o BCA – *Protein assay kit* (Pierce, Thermo Fisher Scientific), que detecta de 20 a 2000 µg/mL de proteína, seguindo as instruções do fabricante. Foram utilizados 25 µL de cada amostra a ser testada e a leitura foi feita a 562 nm utilizando um leitor de placas Spark (TECAN). As concentrações das amostras foram obtidas com base na curva padrão de albumina bovina (BSA).

4.3.10. Clivagem da proteína de fusão GST das proteínas quinases purificadas

Para clivagem da proteína de fusão GST das proteínas quinase, foi utilizado o kit Pierce HCV 3C protease (Pierce). A HCV 3C protease é uma protease proveniente do *rhinovirus* humano 3C que cliva substratos protéicos através do reconhecimento da sequência de aminoácidos Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln-Gli-Pro entre os resíduos Gln e Gly. A clivagem foi realizada utilizando 200 µg de proteína e 2 unidades da enzima HCV 3C. Para realização deste ensaio foi utilizado o protocolo em que a clivagem é realizada na própria coluna seguindo as instruções do fabricante.

4.4. Padronização de um ensaio para análise da atividade das proteínas quinases e triagem de drogas

A fim de desenvolver um teste para triagem de drogas que se liguem ao sítio de ligação ao ATP e, portanto, inibam as PKs através de um método abrangente à várias proteínas quinase e que seja financeiramente acessível, foi desenvolvido um ensaio para análise de atividade (MOREIRA; ARMSTRONG; BATISTA; CLEMENTE TAVARES *et*

al., 2020). A funcionalidade do ensaio consiste na avaliação da capacidade de ligação de uma sonda análoga ao ATP, BODIPY® FL ATP- γ -S (Sigma-Aldrich), conjugada à fluoresceína ao sítio catalítico das PKs. O ensaio baseia-se na medição da polarização da fluorescência causada pela presença dessa sonda. Esta parte foi feita com o auxílio e contribuições da Dra. Naiara Clemente, do Dr. Bernardo Moreira, do Dr. Tom Armstrong e do Dr. Luddowik Dekker.

4.4.1. Análise da capacidade da sonda BODIPY™ FL ATP- γ -S se ligar a proteína quinase A comercial *in silico*

Primeiramente, para padronização do ensaio para verificar a capacidade da sonda em se ligar a uma PK, foi utilizada a proteína quinase A comercial (PKA) (Sigma-Aldrich), conhecida também como proteína quinase dependente de cAMP.

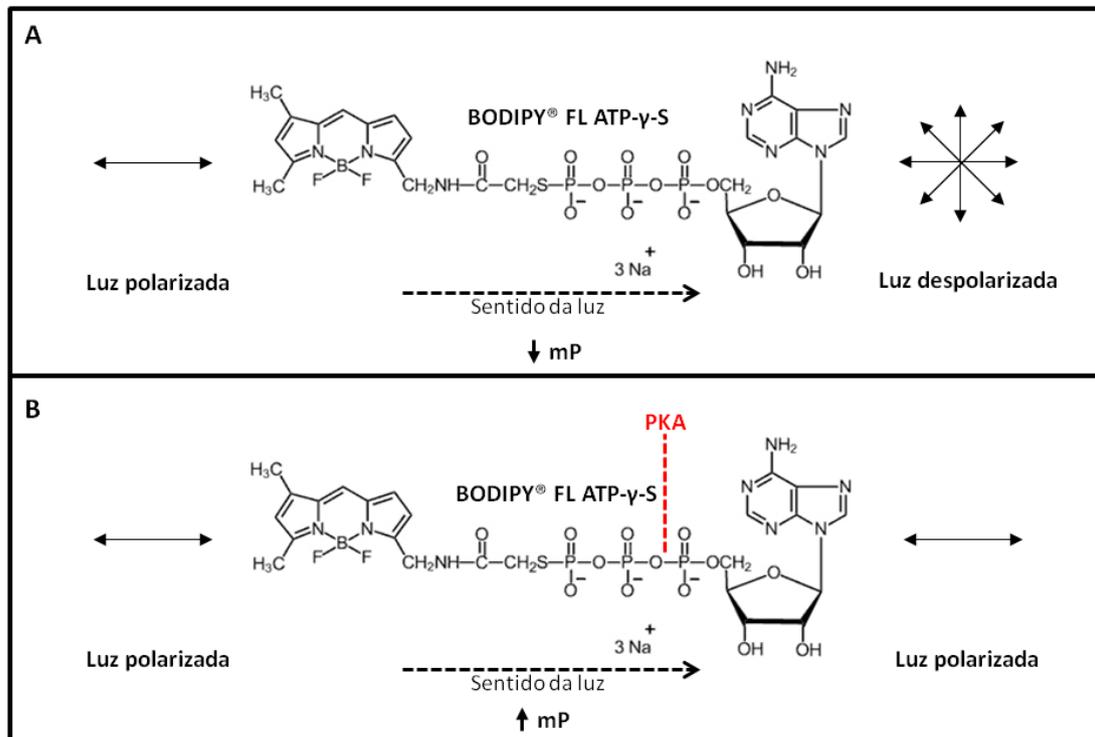
Assim, foi realizado um “*docking*” para a verificação da ligação *in silico* do ATP e da sonda BODIPY® FL ATP- γ -S (Sigma-Aldrich) na PKA (Sigma-Aldrich) pelo Dr. Bernardo Moreira e pelo Dr. Tom Armstrong. Para isso, a estrutura 4WB5 (PKA ligada ao ATP) disponível no *Protein Data Bank* (PDB) (<https://www.rcsb.org/>), foi submetida a análises pelo software MAESTRO (<https://www.schrodinger.com/maestro>) para predição do sítio de ligação do ATP na PKA. A estrutura foi submetida à otimização de pontes de hidrogênio e minimização energética usando força de campo OPLS3 e o docking foi realizado através da plataforma *Genetic Optimization for Ligand Docking* (GOLD) do *Cambridge Crystallographic Data Centre* (CCDC) (JONES *et al.*, 1997).

4.4.2. Análise da polarização da fluorescência da sonda BODIPY™ FL ATP- γ -S.

Para otimizar a concentração da sonda a ser usada no ensaio, o primeiro passo realizado foi definir em qual concentração ela seria capaz de mudar o sentido da luz polarizada. Para isso foi feita uma diluição seriada da sonda (concentração inicial 5 mM) em PBS 1X + 2 mM de MgCl₂ que variou entre 10⁻⁷ a 10⁻¹³ M. Utilizou-se também o detergente Tween 20 (Merck) na concentração 0,01% e 0,05% também diluído em PBS 1X + 2mM de MgCl₂ para observarmos se haveria alguma interferência na polarização da luz, já que ele seria utilizado em experimentos posteriores a fim de analisarmos a especificidade da ligação desta sonda. Todos estes experimentos foram realizados em placas pretas de 384 poços com proteção da luz e volume final de 50 μ L. As placas foram lidas no equipamento *Wallac*

Envision 2104 Multilabel (PerkinElmer) utilizando filtros de 480 nm de excitação e 535 nm de emissão.

Figura 8 - Funcionamento da sonda BODIPY™ FL ATP-γ-S como ligante de PKs.



A: Quando a luz polarizada passa pela sonda BODIPY livre, a sonda despoliariza a luz, gerando assim um baixo sinal de polarização da fluorescência (mP). B: Quando a luz polarizada passa pela sonda que está ligada a proteína quinase, a luz permanece polarizada, gerando assim um alto sinal de mP.

Como o ensaio se baseia na medição da polarização da fluorescência causada pela BODIPY, tanto na ausência como na presença de pequenas quantidades de sonda, a luz permanece polarizada quando passa pela amostra, o que é detectado como um alto valor de polarização da fluorescência (mP). Por outro lado, em altas concentrações de sonda livre na amostra, a luz que passa pela amostra se espalha, ou seja, se torna despoliarizada, o que retorna valores de mP baixos. Sendo assim, quando a sonda é capaz de se ligar a PKA, consequentemente terá uma baixa quantidade de sonda livre, gerando assim um alto mP devido a repolarização da luz (Figura 8).

Para realização dos testes utilizando a PKA, foi adicionado 150 µL de água *nuclease free* na PKA liofilizada contendo 400 U, a partir daí foram feitas diferentes diluições em água *nuclease free* para se obter 0; 1; 5; 10 U e, assim, determinar qual seria a melhor concentração para trabalharmos. Em placas de 384 poços foram adicionadas PBS 1x + 2 mM de MgCl₂, a

sonda na concentração de 5×10^{-9} e a PKA nas diferentes concentrações, incubadas por aproximadamente 30 minutos e posteriormente lidas no leitor de placas citado acima.

4.4.3. Análise da ligação da BODIPY™ FL ATP- γ -S e do inibidor H7 à PKA

Para avaliação da afinidade da BODIPY™ FL ATP- γ -S pelo sítio catalítico da PKA, foi realizada uma competição da ligação da sonda BODIPY™ FL ATP- γ -S e de um conhecido inibidor específico de PKs, o H7. Para isso, 5 U da PKA foram incubadas com a sonda na concentração de 5×10^{-9} e com diferentes concentrações do inibidor H7 (1×10^{-2} a 1×10^{-6}) diluídos em PBS 1X + 2 mM de $MgCl_2$ + 0,01% de *Tween* 20 (Merck).

No teste de competição, a placa foi incubada por 2 horas e, então, foi lida no equipamento citado anteriormente.

4.4.4. Análise da ligação da sonda BODIPY™ FL ATP- γ -S à SmJNK recombinante

Para avaliarmos a capacidade desta sonda se ligar à PKs expressas em sistemas heterólogos e detectar sua atividade, a proteína SmJNK recombinante em fusão com GST e livre dele foram utilizadas. Para isso, a sonda na concentração de 5×10^{-9} foi incubada com a SmJNK (com GST e clivadas) nas concentrações de 0,01 μ g, 0,05 μ g e 0,1 μ g, diluídas em PBS 1X + 2 mM de $MgCl_2$ + 0,01% de *Tween* 20 (Merck). A placa foi incubada por 2 horas e, então, foi lida no equipamento citado anteriormente.

4.4.5. Análise de “docking” da PKA contra compostos disponíveis na Managed Chemical Compound Collection (MCCC)

Para a realização da triagem *in silico* de moléculas pertencentes à biblioteca MCCC (Universidade de Nottingham) que sejam capazes de se ligar à PKs utilizando como modelo a proteína comercial PKA, esta foi submetida ao software MAESTRO com posterior otimização de pontes de hidrogênio, como explicado no item 4.4.1. As estruturas resultantes foram salvas em formato PDB para posterior uso na triagem *in silico* com 10.000 moléculas pertencentes à biblioteca de compostos MCCC da Universidade de Nottingham utilizando a plataforma GOLD. Um arquivo SDF contendo todos os ligantes disponíveis nesta biblioteca foram preparados usando a ferramenta LigPrep na plataforma MAESTRO. Os vários estados de protonação para cada molécula foram calculados na faixa de pH $7,0 \pm 2,0$ e as estruturas

resultantes foram salvas em arquivo SDF para posterior uso. Para as análises posteriores de “*docking*”, nós utilizamos a função ChemPLP. O resultado desta análise é uma lista com o “*score*” para a ligação de cada molécula com a PKA. Quanto maior a afinidade da molécula pelo sítio de ligação ao ATP da proteína alvo, maior o “*score*”.

As doze moléculas que apresentaram maior *score*, assim como 5 que apresentaram *score* negativo (controle negativo) foram selecionadas para realização de testes. Todas elas foram diluídas em DMSO e utilizadas na concentração final de 10 µM. Para realização deste teste, 5 U da PKA foram incubadas com a sonda BODIPY na concentração 5×10^{-9} de cada uma das moléculas. A leitura da placa foi realizada como descrito no item 4.4.2.

4.5. Triagem de moléculas preditas como inibidoras de PKs

4.5.1. “*Docking*” molecular das PKs SmERK1, SmERK2, Smp38 e SmJNK e priorização de moléculas da MCCC

O “*docking*” molecular, desenvolvido pelo Dr. Tom Armstrong, foi realizado como explicado no item 4.4.5 para cada uma das PKs incluídas no trabalho, SmERK-1, SmERK-2, Smp38 e SmJNK. A triagem *in silico* foi feita contra todas as moléculas da biblioteca MCCC (84.665 compostos) para cada uma das PKs de Schistosoma e o ortólogo de humano correspondente.

Posteriormente, foi feita a priorização das moléculas pelo Dr. Bernardo Mereira, utilizando três análises diferentes:

- 1- “*Best hits overall*”: seleção direta dos melhores scores/moléculas obtidos na triagem contra as PKs de Schistosoma, mesmo que também tivesse alta afinidade pelas enzimas humanas;
- 2- “*Best hits Schistosoma-specific*”: seleção das melhores moléculas que apresentaram a maior diferença entre os scores Schistosoma/humano obtidos na triagem;
- 3- “*Best hits Pan kinases Schistosoma-specific*”: seleção das melhores moléculas que apresentaram maior especificidade para as quatro PKs (SmERK1, SmERK2, SmJNK e Smp38) ao mesmo tempo. Estas também foram selecionados de acordo com a melhor diferença entre os scores para as quinases de Schistosoma e a de humano correspondente.

Ao final destas três análises, foram escolhidas um total de 140 moléculas de interesse que foram selecionados para a triagem *in vitro*. Elas foram adquiridas na biblioteca de compostos MCCC diluídas para a concentração estoque de 5 mM em dimetilsulfóxido 100%

(DMSO) (Sigma-Aldrich) de modo que a concentração final de DMSO a ser adicionada na cultura não fosse superior a 1%.

4.5.2. Material biológico – Parasitos

Para realização dos experimentos *in vitro* e *in vivo*, foram utilizadas cercárias da cepa LE, gentilmente cedidas pelo moluscário Lobato Paraense, do Instituto René Rachou (IRR-FIOCRUZ/MG). O ciclo do parasito é mantido rotineiramente pelo moluscário do IRR-FIOCRUZ/MG, por passagens em *Biomphalaria glabrata*, seguido de camundongo ou hamsters e retornando a *B. glabrata*. Os esquistossômulos foram obtidos por transformação mecânica dessas cercárias (MILLIGAN; JOLLY, 2011).

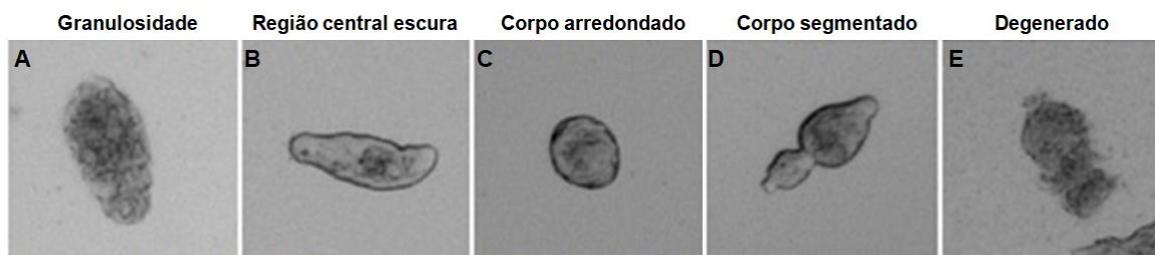
Para obtenção de vermes adultos e esporocistos de *S. mansoni*, hamsters da linhagem Golden (*Mesocricetus auratus*) de seis semanas de idade foram infectados por via subcutânea com 400 cercárias cada. Quarenta e dois dias após a infecção, os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina (10 mg / kg) (Syntec) e cloridrato de cetamina (150 mg/kg) (Syntec), seguidos de eutanásia por overdose com tiopental de sódio a 2,5% (150 mg/kg) (Cristália). Em seguida, foi realizada perfusão (PELLEGRINO; SIQUEIRA, 1956) para recuperação de vermes adultos. Seus fígados foram usados para recuperar os ovos do parasito e induzir a eclosão do miracídio. A transformação de miracídios em esporocistos ocorreu *in vitro* cultivando os miracídios em CBSS+, (NaCl 47,9 mM, KCl 2 mM, Na₂HPO₄ 0,5 mM, MgSO₄ 1,8 mM, CaCl₂ 3,6 mM e NaHCO₃ 0,6 mM), suplementado com 1 g/L de glicose (Vetec) e trealose (Vetec) e contendo 1% de penicilina/streptomicina (Gibco) (MOURÃO *et al.*, 2009). Os experimentos utilizando hamsters foram revisados e aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (licença número LW-12/16).

Os vermes adultos recuperados foram lavados quatro vezes com o Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Gibco) contendo 2% penicilina/estreptomicina (Gibco). Machos e fêmeas foram separados e incubados por uma hora em uma estufa a 37°C, com 5% de CO₂ e 95% de umidade. Depois, machos e fêmeas foram lavados dentro de uma capela de fluxo laminar e mantidos em placas contendo RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 2% penicilina/estreptomicina (Gibco) e 5% de soro fetal bovino inativado (Gibco). Os parasitos foram incubados em uma estufa a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade.

4.5.2.1. Teste das moléculas em esquistossômulos e vermes adultos *in vitro*

Para a realização do teste das moléculas *in vitro*, cem esquistossômulos/poço foram transferidos para uma placa de 96 poços com 100 µL de meio MEM suplementado com 0,1% de glicose (Gibco, Thermo Fisher Scientific); 0,1% de lactalbumina (Sigma-Aldrich); 20 mM de HEPES (Sigma-Aldrich); 0,5% de MEM vitamina (Gibco, Thermo Fisher Scientific); 5% de meio Schneider (Gibco, Thermo Fisher Scientific); 0,5 µM de hipoxantina (Sigma-Aldrich), 1 µM de hidrocortisona (Sigma-Aldrich), 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco, Thermo Fisher Scientific) e 2% de soro fetal bovino (Gibco, Thermo Fisher Scientific). Esses parasitos foram mantidos por 24h em uma estufa a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade. No dia seguinte da transformação, foram adicionados 20 µM de cada uma das moléculas nos poços contendo os esquistossômulos. Como controle, foi utilizado apenas DMSO a 0,4% (mesma quantidade adicionada para diluição dos compostos). Após 24 e 72 horas da adição dessas moléculas às culturas de esquistossômulos, o fenótipo dos parasitos foi analisado em um microscópio invertido (Axiostar Plus, Zeiss) e os seguintes parâmetros de viabilidade foram avaliados: granulosidade, região central escura, corpo arredondado, corpo arredondado e degeneração (Figura 9). Foi atribuída uma pontuação a cada poço de acordo com o número de parasitos que exibiram alguma diversificação no fenótipo: 0 - quando nenhum parasito apresentou alteração fenotípica, 1 - quando menos de 50% dos parasitos apresentaram alteração, 2 - quando aproximadamente 50% dos esquistossômulos exibiram o fenótipo e 3 - quando mais de 50% dos parasitos apresentaram alteração (RESSURREIÇÃO *et al.*, 2016).

Figura 9 - Alterações fenotípicas em esquistossômulos expostos às moléculas preditas como inibidoras de PKs.



Imagens representando os parâmetros de viabilidade avaliados em esquistossômulos expostos às moléculas específicas para as PKs, sendo eles: (A) granulosidade, (B) região central escura, (C) corpo arredondado, (D) corpo segmentado, (E) degenerado.

Após 24 e 72 horas de exposição às moléculas, imagens das culturas de esquistossômulos foram obtidas com ampliação de 5X no microscópio invertido Axiostar Plus (Zeiss) para posterior análise de alteração de suas áreas, que foi avaliada usando o *software ImageJ* (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012). Além disso, para análise da

mortalidade, após 24 e 72 horas, os esquistossômulos foram corados com 5 mg/mL de iodeto de propídio (Sigma-Aldrich) e analisado ao microscópio invertido *Eclipse Ti-E* (Nikon) com ampliação de 10X e comprimento de onda de 544 nm.

Após a análise dos resultados utilizando as moléculas na concentração de 20 μ M, aquelas que foram ativas foram avaliadas novamente, como descrito acima, utilizando uma concentração de 10 μ M.

Para avaliar os efeitos dessas moléculas nos vermes adultos, oito machos e oito fêmeas foram mantidos em placas de 24 poços contendo 1 mL de RPMI 1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific) suplementado com 2% penicilina/estreptomicina (Gibco, Thermo Fisher Scientific) e 5% de soro fetal bovino inativado (Gibco, Thermo Fisher Scientific). Os parasitos foram incubados em uma estufa a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade. O movimento dos machos e fêmeas foram registradas por um minuto e 30 segundos, diariamente, por dez dias, utilizando o software WormAssay (MARCELLINO *et al.*, 2012).

Diagramas de Venn mostrando o número de moléculas ativos em cada estágio do parasito foi gerado usando o pacote VennDiagram (v.1.6.20) no software estatístico R (v. 3.3.2).

4.6. Validação de alvos moleculares

4.6.1. Verificação dos genes regulados por vias de sinalização de SmJNK e Smp38

Genes pertencentes a importantes funções para a sobrevivência do parasito foram identificados como sendo regulados pelas vias SmJNK e/ou Smp38. Assim, após triarmos as moléculas *in vitro*, duas ativas, uma específica para SmJNK e outra específica para Smp38, foram selecionadas para verificar experimentalmente que o gene *SmHGPRTase 1* é regulado pela via de Smp38 e que o gene *SmPAI-RBP1* é regulado tanto pela via de Smp38 quanto pela via de SmJNK, como já descrito anteriormente (GAVA *et al.*, 2019). Para isso, em uma placa de 12 poços foram adicionados 5.000 esquistossômulos em 1 mL de meio MEM suplementado e 10 μ M de cada uma dessas moléculas. Como controle foi utilizado 0,2% de DMSO, mesma quantidade dos parasitos expostos aos inibidores.

Os parasitos foram incubados por 30 horas a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade. Depois desse período de incubação, foi feita avaliação fenotípica em microscópio invertido (*Axiostar Plus*, Zeiss) para verificar alterações morfológicas. A avaliação da viabilidade foi realizada pela adição de 5 μ g/mL de iodeto de propídio como já descrito anteriormente.

4.6.2. Desenho de iniciadores específicos para amplificação dos alvos moleculares utilizados neste estudo

Para validação das proteínas SmPAI-RBP1 e SmHGPRases- 1, 2, 3, 4 e 5 como alvos moleculares, foram desenhados iniciadores específicos para diferentes etapas deste estudo com base nas sequências preditas dos genes de interesse que estão depositadas na versão 7 no banco de dados SchistoDB (<http://schistodb.net/schisto/>). Utilizando o programa *Primer 3* (<http://primer3.sourceforge.net>) foram desenhados iniciadores que amplificam fragmentos de 250 a 578 pb para síntese de dsRNA. Aoiniciadores foram adicionadas na extremidade 5' caudas com a sequência do promotor T7 RNA polimerase-específico (TAATACGACTCACTATAGGG) para posterior síntese de dsRNA. Adicionalmente, foram amplificados por PCR fragmentos do gene GFPclonado no vetor pCRII-GFP,o mesmo foi utilizado como controle inespecífico.

Iniciadores que amplificam de 94-122 pb também foram desenhados para realização de RT-qPCR para análise dos níveis de transcritos após silenciamento gênico. A subunidade 1 do gene da citocromo oxidase (SmCOXI, Smp_900000), a proteína relacionada a actina 10 (SmArp10, Smp_093230) e aoxidoreductase dependente de FAD (SmFAD, Smp_089880) de *S. mansoni* foram utilizadas como controle endógeno constitutivo (ANDRADE *et al.*, 2014). O programa Oligo Analyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>), foi utilizado para verificar a possível formação de dímeros, heterodímeros, grampos, estruturas secundárias e para evitar a baixa especificidade de ligação à extremidade 3'. Todos os iniciadores utilizados neste estudo, estão representados no Quadro 3.

Quadro 3 - Iniciadores específicos para proteínas utilizadas neste estudo para realização da síntese de dsRNA e RT-qPCR e tamanho do fragmento amplificado (em letras minúsculas estão as sequências do promotor de T7 e em letras maiúsculas as sequências dos iniciadores específicas para cada gene).

Alvo	Gene ID	Forward	Reverse	Tamanho do fragmento amplificado
Iniciadores para dsRNA				
SmHGPRTase	Sm_103560	taatacgactcactatagggAATGTCCGT TGAGTTTGTTCCG	taatacgactcactatagggTTCATTAAT CACGCAAATATGG	349 pb
	Sm_148820/ Smp_312580/ Smp_332640	taatacgactcactatagggGAGGCTTCA AATTCGCTTCC	taatacgactcactatagggAACTTGTGC CAGTGCAACC	250 pb
	Sm_168500	taatacgactcactatagggGCCTTCATA CAGGAAGAATTTTG	taatacgactcactatagggATTGAGGTT CATGCCCTACG	358 pb
SmPAI-RBP1	Sm_009310	taatacgactcactatagggCGTCAGGGT CCAAGACAATATG	taatacgactcactatagggCCTCTTCC GTCACTCCTTATCT	578 pb
Iniciadores para qPCR				
SmHGPRTase	Sm_103560	TGTGTCCTCAAAGGTGGATTTA	CGGACATTGGTAGGACGATAC	94 pb
	Sm_148820/ Smp_312580/ Smp_332640	TGATGATAGTTATGAAGGATATT CAGC	TATCCAAACGACTCCGAACC	113 pb
	Sm_168500	AGGCGGGTTCAAGTTTGC	CCAAACTCACCTCGTATGTGC	122 pb
SmPAI-RBP1	Sm_009310	TAGCTCCGACAGAAGCACCT	ACGACCTCGACCAAACATTC	119 pb
Iniciadores para dsRNA do controle inespecífico				
GFP	pCRII-GFP	taatacgactcactatagggTCTTCAAGT CCGCCATG	taatacgactcactatagggTGCTCAGG TAGTGGTTGTC	360 pb
Iniciadores para os normalizadores endógenos				
SmCOXI	Smp_900000	TACGGTTGGTGGTGTACAG	ACGGCCATCACCATACTAGC	152 pb
SmArp10	Smp_093230	GAAGGCTTGAAGGATTCTG	CAACTGCCAACTCTCGGATA	137 pb
SmFAD	Smp_089880	TACGGTTTCTCTTCCAACC	CATGGACCTGCTGCATTTAC	72 pb

4.6.3. Amplificação, clonagem e sequenciamento dos transcritos que codificam para as proteínas SmPAI-RBP1 e SmHGPRTases e para o gene inespecífico GFP

As amplificações dos fragmentos dos transcritos dos genes de interesse *SmPAI-RBP1*, *SmHGPRTases- 1, 2, 3, 4, 5* e GFP (controle inespecífico) foram feitas por PCR utilizando os iniciadores descritos no Quadro 2. Para isso foi utilizado o kit *Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity* (Invitrogen) em um volume final de 10 µL. Foram adicionados em tubos de 0,2 µL: 0,5 µL de *10X PCR Buffer*, 0,2 µL de MgSO₄ (50mM), 0,5 µL de DNTp à 10mM, 0,2 µL de *Taq DNA Polymerase High Fidelity* (5U/µL), 1 µL de cada iniciador (senso e anti-senso, à 10 µM) e 1 µL de cDNA de esquistossômulos (sntetizado conforme descrito no tópico 4.6.5.6). A ciclagem utilizada para a amplificação foi: 94°C por 2 minutos para desnaturação inicial e depois 40 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação das fitas de DNA); 58°C por 30 segundos (anelamento dos iniciadores); 72°C (polimerização pela *Taq DNA Polymerase High Fidelity*). A finalização da reação foi feita a 72°C por 10 minutos para extensão final.

Após amplificação, os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose não desnaturante 1% para análise de especificidade por visualização do tamanho das bandas em transiluminador *Benchtop UV Transilluminator* (Analytikjena). Para síntese dos dsRNAs, após a eletroforese, os fragmentos de interesse foram excisados do gel e purificados utilizando o kit *QIAquick Gel Extraction* (QIAGEN) segundo orientações do fabricante. Sendo assim, as bandas correspondentes aos fragmentos de interesse foram extraídas do gel, foram acrescentados 3 volumes do *Buffer QG* a cada fragmento, e esses foram incubados a 56°C até completa dissolução. Em seguida, foi adicionado 1 volume de isopropanol 100% e as amostras foram transferidas para colunas do kit, que foram centrifugadas a 13.000 rpm por 1 minuto. Foram adicionados 500 µL de *Buffer QG* e as amostras foram centrifugadas por 1 minuto a 13.000 rpm. Em seguida foram acrescentados 750 µL de *Buffer PE para a lavagem* e as amostras foram centrifugadas por 1 minuto a 13.000 rpm. O eluato foi descartado e as amostras centrifugadas por mais 1 minuto a 13.000 rpm para secagem das colunas. As colunas foram transferidas para novos tubos de 1,5 mL e o DNA eluído utilizando 30 µL de água. Os produtos de PCR purificados obtidos foram quantificados utilizando o *NanoDrop 2000 Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific).

Para confirmarmos as sequências que foram amplificadas, foi realizada uma reação de sequenciamento na plataforma de sequenciamento do Instituto René Rachou em sistema ABI 3730 (Applied Biosystems), segundo orientações do fabricante.

Depois que essas sequências foram confirmadas, foi realizada a clonagem dos fragmentos de interesse no vetor pGEM-T easy vector (Promega). Para isso, foi feita uma reação de ligação para o volume final de 10 µL contendo 50 ng do vetor pGEM e o produto da PCR na proporção vetor:inserto de 1:3, adicionados da enzima T4 ligase e do *2X Rapid Ligation Buffer* de acordo com as instruções do fabricante da enzima. A reação foi incubada a 4°C por cerca de 16 horas. A transformação foi realizada em bactérias DH5α seguindo o protocolo descrito no item 4.2.2.

4.6.4. Síntese de dsRNA

Os dsRNAs foram sintetizados utilizando o kit *T7 RiboMAX Express RNAi Systems* (Promega). Seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, em um microtubo de 1,5 mL foram adicionados 10 µL do *RiboMAX Express T7 2X Buffer*, 2 ul de *Enzyme Mix T7 Express* e 8 ul de produto de PCR purificado na concentração de 80 - 100 ng/µL. Essa reação foi incubada a 37°C por cerca de 16 horas. No dia seguinte, foi realizado o anelamento das

fitas de RNA para o aumento do rendimento do dsRNA para os genes *SmPAI-RBP1*, *SmHGPRtase 1*, *2/4/5* e *3*. Isso foi realizado incubando a reação por 10 minutos a 70°C e resfriando-a lentamente. Para GFP, seguimos diretamente para a etapa seguinte, que é a degradação dos moldes de DNA. Para isso, foi adicionado 1 µL de *RQ1 RNase-Free DNase* e as amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos. Os dsRNAs foram precipitados através da adição de 0,1 volumes de acetato de sódio 3 M e 2,5 volumes de etanol 95% gelado. As amostras foram incubadas por 10 minutos no gelo e centrifugadas a 13.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e sob o pellet foram acrescentados 500 µL de etanol 70% gelado para a lavagem dos precipitados. Após a secagem completa dos precipitados, foram adicionados 45 µL de água livre de nucleases para ressuspensão dos dsRNAs. Posteriormente, as amostras foram quantificadas utilizando o *NanoDrop 2000 Spectrophotometer* (*Thermo Fisher Scientific*) e a integridade analisada em gel agarose 1% não desnaturante.

4.6.5. Exposição dos parasitos aos dsRNAs *in vitro*

4.6.5.1. Exposição dos esporocistos aos dsRNAs

Os dsRNAs sintetizados: *SmHGPRtase 1*-dsRNA, *SmHGPRtase 2/4/5*-dsRNA, *SmHGPRtase 3*-dsRNA, *SmPAI-RBP1*-dsRNA e GFP-dsRNA foram adicionados, na concentração de 50 nM, em culturas contendo aproximadamente 15.000 parasitos e 3 mL de CBSS+ por poço. Foi incluído também um grupo denominado “combinado” para a combinação dos três dsRNAs direcionados às cinco *SmHGPRtases*. Para este grupo foi adicionado 150 nM de dsRNA (50 nM de cada dsRNA), assim como para o grupo controle inespecífico. O controle não tratado continha apenas meio e parasitos.

As culturas foram observadas diariamente por microscopia de inversão (*Axiostar Plus*, *Zeiss*) para verificação de mudanças fenotípicas. Imagens dos parasitos foram registradas utilizando o software *Axion Vision REL 4* (*Zeiss*) durante todos os dias de cultura. Essas imagens foram utilizadas para medir as áreas dos esporocistos tratados e não tratados com dsRNA utilizando o software *ImageJ* para avaliar se este tratamento interferia no desenvolvimento dos mesmos.

Além disso, uma alíquota com 100 esporocistos era retirada diariamente para verificação da viabilidade dos mesmos. Isso era feito através da utilização de iodeto de propídio na concentração final de (5 µL/mL). A extração de RNA dos esporocistos também

foi realizada diariamente. Os experimentos foram realizados em três réplicas biológicas independentes.

4.6.5.2. Exposição dos esquistossômulos aos dsRNAs

Para esquistossômulos, a concentração dos dsRNAs sintetizados (SmHGPRase 1-dsRNA, SmHGPRase 2/4/5-dsRNA, SmHGPRase 3-dsRNA, SmPAI-RBP1-dsRNA e GFP-dsRNA) foi de 100 nM. Esses dsRNAs foram adicionados em culturas contendo aproximadamente 40.000 parasitos e 5 mL de meio MEM suplementado. Para o grupo combinado foi adicionado 200 nM de dsRNA (aproximadamente 70 nM de cada dsRNA), assim como para o grupo do controle inespecífico. Em cada uma das placas os tratamentos foram realizados em duplicata e foi mantido por 7 dias.

Como descrito para esporocistos, as culturas também foram observadas diariamente por microscopia e as imagens registradas para análise da área dos parasitos. A viabilidade dos esquistossômulos também foi avaliada através da adição de iodeto de propídio. A extração de RNA dos esquistossômulos também foi realizada diariamente. Os experimentos foram realizados em três réplicas biológicas independentes.

4.6.5.3. Extração e tratamento do RNA dos esporocistos e esquistossômulos expostos aos dsRNAs

A extração de RNA foi feita diariamente utilizando o *TRIzol Reagent* (Thermo Fisher Scientific). Para isso, cerca de 4.000 esquistossômulos foram retirados da cultura, transferidos para um microtubo de 1,5 mL e centrifugados a 1.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e 50 µL de TRIzol foram adicionados aos parasitos. Esses parasitos foram macerados com o auxílio de um pistilo por 3 minutos. Posteriormente, foram adicionados 450 µL de TRIzol seguido de uma incubação por 5 minutos a temperatura ambiente. Acrescentou-se 100 µL de clorofórmio e as amostras foram agitadas vigorosamente por 15 segundos e, logo em seguida, foram mantidas à temperatura ambiente por 3 minutos. As amostras foram então centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos a 4°C e a fase aquosa transferida para um novo tubo. Foram adicionados 250 µL de isopropanol 100% e as amostras incubadas a -20°C por cerca de 16 horas. Após incubação, os tubos foram centrifugados a 12.000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. No precipitado, foram adicionados 500 µL de etanol 75% gelado e novamente as amostras foram centrifugadas a 7.500 g a 4°C por 5 minutos. O

sobrenadante foi descartado e os tubos ficaram abertos até que o precipitado estivesse completamente seco para posterior ressuspensão em 20 μ L de água livre de nucleases.

Logo após a extração dos RNAs, eles foram submetidos ao tratamento com DNase para a remoção de possíveis contaminações de DNA genômico. O kit *Turbo DNase* (Ambion) foi utilizado seguindo as instruções sugeridas pelo fabricante. Assim, foram adicionados às amostras 0,1 volume do tampão *10X TURBO DNase Buffer* e 1 μ L da enzima *TURBO DNase*. As amostras foram incubadas à 37°C por 30 minutos. Depois da incubação, mais 1 μ L da enzima foi adicionada a reação, que foi incubada novamente a 37°C por 30 minutos. Foram adicionados 0,2 volumes do tampão *DNase Inactivation Reagent* e as amostras foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 15 minutos e o RNA transferido para um novo tubo. Os RNAs foram quantificados utilizando o kit *Qubit RNA HS Assay* (Invitrogen) no equipamento *Qubit 2.0 Fluorometer* (Invitrogen) e posteriormente armazenados a -70°C.

4.6.5.4. Exposição de vermes adultos aos dsRNAs

A exposição dos vermes adultos aos dsRNAs de SmHGPRtase 1, SmHGPRtase 2/4/5, SmHGPRtase 3, SmPAI-RBP1 e GFP, foi realizada por eletroporação. Para isso, oito vermes adultos machos e oito fêmeas foram, separadamente, colocados em cubetas de 4 mm em 100 μ L de meio RPMI sem suplementação e sem HEPES contendo 25 μ g de cada dsRNA. No caso do grupo combinado, foi adicionado cerca de 9 μ g de cada dsRNA (25 μ g no total). Como controle negativo, foram utilizados vermes adultos eletroporados sem adição de dsRNA. Cada um dos grupos foram eletroporados no equipamento *Gene Pulser Xcell* (BIORAD) a 125 V por 20 milissegundos (NDEGWA; KRAUTZ-PETERSON; SKELLY, 2007). Os vermes adultos foram retirados das cubetas através da adição de 1 mL de meio RPMI suplementado e foram cultivados em placa de seis poços (KASV) com 3 mL de meio para extração de RNA e contagem de ovos. Os oito machos e oito fêmeas foram cultivados separadamente, em placas de 24 poços (KASV) contendo 1 mL de meio RPMI suplementado para análise no WormAssay.

Cada experimento foi realizado em duplicata e um casal de cada réplica foi retirado diariamente para extração de RNA, o meio foi trocado a cada dois dias e ovos contados. As análises no WormAssay também foram realizadas diariamente como descrito no tópico 4.5.2.1. Os experimentos foram realizados em três réplicas biológicas independentes.

4.6.5.5. Extração de RNA de vermes adultos eletroporados com dsRNAs

As extrações de RNA em vermes adultos foram realizadas utilizando o método do *TRIzol Reagent* (Invitrogen) associado ao kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega). Para isso, dois casais de vermes adultos foram transferidos para microtubos de 1,5 mL. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados ao precipitado 50 μ L de *TRIzol Reagent* (Invitrogen). Os vermes foram macerados com a ajuda de um pistilo por 2 minutos e posteriormente foram acrescentados 450 μ L de *TRIzol* seguido de uma incubação por 5 minutos a temperatura ambiente. Foram acrescentados 100 μ L de clorofórmio e as amostras foram agitadas vigorosamente por 15 segundos e, logo em seguida, foram mantidas à temperatura ambiente por 3 minutos. As amostras foram então centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos a 4°C e a fase aquosa transferida para um novo tubo. Foram adicionados 200 μ L de etanol 95% nas amostras e o conteúdo transferido para colunas do *kit SV Total RNA Isolation System*, centrifugadas por 1 minuto a 14.000 rpm e o eluato descartado. Foram adicionados 600 μ L de *RNA Wash Solution* e as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 1 minuto. Esta etapa foi feita novamente. Em seguida, mais 250 μ L de *RNA Wash Solution* foram adicionados à coluna e as amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 14.000 rpm. As colunas foram transferidas para novos tubos e o RNA eluído em 20 μ L de água livre de RNase, centrifugando por 1 minuto. O eluato foi colocado novamente na coluna para mais uma passagem. O RNA obtido foi imediatamente tratado com DNase e dosados no Qubit como descrito no tópico 4.6.5.3.

4.6.5.6. Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit *ImProm-II™ Reverse Transcription System* (Promega) seguindo protocolo do fabricante. Para quantificação dos transcritos sempre foram utilizadas as mesmas quantidades de RNA total para amostras de um mesmo experimento. Assim, foram adicionados ao RNA 1 μ L de oligo (dt) (500 μ g/mL) e 1 μ L de Random (500 μ g/mL) em um volume final de 10 μ L. As amostras foram aquecidas a 70°C por 5 minutos e resfriadas no gelo. Foram acrescentados 4 μ L do *ImProm-II™ 5X Reaction Buffer*, 2,4 μ L de $MgCl_2$ (0,1 mM), 1 μ L de dNTPs (10 mM), 0,5 μ L de *RNase-in* (40 μ g/mL) e 1 μ L da transcriptase reversa *ImProm-II*. A reação foi incubada a 25°C por 5 minutos, 42°C por 60 minutos e, em seguida, incubada a 70°C por 10 minutos. Os cDNAs obtidos foram

tratados com 0,5 μ L de *RNase H*, incubando a 37°C por 30 minutos. Os cDNAs foram armazenados a -20°C.

4.6.5.7. PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)

Os níveis de transcritos dos genes de interesse expostos aos dsRNAs foram avaliados por RT-qPCR. Todos os iniciadores passaram primeiramente por padronização para definirmos a melhor concentração para uso dos mesmos, seguindo as recomendações do MIQE (BUSTIN *et al.*, 2009). Depois da padronização ficou definido que os iniciadores para *SmHGPRTase 1*, *SmHGPRTase 2/4/5*, *SmHGPRTase 3* e *SmPAI-RBP1* seriam utilizados nas concentrações de 800 nM, 600 nM, 600 nM e 900 nM, respectivamente. Como normalizadores foram utilizados iniciadores para o gene que codifica a proteína Citocromo Oxidase I (*SmCOXI*, *Smp_900000*) de *S. mansoni* e o gene que codifica a proteína relacionada a actina 10 (*SmArp10*, *Smp_093230*) na concentração de 200 nM. Para verificar o nível de transcrito dos genes alvo, utilizamos as seguintes amostras: cDNA de esquistossômulos, esporocistos e vermes adultos expostos aos dsRNAs (*SmHGPRTase 1*-dsRNA, *SmHGPRTase 2/4/5*-dsRNA, *SmHGPRTase 3*-dsRNA, *SmPAI-RBP1*-dsRNA e GFP-dsRNA) e cDNA de parasitos que não receberam nenhum tipo de tratamento (controle negativo).

A reação de RT-qPCR foi realizada no equipamento ViiA 7 Real Time PCR System (*Thermo Fisher Scientific*). Para cada amostra utilizou-se 7,5 μ L de *GoTaq® qPCR Master Mix* (Promega), 200 – 900 nM de iniciadores senso e anti-senso (Quadro 1) e 2 μ L de cDNA em um volume final de 15 μ L. As reações foram realizadas em triplicata e em placas *96-Well Optical Reaction Plate* (*Applied Biosystems*) utilizando a ciclagem padrão da *Applied Biosystems*.

Os resultados foram normalizados e os níveis de expressão de cada gene em parasitos silenciados foi comparado com o nível de expressão dos transcritos do mesmo gene em parasitos tratados com dsRNA-GFP (controle inespecífico) ou com o controle não tratado. A expressão relativa foi analisada pelo método do $\Delta\Delta Ct$, em que os valores Ct de cada amostra foram subtraídos do Ct do normalizador (ΔCt). Em seguida, os valores correspondentes ao ΔCt encontrados para cada amostra foram subtraídos do ΔCt normalizado ($\Delta\Delta Ct$) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; SCHMITTGEN, 2001).

Para investigar o perfil de expressão do mRNA dos genes *SmHGPRTase 1*, *SmHGPRTase 2/4/5*, *SmHGPRTase 3*, *SmPAI-RBP1* nos diferentes estágios da vida do parasito, foi utilizada a quantificação relativa por RT-qPCR. Para isso, os níveis de transcrito

de cada gene foram avaliados em miracídios, esporocistos, cercárias, esquistossômulos, vermes adultos machos e fêmeas. Os resultados foram normalizados usando a média geométrica dos níveis de transcrito de três genes de referência: SmCOXI, SmArp10 e oxidoreductase dependente de FAD (SmFAD, Smp_089880), na concentração de 400 nM.

Como já citado anteriormente, todas as amostras foram tratadas com DNase para a remoção de possíveis contaminações de DNA genômico. E para garantirmos que não havia essa contaminação mesmo depois do tratamento, amostras de RNA foram adicionadas às placas como controle.

4.6.6. Avaliação da ativação do plasminogênio

Para avaliar se SmPAI-RBP1 era funcional em *S. mansoni* e se a atividade estava alterada após o silenciamento, foi feito o ensaio de ativação do plasminogênio (PLMG). O mesmo foi avaliado através da medição da atividade amidolítica da plasmina gerada em diferentes fases do parasito seguindo um protocolo já descrito anteriormente (FIGUEIREDO *et al.*, 2015). Para isso os parasitos silenciados (1000 esquistossômulos ou 1000 esporocistos ou um único verme adulto macho ou fêmea) foram lavados com PBS e depois transferidos para placas de 96 poços contendo 100 µL de PBS. Posteriormente, 1,5 µg de PLMG humano (Sigma-Aldrich) e 15 ng do ativador do PLMG tecidual (t-PA) (Sigma-Aldrich) foram adicionados aos poços em 100 µL de PBS. A análise também foi feita na ausência de t-PA e/ou de PLMG. A placa foi incubada na estufa de CO₂ por 1 hora a 37 °C para permitir a formação da plasmina. Finalmente, 4 µg do substrato da plasmina sintética (D-Valyl-L-Leucyl-L-Lysine 4-nitroanilide dihydrochloride – Sigma-Aldrich) foi adicionado a cada um dos poços em 50 µL de PBS. Mudanças na OD₄₀₅ foram monitoradas constantemente até as primeiras quatro horas do experimento em um espectrofotômetro *Spectra Max M5 (Molecular Devices)*. Os experimentos foram realizados em duplicata em três réplicas biológicas.

4.6.7. Dosagem de adenosina por HPLC

Para verificar a atividade das *SmHGPRTases*, foi feita a avaliação dos níveis de adenosina nas diferentes fases do parasito. O método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) foi realizado para separar e quantificar o conteúdo de adenosina nos extratos dos parasitos. Primeiro, foi gerada uma curva de calibração dos metabólitos em sete concentrações diferentes (1.000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625 ng / mL). Para a realização do experimento, 150 µL de metanol contendo 100 ng/mL de fenacetina foram adicionados em todas as amostras, incluindo a curva. Em seguida, parasitos do grupo controle

não tratado, grupo controle inespecífico e parasitos (~ 3.000 esporocistos, ~ 3.000 esquistossomos, quatro vermes adultos machos e quatro adultos fêmeas) tratados com SmHGPRtase 1, 2/4/5 e 3-dsRNAs separadamente ou em combinação foram maceradas e centrifugadas a 13.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um tubo contendo a resina C18 (Sigma-Aldrich) e centrifugado. Em seguida, o sobrenadante recuperado da resina foi liofilizado em um concentrador a vácuo (Eppendorf) por 30 minutos, depois ressuspendido em 50 µL de água Milli-Q e transferido para tubos de LC-MS (Sigma-Aldrich). A detecção de adenosina foi baseada na massa exata e no tempo de retenção da curva de calibração padrão. As variações individuais na eficiência da extração foram normalizadas usando o padrão interno de fenacetina. A HPLC foi realizada em um sistema hifenizado Nexera UHPLC (Shimadzu) em um espectrômetro de massa ESI-QTOF de alta resolução maXis ETD (Bruker) controlado pelo software Compass 1.5 (Bruker), na plataforma de Bioprospecção de Produtos Naturais. O volume de 20 µL dos extratos de metabólitos foi injetado em uma coluna Shimadzu Shim-Pack XR-ODS-III (C18, 2,2 µm, 2,0 x 150 mm) a 30 °C em um fluxo de 400 µL/min. A detecção e quantificação de adenosina foram realizadas usando o programa *QuantAnalysis* do *software Compass*. Os experimentos foram realizados em três réplicas biológicas.

4.6.8. Experimentos *in vivo*

Para avaliarmos o papel de SmHGPRtase 1/2/3/4/5 e SmPAI-RBP1 frente ao sistema imune do hospedeiro, esquistossômulos tratados com dsRNA para cada um dos genes foram inoculados em camundongos, conforme descrito a seguir.

4.6.8.1. Obtenção dos animais experimentais

A execução dos experimentos do presente trabalho utilizando camundongos foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), número de licença LM-05/18 (Anexo 2).

Foram adquiridos camundongos da linhagem *Swiss Webster*, fêmeas, com idade de 6 semanas para infecção com 350 esquistossômulos silenciados.

Todos os experimentos *in vivo* foram realizados no biotério de experimentação do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ e os animais foram manuseados de acordo com o manual de ética em experimentação animal da instituição.

4.6.8.2. Infecção de camundongos com esquistossômulos expostos aos dsRNAs

A infecção em camundongos utilizando esquistossômulos silenciados foi realizado apenas com o grupo combinado e o grupo silenciado para SmPAI-RBP1. Como descrito no item 4.6.5.2., esquistossômulos foram expostos aos dsRNAs durante 7 dias e o dia em que foi observada a maior diminuição dos transcritos para esses genes de interesse foi o terceiro dia de exposição aos dsRNAs. Após essa exposição, 400 parasitos foram colocados em tubos contendo 200 μ L de meio MEM e foram inoculados, via subcutânea, no dorso dos camundongos *Swiss Webster* utilizando agulhas de calibre 21 G. Em cada experimento foram utilizados 30 camundongos separados em grupos, conforme descrito:

- 6 camundongos para o tratamento com dsRNA para a combinação das cinco SmHGPRases;
- 6 camundongos para o tratamento com SmPAI-RBP1-dsRNA;
- 6 camundongos para o controle inespecífico utilizando 100 nM de GFP-dsRNA;
- 6 camundongos para o controle inespecífico utilizando 200 nM de GFP-dsRNA;
- 6 camundongos para o controle não tratado.

Após 42 dias de infecção, foi realizada a eutanásia dos camundongos como descrito no item 3.5, seguida da perfusão dos animais para recuperação dos vermes adultos (PELLEGRINO; KATZ, 1974).

Para a avaliação da maturação dos ovos, após a perfusão, a porção final do intestino delgado foi retirada e prensada em lâminas de vidro para contagem de ovos maduros, imaturos e mortos.

O restante do intestino e o fígado foram pesados e dissolvidos para contagem total de ovos. Portanto, os mesmos foram acondicionados em tubos com KOH 10%, onde ficaram por cerca de 16 horas a 4°C e, em seguida, incubados a 37°C por 1 hora. Os tubos foram centrifugados por cinco minutos a 2.000 rpm e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi ressuscitado com salina 0,85% para lavagem. Esta etapa foi repetida por mais duas vezes. Depois da última centrifugação, o sedimento foi ressuscitado em 1 mL de salina 0,85% e o número de ovos presentes em cada amostra foi contado por microscopia a partir de 3 alíquotas de 10 μ L. O número de ovos e de vermes adultos recuperados para os tratamentos com dsRNA específicos para os genes de interesse, foram comparados com o número de ovos e vermes adultos recuperados nos camundongos infectados com esquistossômulos dos grupos controles (dsRNA controle inespecífico e não tratado).

Além disso, os vermes adultos recuperados na perfusão foram separados para extração de RNA e para análise de alterações fenotípicas por microscopia confocal. Para análise de alteração fenotípica, os parasitos foram fixados em uma solução de Álcool-Formalina-Ácido acético (AFA), contendo 95% de etanol (Merck Millipore), 2% de ácido acético glacial (Merck Millipore), 10% de formaldeído (Dinâmica) e depois corados por 30 min com 2,5% de cloreto de carmim (Sigma-Aldrich). Posteriormente, os vermes foram lavados com etanol a 70% (Merck Millipore) e rapidamente imersos em uma solução contendo 3% de HCl (Synth) e 70% de etanol (Merck Millipore) seguidos por desidratação usando etanol a 70%, 80%, 95% e absoluto (Merck Millipore), deixando por 5 minutos para cada concentração. Em seguida, foram clarificados em salicilato de metila (Dinâmica) com bálsamo canadense (Synth) (1: 2) por pelo menos 24 horas e os vermes foram montados individualmente em lâminas. Foram analisadas alterações morfológicas nos órgãos reprodutores e no tegumento dos vermes através da análise de imagens confocais de 15 e 12 vermes adultos fêmeas para SmHGPRases e SmPAI-RBP1, respectivamente, e 12 machos para cada grupo. As imagens foram capturadas usando um microscópio invertido *Eclipse* Ti-E (Nikon) com *Confocal C2 plus* (Nikon) com ampliação de 10 e 40 X usando 546 e 488 nm comprimentos de onda. Imagens confocais foram analisadas usando NIS-Elements software (Nikon). Vermes provenientes de três réplicas biológicas foram analisados nestes experimentos.

4.7. Análises estatísticas

Para a padronização do teste de atividade de ePKs foi utilizado o two-way ANOVA e para a análise de ligação de inibidores da MCCC à PKA foi utilizado o one-way ANOVA e a múltipla comparação pelo teste de Tukey. Para a análise dos dados de qRT-PCR, níveis de adenosina, atividade do plasminogênio, maturação dos ovos, análises morfométricas do ovário e do tubérculo de vermes adultos, primeiramente foi realizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk e as diferenças comparadas com os controles foram analisadas pelo teste t. Para a área dos parasitos, o teste de normalidade utilizado do o D'Agostino-Pearson seguido do teste t. A taxa de mortalidade dos parasitos, assim como a motilidade de vermes adultos, foram avaliados utilizando a two-way ANOVA e o Sidak's como pós-teste. A significância estatística foi definida como $p \leq 0.05$. Todos os gráficos e as análises estatísticas foram feitas utilizando o software GraphPad Prism (www.graphpad.com) (La Jolla, CA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Comparação *in silico* da das proteínas SmERK1, SmERK2, Smp38 e SmJNK de *S. mansoni* com os ortólogos do hospedeiro vertebrado humano

As proteínas SmERK1 e SmERK2 assim como as ERK1-7 em humanos compartilham o mesmo domínio: domínio das proteínas quinase (Família Pkinase - PF00069) (EL-GEBALI *et al.*, 2019), que possuem a função catalítica de modificar outras proteínas adicionando quimicamente grupos fosfato (fosforilação) (EL-GEBALI *et al.*, 2019; HANKS; QUINN, 1991). No caso das proteínas ERK elas são classificadas como MAPKs (Serina/Treonina quinases), ou seja, elas fosforilam os resíduos de aminoácidos Serina ou treonina. O domínio da proteína ERK1 do *S. mansoni* apresentou menor similaridade comparada com a ERK3 (42,14%) de humanos e, interessante, maior similaridade com ERK2 de humanos (70,93%). Com relação a ERK2 do *S. mansoni*, apesar dos resultados serem bem semelhantes aos vistos com a ERK1, apresentou uma menor similaridade com a ERK4 (41,55%) de humanos e uma maior similaridade com a ERK2 (70,34%) (Quadro 4, Figura 9).

O que caracteriza e diferencia as proteínas ERK1 e ERK2 das outras MAPKs é o fato de que elas são ativadas por MEK1 e MEK2 que fosforilam os sítios Thr-Glu-Tyr (LEWIS; SHAPIRO; AHN, 1998). Em vertebrados, acredita-se que a duplicação do genoma inteiro levou ao surgimento de ERK1 e ERK2 (BUSCÀ *et al.*, 2015). Em mamíferos, as sequências protéicas de ERK1 e ERK2 apresentam 84% de identidade. O que as difere é que a proteína ERK1 em humanos é maior que a ERK2 devido a uma extensão de 17 aminoácidos na região N-terminal e dois aminoácidos na região C-terminal. Estudos realizados com esta proteína, sugeriram que a chegada da proteína ERK1 no núcleo celular é mais lenta que a ERK2 devido aos 20 aminoácidos de ERK1 situados na extremidade N-terminal (BUSCÀ; POUYSSÉGUR; LENORMAND, 2016; MARCHI *et al.*, 2008). No entanto, nenhum mecanismo que possa explicar essa diferença foi relatado até agora e, além disso, camundongos que expressam apenas a ERK1 são perfeitamente viáveis e férteis; portanto, essa diferença no tempo da chegada no núcleo celular não é suficiente para diferenciar a função de cada uma delas (BUSCÀ; POUYSSÉGUR; LENORMAND, 2016).

Quadro 4. Porcentagem de identidade dos domínios quinase entre as proteínas ERK encontradas no *S. mansoni* e no humano.

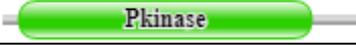
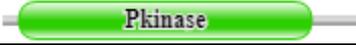
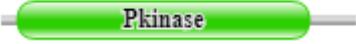
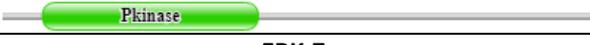
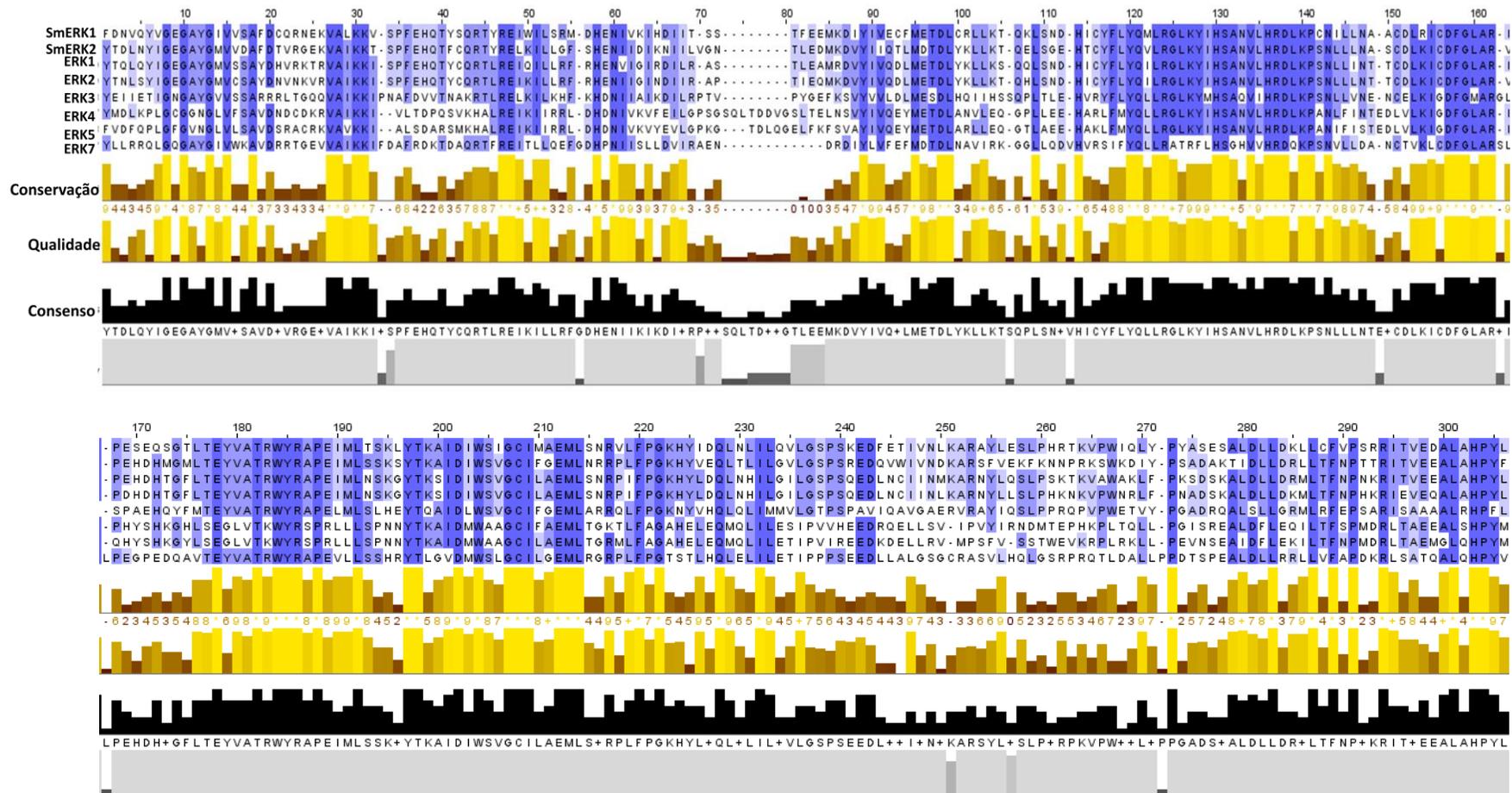
Posição do domínio <i>S. mansoni</i>	Posição do domínio humano	% Identidade entre os domínios quinase
SmERK1 (Smp_142050) Posição: 22-308 	ERK-1 Posição: 42-330 	69,55
	ERK-2 Posição: 25-313 	70,93
	ERK-3 Posição: 20-316 	42,14
	ERK-4 Posição: 22-312 	43,58
	ERK-5 Posição: 55-347 	48,46
	ERK-7 Posição: 16-304 	44,07
SmERK2 (Smp_047900) Posição: 17-306 	ERK-1 Posição: 42-330 	70
	ERK-2 Posição: 25-313 	70,34
	ERK-3 Posição: 20-316 	42,14
	ERK-4 Posição: 22-312 	41,55
	ERK-5 Posição: 55-347 	50,51
	ERK-7 Posição: 16-304 	44,59

Figura 10 - Alinhamento das seqüências dos domínios das proteínas ERKs de humanos e *S. mansoni*.

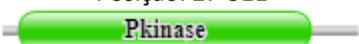
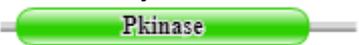
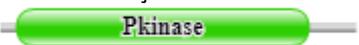


As duas primeiras linhas do alinhamento correspondem as seqüências dos domínios de SmERK1 e SmERK2, respectivamente. As outras 6 linhas correspondem as seqüências dos domínios de ERK1, ERK2, ERK3, ERK4, ERK5 e ERK7 de humanos. Os resíduos de aminoácidos são coloridos de acordo com a porcentagem de identidade entre eles: Azul escuro: >80% de identidade; azul claro: >60%; cinza: >40%; branco: <40%. Conservação: Medição da conservação de propriedades físico-químicas em cada coluna de aminoácidos. Consensus: resíduos mais comuns e sua porcentagem para cada coluna do alinhamento.

A proteína p38, tanto em *S. mansoni* quanto em humanos, também tem o domínio proteínas quinase (Família Pkinase - PF00069) (EL-GEBALI *et al.*, 2019). Essas enzimas também pertencem as MAPKs (Serina/Treonina quinases). Ao compararmos as sequências desse domínio do *S. mansoni* e as quatro isoformas em humanos, elas apresentam uma similaridade de aproximadamente 55% (Quadro 5 e Figura 11).

Diferentemente das ERKs, as proteínas p38 são fosforiladas nos sítios com os motivos Thr-Gly-Tyr (ZARUBIN; HAN, 2005). As quatro isoformas de p38 em humanos, compartilham mais de 60% de homologia entre elas (YANG *et al.*, 2016) e são as MKKs 3, 4 e 6 que fosforilam as diferentes isoformas de p38, que por sua vez ativam substratos específicos, por exemplo, α e β ativam proteínas heat-shock enquanto δ e γ ativam ATF-2 (YANG *et al.*, 2016).

Quadro 5. Porcentagem de identidade dos domínios quinase entre as proteínas p38 encontradas no *S. mansoni* e no humano

Posição do domínio <i>S. mansoni</i>	Posição do domínio humano	% Identidade entre os domínios quinase
<p>Smp38 (Smp_133020)</p> <p>Posição: 27-311</p> 	<p>p38α</p> <p>Posição: 24-308</p> 	60,35
	<p>p38β</p> <p>Posição: 27-308</p> 	56,84
	<p>p38δ</p> <p>Posição: 28-308</p> 	54,04
	<p>p38λ</p> <p>Posição: 27-311</p> 	52,63

A proteína JNK também possui o domínio das proteínas quinase (PF00069) tanto em *S. mansoni* como em humanos (EL-GEBALI *et al.*, 2019). Ao comparar esse domínio no parasito e em humanos, foi visto uma identidade entre eles de aproximadamente 75%, indicando que JNK parece ser bastante conservada entre os diferentes organismos (Quadro 6 e Figura 12).

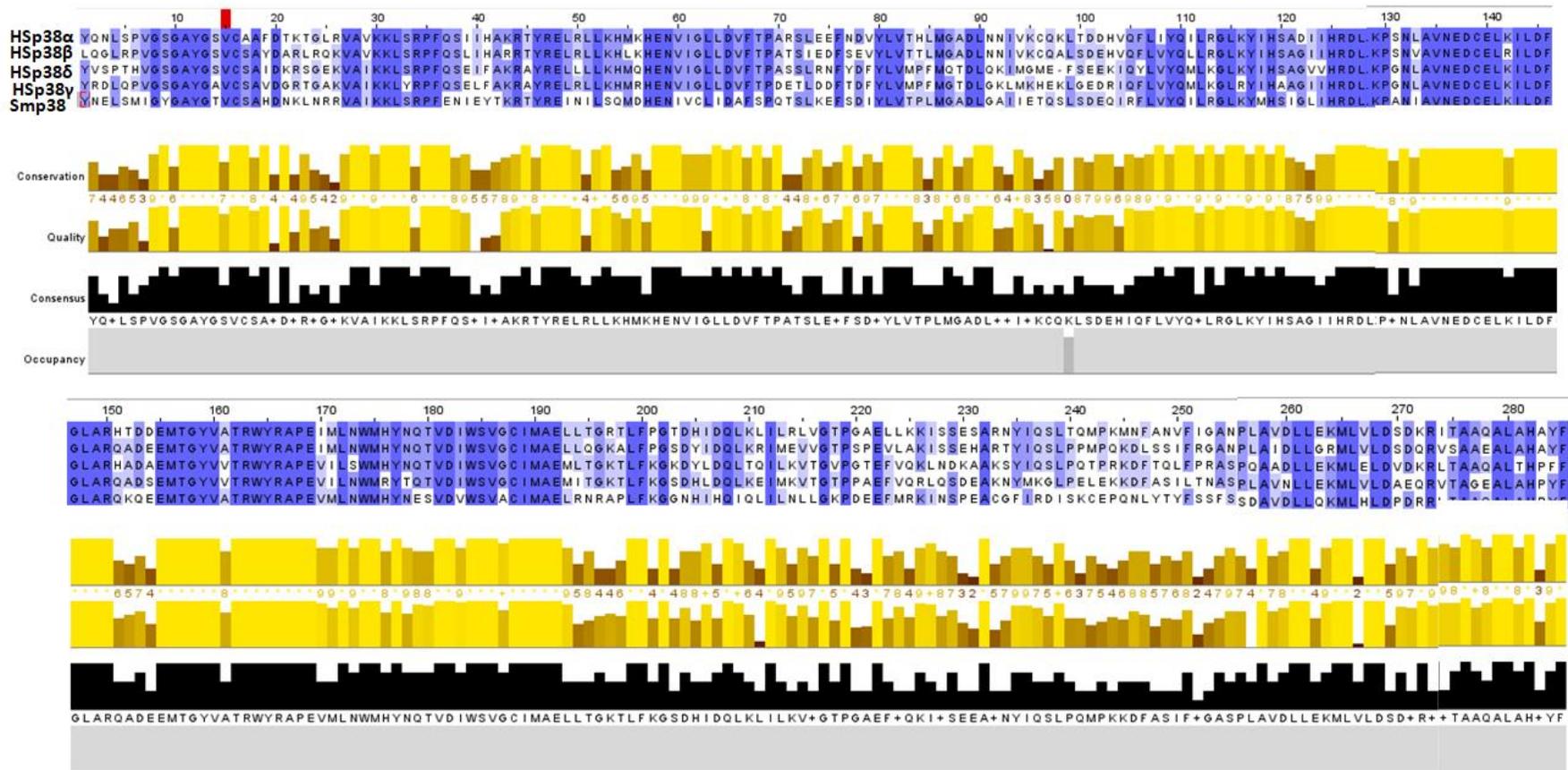
As proteínas JNK, diferentemente das ERKs e das p38, são ativadas por fosforilação dupla no motivo Thr-Pro-Tyr pelas JNKK1 e JNKK2, conhecidas como MAPK quinase 4 e 7 (LIN, 2003; ZEKE *et al.*, 2016). Em humanos, já foram descritas três isoformas diferentes, JNK1, JNK2 e JNK3. A JNK3 compartilha uma identidade de 75% com JNK1 e JNK2

compartilha 73% de identidade com JNK1. JNK2 e JNK3 apresentam 77% de identidade (PARK *et al.*, 2015).

Quadro 6. Porcentagem de identidade dos domínios quinase entre as proteínas JNK encontradas em *S. mansoni* e no humano

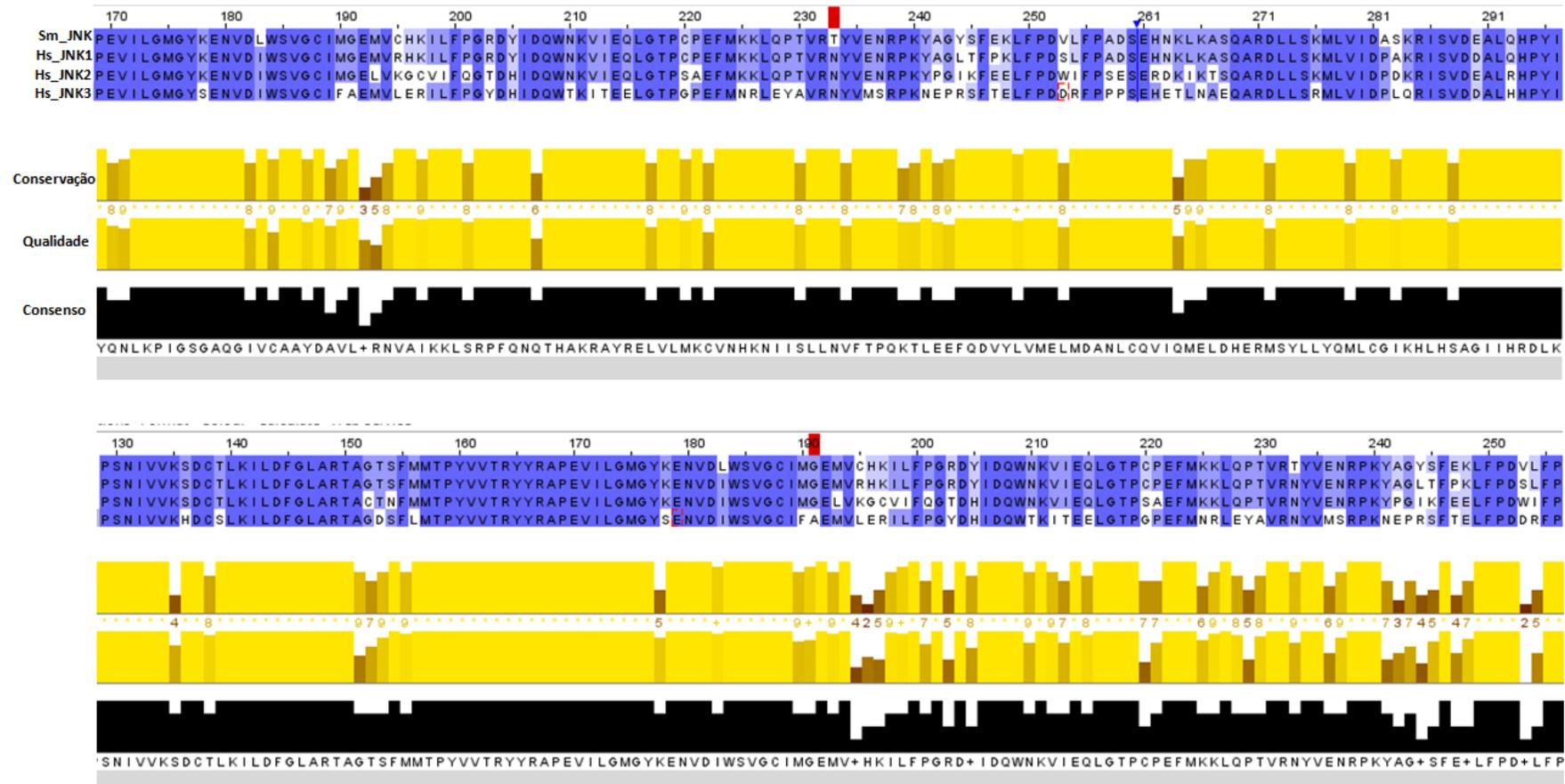
Posição do domínio <i>S. mansoni</i>	Posição do domínio humano	% Identidade entre os domínios quinase
SmJNK (Smp_172240) Posição: 25-321 	HsJNK1 Posição: 26-321 	75,34
	HsJNK2 Posição: 26-321 	73,31
	HsJNK3 Posição: 64-359 	77,70

Figura 11 - Alinhamento das seqüências dos domínios da proteína p38 de humanos e *S. mansoni*.



A última linha do alinhamento corresponde a seqüência do domínio de Smp38. As outras 4 linhas acima correspondem as seqüências dos domínios de p38 α , p38 β , p38 δ , p38 γ de humanos. Os resíduos de aminoácidos são coloridos de acordo com a porcentagem de identidade entre eles: Azul escuro: >80% de identidade; azul claro: >60%; cinza: >40%; branco: <40%. Conservação: Medição da conservação de propriedades físico-químicas em cada coluna de aminoácidos. Consensus: resíduos mais comuns e sua porcentagem para cada coluna do alinhamento.

Figura 12 - Alinhamento das seqüências dos domínios das proteínas JNK de humanos e *S. mansoni*.

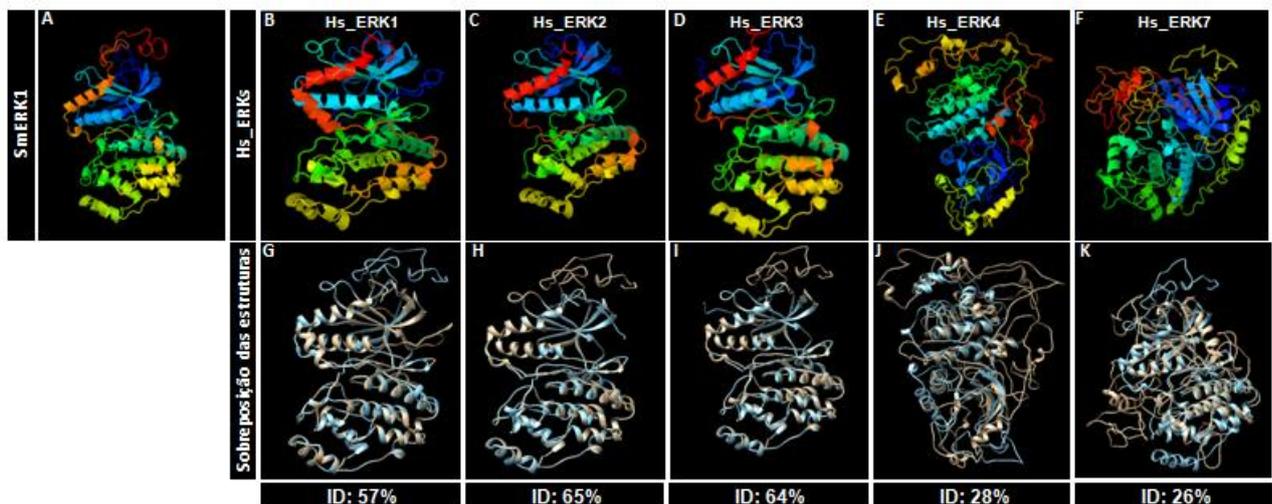


A primeira linha do alinhamento corresponde a seqüência do domínio de SmJNK. As outras três linhas correspondem as seqüências dos domínios de JNK1, JNK2 e JNK3 de humanos. Os resíduos de aminoácidos são coloridos de acordo com a porcentagem de indentidade entre eles: Azul escuro: >80% de identidade; azul claro: >60%; cinza:>40%; branco: <40%. Conservação: Medição da conservação de propriedades físico-químicas em cada coluna de aminoácidos. Consensus: resíduos mais comuns e sua porcentagem para cada coluna do alinhamento.

Todas as proteínas da subfamília ERK, JNK, p38a foram modeladas utilizando o software Phyre2. Além disso, os modelos obtidos foram alinhados no programa Chimera 1.3 para avaliarmos as diferenças estruturais entre as proteínas encontradas no *S. mansoni* e em humanos. Não foi possível realizar a modelagem da proteína humana ERK 5 devido a falta de informação no banco de dados consultado.

As proteínas da sub-família ERK encontradas em humanos (ERK 1, ERK 2, ERK 3, ERK4 e ERK7) e em *S. mansoni* (SmERK1 e SmERK2) foram modeladas e os modelos preditos foram alinhados para análise de similaridade em suas estruturas. Ao alinharmos o modelo predito da proteína humana ERK1 com a proteína SmERK1, observamos uma identidade de 57% (Figura 13- A, B e G). Quando comparamos a estrutura da SmERK1 com a ERK 2 humana, encontra-se uma identidade de 65% (Figura 13- A, C e H). Não muito diferente, as proteínas SmERK1 e a proteína humana ERK 3 apresentaram uma identidade de 64% quando modeladas e sobrepostas (Figura 12- A, D, I). Diferente do que foi visto para as proteínas ERK1, ERK2 e ERK3, ao alinharmos a proteína SmERK1 com as proteínas humanas ERK4 e ERK7, vimos uma identidade bem mais baixa de 28% (Figura 13- A, E e J) e 26% (Figura 13- A, F, K), respectivamente.

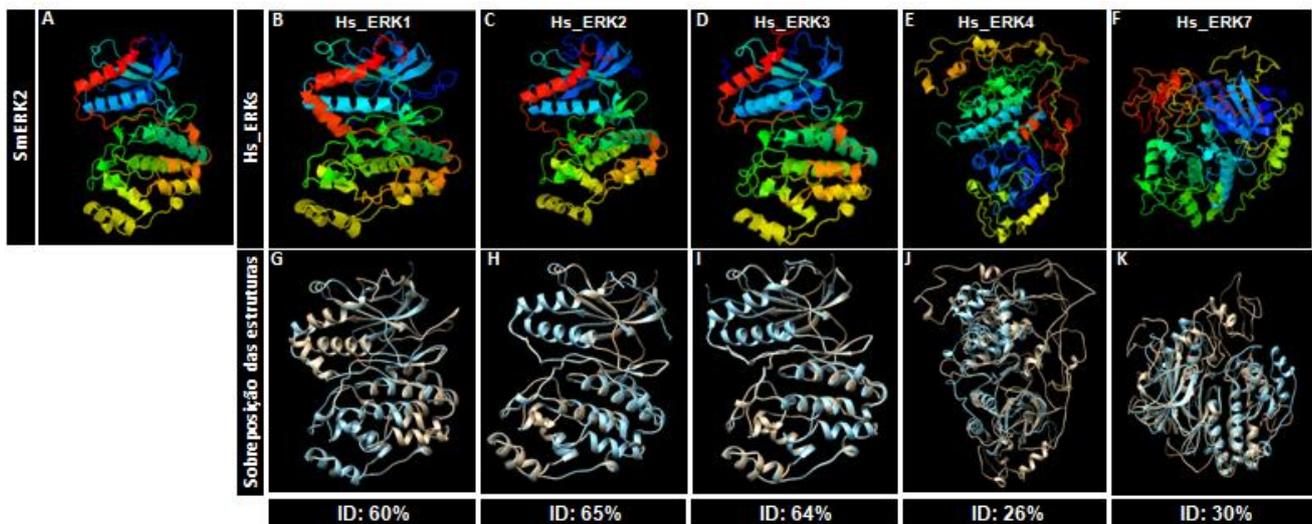
Figura 13 - Modelagem das proteínas SmERK1 e ERK 1, 2, 3, 4 e 7 de humanos.



Modelagem e sobreposição da proteína SmERK1 de *S. mansoni* (A) e ERK1 (B), ERK2 (C), ERK3 (D), ERK 4 (E) e ERK 7 (F) de humanos utilizando o programa Phyre2. Os elementos da estrutura secundária das proteínas são coloridos da extremidade N-terminal à extremidade C-terminal, na ordem violeta, azul, verde, amarelo, laranja, vermelho (*rainbow*). Suas identidades foram calculadas através dos modelos preditos e a sobreposição dessas estruturas estão representadas em G, H, I, J, K (em cinza: proteína humana; azul: proteína correspondente em *S. mansoni*).

Quando o modelo predito para proteína SmERK2 foi alinhado com a proteína ERK1 em humano, foi visto uma identidade de 60% (Figura 14- A, B, G). Ao alinharmos com a proteína humana ERK2 observamos uma identidade de 65% (Figura 14- A, C, H) e com a proteína ERK3 64% (Figura 14- A, D, I). Assim como foi visto para proteína SmERK1, ao alinharmos a proteína SmERK2 com as proteínas humanas ERK 4 e 7 a identidade entre elas foi mais baixa, 26% para ERK4 (Figura 14 A, E, J) e 30% para ERK7 (Figura 14 A, F, K).

Figura 14 - Modelagem das proteínas SmERK2 e ERK 1, 2, 3, 4 e 7 de humanos.



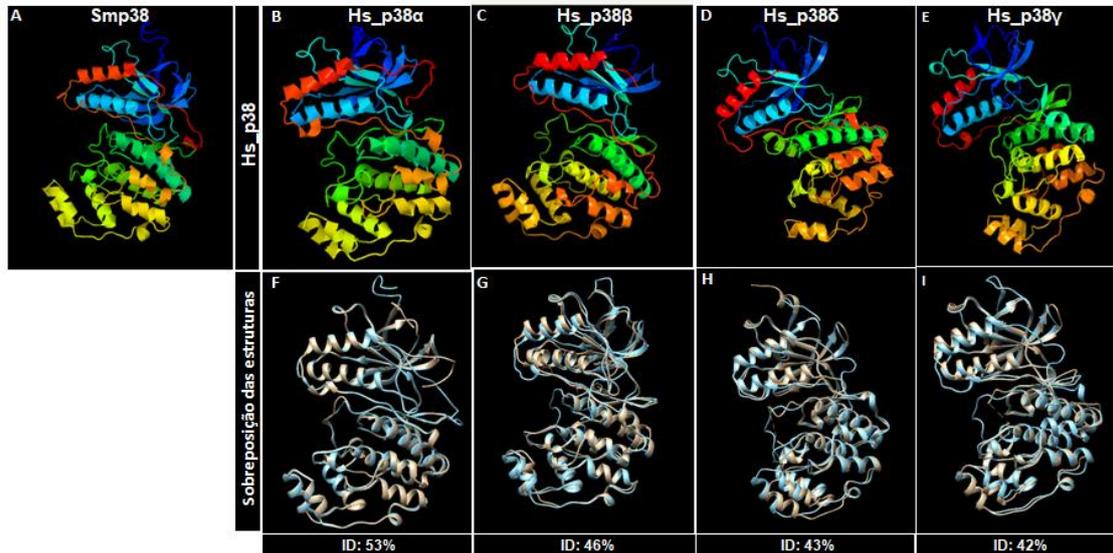
Modelagem e sobreposição da proteína SmERK2 de *S. mansoni* (A) e ERK1 (B), ERK2 (C), ERK3 (D), ERK 4 (E) e ERK 7 (F) de humanos utilizando o programa Phyre2. Os elementos da estrutura secundária das proteínas são coloridos da extremidade N-terminal à extremidade C-terminal, na ordem violeta, azul, verde, amarelo, laranja, vermelho (*rainbow*). Suas identidades foram calculadas através dos modelos preditos e a sobreposição dessas estruturas estão representadas em G, H, I, J e K (em cinza: proteína humana; azul: proteína correspondente em *S. mansoni*).

É possível observar que a identidade apresentada nas modelagens das proteínas completas coincidem com a identidade observada nos alinhamentos dos domínios para cada uma destas proteínas, tanto para SmERK1 quanto para SmERK2. Interessantemente, ambos os membros de *S. mansoni* da sub-família ERK, possuem uma maior similaridade com ERK2 de humanos. Apenas no caso da proteína humana ERK3, quando alinhadas com as proteínas de *S. mansoni* apresentaram uma identidade menor ao se comparar os seus domínios (42%) (Quadro 3) do que a estrutura inteira (64%) (Figuras 13 e 14 D-I).

Ao comparar a proteína Smp38 (Figura 15 A) com a proteína p38 α em humanos (Figura 15 B) foi observada uma identidade de 53% (Figura 14 F). Essa mesma comparação foi realizada com as outras isoformas de p38 em humanos, p38 β (Figura 15 C), p38 δ (Figura

15 D) e p38 γ (Figura 15 E) e foi visto uma identidade de 46%, 43% e 42%, respectivamente (Figura 15 G-H).

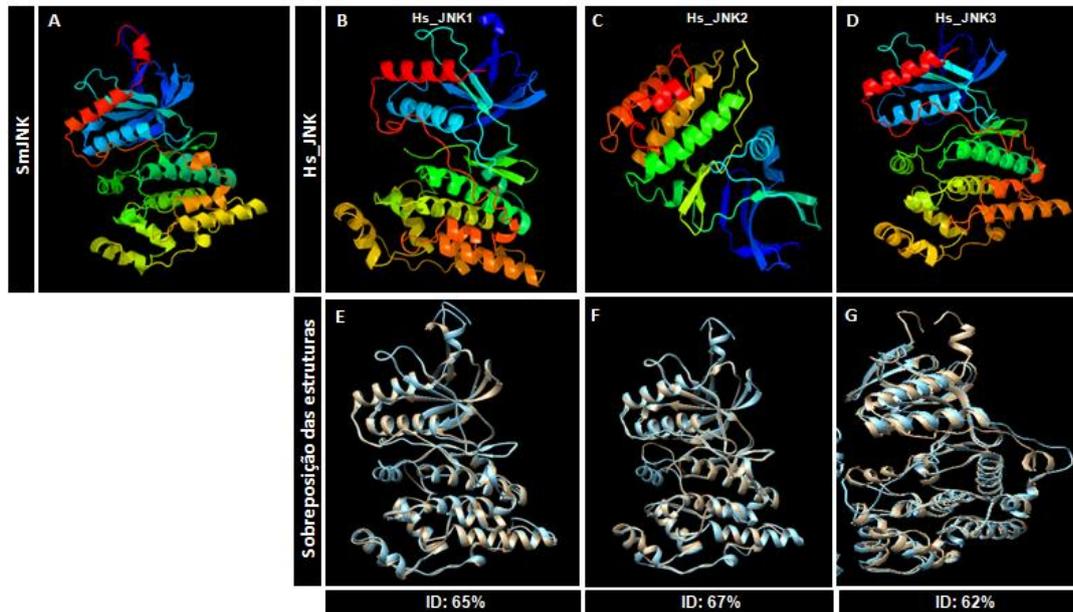
Figura 15 - Modelagem das proteínas Smp38 e das proteínas humanas p38 α , p38 β , p38 δ e p38 γ .



Modelagem e sobreposição da proteína Smp38 de *S. mansoni* (A) e as proteínas p38 α (B), p38 β (C) e p38 γ (D) de humanos utilizando o programa Phyre2. Os elementos da estrutura secundária das proteínas são coloridos da extremidade N-terminal à extremidade C-terminal, na ordem violeta, azul, verde, amarelo, laranja, vermelho (*rainbow*). Suas identidades foram calculadas através dos modelos preditos e a sobreposição dessas estruturas estão representadas em F, G, H e I (em cinza: proteína humana; azul: proteína correspondente em *S. mansoni*).

Já foi demonstrado em estudos anteriores que o *S. mansoni* expressa apenas um único membro da sub-família JNK, que contrasta com a presença de três ortólogos em humanos (ANDRADE *et al.*, 2011). Ao fazermos a comparação das estruturas protéicas da proteína JNK do parasito com as correspondentes em humanos JNK1, JNK2, JNK3, foi visto uma identidade de 65%, 67% e 62% (Figura 16), respectivamente. Assim como foi visto na análise de seus domínios, a proteína JNK é bastante conservada ao comparar suas estruturas nestes dois organismos.

Figura 16 - Modelagem das proteínas SmJNK e a proteína humana JNK 1, 2 e 3.



Modelagem e sobreposição da proteína SmJNK de *S. mansoni* (A) e as proteínas JNK1 (B), JNK2 (C) e JNK3 (D) de humanos utilizando o programa Phyre2. Os elementos da estrutura secundária das proteínas são coloridos da extremidade N-terminal à extremidade C-terminal, na ordem violeta, azul, verde, amarelo, laranja, vermelho (*rainbow*). Suas identidades foram calculadas através dos modelos preditos e a sobreposição dessas estruturas estão representadas em E, F e G (em cinza: proteína humana; azul: proteína correspondente em *S. mansoni*).

Ao analisarmos os resultados de alinhamento das proteínas ERK1, ERK2, p38 e JNK de humanos e de *S. mansoni*, observamos importantes semelhanças em suas estruturas e em suas sequências. Um estudo feito recentemente, utilizando análises filogenéticas, mostrou que a duplicação de genes seguido de divergência foram provavelmente o principal mecanismo que proporcionou a evolução dos membros das sub-famílias de ERK e JNK (ANDRADE *et al.*, 2014). Além disso, foi visto que as proteínas ERK e JNK são conservadas evolutivamente em diferentes espécies de metazoários, tendo como função a transdução de sinais da superfície celular para o núcleo (ANDRADE *et al.*, 2014).

Por muito tempo, o desenvolvimento de novas ferramentas de controle da esquistossomose baseou-se em abordagens empíricas com pouco ou nenhum conhecimento de possíveis alvos terapêuticos. Avanços em genômica trouxeram informações e novas tecnologias, proporcionando novas abordagens computacionais para identificação de alvos. Atualmente é possível compreender mais a fundo a funcionalidade e a estrutura do alvo estudado para o desenvolvimento racional de uma quimioterapia eficaz para esquistossomose (NAHUM; MOURÃO; OLIVEIRA, 2012; TAVARES *et al.*, 2016). Dessa forma, comparações das estruturas, dos domínios e das sequências dessas proteínas com as proteínas correspondentes em humano foi o primeiro passo para o desenvolvimento deste trabalho, uma

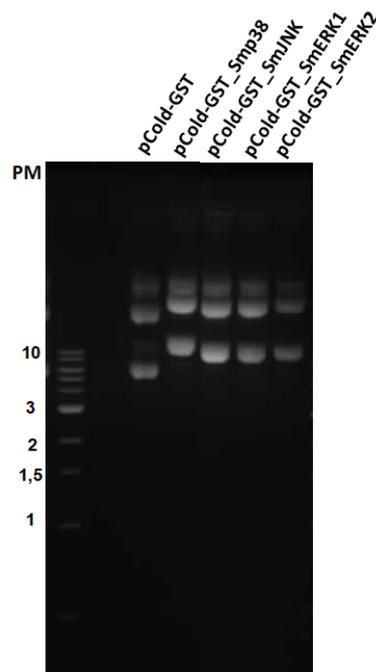
vez que as MAPKs do parasito se mostraram potenciais alvos de drogas devido ao papel essencial no estabelecimento da infecção.

5.2. Expressão e purificação de Smp38, SmJNK, SmERK1 e SmERK2 recombinates

Para a produção de proteínas recombinantes visando posterior análise estrutural e triagem de inibidores, as sequências correspondentes a cada uma das PKs alvo deste estudo foram sintetizadas comercialmente no vetor pCold-GST. Assim, para a amplificação das mesmas, foi realizado transformações em bactéria *E. coli* DH5 α e posterior extração do DNA plasmidial.

Com o intuito de verificar a integridade das construções plasmidiais, as mesmas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 17). As bandas referentes a cada uma das amostras apresentaram o tamanho de 6.219 Kb (SmJNK), 6.228 Kb (SmERK1) e 6.111 Kb (SmERK2).

Figura 17 - Extração do DNA plasmidial dos clones transformados com o vetor pCold-GST clonado com Smp38, SmJNK, SmERK1 e SmERK2.

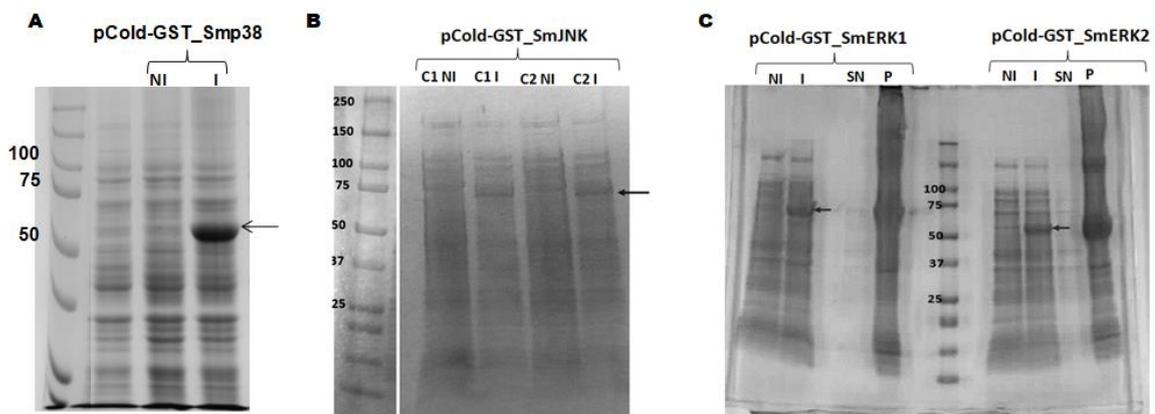


Gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, das construções plasmidiais das PKs Smp38, SmJNK, SmERK1, SmERK2 (sintetizadas comercialmente) após transformação em *E. coli* DH5 α e posterior extração plasmidial. PM: Padrão de peso molecular: Quick-Load® Purple 1 kb DNA Ladder – New England BioLabs

As PKs utilizadas neste estudo, foram produzidas em sistema procarioto utilizando-se bactérias *Escherichia coli* ArcticExpress, BL21 e DH5 α transformadas com o vetor de expressão pCold-GST contendo cada uma das sequências que codificam para as PKs de interesse.

A expressão das proteínas foi visualizada por SDS-PAGE representados na Figura 18 mostrando a expressão da proteína SmJNK em DH5 α e SmERK1 e SmERK2 em ArcticExpress, linhagens bacterianas que apresentaram os melhores resultados com cada uma das proteínas. Na Figura 18 A, uma banda de aproximadamente 71 KDa referente a proteína Smp38 (45 KDa) em fusão com a proteína GST (26 KDa). Na Figura 18B, observou-se uma banda de 68 KDa, resultado da soma da proteína SmpJNK (42 KDa) com a proteína GST (26 KDa). Na Figura 18 C, nota-se a presença de uma banda de 70 KDa correspondente a proteína SmERK1 (44 KDa) somada a proteína de fusão GST em sua porção N-terminal (26 KDa) e a expressão de uma proteína de aproximadamente 66 KDa referente a proteína SmERK2 (40 KDa) juntamente com a proteína de fusão GST (26 KDa).

Figura 18 - Verificação da expressão das PKs Smp38, SmJNK, SmERK1 e SmERK2.

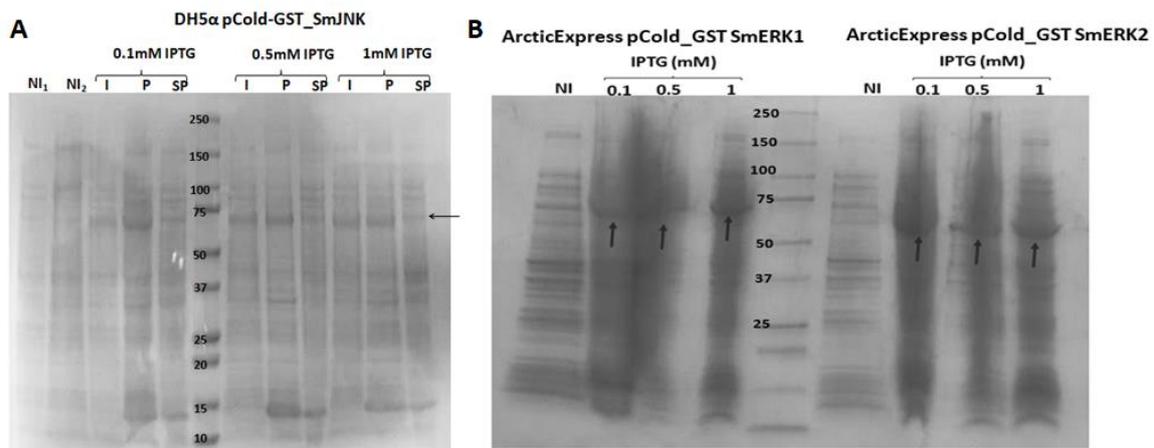


A: SDS-PAGE representando lisados de culturas dos clones bacterianos da linhagem DH5 α transformadas com o vetor de expressão pCold-GST contendo o inserto que codifica para a proteína Smp38. B: SDS-PAGE representando lisados de culturas dos clones bacterianos da linhagem ArcticExpress transformadas com o vetor de expressão pCold-GST contendo o inserto que codifica para as proteínas SmJNK. C: SDS-PAGE representando lisados de culturas dos clones bacterianos da linhagem BL21 transformadas com o vetor de expressão pCold-GST contendo o inserto que codifica para as proteínas SmERK1 e SmERK2. NI: controles não induzidos por IPTG. I: expressão protéica após indução com IPTG (setas pretas). SN: sobrenadante após lise bacteriana. P: pellet após lise bacteriana. Padrão de Peso Molecular: *Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards* – Bio Rad. Gel corado com *InstantBlue* (Expedeon).

Com o intuito de otimizar a expressão das proteínas em *E. coli* DH5 α e ArcticExpress das PKs alvo foi realizado a indução protéica com diferentes concentrações de IPTG: 0,1mM;

0,5 mM; 1 mM. Para proteína SmJNK, não foi observado diferença entre as concentrações 0,5 mM e 1 mM de IPTG, dessa forma passou a ser utilizado a concentração de 0,5 mM (Figura 19 A). Para as proteínas SmERK1 e SmERK2 foi observado maior rendimento ao utilizarmos a concentração de 1 mM de IPTG (Figura 19 B). Para a proteína Smp38, a concentração de 1mM de IPTG mostrou melhores resultados.

Figura 19 - Otimização da expressão das PKs SmJNK, SmERK1 e SmERK2.



A: SDS-PAGE representando lisados de culturas dos clones bacterianos da linhagem DH5α transformadas com o vetor de expressão pCold-GST contendo o inserto que codifica para a proteína SmJNK. B: SDS-PAGE representando lisados de culturas dos clones bacterianos da linhagem *ArcticExpress* transformadas com o vetor de expressão pCold-GST contendo o inserto que codifica para as proteínas SmERK1 e SmERK2. NI: controles não induzidos por IPTG. As outras canaletas mostram as induções realizadas com diferentes concentrações de IPTG (0,1; 0,5; 1 mM). As setas pretas correspondem a proteína de interesse expressa. Padrão de Peso Molecular: *Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards* – Bio Rad. Gel corado com *InstantBlue* (Expedeon).

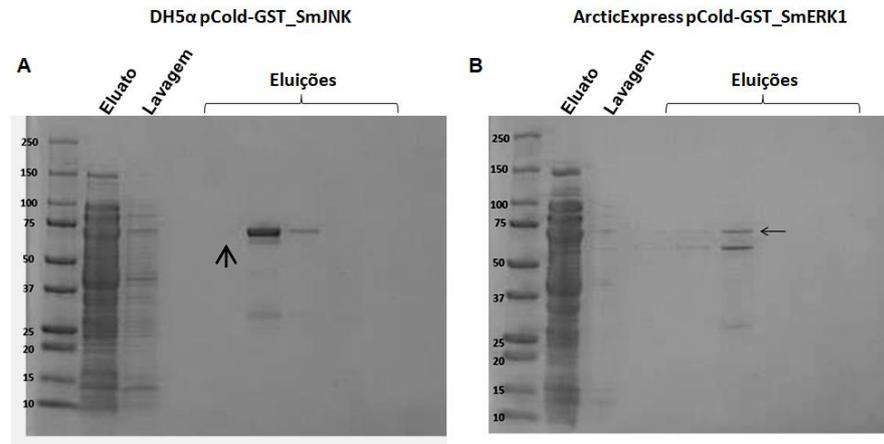
A expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* é frequentemente dificultada por baixos níveis de expressão e baixa solubilidade. O cultivo bacteriano em baixas temperaturas representa uma boa estratégia para aumentar a recuperação de proteínas solúveis. Assim, o plasmídeo pCold-GST foi utilizado visando a expressão do gene alvo pelo promotor de *cspA* que é ativado pelo choque térmico (frio). Além disso, ele foi desenvolvido mediante a incorporação de glutatona S-transferase 26 (GST26) de *S. japonicum* como uma proteína de fusão solúvel em sua porção N-terminal, o que pode melhorar a estabilidade e solubilidade da proteína (HAYASHI; KOJIMA, 2008). Além disso, utilizamos a linhagem bacteriana *ArcticExpress* que foi desenvolvida para otimizar a expressão proteica em baixas temperaturas. Essas células co-expressam as chaperoninas Cpn10 e Cpn60 da bactéria psicrófila *Oleispira antarctica*. Essas chaperoninas mostram altas atividades no enovelamento da proteína em temperaturas de 4–15 °C aumentando o rendimento da recuperação da proteína recombinante na forma correta (FERRER *et al.*, 2003). Entretanto,

não foi possível expressar a proteína SmJNK na linhagem bacteriana *ArcticExpress* ou na linhagem BL21, tendo sido expressa apenas em DH5 α .

Apesar de utilizarmos várias alternativas na tentativa de aumentar a solubilidade das proteínas, como pode ser observado nas Figuras 18 e 19, a maior parte das proteínas expressas se encontram no pellet bacteriano em corpúsculos de inclusão. A obtenção de proteínas ativas a partir de corpúsculos de inclusão requer etapas de redobrimento protéico, sem garantia de obtenção de um produto biologicamente ativo (ROSANO; CECCARELLI, 2014). Por esse motivo, apesar da pouca quantidade de proteína disponível no sobrenadante, procedemos para purificação das mesmas, já que para realização das próximas etapas deste projeto, estas proteínas precisam estar ativas.

Para purificação das proteínas Smp38, SmJNK, SmERK1 e SmERK2, a cromatografia de afinidade foi feita utilizando a coluna GSTrap Hp de Glutathione. A Figura 20 A representa o gel de purificação da proteína SmJNK em que há presença de uma banda de 68 KDa resultante da proteína em fusão com GST. Há também uma banda de 26 KDa referente à GST dissociada. Na Figura 20 B, observa-se duas bandas, uma delas referente aos 70 kDa da proteína SmERK1 e a outra com tamanho próximo, provavelmente referente a proteína chaperonina bacteriana. Várias metodologias alternativas foram utilizadas na tentativa de otimizar estas purificações, uma vez que parte da proteína passou pela coluna sem se ligar. Dentre as alternativas foi utilizada a resina HisTrap, já que as proteínas de interesse também possuem uma cauda de histidina. Além disso, o tempo de passagem da proteína pela coluna foi reduzido (ao invés de 1 mL por minuto, foi reduzida para 1 mL por 0,5 minuto) para as duas colunas utilizadas. No entanto, não obtivemos sucesso nas otimizações (dados não mostrados).

Figura 20 - Purificação em pequena escala das proteínas SmJNK e SmERK1 em fusão com a proteína GST.

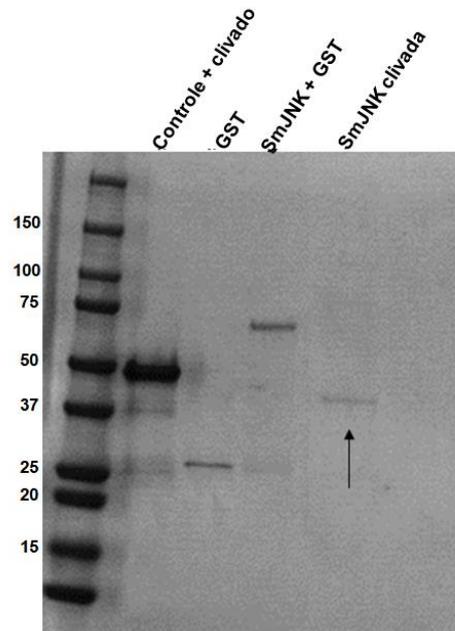


A: Gel representativo mostrando a purificação de uma proteína de 68 KDa referente a fusão da proteína SmJNK com GST (seta preta). B: Gel representativo mostrando a purificação de uma proteína de 70 KDa referente a fusão da proteína SmERK1 com GST (seta preta). As diferentes frações eluídas das proteínas estão representadas nas canaletas identificadas como eluição. Eluato: proteínas não ligantes à coluna GSTrap. Lavagem: retirada de proteínas inespecíficas. Padrão de Peso Molecular: *Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards* – Bio Rad. Gel corado com *InstantBlue* (Expedeon).

A purificação das proteínas Smp38 e SmERK2 também foi feita utilizando tanto a coluna GSTrap HP quanto a HisTrap, porém não conseguimos purificá-las. Como as quantidades das proteínas eram baixas no sobrenadante, otimizações na lise bacteriana foram realizadas, tais como: aumento do número de vezes de congelamento e descongelamento das bactérias, aumento do tempo de incubação com lisozima e, passagem das bactérias a pressão através de uma seringa de 50 mL, porém, não foi possível obter a proteína purificada.

As proteínas SmJNK e SmERK1 purificadas foram utilizadas na tentativa de clivar a proteína de fusão GST utilizando o kit HRV protease. A Figura 21 representa a clivagem de SmJNK. Como esperado, observa-se que antes da clivagem a proteína apresentava o tamanho de 68 KDa, após a clivagem passou a apresentar 42 KDa. No caso da proteína SmERK1 não foi possível a realização da clivagem, pode ser que o folding da proteína tenha escondido o sítio de clivagem e como obtivemos um baixo rendimento na etapa de purificação, outros testes não puderam ser realizados.

Figura 21 - Clivagem da proteína de fusão GST da proteína SmJNK.



Gel representativo mostrando a clivagem da proteína de fusão GST (26 KDa) da proteína SmJNK (42 KDa). Controle positivo: proteína Syk. SmJNK + GST: proteína antes da clivagem. SmJNK clivada: proteína livre de GST. Padrão de Peso Molecular: *Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards* – Bio Rad. Gel corado com *InstantBlue* (Expedeon).

5.3. Desenvolvimento de um ensaio para análise da atividade das PKs recombinantes e triagem de moléculas disponíveis na MCCC

5.3.1. Confirmação por “*docking*” da ligação do ATP e da sonda BODIPY FL ATP-Y-S ao sítio de ligação do ATP da PKA

Como já foi dito anteriormente, as PKs são enzimas que regulam a atividade biológica de outras proteínas fosforilando aminoácidos específicos usando ATP como fonte de fosfato (HANKS; QUINN; HUNTER, 1988). Dessa forma, moléculas que são capazes de bloquear o sítio de ligação do ATP podem ser consideradas candidatas promissoras ao desenvolvimento de novas drogas para o tratamento de diversas doenças parasitárias (COHEN, 2002). Apesar do sítio de ligação do ATP ser considerado conservado dentre as PKs, pequenas diferenças existentes podem ser exploradas para induzir a seletividade das mesmas, como demonstrado pelo alto nível de seletividade alcançado para os inibidores de PKs (VULPETTI; BOSOTTI, 2004; WU; NIELSEN; CLAUSEN, 2015).

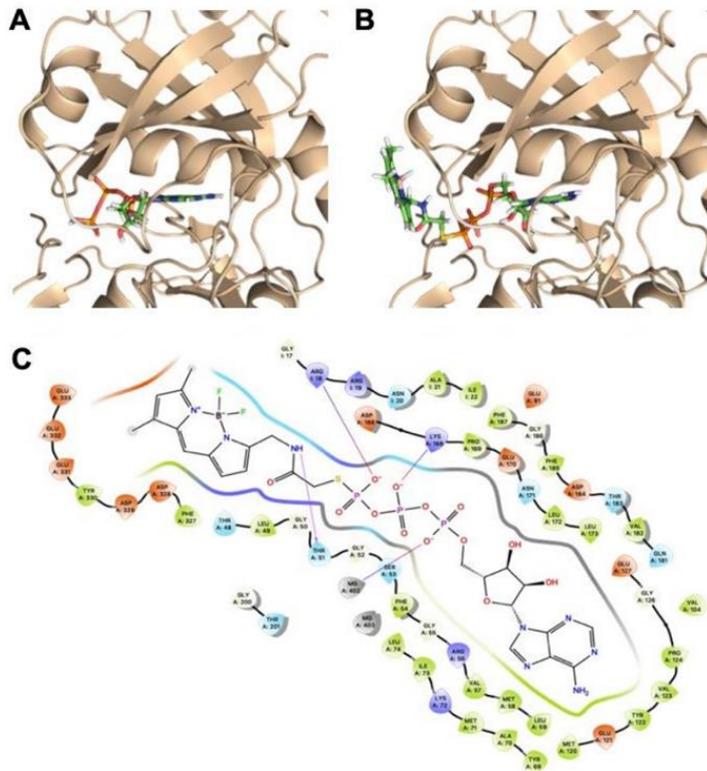
A ausência de um tratamento alternativo para a esquistossomose demonstra a necessidade da realização de pesquisas envolvendo a identificação de novas moléculas para o

combate da doença. Diferentemente da triagem empírica, em que a busca por novos medicamentos é feita pela procura de atividade biológica de inúmeras moléculas randomicamente, sem ter um alvo definido, a triagem racional identifica um alvo promissor e vital para o organismo e a partir da definição desse alvo, ocorre a busca de inibidores específicos. Isso aumenta a chance da descoberta de um maior número de moléculas promissoras em um período de tempo menor (GANE; DEAN, 2000; TAVARES *et al.*, 2016). E isso só foi possível devido ao avanço da tecnologia que permitiu a introdução de metodologias computacionais com objetivo de aumentar a eficiência na descoberta de novos fármacos (LIONTA *et al.*, 2014).

Neste trabalho as triagens foram realizadas através da abordagem racional com o intuito de desenvolver uma triagem de alto rendimento (HTS – *High-throughput screening*), uma vez que tínhamos um grande número de moléculas para serem testadas. Para isso buscamos o desenvolvimento de um ensaio baseado na análise de ligação de uma sonda análoga ao ATP (BODIPY® FL ATP- γ -S) conjugada à fluoresceína ao sítio catalítico das PKs. O ensaio baseia-se na medição da polarização da fluorescência causada pela presença dessa sonda e foi desenvolvido para análise da atividade de PKs e triagem de moléculas da biblioteca *Nottingham Managed Chemical Compound Collection* disponível na Universidade de Nottingham. As vantagens de um ensaio que analisa a polarização da fluorescência através de propriedades anisotrópicas de uma molécula são que eles são homogêneos, ou seja, não há necessidade de separar o ligante livre e o que foi ligado, são reprodutíveis, facilmente automatizados e apresentam um custo relativamente baixo (JAMESON; ROSS, 2010).

Primeiramente, foi feita uma predição da ligação do ATP e do BODIPY FL ATP- γ -S (adenosina 5'-O- (3-tiotrifosfato), BODIPY FL) no sítio de ligação ao ATP da PKA através de “docking” *in silico* pelo Dr. Tom Armstrong. Os resultados vistos no “docking” mostraram que a ligação do ATP, tanto natural quanto com a sonda apresentam bastante precisão (Figuras 22 A e B). Primeiramente, utilizamos PKA comercial para padronização, uma vez que tínhamos pouca quantidade de proteína purificada. Embora a sonda contenha um fluoróforo adicional relativamente grande, a análise de “docking” mostrou que ela não interage com nenhuma outra parte significativa da PKA, com exceção de uma ligação de hidrogênio entre a amida NH₂ e T51 (Figura 22 C), inclusive a ligação apresentada por ela se assemelha muito com a ligação da molécula natural de ATP (VULPETTI; BOSOTTI, 2004). Isso mostra que esta sonda é compatível com o ensaio que foi desenvolvido.

Figura 22 - “*Docking*” mostrando a ligação entre o ATP e a sonda BODIPY FL ATP- γ -S com o sítio de ligação ao ATP da PKA.

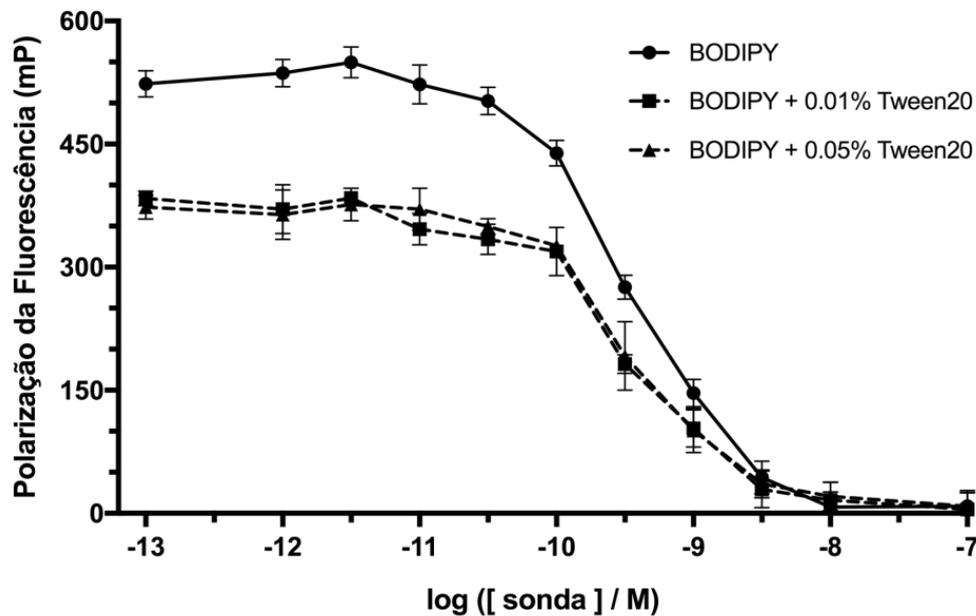


Posição de ligação predita do ATP (A) e da sonda ATP- γ -S BODIPY FL (B) na estrutura do cristal da PKA (PDB: 4WB5), mostrando que a sonda é projetada para fora do sítio de ligação do ATP. Estrutura de referência: carbono = verde; oxigênio = vermelho; nitrogênio = azul escuro; fósforo = laranja. (C) Mapa esquemático mostrando interações da sonda BODIPY dentro do sítio de ligação ao ATP da PKA. Aminoácidos são representados com três letras e sua posição correspondente na sequência de aminoácidos da PKA. MG = cátion magnésio (Mg^{2+}).

5.3.2. Análise da ligação de BODIPY™ FL ATP- γ -S e do inibidor H7 à PKA

Após a realização do “*docking*”, foi feita a padronização do experimento. Para isso, primeiramente foi escolhida uma concentração da sonda BODIPY™ FL ATP- γ -S a qual apresentasse um baixo valor de polarização da fluorescência da luz que é medida em milipolarização (mP), mas não total despolarização. Os valores correspondentes variam de 5×10^{-9} a 1×10^{-8} M (-8,5 a -8,0 no eixo X). Além disso, foram utilizadas diferentes concentrações de detergente Tween 20 (SIGMA) para evitar ligação inespecífica da sonda, fornecendo valores mais confiáveis para cada concentração de sonda (Figura 23).

Figura 23 - Curva resposta da concentração de sonda BODIPY FL ATP-Y-S medida pela polarização da fluorescência da luz (mP).



Curva contendo concentrações da sonda que variam de 1×10^{-13} a 1×10^{-7} M. Os círculos representam a sonda livre em uma solução contendo apenas PBS, os quadrados representam a sonda livre numa solução contendo 0,01% de Tween 20 diluídos em PBS, os triângulos representam a sonda livre numa solução contendo 0,05% de Tween 20 diluídos em PBS.

Como mostrado, as concentrações 1×10^{-13} a 1×10^{-10} M não provocaram a despolarização da luz, enquanto 1×10^{-7} M provocou a total despolarização da luz. As concentrações mais baixas próximas a total despolarização da luz (5×10^{-9} a 1×10^{-8} M) mostraram ser as melhores concentrações a serem utilizadas.

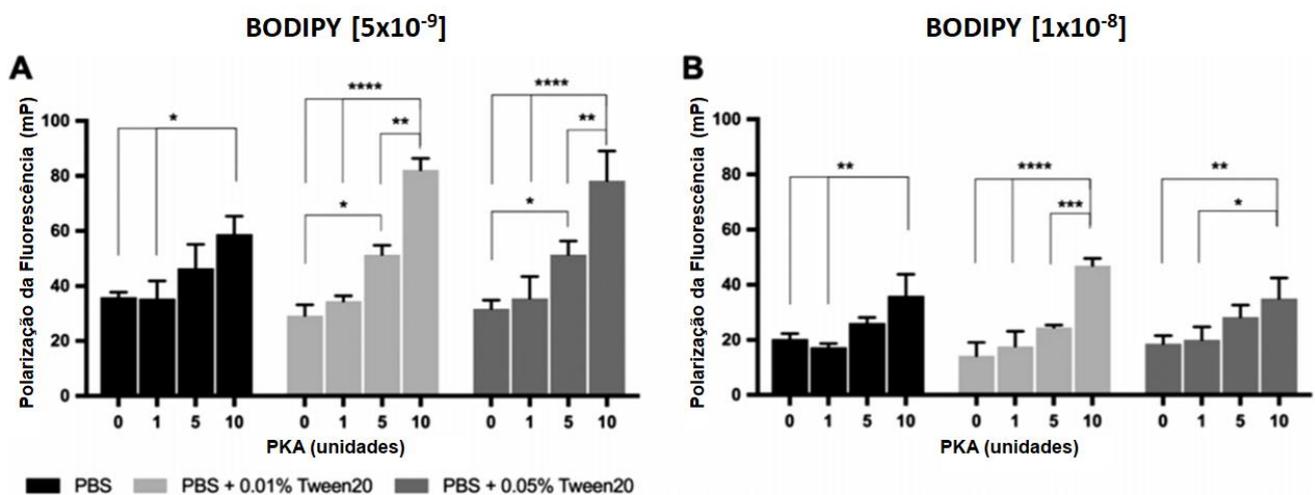
Ainda, a presença de detergente na amostra diminuiu o valor de mP em torno de 30% em cada concentração quando comparado com a amostra contendo somente a sonda, mostrando que a presença do detergente aumenta a ligação específica da sonda à PKA. Isso pode ser explicado devido ao fato de que detergentes não iônicos são geralmente usados como bloqueadores, o que evita ligações inespecíficas, diminuem possíveis ruídos que possam interferir na leitura do experimento e aumentam a sensibilidade do teste como é observado nos ensaios de imunotransferência (ZAMPIERI *et al.*, 2000).

Posteriormente, com o objetivo de determinar se a sonda se ligaria à proteína quinase e qual a concentração de PKA seria necessária para avaliar a mudança de polarização da fluorescência, foram testadas quatro diferentes quantidades de enzima com as duas concentrações diferentes da sonda (5×10^{-9} e 1×10^{-8}) e do detergente *Tween* 20 (0,01% e 0,05%) (Figura 24). Com o aumento da quantidade de PKA, ocorre um aumento no valor de

mP, o que indica que a luz sofreu polarização em relação ao controle (sem adição de PKA), uma vez que a sonda presente no meio se ligou à enzima.

Utilizando a sonda na concentração de 5×10^{-9} e Tween 20 a 0,01%, nota-se que as quantidades 5 e 10 unidades de PKA emitiram magnitudes dos sinais 40% e 65% maiores do que o controle, respectivamente. Optou-se por usar 5 unidades da PKA, uma vez que a quantidade permitiu um sinal confiável e com um custo mais baixo (Figura 24 A), assim a sonda na concentração de 5×10^{-9} apresentou resultados mais satisfatórios.

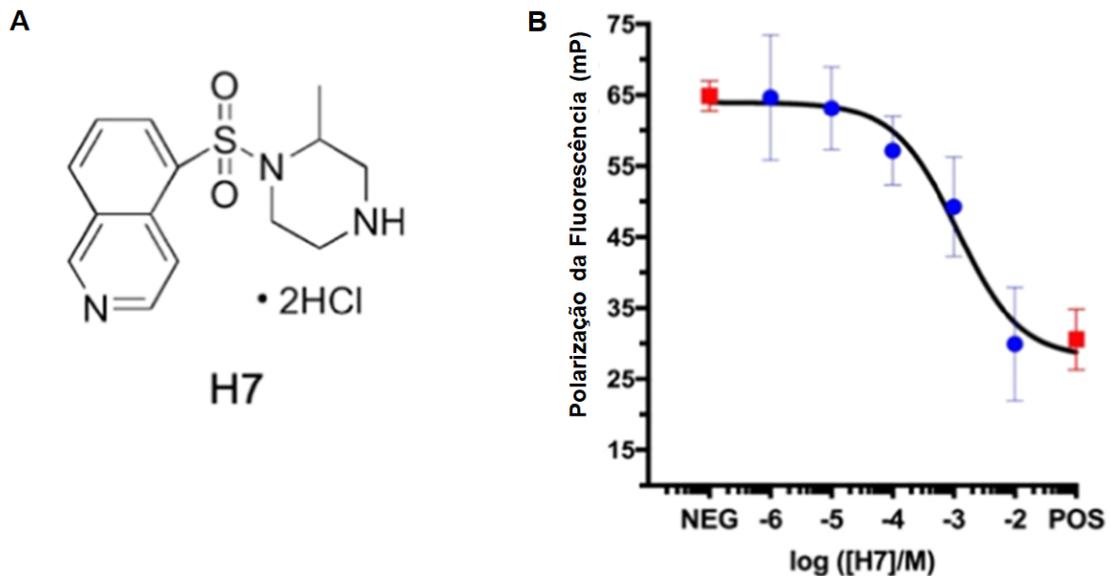
Figura 24 - Avaliação da polarização da fluorescência na presença da PKA.



As quantidades de 0, 1, 5 e 10 unidades de enzima PKA foram utilizadas para determinar o melhor sinal na repolarização da luz com concentrações diferentes de sonda BODIPY FL ATP-Y-S, 5×10^{-9} (A) e 1×10^{-8} (B). Em preto estão as diferentes quantidades de PKA testadas apenas com PBS. Em cinza claro estão as diferentes quantidades de PKA testadas, com 0,01% de Tween20. Em cinza escuro estão as diferentes quantidades de PKA testadas com 0,05% de Tween20. Análises estatísticas foram feitas utilizando two-way ANOVA e o teste de múltipla comparação de Tukey (*, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$, ***, $p \leq 0,001$, ****, $p \leq 0,0001$).

Diante destes resultados, foi visto que quantidades mais altas da enzima (10 unidades) causaram um aumento dos valores de polarização na presença ou na ausência do detergente (Figura 24). Os menores valores observados usando 1×10^{-8} M da sonda indica que nesta concentração, pode ter ocorrido uma saturação irreversível do sinal causado pela sonda livre (Figura 24 B). Esses dados indicam que seria possível usar a cinética entre a PKA e a sonda para identificar moléculas que podem bloquear essa mesma interação. Para confirmar isso, um inibidor de sítio de ligação do ATP comercial, H7 (HIDAKA *et al.*, 1984), foi utilizado para validar esse ensaio (Figura 25 A). Como mostrado na Figura 25 B, o H7 inibiu a ligação da sonda à PKA de forma dose-dependente com um valor de IC_{50} de aproximadamente 1,13 mM.

Figura 25 - Ensaio de competição entre a sonda BODIPY FL ATP-Y-S e o inibidor H7 na presença de PKA.



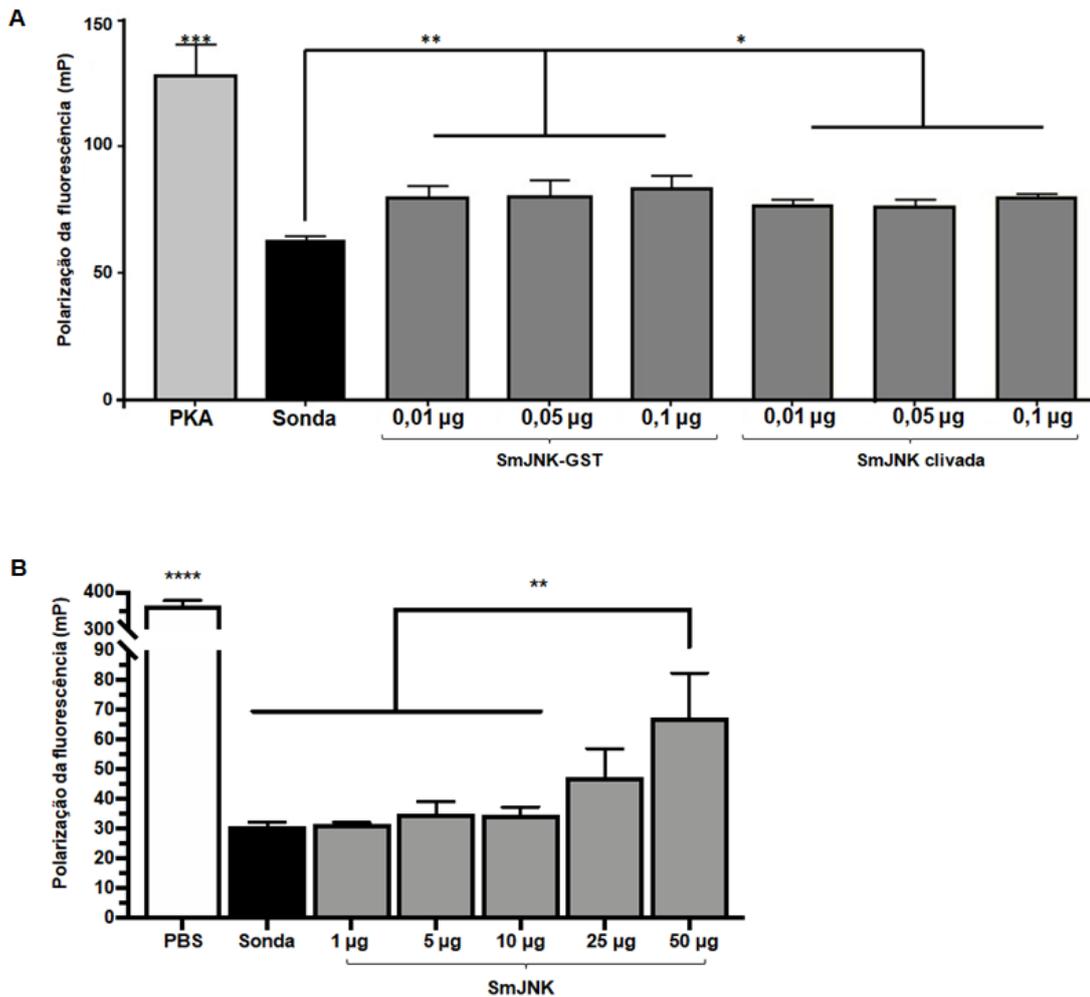
(A) Estrutura do inibidor H7. (B) A curva do gráfico representa o bloqueio da ligação entre a sonda e a PKA pelo inibidor H7. A sonda foi incubada com a PKA e diferentes concentrações de H7 (1×10^{-2} a 1×10^{-6}). Os dados foram ajustados no GraphPad Prism em Log (inibidor) vs resposta com inclinação variável.

Como mostrado na Figura 20 A (tópico 5.2), a proteína SmJNK recombinante apresentou um maior rendimento ao ser purificada e por isso ela foi utilizada na realização do teste de atividade utilizando este ensaio. Na Figura 25 A, observa-se que ao utilizar esta proteína fundida ao GST os sinais de polarização da fluorescência aumentam 20% nas concentrações de 0,01 μ g e 0,05 μ g e 22% quando utilizamos esta proteína na concentração de 0,1 μ g comparadas com o controle. Com a proteína SmJNK clivada para a remoção de GST, foi observada uma redução de cerca de 15% nos sinais emitidos pela sonda utilizando as três concentrações diferentes comparadas com o controle. Apesar da SmJNK recombinante ter sido a proteína que apresentou o maior rendimento na purificação comparada as outras PKs, a quantidade obtida não foi suficiente para realizarmos outros testes com uma concentração maior da mesma.

A Figura 26 B representa os resultados obtidos ao avaliarmos a capacidade da sonda BODIPY de se ligar a proteína SmJNK recombinante, mas desta vez expressa em células Sf9 de insetos (etapa realizada pela Dra. Camilla Valente). É possível observar que ao aumentarmos a concentração da proteína, o sinal emitido pela sonda também aumenta chegando a 60% quando utilizamos 50 μ g de SmJNK comparando com o controle que seria a

sonda BODIPY sozinha. Isso mostra que a sonda foi capaz de se ligar à SmJNK expressa em células de insetos e que a proteína estava ativa. Provavelmente, este resultado não foi visto ao utilizarmos a SmJNK expressa em bactérias devido a quantidade da proteína obtida e testada.

Figura 26 - Capacidade de ligação da sonda BODIPY FL ATP-Y-S à proteína recombinante SmJNK.



A: Diferentes concentrações da proteína recombinante SmJNK expressa em bactérias fundidas com GST e clivadas para remoção do GST foram incubadas com a sonda BODIPY FL ATP-Y-S. Como controles foram utilizados apenas a sonda BODIPY FL ATP-Y-S e a proteína PKA ligada a sonda B: Diferentes concentrações da proteína recombinante SmJNK expressa em células de inseto Sf9 foram incubadas com a sonda BODIPY FL ATP-Y-S. Como controle foram utilizados apenas o PBS e apenas a sonda. Acima das barras estão representados o erro padrão da média de três réplicas. Análises estatísticas foram feitas utilizando one-way ANOVA e o teste de múltipla comparação de Tukey. (*, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$, ***, $p \leq 0,001$, ****, $p \leq 0,0001$).

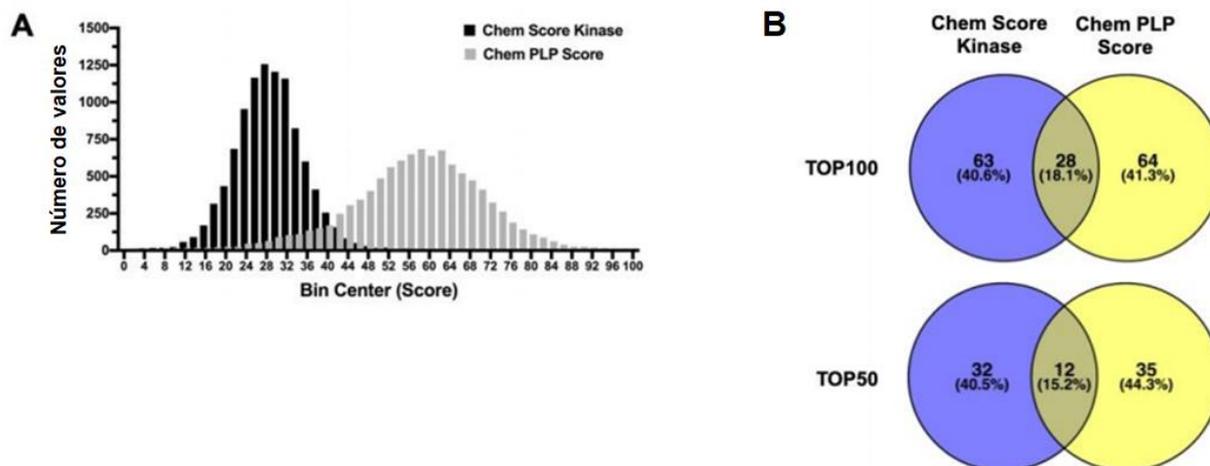
5.3.3. Análise de “docking” da PKA contra moléculas disponíveis na *Managed Chemical Compound Library* (MCCC) da Universidade de Nottingham.

A análise de “docking” com 10.000 moléculas da MCCC foi realizada utilizando as funções *ChemScore Kinase* e *ChemPLP Score* da plataforma *Genetic Optimization for Ligand Docking* (GOLD) pelo Dr. Tom Armstrong. GOLD é um programa desenvolvido pelo *Cambridge Crystallographic Data Centre* – CCDC (Centro de Dados Cristalográficos de Cambridge), que permite o “docking” entre moléculas, tendo disponíveis parâmetros que avaliam a estabilidade da interação entre as estruturas (JONES *et al.*, 1997). Para a realização do “docking” foram escolhidas duas funções de “score” utilizadas para classificar as interações encontradas através do uso de um algoritmo genético. Essas funções de “score” fornecem uma escala de pontuação que avaliam a orientação espacial dos ligantes e as interações moleculares relevantes, ou seja, quanto maior o “score”, melhor será o resultado de ligação dessas moléculas. A função *ChemScore* leva em consideração a energia livre total que ocorre na ligação entre moléculas, a área de contato hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, a flexibilidade do ligante e interações metálicas. A *ChemPLP* é a função padrão do GOLD e usa o chamado “Piece-wise linear potential” (PLP) para interações hidrofóbicas e não complementares, ligações de van der Waals além de termos da função de pontuação *ChemScore* para pontes de hidrogênio e energia interna (JONES *et al.*, 1997; VERDONK *et al.*, 2003).

Apesar de um recente estudo ter analisado diversas plataformas de “docking” e ter sugerido que os “scores” gerados pelo *ChemPLP Score* é mais preciso na reprodução de estruturas experimentais do que a função *ChemScore Kinase* (TUCCINARDI *et al.*, 2010), nós optamos por utilizar as duas funções para que as análises fossem mais robustas. A faixa de valores obtidos para as mesmas 10.000 moléculas foi significativamente diferente entre as duas funções (Figura 27 A). A função *ChemScore Kinase* forneceu “scores” significativamente mais baixos do que a função *ChemPLP Score*. Além disso, essas funções mostraram uma grande divergência em relação às moléculas que apresentaram maiores “scores”. Como pode ser observado na Figura 27 B, ao sobrepor os resultados das duas funções considerando os 100 melhores “scores” de cada uma, foram identificadas apenas 28 (18,1%) moléculas comuns entre as duas funções e apenas 12 (15,2%) considerando os 50 melhores “scores”. Isso sugere que o *ChemScore Kinase* produz “scores” empiricamente mais baixos, mas produz tendências semelhantes à função *ChemPLP Score*. Algumas moléculas apresentaram “scores” excepcionalmente altos em uma das funções. A avaliação biológica

desses compostos pelo nosso ensaio sugeriu que a função *ChemPLP Score* é melhor em termos da sua capacidade de identificar reais potenciais inibidores.

Figura 27 - Análise da ligação das moléculas à PKA através de docking utilizando duas funções diferentes: *ChemScore Kinase* e *ChemPLP Score*.



(A) Distribuição dos “scores” obtidos através da predição realizada pelo *Chem Score Kinase* e *ChemPLP Score*.
 (B) Diagrama de Venn comparando os “scores” mais altos em 100 moléculas testadas (Top 100) e em 50 (Top 50) de ambas as funções. Em azul: “scores” obtidos pelo *Chem Score Kinase*. Em amarelo: “scores” obtidos pelo *ChemPLP Score*.

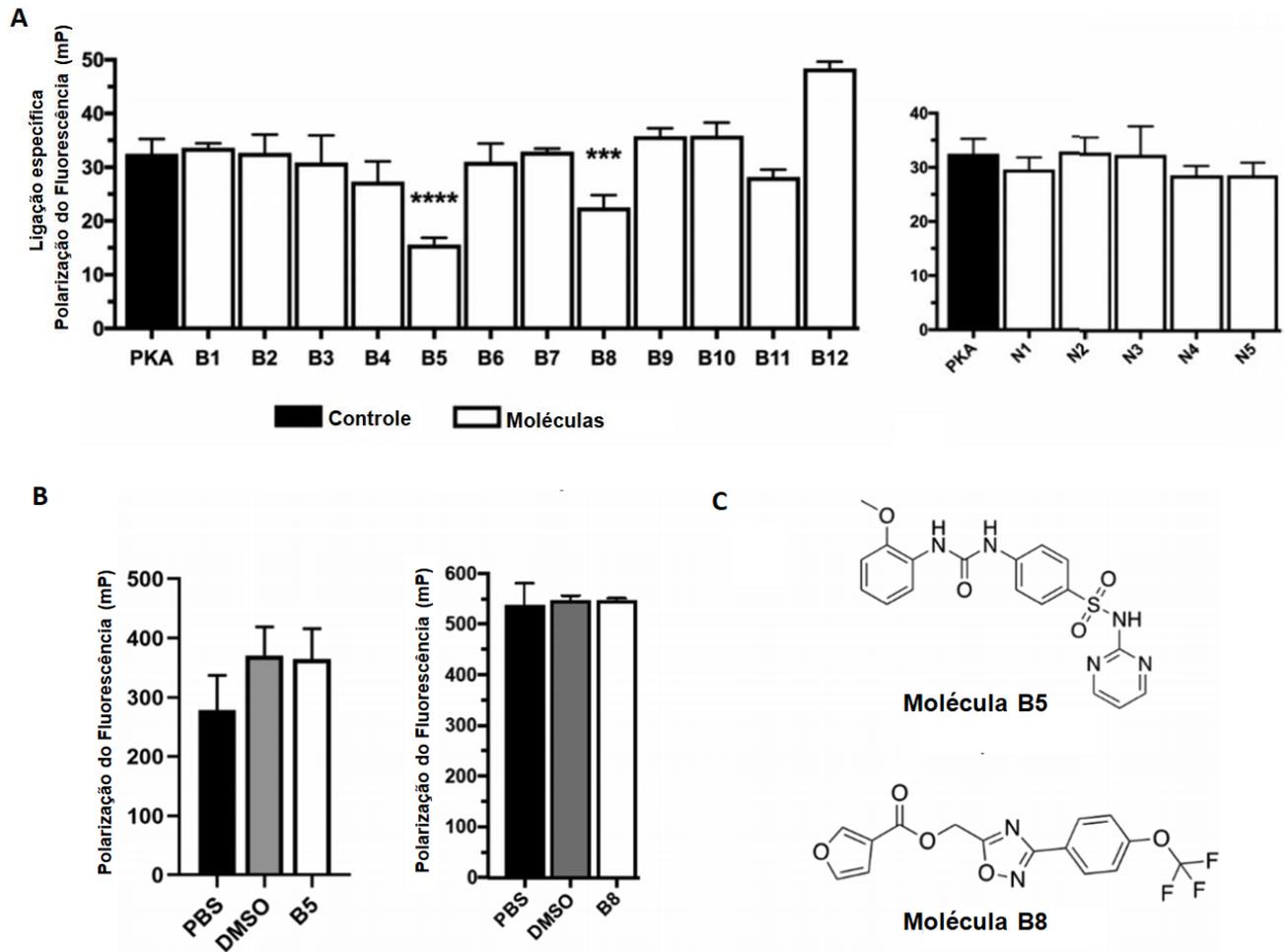
Para o próximo passo, foram selecionadas as 12 moléculas que apresentaram os “scores” mais altos nas duas funções, além de 5 moléculas que apresentaram “score” negativo que foram utilizadas como controles negativos (Tabela 2).

Tabela 2. Comparação dos “scores” obtidos pelo *ChemScore Kinase* e *ChemPLP Score* utilizando 17 moléculas diferentes

ID	ID no MCCC	<i>ChemScore Kinase</i>	<i>ChemPLP Score</i>
<i>Positivos</i>			
B1	NCC-00066504	62.79	100.77
B2	NCC-00069179	60.16	108.41
B3	NCC-00068966	56.95	99.12
B4	NCC-00063353	55.62	101.23
B5	NCC-00027360	53.02	93.79
B6	NCC-00073056	52.97	92.98
B7	NCC-00071565	52.31	99.53
B8	NCC-00067960	52.13	93.54
B9	NCC-00062976	51.55	97.02
B10	NCC-00063592	51.45	95.70
B11	NCC-00070778	48.47	91.73
B12	NCC-00066895	48.07	95.12
<i>Negativos</i>			
N1	NCC-00000100	-28.25	-17.98
N2	NCC-00000176	-5.98	-10.25
N3	NCC-00000179	-5.27	-48.39
N4	NCC-00000267	18.91	-82.98
N5	NCC-00006655	15.14	-29.74

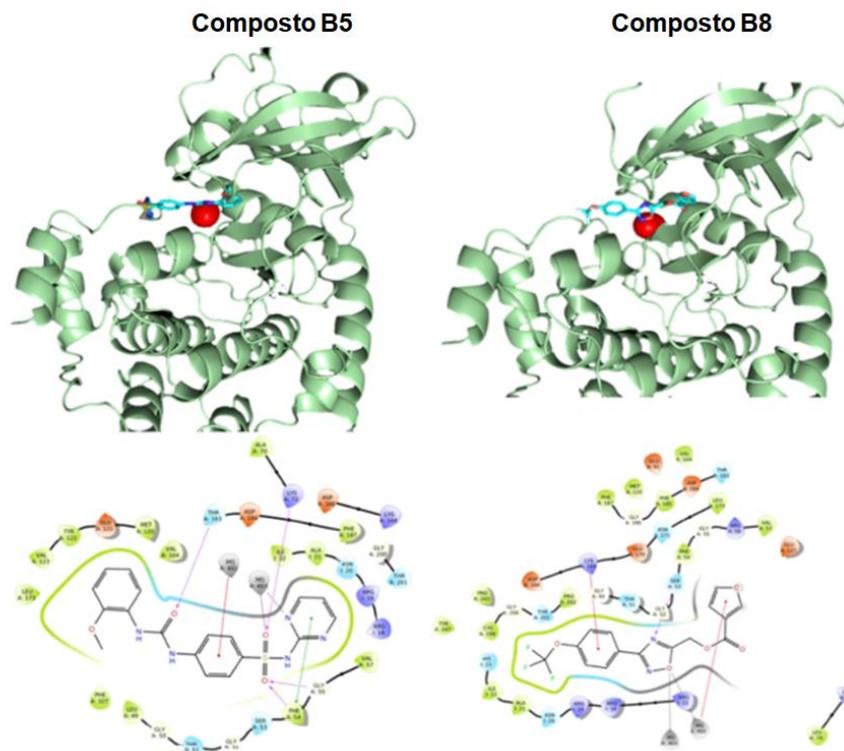
As moléculas selecionadas foram testadas quanto à sua capacidade de inibir a ligação PKA - Sonda. Como mostrado na Figura 28 A, duas de doze moléculas inibiram significativamente a ligação PKA – Sonda. Além disso, a mudança detectável no valor de mP representa a ligação competitiva da molécula à PKA e não uma interferência da própria molécula no sinal da sonda como é mostrado na Figura 28 B. A estrutura das moléculas (Figura 28 C) e seus respectivos “dockings” (Figura 29) indicam que elas possuem uma ligação forte e específica ao sítio de ligação ao ATP da PKA. A molécula B5 mimetiza interações semelhantes às da sonda, o grupo uréia interage com os íons Mg^{2+} e o anel metoxi benzeno ocupa um espaço semelhante ao anel de adenosina no ATP (Figura 29 A). A molécula B8 também interage com os íons Mg^{2+} através do anel de cinco membros e o grupo trifluorometoxi ocupa uma região hidrofóbica no sítio de ligação (Figura 29 B).

Figura 28 - Triagem de moléculas para avaliar a capacidade das mesmas de inibir a ligação entre a sonda e a PKA comercial.



(A) As barras do gráfico representam os valores de polarização da fluorescência (mP) referente a ligação ou não da PKA com cada uma das doze moléculas previstas por “*docking*” (B1-B12, positivas; N1-N5, negativas). Acima das barras estão representados o erro padrão da média de 3 réplicas. Análises estatísticas foram feitas utilizando o teste ANOVA unidirecional e o teste de múltipla comparação de Tukey. (B) Valores de polarização da fluorescência para as moléculas positivas B5 e B8 incubadas com PBS ou DMSO. Acima das barras estão representados o erro padrão da média de três réplicas. (C) Estrutura dos compostos B5 e B8. (** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$).

Figura 29 - Predição da ligação das moléculas B5 e B8 em PKA.



Estrutura cristalina da PKA (PDB: 4WB5) ligada aos compostos B5 (esquerda) e B8 (direita) se assemelha à ligação realizada com o ATP natural. Estrutura de referência: carbono = ciano; oxigênio = vermelho; nitrogênio = azul escuro; fluoreto = azul claro; enxofre = laranja; Mg^{2+} é representado por bolas vermelhas. Os mapas esquemáticos inferiores representam as interações dos compostos B5 (esquerda) e B8 (direita) no sítio de ligação ao ATP. Os aminoácidos são representados por três letras com sua posição correspondente na seqüência de aminoácidos da PKA. MG = cátion magnésio (Mg^{2+}).

Resumindo, os resultados mencionados acima validam a estratégia de triagem *in silico* e mostram que o ensaio desenvolvido é uma importante ferramenta para avaliar se uma determinada molécula pode inibir a ligação do ATP à uma enzima através da análise do deslocamento da polarização da fluorescência que é provocada por uma sonda liberada pela enzima na presença de um inibidor. Este ensaio será muito útil e com bom custo-benefício para realização de triagens em *high-throughput* de diferentes moléculas que tem como alvo as PKs para a descoberta de novos medicamentos contra diferentes organismos.

Os resultados obtidos na padronização e no desenvolvimento deste teste foram publicados neste ano (MOREIRA *et al.*, 2020).

5.4. Priorização *in silico* de moléculas pertencentes à biblioteca MCCC contra as PKs SmERK1, SmERK2, Smp38 e SmJNK.

A triagem *in silico* foi realizada através de análises de “*docking*” com cerca de 80.000 moléculas disponíveis na biblioteca MCCC da Universidade de Nottingham para cada uma das PKs de interesse, SmERK1, SmERK2, Smp38 e SmJNK e seus correspondentes em humanos. Esta etapa foi realizada em colaboração com o Dr. Tom Armstrong.

Para a seleção das moléculas a serem testadas *in vitro*, foram realizadas três análises diferentes, como explicado no item 4.5.1. Ao final destas três análises, foram escolhidas um total de 140 moléculas de interesse que foram selecionados para a triagem *in vitro* (Quadro 7 e 8). Dentre elas quinze específicas para SmERK1, dez para SmERK2, nove para SmJNK, quinze para Smp38. Além disso, algumas moléculas se mostraram promissoras para todas essas quinases, sendo assim, elas foram agrupadas no grupo Pan quinases e para este grupo foram identificadas 91 moléculas. Essas moléculas foram diluídas para a concentração estoque de 5 mM em dimetilsulfóxido (DMSO) 100% de modo que a concentração final de DMSO a ser adicionada na cultura não fosse superior a 1%.

Quadro 7. Lista de moléculas selecionadas para triagem *in vitro* tendo com alvo as PKs SmERK1, SmERK2, SmJNK e Smp38.

ID da amostra (MCCC)	Alvo	ID da amostra (MCCC)	Alvo
NCC-00017983	SmERK1	NCC-00090518	SmJNK
NCC-00007314	SmERK1	NCC-00016898	SmJNK
NCC-00035747	SmERK1	NCC-00078626	SmJNK
NCC-00055010	SmERK1	NCC-00029042	SmJNK
NCC-00029213	SmERK1	NCC-00040491	SmJNK
NCC-00026645	SmERK1	NCC-00053156	SmJNK
NCC-00037495	SmERK1	NCC-00059111	SmJNK
NCC-00082698	SmERK1	NCC-00018787	SmJNK
NCC-00008484	SmERK1	NCC-00036486	SmJNK
NCC-00028622	SmERK1	NCC-00029738	Smp38
NCC-00047636	SmERK1	NCC-00031769	Smp38
NCC-00049336	SmERK1	NCC-00012979	Smp38
NCC-00056912	SmERK1	NCC-00015832	Smp38
NCC-00027542	SmERK1	NCC-00019131	Smp38
NCC-00009861	SmERK1	NCC-00070703	Smp38
NCC-00036319	SmERK2	NCC-00076827	Smp38
NCC-00044009	SmERK2	NCC-00001994	Smp38
NCC-00029944	SmERK2	NCC-00009031	Smp38
NCC-00070302	SmERK2	NCC-00014089	Smp38
NCC-00017507	SmERK2	NCC-00029718	Smp38
NCC-00081729	SmERK2	NCC-00027587	Smp38
NCC-00046544	SmERK2	NCC-00049859	Smp38
NCC-00049492	SmERK2	NCC-00052702	Smp38
NCC-00001563	SmERK2	NCC-00013544	Smp38
NCC-00003592	SmERK2		

Quadro 8. Lista de moléculas selecionadas para triagem *in vitro* tendo como alvo todas as PKs.

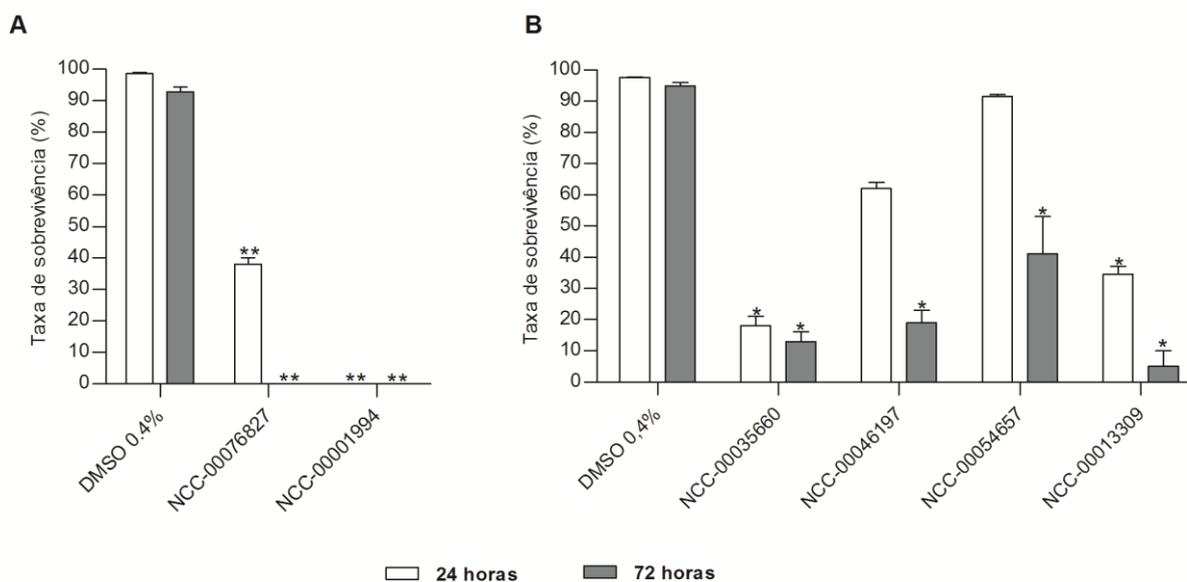
ID da amostra (MCCC)	Alvo	ID da amostra (MCCC)	Alvo	ID da amostra (MCCC)	Alvo
NCC-00075699	Pan quinase	NCC-00015486	Pan quinase	NCC-00074063	Pan quinase
NCC-00068627	Pan quinase	NCC-00068995	Pan quinase	NCC-00054317	Pan quinase
NCC-00042943	Pan quinase	NCC-00029360	Pan quinase	NCC-00010728	Pan quinase
NCC-00076070	Pan quinase	NCC-00016193	Pan quinase	NCC-00003770	Pan quinase
NCC-00018113	Pan quinase	NCC-00018286	Pan quinase	NCC-00014104	Pan quinase
NCC-00045394	Pan quinase	NCC-00038473	Pan quinase	NCC-00050699	Pan quinase
NCC-00061557	Pan quinase	NCC-00086403	Pan quinase	NCC-00052305	Pan quinase
NCC-00065146	Pan quinase	NCC-00078696	Pan quinase	NCC-00054715	Pan quinase
NCC-00061001	Pan quinase	NCC-00020251	Pan quinase	NCC-00049854	Pan quinase
NCC-00012106	Pan quinase	NCC-00084130	Pan quinase	NCC-00079641	Pan quinase
NCC-00083943	Pan quinase	NCC-00069832	Pan quinase	NCC-00044358	Pan quinase
NCC-00027148	Pan quinase	NCC-00081425	Pan quinase	NCC-00000767	Pan quinase
NCC-00041194	Pan quinase	NCC-00001515	Pan quinase	NCC-00013309	Pan quinase
NCC-00069113	Pan quinase	NCC-00084291	Pan quinase	NCC-00055585	Pan quinase
NCC-00074605	Pan quinase	NCC-00067868	Pan quinase	NCC-00027880	Pan quinase
NCC-00035660	Pan quinase	NCC-00047992	Pan quinase	NCC-00054079	Pan quinase
NCC-00062160	Pan quinase	NCC-00066976	Pan quinase	NCC-00048932	Pan quinase
NCC-00070183	Pan quinase	NCC-00049052	Pan quinase	NCC-00012370	Pan quinase
NCC-00003100	Pan quinase	NCC-00046197	Pan quinase	NCC-00036376	Pan quinase
NCC-00005963	Pan quinase	NCC-00000971	Pan quinase	NCC-00035180	Pan quinase
NCC-00048090	Pan quinase	NCC-00069648	Pan quinase	NCC-00055840	Pan quinase
NCC-00078044	Pan quinase	NCC-00054657	Pan quinase	NCC-00052590	Pan quinase
NCC-00032017	Pan quinase	NCC-00081760	Pan quinase	NCC-00043796	Pan quinase
NCC-00007072	Pan quinase	NCC-00046587	Pan quinase	NCC-00065625	Pan quinase
NCC-00062307	Pan quinase	NCC-00052360	Pan quinase	NCC-00088841	Pan quinase
NCC-00004353	Pan quinase	NCC-00043367	Pan quinase	NCC-00049235	Pan quinase
NCC-00041388	Pan quinase	NCC-00005445	Pan quinase	NCC-00007185	Pan quinase
NCC-00030093	Pan quinase	NCC-00073456	Pan quinase	NCC-00070487	Pan quinase
NCC-00072661	Pan quinase	NCC-00057163	Pan quinase	NCC-00057337	Pan quinase
NCC-00002778	Pan quinase	NCC-00036579	Pan quinase	NCC-00056751	Pan quinase
NCC-00078268	Pan quinase				

5.5. Triagem *in vitro* de moléculas pertencentes à biblioteca MCCC contra as PKs SmERK1, SmERK2, Smp38 e SmJNK em esquistossômulos

Primeiramente foi feita a busca de moléculas ativas em esquistossômulos, uma vez que esta fase apresenta maior rendimento em cultura e o fármaco disponível para tratamento da esquistossomose não apresenta atividade na forma imatura. Assim, foram utilizadas três metodologias diferentes para análise de viabilidade do parasito. Após a coloração com iodeto de propídio, os esquistossômulos mortos eram contados. Consideramos como ativas aquelas moléculas que induziram pelo menos 50% de mortalidade dos parasitos.

Moléculas que foram previstas para se ligar no sítio de ligação ao ATP de SmERK1, SmERK2 e SmJNK não se mostraram ativas quando levamos em consideração a mortalidade dos esquistossômulos, já que nenhuma foi capaz de matar 50% dos parasitos expostos a elas (dados não mostrados). Analisando a atividade dos inibidores que apresentavam a proteína Smp38 como alvo, foram identificadas duas moléculas ativas, sendo que uma delas (NCC-00001994) teve a capacidade de matar 100% dos esquistossômulos já nas primeiras 24 h de incubação. A outra molécula ativa (NCC-00076827) também foi responsável por causar altas taxas de mortalidade, sendo que após 24 h de exposição essa taxa foi de 62%, passando para 100% após 72 h de incubação (Figura 30 A). Além disso, quatro moléculas que possuem afinidade para todas as PKs alvo deste estudo (Pan quinases) foram ativas neste experimento. Duas delas se mostraram ativas desde as análises realizadas com 24 h de incubação, NCC-00035660 e NCC-00013309, causando mortalidade de 82% e 65,5% dos esquistossômulos, respectivamente. Após 72 horas de exposição, os compostos NCC-00035660, NCC-00046197, NCC-00054657 e NCC-00013309 promoveram uma mortalidade dos parasitos de 87%, 81%, 59% e 95%, respectivamente (Figura 30 B).

Figura 30 – Taxa de sobrevivência de esquistossômulos expostos a moléculas ativas da MCCC na concentração de 20 μ M.

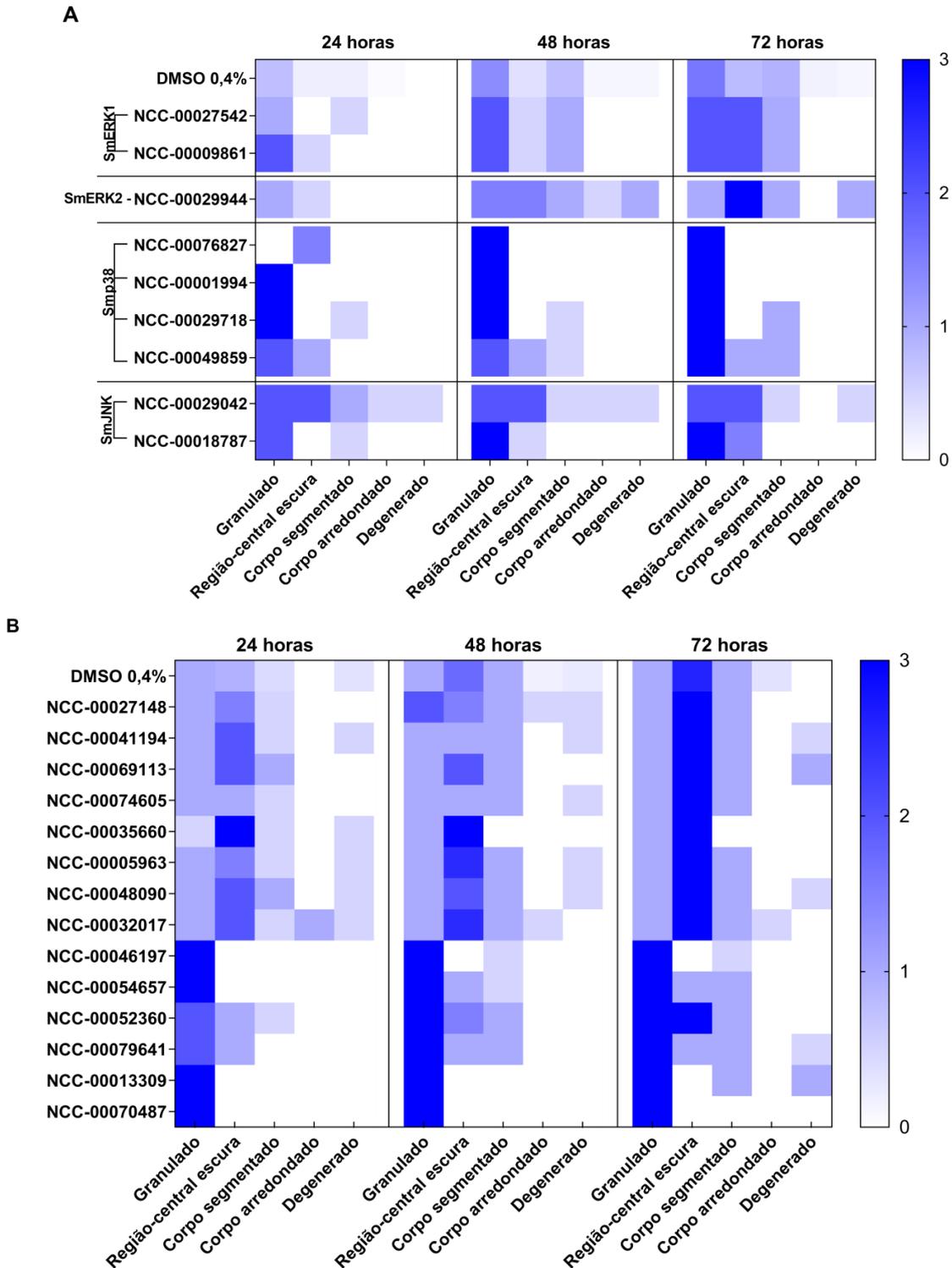


As barras dos gráficos representam a média de sobrevivência (%) de esquistossômulos expostos por 24 horas (branco) e 72 horas (cinza) à 0,4% de DMSO (controle negativo) ou à moléculas (20 μ M) com afinidade prevista ao sítio de ligação ao ATP de Smp38 (A) e para todas as PKs (Pan quinase) (B). Acima das barras estão representadas o erro padrão. As análises estatísticas foram feitas utilizando o teste de Mann-Whitney. (* p <0,05 e ** p <0,01).

A Figura 31 mostra a análise visual para avaliação de alterações fenotípicas realizadas nos parasitos expostos a diferentes moléculas preditas como inibidoras das PKs. Foram consideradas ativas aquelas que receberam pelo menos o “*score*” 2 em dois ou mais parâmetros avaliados ou um “*score*” 3 em pelo menos um parâmetro. Os inibidores preditos para SmERK1, NCC-00027542 e NCC-00009861, apresentaram “*score*” de 2, ou seja, foram capazes de induzir alterações na viabilidade em cerca de 50% dos parasitos expostos a eles considerando a granulabilidade e surgimento de uma região central escura em esquistossômulos. Um inibidor predito para SmERK2 também provocou alterações morfológicas nos parasitos após 72 horas de exposição a eles. A molécula NCC-00029944 apresentou um “*score*” 3, ao induzir o aparecimento de uma região central escura em mais de 50% dos parasitos. Quatro compostos que foram preditos para se ligarem à Smp38 causaram granulabilidade em mais de 50% dos esquistossômulos após 72 horas de incubação (NCC-00076827, NCC-00001994, NCC-00029718 e NCC-00049859), sendo que NCC-00001994 e NCC-00029718 induziram esse fenótipo já nas primeiras 24 horas. Além disso, após 72 horas, parasitos expostos ao NCC-00029738 apresentaram “*score*” 2, já que cerca de 50% deles apresentaram granulabilidade e região central escura. Após 72 horas de incubação, a molécula NCC-00029042 predita para SmJNK provocou granulabilidade e região central escura em cerca de 50% dos esquistossômulos e mais de 50% dos parasitos expostos ao inibidor NCC-00018787 mostraram-se com granulabilidade, recebendo o “*score*” 3 (Figura 31 A).

Levando em consideração as moléculas que teriam como alvo todas as PKs deste estudo (Pan quinases), nota-se que parasitos expostos as moléculas NCC-00027148, NCC-00041194, NCC-00069113, NCC-00074605, NCC-00035660, NCC-00005963, NCC-00005963, NCC-00048090 e NCC-00032017 receberam “*score*” 3 por mais de 50% deles apresentarem uma região central escura. As moléculas NCC-00046197, NCC-00054657, NCC-00079641, NCC-00013309 e NCC-00070487 foram responsáveis por causar granulabilidade na maioria dos esquistossômulos após 24 h de exposição a elas recebendo também o “*score*” 3. Ao expor os parasitos à molécula NCC-00052360, mais de 50% deles apresentaram granulabilidade já a partir de 24 h de exposição e uma região central escura a partir de 48 h (Figura 31 B).

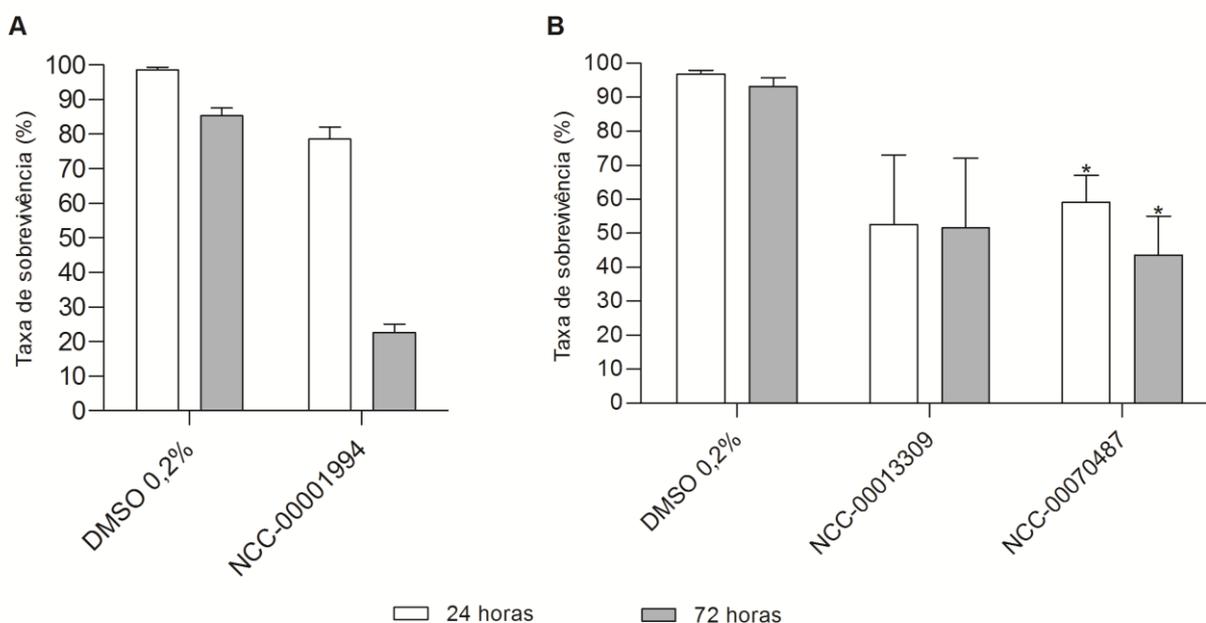
Figura 31 - Alterações morfológicas de esquistossômulos expostos a moléculas ativas da MCCC na concentração de 20 μ M.



Heatmaps representando a média dos “scores” atribuída aos esquistossômulos expostos ao DMSO a 0,4% (controle negativo) ou à moléculas (20 μ M) preditas para se ligar ao sítio de ligação ao ATP de SmERK1, SmERK2, SmJNK, Smp38 (A) e para todas as PKs (B) após 24 (esquerda), 48 (centro) e 72 horas (direita). Os fenótipos dos esquistossômulos foram quantificados de acordo com os seguintes parâmetros: granulidade, região central escura, corpo segmentado, corpo arredondado e degeneração. As pontuações dadas foram de 0 (branco) a 3 (azul escuro).

Aquelas moléculas que se mostraram ativas na concentração de 20 μM , foram novamente avaliadas na concentração de 10 μM . De 23 moléculas testadas, três delas foram ativas nessa nova concentração ao avaliarmos o parâmetro mortalidade. A molécula NCC-00001994, predita como inibidora de Smp38, apresentou uma mortalidade de 22% e de 78% após 24 e 72 h de exposição, respectivamente (Figura 32 A). Ao avaliarmos a molécula predita como inibidora Pan quinases, a molécula NCC-00013309 apresentou aproximadamente 50% de mortalidade nos parasitos expostos a ela, enquanto que a molécula NCC-00070487 causou uma mortalidade de 41% e 56% após exposição a ela por 24h e 72h, respectivamente (Figura 32 B).

Figura 32 – Taxa de sobrevivência de esquistossômulos expostos a moléculas ativas da MCCC na concentração de 10 μM .

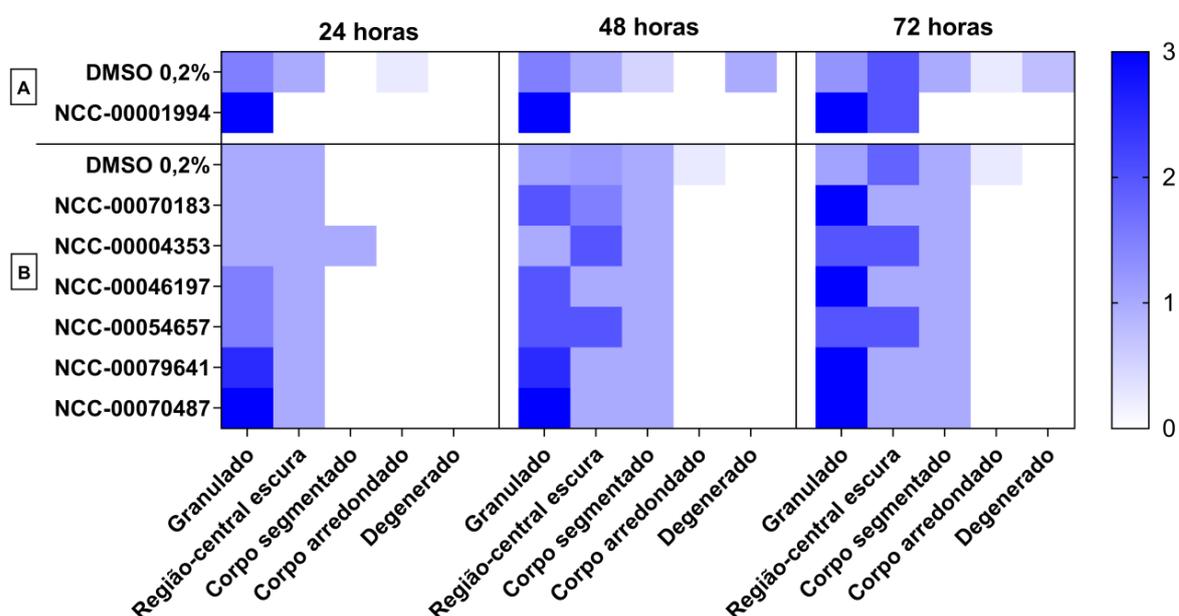


As barras dos gráficos representam a média de sobrevivência (%) de esquistossômulos expostos por 24 horas (branco) e 72 horas (cinza) à 0,2% de DMSO (controle negativo) ou à moléculas (10 μM) com afinidade predita ao sítio de ligação ao ATP de Smp38 (A) e para todas as PKs (Pan quinase) (B). Acima das barras estão representadas o erro padrão. As análises estatísticas foram feitas utilizando o teste de Mann-Whitney. * $p < 0,05$.

Análises fenotípicas também foram realizadas novamente utilizando esta nova concentração das moléculas. Tendo como alvo a proteína Smp38, uma molécula também foi ativa na concentração de 10 μM , a NCC-00001994, e novamente apresentou o “score” 3, sendo que mais de 50% dos parasitos apresentaram granulocidade já nas primeiras 24 h de exposição (Figura 33 A). Mais de 50% de parasitos expostos às moléculas NCC-00070183, NCC-00046197, NCC-00079641 e NCC-00070487 preditas como inibidoras Pan quinases,

apresentaram granulose, sendo que estes dois ultimos citados, a mudana de fen3tipo ja foi observada com 24 h de exposiao, enquanto o restante ap3s 72 h de exposiao. Ap3s 72 h de incubaiao a mol3cula NCC-00004353 apresentou “score” 2, ou seja, cerca de 50% dos parasitos apresentaram alteraes fen3ticas caracterizadas por granulose e pelo surgimento de uma regi3o central escura, enquanto que ao utilizarmos a mol3cula NCC-00054657 este mesmo fen3tipo foi observado com 48 h de incubaiao (Figura 33 B).

Figura 33 - Alteraes morfol3gicas de esquistoss3mulos expostos a mol3culas ativas da MCCC na concentrao de 10 μ M.



Heatmaps representando a m3dia dos “scores” atribu3da aos esquistoss3mulos expostos ao DMSO a 0,2% (controle negativo) ou 3 mol3culas (10 μ M) preditas para se ligar ao s3tio de ligaao ao ATP de Smp38 (A) e para todas as PKs (Pan quinases) (B) ap3s 24 (esquerda), 48 (centro) e 72 horas (direita). Os fen3tipos dos esquistoss3mulos foram quantificados de acordo com os seguintes par3metros: granulose, regi3o central escura, corpo segmentado, corpo arredondado e degeneraao. As pontuaes dadas foram de 0 (branco) a 3 (azul escuro).

O padr3o ouro para avaliaao da viabilidade de parasitos na realizaao de triagens de drogas 3 a observaao microsc3pica que identifica alteraes fen3ticas, como mudana na forma, tamanho, cor e motilidade dos organismos que foram expostos a diferentes subst3ncias (ABDULLA *et al.*, 2009; GLASER *et al.*, 2015; RESSURREIAO *et al.*, 2016; ROJO-ARREOLA *et al.*, 2014). Entretanto essas an3lises podem ser subjetivas, demandando que apenas uma pessoa faa essas avaliaes. Al3m disso, parasitos podem apresentar caracter3sticas de mortos mesmo quando vi3veis (KEISER, 2010; TAVARES *et al.*, 2016). Um estudo realizado comparando diferentes metodologias para realizaao de uma triagem de 400 mol3culas provenientes do *Pathogen Box* contra esquistoss3mulos, concluiu que as

metodologias avaliadas, de observação em microscópio e análises de metabólitos através do XTT, foram concordantes e que a melhor estratégia para aumentar a identificação dos compostos ativos é a combinação de diferentes abordagens (MACCESI *et al.*, 2019). Nossos resultados também mostram a importância da utilização de mais de uma metodologia para análise de viabilidade do parasito em triagem de drogas. Vimos que apesar de poucas moléculas causarem mortalidade em esquistossômulos, muitas delas provocaram importantes alterações fenotípicas que interferem na viabilidade do parasito.

5.6. Triagem *in vitro* de moléculas pertencentes à biblioteca MCCC contra as PKs SmERK1, SmERK2, Smp38 e SmJNK em vermes adultos

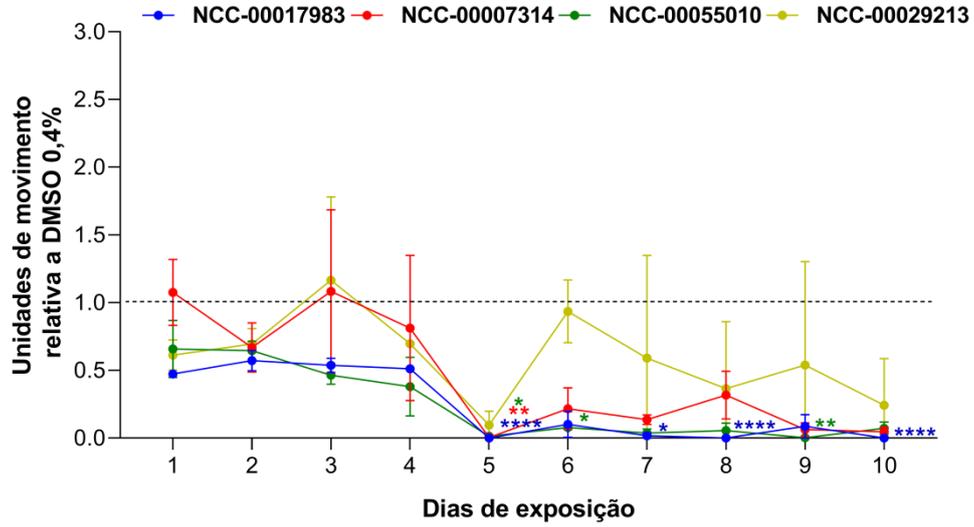
Vermes adultos de *S. mansoni* também foram expostos a inibidores preditos em se ligar no sítio de ligação ao ATP de PKs. Para verificar o efeito dessas moléculas na fase adulta do parasito, a motilidade de fêmeas e machos foi analisada por dez dias. Consideramos ativas aquelas moléculas que possuíram a capacidade de reduzir a motilidade no verme em mais de 50% no décimo dia de exposição.

Levando em consideração moléculas específicas para a proteína SmERK1, foram identificadas sete ativas para fêmeas. As moléculas NCC-00017983, NCC-00007314, NCC-00055010 e NCC-00029213 foram capazes de reduzir bruscamente em 100% o movimento de fêmeas após o quinto dia de exposição. Essa redução na motilidade continuou até o décimo dia em parasitos expostos às moléculas NCC-00017983 e NCC-00055010, indicando a morte desses vermes. Ao serem expostas à molécula NCC-00007314, no oitavo dia de exposição as fêmeas recuperaram 30% de motilidade comparadas com o controle, mas já no nono dia elas reduziram novamente em 100% sua motilidade, mantendo-se assim até o décimo dia. Com relação a molécula NCC-00029213, no sexto dia de exposição as fêmeas tiveram um aumento de motilidade de 100%, e a partir do sétimo dia esse número começou a reduzir novamente, chegando a 76% de redução no décimo dia de exposição (Figura 34 A). Ao expormos as fêmeas de vermes adultos às moléculas NCC-00082689, NCC-00028622 e NCC-00047636 um padrão de motilidade bem semelhante foi observado entre elas. Ao longo dos dez dias de observação, as fêmeas apresentaram uma motilidade constante, com reduções de cerca de 40% no terceiro e no sexto dia. No décimo dia a redução de motilidade foi de 65% (Figura 34 B).

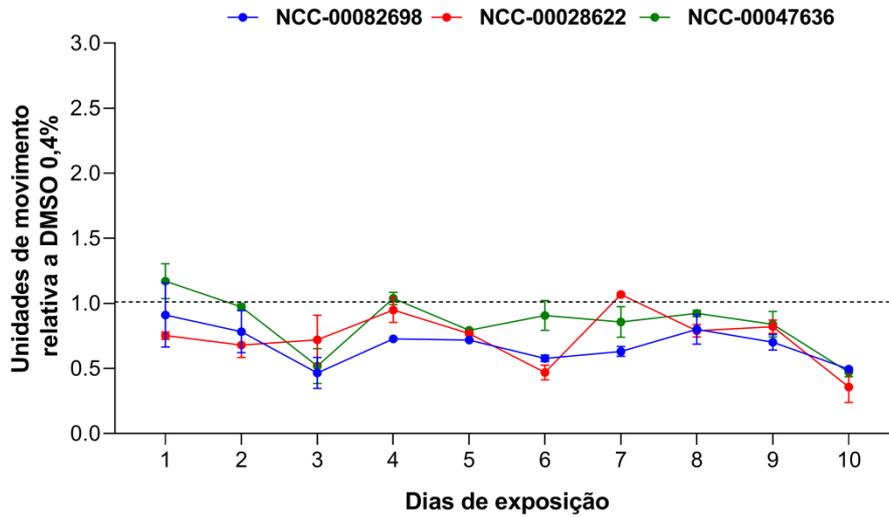
Apenas uma molécula, a NCC-00017983, que também foi ativa para fêmeas, foi ativa para machos quando consideramos como alvo a proteína SmERK1. A exposição dessa molécula causou uma redução gradual na motilidade dos vermes, sendo que já no segundo dia foi observado uma redução de 35% de motilidade, chegando a 70% no décimo dia de exposição (Figura 34 C).

Figura 34 - Avaliação da motilidade de vermes adultos machos e fêmeas expostos às moléculas preditas como inibidoras de SmERK1.

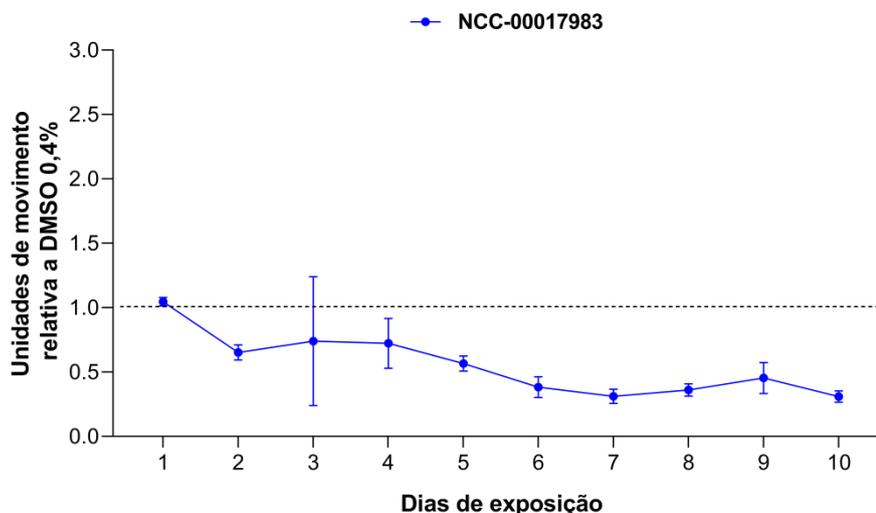
A



B



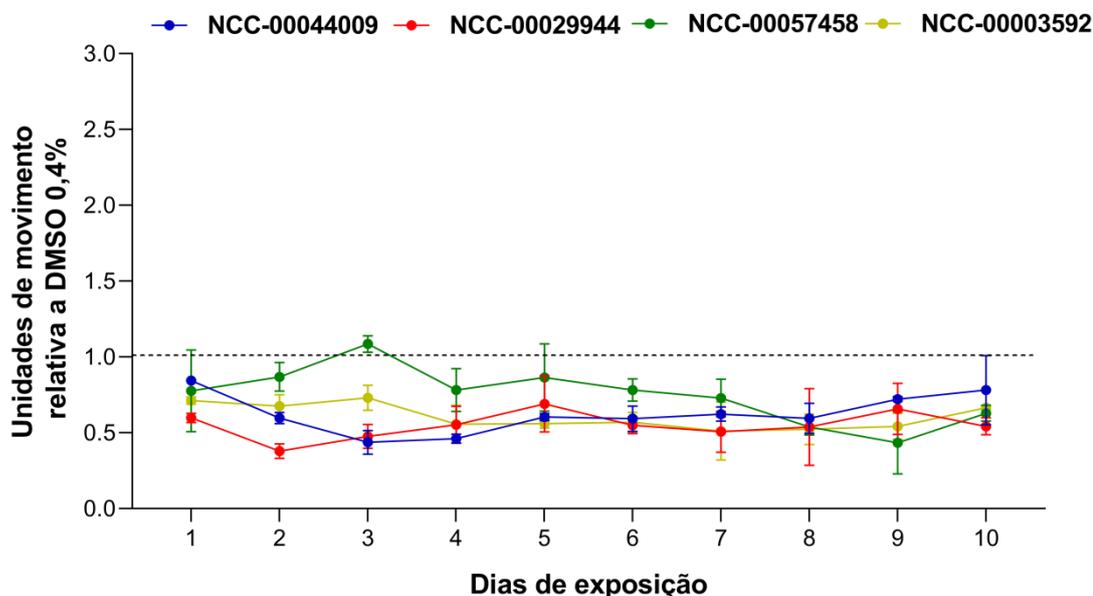
C



O gráfico representa a média das unidades de movimento de vermes adultos fêmeas (A e B) e machos (C) expostas à inibidores preditos para SmERK1 ao longo de dez dias. As unidades de movimento foram normalizadas de acordo com as unidades de movimento de vermes adultos incubados com DMSO a 0,4% (linha pontilhada). Cada um dos inibidores está representado por uma cor, como mostrado na legenda de cada gráfico. Em cada ponto está representado o desvio padrão. A análise estatística foi feita pelo Two-way ANOVA e Sidak como pós-teste. (*, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$, ***, $p \leq 0,001$, ****, $p \leq 0,0001$), $n=2$.

A figura 35 mostra a motilidade de fêmeas ao serem incubadas com os inibidores preditos para a proteína SmERK2: NCC-00044009, NCC-00029944, NCC-00057458 e NCC-00003592. Apesar de nenhuma delas terem sido ativas considerando nosso parâmetro de avaliação, os vermes apresentaram uma redução constante no movimento de cerca de 40% até o nono dia. Embora indique uma alteração no movimento, elas não atingiram o *threshold* estabelecido para serem consideradas moléculas ativas.

Figura 35 - Avaliação da motilidade de vermes adultos fêmeas expostos às moléculas preditas como inibidoras de SmERK2.



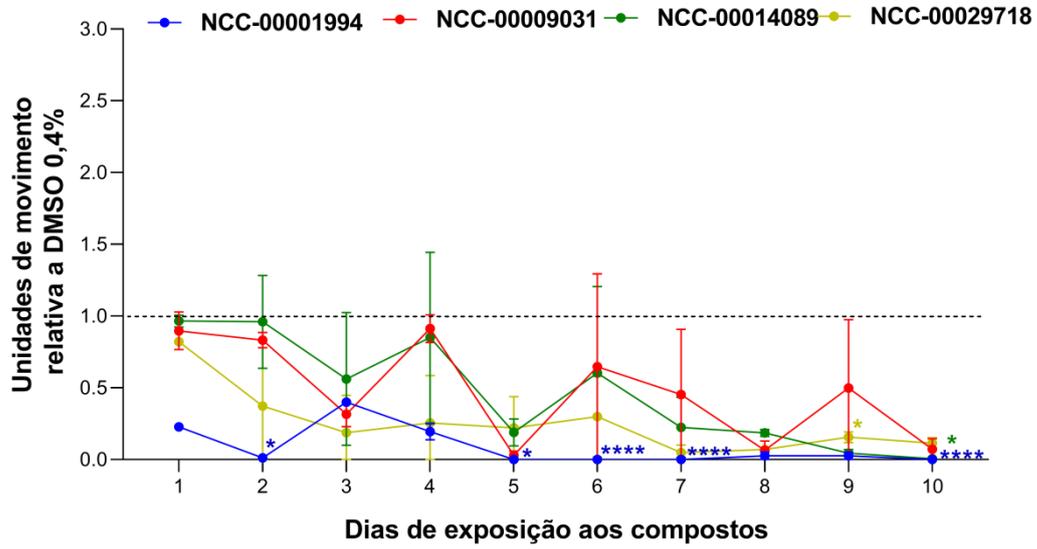
O gráfico representa a média das unidades de movimento de vermes adultos fêmeas expostos à inibidores preditos para SmERK2 ao longo de dez dias. As unidades de movimento foram normalizadas de acordo com as unidades de movimento de vermes adultos incubados com DMSO a 0,4% (linha pontilhada). Cada um dos inibidores está representado por uma cor, como mostrado na legenda de cada gráfico. Em cada ponto está representado o desvio padrão. A análise estatística foi feita pelo Two-way ANOVA e Sidak como pós-teste. n=2.

Considerando a proteína Smp38 como alvo, foram identificadas oito moléculas ativas para vermes adultos fêmeas. A molécula NCC-00001994 foi capaz de reduzir em 78% a motilidade de fêmeas já no primeiro dia de exposição, chegando a 100% no quinto dia e se mantendo até o décimo dia, indicando a morte desses parasitos. As moléculas NCC-00009031 e NCC-00014089 provocaram um comportamento semelhante em fêmeas, uma redução de aproximadamente 55% no terceiro dia de exposição e de 90% a partir do quinto dia, atingindo 100% no décimo dia, quando comparado com o grupo controle exposto apenas a DMSO. A motilidade das fêmeas expostas à molécula NCC-00029718 foi reduzida em 63% no segundo dia, sendo constante ao longo dos dias até atingir 89% no décimo dia de exposição (Figura 36 A). Quando consideramos as moléculas NCC-00027587, NCC-00049859 e NCC-00052702, nota-se que elas causaram uma redução brusca de aproximadamente 80% na motilidade de fêmeas no quinto dia de exposição reduzindo no sétimo dia (90%) o que se manteve até o décimo dia. A molécula NCC-00013544 provocou uma redução de 90% no quarto dia de exposição que manteve até o décimo dia (Figura 36 B).

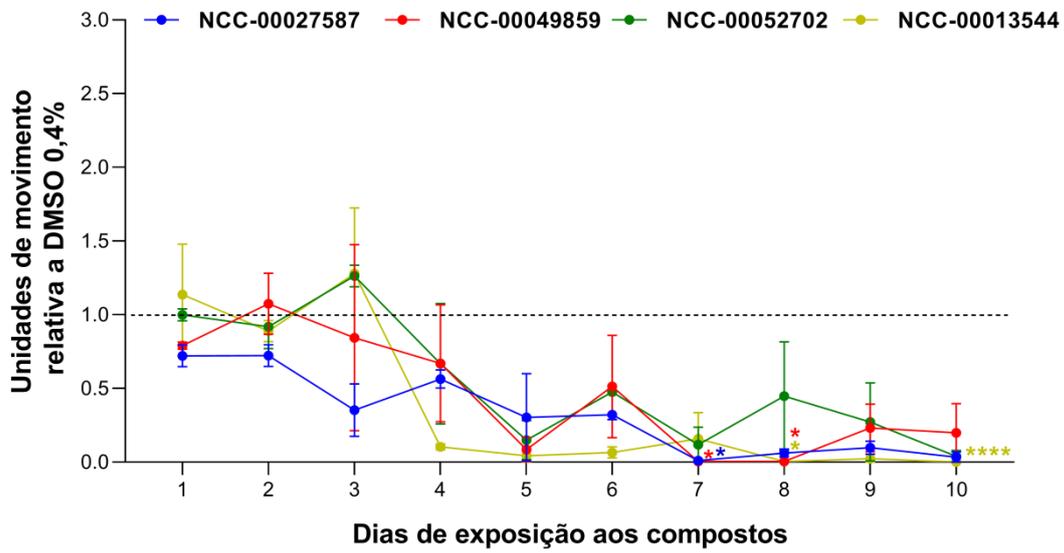
A Figura 36 C representa os resultados obtidos com a exposição de machos às moléculas preditas para Smp38. Interessantemente, a molécula NCC-00001994 causou um comportamento similar ao visto em fêmeas que foram expostas a ela. Em machos, essa molécula foi capaz de reduzir a motilidade de machos em 87% no sexto dia quando comparamos com o controle e no sétimo dia não foi detectado nenhum movimento. Ao analisar as moléculas NCC-00012979, NCC-00076827, NCC-00009031 NCC-00029718 observa-se que elas ocasionaram uma redução no movimento no sétimo dia dos machos e posteriormente aumentou novamente no dia seguinte. No décimo dia os machos expostos a essas quatro moléculas exibiram uma redução em 64% de sua motilidade ao ser comparado com o controle exposto apenas ao DMSO.

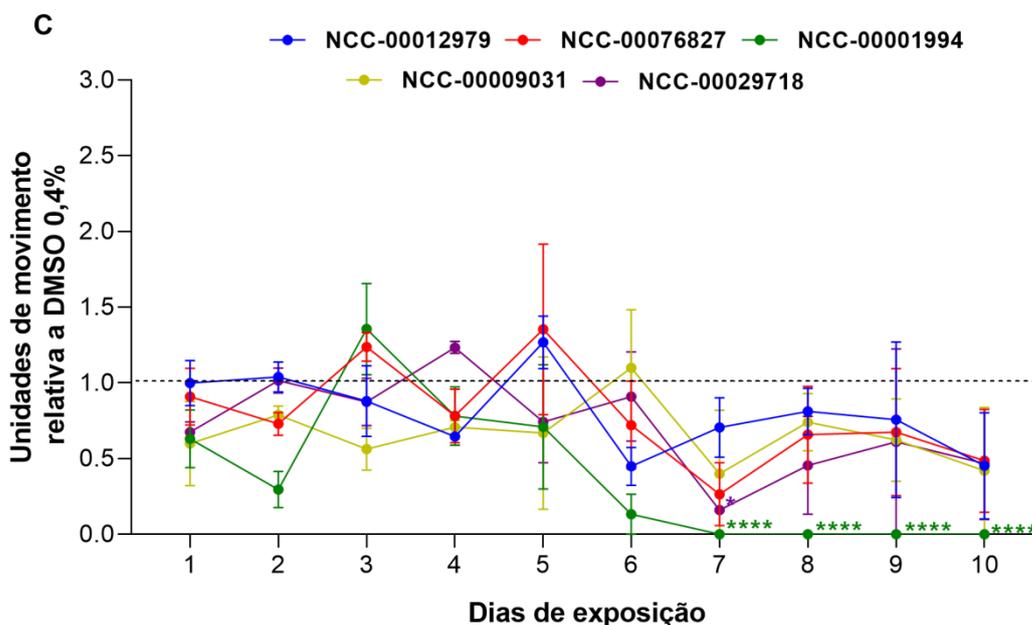
Figura 36 - Avaliação da motilidade de vermes adultos machos e fêmeas expostos às moléculas preditas como inibidoras de Smp38.

A



B

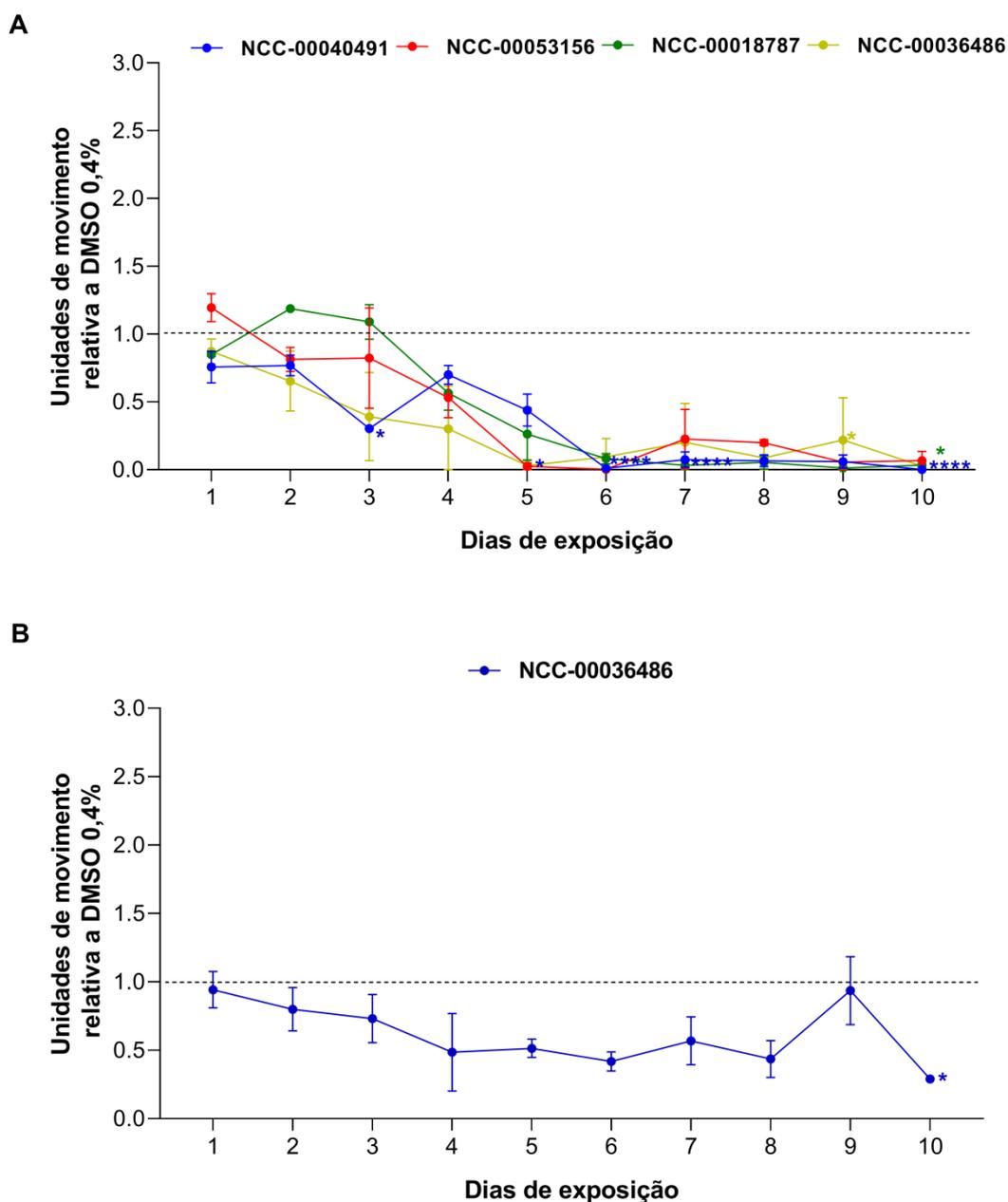




O gráfico representa a média das unidades de movimento de vermes adultos fêmeas (A e B) e machos (C) expostas à inibidores preditos para Smp38 ao longo de dez dias. As unidades de movimento foram normalizadas de acordo com as unidades de movimento de vermes adultos incubados com DMSO à 0,4% (linha pontilhada). Cada um dos inibidores está representado por uma cor, como mostrado na legenda de cada gráfico. Em cada ponto está representado o desvio padrão. A análise estatística foi feita pelo Two-way ANOVA e Sidak como pós-teste. (*, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$, ***, $p \leq 0,001$, ****, $p \leq 0,0001$), $n=2$.

Quatro moléculas foram consideradas ativas em fêmeas quando analisamos àquelas que foram preditas para a proteína SmJNK. Ao expormos os parasitos às moléculas NCC-00040491, NCC-00018787 houve uma redução de 100% na motilidade dessas fêmeas no sexto dia de exposição que se manteve até o décimo dia, indicando que estes parasitos estavam mortos. Utilizando a molécula NCC-00053156, após a uma queda brusca (100%) em sua motilidade no quinto dia, as fêmeas recuperaram parcialmente e voltaram a reduzir em 100% no nono e no décimo dia de exposição. A molécula NCC-00036486 também provocou uma redução de 100% na motilidade dos vermes no quinto dia de exposição o que se manteve até o décimo dia (Figura 37 A). Ao expormos os vermes adultos machos às moléculas preditas como inibidoras de SmJNK, uma delas foi ativa, a NCC-00036486. Foi observada uma redução contínua de cerca de 50% entre o quarto e o oitavo dia de exposição, que foi reduzida novamente em 72% no décimo dia (Figura 37 B).

Figura 37 - Avaliação da motilidade de vermes adultos machos e fêmeas expostos às moléculas previstas como inibidoras de SmJNK.



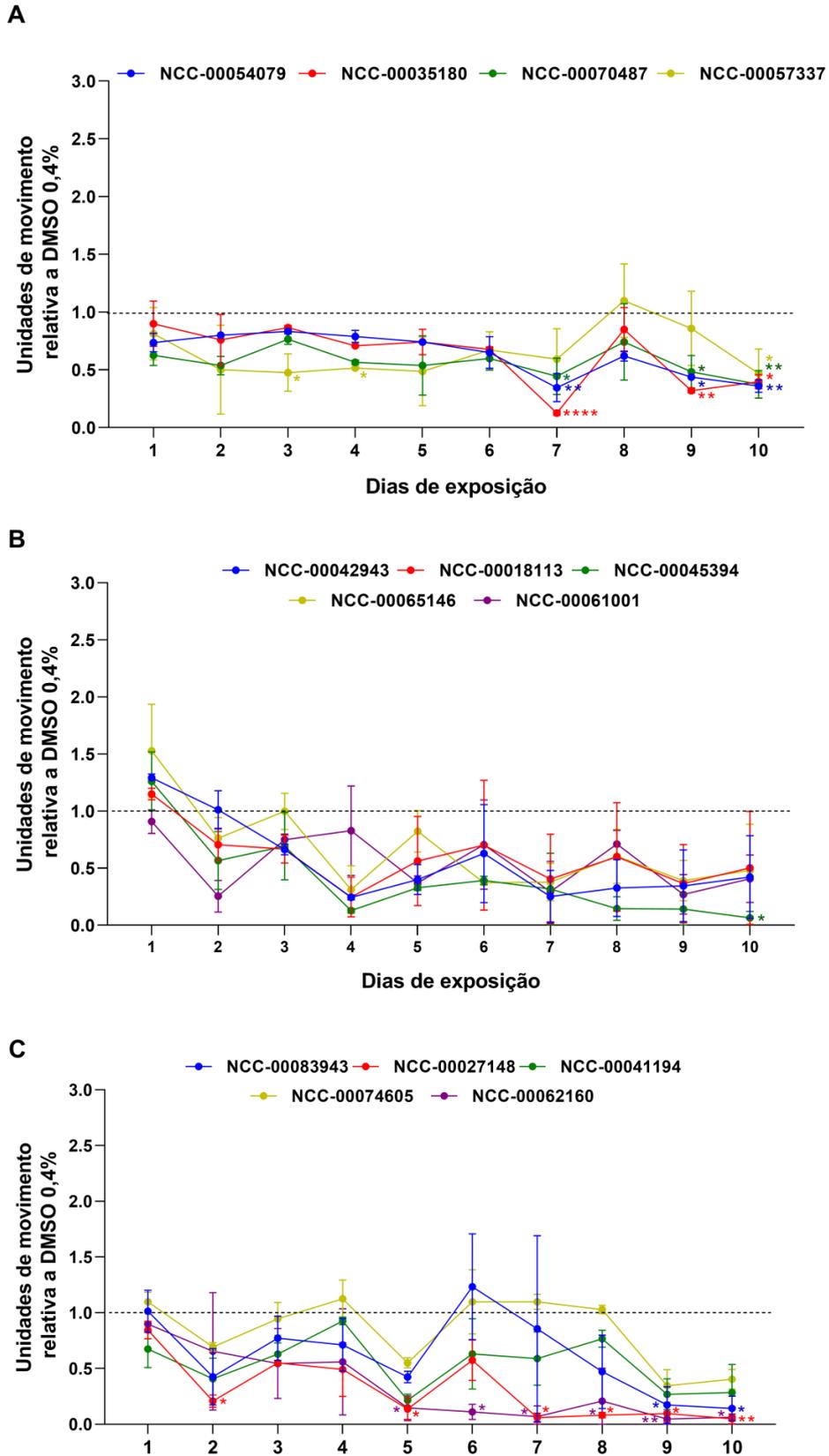
O gráfico representa a média das unidades de movimento de vermes adultos fêmeas (A) e machos (B) expostas à inibidores previstos para SmJNK ao longo de dez dias. As unidades de movimento foram normalizadas de acordo com as unidades de movimento de vermes adultos incubados com DMSO a 0,4% (linha pontilhada). Cada um dos inibidores está representado por uma cor, como mostrado na legenda de cada gráfico. Em cada ponto está representado o desvio padrão. A análise estatística foi feita pelo Two-way ANOVA e Sidak como pós-teste. (*, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$; ****, $p \leq 0,0001$), $n=2$.

Foram identificadas 24 moléculas ativas para vermes adultos fêmeas tendo como alvo as Pan quinases. As moléculas NCC-00054079, NCC-00035180, NCC-00070487 e NCC-

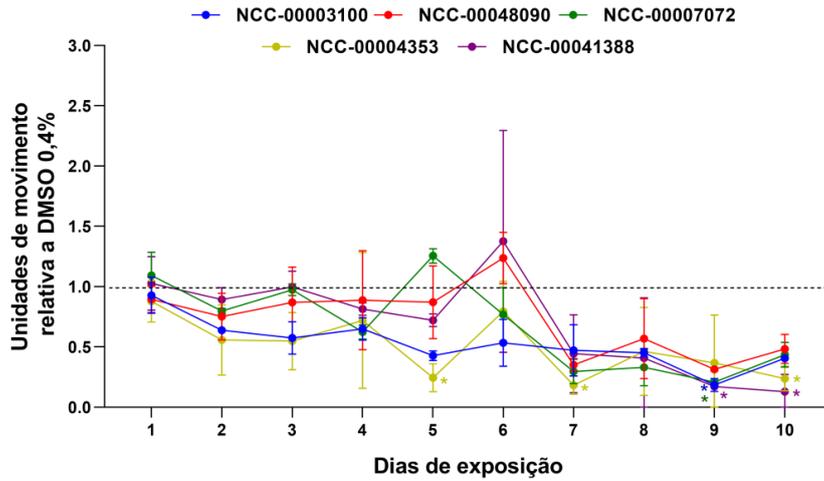
00057337 causaram uma redução de aproximadamente 35% na motilidade dos parasitos que se manteve do primeiro ao sexto dia. No oitavo dia, a motilidade aumenta ligeiramente, mas já diminui novamente em 63% comparado ao controle no décimo dia (Figura 38 A). Ao analisarmos os parasitos expostos às moléculas NCC-00042943, NCC-00018113, NCC-00045394 e NCC-00065146 nota-se uma redução na motilidade de 76% no quarto dia de exposição que se manteve até o décimo dia, com exceção da molécula NCC-00045394, que no décimo dia não apresentou motilidade comparado ao controle. A molécula NCC-00061001 provocou uma redução na motilidade de fêmeas de 75% no segundo dia de exposição, que apesar de ser observado algumas variações ao longo dos dez dias avaliados, essa redução se manteve e chegou a 60% no décimo dia de exposição (Figura 38 B). Foi observada uma redução de cerca de 55% na motilidade de parasitos expostos às moléculas NCC-00083943, NCC-00041194 e NCC-00074605, sendo que no décimo dia, essa redução chegou a cerca de 75%. As moléculas NCC-00062160 e NCC-00027148 causaram uma redução na motilidade de fêmeas constante a partir do quinto dia, sendo que no décimo dia de exposição nenhum movimento foi detectado ao compararmos com o controle (Figura 38 C). Ao serem expostas aos parasitos, as moléculas NCC-00003100, NCC-00048090, NCC-00007072, NCC-00004353 e NCC-00041388 causaram uma redução de cerca de 70% na motilidade das fêmeas no sétimo dia de exposição. Essa redução se manteve até o décimo dia, sendo de cerca de 80% para as moléculas NCC-00004353 e NCC-00041388 e de 57% para as moléculas NCC-00003100, NCC-00048090 e NCC-00007072 ao serem comparadas com o controle (Figura 38 D). As moléculas NCC-00030093, NCC-00018286, NCC-00078696, NCC-00049052 e NCC-00048932 foram responsáveis pela redução de cerca de 60% na motilidade de fêmeas expostas a elas no sétimo dia de exposição, que foi constante até o décimo dia, na qual foi observado uma redução de cerca de 68% na motilidade destes parasitos (Figura 38 E).

A Figura 38 F representa a única molécula, NCC-00047992, que foi ativa para vermes adultos machos tendo como alvo as Pan quinases. Observa-se uma redução significativa de 66% já no segundo dia de exposição que se manteve até o décimo dia (64%) comparado com o controle.

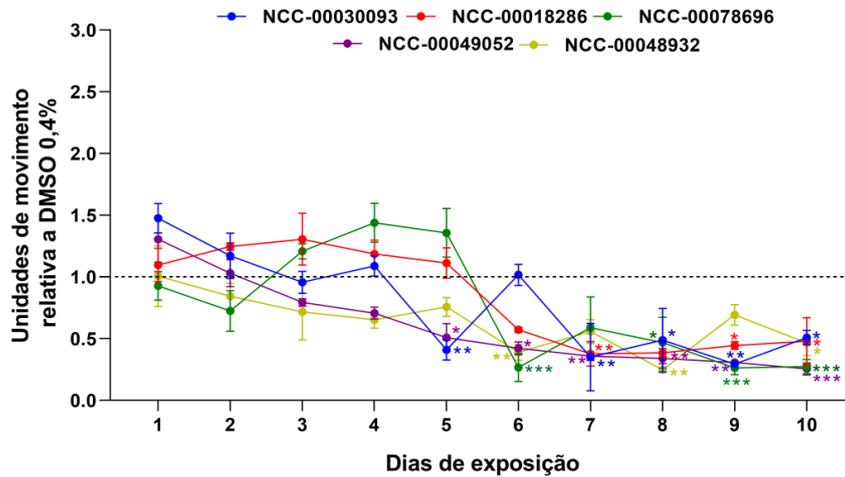
Figura 38 - Avaliação da motilidade de vermes adultos machos e fêmeas expostos às moléculas preditas como inibidoras de todas as PKs alvo deste estudo.



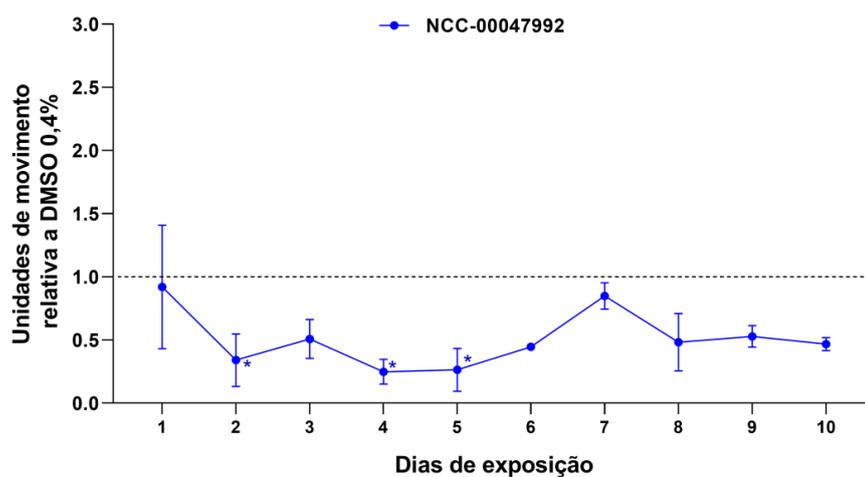
D



E



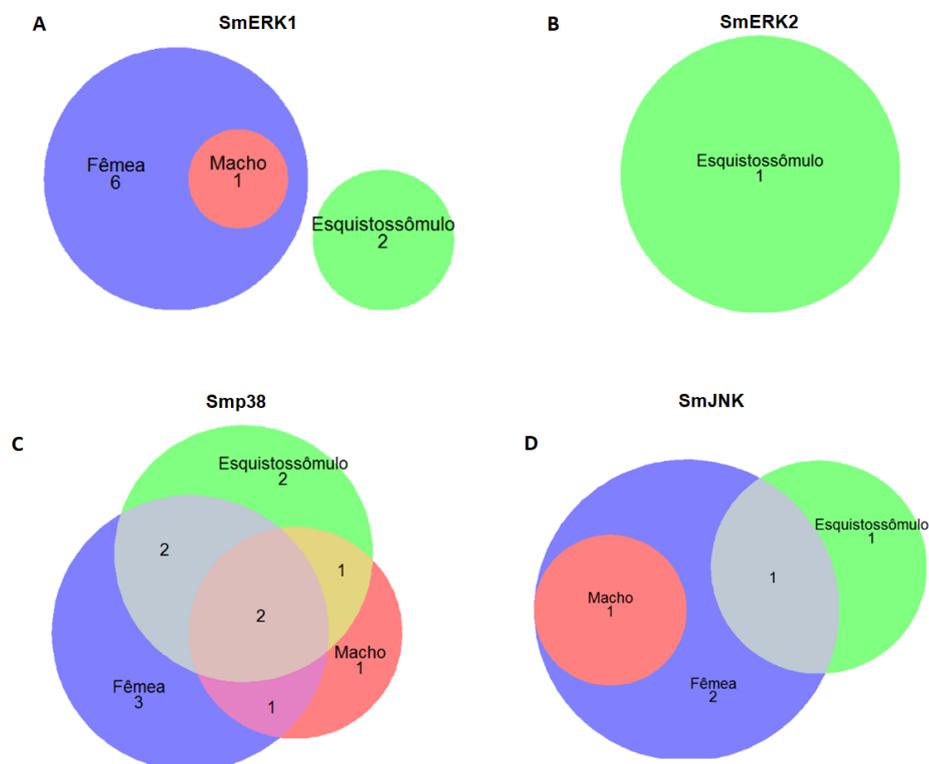
F

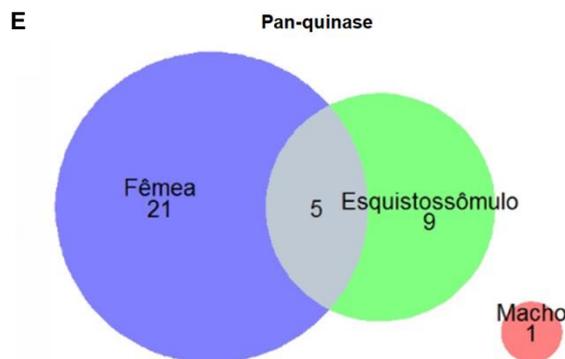


O gráfico representa a média das unidades de movimento de vermes adultos fêmeas (A-E) e machos (F) expostas à inibidores preditos para Pan quinases ao longo de dez dias. As unidades de movimento foram normalizadas de acordo com as unidades de movimento de vermes adultos incubados com DMSO a 0,4% (linha pontilhada). Cada um dos inibidores está representado por uma cor, como mostrado na legenda de cada gráfico. Em cada ponto está representado o desvio padrão. A análise estatística foi feita pelo Two-way ANOVA e Sidak como pós-teste. *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$, ***, $p \leq 0,001$, ****, $p \leq 0,0001$, $n=2$.

Os resultados obtidos na triagem de moléculas ativas *in vitro* foram compilados em Diagramas de Venn. A Figura 39 A mostra que um total de nove moléculas preditas como inibidoras de SmERK1 foram ativas, sendo que a maioria delas, sete moléculas, foram mais eficazes na fase adulta do parasito e duas moléculas no estágio de esquistossômulos. Para SmERK2, apenas um inibidor foi ativo alterando a viabilidade de esquistossômulos (Figura 39 B). Doze moléculas preditas para Smp38 foram ativas e apresentaram um padrão bem diversificado de fenótipos, alterando a viabilidade de esquistossômulos, vermes adultos machos e fêmeas, sendo que duas delas apresentaram atividade para todos os parasitos avaliados (esquistossômulos, machos e fêmeas) (Figura 39 C). O mesmo foi visto quando consideramos a proteína SmJNK como alvo. Foram identificadas cinco moléculas ativas, que provocaram alteração na viabilidade de esquistossômulos e vermes adultos (Figura 39 D). Considerando àquelas moléculas específicas para todas as PKs, as Pan-quinases, foram identificadas 36 moléculas ativas, sendo a maior parte delas, 21 moléculas, foram ativas em vermes adultos fêmeas, uma em macho e nove em esquistossômulos (Figura 39 E).

Figura 39 - Diagrama de Venn dos compostos ativos em esquistossômulos e em vermes adultos machos e fêmeas.





O diagrama representa a distribuição das moléculas ativas preditas em se ligar no sítio de ligação ao ATP de SmERK1 (A), SmERK2 (B), Smp38 (C) e SmJNK (D) de acordo com o estágio do parasito. Em verde está representado o número de moléculas ativas em esquistossômulos. Em azul está representado o número de moléculas ativas em fêmeas e em rosa em machos.

Nas quatro últimas décadas, as drogas que apresentaram um maior sucesso no tratamento da esquistossomose foram a oxamniquina e o PZQ, significando um grande avanço da terapêutica dessa doença, já que o tratamento medicamentoso da esquistossomose sempre foi limitado, pela dificuldade de serem encontrados quimioterápicos que possuíssem alta eficácia e que não fossem tóxicos ao hospedeiro humano (LOVERDE, 2019; PICA-MATTOCCIA; CIOLI, 1985). Acredita-se que a oximniquina atua bloqueando os receptores da acetilcolina gerando uma inibição irreversível da síntese de ácidos nucleicos causando assim a morte dos parasitos (VALENTIM *et al.*, 2013). Apesar de ser um medicamento eficaz para todos os estágios do *S. mansoni* encontrados no hospedeiro humano, ela parou de ser utilizada devido aos fortes efeitos colaterais gerados e alto custo de produção. Dessa forma a droga de escolha para o tratamento da esquistossomose foi o PZQ que possui uma alta eficácia contra todas as espécies de *Schistosoma*, ausência de efeitos colaterais sérios, administração de dose oral única, baixo custo, efetivo e fácil de administrar (CIOLI; PICA-MATTOCCIA, 2003; DOENHOFF *et al.*, 2009; THOMAS; TIMSON, 2020; VALE *et al.*, 2017). Sugere-se que o PZQ atua na inibição da bomba Na⁺, K⁺ dos vermes adultos do *Schistosoma spp.*, aumentando a permeabilidade da membrana do parasito ao cálcio que leva ao aumento da atividade muscular, seguida por contração e paralisia espática, levando a sua morte (BECKER *et al.*, 1980; DOENHOFF; CIOLI; UTZINGER, 2008). Apesar da alta eficácia deste medicamento, um dos grandes problemas do seu uso, além do surgimento da resistência, que já foi discutido anteriormente, é que o PZQ atua apenas em vermes já adultos no hospedeiro humano. Dessa forma é muito importante o desenvolvimento de novos fármacos que atuem em estágios mais iniciais do parasito, já que isso pode diminuir a chance do agravamento da doença (CAFFREY, 2007; CIOLI; PICA-MATTOCCIA, 2003).

Diante do exposto, fica evidente que a triagem de novos fármacos contra um parasito que apresenta um ciclo de vida tão distinto e complexo, como é o caso do *S. mansoni*, deve ser realizada nos diferentes estágios encontrados em seu hospedeiro humano (esquistossômulos e os vermes adultos machos e fêmeas), pois a sensibilidade ao medicamento é diferente entre os estágios e o sexo do parasito (PICA-MATTOCCIA; CIOLI, 2004; TAVARES *et al.*, 2016).

Analisando os resultados obtidos com a triagem realizada, vimos que várias moléculas se mostraram muito promissoras neste contexto. Utilizando moléculas específicas para o sítio de ligação ao ATP de Smp38, duas moléculas são capazes de interferir na viabilidade tanto de esquistossômulos quanto de vermes adultos machos e fêmeas (NCC-00001994 e NCC-00029718). Enquanto que a molécula NCC-00076827 foi ativa para esquistossômulos e machos e as moléculas NCC-00049859 e NCC-00013544 causaram alterações fenotípicas em esquistossômulos e fêmeas (Figura 39 C). Uma das moléculas que tem a proteína SmJNK como alvo, NCC-00018787, também foi considerada ativa em esquistossômulos e em fêmeas (Figura 38 D). Muito promissoras também são as cinco moléculas preditas como inibidoras de todas as PKs e foram ativas para fêmeas e esquistossômulos, sendo elas NCC-00027148, NCC-00041194, NCC-00074605, NCC-00048090 e NCC-00070487 (Figura 39 E).

Os nossos resultados demonstram que a realização do “docking” *in silico* para priorização de moléculas antes da realização do teste *in vitro* foi uma ferramenta muito valiosa e útil, já que de mais de 80.000 moléculas foram selecionadas apenas aquelas mais promissoras para nossos alvos de interesse, reduzindo assim o custo dos experimentos e o tempo gasto na realização dos mesmos. Além disso, os ensaios *in vitro* confirmaram a acurácia desta priorização, nos possibilitando identificar 61 moléculas potencialmente ativas dentre as 140 testadas com a capacidade de provocar alterações fenotípicas em pelo menos um estágio de vida do parasito. Na indústria farmacêutica a porcentagem de moléculas que chega a serem testadas clinicamente é de 2,5% e para chegar no mercado é 0,01% (WHITESIDE; POMONIS; KENNEDY, 2016). Em nosso estudo, 43% das moléculas testadas se mostraram ativas em pelo menos um estágio de vida do parasito, confirmando a importância da priorização de moléculas. Mostramos também a importância de usar a abordagem racional para identificação de moléculas ativas visando alvos validados anteriormente, fazendo com que a busca por novos fármacos seja mais direta e específica.

Os compostos ativos foram submetidos a análises de ADMET realizadas pela Dra. Sandra Gava, utilizando o servidor pkCSM (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/>), para avaliarmos a absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade dessas moléculas *in silico* (PIRES;

BLUNDELL; ASCHER, 2015). As moléculas ativas para SmERK1 apresentaram um peso molecular que variou entre 374 a 489 Da. Essas moléculas foram preditas como sendo hepatotóxicas, mas não causam sensibilização na pele e são altamente absorvidas no intestino humano. Além disso, nenhuma delas é solúvel em água e das nove moléculas ativas, duas foram preditas ter capacidade carcinogênica (NCC-00017983 e NCC-00028622). Foi visto também que uma dessas moléculas foi predita como inibidora de hERG I (canais de íons de potássio que contribuem para atividade elétrica do coração), NCC-00029213, e sete são inibidoras de hERG II, sendo elas NCC-00009861, NCC-00029213, NCC-00017983, NCC-00028622, NCC-00055010, NCC-0007314 e NCC-00082698. A única molécula ativa para SmERK2, NCC-00029944, tem o peso molecular de 425 Da e foi predita como hepatotóxica, não provoca sensibilização na pele e são bem absorvidas pelo intestino do homem. Esta molécula não foi predita como carcinogênica e nem como inibidora de hERG I, mas foi predita como inibidora de hERG II. Doze moléculas com pesos moleculares de 327 a 482 Da foram ativas tendo como alvo a PK Smp38. Dentre elas, apenas duas não foram preditas como hepatotóxicas (NCC-00012979 e NCC-00076827) e nenhuma delas foi predita em causar sensibilização na pele e em ser solúvel em água. Além disso, nenhuma apresentou indícios de ser carcinogênica e nem de inibir hERG I. Enquanto que as moléculas NCC-00009031, NCC-00027587, NCC-00052702, NCC-00029738, NCC-00001994, NCC-00029718, NCC-00049859 e NCC-00076827 foram preditas como sendo inibidoras de hERG II. Além disso, todas elas foram preditas como sendo altamente absorvidas pelo intestino. A proteína SmJNK apresentou cinco moléculas ativas para pelo menos um estágio de vida do parasito, com pesos moleculares que variam de 309 a 489 Da. Nenhuma delas apresentou solubilidade em água, sensibilização na pele e nem foi predita como inibidora de hERG I, enquanto que três moléculas foram preditas como sendo inibidoras de hERG II (NCC-00040491, NCC-00053156 e NCC-00018787), duas foram preditas como sendo hepatotóxicas, NCC-00040491 e NCC-00053156 e uma, NCC-00029042, carcinogênica.

O grupo das Pan-quinases apresentou 36 moléculas ativas com pesos moleculares que variam de 313 a 499 Da. Todas essas moléculas foram preditas por serem altamente absorvidas no intestino humano e por não causarem sensibilização na pele, enquanto que nenhuma delas foi predita como sendo solúvel em água. Quatro moléculas foram preditas como carcinogênicas, sendo elas NCC-00007072, NCC-00048932, NCC-00079641 e NCC-00041194. De todas as moléculas apenas duas, NCC-00004353 e NCC-00075699, não foram consideradas com potencial para gerar hepatotoxicidade. Nenhuma das 36 moléculas foi

predita como sendo inibidora de hERG I e 28 foram preditas como sendo inibidoras de hERG II.

Dentre as moléculas avaliadas no ADMET *in silico*, duas delas que foram ativas apenas para esquistossômulos parecem ser bem promissoras, já que, dentro dos parâmetros avaliados, não apresentam nenhuma característica que possa ser prejudicial ao homem, sendo elas a NCC-00012979 (Smp38 como alvo) e NCC-0007599 (pan-quinases).

O desenvolvimento de novos medicamentos é algo bastante desafiador, pois além de ser caro a chance de sucesso é muito baixa. A maioria dos medicamentos avaliados em ensaios clínicos não chegam ao mercado devido à falta de eficácia (GUIDI *et al.*, 2017; MANSOUR *et al.*, 2016). Propriedades farmacocinéticas e de toxicidade determinam se é possível avançar e obter sucesso terapêutico. É neste contexto que abordagens computacionais podem ajudar a minimizar o trabalho e tempo gastos ao fazer uma triagem de drogas (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015). A análise ADMET foi realizada em nosso estudo com as moléculas que foram ativas na triagem *in vitro* realizada em esquistossômulos e vermes adultos, para determinarmos quais moléculas teriam as melhores propriedades para darmos sequência aos testes *in vivo*, reduzindo assim o número de animais utilizados nos experimentos, tempo, trabalho e os custos.

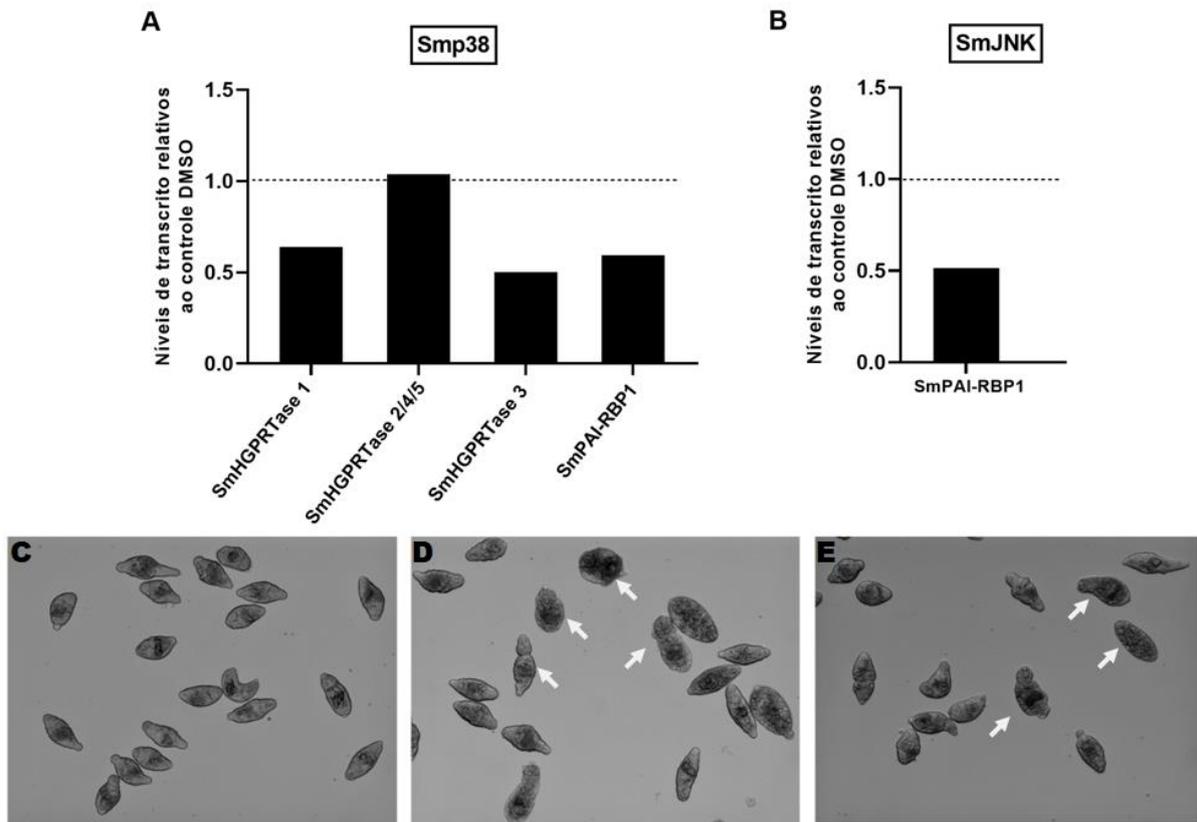
5.7. Confirmação da regulação da expressão de *SmHGPRTase 1*, *SmHGPRTase 3* e *SmPAI-RBPI* por MAPKs

Em estudos prévios do nosso grupo, SmJNK e Smp38 foram identificados como alvos promissores para o desenvolvimento de fármacos, uma vez que a diminuição de expressão dos genes que codificam estas proteínas resultou na diminuição do número de vermes no hospedeiro definitivo. Já que as MAPKs regulam diferentes genes em *S. mansoni*, buscamos entender melhor a existência de genes mais específicos, supostamente muito importantes na biologia do *S. mansoni* e que poderiam ser responsáveis pelas alterações fenotípicas observadas em parasitos silenciados para MAPKs.

Nosso grupo de pesquisa mostrou também que em esquistossômulos silenciados para *Smp38* o nível de expressão de *SmHGPRTase 1* é diminuída, enquanto o nível de expressão de *SmPAI-RBPI* é diminuído quando esquistossômulos são silenciados, tanto para *Smp38*, quanto para *SmJNK* (AVELAR *et al.*, 2019; GAVA *et al.*, 2019). Para confirmarmos experimentalmente esse achado, após a realização da triagem *in vitro* de moléculas preditas como inibidoras da ligação do ATP no sítio de ligação ao ATP de PKs, foram selecionados

dois inibidores para serem expostos a esquistossômulos em subdose, um que foi predito como ativo para SmJNK (NCC-00029042) e outro para Smp38 (NCC-00001994). Após 30 h de cultura, foram observadas alterações nos fenótipos desses parasitos, caracterizada pelo surgimento de granulosidade, parasitos arredondados e sem movimento (Figura 40), indicando atividade, mas não mortalidade. Ao analisarmos os níveis de transcritos dos genes de interesse nos parasitos tratados com inibidores, foi observado que utilizando o inibidor predito para Smp38, a expressão dos genes *SmHGPRTase 1*, *SmHGPRTase 3* e *SmPAI-RBPI* estavam reduzidas em 37%, 50% e 41%, respectivamente, ao ser comparado com o grupo controle (DMSO, 0,2%) (Figura 40 A). As *SmHGPRTases 2/4/5* não tiveram seus níveis de transcrito alterados. Utilizando o inibidor predito para SmJNK, uma redução de 49% nos níveis de transcrito de *SmPAI-RBPI* foi observado ao ser comparado com o grupo de parasitos controle (DMSO) (Figure 40 B).

Figura 40 - Validação das vias das MAPKs Smp38 e SmJNK na regulação de *SmHGPRTase 1*, *SmHGPRTase 2/4/5*, *SmHGPRTase 3* e/ou *SmPAI-RBP1*.



As barras do gráfico representam os níveis de transcritos de *SmHGPRTase 1*, *SmHGPRTase 2/4/5*, *SmHGPRTase 3* e *SmPAI-RBP1* em esquistossômulos expostos ao inibidor predito para Smp38 (A) e níveis de transcritos de *SmPAI-RBP1* em esquistossômulos expostos ao inibidor predito para SmJNK (B). Os dados foram normalizados com o grupo controle DMSO (linha tracejada). Imagens representativas de esquistossômulos incubados com DMSO a 0,2% (controle) (C), esquistossômulos expostos ao inibidor predito para Smp38 (D) e esquistossômulos expostos ao inibidor predito para SmJNK (E). Setas apontam para alterações morfológicas no fenótipo do parasito.

Diante do exposto, foi confirmado que SmJNK e Smp38 regulam a expressão de *SmHGPRTase 1*, *SmHGPRTase 3* e/ou *SmPAI-RBP1*. Apesar da *SmHGPRTase 3* não ter sido detectada como expressa diferencialmente usando os dados do transcriptoma, o silenciamento de *Smp38* parece regular negativamente a expressão desse gene. Os genes *SmHGPRTase 1* e *SmHGPRTase 3*, que parecem ser regulados pela MAPK Smp38, estão localizados próximos um do outro no genoma do *S. mansoni*, enquanto os genes que codificam *SmHGPRTases 2, 4* e *5*, cuja expressão não parece ser regulada por essa via de sinalização, também estão próximos, porém mais distantes que *SmHGPRTase 1* e *SmHGPRTase 3* (WANG; ZHU; CAI, 2017). A análise de duplicação de genes revelou que os genes derivados de duplicações próximas, como observamos nas *SmHGPRTases 2, 4* e *5*, divergem menos na estrutura dos genes e nos níveis de expressão. A retenção de genes duplicados é um mecanismo descrito

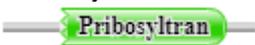
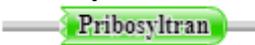
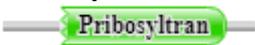
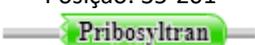
para contribuir para a expansão de famílias de genes associados à patogênese e consequentes adaptações ao parasitismo por *S. mansoni* (WANG; ZHU; CAI, 2017), muito provavelmente pela grande dependência da via de salvação de purinas.

5.8. Comparação das proteínas SmHGPRTases e SmPAI-RBP1 de *S. mansoni* com os ortólogos do hospedeiro vertebrado humano

Assim como foi realizado para as MAPKs, análises *in silico* também foram realizadas para compararmos o domínio e a estrutura protéica de SmHGPRTases e SmPAI-RBP1 com as proteínas correspondentes em humanos. O domínio da proteína HGPRTase em humanos e *S. mansoni* é o mesmo, sendo ele o Fosforibosiltransferase (Família Pribosyltran – PF00156), que catalisa, em uma reação dependente de Mg^{2+} , a substituição do grupo 1-pirofosfato do PRPP (5-fosfo-a-Dribose-1-difosfato) por uma base purina (adenina, guanina, hipoxantina ou xantina) para formar o nucleosídeo correspondente na forma ‘nucleosídeo-5-monofosfato’ (EL-GEBALI *et al.*, 2019). As enzimas que possuem este domínio são essenciais para síntese de nucleotídeos à via de salvação de purinas (SINHA; SMITH, 2001). Diferentemente do hospedeiro humano, em *S. mansoni*, já foram anotadas cinco SmHGPRTases diferentes, sendo que todas elas, com exceção da SmHGPRTase 3, tem seus domínios truncados. Como as SmHGPRTases 4 e 5 se tratam de uma duplicação gênica, sendo que a única diferença entre elas é o sentido da fita em que elas se encontram no genoma do parasito, assim os resultados mostrados nesta seção tratarão as duas proteínas como uma única, SmHGPRTases 4/5.

Os domínios destas proteínas foram alinhados ao domínio da proteína humana e muitas diferenças foram encontradas entre elas, principalmente na proteína SmHGPRTase 2, que apresentou uma identidade de 35,23% e SmHGPRTase 4/5 que apresentou uma identidade de 36,87% como pode ser visto no Quadro 9 e na Figura 41. A SmHGPRTase 1 foi a proteína com maior porcentagem de identidade com a proteína correspondente em humanos (50,61%).

Quadro 9. Porcentagem de identidade dos domínios fosforibosiltransferase entre as proteínas HGPRTases encontradas no *S. mansoni* e no humano

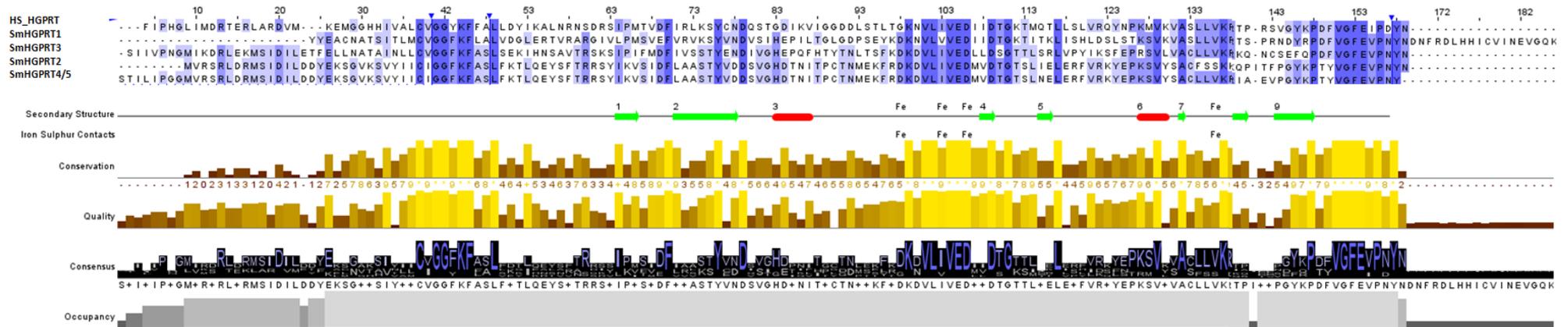
Posição do domínio <i>S. mansoni</i>	Posição do domínio humano	% Identidade entre os domínios fosforibosiltransferase
SmHGPRTase 1 Smp_103560 Posição: 58-220 	HGPRTase Posição: 36-196 	50,61
SmHGPRTase 2 Smp_148820 Posição: 43-203 		35,23
SmHGPRTase 3 Smp_168500 Posição: 35-201 		40,49
SmHGPRTase 4/5 Smp_312580 Smp_332640 Posição: 35-201 		36,87

Adicionalmente, visamos analisar as funções da proteína *Plaminogen Activator Inhibitor -RNA Binding Protein 1* (PAI-RBP1) no desenvolvimento do parasito. A mesma apresenta dois domínios diferentes: o ligante intracelular de hialurona 4 N terminal (Família IHABP4_N – PF16174) e o hialurona/proteína ligante de mRNA (Família HABP4_PAI-RBP1 – PF04774). O domínio ligante intracelular de hialurona 4 N terminal, está envolvido na ligação de alguns componentes importantes na maquinaria traducional (GONÇALVES *et al.*, 2011). Já o domínio HABP4_PAI-RBP1, que é o outro domínio desta proteína em *S. mansoni*, liga-se especificamente ao mRNA do Inibidor do Ativador do Plasminogênio (PAI-RBP1), e pode estar envolvido na regulação da estabilidade do mRNA do mesmo (HEATON *et al.*, 2001), que é um importante componente da via fibrinolítica responsável por inativar enzimas que catalisam a conversão da pró-enzima inativa plasminogênio em plasmina (KAPLAN; AUSTEN, 1972). Ao alinharmos as sequências dos domínios destas proteínas em *S. mansoni* com a PAI-RBP1 humana foi observada uma identidade de 31,25% (Quadro 10 e Figura 42).

Quadro 10. Porcentagem de identidade dos domínios hialurona/ligante de mRNA entre as proteínas PAI-RBP1 encontradas no *S. mansoni* e no humano

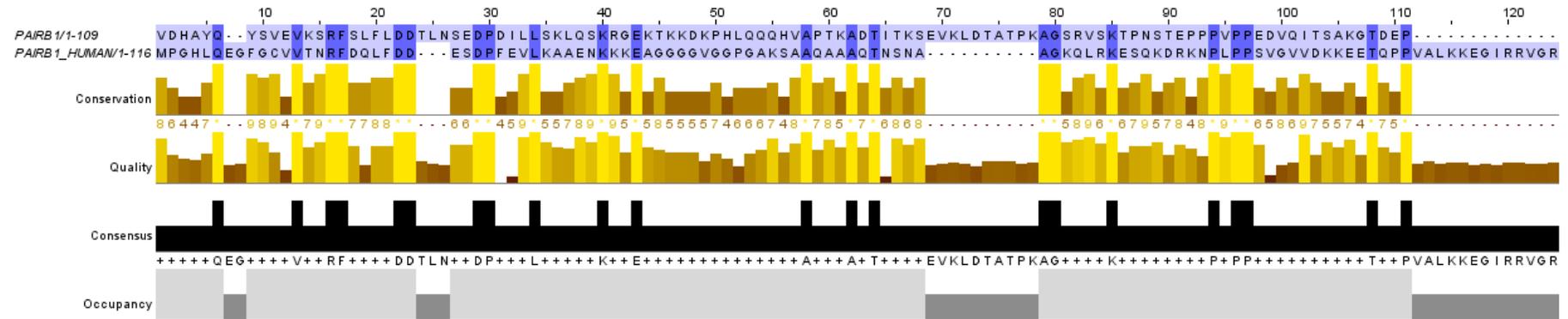
Posição do domínio <i>S. mansoni</i>	Posição do domínio humano	% Identidade entre os domínios hialurona/ligante de mRNA
<p>Sm_PAIRBP1 (Smp_009310) Posição: 185-297</p> 	<p>PAI-RBP1 Posição: 189-313</p> 	31,25

Figura 41 - Alinhamento das seqüências dos domínios das proteínas HGPRTases de humanos e do *S. mansoni*.



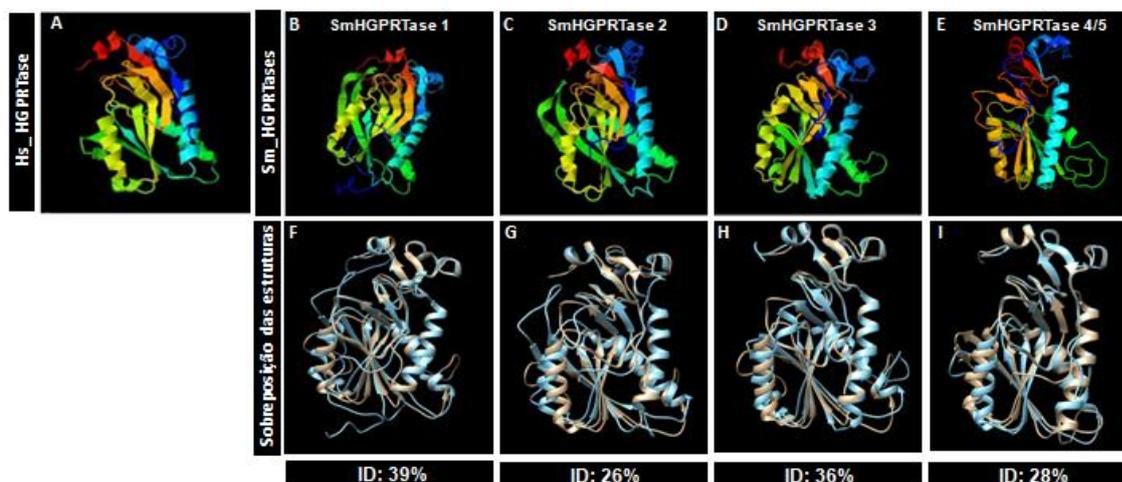
A primeira linha corresponde a seqüência do domínio HGPRTase de humanos. As quatro linhas seguintes do alinhamento correspondem a seqüência dos domínios das SmHGPRTase 1, SmHGPRTase 3, SmHGPRTase 2, SmHGPRTase 4/5 respectivamente.. Os resíduos de aminoácidos são coloridos de acordo com a porcentagem de identidade entre eles: Azul escuro: >80% de identidade; azul claro: >60%; cinza: >40%; branco: <40%. Conservação: Medição da conservação de propriedades físico-químicas em cada coluna de aminoácidos. Consensus: resíduos mais comuns e sua porcentagem para cada coluna do alinhamento.

Figura 42 - Alinhamento das seqüências dos domínios das proteínas PAI-RBP1 de humanos e do *S. mansoni*.



As primeira linha do alinhamento corresponde a seqüência do domínios de Sm_PAIRB1. A segunda linha apresenta esta proteína em humanos. Os resíduos de aminoácidos são coloridos de acordo com a porcentagem de indentidade entre eles: Azul escuro: >80% de identidade; azul claro: >60%; cinza:>40%; branco: <40%. Conservação: Medição da conservação de propriedades físico-químicas em cada coluna de aminoácidos. Consensus: resíduos mais comuns e sua porcentagem para cada coluna do alinhamento.

Figura 43 - Modelagem das proteínas HGPRTases encontradas em *S. mansoni* e em humanos.



Utilizando o Phyre2 a proteína humana HGPRTase (A) e as proteínas SmHGPRTase 1 (B), SmHGPRTase 2 (C), SmHGPRTase 3 (D) e SmHGPRTase 4/5 (E) de *S. mansoni* foram modeladas e posteriormente alinhadas. Os elementos da estrutura secundária das proteínas são coloridos da extremidade N-terminal à extremidade C-terminal, na ordem violeta, azul, verde, amarelo, laranja, vermelho (*rainbow*). Suas identidades foram calculadas através dos modelos preditos e a sobreposição dessas estruturas estão representadas em F, G, H e I (em cinza: proteína humana; azul: proteína correspondente em *S. mansoni*).

A modelagem seguida da comparação das estruturas protéicas dessas proteínas também foi realizada. Ao sobrepor os modelos estruturais das proteínas HGPRTases preditos pelo Phyre2, o que havia sido observado pelo alinhamento dos domínios protéicos foi confirmado. Como pode ser visto na Figura 43 A, B e F, a proteína SmHGPRTase 1, apresentou uma maior identidade com a proteína humana (39%) se compararmos com as outras três. Resultado semelhante foi visto ao sobrepor a proteína SmHGPRTase 3 com a proteína correspondente em humanos (36%). A proteína que mostrou ter uma menor identidade ao alinharmos o domínio delas, a SmHGPRTase 2, apresentou também a menor identidade (26%) ao comparar o modelo estrutural da proteína completa (Figura 43 A, C, G), assim como a proteína SmHGPRTase 4/5 apresentando uma identidade de 28%.

Estes resultados mostram que as SmHGPRTases apresentam diferenças importantes nas estruturas protéicas e nas seqüências do domínio catalítico quando comparadas aos seus respectivos ortólogos humanos. Estes dados confirmam outros estudos nos quais a estrutura de HGPRTase 1 em *Schistosoma* foi comparada com a HGPRTase humana por dicroísmo circular. Diferenças significativas foram observadas na termoestabilidade e nas cadeias laterais de aminoácidos e foi visto que esta proteína em *Schistosoma* contém 27% de hélice α e 30% de folha β , enquanto a enzima humana contém 21% de α -hélice e 53% de folha β (YUAN *et al.*, 1993). Além disso, o mecanismo de cinética no estado estacionário foi determinado e sugerido que a existência de um inibidor altamente específico da

SmHGPRTase, que se ligue exclusivamente ao complexo binário dessa enzima, pode ser possível (YUAN *et al.*, 1992). Por outro lado, um estudo recente usando calorimetria de titulação isotérmica para determinar parâmetros cinéticos da SmHGPRTase 1, 2 e 3 observou que os valores de KM para a HGPRTase de *S. mansoni* são muito semelhantes aos encontrados para a HGPRTase em humanos, indicando que é improvável que a SmHGPRTase sozinha seja um alvo terapêutico eficiente (ROMANELLO *et al.*, 2019).

Análises filogenéticas das proteínas HGPRTases do *S. mansoni* mostram que o surgimento dessa família gênica ocorreu devido aos vários eventos de duplicação e que parece preceder a divergência entre esta espécie e *S. japonicum* (ROMANELLO *et al.*, 2019). Além disso, analisando a organização genômica do parasito, nota-se que as cinco SmHGPRTases estão localizados no cromossomo IV, com as SmHGPRTases 1 e 3, localizadas mais próximas uma da outra, como mencionado anteriormente. Por outro lado, os genes que codificam as SmHGPRTases 2, 4 e 5, também estão intimamente distribuídos, evidenciando duplicidades em tandem, como já descrito por Wang et al (WANG; ZHU; CAI, 2017). Isso explica o motivo dos resultados de alinhamento obtidos para SmHGPRTase 1 e 3 serem mais próximos, assim como os resultados obtidos para SmHGPRTase 2 e 4/5.

Poucas informações sobre o PAI-RBP1 estão disponíveis no *Protein Data Bank* (PDB), dessa forma não foi possível realizar a modelagem da estrutura. No entanto, os alinhamentos de sua sequência de domínio já mostraram uma baixa identidade, 31,25%, quando comparados ao ortólogo humano.

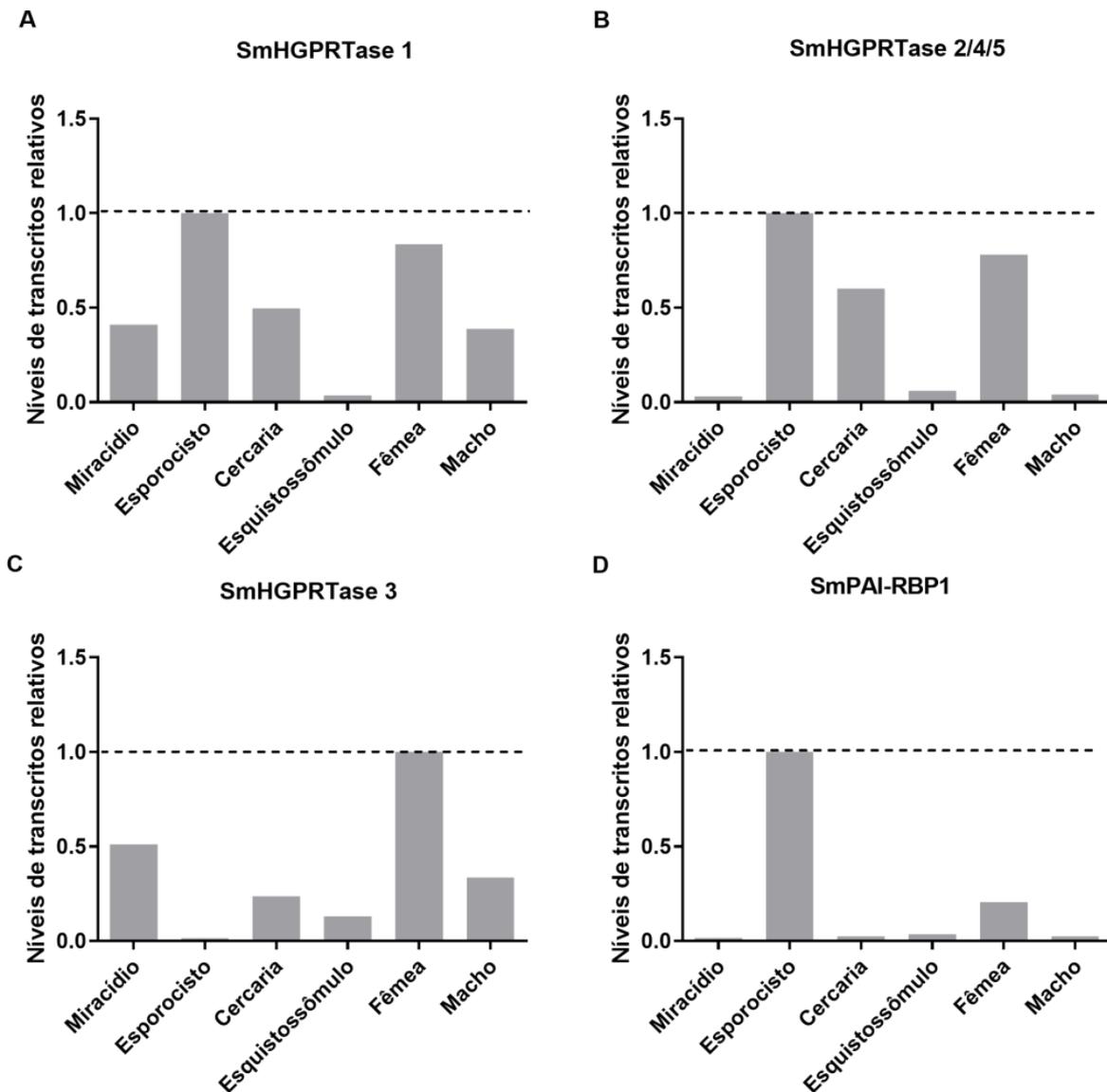
5.9. Perfil de expressão de *SmHGPRTases 1*, *SmHGPRTases 2/4/5*, *SmHGPRTases 3* e *SmPAI-RBP1* nos diferentes estágios de vida do *S. mansoni*

Já que demonstramos que as *SmHGPRTases* e *SmPAI-RBP1* são reguladas pelas vias das MAPKs SmJNK e Smp38 e são diferentes das proteínas correspondentes em humanos, seguimos para caracterização funcional dessas proteínas. Para investigar o perfil de expressão de cada gene alvo nos diferentes estágios de vida do *S. mansoni*, os níveis de transcrito foram avaliados em miracídio, esporocisto, cercaria, esquistossomulo, vermes adultos machos e fêmeas.

A *SmHGPRTase 1* exibiu os níveis mais altos de expressão no estágio de esporocisto, seguido de verme adulto fêmea e os níveis mais baixos foram observados em esquistossômulo. Miracídio, verme adulto macho e cercária apresentaram aproximadamente metade dos transcritos exibidos por esporocisto (Figura 44 A). As *SmHGPRTases 2/4/5*

também apresentaram os níveis mais altos de expressão no estágio de esporocisto e o segundo nível mais alto de expressão em verme adulto fêmea, seguido por cercaria. Esquistossômulo e verme adulto macho apresentaram baixos níveis de expressão e miracídio apresentou os menores níveis 33 vezes menor do que no esporocisto (Figura 44 B). Para *SmHGPRase 3*, os maiores níveis de expressão foram encontrados em verme adulto fêmea, duas vezes a quantidade apresentada pelo miracídio que exibiu o segundo maior nível de expressão. O estágio de esporocisto apresentou os menores níveis de expressão (Figura 44 C). Levando em consideração o gene *SmPAI-RBP1* nota-se que ele é mais expresso no estágio de esporocisto, que é cinco vezes maior que os níveis apresentados pelo estágio de verme adulto fêmea. Miracídio, verme adulto macho, cercaria e esquistossômulo apresentaram os menores níveis de expressão (Figura 44 D).

Figura 44 - Perfil de expressão dos genes *SmHGPRTase 1*, *SmHGPRTase 2/4/5*, *SmHGPRTase 3* e *SmPAI-RBP1* nos diferentes estágios de vida do *S. mansoni*.



As barras dos gráficos representam os níveis relativos de transcrito de *SmHGPRTase 1* (A), *SmHGPRTase 2/4/5* (B), *SmHGPRTase 3* (C) e *SmPAI-RBP1* (D) nos diferentes estágios da vida do *S. mansoni*: miracídio, esporocisto, cercaria, esquistossômulo, vermes adultos macho e fêmea. A, B, D: Os dados foram normalizados com os níveis de transcrito dos esporocistos (linha tracejada). C: Os dados foram normalizados com os níveis de transcrito de vermes adultos fêmeas (linha tracejada).

Nossos dados mostraram que os genes *SmHGPRTase 1* e *SmHGPRTase 2/4/5* exibiram os maiores níveis de expressão no estágio de esporocisto. De fato, no hospedeiro intermediário (caramujo), ocorre uma intensa reprodução assexuada do parasito, e várias gerações de esporocistos com alta capacidade de multiplicação se desenvolvem (MALDONADO; ACOSTA MATIENZO, 1947), o que exige energia e nucleotídeos para a síntese de DNA, explicando o motivo da maior expressão de *SmHGPRTases* neste estágio.

Corroborando com esses dados, a análise do transcriptoma do parasito *in vivo* três dias após a infecção em *Biomphalaria pfeifferi* demonstrou uma regulação positiva de genes relacionados às vias de salvação de purina e biossíntese de nucleotídeos (BUDDENBORG *et al.*, 2019).

As *SmHGPRTases* também são muito expressas em vermes adultos fêmeas. Estudos anteriores sugerem que esses genes podem estar envolvidos na maturação sexual do parasito (ROMANELLO *et al.*, 2019). Além disso, experimentos de hibridização *in situ* mostram que a *SmHGPRTase 2* está presente ao longo do corpo de vermes adultos machos e fêmeas, incluindo o canal ginecóforo de machos, indicando um papel de especialização sexual para estas enzimas (ROMANELLO *et al.*, 2019).

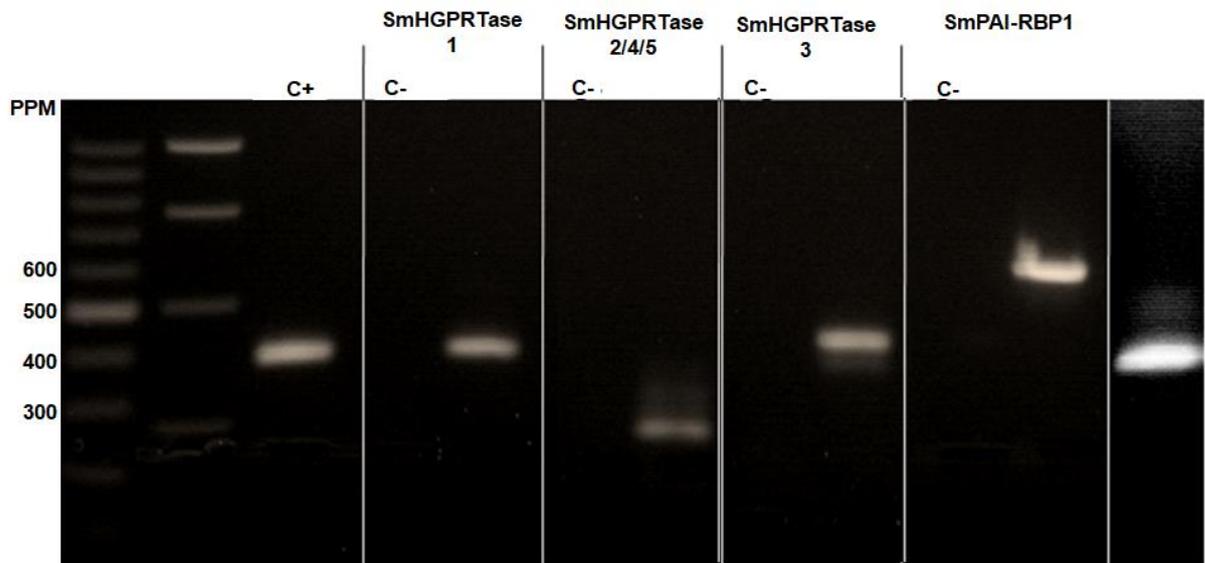
O gene *SmPAI-RBP1* também apresenta um alto nível de expressão em esporocistos. Apesar de mais estudos precisarem ser realizados, sugere-se que o uso de fatores da via de coagulação poderia facilitar a migração de esporocistos do local de penetração do parasito no caramujo para as glândulas digestivas através dos tecidos do molusco (MALDONADO; ACOSTA MATIENZO, 1947), explicando as altas taxas de expressão neste estágio do parasito.

Todos estes resultados apresentados coincidiram com os obtidos por meta-análise de estudos de RNASeq já publicados (ZHIGANG LU, 2018).

5.10. Caracterização funcional de *SmPAI-RBP1*, *SmHGPRTases 1*, *SmHGPRTases 2/4/5* e *SmHGPRTases 3* por RNA de interferência

Para caracterização das proteínas *SmPAI-RBP1*, *SmHGPRTases 1*, *SmHGPRTases 2/4/5* e *SmHGPRTases 3* como alvos moleculares, foram desenhados iniciadores específicos para amplificação dos fragmentos que codificam as mesmas através da PCR para síntese de dsRNA. Para isso, utilizou-se cDNA sintetizado a partir do RNA extraído de 5.000 esquistossômulos. O tamanho dos fragmentos gerados foram analisados em gel de agarose. Era esperado a amplificação de fragmentos apresentando os seguintes tamanhos: *SmHGPRTase 1*: 349 pb; *SmHGPRTase 2/4/5*: 250 pb; *SmHGPRTase 3*: 358 pb; *SmPAI-RBP1*: 578 pb; GFP: 360 pb, o que foi confirmado no gel representado na Figura 45.

Figura 45 - Verificação da amplificação dos fragmentos dos transcritos que codificam para as proteínas SmPAI-RBP1 e SmHGPRTases.

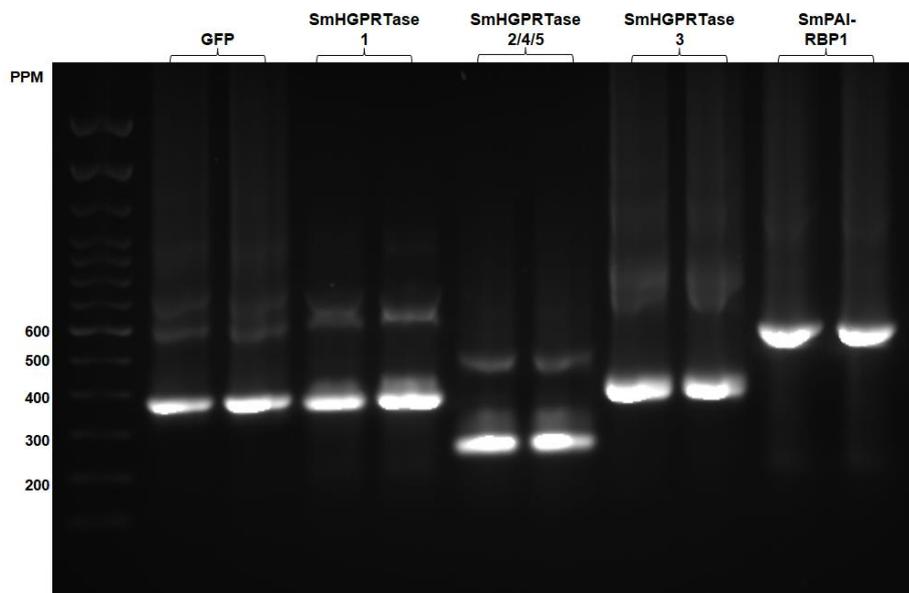


Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio representando a amplificação dos genes de interesse. Observa-se a presença de bandas que variam de 220 pb a 578 pb referente aos tamanhos de fragmentos esperados, sendo eles: SmHGPRTase 1: 349 pb; SmHGPRTase 2/4/5: 250 pb; SmHGPRTase 3: 358 pb; SmpPAI-RBP1: 578 pb; GFP: 360 pb. C+: controle positivo. C-: controle negativo. PPM: padrão de peso molecular 100 pb (Promega).

Assim, de posse de amplicons purificados para SmPAI-RBP1, SmHGPRTase 1, SmHGPRTase 2/4/5 e SmHGPRTase 3, foi feito o sequenciamento para confirmação das sequências. Estes produtos foram utilizados para clonagem no vetor pGEM.

Posteriormente, foram feitas PCRs a partir dos plasmídeos, os produtos foram purificados do gel e utilizados para a síntese de dsRNA para cada um dos alvos. Os dsRNAs foram quantificados e aplicados em gel de agarose 1% para a confirmação da síntese, tamanho e integridade. As bandas presentes no gel estão em conformidade com o tamanho esperado para cada dsRNA, demonstrando que foram sintetizados dsRNAs específicos para cada alvo (Figura 46).

Figura 46 - Síntese de dsRNAs para os genes *SmHGPRTase 1*, *SmHGPRTase 2/4/5*, *SmHGPRTase 3* e *SmPAI-RBP1*.



Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio mostrando a integridade dos dsRNAs sintetizados para realização do silenciamento gênico de *SmHGPRTase 1*, *SmHGPRTase 2/4/5*, *SmHGPRTase 3* e *SmPAI-RBP1*. Na sequência: GFP: 360 pb, *SmHGPRTase 1*: 349 pb, *SmHGPRTase 2/4/5*: 250 pb, *SmHGPRTase 3*: 358 pb e *SmPAI-RBP1*: 578 pb. PPM: padrão de peso molecular 100 pb (Thermo Fischer Scientific).

5.10.1. Silenciamento dos genes *SmHGPRTase 1*, *SmHGPRTase 2/4/5* e *SmHGPRTase 3* em esporocistos, esquistossômulos e vermes adultos

Para interrogar os papéis funcionais dos genes *SmHGPRTase 1*, *SmHGPRTase 2/4/5* e *SmHGPRTase 3* nos diferentes estágios de vida do parasito, eles foram silenciados pela exposição à dsRNAs específicos para cada um deles ou em combinação para às cinco *SmHGPRTases* (combinado).

Em esporocistos, os níveis de transcritos de *SmHGPRTase 1* reduziram em 46% comparado ao controle não tratado e 58% comparado o controle inespecífico após dois dias de exposição e cerca de 71% após quatro dias de exposição ao dsRNA comparado com os dois grupos controle. Foi observado também uma redução de 77% e de 64% comparando os controles não tratado e inespecífico, respectivamente, após sete dias de exposição ao dsRNA. Para *SmHGPRTase 2/4/5*, com dois dias de exposição, os níveis de transcritos foram reduzidos em 70% com relação ao controle não tratado e 55% com o controle inespecífico, seguidos por 90% e 60% após quatro dias quando consideramos os crontróles não tratado e inespecífico, respectivamente. Com sete dias de exposição, eles apresentaram os níveis mais baixos de transcritos 89% (controle não tratado) e 77% (controle inespecífico). A

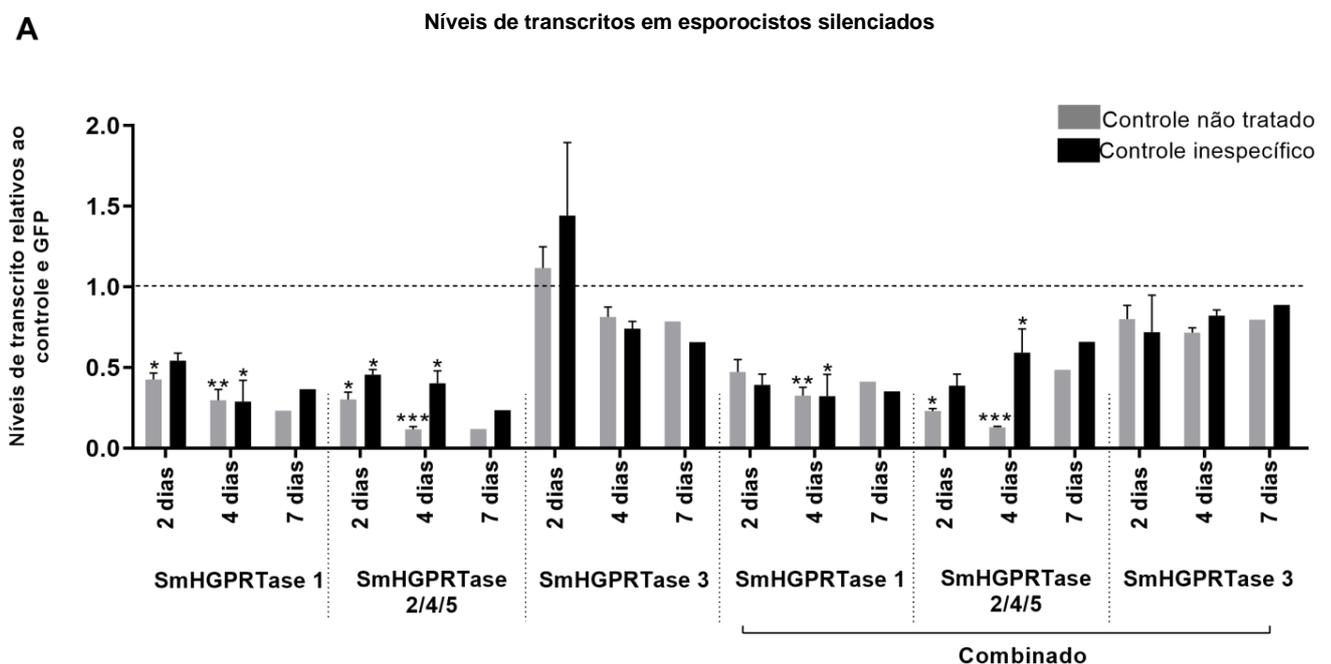
SmHGPRTase 3 não reduziu os níveis de transcrito após dois dias de exposição ao dsRNA, enquanto que após quatro dias eles reduziram em aproximadamente 22% comparado aos dois controles e após sete dias foi observada uma redução de 22% em relação ao controle não tratado e 35% em relação ao controle inespecífico. Resultados semelhantes foram observados quando usamos uma combinação de dsRNA para as cinco *SmHGPRTases* (Figura 47 A).

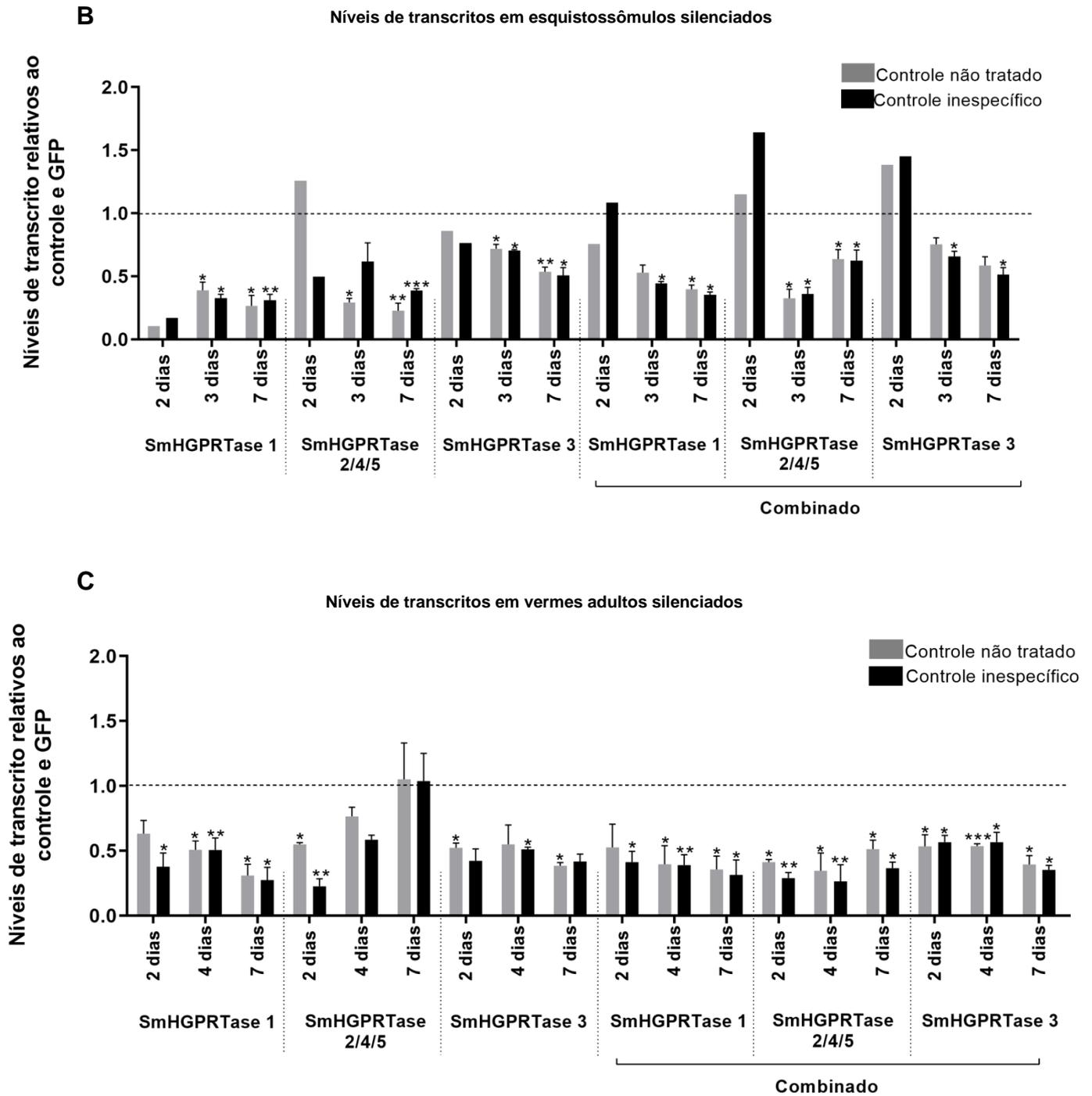
Em esquistossômulos, os níveis de transcritos de *SmHGPRTase 1* foram reduzidos em até aproximadamente 85% após dois dias de exposição ao dsRNA, permanecendo com diminuição de cerca de 70% no terceiro dia até o sétimo dia de exposição comparando com os dois controles. Utilizando o *SmHGPRTase 2/4/5*-dsRNA, observou-se uma redução de aproximadamente 50% após dois dias de exposição, comparado ao controle inespecífico e, após três dias de exposição foi observada uma redução de 71% em relação ao controle não tratado e 40% em relação ao controle inespecífico. Após sete dias de exposição, houve uma diminuição de 78% nos níveis de transcritos comparando com o controle não tratado e de 78% com o controle inespecífico. Para *SmHGPRTase 3*, foram observados menores níveis de transcritos após sete dias de exposição ao dsRNA (cerca de 50%), aproximadamente 14% após dois dias e cerca de 30% após três dias quando comparamos com ambos os controles. Quando a combinação dos três dsRNAs foi utilizada, os níveis de transcrito não foram reduzidos em comparação aos controles após dois dias de exposição ao dsRNA, enquanto que após três dias foi observada uma redução nos níveis de transcrito de 48% comparando com o grupo controle não tratado e 56% comparado ao grupo controle inespecífico para *SmHGPRTase 1*, aproximadamente 68% para *SmHGPRTase 2/4/5* e 25% e 35% para *SmHGPRTase 3* ao compararmos com o grupo controle não tratado e o grupo controle inespecífico, respectivamente. A redução dos níveis de transcrito atingiu cerca de 63% após sete dias de exposição ao dsRNA para *SmHGPRTase 1*, 38% para *SmHGPRTase 2/4/5* e aproximadamente 49% para *SmHGPRTase 3* comparando com os grupos controle (Figura 47 B).

Quando vermes adultos foram eletroporados com os dsRNAs específicos, o gene *SmHGPRTase 1* apresentou uma redução de 37% e de 63% em seus níveis de transcritos no segundo dia após a eletroporação comparado com o controle não tratado e o controle inespecífico, respectivamente. No quarto dia, foi observada uma redução nos níveis de transcritos de aproximadamente 50% e cerca de 70% de redução no sétimo dia comparado aos controles. O gene *SmHGPRTase 2/4/5* apresentou uma diminuição nos níveis de transcrito de 46% comparado com grupo controle não tratado e de 78% comparado ao grupo controle

inespecífico dois dias após a eletroporação. Reduções de 24% e 42% foram observadas em relação aos grupos controle não tratado e inespecífico, respectivamente, após quatro dias de exposição e no sétimo dia, nenhuma redução foi observada. Foi visto também uma diminuição nos níveis de transcrito de *SmHGPRTase 3* de 48% comparado ao grupo controle não tratado e de 58% comparado ao grupo inespecífico dois dias após a eletroporação. No quarto dia, houve uma redução de aproximadamente 47% e no sétimo dia de 60% em comparação aos dois controles. Quando o grupo combinado foi analisado, resultados semelhantes foram observados para *SmHGPRTase 1* e *SmHGPRTase 3*, no entanto, para *SmHGPRTase 2*, foram encontrados níveis de transcritos mais baixos. No segundo, quarto e sétimo dias após a eletroporação observou-se uma diminuição de 59-72%, 66-74% e 49-64% quando comparamos com os grupos controles não tratado e inespecífico, respectivamente (Figura 47 C).

Figura 47 - Níveis de transcritos dos genes *SmHGPRTase 1*, *SmHGPRTase 2/4/5* e *SmHGPRTase 3* em relação aos grupos controle, não tratado e inespecífico, em esporocistos, esquistosômulos e verme adultos expostos aos dsRNAs específicos após 2, 3 ou 4 e 7 dias.





As barras do gráfico representam os níveis de transcrito de *SmHGPRTase 1*, *SmHGPRTase 2/4/5* e *SmHGPRTase 3* em esporocistos (A), esquistossômulos (B) e vermes adultos (C) após exposição aos dsRNAs específicos separadamente ou em combinação (grupo combinado) em relação ao grupo controle não tratado (cinza) ou inespecífico (preto) após 2, 3 ou 4 e 7 dias. Acima das barras estão representados o erro padrão da média de uma ou três réplicas. A linha pontilhada representa o nível normalizado dos transcritos nos grupos controle. Após verificação da normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, diferenças significativas comparadas às condições de controle foram analisadas pelo teste t não pareado (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

5.10.2. Dosagem de adenosina para avaliação da atividade enzimática das SmHGPRTases

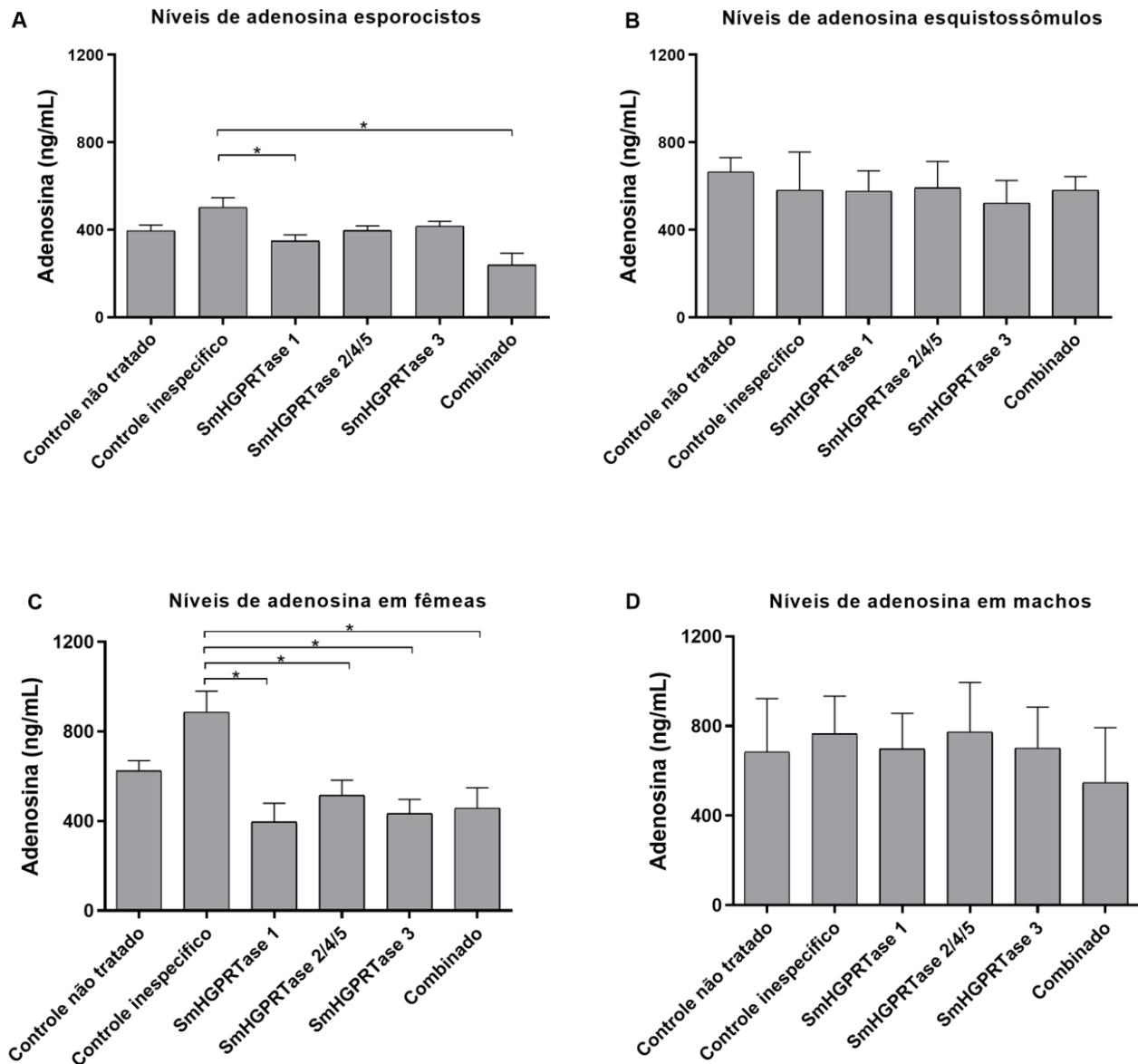
Uma vez que determinamos os dias em que os níveis de transcrito estavam mais baixos após o silenciamento, foram realizados testes bioquímicos para verificar se os níveis de adenosina também estavam diminuídos, uma vez que essas enzimas estão, supostamente, envolvidas na via de salvação de purinas. Observamos que os níveis de adenosina diminuíram em 30% em esporocistos silenciados para *SmHGPRTase 1*. Para o grupo combinado, observou-se uma diminuição de 50% nos níveis de adenosina quando comparado ao grupo controle inespecífico (Figura 48 A).

Com relação à dosagem dos níveis de adenosina em esquistossômulos, não foi observada diferença estatisticamente significativa quando os valores obtidos para os parasitos silenciados foram comparados com os controles (Figura 48 B).

Em fêmeas, os níveis de adenosina reduziram em aproximadamente 45% para todos os parasitos silenciados para as *SmHGPRTases* em comparação com o grupo controle inespecífico (Figura 48 C). Por outro lado, em machos, não foi observada diferença estatisticamente significativa nos níveis de adenosina (Figura 48 D).

Os resultados vistos com a dosagem de adenosina confirmam os dados mostrados anteriormente quando avaliamos os níveis de expressão dos genes *SmHGPRTases* nas diferentes fases do parasito. As fases que apresentaram maiores níveis de expressão, esporocistos e fêmeas, foram as fases que vimos maior redução nos níveis de adenosina quando estes parasitos são silenciados. Isso confirma também a função das SmHGPRTases em *S. mansoni*, que ela realmente está envolvida com a síntese de purinas.

Figura 48 - Dosagem de adenosina em esporocistos, esquistossômulos e vermes adultos.



Representação dos níveis de adenosina quantificados em esporocistos (A), esquistossômulos (B) e vermes adultos (C) nos respectivos grupos: controle não tratado, controle inespecífico, parasitos tratados com SmHGPRase 1-dsRNA, SmHGPRase 2/4/5-dsRNA, SmHGPRase 3 -dsRNA e o grupo combinado. Acima das barras estão representados o erro padrão da média de três réplicas. Após verificação da normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, diferenças significativas comparadas às condições de controle foram analisadas pelo teste t não pareado (* $p \leq 0,05$).

5.10.3. Análises de viabilidade de esporocistos, esquistossômulos e vermes adultos silenciados para as *SmHGPRases*

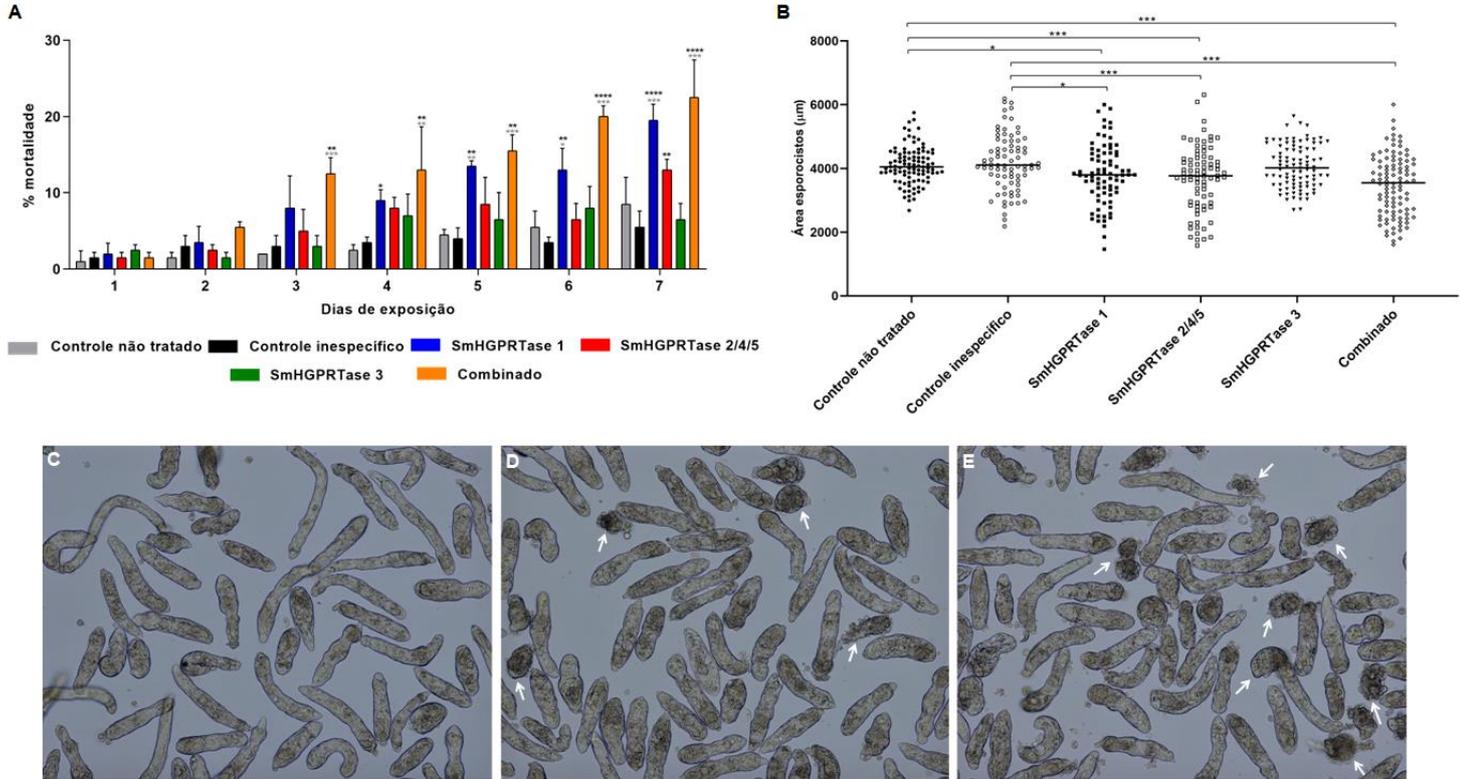
Para avaliarmos a viabilidade de esporocistos expostos ou não aos dsRNAs, os parasitos foram observados diariamente. Após quatro dias de exposição aos dsRNAs, foi

observada uma taxa de mortalidade de 8% em esporocistos expostos ao SmHGPRase 1-dsRNA, 62% maior do que a taxa apresentada pelo controle não tratado. Esse valor foi mantido até o sétimo dia em que atingiu uma taxa de mortalidade de 19%, valor 57% maior do que os encontrados nos grupos controle. Para esporocistos expostos ao SmHGPRase 2/4/5-dsRNA, observou-se uma taxa de mortalidade de 13% após sete dias de exposição, aumento este significativo quando comparamos com o controle inespecífico. O grupo combinado teve a maior taxa de mortalidade de esporocistos. A partir do terceiro dia de exposição aos dsRNAs, observou-se uma taxa de 12%, representando um aumento de 75% na mortalidade comparado aos dois grupos controle. No sétimo dia, este grupo atingiu a taxa de 22%, sendo aproximadamente 65% maior do que os grupos controle (Figura 49 A).

A avaliação dos fenótipos dos parasitos após o silenciamento gênico da *SmHGPRase 1*, *SmHGPRase 2/4/5* e *SmHGPRase 3* também foi realizada. A área dos esporocistos foi delimitada considerando o dia em que cada gene apresentou os níveis de transcritos mais baixos em comparação aos grupos controle. Observou-se uma redução significativa (8-13%) na área de esporocistos expostos aos dsRNAs de *SmHGPRase 1* e *SmHGPRase 2/4/5* quando comparados aos grupos controle não tratado e inespecífico após quatro dias de exposição. Os esporocistos silenciados para *SmHGPRase 3* não apresentaram alteração significativa em seu tamanho (Figura 49 B). A Figura 49 C, D e E são imagens representativas evidenciando alterações fenotípicas e o aumento de esporocistos mortos nos grupos tratados com *SmHGPRase 1*-dsRNA e com a combinação dos três dsRNAs comparado ao controle não tratado.

É importante ressaltar que o gene *SmHGPRase 3* não apresentou redução significativa nos níveis de transcrito nos esporocistos, não apresentando alterações fenotípicas significativas.

Figura 49 - Viabilidade de esporocistos expostos aos dsRNAs da SmHGPRase 1, SmHGPRase 2/4/5 e SmHGPRase 3.

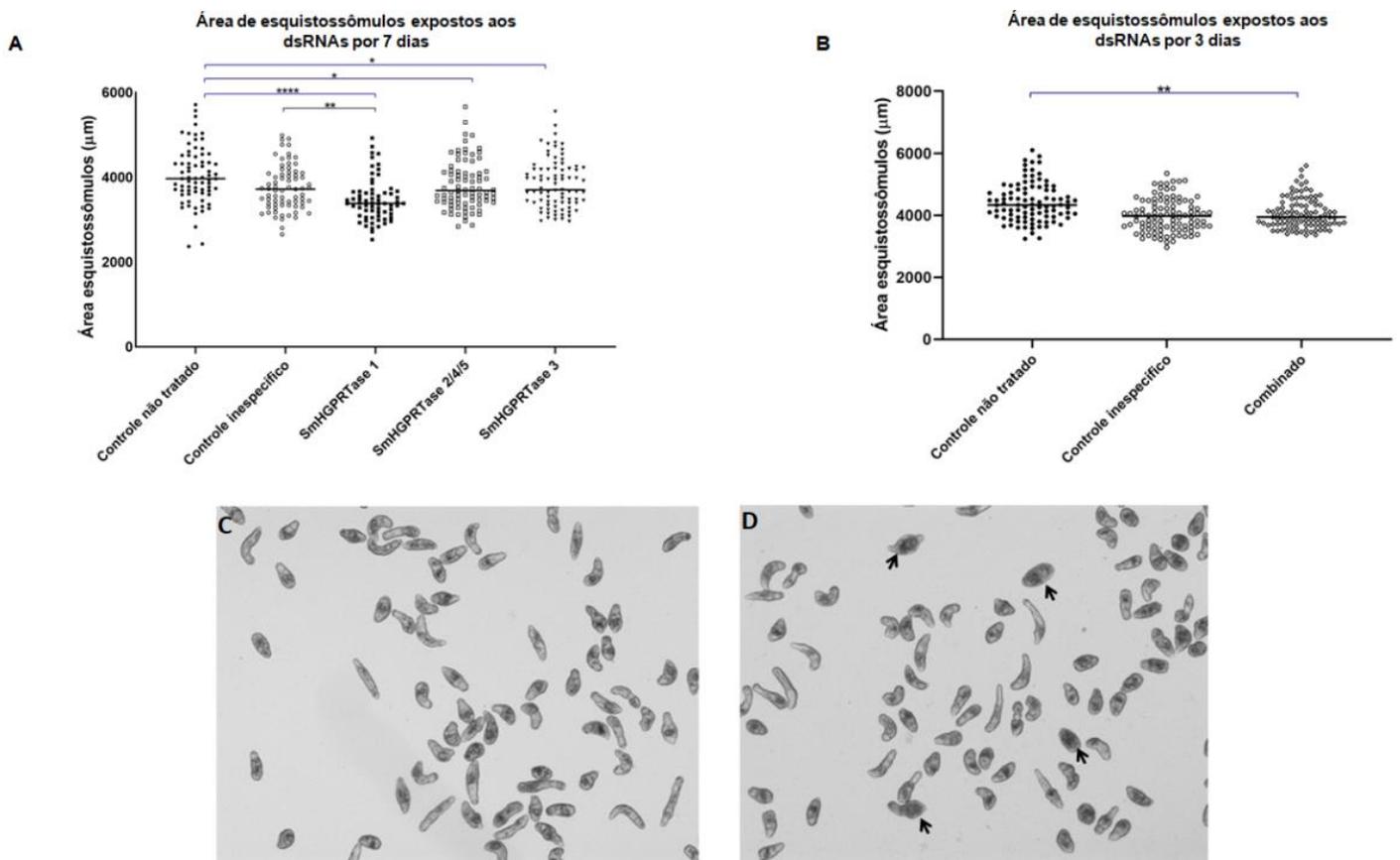


(A) As barras do gráfico representam a taxa de mortalidade de esporocistos expostos aos dsRNAs específicos. Cinza: controle não tratado. Preto: controle inespecífico. Azul: esporocistos expostos ao SmHGPRase 1-dsRNA. Vermelho: esporocistos expostos ao SmHGPRase 2/4/5-dsRNA. Verde: esporocistos expostos ao SmHGPRase 3-dsRNA. Laranja: grupo combinado. Acima das barras estão representados o erro padrão da média de duas réplicas biológicas. Como teste estatístico, foi utilizada Two way ANOVA seguido do teste de múltiplas comparações Sidak. Asteriscos pretos representam diferenças significativas comparadas ao controle não tratado e asteriscos cinza ao controle inespecífico. (B) Área de esporocistos expostos aos SmHGPRase-dsRNAs. Os símbolos representam um único parasito para cada grupo experimental. Círculos pretos: controle não tratado. Círculos brancos: controle inespecífico. Quadrado preto: parasitos tratados com SmHGPRase 1-dsRNA. Quadrados brancos: parasitos tratados com SmHGPRase 2/4/5-dsRNA. Triângulos pretos: parasitos tratados com SmHGPRase 3-dsRNA. Losango branco: grupo combinado. As linhas pretas horizontais representam a mediana da área dos esporocistos de cada grupo. Após verificar a normalidade pelo teste de D'Agostino-Pearson, diferenças significativas foram analisadas pelo teste t não pareado (C-E) Imagens representativas do grupo controle não tratado (C), esporocistos expostos ao SmHGPRase 1-dsRNA (D) e esporocisto expostos à combinação de três SmHGPRase-dsRNAs (E). As setas brancas indicam parasitos apresentando alterações no fenótipo ou esporocistos mortos. (* $P \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p < 0,0001$).

Em esquistossômulos, quando a área foi delimitada considerando o dia em que cada gene apresentou os níveis mais baixos de transcritos, observou-se uma redução de 12% na área dos parasitos tratados com SmHGPRase 1-dsRNA em comparação ao grupo controle não tratado e 8% em comparação ao grupo controle inespecífico. Utilizando o SmHGPRase 2/4/5-dsRNA, foi observada uma redução de 7% e para SmHGPRase 3-dsRNA uma redução de 8% na área dos esquistossômulos em comparação ao grupo controle não tratado (Figura 50

A). O grupo combinado também foi avaliado e observou-se uma redução significativa no tamanho do esquistossômulo de 9% quando comparado ao grupo controle não tratado (Figura 50 B). Além da redução do tamanho, foram observadas alterações fenotípicas, caracterizada pelo surgimento de regiões centrais escuras e forma arredondada em parasitos do grupo combinado (Figura 50 C e D). A taxa de mortalidade em esquistossômulos não apresentou diferenças significativas entre os grupos (dados não mostrados).

Figura 50 - Alterações fenotípicas de esquistossômulos expostos aos dsRNAs da SmHGPRTase 1, SmHGPRTase 2/4/5 e SmHGPRTase 3.

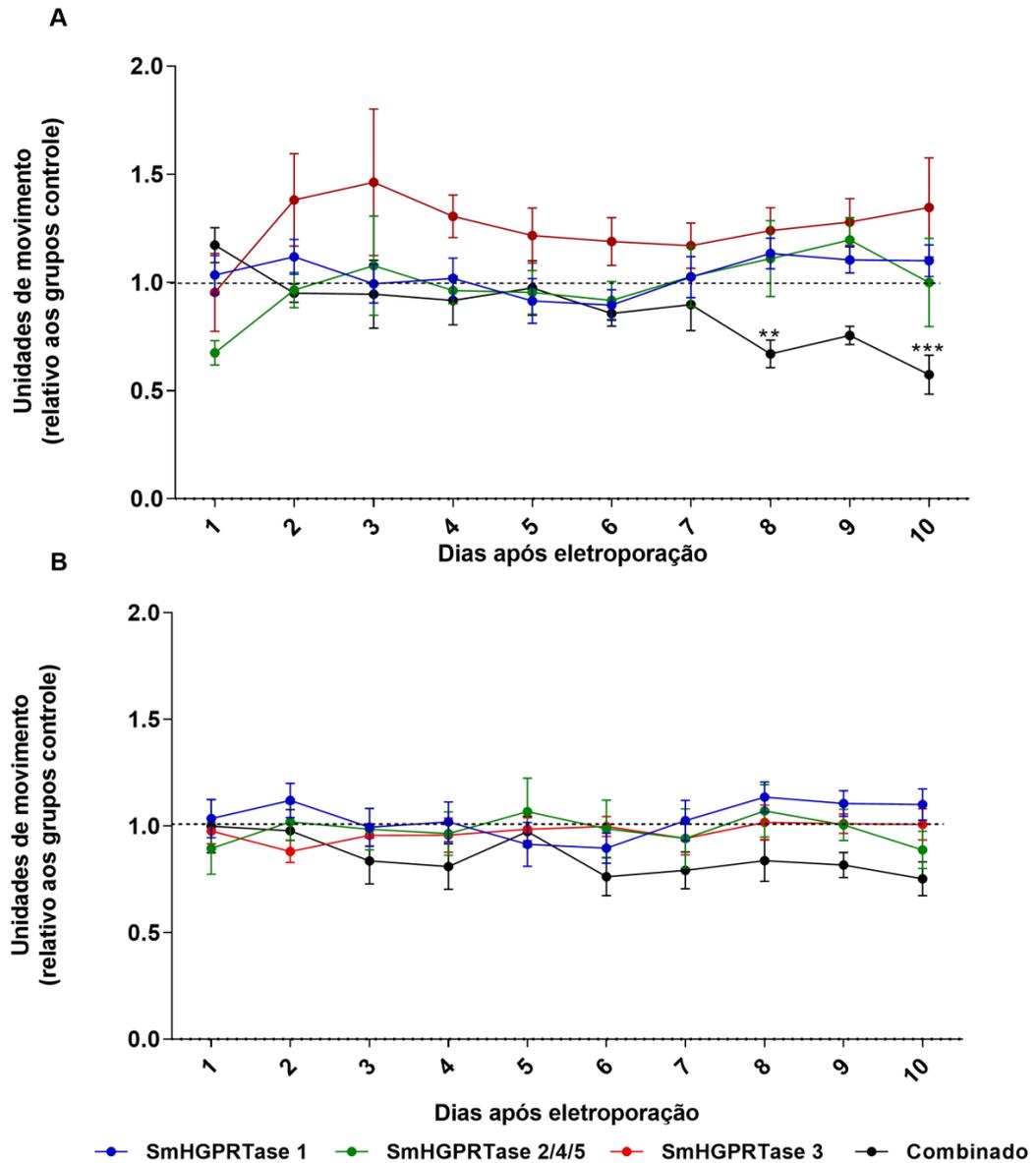


(A) Área de esporocistos expostos aos SmHGPRTases-dsRNAs por 7 dias. Os símbolos representam um único parasito para cada grupo experimental. Círculos pretos: controle não tratado. Círculos brancos: controle inespecífico. Quadrado preto: parasitos tratados com SmHGPRTase 1-dsRNA. Quadrados brancos: parasitos tratados com SmHGPRTase 2/4/5-dsRNA. Triângulos pretos: parasitos tratados com SmHGPRTase 3-dsRNA. (B) Área de esquistossômulos expostos à combinação dos três dsRNAs por 3 dias. Círculos pretos: controle não tratado. Círculos brancos: controle inespecífico. Losango branco: grupo combinado. As linhas pretas horizontais dos gráficos representam a mediana da área dos esquistossômulos. Após verificar a normalidade pelo teste de D'Agostino-Pearson, diferenças significativas comparadas aos controles foram analisadas pelo teste t não pareado. (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; **** $p < 0,0001$). C-D) Imagens representativas do grupo controle não tratado (C) e de esquistossômulos expostos à combinação de três SmHGPRTase-dsRNAs (D). As setas pretas indicam alterações fenotípicas do parasito.

Para analisarmos alterações na viabilidade de vermes adultos após o silenciamento das *SmHGPRTases*, o movimento dos parasitos foi quantificado. Vermes adultos fêmeas

eletroporados com a combinação dos três dsRNAs de SmHGPRases combinados mostraram uma redução significativa de motilidade no oitavo (34%) e décimo dia (43%) em comparação aos grupos de controle (Figura 51 A). Em vermes adultos machos, não foi observada diferença significativa de motilidade (Figura 51 B).

Figura 51 - Avaliação da motilidade de vermes adultos expostos aos dsRNAs de SmHGPRase 1, SmHGPRase 2/4/5 e SmHGPRase 3 por eletroporação.



Cada um dos pontos nos gráficos representam a média das unidades de movimento de vermes adultos fêmeas (A) e machos (B) que foram eletroporadas com os dsRNAs específicos para as SmHGPRases. Azul: parasitos expostos ao SmHGPRase 1-dsRNA. Verde: parasitos expostos ao SmHGPRase 2/4/5-dsRNA. Vermelho: parasitos expostos ao SmHGPRase 3-dsRNA. Preto: parasitos expostos à combinação dos três SmHGPRase-dsRNAs. Os resultados foram normalizados de acordo com as unidades de movimento de vermes adultos dos grupos controle (linha pontilhada). Erros padrão da média de três repetições biológicas são representados acima dos pontos. A análise estatística foi realizada utilizando Two way ANOVA seguida pelo pós-teste de Sidak (** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

Pequenos RNAs de interferência (siRNAs) específicos para a *SmHGPRase 1* já foram utilizados para avaliar seu papel biológico durante a infecção em camundongos. Neste estudo, os siRNAs foram inoculados na cauda de camundongos infectados com *S. mansoni*, resultando em uma redução de 27% no número de vermes após uma redução de 60% nos níveis de transcrito (PEREIRA *et al.*, 2008). Nossos resultados reforçam a importância de silenciar todos os genes dessa família de enzimas, uma vez que um gene pode desempenhar a função de outros. Isso fica evidente pelos altos níveis de mortalidade encontrados nos esporocistos, alterações fenotípicas observadas em esquistossômulos e redução da motilidade em vermes adultos fêmeas quando todos os genes foram silenciados simultaneamente. Nossos resultados também sugerem que a *SmHGPRase 1* pode desempenhar funções mais relevantes do que os outros membros da família para a viabilidade do esporocisto, uma vez que a taxa de mortalidade também é alta quando silenciamos apenas esse gene.

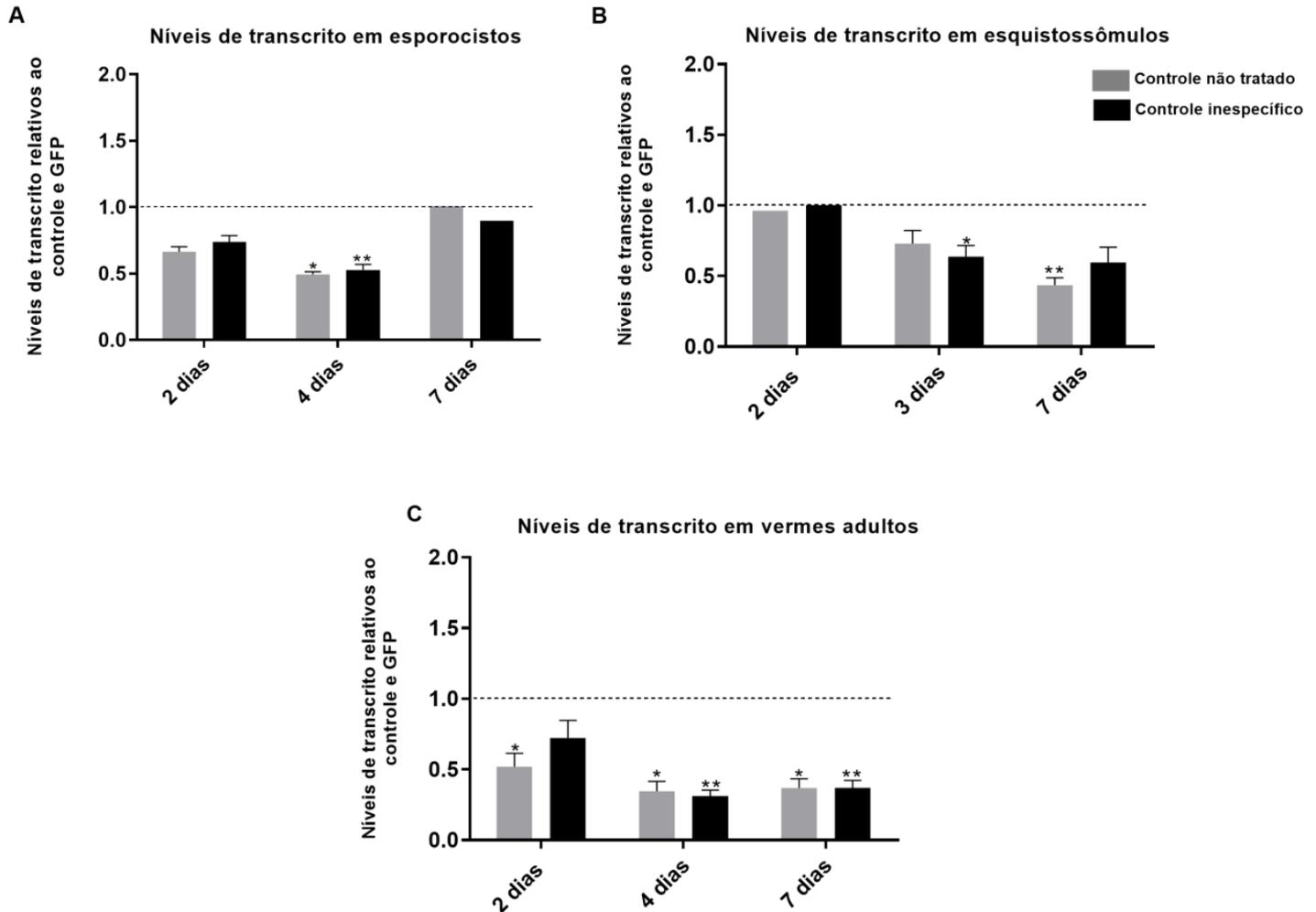
5.10.4. Silenciamento do gene *SmPAI-RBP1* em esporocistos, esquistossômulos e vermes adultos

Os níveis de transcritos de *SmPAI-RBP1* em esporocistos, apresentaram uma redução de 44% ao compararmos com o grupo controle não tratado e de 27% com o grupo controle inespecífico após dois dias e aproximadamente 51% após quatro dias de exposição ao dsRNA. No sétimo dia de exposição, observou-se uma diminuição de 11% em comparação com o controle inespecífico; no entanto, quando comparado ao grupo de controle não tratado, os níveis de transcritos não foram reduzidos (Figura 52 A).

Após dois dias de exposição de esquistossômulos ao *SmPAI-RBP1*-dsRNA, não foi observada uma redução significativa nos níveis de transcritos. Após três dias, os níveis de transcritos foram reduzidos em 28% e 37% em relação aos grupos controles não tratado e inespecífico, respectivamente. Após sete dias de exposição ao dsRNA foi observada uma diminuição de 57% dos níveis de transcrito comparado ao grupo controle não tratado e 41% em comparação com o grupo controle inespecífico (Figura 52 B).

Os vermes adultos eletroporados com *SmPAI-RBP1*-dsRNA apresentaram uma diminuição significativa nos níveis de transcrito de 49% e de 28% no segundo dia após eletroporação comparados com os grupos controles não tratado e inespecífico, respectivamente. No quarto dia observou-se uma redução de aproximadamente 67% e 64% no sétimo dia após a eletroporação em relação aos controles (Figura 52 C).

Figura 52 - Níveis de transcritos do gene *SmPAI-RBP1* em relação aos controles, não tratado e inespecífico, em esporocistos expostos ao dsRNA específico.



As barras do gráfico representam os níveis de transcrito de *SmPAI-RBP1* em esporocistos (A), esquistossômulos (B) e vermes adultos (C) após exposição ao dsRNA específico em relação ao controle não tratado (cinza) ou inespecífico (preto) após 2, 3 ou 4 e 7 dias. Acima das barras estão representados o erro padrão da média de uma ou três réplicas. A linha pontilhada representa o nível normalizado dos transcritos nos grupos controle. Após verificação da normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, diferenças significativas comparadas às condições de controle foram analisadas pelo teste t não pareado (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

5.10.5. Avaliação da atividade da plasmina em esporocistos, esquistossômulos e vermes adultos silenciados para o gene *SmPAI-RBP1*

Para verificarmos se os níveis protéicos dos parasitos expostos ao *SmPAI-RBP1*-dsRNA estavam diminuídos e se o *SmPAI-RBP1* realmente altera a atividade do ativador do plasminogênio (tPA), interferindo na via fibrinolítica, foram utilizados parasitos vivos silenciados para detectar a atividade da plasmina. Para esporocistos silenciados para *SmPAI-*

RBPI, foi observada uma redução significativa de 11% na ativação de PLMG em comparação com os grupos controle (Figura 53 A).

A Figura 53 B mostra que esquistossômulos silenciados para *SmPAI-RBPI* foram capazes de provocar um aumento significativo de 22% na ativação do plasminogênio na presença de tPA quando comparado aos grupos controle.

A atividade da plasmina também foi avaliada em vermes adultos e foi visto que fêmeas silenciadas para *SmPAI-RBPI* aumentam a ativação do plasminogênio em 23% na presença de tPA quando comparadas aos controles (Figura 53 C). Em machos, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada (Figura 53 D).

Estes resultados confirmam que a proteína SmPAI-RBP1 em *S. mansoni* está relacionada com a estabilidade do RNAm de PAI-1, já que como o esperado, ao silenciarmos este gene, o tPA não é regulado por ele e como consequência ocorre a ativação do plasminogênio em plasmina.

Figura 53 - Avaliação da atividade da plasmina nos diferentes estágios de vida do parasito silenciado.

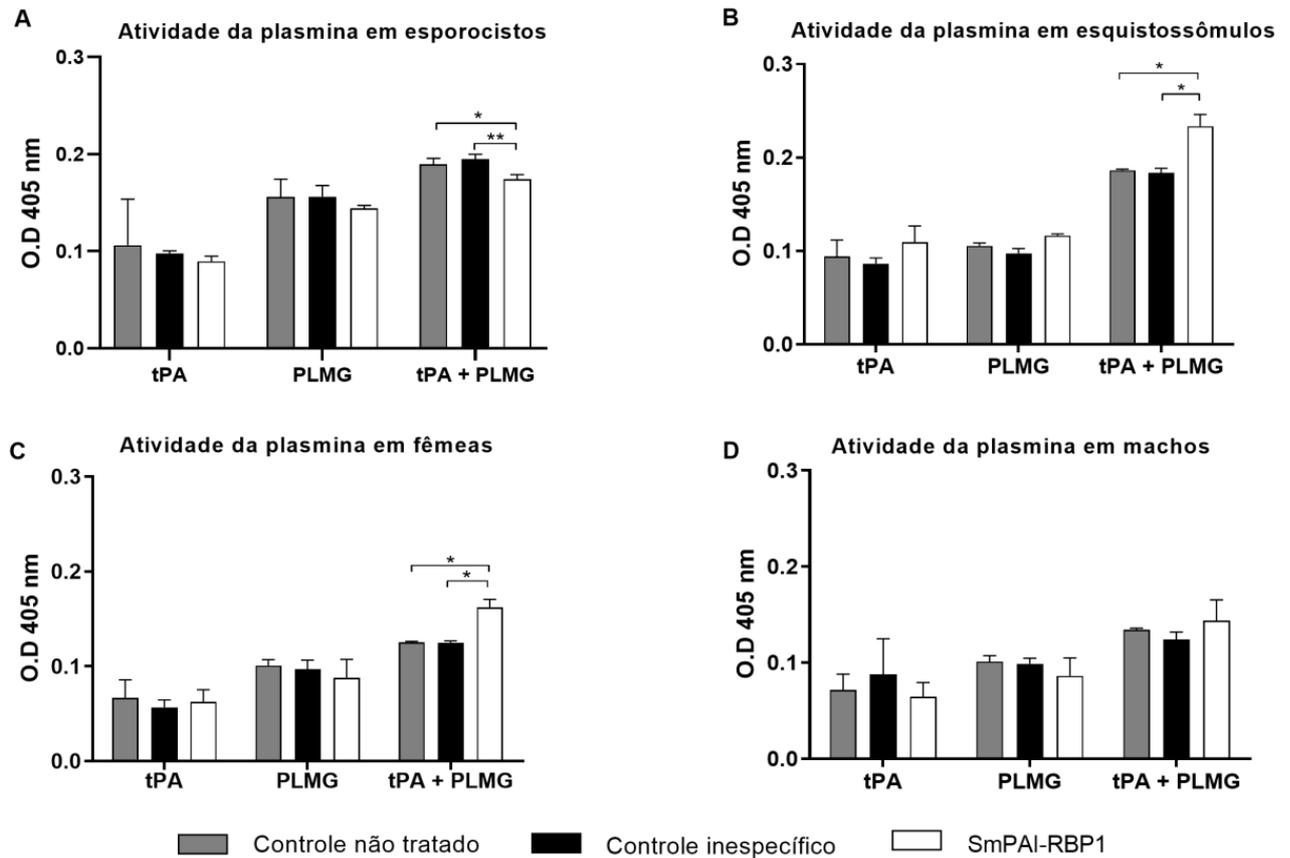
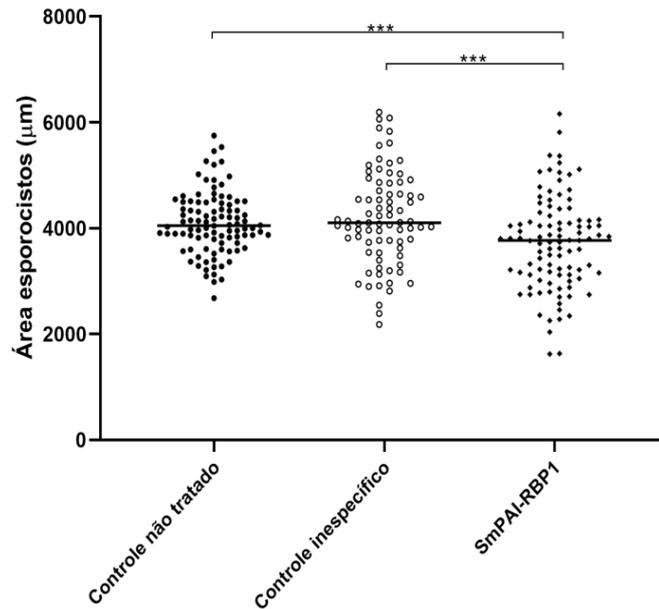


Gráfico representando a atividade da plasmina na presença de t-PA e/ou PLMG em esporocistos (A), esquistossômulos (B), vermes adultos fêmeas (C) e machos (D) vivos silenciados para *SmPAI-RBP1*. Barras cinzas: controle não tratado. Barras pretas: controle inespecífico. Barras brancas: parasitos expostos ao SmPAI-RBP1-dsRNA. Acima das barras estão representados o erro padrão da média de três réplicas. Após verificar a normalidade usando o teste Shapiro-Wilk, diferenças significativas comparadas às condições de controle foram analisadas pelo teste t não pareado (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

5.10.6. Análises de viabilidade de esporocistos, esquistossômulos e vermes adultos silenciados para as *SmPAI-RBP1*

Embora não tenha sido observada diferença significativa na taxa de mortalidade dos esporocistos silenciados para *SmPAI-RBP1* (dados não mostrados), alterações fenotípicas foram observadas no quarto dia após a exposição ao dsRNA, dia em que o SmPAI-RBP1 apresentou os níveis de transcritos mais baixos em comparação aos grupos controle. A avaliação fenotípica foi realizada através da delimitação da área de esporocisto. Foi observada uma redução significativa de 9% na área de parasitos expostos ao SmPAI-RBP1-dsRNA quando comparado aos grupos controle (Figura 54).

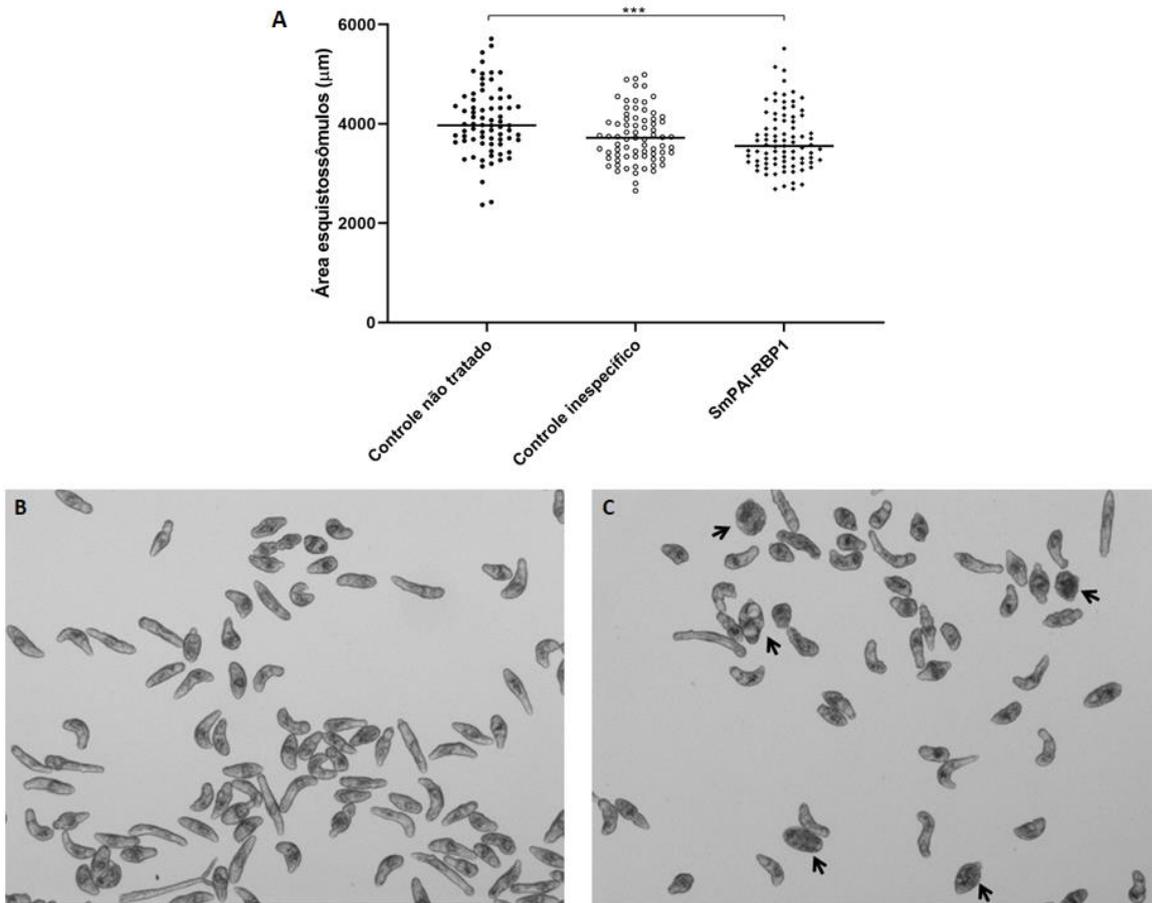
Figura 54 - Alterações fenotípicas de esporocistos expostos ao dsRNA específico para SmPAI-RBP1.



Área de esporocistos expostos ao SmPAI-RBP1-dsRNAs. Círculos pretos: controle não tratado. Círculos brancos: controle inespecífico. Grupo combinado: losango branco. As linhas pretas horizontais dos gráficos representam a mediana da área dos esporocistos. Após verificar a normalidade pelo teste de D'Agostino-Pearson, diferenças significativas comparadas aos controles foram analisadas pelo teste t não pareado. (***) $p \leq 0,001$.

Em relação à viabilidade dos esquistossômulos, assim como em esporocistos, a taxa de mortalidade também não apresentou diferenças significativas entre os grupos (dados não mostrados), mas, quanto ao tamanho do parasito, houve uma redução significativa de 11% nos parasitos silenciados para *SmPAI-RBP1* em comparação ao grupo controle não tratado observado após sete dias de exposição aos dsRNAs (Figura 55 A). Além disso, os parasitos tratados com SmPAI-RBP1-dsRNA apresentaram alterações em sua coloração e forma, caracterizada pela presença de uma região central escura e corpo arredondado (Figura 55 B e C).

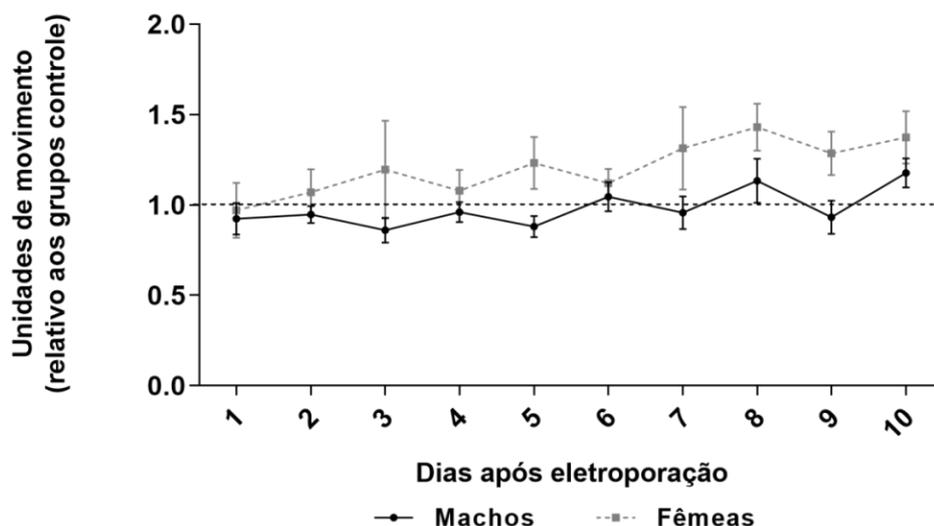
Figura 55 - Alterações fenotípicas de esquistossômulos expostos ao dsRNA específico para SmPAI-RBP1.



(A) Área de esquistossômulos expostos aos SmPAI-RBP1-dsRNAs por 7 dias. Os símbolos representam um único parasito para cada grupo experimental. Círculos pretos: controle não tratado. Círculos brancos: controle inespecífico. Losango preto: parasitos tratados com SmPAI-RBP1-dsRNA. As linhas pretas horizontais representam a mediana da área dos esquistossômulos. A normalidade foi verificada pelo teste de D'Agostino-Pearson e diferenças significativas comparadas aos controles foram analisadas pelo teste t não pareado (***) $p \leq 0,001$. B-C) Imagens representativas do grupo controle não tratado (B) e de esquistossômulos expostos ao SmPAI-RBP1-dsRNAs. As setas pretas indicam alterações fenotípicas do parasito.

Alterações na viabilidade de vermes adultos também foram avaliadas, no entanto, o silenciamento de *SmPAI-RBP1* não resultou em alterações significativas no movimento de machos e fêmeas durante os dez dias avaliados (Figura 56).

Figura 56 - Avaliação da motilidade de vermes adultos expostos aos dsRNAs de SmPAI-RBP1 por eletroporação.



Cada um dos pontos nos gráficos representam a média das unidades de movimento de vermes adultos fêmeas (cinza) e machos (preto) que foram eletroporadas com dsRNA específico para SmPAI-RBP1. Os resultados foram normalizados de acordo com as unidades de movimento de vermes adultos dos grupos controle (linha pontilhada). Erros padrão da média de três repetições biológicas são representados acima dos pontos. A análise estatística foi realizada utilizando Two way ANOVA seguida pelo pós-teste de Sidak.

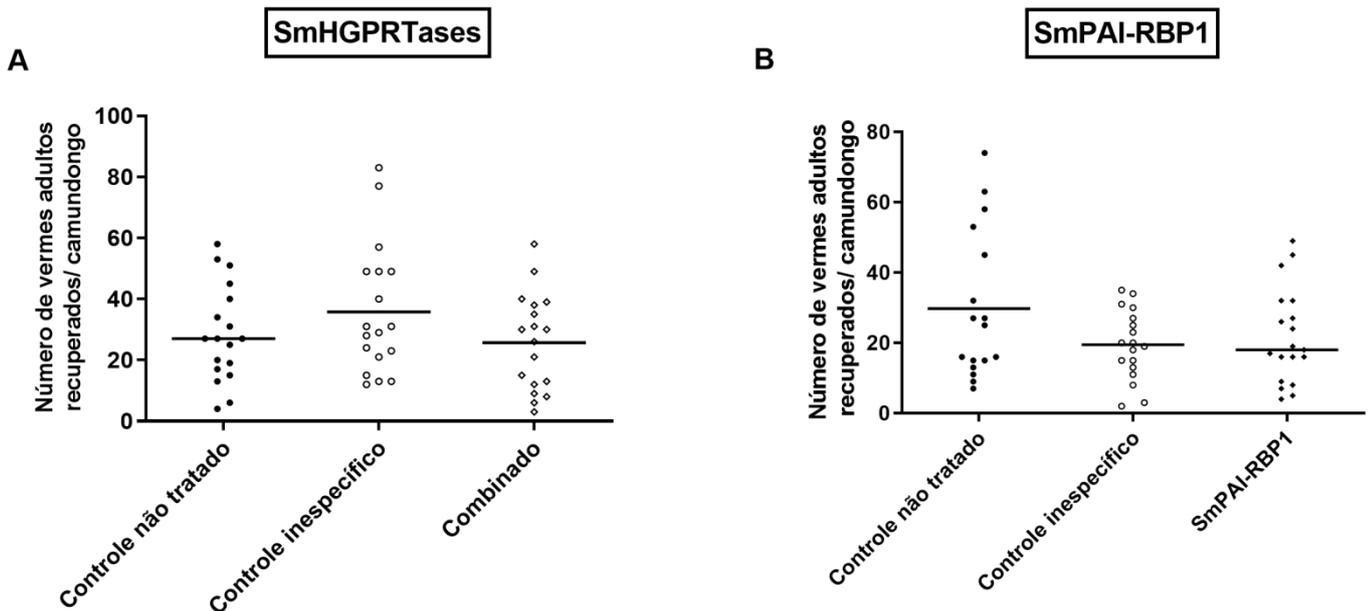
5.11. Avaliação do papel funcional de SmPAI-RBP1 e SmHGPRases no estabelecimento e desenvolvimento da infecção causada pelo *S. mansoni* em camundongos

Para avaliarmos a função das SmHGPRases e SmPAI-RBP1 no estabelecimento da infecção, esquistossômulos expostos à combinação dos três dsRNAs de SmHGPRases (grupo combinado) e o SmPAI-RBP1-dsRNA foram utilizados para os experimentos *in vivo*. Após 42 dias de infecção, foram analisados o número de vermes adultos recuperados, maturação de ovos na porção final do intestino delgado e número de ovos presentes no fígado e no intestino dos camundongos infectados.

O gráfico representado na Figura 57 A, mostra o número de vermes adultos recuperados por camundongo ao expormos esquistossômulos a dsRNAs específicos para as SmHGPRases (grupo combinado). Nota-se que não houve diferença significativa entre os grupos estudados, embora tenha ocorrido uma diminuição de 30% dos números de vermes em camundongos infectados com esquistossômulos expostos aos dsRNA para todas as SmHGPRases combinadas em relação ao grupo controle inespecífico. Ao avaliarmos os animais infectados com esquistossômulos expostos ao SmPAI-RBP1-dsRNA, apesar de não

ser observada diferenças significativas entre os grupos, houve uma redução de aproximadamente 44% no número de vermes ao ser comparado com camundongos infectados com parasitos do grupo controle não tratado (Figura 57 B).

Figura 57 - Vermes adultos recuperados 42 dias após infecção de camundongos com esquistossômulos expostos aos dsRNAs para SmHGPRTases e SmPAI-RBP1.

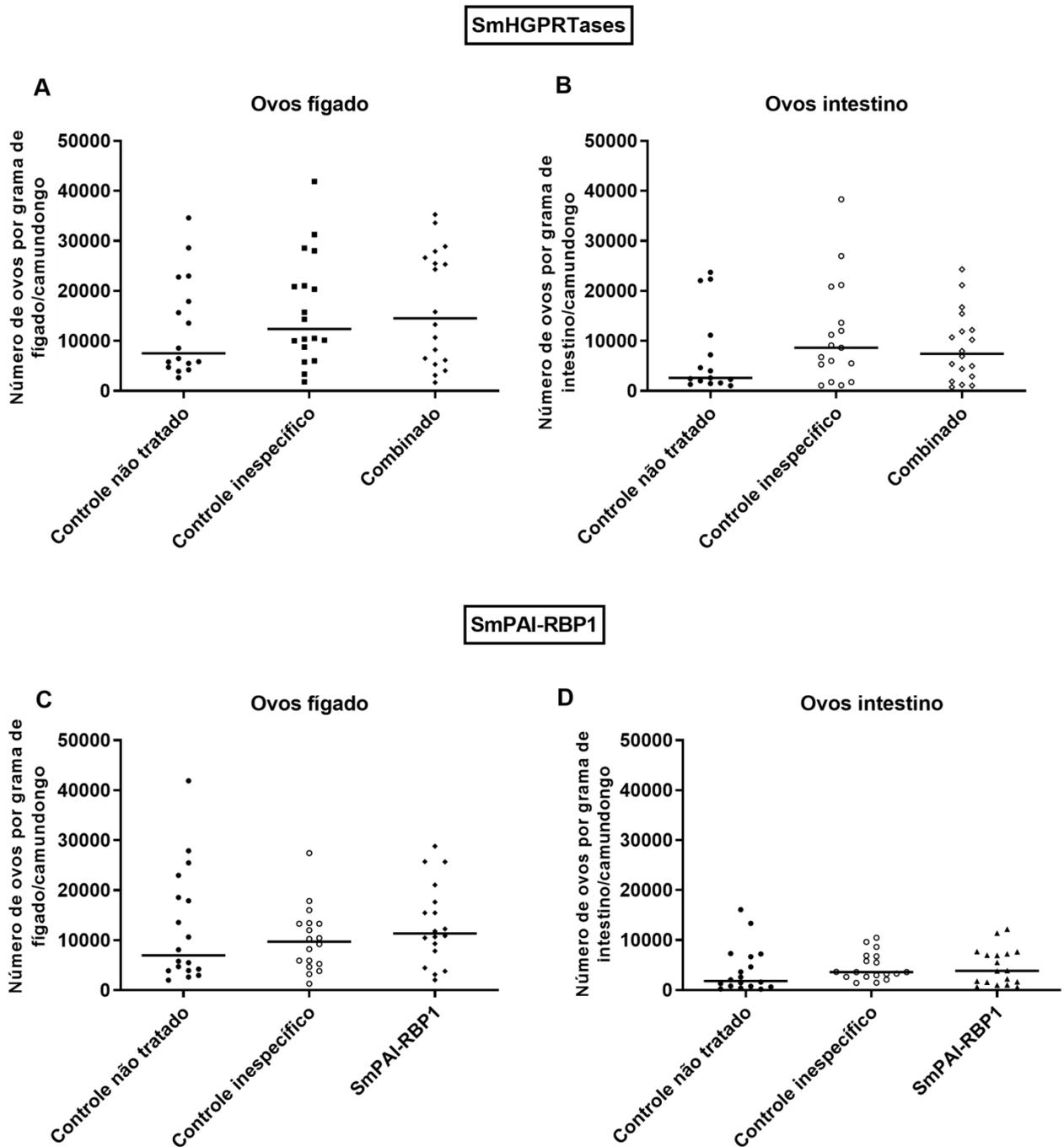


No gráfico estão representados o número de vermes adultos recuperados após perfusão utilizando camundongos infectados com esquistossômulos expostos aos dsRNAs para SmHGPRTases (A) e ao dsRNA para SmPAI-RBP1 (B). Os símbolos representam um único animal para cada grupo experimental. As barras pretas horizontais representam a mediana do número de vermes recuperados. Os círculos pretos representam o número de parasitos recuperados no grupo controle não tratado, os círculos brancos o número de parasitos recuperados no grupo controle inespecífico, os losangos brancos o número de parasitos recuperados no grupo tratado com dsRNAs para SmHGPRTases (A), os losangos pretos o número de parasitos recuperados no grupo tratado com dsRNA para SmPAI-RBP1 (B). Após verificar a normalidade usando o teste Shapiro-Wilk, diferenças significativas comparadas às condições de controle foram analisadas pelo teste t não pareado.

Com relação ao número de ovos recuperados do fígado e intestino dos grupos experimentais, também não houve diferenças significativas quando comparado aos grupos controle. Entretanto observa-se um aumento médio de 51% dos números de ovos nos fígados de camundongos infectados com esquistossômulos expostos aos SmHGPRTases-dsRNAs (combinados) em relação ao grupo de parasitos pertencentes ao controle não tratado (Figura 58 A). Com relação aos ovos encontrados no intestino, apesar de não ter havido diferenças estatísticas, houve um aumento de 66% no número de ovos por grama de intestino em animais infectados com esquistossômulos silenciados para *SmHGPRTases* (combinadas) comparado com o grupo controle não tratado (Figura 58 B). Ao analisarmos o número de ovos presentes

por grama de fígado em camundongos infectados com esquistossômulos silenciados para *SmPAI-RBP1*, observa-se um aumento de 40% no número de ovos quando comparado com o grupo controle não tratado (Figura 58 C). Com relação ao número de ovos por grama de intestino, houve um aumento de 45% ao compararmos o grupo infectado com esquistossômulos silenciados para *SmPAI-RBP1* e os parasitos do controle não tratado (Figura 58 D).

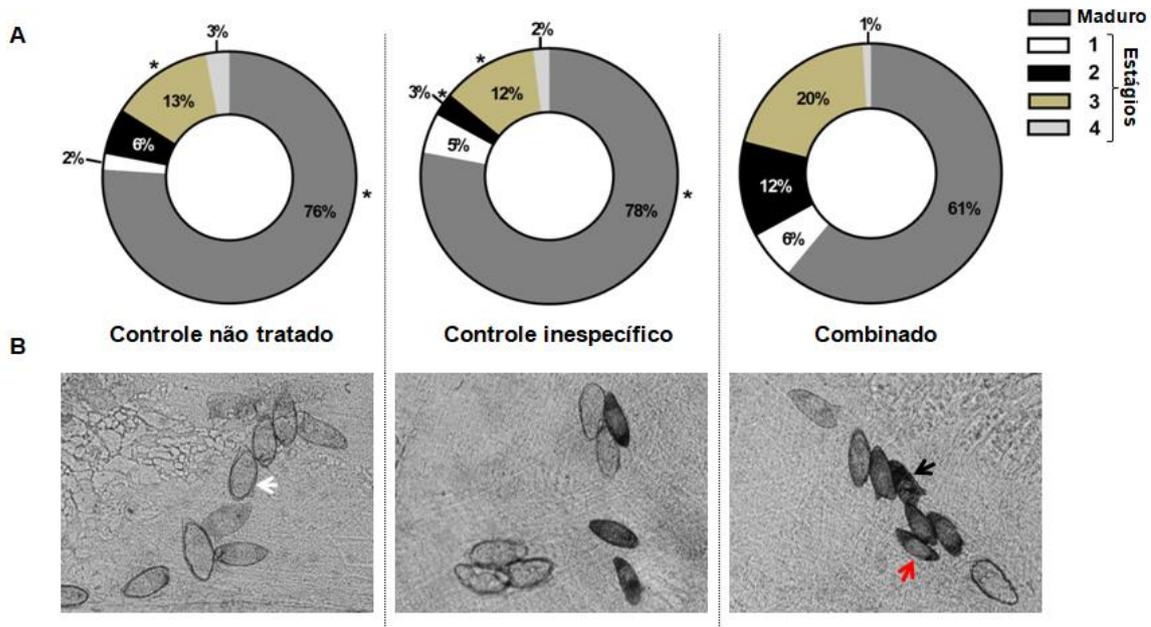
Figura 58 - Contagem do número de ovos encontrados nos fígados e intestinos de camundongos infectados com esquistossômulos expostos aos SmHGPRases-dsRNAs e SmPAI-RBP1-dsRNAs.



(A-B) Os gráficos representam o número de ovos por grama de fígado (A) e intestino (B) de camundongos infectados com esquistossômulos do controle não tratado (círculos pretos), controle inespecífico (círculos brancos), grupo combinado (losangos brancos). (C-D) Os gráficos representam o número de ovos por grama de fígado (C) e intestino (D) de camundongos infectados com esquistossômulos do controle não tratado (círculos pretos), controle inespecífico (círculos brancos), expostos ao SmPAI-RBP1-dsRNA (losangos brancos). Os símbolos representam um único animal para cada grupo experimental. As barras pretas horizontais representam a mediana da área do grupo amostrado. A análise estatística foi feita a partir do teste Mann Whitney.

Apesar de não haver diferença significativa quando consideramos o número de ovos presente no fígado e no intestino destes animais, o íleo de camundongos infectados com esquistossômulos expostos à combinação dos dsRNAs para SmHGPRTases apresentou um aumento significativo de ovos imaturos. Esse aumento foi de 8% de ovos no estágio 3 no grupo de camundongos infectados com parasitos tratados com dsRNAs combinados para *SmHGPRTases* quando comparado aos dos grupos controle. Além disso, foi observado um aumento também significativo de 9% nos ovos no estágio 2, quando comparado aos íleos dos camundongos do grupo controle inespecífico. Uma redução significativa de aproximadamente 16% em ovos maduros também foi observada no grupo no grupo de camundongos infectados com parasitos tratados com dsRNAs combinados para *SmHGPRTases* quando comparado aos grupos controles (Figura 59 A). Imagens representativas na Figura 59 B mostram as diferenças entre os ovos encontrados no íleo de camundongos.

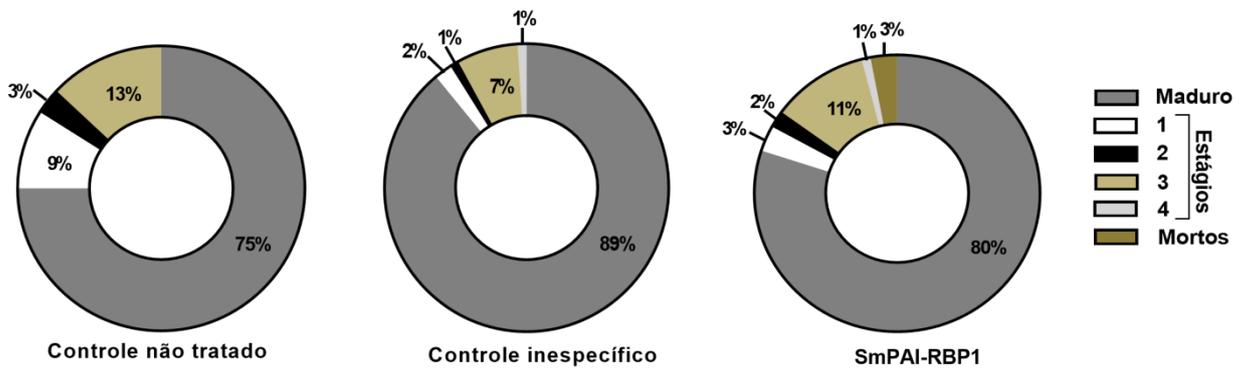
Figura 59 - Avaliação da maturação de ovos presentes no íleo de camundongos infectados com parasitos expostos à combinação dos SmHGPRTases-dsRNAs.



(A) Foram contados 100 ovos no íleo de cada camundongo infectado. As porcentagens de maturação de ovos estão representadas nos gráficos em formas circulares, em que os ovos maduros (cinza), estágio 1 (branco), estágio 2 (preto), estágio 3 (bege) e estágio 4 (cinza claro) foram encontrados. Após verificar a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, foram analisadas diferenças significativas em relação às condições de controle pelo teste t não pareado (* $p \leq 0,05$). (B) Imagens representativas do padrão de maturação em cada grupo experimental. Seta branca: ovo maduro. Seta preta: ovo no estágio 2. Seta vermelha: ovo no estágio 3.

Ao avaliarmos a maturação dos ovos presentes nos fêcos de camundongos infectados com esquistossômulos expostos ao SmPAI-RBP1-dsRNA, nenhuma diferença significativa foi observada como é mostrado na Figura 60. Isso sugere que SmPAI-RBP1 pode não estar relacionado com o desenvolvimento de órgãos reprodutores de fêmeas e conseqüentemente, não interferiu na maturação de ovos.

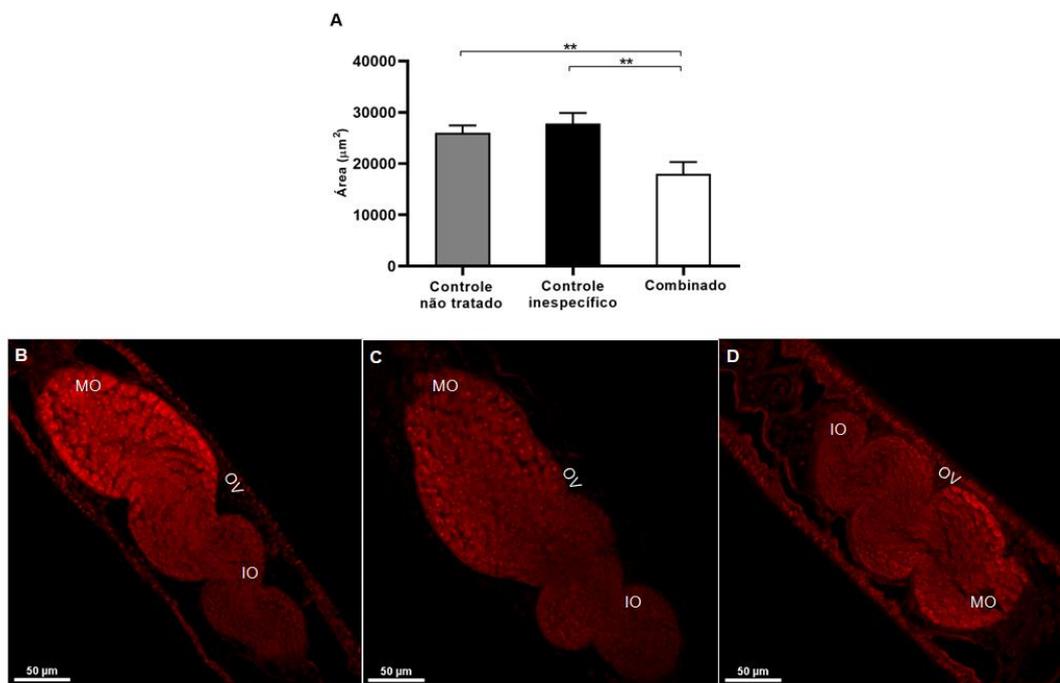
Figura 60 - Avaliação da maturação de ovos presentes no fêco de camundongos infectados com parasitos expostos ao SmPAI-RBP1-dsRNA.



Foram contados 100 ovos no fêco de cada camundongo infectado. As porcentagens de maturação de ovos estão representadas nos gráficos em formas circulares, em que os ovos maduros (cinza), estágio 1 (branco), estágio 2 (preto), estágio 3 (bege), estágio 4 (cinza claro) e mortos (marrom) foram encontrados. Após verificar a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, foram analisadas diferenças significativas em relação às condições de controle pelo teste t não pareado.

Devido ao alto número de ovos imaturos observados após o silenciamento de *SmHGPRases* foi realizada a microscopia confocal para verificarmos se a falta de maturidade dos ovos estavam associados a mudanças na morfologia do parasito. Foi observada uma redução significativa de 36% na área dos ovários em vermes adultos fêmeas recuperadas de camundongos infectados com esquistossômulos silenciados para a combinação de todas as *SmHGPRases* quando comparados aos parasitos dos grupos controle (Figura 61A). A Figura 61 B-D mostram imagens de confocal das alterações estruturais observadas em vermes adultos fêmeas silenciadas para as *SmHGPRases*. Não foram observadas alterações morfológicas no sistema reprodutivo e nem no tegumento de vermes adultos machos (dados não mostrados).

Figura 61 - Vermes adultos fêmeas recuperadas de camundongos infectados com esquistossômulos silenciados para SmHGPRases.



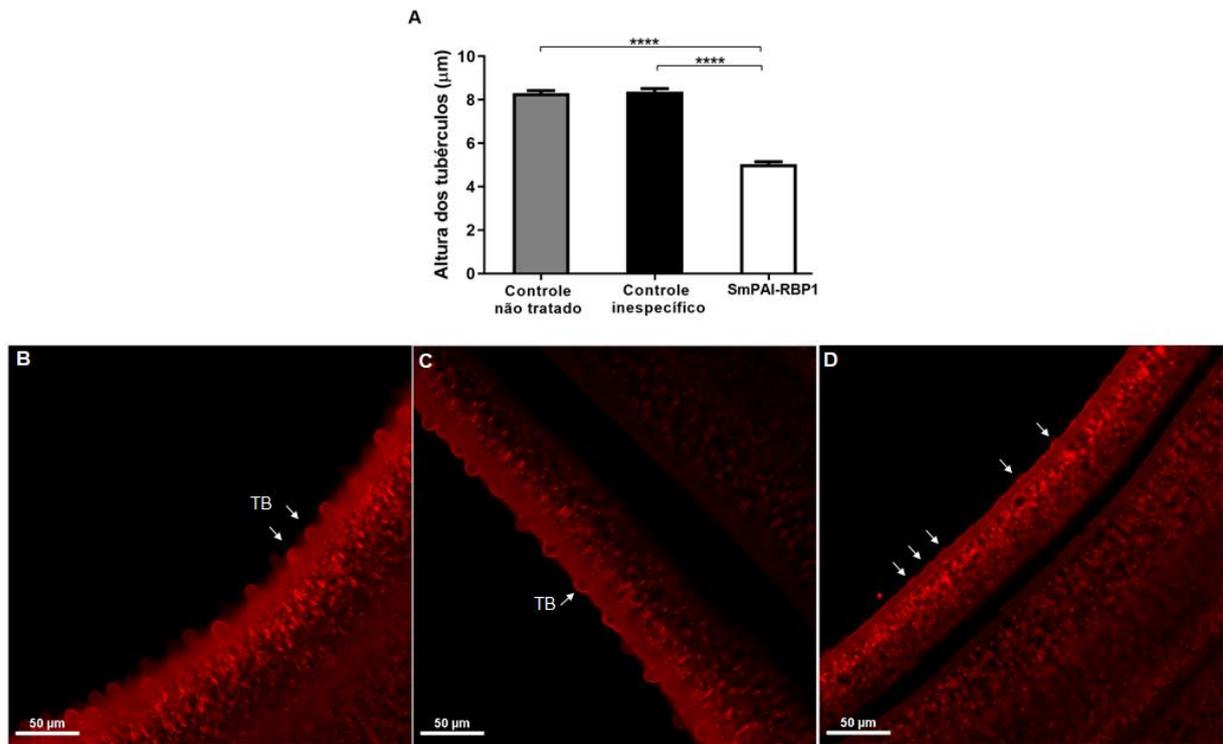
(A) As barras do gráfico representam a área do ovário de vermes adultos fêmeas do grupo controle não tratado (cinza), grupo controle inespecífico (preto) e grupo combinado das SmHGPRases (branco). Acima das barras estão representados o erro padrão da média de três réplicas. Após verificar a normalidade usando o teste de Shapiro-Wilk, diferenças significativas foram analisadas pelo teste t não pareado (** $p \leq 0,01$). B-D): Imagens do confocal demonstrando vermes adultos fêmeas do grupo controle não tratado (B), grupo controle inespecífico (C) e o grupo combinado das SmHGPRases (D). MO: oócito maduro, IO: oócito imaturo, OV: ovário. Barras de escala: 50 μm .

Os genes que codificam SmHGPRases são encontrados regulados positivamente em parasitos avaliados 28 dias após a infecção no humano, sugerindo um possível papel nessa via de sinalização na síntese de moléculas necessárias para a produção de ovos (BUDDENBORG *et al.*, 2019). Nossos resultados corroboram com esses achados, já que observamos uma redução na área do ovário e um número maior de ovos imaturos no íleo de camundongos infectados com esquistossômulos silenciados para todos os genes das SmHGPRases.

Vermes adultos machos recuperados de camundongos infectados com esquistossômulos silenciados para *SmPAI-RBP1* apresentaram uma redução significativa de 40% na altura dos tubérculos ao serem comparados com os parasitos dos grupos controles (Figura 62 A). Alterações estruturais no tegumento são evidenciadas em imagens adquiridas por microscopia confocal de vermes recuperados do grupo *SmPAI-RBP1* (Figura 62 B e C) em comparação com vermes recuperados dos grupos controle (Figura 62 D). Não foram

observadas alterações morfológicas em vermes adultos fêmeas quando *SmPAI-RBP1* foi silenciado.

Figura 62 - Vermes adultos machos recuperados de camundongos infectados com esquistossômulos silenciados para *SmPAI-RBP1*.



(A) As barras do gráfico representam a altura dos tubérculos de vermes adultos machos do grupo controle não tratado (cinza), controle inespecífico (preto) e grupo *SmPAI-RBP1* (branco). Acima das barras estão representados o erro padrão da média de duas réplicas. Após verificação da normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, diferenças significativas em relação às condições de controle foram analisadas pelo teste t não pareado (**** $p < 0,0001$). B-D: Imagem de confocal demonstrando vermes adultos machos do grupo controle não tratado (B), grupo controle inespecífico (C) e grupo *SmPAI-RBP1* (D). TB: tubérculos. As setas brancas indicam os tubérculos normais em B e C e sua redução em D. Barras de escala: 50 µm.

Como o *S. mansoni* tem a capacidade de viver durante anos dentro dos vasos sanguíneos humanos, sabe-se que alguns genes são responsáveis pela viabilidade dos vermes e pelo estabelecimento de infecções. Vários mecanismos foram propostos para explicar como esses parasitos podem inibir a coagulação do sangue do hospedeiro humano, incluindo a troca e a mimetização de moléculas provenientes de seu hospedeiro (DA'DARA; SKELLY, 2014; FIGUEIREDO *et al.*, 2015; FIGUERA; GÓMEZ-ARREAZA; AVILÁN, 2013; MEBIUS *et al.*, 2013; PIROVICH; DA'DARA; SKELLY, 2020). Estudos demonstraram a interação de diferentes proteínas no tegumento de vermes com a via de coagulação do hospedeiro. Em *S. bovis* machos, o plasminogênio do hospedeiro é capaz de se ligar à superfície do tegumento

do verme devido a uma interação com várias proteínas, principalmente enolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e actina. Além disso, essas proteínas são capazes de aumentar a plasmina gerada pelo t-PA (FIGUEIREDO *et al.*, 2015; RAMAJO-HERNÁNDEZ *et al.*, 2007). Assim, recrutando o plasminogênio do hospedeiro para a superfície do tegumento e gerando plasmina, o verme é capaz de degradar os coágulos sanguíneos ao seu redor no sistema vascular do hospedeiro, permitindo que eles se movam e se alimentem livremente *in vivo* (PIROVICH; DA'DARA; SKELLY, 2020; RAMAJO-HERNÁNDEZ *et al.*, 2007). Nossos resultados mostraram que o silenciamento de *SmPAI-RBP1* reduziu os tubérculos em vermes adultos machos recuperados de camundongos infectados com esquistossômulos silenciados. Os tubérculos desempenham papéis essenciais para a sobrevivência do *Schistosoma*, incluindo o aumento da superfície de contato com o sangue do hospedeiro para a absorção de nutrientes e a promoção da aderência às paredes dos vasos sanguíneos do hospedeiro (EL-SHABASY *et al.*, 2015). Assim, tubérculos reduzidos podem afetar a viabilidade e sobrevivência do *Schistosoma* e os resultados aqui apresentados indicam que *SmPAI-RBP1* possa estar envolvido na formação dessas estruturas, uma vez que o tegumento do verme está diretamente relacionado à via de coagulação.

Estudos anteriores mostraram que fêmeas recuperadas de camundongos infectados com esquistossômulos silenciados para *Smp38* apresentaram uma redução significativa na área dos ovários e os machos apresentaram uma redução significativa na altura dos tubérculos (AVELAR *et al.*, 2019). Além disso, vermes adultos machos recuperados de camundongos infectados com parasitos silenciados para *SmJNK* exibiram danos no tegumento e tubérculos reduzidos (ANDRADE *et al.*, 2014). Nossos resultados demonstraram que fêmeas recuperadas após 42 dias de infecção em camundongos com esquistossômulos silenciados para *SmHGPRTases* também apresentaram uma redução na área do ovário. Interessantemente, vermes adultos machos recuperados de camundongos infectados com esquistossômulos silenciados para *SmPAI-RBP1* também mostraram uma redução na altura dos tubérculos, o que possivelmente correlaciona com as evidências que as vias de MAPKs estão diretamente ligadas a expressão de *SmHGPRTase* e *SmPAI-RBP1*, não menosprezando todos os outros alvos identificados como sendo regulados por estas MAPKs.

Os resultados obtidos neste estudo também sugerem que a expansão gênica da família das *SmHGPRTases* que ocorreu com os *Schistosoma spp.*, está relacionado com a necessidade do verme de garantir alternativas para realização da síntese de purinas, já que ele perdeu a capacidade de síntese *de novo*. Em seres humanos as purinas podem ser obtidas por duas vias

diferentes, a via de salvação e a síntese *de novo*, por isso não foi necessário esta expansão gênica, sendo ela codificada por um único gene (WELIN *et al.*, 2010).

6. CONCLUSÕES

Durante este trabalho foi desenvolvido um ensaio financeiramente acessível e de fácil execução com a finalidade de realização de triagens de alto desempenho para novas moléculas que possuam a capacidade de se ligar ao sítio de ligação ao ATP e inibir a ação das Proteínas quinase. O mesmo poderá ser utilizado na busca de inibidores não apenas para os diferentes grupos de Pks do parasito *S. mansoni*, mas também na busca de moléculas para diferentes organismos, sendo este baseado na análise da polarização da fluorescência de uma sonda análoga ao ATP.

Os “*pipelines*” utilizados para triagem de moléculas *in silico* por “*docking*” e priorização de compostos resultaram em predições de inibidores com capacidade de se ligar ao sítio de ligação ao ATP das MAPKs de *S. mansoni*, o que resultou em um grande número de inibidores ativos em diferentes estágios do parasito que serão bastante promissores para futuros estudos *in vivo* contribuindo para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da esquistossomose.

Ainda, a compreensão do papel biológico das proteínas SmPAI-RBP1 e da família SmHGPRases, as quais são reguladas pelas proteínas quinase no ciclo de vida do parasito, confirmou que a via da MAPK SmJNK regula a expressão de *SmPAI-RBP1* e a via da MAPK Smp38 regula a expressão de *SmHGPRase 1*, *SmHGPRase 3* e *SmPAI-RBP1*.

O *SmPAI-RBP1* parece estar envolvido no desenvolvimento de esporocistos e esquistossômulos. Além disso, esse gene também parece estar relacionado com a diminuição da altura dos tubérculos no tegumento de vermes adultos machos.

A depleção das SmHGPRases reduziram os níveis de adenosina em esporocistos e fêmeas, estágios estes que apresentaram altos níveis de expressão destes genes, afetando assim a viabilidade e desenvolvimento de esporocistos e a reprodução de vermes adultos fêmeas, demonstrada pela redução da área dos ovários e o aumento no número de ovos imaturos no íleo de camundongos, além de alterar a motilidade de fêmeas *in vitro*.

Nossos resultados sugerem ainda que SmHGPRase 1, SmHGPRase 2, SmHGPRase 4 e SmHGPRase 5 sejam importantes para a viabilidade e o desenvolvimento de esporocistos e que a atividade de SmHGPRase 1, SmHGPRase 2, SmHGPRase 4, SmHGPRase 5 e SmHGPRase 3 sejam importantes para o desenvolvimento de esquistossômulos, sendo que há indícios que uma SmHGPRase substitua a função de outra.

Em conclusão, este estudo forneceu instrumentos úteis para a descoberta de novos medicamentos promissores que preconizam as PKs como alvo e podem ser utilizados em

diversos organismos. Além disso, contribuimos para elucidar os papéis biológicos de genes essenciais para o ciclo de vida do *S. mansoni*.

7. PERSPECTIVAS

- Determinar o índice de seletividade das moléculas que foram ativas nos ensaios *in vitro* realizados com esquistossômulos e vermes adultos.
- Realização de testes *in vivo* com as moléculas que se mostraram ativas nos testes *in vitro*.
- Avaliar a ocorrência de encapsulamento de esporocistos silenciados para os genes *SmHGPRTases* por hemócitos de moluscos.
- Silenciar os genes das *SmHGPRTases* em ovos de *S. mansoni* para avaliar o desenvolvimento dos esporocistos em moluscos.

8. REFERÊNCIAS

ABDULLA, M. H. *et al.* Drug discovery for schistosomiasis: hit and lead compounds identified in a library of known drugs by medium-throughput phenotypic screening. *PLoS Negl Trop Dis*, 3, n. 7, p. e478, Jul 2009.

AGUIAR, P. H. N. *et al.* A high-throughput colorimetric assay for detection of *Schistosoma mansoni* viability based on the tetrazolium salt XTT. *Parasit Vectors*, 10, n. 1, p. 300, Jun 2017.

ANDRADE, L. F. *et al.* Regulation of *Schistosoma mansoni* development and reproduction by the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *PLoS Negl Trop Dis*, 8, n. 6, p. e2949, Jun 2014.

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

AVELAR, L. D. G. A. *et al.* Smp38 MAP Kinase Regulation in. *Front Immunol*, 10, p. 21, 2019.

BAGOWSKI, C. P.; XIONG, W.; FERRELL, J. E. c-Jun N-terminal kinase activation in *Xenopus laevis* eggs and embryos. A possible non-genomic role for the JNK signaling pathway. *J Biol Chem*, 276, n. 2, p. 1459-1465, Jan 2001.

BASCH, P. F. Why do schistosomes have separate sexes? *Parasitol Today*, 6, n. 5, p. 160-163, May 1990.

BECKER, B. *et al.* Light and electron microscopic studies on the effect of praziquantel on *Schistosoma mansoni*, *Dicrocoelium dendriticum*, and *Fasciola hepatica* (Trematoda) in vitro. *Z Parasitenkd*, 63, n. 2, p. 113-128, 1980.

BERRY, A. *et al.* Evidence for a permanent presence of schistosomiasis in Corsica, France, 2015. *Euro Surveill*, 21, n. 1, 2016.

BITEAU, B. *et al.* Regulation of *Drosophila* lifespan by JNK signaling. *Exp Gerontol*, 46, n. 5, p. 349-354, May 2011.

BOAG, P. R.; NEWTON, S. E.; GASSER, R. B. Molecular aspects of sexual development and reproduction in nematodes and schistosomes. *Adv Parasitol*, 50, p. 153-198, 2001.

BOTROS, S. S.; BENNETT, J. L. Praziquantel resistance. *Expert Opin Drug Discov*, 2, n. s1, p. S35-40, Oct 2007.

BOYLE, J. P. *et al.* Using RNA interference to manipulate endogenous gene expression in *Schistosoma mansoni* sporocysts. *Mol Biochem Parasitol*, 128, n. 2, p. 205-215, May 2003.

BOYLE, S. N.; KOLESKE, A. J. Dissecting kinase signaling pathways. *Drug Discov Today*, 12, n. 17-18, p. 717-724, Sep 2007.

- BUDDENBORG, S. K. *et al.* The in vivo transcriptome of *Schistosoma mansoni* in the prominent vector species *Biomphalaria pfeifferi* with supporting observations from *Biomphalaria glabrata*. *PLoS Negl Trop Dis*, 13, n. 9, p. e0007013, 09 2019.
- BUSCÀ, R. *et al.* ERK1 and ERK2 present functional redundancy in tetrapods despite higher evolution rate of ERK1. *BMC Evol Biol*, 15, p. 179, Sep 2015.
- BUSCÀ, R.; POUYSSÉGUR, J.; LENORMAND, P. ERK1 and ERK2 Map Kinases: Specific Roles or Functional Redundancy? *Front Cell Dev Biol*, 4, p. 53, 2016.
- BUSTIN, S. A. *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, 55, n. 4, p. 611-622, Apr 2009.
- CAFFREY, C. R. Chemotherapy of schistosomiasis: present and future. *Curr Opin Chem Biol*, 11, n. 4, p. 433-439, Aug 2007.
- CHEEVER, A. W. *et al.* Natural history of *Schistosoma mansoni* infection in mice: egg production, egg passage in the feces, and contribution of host and parasite death to changes in worm numbers. *Am J Trop Med Hyg*, 50, n. 3, p. 269-280, Mar 1994.
- CHEN, J. *et al.* Participation of the p38 pathway in *Drosophila* host defense against pathogenic bacteria and fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, n. 48, p. 20774-20779, Nov 2010.
- CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L. Praziquantel. *Parasitol Res*, 90 Supp 1, p. S3-9, Jun 2003.
- COELI, R. *et al.* Praziquantel treatment decreases *Schistosoma mansoni* genetic diversity in experimental infections. *PLoS Negl Trop Dis*, 7, n. 12, p. e2596, 2013.
- COHEN, P. Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov*, 1, n. 4, p. 309-315, Apr 2002.
- COX, L. S.; REDMAN, C. The role of cellular senescence in ageing of the placenta. *Placenta*, 52, p. 139-145, 04 2017.
- CRAIG, S. P. *et al.* Analysis of cDNA encoding the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRTase) of *Schistosoma mansoni*; a putative target for chemotherapy. *Nucleic Acids Res*, 16, n. 14B, p. 7087-7101, Jul 1988.
- CUESTA-ASTROZ, Y. *et al.* Analysis of Predicted Host-Parasite Interactomes Reveals Commonalities and Specificities Related to Parasitic Lifestyle and Tissues Tropism. *Front Immunol*, 10, p. 212, 2019.
- DA'DARA, A. A.; SKELLY, P. J. Schistosomes versus platelets. *Thromb Res*, 134, n. 6, p. 1176-1181, Dec 2014.
- DEMARCO, R.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. Schistosomes--proteomics studies for potential novel vaccines and drug targets. *Drug Discov Today*, 14, n. 9-10, p. 472-478, May 2009.

DHANASEKARAN, D. N.; REDDY, E. P. JNK signaling in apoptosis. *Oncogene*, 27, n. 48, p. 6245-6251, Oct 2008.

DHANASEKARAN, D. N.; REDDY, E. P. JNK-signaling: A multiplexing hub in programmed cell death. *Genes Cancer*, 8, n. 9-10, p. 682-694, Sep 2017.

DOENHOFF, M. J.; CIOLI, D.; UTZINGER, J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Curr Opin Infect Dis*, 21, n. 6, p. 659-667, Dec 2008.

DOENHOFF, M. J. *et al.* Praziquantel: its use in control of schistosomiasis in sub-Saharan Africa and current research needs. *Parasitology*, 136, n. 13, p. 1825-1835, Nov 2009.

EGLIN, R. M.; REISINE, T. The current status of drug discovery against the human kinome. *Assay Drug Dev Technol*, 7, n. 1, p. 22-43, Feb 2009.

EL-GEBALI, S. *et al.* The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Res*, 47, n. D1, p. D427-D432, 01 2019.

EL-SHABASY, E. A. *et al.* Transmission electron microscopic observations on ultrastructural alterations in *Schistosoma mansoni* adult worms recovered from C57BL/6 mice treated with radiation-attenuated vaccine and/or praziquantel in addition to passive immunization with normal and vaccinated rabbit sera against infection. *Parasitol Res*, 114, n. 4, p. 1563-1580, Apr 2015.

ESCOBEDO, G. *et al.* Parasite regulation by host hormones: an old mechanism of host exploitation? *Trends Parasitol*, 21, n. 12, p. 588-593, Dec 2005.

FENWICK, A.; WEBSTER, J. P. Schistosomiasis: challenges for control, treatment and drug resistance. *Curr Opin Infect Dis*, 19, n. 6, p. 577-582, Dec 2006.

FENWICK, A. *et al.* The Schistosomiasis Control Initiative (SCI): rationale, development and implementation from 2002-2008. *Parasitology*, 136, n. 13, p. 1719-1730, Nov 2009.

FERRER, M. *et al.* Chaperonins govern growth of *Escherichia coli* at low temperatures. *Nat Biotechnol*, 21, n. 11, p. 1266-1267, Nov 2003.

FIGUEIREDO, B. C. *et al.* Schistosomes Enhance Plasminogen Activation: The Role of Tegumental Enolase. *PLoS Pathog*, 11, n. 12, p. e1005335, Dec 2015.

FIGUERA, L.; GÓMEZ-ARREAZA, A.; AVILÁN, L. Parasitism in optima forma: exploiting the host fibrinolytic system for invasion. *Acta Trop*, 128, n. 1, p. 116-123, Oct 2013.

FLETCHER, M. *et al.* Global transcriptional regulation of innate immunity by ATF-7 in *C. elegans*. *PLoS Genet*, 15, n. 2, p. e1007830, 02 2019.

GALVÃO-CASTRO, B. *et al.* Correlation of circulating immune complexes and complement breakdown products with the severity of the disease in human schistosomiasis mansoni. *Am J Trop Med Hyg*, 30, n. 6, p. 1238-1246, Nov 1981.

GANE, P. J.; DEAN, P. M. Recent advances in structure-based rational drug design. *Curr Opin Struct Biol*, 10, n. 4, p. 401-404, Aug 2000.

GAVA, S. G. *et al.* Profiling Transcriptional Regulation and Functional Roles of. *Front Genet*, 10, p. 1036, 2019.

GLASER, J. *et al.* Anti-Schistosomal Activity of Cinnamic Acid Esters: Eugenyl and Thymyl Cinnamate Induce Cytoplasmic Vacuoles and Death in Schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Molecules*, 20, n. 6, p. 10873-10883, Jun 2015.

GONZÁLEZ-MIGUEL, J. *et al.* Can the activation of plasminogen/plasmin system of the host by metabolic products of *Dirofilaria immitis* participate in heartworm disease endarteritis? *Parasit Vectors*, 8, p. 194, Apr 2015.

GONÇALVES, K. E. A. *et al.* Evidence for the association of the human regulatory protein Ki-1/57 with the translational machinery. *FEBS Lett*, 585, n. 16, p. 2556-2560, Aug 2011.

GRAY, D. J. *et al.* Diagnosis and management of schistosomiasis. *BMJ*, 342, p. d2651, May 2011.

GREENBERG, R. M. New approaches for understanding mechanisms of drug resistance in schistosomes. *Parasitology*, 140, n. 12, p. 1534-1546, Oct 2013.

GREVELDING, C. G.; LANGNER, S.; DISSOUS, C. Kinases: Molecular Stage Directors for Schistosome Development and Differentiation. *Trends Parasitol*, 34, n. 3, p. 246-260, 03 2018.

GRYSEELS, B. Schistosomiasis. *Infect Dis Clin North Am*, 26, n. 2, p. 383-397, Jun 2012.

GRYSEELS, B. *et al.* Human schistosomiasis. *Lancet*, 368, n. 9541, p. 1106-1118, Sep 2006.

GUIDI, A. *et al.* Discovery by organism based high-throughput screening of new multi-stage compounds affecting *Schistosoma mansoni* viability, egg formation and production. *PLoS Negl Trop Dis*, 11, n. 10, p. e0005994, Oct 2017.

HAAS, W. *et al.* *Schistosoma mansoni* cercariae: stimulation of acetabular gland secretion is adapted to the chemical composition of mammalian skin. *J Parasitol*, 83, n. 6, p. 1079-1085, Dec 1997.

HAMILTON, A. J.; BAULCOMBE, D. C. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 286, n. 5441, p. 950-952, Oct 1999.

HAN, J. *et al.* A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*, 265, n. 5173, p. 808-811, Aug 1994.

HAN, Z. G. *et al.* *Schistosoma* genomics: new perspectives on schistosome biology and host-parasite interaction. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 10, p. 211-240, 2009.

HANKS, S. K.; QUINN, A. M. Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods Enzymol*, 200, p. 38-62, 1991.

HANKS, S. K.; QUINN, A. M.; HUNTER, T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, 241, n. 4861, p. 42-52, Jul 1988.

HATTORI, A. *et al.* The *Caenorhabditis elegans* JNK signaling pathway activates expression of stress response genes by derepressing the Fos/HDAC repressor complex. *PLoS Genet*, 9, n. 2, p. e1003315, 2013.

HAYASHI, K.; KOJIMA, C. pCold-GST vector: a novel cold-shock vector containing GST tag for soluble protein production. *Protein Expr Purif*, 62, n. 1, p. 120-127, Nov 2008.

HAZENBOS, W. L. *et al.* Murine IgG1 complexes trigger immune effector functions predominantly via Fc gamma RIII (CD16). *J Immunol*, 161, n. 6, p. 3026-3032, Sep 1998.

HEATON, J. H. *et al.* Identification and cDNA cloning of a novel RNA-binding protein that interacts with the cyclic nucleotide-responsive sequence in the Type-1 plasminogen activator inhibitor mRNA. *J Biol Chem*, 276, n. 5, p. 3341-3347, Feb 2001.

HESSE, M. *et al.* NOS-2 mediates the protective anti-inflammatory and antifibrotic effects of the Th1-inducing adjuvant, IL-12, in a Th2 model of granulomatous disease. *Am J Pathol*, 157, n. 3, p. 945-955, Sep 2000.

HIDAKA, H. *et al.* Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochemistry*, 23, n. 21, p. 5036-5041, Oct 1984.

HOLTFRETER, M. C. *et al.* *Schistosoma haematobium* infections acquired in Corsica, France, August 2013. *Euro Surveill*, 19, n. 22, Jun 2014.

HUANG, X. *et al.* JNK2 participates in spindle assembly during mouse oocyte meiotic maturation. *Microsc Microanal*, 17, n. 2, p. 197-205, Apr 2011.

HUNTINGTON, J. A. Serpin structure, function and dysfunction. *J Thromb Haemost*, 9 Suppl 1, p. 26-34, Jul 2011.

INGLESE, J. *et al.* High-throughput screening assays for the identification of chemical probes. *Nat Chem Biol*, 3, n. 8, p. 466-479, Aug 2007.

INOUE, H. *et al.* The *C. elegans* p38 MAPK pathway regulates nuclear localization of the transcription factor SKN-1 in oxidative stress response. *Genes Dev*, 19, n. 19, p. 2278-2283, Oct 2005.

JAMESON, D. M.; ROSS, J. A. Fluorescence polarization/anisotropy in diagnostics and imaging. *Chem Rev*, 110, n. 5, p. 2685-2708, May 2010.

JOHNSON, G. L.; LAPADAT, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*, 298, n. 5600, p. 1911-1912, Dec 2002.

JONES, G. *et al.* Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J Mol Biol*, 267, n. 3, p. 727-748, Apr 1997.

KAPLAN, A. P.; AUSTEN, K. F. The fibrinolytic pathway of human plasma. Isolation and characterization of the plasminogen proactivator. *J Exp Med*, 136, n. 6, p. 1378-1393, Dec 1972.

KAPPOCK, T. J.; EALICK, S. E.; STUBBE, J. Modular evolution of the purine biosynthetic pathway. *Curr Opin Chem Biol*, 4, n. 5, p. 567-572, Oct 2000.

KATOH, K.; ROZEWICKI, J.; YAMADA, K. D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief Bioinform*, 20, n. 4, p. 1160-1166, 07 2019.

KATZ, N. Schistosomiasis control in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 93 Suppl 1, p. 33-35, 1998.

KEISER, J. In vitro and in vivo trematode models for chemotherapeutic studies. *Parasitology*, 137, n. 3, p. 589-603, Mar 2010.

KELLEY, L. A. *et al.* The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc*, 10, n. 6, p. 845-858, Jun 2015.

KURRECK, J. RNA interference: from basic research to therapeutic applications. *Angew Chem Int Ed Engl*, 48, n. 8, p. 1378-1398, 2009.

LAMBERTUCCI, J. R. Acute schistosomiasis: clinical, diagnostic and therapeutic features. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 35, n. 5, p. 399-404, 1993 Sep-Oct 1993.

LEWIS, T. S.; SHAPIRO, P. S.; AHN, N. G. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res*, 74, p. 49-139, 1998.

LIN, A. Activation of the JNK signaling pathway: breaking the brake on apoptosis. *Bioessays*, 25, n. 1, p. 17-24, Jan 2003.

LIONTA, E. *et al.* Structure-based virtual screening for drug discovery: principles, applications and recent advances. *Curr Top Med Chem*, 14, n. 16, p. 1923-1938, 2014.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, n. 4, p. 402-408, Dec 2001.

LONG, T. *et al.* Structure-Bioactivity Relationship for Benzimidazole Thiophene Inhibitors of Polo-Like Kinase 1 (PLK1), a Potential Drug Target in *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis*, 10, n. 1, p. e0004356, Jan 2016.

- LOVERDE, P. T. Schistosomiasis. *Adv Exp Med Biol*, 1154, p. 45-70, 2019.
- LOVERDE, P. T. *et al.* Schistosoma mansoni genome project: an update. *Parasitol Int*, 53, n. 2, p. 183-192, Jun 2004.
- MACCESI, M. *et al.* Multi-center screening of the Pathogen Box collection for schistosomiasis drug discovery. *Parasit Vectors*, 12, n. 1, p. 493, Oct 2019.
- MACHADO, P. A. The Brazilian program for schistosomiasis control, 1975-1979. *Am J Trop Med Hyg*, 31, n. 1, p. 76-86, Jan 1982.
- MALDONADO, J. F.; ACOSTA MATIENZO, J. The development of Schistosoma mansoni in the snail intermediate host, Australorbis glabratus. *PR J Public Health Trop Med*, 22, n. 4, p. 331-373, Spanish transl, 374-404, Jun 1947.
- MANSOUR, N. R. *et al.* High Throughput Screening Identifies Novel Lead Compounds with Activity against Larval, Juvenile and Adult Schistosoma mansoni. *PLoS Negl Trop Dis*, 10, n. 4, p. e0004659, Apr 2016.
- MARCELLINO, C. *et al.* WormAssay: a novel computer application for whole-plate motion-based screening of macroscopic parasites. *PLoS Negl Trop Dis*, 6, n. 1, p. e1494, Jan 2012.
- MARCHI, M. *et al.* The N-terminal domain of ERK1 accounts for the functional differences with ERK2. *PLoS One*, 3, n. 12, p. e3873, 2008.
- MATI, V. L.; MELO, A. L. Current applications of oogram methodology in experimental schistosomiasis; fecundity of female Schistosoma mansoni and egg release in the intestine of AKR/J mice following immunomodulatory treatment with pentoxifylline. *J Helminthol*, 87, n. 1, p. 115-124, Mar 2013.
- MEBIUS, M. M. *et al.* Interference with the host haemostatic system by schistosomes. *PLoS Pathog*, 9, n. 12, p. e1003781, 2013.
- MILLIGAN, J. N.; JOLLY, E. R. Cercarial transformation and in vitro cultivation of Schistosoma mansoni schistosomules. *J Vis Exp*, n. 54, Aug 2011.
- MIYASHITA, C.; WENZEL, E.; HEIDEN, M. Plasminogen: a brief introduction into its biochemistry and function. *Haemostasis*, 18 Suppl 1, p. 7-13, 1988.
- MOREIRA, B. P. *et al.* Use of BODIPY-Labeled ATP Analogues in the Development and Validation of a Fluorescence Polarization-Based Assay for Screening of Kinase Inhibitors. *ACS Omega*, 5, n. 16, p. 9064-9070, Apr 2020.
- MORGAN, J. A. *et al.* Schistosoma mansoni and Biomphalaria: past history and future trends. *Parasitology*, 123 Suppl, p. S211-228, 2001.
- MOURÃO, M. M. *et al.* Phenotypic screen of early-developing larvae of the blood fluke, schistosoma mansoni, using RNA interference. *PLoS Negl Trop Dis*, 3, n. 8, p. e502, Aug 2009.

MÄDER, P. *et al.* Chemotherapy for Fighting Schistosomiasis: Past, Present and Future. *ChemMedChem*, 13, n. 22, p. 2374-2389, 11 2018.

NAHUM, L. A.; MOURÃO, M. M.; OLIVEIRA, G. New frontiers in schistosoma genomics and transcriptomics. *J Parasitol Res*, 2012, p. 849132, 2012.

NATION, C. S. *et al.* Schistosome migration in the definitive host. *PLoS Negl Trop Dis*, 14, n. 4, p. e0007951, 04 2020.

NDEGWA, D.; KRAUTZ-PETERSON, G.; SKELLY, P. J. Protocols for gene silencing in schistosomes. *Exp Parasitol*, 117, n. 3, p. 284-291, Nov 2007.

NEGI, H. *et al.* 3 β -Hydroxy-urs-12-en-28-oic acid prolongs lifespan in *C. elegans* by modulating JNK-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 480, n. 4, p. 539-543, Nov 2016.

NUTTER, F. H.; HAYLOR, J. L.; KHWAJA, A. Inhibiting ERK Activation with CI-1040 Leads to Compensatory Upregulation of Alternate MAPKs and Plasminogen Activator Inhibitor-1 following Subtotal Nephrectomy with No Impact on Kidney Fibrosis. *PLoS One*, 10, n. 9, p. e0137321, 2015.

OKUYAMA, T. *et al.* The ERK-MAPK pathway regulates longevity through SKN-1 and insulin-like signaling in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem*, 285, n. 39, p. 30274-30281, Sep 2010.

OLIVEIRA, K. C. *et al.* Imbalance of Steroid Hormones in Hamsters Infected with. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 19, n. 8, p. 1122-1126, 2019.

ONO, K.; HAN, J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal*, 12, n. 1, p. 1-13, Jan 2000.

ORGANISATION, W. A. H. Weekly epidemiological record:Schistosomiasis and soiltransmitted helminthiasis: numbers of people treated in 2017.: *Wkly. Epidemiol. Rec. III*: 445–452 p. 2018.

PARK, H. *et al.* Structural basis and biological consequences for JNK2/3 isoform selective aminopyrazoles. *Sci Rep*, 5, p. 8047, Jan 2015.

PEARCE, E. J.; SHER, A. Mechanisms of immune evasion in schistosomiasis. *Contrib Microbiol Immunol*, 8, p. 219-232, 1987.

PELLEGRINO, J.; KATZ, N. Experimental therapy of schistosomiasis mansoni. IX. Observations on the activity of quinine and its isomers. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 16, n. 5, p. 301-304, 1974 Sep-Oct 1974.

PELLEGRINO, J.; SIQUEIRA, A. F. A perfusion technic for recovery of *Schistosoma mansoni* from experimentally infected guinea pigs. *Rev Bras Malariol Doencas Trop*, 8, n. 4, p. 589-597, Oct 1956.

- PEREIRA, T. C. *et al.* Schistosoma mansoni: evaluation of an RNAi-based treatment targeting HGPRTase gene. *Exp Parasitol*, 118, n. 4, p. 619-623, Apr 2008.
- PETERSON, N. A. *et al.* Glycotope analysis in miracidia and primary sporocysts of Schistosoma mansoni: differential expression during the miracidium-to-sporocyst transformation. *Int J Parasitol*, 39, n. 12, p. 1331-1344, Oct 2009.
- PETTERSEN, E. F. *et al.* UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*, 25, n. 13, p. 1605-1612, Oct 2004.
- PICA-MATTOCCIA, L.; CIOLI, D. Studies on the mode of action of oxamniquine and related schistosomicidal drugs. *Am J Trop Med Hyg*, 34, n. 1, p. 112-118, Jan 1985.
- PICA-MATTOCCIA, L.; CIOLI, D. Sex- and stage-related sensitivity of Schistosoma mansoni to in vivo and in vitro praziquantel treatment. *Int J Parasitol*, 34, n. 4, p. 527-533, Mar 2004.
- PIRES, D. E.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B. pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. *J Med Chem*, 58, n. 9, p. 4066-4072, May 2015.
- PIROVICH, D. B.; DA'DARA, A. A.; SKELLY, P. J. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase enhances formation of the blood-clot lysis protein plasmin. *Biol Open*, 9, n. 3, Mar 2020.
- RAMAJO-HERNÁNDEZ, A. *et al.* Schistosoma bovis: plasminogen binding in adults and the identification of plasminogen-binding proteins from the worm tegument. *Exp Parasitol*, 115, n. 1, p. 83-91, Jan 2007.
- RAU, J. C. *et al.* Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. *J Thromb Haemost*, 5 Suppl 1, p. 102-115, Jul 2007.
- RESSURREIÇÃO, M. *et al.* Molecular characterization of host-parasite cell signalling in Schistosoma mansoni during early development. *Sci Rep*, 6, p. 35614, 10 2016.
- RESSURREIÇÃO, M. *et al.* A role for p38 MAPK in the regulation of ciliary motion in a eukaryote. *BMC Cell Biol*, 12, p. 6, Jan 2011a.
- RESSURREIÇÃO, M. *et al.* A role for p38 mitogen-activated protein kinase in early post-embryonic development of Schistosoma mansoni. *Mol Biochem Parasitol*, 180, n. 1, p. 51-55, Nov 2011b.
- ROJO-ARREOLA, L. *et al.* Chemical and genetic validation of the statin drug target to treat the helminth disease, schistosomiasis. *PLoS One*, 9, n. 1, p. e87594, 2014.
- ROMANELLO, L. *et al.* In vitro and in vivo characterization of the multiple isoforms of Schistosoma mansoni hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferases. *Mol Biochem Parasitol*, 229, p. 24-34, 04 2019.

- ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol*, 5, p. 172, 2014.
- ROSS, A. F.; JAFFE, J. J. Effects of tubercidin and its ribonucleotides on various metabolic pathways in *Schistosoma mansoni*. *Biochem Pharmacol*, 21, n. 22, p. 3059-3069, Nov 1972.
- SABAH, A. A. *et al.* *Schistosoma mansoni*: chemotherapy of infections of different ages. *Exp Parasitol*, 61, n. 3, p. 294-303, Jun 1986.
- SCHMITTGEN, T. D. Real-time quantitative PCR. *Methods*, 25, n. 4, p. 383-385, Dec 2001.
- SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*, 9, n. 7, p. 671-675, Jul 2012.
- SCHOLTE, R. G. *et al.* Predictive risk mapping of schistosomiasis in Brazil using Bayesian geostatistical models. *Acta Trop*, 132, p. 57-63, Apr 2014.
- SEIFFERT, D. *et al.* Interactions between type 1 plasminogen activator inhibitor, extracellular matrix and vitronectin. *Cell Differ Dev*, 32, n. 3, p. 287-292, Dec 1990.
- SENFT, A. W.; CRABTREE, G. W. Pathways of nucleotide metabolism in *Schistosoma mansoni*--VII. Inhibition of adenine and guanine nucleotide synthesis by purine analogs in intact worms. *Biochem Pharmacol*, 26, n. 20, p. 1847-1855, Oct 1977.
- SENFT, A. W.; CRABTREE, G. W. Purine metabolism in the schistosomes: potential targets for chemotherapy. *Pharmacol Ther*, 20, n. 3, p. 341-356, 1983.
- SHELLER-MILLER, S. *et al.* Systematic review of p38 mitogen-activated kinase and its functional role in reproductive tissues. *Am J Reprod Immunol*, 80, n. 6, p. e13047, 12 2018.
- SHIVERS, R. P. *et al.* Phosphorylation of the conserved transcription factor ATF-7 by PMK-1 p38 MAPK regulates innate immunity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet*, 6, n. 4, p. e1000892, Apr 2010.
- SHOSHANI, O.; CLEVELAND, D. W. Gene expression regulated by RNA stability. *Science*, 367, n. 6473, p. 29, 01 2020.
- SINHA, S. C.; SMITH, J. L. The PRT protein family. *Curr Opin Struct Biol*, 11, n. 6, p. 733-739, Dec 2001.
- SKELLY, P. J.; DA'DARA, A.; HARN, D. A. Suppression of cathepsin B expression in *Schistosoma mansoni* by RNA interference. *Int J Parasitol*, 33, n. 4, p. 363-369, Apr 2003.
- SOUFAN, O. *et al.* Mining Chemical Activity Status from High-Throughput Screening Assays. *PLoS One*, 10, n. 12, p. e0144426, 2015.
- SUN, H. The interaction between pathogens and the host coagulation system. *Physiology (Bethesda)*, 21, p. 281-288, Aug 2006.

- SUNDARAM, M. V. RTK/Ras/MAPK signaling. WormBook, p. 1-19, Feb 2006.
- SUZANNE, M.; PERRIMON, N.; NOSELLI, S. The Drosophila JNK pathway controls the morphogenesis of the egg dorsal appendages and micropyle. *Dev Biol*, 237, n. 2, p. 282-294, Sep 2001.
- TAKEDA, A. *et al.* Squamous cell carcinoma antigen is a potent inhibitor of cysteine proteinase cathepsin L. *FEBS Lett*, 359, n. 1, p. 78-80, Feb 1995.
- TASAKI, J. *et al.* ERK signaling controls blastema cell differentiation during planarian regeneration. *Development*, 138, n. 12, p. 2417-2427, Jun 2011.
- TAVARES, N. C.; A. *et al.* Schistosomiasis: Setting Routes for Drug Discovery. In: CHEN, T. e CHAI, S. (Ed.). *Special Topics in Drug Discovery*. IntechOpen, 2016. v. 1, p. 105-132.
- THOMAS, C. M.; TIMSON, D. J. The Mechanism of Action of Praziquantel: Can New Drugs Exploit Similar Mechanisms? *Curr Med Chem*, 27, n. 5, p. 676-696, 2020.
- TROEMEL, E. R. *et al.* p38 MAPK regulates expression of immune response genes and contributes to longevity in *C. elegans*. *PLoS Genet*, 2, n. 11, p. e183, Nov 2006.
- TUCCINARDI, T. *et al.* Protein kinases: docking and homology modeling reliability. *J Chem Inf Model*, 50, n. 8, p. 1432-1441, Aug 2010.
- VALE, N. *et al.* Praziquantel for Schistosomiasis: Single-Drug Metabolism Revisited, Mode of Action, and Resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 61, n. 5, 05 2017.
- VALENTIM, C. L. *et al.* Genetic and molecular basis of drug resistance and species-specific drug action in schistosome parasites. *Science*, 342, n. 6164, p. 1385-1389, Dec 2013.
- VERDONK, M. L. *et al.* Improved protein-ligand docking using GOLD. *Proteins*, 52, n. 4, p. 609-623, Sep 2003.
- VERMA, S. *et al.* A novel gene-diet pair modulates *C. elegans* aging. *PLoS Genet*, 14, n. 8, p. e1007608, 08 2018.
- VICOIGNE, J. *et al.* Conservation of epidermal growth factor receptor function in the human parasitic helminth *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem*, 279, n. 36, p. 37407-37414, Sep 2004.
- VIDALIN, O. *et al.* In vivo target validation using gene invalidation, RNA interference and protein functional knockout models: it is the time to combine. *Curr Opin Pharmacol*, 9, n. 5, p. 669-676, Oct 2009.
- VULPETTI, A.; BOSOTTI, R. Sequence and structural analysis of kinase ATP pocket residues. *Farmaco*, 59, n. 10, p. 759-765, Oct 2004.
- WAKNINE-GRINBERG, J. H. *et al.* *Schistosoma mansoni* infection reduces the incidence of murine cerebral malaria. *Malar J*, 9, p. 5, Jan 2010.

WANG, S.; ZHU, X. Q.; CAI, X. Gene Duplication Analysis Reveals No Ancient Whole Genome Duplication but Extensive Small-Scale Duplications during Genome Evolution and Adaptation of. *Front Cell Infect Microbiol*, 7, p. 412, 2017.

WARREN, K. S.; DOMINGO, E. O.; COWAN, R. B. Granuloma formation around schistosome eggs as a manifestation of delayed hypersensitivity. *Am J Pathol*, 51, n. 5, p. 735-756, Nov 1967.

WATANABE, A. *et al.* Phospholamban ablation by RNA interference increases Ca²⁺ uptake into rat cardiac myocyte sarcoplasmic reticulum. *J Mol Cell Cardiol*, 37, n. 3, p. 691-698, Sep 2004.

WATERHOUSE, A. M. *et al.* Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25, n. 9, p. 1189-1191, May 2009.

WEERAKOON, K. G. *et al.* Advances in the Diagnosis of Human Schistosomiasis. *Clin Microbiol Rev*, 28, n. 4, p. 939-967, Oct 2015.

WELIN, M. *et al.* Structural and functional studies of the human phosphoribosyltransferase domain containing protein 1. *FEBS J*, 277, n. 23, p. 4920-4930, Dec 2010.

WHITESIDE, G. T.; POMONIS, J. D.; KENNEDY, J. D. Preclinical Pharmacological Approaches in Drug Discovery for Chronic Pain. *Adv Pharmacol*, 75, p. 303-323, 2016.

WHO. Weekly epidemiological record:Schistosomiasis and soiltransmitted helminthiasis: numbers of people treated in 2017. *Wkly. Epidemiol. Rec*, III, p. 445-452, 2018.

WILLSEY, H. R. *et al.* Localized JNK signaling regulates organ size during development. *Elife*, 5, 03 2016.

WU, C. *et al.* Snail modulates JNK-mediated cell death in *Drosophila*. *Cell Death Dis*, 10, n. 12, p. 893, 11 2019.

WU, P.; NIELSEN, T. E.; CLAUSEN, M. H. FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. *Trends Pharmacol Sci*, 36, n. 7, p. 422-439, Jul 2015.

YANG, C. *et al.* Differential expression of p38 MAPK α , β , γ , δ isoforms in nucleus pulposus modulates macrophage polarization in intervertebral disc degeneration. *Sci Rep*, 6, p. 22182, Feb 2016.

YUAN, L. *et al.* Steady-state kinetics of the schistosomal hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase. *Biochemistry*, 31, n. 3, p. 806-810, Jan 1992.

YUAN, L. *et al.* Comparing the human and schistosomal hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferases by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta*, 1162, n. 1-2, p. 10-16, Mar 1993.

ZAMPIERI, S. *et al.* The use of Tween 20 in immunoblotting assays for the detection of autoantibodies in connective tissue diseases. *J Immunol Methods*, 239, n. 1-2, p. 1-11, May 2000.

ZARUBIN, T.; HAN, J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res*, 15, n. 1, p. 11-18, Jan 2005.

ZEKE, A. *et al.* JNK Signaling: Regulation and Functions Based on Complex Protein-Protein Partnerships. *Microbiol Mol Biol Rev*, 80, n. 3, p. 793-835, 09 2016.

ZHIGANG LU , M. B. Meta-analysis of RNA-seq studies reveals genes responsible for life stage-dominant functions in *Schistosoma mansoni*. *bioRxiv* 2018.

9. APÊNDICES

Apêndice 1 – Artigo publicado

MOREIRA, B. P.; ARMSTRONG, T.; BATISTA, I. C. A.; CLEMENTE TAVARES, N. *et al.* Use of BODIPY-Labeled ATP Analogues in the Development and Validation of a Fluorescence Polarization-Based Assay for Screening of Kinase Inhibitors. **ACS Omega**, 5, n. 16, p. 9064-9070, Apr 2020.

Use of BODIPY-Labeled ATP Analogues in the Development and Validation of a Fluorescence Polarization-Based Assay for Screening of Kinase Inhibitors

Bernardo Pereira Moreira, Tom Armstrong, Izabella Cristina Andrade Batista, Naiara Clemente Tavares, Camilla Valente Pires, Marina de Moraes Mourão, Franco H. Falcone,* and Lodewijk V. Dekker



Cite This: <https://dx.doi.org/10.1021/acsomega.9b03344>



Read Online

ACCESS |



Metrics & More

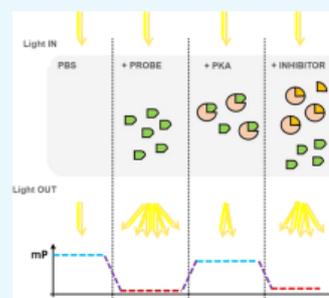


Article Recommendations



Supporting Information

ABSTRACT: The screening of compound libraries to identify small-molecule modulators of specific biological targets is crucial in the process for the discovery of novel therapeutics and molecular probes. Considering the need for simple single-tool assay technologies with which one could monitor “all” kinases, we developed a fluorescence polarization (FP)-based assay to monitor the binding capabilities of protein kinases to ATP. We used BODIPY ATP- γ -S as a probe to measure the shift in the polarization of a light beam when passed through the sample. We were able to optimize the assay using commercial Protein Kinase A (PKA) and H7 efficiently inhibited the binding of the probe when added to the reaction. Furthermore, we were able to employ the assay in a high-throughput fashion and validate the screening of a set of small molecules predicted to dock into the ATP-binding site of PKA. This will be useful to screen larger libraries of compounds that may target protein kinases by blocking ATP binding.



INTRODUCTION

A very first step on the path for the discovery of novel therapeutics is the screening of compound libraries in the search for new small-molecule modulators of biological targets. A wide range of robust assay technologies are currently available and, although no single technology is broad enough to address all of the needs in the drug discovery field, most of them are suitable for high-throughput screening (HTS). Nevertheless, the selection of an appropriate primary assay technology can greatly increase the chances of initial hit identification. One applicable technology, fluorescence polarization (FP) is a powerful approach by which alterations in the apparent molecular weight of a fluorescent probe in solution are indicated by changes in the polarization of the sample's emitted light.¹ Since FP was first applied to screening, newly advanced methods have substantially boosted this technology in the field. Advantages of FP assays include the use of an all-in-one (homogeneous) format fitted to study molecular processes in solution, comparatively low cost, availability of time-course analysis, and relatively insensitivity to some type of assay interferences such as inner filter effects.^{1–3}

One major application of FP assays relies on the interrogation of biologically relevant molecular interactions, either due to direct binding of a fluorescent probe (tracer) or through competition with an unlabeled species.² We recently described a fluorescent tool based on the nonspecific kinase inhibitor staurosporine. The tool was highly suitable for FP applications and allowed monitoring the ATP-binding site of a large

number of kinases and in this way enabled identification of inhibitory substances.⁴ Although the FP technique is easily adapted for HTS applications, a significant number of kinases could not be measured using this tool. With the emergence of the new therapeutic areas for kinase drug discovery and considering the still considerably large orphan kinase family in, for example, oncology applications, the need arises for simple universal assay technologies with which one could monitor most kinases. Such tools would also allow parallel development of single assay formats for multiple different kinases, which would allow easy side-by-side screening and analysis, as in selectivity screening experiments, for example.

With this in mind, we sought to develop a FP-based system suitable for HTS using solely ATP- γ -S, a nonhydrolyzable derivative of ATP-containing BODIPY FL as the fluorophore chemosensor.⁵ Being an ATP derivative, this probe is expected to bind to all kinases, including kinases for which no ready high-throughput assay system exists. Additionally, BODIPY has unique photophysical and photochemistry properties compared to fluorophores such as fluorescein.⁶ This probe was originally used in studies of synthesis and transport of

Received: October 9, 2019

Accepted: March 10, 2020



ACS Publications

© XXXX American Chemical Society

A

<https://dx.doi.org/10.1021/acsomega.9b03344>
ACS Omega XXXX, XXX, XXX–XXX

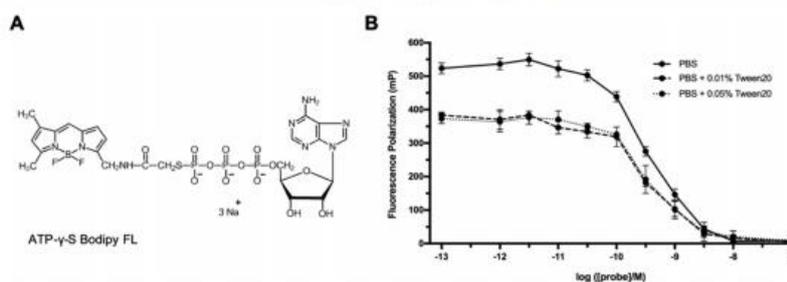


Figure 1. Use of the ATP derivative, ATP- γ -S BODIPY FL (SIGMA) in fluorescence polarization assay. (A) Structure of the probe. (B) Fluorescence polarization value in response to increasing amounts of the probe in three different conditions regarding the presence or absence of the detergent (Tween20, Merck) in the buffer. Each point represents the mean \pm SD ($n = 3$). Fluorescence polarization was measured as described in the Methods section.

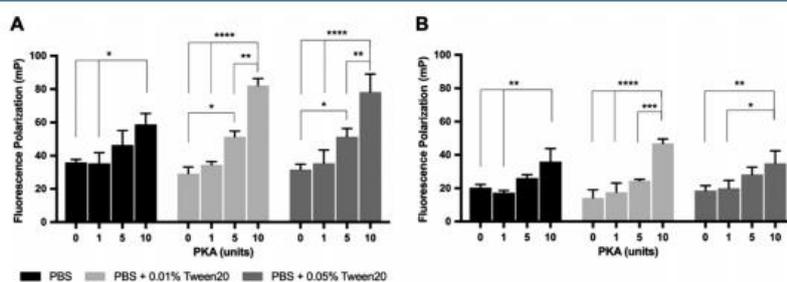


Figure 2. Binding of the probe to the enzyme PKA (Protein Kinase A, Merck) visualized by fluorescence polarization in three different conditions. Two concentrations of the probe (A) 5×10^{-9} M or (B) 1×10^{-8} M were used and increasing amounts of PKA were added to the reaction. Fluorescence polarization was measured as described in the Methods section. Each column represents the mean \pm SD ($n = 2$). Data was analyzed using two-way ANOVA ($p < 0.0001$) and Tukey's multiple comparisons test (p -value 0.0332 (*), 0.0021 (**), 0.0002 (***), < 0.0001 (****)).

sphingolipids,⁷ though it is currently being used in many fields, from clinical diagnostics and biotechnology to molecular biology and biochemistry. Yet, several applications include the use of BODIPY derivatives, such as sensitizers for living cells, cationic and anionic chemical sensors, medical applications, and electroluminescent agents.^{8–10}

To characterize the probe and obtain proof-of-principle for the assay, we employed purified cAMP-dependent protein kinase (PKA), which is well-known and widely available for commercial purposes. Thus, in addition to establishing inhibition by known PKA inhibitors, we also employed the assay in the HTS format to validate an *in silico* screening of a library of small molecules predicted to dock into the ATP-binding site of PKA.

RESULTS

Kinase Binding Assay. First, we performed an *in silico* docking prediction of the ATP and the BODIPY FL ATP- γ -S (adenosine 5'-O-(3-thiotriphosphate), BODIPY FL) probe into the nucleotide-binding pocket (G-loop) of the protein kinase A (PKA). *In silico* docking of ATP recreated the experimentally observed ATP-binding poses with a good deal of accuracy (root-mean-square deviation, RMSD = 1.07 Å) (Figures 1A and S1A,B).¹¹ Although the probe, in comparison to the natural kinase ligand ATP, contains a relatively large additional fluorophore, *in silico* docking analysis predicts that it protrudes out of the ATP binding into the solvent-accessible space and does not interact with any part of the protein, apart from a hydrogen bond between the amide NH₂ and TS1,

hence making this docking very similar to ATP itself and quite stable (Figure S1C).

To optimize the probe concentration to be used in the assay, FP was measured for several concentrations of the probe, ranging from 10^{-13} to 10^{-7} M in three different conditions (Figure 1B). Low amounts of Tween20 (0.01 or 0.05%) were used to reduce (or remove) nonspecific binding of the probe, hence providing a more realistic value of the free/bound probe in the sample. As shown in Figure 1B, around 10^{-10} M of the probe was capable of causing depolarization of the light, with this effect reaching saturation around 10^{-8} M. The presence of the detergent lowered the polarized fluorescence values by roughly 30% when compared to the probe alone (Figure 1B). For application in the assay, we have selected the optimal concentration of the probe that causes a full depolarization signal without saturation of it, thus the chosen optimal concentration corresponded to a range of 5×10^{-9} to 1×10^{-8} M (-8.5 to -8.0 on the x -axis, Figure 1B).

It is known that ATP is the natural ligand of protein kinases; hence if the analogous ATP probe can bind to a protein kinase, the light depolarization previously observed could be reversed. Purified PKA was used as a model kinase to bind to the probe, since it is a standard known kinase largely and commercially available. The probe concentrations corresponding to the optimal depolarization values (5×10^{-9} and 1×10^{-8} M) were chosen to evaluate the binding of PKA in a dose-dependent manner. PKA was able to bind to the probe and cause a significant increase in FP, specifically in the presence of 0.01% Tween20 detergent as from 5 units of the PKA enzyme (Figure

2). Higher amounts of the enzyme (10 units) caused an increase in polarization values either in the presence or absence of the detergent (Figure 2). The lower values observed when using 1×10^{-8} M of the probe indicate that at this concentration, there might have been some irreversible saturation of the signal caused by the free probe (Figure 2B).

These data indicate that we could use the kinetics between the PKA and the probe to identify compounds that can block that same interaction. To confirm this, we used H7 (Figure 3A), a known ATP-binding site blocker, to validate the present

Since the natural ligand ATP could not preferentially bind to PKA in the presence of the probe, we hypothesized that both molecules would have a high score of affinity to dock in the same site in PKA. Thus, ATP is not an efficient competitor against the probe to bind to PKA. Indeed, predicted docking scores were high for both the ATP and the probe (144.14 and 70.73, respectively) when analyzed by the ChemPLP Score function.

In Silico Docking Analysis of PKA and In Vitro Validation. First, a docking analysis was carried out to identify potential inhibitors of the human PKA. Initial docking was performed on a subset of 10 000 compounds from the University of Nottingham Managed Chemical Compound Collection (MCCC) using both the ChemScore Kinase and ChemPLP Score scoring functions from the Genetic Optimization for Ligand Docking (GOLD) platform.¹² It was noticed that the range of score values obtained for the same 10 000 compounds was significantly different between the two scoring functions (Figure S2A). In each case, the ChemScore Kinase scoring function provided significantly lower scores than the ChemPLP function. Additionally, both functions showed a broad divergence with regards to the highest-scoring compounds as there were only 28 (18.1%) matching compounds in the top 100 and 12 (15.2%) in the top 50 between the two scoring functions (Figure S2B and Tables S1 and S2). Next, we selected the 12 common compounds with the highest score in both scoring functions that matched on the top 50 set (Table 1 and Figure S2B), as well as 5 negatively scored predicted compounds to serve as negative controls (Table 1).

The selected compounds were tested for their inhibitory activity against the PKA–probe binding. As shown, 2 out of 12 compounds significantly blocked PKA–probe binding thus lending support to the in silico prediction (Figure 4A).

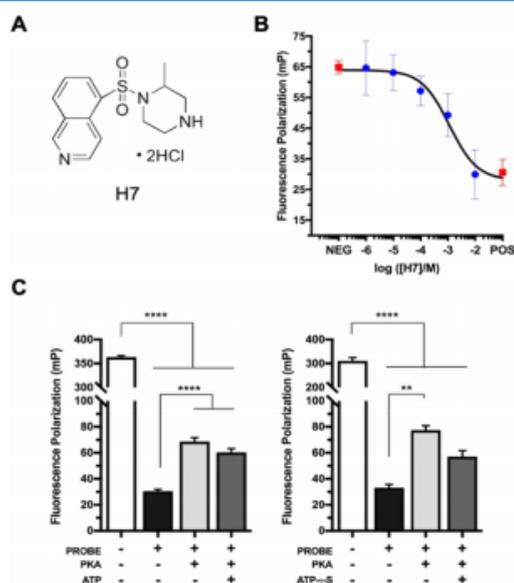


Figure 3. Competition for the nucleotide-binding site of PKA. (A) Structure of H7 inhibitor. (B) Blocking of the binding between the

probe and PKA by H7 inhibitor. The probe (5×10^{-9} M) was incubated with 5 units of PKA in the presence of increasing concentrations of H7, and specific binding was measured as described in the [Methods](#) section (mean \pm SD, $n = 3$). Data were fitted in GraphPad Prism log(inhibitor) vs response, variable slope (four parameters). (C) Effect of the natural ligand ATP (left) and the ATP- γ -S (right) on the probe–PKA interaction. Data is represented by mean \pm SEM from several experiments ($n = 8$) (left). Fluorescence polarization was measured as described in the [Methods](#) section and Tukey's multiple comparison test (p -value < 0.0001 (****)) was used for statistical analysis.

FP binding assay. As shown in [Figure 3B](#), H7 inhibited the binding of the probe to PKA in a dose-dependent manner with an IC_{50} value of approximately 1.13 mM. Additionally, a ligand competition experiment was performed by adding unlabeled ATP to assess if it could bind preferentially to the enzyme, displacing the probe and causing the polarization values to decrease. As shown in [Figure 3C](#) (left), although ATP appeared to slightly reverse the effect caused by the binding of the probe to PKA, this was not considered statistically significant. The same behavior was observed in the presence of increased PKA (10 units) and when the order of reagent addition was varied (results not shown). Then, we used the same ATP analogous that is present in the BODIPY probe, ATP- γ -S. As observed in [Figure 3C](#) (right), the ATP slightly reverses the polarization observed by the ligation probe–PKA.

Table 1. Comparison of the Scores for 17 Matching Compounds between ChemScore Kinase and ChemPLP Functions^a

ID	MCCC sample ID	ChemScore Kinase	ChemPLP Score
Positive			
B1	NCC-00066504	62.79	100.77
B2	NCC-00069179	60.16	108.41
B3	NCC-00068966	56.95	99.12
B4	NCC-00063353	55.62	101.23
B5	NCC-00027360	53.02	93.79
B6	NCC-00073056	52.97	92.98
B7	NCC-00071565	52.31	99.53
B8	NCC-00067960	52.13	93.54
B9	NCC-00062976	51.55	97.02
B10	NCC-00063592	51.45	95.70
B11	NCC-00070778	48.47	91.73
B12	NCC-00066895	48.07	95.12
Negative			
N1	NCC-00000100	-28.25	-17.98
N2	NCC-00000176	-5.98	-10.25
N3	NCC-00000179	-5.27	-48.39
N4	NCC-00000267	18.91	-82.98
N5	NCC-00006655	15.14	-29.74

^aTwelve positively scored compounds were detected in the top 50 list and five negatively scored compounds were selected as negative controls.

C

<https://dx.doi.org/10.1021/acsomega.9b03344>
ACS Omega XXXX, XXX, XXX–XXX

ACS Omega

<http://pubs.acs.org/journal/acsofd>

Article

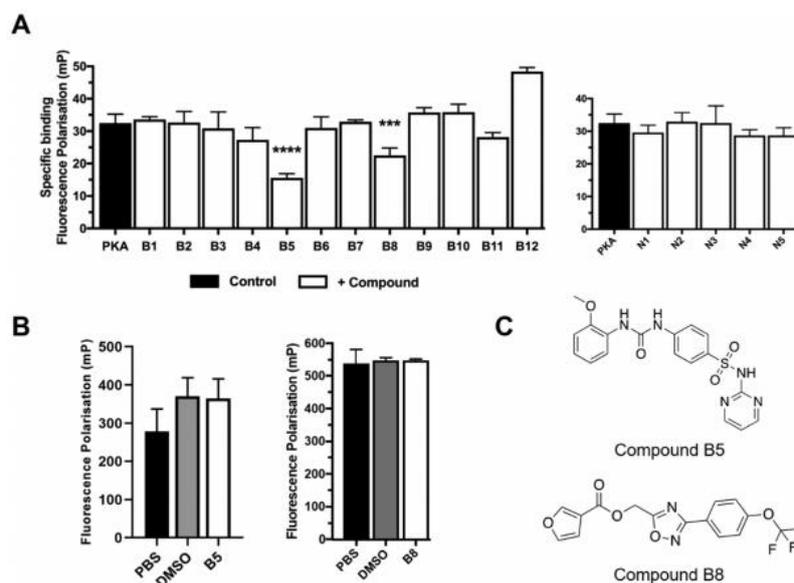


Figure 4. Screening to evaluate the inhibitory activity of several compounds against the binding of the probe to commercial PKA. (A) ATP- γ -S BODIPY probe (5×10^{-9} M) was incubated with 5 units of PKA in the presence of different compounds (10 μ M) predicted by both score functions (B1–B12, positive; N1–N5, negative). Values of FP (mP) represent specific binding and it was measured as described in the [Methods](#) section (mean \pm SD, $n = 3$). Data was analyzed using one-way ANOVA ($p < 0.0001$) and Tukey's multiple comparisons test (p -value 0.0332 (*), 0.0021 (**), 0.0002 (***), < 0.0001 (****)). (B) Fluorescence polarization values for the positive compounds B5 and B8 incubated in phosphate-buffered saline (PBS)/dimethyl sulfoxide (DMSO). Bars represent the average of three replicates. Compounds were tested in 10 μ M final concentration. (C) Structure of compounds B5 and B8.

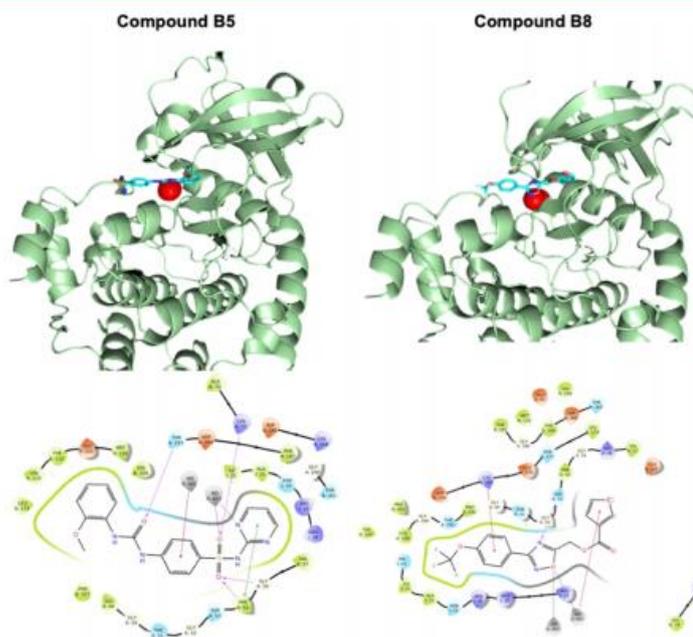


Figure 5. Predicted binding pose of compounds B5 (left) and B8 (right) in the crystal structure of PKA (PDB: 4WB5), showing the similar interactions as seen for the natural ligand ATP. Reference structure: carbon = cyan; oxygen = red; nitrogen = dark blue; fluoride = light blue; sulfur = orange; Mg^{2+} is represented by rounded red shapes. Bottom schematic maps represent the interactions of the compounds B5 (left) and B8 (right) inside the ATP-binding pocket. Amino acids are represented as a three-letter code with its corresponding position in the PKA amino acid sequence. MG = magnesium cation (Mg^{2+}).

D

<https://dx.doi.org/10.1021/acsomega.9b03344>
ACS Omega XXXX, XXX, XXX–XXX

Moreover, the detectable change in the mP value represented the competitive binding of the compound to PKA rather than interference from the compound itself with the probe signal (Figure 4B). The compounds' structure (Figure 4C) and their docking prediction (Figure 5) indicate that they have a strong specific binding to the ATP pocket of PKA. Compound B5 mimics similar interactions as the ATP probe, the urea group interacts with the Mg^{2+} ions, and the methoxy benzene ring occupies a similar space to the adenosine ring in ATP. Compound B8 also interacts with the Mg^{2+} ions through the five-membered ring and the trifluoromethoxy group occupies a hydrophobic region of the binding site (Figure 5).

Additionally, a total of 31 of the top-scoring compounds from each function were also tested in the same conditions previously used for the H7 inhibitor (Figure S3A,B). A total of 7 out of 62 selected compounds significantly inhibited the binding of the probe to PKA. From those, only one presented minor signal interference. The mP value for the compound itself was 21% lower when compared to that of PBS, indicating that this compound itself was able to depolarize the light (Figure S3C).

DISCUSSION

As characterized first for PKA, typical protein kinases are nucleotide-binding proteins.¹¹ Therefore, the kinase must bind an ATP molecule for the enzyme to undergo a conformational change and switch to an active state, required for substrate binding and catalytic core functioning.^{13,14} Thus, molecules that are able to block the docking of ATP into its pocket, either by direct competition or by allosteric regulation, are considered promising protein kinase inhibitors and drug

are generally used as blocking agents, which can help avoid nonspecific binding of the probe and decrease the background signal just as they do in immunoblotting assays.²⁶ This is in agreement with our data showing that the presence of the detergent promotes specific binding of the probe to PKA.

When the natural ligand was used in competition with the probe, we noticed a slight preference for the ATP rather than the probe. This preference was even higher when ATP- γ -S was used as the competitor. In addition, the same behavior was observed for higher concentrations of ATP, 10 and 50 mM (data not shown). Also, the fact that the known H7 inhibitor was able to efficiently block the binding of the probe indicates that the probe is specifically binding to PKA into the ATP-binding pocket. It is possible, however, that in addition to the ATP-binding site, the BODIPY probe also binds to alternative sites on the PKA molecule, resulting in incomplete displacement by ATP- γ -S, which would only displace the probe bound to the ATP-binding site.

Additionally, in the present study, we performed an *in silico* analysis to obtain docking scores for a library of compounds that potentially block the ATP-binding site of protein kinases. Docking was performed using the GOLD software package, which includes a built-in kinase scoring function, ChemScore Kinase, that was initially used to score the compounds being investigated. Moreover, a recent article inspecting numerous docking platforms suggested that the ChemPLP scoring is more accurate at reproducing experimental structures than the dedicated ChemScore Kinase function.²⁷ In an attempt to have a robust analysis, we used both scoring functions, ChemScore Kinase and ChemPLP Score. We observed a significant difference in the scores generated by each of the two

candidates.^{15–18} Indeed, the ATP-binding pocket is considered the main focus for inhibitor design,¹⁹ and although it is generally well conserved between kinases, small differences exist in the lining of the binding area that can be exploited to introduce kinase selectivity, as demonstrated by the high level of selectivity now achieved for kinase inhibitors.^{20,21}

Here, we describe the development of an ATP-kinase binding evaluation assay using an analogous ATP-containing fluorophore chemosensor, named BODIPY FL ATP- γ -S (adenosine 5'-O-(3-thiotriphosphate), BODIPY FL, sodium salt). This probe is an ATP molecule conjugated with the fluorescent dye known as BODIPY FL (4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacine-3-yl).⁵ For instance, ATP derivatives of this probe have been used as an indicator to measure ATP influx through the outer membrane of the mitochondria²² as well as a label for histidine kinases in bacterial two-component systems.²³ Here, we used the probe to measure the shift in the fluorescence polarization caused by the addition of inhibitors that block the ATP binding to protein kinases, specifically to PKA.

Our docking analysis shows that the probe sits at the ATP-binding site of PKA in a similar manner as described for the natural ligand ATP.^{21,24} However, the fluorophore protrudes out of the pocket and does not impair the binding of the probe to the enzyme, thus making the use of the probe compatible for this kind of assay. Additionally, we were able to determine the right amount of probe (5×10^{-9} M) to use in order to provide a steady reading value for depolarized light without saturating the signal, similar to what is observed for the theoretical value for free fluorescein (27 mP).²⁵

All experiments in this study were carried out in the presence of 0.01% Tween20 in the buffer. Nonionic detergents

algorithms. This suggests that ChemScore Kinase produces empirically lower scores but produces similar trends as to ChemPLP Score. In each case, there were some compounds that scored uniquely high with one of the scoring functions, and biological assessment of these compounds by our assay suggested that the ChemPLP Score scoring function is superior in terms of its ability to identify potential inhibitors.

CONCLUSIONS

The universal FP-based assay developed in the present study is quick and cost effective and may be used as an HTS method to cover libraries for potential new drugs against key kinase targets of many organisms. Furthermore, this assay is not substrate-based, and it is useful mainly for screening compounds that target kinases or any other ATP-binding enzymes. It is therefore developed to be used as a tool to evaluate if a given compound can inhibit the binding of ATP to the enzyme by measuring the fluorescence polarization shift caused by the probe released from the enzyme in the presence of an inhibitor.

METHODS

Fluorescence Polarization Assays. Assays were performed in 384-well black flat-bottom plates in 50 μ L final volume of 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4 containing 2 mM magnesium chloride at room temperature. Increased concentrations of BODIPY FL ATP- γ -S (SIGMA) were used to define the ideal concentration for light depolarization in serial dilutions, and it was established the use of 5×10^{-9} M of the probe, unless stated otherwise. Commercial Protein Kinase A catalytic subunit (PKA from

E

<https://dx.doi.org/10.1021/acsomega.9b03344>
ACS Omega XXXX, XXX, XXX–XXX

bovine heart, Merck) was used as the enzyme source, after standardization using 1, 5, and 10 enzyme units, experiments were carried out using 5 units (approximately 500 μg) of enzyme per reaction, unless stated otherwise. A concentration of 0.01% nonionic detergent (Tween20, Merck) was added to the mixture unless stated otherwise. Natural ATP ligand as well as ATP- γ -S were used at 1 mM concentration, unless stated otherwise. Reading of the plates was performed using a PerkinElmer Envision 2104 Multilabel plate-reading spectrophotometer using 480 nm excitation and 535 nm emission filters, suitable for measurement of fluorescein. Fluorescence polarization was determined by measuring the parallel and perpendicular fluorescence emission intensity with respect to the polarized excitation light and is expressed in millipolarization (mP) units. Specific PKA inhibitor H7 was purchased from Merck.

In Silico Docking Analyses for PKA. The in silico docking analyses for PKA were performed using the Genetic Optimization for Ligand Docking (GOLD) platform from The Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) and a selection of 10 000 compounds available within the University of Nottingham Managed Chemical Compound Library (MCCC). The structure 4WB5, PKA in complex with ATP was retrieved from the Protein Data Bank database (PDB, <https://www.rcsb.org/>) and prepared using the Protein Preparation Wizard Tool in Maestro (Schrödinger Release 2018-4: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2018). The structure was subject to H-bond optimization and energetic minimization using the OPLS3 force field. The resulting structure was then saved as a PDB file for future use. An SDF file containing all of the ligand available in the MCCC was obtained, and these structures were prepared using the LigPrep tool within Maestro. The various protonation states for each molecule were calculated between pH 7.0 \pm 2.0, and the resulting structures were saved as an SDF file for future use. Docking was performed using GOLD (5.6) using the standard search efficiency settings. The active site was defined by the native ATP ligand in the 4WB5 crystal structure. The solution structures were saved in the SDF file format.

Compounds. Compounds were obtained from a library of small molecules from the MCCC Library provided at the Centre of Biomolecular Sciences (University of Nottingham). All compounds were dissolved in DMSO and were used at a final concentration of 10 μM . The requested compound codes are: NCC-00066504, NCC-00069179, NCC-00068966, NCC-00063353, NCC-00027360, NCC-00073056, NCC-00071565, NCC-00067960, NCC-00062976, NCC-00063592, NCC-00070778, NCC-00066895, NCC-00000100, NCC-00000176, NCC-00000179, NCC-00000267, NCC-00006655, NCC-00067772, NCC-00068009, NCC-00067155, NCC-00075821, NCC-00073101, NCC-00004123, NCC-00073207, NCC-00004578, NCC-00069395, NCC-00071160, NCC-00070853, NCC-00071708, NCC-00016314, NCC-00040680, NCC-00066365, NCC-00009799, NCC-00074851, NCC-00020178, NCC-00000041, NCC-00000037, NCC-00066879, NCC-00067308, NCC-00033008, NCC-00071549, NCC-00072265, NCC-00067150, NCC-00063994, NCC-00070051, NCC-00063034, NCC-00072272, NCC-00070760, NCC-00069625, NCC-00076211, NCC-00029407, NCC-00069711, NCC-00013234, NCC-00014721, NCC-00034842, NCC-00018391, NCC-00069640, NCC-00041365, NCC-

00067733, NCC-00066507, NCC-00072319, NCC-00065651, NCC-00066826, NCC-00072585, NCC-00069782, NCC-00066588, NCC-00066671, NCC-00042920, NCC-00072060, NCC-00074246, NCC-00066984, NCC-00073991, NCC-00069672, NCC-00072007, NCC-00067319, NCC-00012226, NCC-00069605, NCC-00070551, and NCC-00066958.

Statistical Analysis. All data were analyzed using GraphPad Prism version 7.00 for Mac (GraphPad Software, La Jolla, California, www.graphpad.com), and statistical analyses are stated where appropriate.

■ ASSOCIATED CONTENT

SI Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.9b03344>.

Predicted binding pose of the ATP and the probe into PKA; docking scores and data analysis for the compounds' in silico screening; binding activity of additional compounds; and tables with the top 50 compounds with better docking scores for each scoring function (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Franco H. Falcone – Biomedizinisches Forschungszentrum Seltersberg, Institut für Parasitologie, Justus-Liebig-Universität Gießen, 35392 Gießen, Germany; School of Pharmacy, Division of Molecular Therapeutics and Formulation, University of Nottingham, Nottingham NG7 2RD, United Kingdom; orcid.org/0000-0002-1732-9932; Email: franco.falcone@vetmed.uni-giessen.de

Authors

Bernardo Pereira Moreira – Biomedizinisches Forschungszentrum Seltersberg, Institut für Parasitologie, Justus-Liebig-Universität Gießen, 35392 Gießen, Germany; Instituto de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz—FIOCRUZ, Belo Horizonte 30190-002, Minas Gerais, Brazil; School of Pharmacy, Division of Molecular Therapeutics and Formulation, University of Nottingham, Nottingham NG7 2RD, United Kingdom; orcid.org/0000-0001-5266-5336

Tom Armstrong – School of Chemistry, University of Nottingham, Nottingham NG7 2RD, United Kingdom

Izabella Cristina Andrade Batista – Instituto de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz—FIOCRUZ, Belo Horizonte 30190-002, Minas Gerais, Brazil; School of Pharmacy, Division of Molecular Therapeutics and Formulation, University of Nottingham, Nottingham NG7 2RD, United Kingdom

Naiara Clemente Tavares – Instituto de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz—FIOCRUZ, Belo Horizonte 30190-002, Minas Gerais, Brazil; School of Pharmacy, Division of Molecular Therapeutics and Formulation, University of Nottingham, Nottingham NG7 2RD, United Kingdom

Camilla Valente Pires – Instituto de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz—FIOCRUZ, Belo Horizonte 30190-002, Minas Gerais, Brazil; School of Pharmacy, Division of Molecular Therapeutics and Formulation, University of Nottingham, Nottingham NG7 2RD, United Kingdom

F

<https://dx.doi.org/10.1021/acsomega.9b03344>
ACS Omega XXXX, XXX, XXX–XXX

Marina de Moraes Mourão – Instituto de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz—FIOCRUZ, Belo Horizonte 30190-002, Minas Gerais, Brazil

Lodewijk V. Dekker – School of Pharmacy, Division of Biomolecular Science and Medicinal Chemistry, University of Nottingham, Nottingham NG7 2RD, United Kingdom

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/10.1021/acsomega.9b03344>

Funding

This study was funded by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brazil (CAPES), Finance Code 001, Drug Discovery Programme, 003/2014, awarded to M.M.M., F.H.F., and L.V.D. This work was partially funded by the LOEWE Centre DRUID within the Hessian Excellence Initiative.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Maria Augusta Arruda (University of Nottingham) for the time and assistance during the course of this study.

REFERENCES

- (1) Jameson, D. M.; Ross, J. A. Fluorescence Polarization/Anisotropy in Diagnostics and Imaging. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2685–2708.
- (2) Hall, M. D.; Yasgar, A.; Peryea, T.; Braisted, J. C.; Jadhav, A.; Simeonov, A.; Coussens, N. P. Fluorescence Polarization Assays in High-Throughput Screening and Drug Discovery: A Review. *Methods Appl. Fluoresc.* **2016**, *4*, No. 022001.
- (3) Zhang, H.; Wu, Q.; Berezin, M. Y. Fluorescence Anisotropy (Polarization): From Drug Screening to Precision Medicine. *Expert Opin. Drug Discovery* **2015**, *10*, 1145–1161.
- (4) Disney, A. J. M.; Kellam, B.; Dekker, L. V. Alkylation of Staurosporine to Derive a Kinase Probe for Fluorescence Applications. *ChemMedChem* **2016**, *11*, 972–979.
- (5) Draganescu, A.; Hodawadekar, S. C.; Gee, K. R.; Brenner, C. Fhit-Nucleotide Specificity Probed with Novel Fluorescent and Fluorogenic Substrates. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 4555–4560.
- (6) Wiederschain, G. Y. The Molecular Probes Handbook. A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies. *Biochemistry* **2011**, *76*, No. 1276.
- (7) Pagano, R. E.; Martin, O. C.; Kang, H. C.; Haugland, R. P. A Novel Fluorescent Ceramide Analogue for Studying Membrane Traffic in Animal Cells: Accumulation at the Golgi Apparatus Results in Altered Spectral Properties of the Sphingolipid Precursor. *J. Cell Biol.* **1991**, *113*, 1267–1269.
- (8) Zhu, S.; Zhang, J.; Janjanam, J.; Vegesna, G.; Luo, F. T.; Tiwari, A.; Liu, H. Highly Water-Soluble BODIPY-Based Fluorescent Probes for Sensitive Fluorescent Sensing of Zinc(II). *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 1722–1728.
- (9) Xu, Z.; Yi, X.; Wu, Q.; Zhu, Y.; Ou, M.; Xu, X. First Report on a BODIPY-Based Fluorescent Probe for Sensitive Detection of Oxytetracycline: Application for the Rapid Determination of Oxytetracycline in Milk, Honey and Pork. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 89288–89297.
- (10) Jones, L. H.; Beal, D.; Selby, M. D.; Everson, O.; Burslem, G. M.; Dodd, P.; Millbank, J.; Tran, T. D.; Wakenhut, F.; Graham, E. J. S.; et al. In-Cell Click Labelling of Small Molecules to Determine Subcellular Localisation. *J. Chem. Biol.* **2011**, *4*, 49–53.
- (11) Knighton, D. R.; Zheng, J. H.; Ten Eyck, L. F.; Ashford, V. A.; Xuong, N. H.; Taylor, S. S.; Sowadski, J. M. Crystal Structure of the Catalytic Subunit of Cyclic Adenosine Monophosphate-Dependent Protein Kinase. *Science* **1991**, *253*, 407–414.
- (12) Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R. Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking. *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 727–748.
- (13) Taylor, S. S.; Keshwani, M. M.; Steichen, J. M.; Kornev, A. P. Evolution of the Eukaryotic Protein Kinases as Dynamic Molecular Switches. *Philos. Trans. R. Soc., B* **2012**, *367*, 2517–2528.
- (14) Huse, M.; Kuriyan, J. The Conformational Plasticity of Protein Kinases. *Cell* **2002**, *109*, 275–282.
- (15) Capdeville, R.; Buchdunger, E.; Zimmermann, J.; Matter, A. Glivec (STI571, Imatinib), a Rationally Developed, Targeted Anticancer Drug. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, *1*, 493–502.
- (16) Schulze, J. O.; Saladino, G.; Busschots, K.; Neimanis, S.; Süß, F.; Oldziej, D.; Zewzem, S.; Hindle, V.; Herbrand, A. K.; Lisa, M. N.; et al. Bidirectional Allosteric Communication between the ATP-Binding Site and the Regulatory PIF Pocket in PDK1 Protein Kinase. *Cell Chem. Biol.* **2016**, *23*, 1193–1205.
- (17) Chen, H.; Tucker, J.; Wang, X.; Gavine, P. R.; Phillips, C.; Augustin, M. A.; Schreiner, P.; Steinbacher, S.; Preston, M.; Ogg, D. Discovery of a Novel Allosteric Inhibitor-Binding Site in ERK5: Comparison with the Canonical Kinase Hinge ATP-Binding Site. *Acta Crystallogr., Sect. D: Struct. Biol.* **2016**, *72*, 682–693.
- (18) Wu, P.; Nielsen, T. E.; Clausen, M. H. Small-Molecule Kinase Inhibitors: An Analysis of FDA-Approved Drugs. *Drug Discovery Today* **2016**, *21*, 5–10.
- (19) Noble, M. E. M.; Endicott, J. A.; Johnson, L. N. Protein Kinase Inhibitors: Insights into Drug Design from Structure. *Science* **2004**, *303*, 1800–1805.
- (20) Wu, P.; Nielsen, T. E.; Clausen, M. H. FDA-Approved Small-Molecule Kinase Inhibitors. *Trends Pharmacol. Sci.* **2015**, *36*, 422–439.
- (21) Vulpetti, A.; Bosotti, R. Sequence and Structural Analysis of Kinase ATP Pocket Residues. *Il Farmaco* **2004**, *59*, 759–765.
- (22) Perevoshchikova, I. V.; Zorov, S. D.; Kotova, E. A.; Zorov, D. B.; Antonenko, Y. N. Hexokinase Inhibits Flux of Fluorescently Labeled ATP through Mitochondrial Outer Membrane Porin. *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 2397–2402.
- (23) Wilke, K. E.; Francis, S.; Carlson, E. E. Activity-Based Probe for Histidine Kinase Signaling. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 9150–9153.
- (24) Zheng, J.; Knighton, D. R.; Ten Eyck, L. F.; Xuong, N.; Taylor, S. S.; Karlsson, R.; Sowadski, J. M. Crystal Structure of the Catalytic Subunit of CAMP-Dependent Protein Kinase Complexed with MgATP and Peptide Inhibitor. *Biochemistry* **1993**, *32*, 2154–2161.
- (25) Buchli, R.; VanGundy, R. S.; Hickman-Miller, H. D.; Giberson, C. F.; Bardet, W.; Hildebrand, W. H. Development and Validation of a Fluorescence Polarization-Based Competitive Peptide-Binding Assay for HLA-A*0201 - A New Tool for Epitope Discovery. *Biochemistry* **2005**, *44*, 12491–12507.
- (26) Zampieri, S.; Ghirardello, A.; Doria, A.; Tonello, M.; Bendo, R.; Rossini, K.; Gambari, P. F. The Use of Tween 20 in Immunoblotting Assays for the Detection of Autoantibodies in Connective Tissue Diseases. *J. Immunol. Methods* **2000**, *239*, 1–11.
- (27) Tuccinardi, T.; Botta, M.; Giordano, A.; Martinelli, A. Protein Kinases: Docking and Homology Modeling Reliability. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50*, 1432–1441.

Apêndice 2 – Artigo em fase de finalização para publicação

SmPAI-RBP1 and SmHGPRases functional roles in *Schistosoma mansoni*

SmPAI-RBP1 and SmHGPRases functional roles in *Schistosoma mansoni*

Izabella Cristina Andrade Batista^{1,2}, Sandra Grossi Gava¹, Naiara Clemente Tavares¹, Carlos Eduardo Calzavara Silva², Marina de Moraes Mourão¹

¹Helmintologia e Malacologia Médica, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Brazil

²Imunologia Celular e Molecular Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Brazil

Abstract

Extracellular/environmental stimuli trigger appropriate cellular responses to allow the development and survival of *Schistosoma* spp. In this context, signal transduction involving eukaryotic protein kinases (ePKs) has an essential role in regulatory mechanisms. Studies using RNA interference had shown the importance of Smp38 and SmJNK MAPKs pathways for parasite development, in addition, RNASeq data demonstrated that they regulate the expression of a large set of genes, among them two important genes for the parasite life cycle: plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein (SmPAI-RBP1), responsible to regulate the PAI-1 mRNA stability, and hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferases (SmHGPRases), a key enzyme family in the purine-salvage pathway consisting of five different genes. This data was experimentally verified here through the use of SmJNK and Smp38 predicted specific inhibitors. *In silico* analysis shows significant differences in the predicted structure and the domain sequence between schistosomal PAI-RBP1 and HGPRases and their human orthologs. In order to interrogate SmPAI-RBP1 and SmHGPRases 1, 2, 3, 4 and 5 functional roles, schistosomula, sporocyst, and adult worms were knocked-down using specific dsRNAs. Our results suggest that SmHGPRases activity has an essential role in sporocyst and schistosomula development since significant differences in viability, size, and/or shape were observed after the knockdown *in vitro*. Also, the knockdown in schistosomula influences the development of ovary and egg maturation in female adult worms during mammalian infection. We also observed alterations in the movement of female adult worms knocked-down *in vitro*. Most of these results were shown when all genes were knocked-down simultaneously, implying that one of them may perform the function of the others. Moreover, SmPAI-RBP1 may be involved in sporocyst and schistosomula development, since phenotypic alterations were observed during the knockdown *in vitro*. SmPAI-RBP1 may also be related with damage in the adult male tegument in which the tubercles were reduced. Concluding, this study helped to elucidate the functional roles of those genes in the *Schistosoma mansoni* life cycle and provided knowledge for future studies required for the development of new drugs for the treatment and control of schistosomiasis.

Key words: *Schistosoma mansoni*; SmHGPRase; SmPAI-RBP1; RNAi; functional roles.

Introduction

Schistosomiasis is a neglected tropical disease caused by trematode worms from the genus *Schistosoma* and is considered a major health and economic problem in developing countries. The transmission is related to precarious conditions of water treatment and sanitation combined with the presence of the vector snails (ORGANISATION, 2018). *Schistosoma mansoni* is one of the main causative agents of schistosomiasis and they can survive in the mammalian host for years or decades (PEARCE; SHER, 1987). According to the World Health Organization, 78 countries reported transmission of this disease, and at least 229 million people required preventive chemotherapy with praziquantel (PZQ) in 2017 (ORGANISATION, 2018)

Currently, PZQ is the only treatment available for schistosomiasis. However, although this drug is effective against all species of *Schistosoma*, there are limitations to its use, including the development of resistance (BOTROS; BENNETT, 2007; DOENHOFF; CIOLI; UTZINGER, 2008; GREENBERG, 2013). Thereat, the search for new drug targets to support schistosomiasis treatment is extremely important.

The study of molecular host-parasite interactions is essential to understand parasitic infection, local adaptation within the host, and pathogenesis (CUESTA-ASTROZ; SANTOS; OLIVEIRA; JENSEN, 2019). Extracellular stimuli trigger appropriate cellular responses to allow the development and survival of *Schistosoma* spp. Protein kinases (PKs) play a major role in mediating these signals, performing essential functions in the cell control, which involves integrated networks that interact mostly by switching the proteins activity status (ANDRADE; NAHUM; AVELAR; SILVA *et al.*, 2011; HANKS; QUINN; HUNTER, 1988). Nowadays, many studies have shown that PKs are proven targets for drug development with an increasing number of eukaryotic Protein Kinase (ePK) inhibitors approved as drugs (BOYLE; KOLESKE, 2007; EGLIN; REISINE, 2009).

Recently, studies showed the importance of c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 MAPK signaling pathways for *S. mansoni* development, reproduction, and survival (AVELAR; GAVA; NEVES; SILVA *et al.*, 2019; GAVA; TAVARES; FALCONE; OLIVEIRA *et al.*, 2019). The knockdown of those genes has shown that both pathways regulate the expression of a large set of genes, including the plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein (SmPAI-RBP1) and hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferases (SmHGPRtases), important proteins in parasite biology (GAVA; TAVARES; FALCONE; OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Previous studies performed in rat fibroblasts showed that the up-regulation of Smp38 and SmJNK signaling pathways promotes increased expression of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) (NUTTER; HAYLOR; KHWAJA, 2015). Corroborating with that, transcriptomic data demonstrated that the knocked-down of these genes generate a down-regulated response of PAI-RBP1, meaning that these pathways are directly linked to PAI-1 expression. The Smp38 MAPK pathway also regulates the expression of the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase enzyme (SmHGPRtase) in *S. mansoni* (GAVA; TAVARES; FALCONE; OLIVEIRA *et al.*, 2019).

PAI-1 is a serine protease inhibitor (serpin) that acts as the principal inhibitor of the plasminogen activators (tPA and uPA) and hence fibrinolysis (MIYASHITA; WENZEL;

HEIDEN, 1988). Studies suggest that PAI-RBP1 is responsible for regulating the stability of PAI-1 mRNA by binding to its cyclic nucleotide sequence (HEATON; DLAKIC; DLAKIC; GELEHRTER, 2001).

The active form of plasminogen, named plasmin, exhibits a broad-spectrum of proteolytic activity and degrades fibrin and components of the extracellular matrix and connective tissue. Therefore, the recruitment of this enzyme by any pathogen present in the blood could be an effective mechanism to prevent possible immobilization by the fibrin clot network and also help the pathogen in its dissemination and stabilization in the host through the degradation of the different components of the extracellular matrix (SUN, 2006). Other functions related to the survival mechanisms of these pathogens such as the degradation of immunoglobulins and complement components, the activation of metalloproteinases, as well as the degradation of proteins for nutrition, have also been suggested as the result of the interaction between pathogens and their hosts' fibrinolytic system. In addition, this interaction can be directly linked to the parasite's ability to move freely through the host's circulatory system and feed without difficulty, as is the case of *Schistosoma* spp. (FIGUEIREDO; DA'DARA; OLIVEIRA; SKELLY, 2015). Thus, a promising target for the development of drugs against *S. mansoni* would be the components of the parasite's fibrinolytic pathway, since any change could be crucial for the worm survival in the host.

Studies demonstrated that *S. mansoni* adult worms were unable to incorporate ¹⁴C-glycine into a purine ring, evidencing the dependence of an external supply of preformed bases for nucleotide synthesis and the absence of the purine *de novo* biosynthesis pathway. Due to the fact that *S. mansoni* depends entirely on the salivation pathway to generate purines, enzymes involved in this pathway become promising targets for the development of new drugs (SENFT; CRABTREE, 1977). SmHGPRTases represent a family of enzymes critical to the parasite's life cycle. Its role is to convert purine bases, hypoxanthine and guanine, to their respective nucleotides, IMP and GMP, in the presence of 5-phosphorylribose 1-pyrophosphate (PRPP) (SENFT; CRABTREE, 1977).

In the present report, we propose to interrogate the functional roles of genes regulated by MAP kinase pathways, SmPAI-RBP1 and SmHGPRTases in different stages of the parasite's life cycle and whether those would be parasite-specific druggable targets.

Methodology

Target genes

In this study we have focused on the characterization of one gene and a family of other gene regulated by Smp38 (Smp_133020) and/or SmJNK (Smp_172240): Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein (SmPAI-RBP1, Smp_009310) and hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferases family (SmHGPRTases). *S. mansoni* presents five different genes encoding SmHGPRTases: Smp_103560 (composed of two isoforms Smp_103560.1 and Smp_103560.2), Smp_148820, Smp_168500, Smp_312580 and Smp_332640; henceforth referred as SmHGPRTase 1, 2, 3, 4 and 5. As the SmHGPRTase 2 sequence is very similar to SmHGPRTase 4 and 5, we used only one double-stranded RNA

(dsRNA) for the three genes, thus the results relating to these genes are represented as *SmHGPRtase 2/4/5*.

Parasites

To obtain *S. mansoni* adult worms and sporocyst, six-week-old female Golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) were infected subcutaneously with 400 cercariae each. Forty-two days after infection, animals were euthanized by anesthetic overdose followed by perfusion (PELLEGRINO; SIQUEIRA, 1956) to recover adult worms and their livers were used to recover parasite eggs (MOURÃO; DE MORAES MOURÃO; DINGUIRARD; FRANCO *et al.*, 2009). The LE cercariae strain of *S. mansoni* was acquired from the Mollusk rearing facility ‘Lobato Paraense’ of René Rachou Institute – FIOCRUZ using *Biomphalaria glabrata* as the intermediate snail host. Schistosomula were obtained by mechanical transformation of these cercariae (MILLIGAN; JOLLY, 2011). All the experiments using animals were reviewed and approved by the Ethics Commission on Animal Use from Fundação Oswaldo Cruz (license numbers LM-05/18 and LW-12/16).

Schistosomula exposure to SmJNK and Smp38 inhibitors

According to Gava *et al.* 2019 (GAVA; TAVARES; FALCONE; OLIVEIRA *et al.*, 2019), the expression of *SmHGPRtase 1* is down-regulated in Smp38 knocked-down schistosomula, while *SmPAI-RBPI* is down-regulated in Smp38 and SmJNK knocked-down schistosomula (GAVA; TAVARES; FALCONE; OLIVEIRA *et al.*, 2019). Based on that, to experimentally confirm it, SmJNK and Smp38 protein structures were modeled and their ATP binding sites were predicted for *S. mansoni* and their corresponding human orthologs. Then, they were subjected to an *in silico* screening through molecular docking with approximately 85,000 compounds from the Managed Chemical Compound Collection (MCCC) at the University of Nottingham. Using the GOLD platform, compounds that present the greater affinity for the ATP binding site of SmJNK or Smp38 were selected based on their scores. The compounds with the highest score predicted to bind to parasite proteins and that present lowest score for binding to the respective human ortholog were selected (Tavares, N.C. (2020). *Avaliação funcional das proteínas quinase FES e RAF de Schistosoma mansoni na interação parasito-hospedeiro* (Unpublished doctoral thesis). Centro de Pesquisas René Rachou – MG/Brazil). At the end, one compound that is predict as SmJNK inhibitor (NCC – 00029042) and other that is predict as Smp38 inhibitor (NCC – 00001994) were selected and used in a final concentration of 10 μ M each in cultures containing 5,000 schistosomula in 1 mL of Glasgow Minimum Essential Medium (GMEM) (Sigma-Aldrich) supplemented with 20 mM HEPES (Sigma-Aldrich), 0.1 % lactalbumin hydrolysate (Vetec), 0.1 % D-glucose (Sigma-Aldrich), 0.5 μ M hypoxanthine (Sigma-Aldrich), 1 μ M hydrocortisone (Sigma-Aldrich), 0.5 % MEM vitamin solution (Gibco), 5 % Schneider (Gibco), 1 % penicillin and streptomycin (Gibco), and 2 % heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Gibco). A control containing parasites cultured with 0.2 % of Dimethyl sulfoxide (DMSO) was included. Parasites were incubated for 30 hours at 37 °C, 5% CO₂ and 95% humidity, prior to phenotypic assessment by inverted microscope (ABO 100 - ZEISS) to verify morphological alterations and viability. Viability assessment was performed by the addition of 5 μ g/mL of

propidium iodide and observation under a fluorescent inverted microscope (ABO 100 - ZEISS) using 544 nm wavelength.

***In silico* analysis**

The sequences of *S. mansoni* proteins used in this study were obtained from on their predicted sequences in the *S. mansoni* genome in version 7 deposited in the WormBase database (https://parasite.wormbase.org/Schistosoma_mansoni_prjea36577/Info/Index/) and the sequences for human proteins were obtained from Uniprot (<https://www.uniprot.org>). Protein domains were acquired in the Pfam (<https://pfam.xfam.org/>) and comparisons between *S. mansoni* and human protein domains were performed using the MAFFT program (<https://mafft.cbrc.jp/>). The identity percentage between domains was calculated through pairwise comparisons using Jalview software (<http://www.jalview.org>) (WATERHOUSE; PROCTER; MARTIN; CLAMP *et al.*, 2009).

SmHGPRases and SmPAI-RBP1 tridimensional modeling were carried out to compare the structures of *S. mansoni* and the human corresponding proteins. For this, the proteins were first modeled using the Phyre 2 online program (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>) (KELLEY; MEZULIS; YATES; WASS *et al.*, 2015). After modeling, the predicted structures were aligned to overlap and for subsequent comparison using the Chimera 1.13.1 program (PETTERSEN; GODDARD; HUANG; COUCH *et al.*, 2004).

dsRNA synthesis

To validate the SmPAI-RBP1 and SmHGPRases proteins as molecular targets, specific primers containing the T7 promoter sequence were designed based on their predicted sequences in the *S. mansoni* genome in version 7 deposited in the WormBase database (https://parasite.wormbase.org/Schistosoma_mansoni_prjea36577/Info/Index/) and used in a PCR to amplify fragments ranging from 250 to 578 bp using sequences of each gene previously cloned into pGEM-T Easy vector (Promega) (Table 1). The unspecific control, green fluorescent protein (GFP), also was synthesized from a fragment from pCRII plasmid (AddGene). PCR products were separated on 1% agarose gel, purified using QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), sequenced by Sanger sequencing, and then used for dsRNA synthesis. DsRNAs were synthesized using the T7 RiboMAX Express RNAi System kit (Promega) according to the supplier's protocol. DsRNAs integrity was verified in 1% agarose gel electrophoresis.

Table 1. Specific primers designed for dsRNA synthesis and RT-qPCR amplification. The amplicon sizes are represented. In lower cases are the T7 promoter sequences and in upper cases, the sequences specific for each gene.

Target	Gene ID	Forward	Reverse	Amplicon size
dsRNA primers				
SmHGPRTase	Sm_103560	taatacgactcactatagggAATGTCCGT TGAGTTTGTTCG	taatacgactcactatagggTTCATTAAT CAGCAAATATGG	349 bp
	Sm_148820/ Smp_312580/ Smp_332640	taatacgactcactatagggGAGGCTTCA AATTCGCTTCC	taatacgactcactatagggAACTTGTG CCAGTGCAACC	250 bp
	Sm_168500	taatacgactcactatagggGCCTTCATA CAGGAAGAATTTG	taatacgactcactatagggATTGAGGTT CATGCCCTACG	358 bp
SmPAI-RBP1	Sm_009310	taatacgactcactatagggCGTCAGGGT CCAAGACAATATG	taatacgactcactatagggCCTCTTCC GTCACCTCCTTATCT	578 bp
qPCR primers				
SmHGPRTase	Sm_103560	TGTGTCCTCAAAGGTGGATTTA	CGGACATTGGTAGGACGATAC	94 bp
	Sm_148820/ Smp_312580/ Smp_332640	TGATGATAGTTATGAAGGATATT CAGC	TATCCAAACGACTCCGAACC	113 bp
	Sm_168500	AGGCGGGTTCAAGTTTGC	CCAAACTCACCTCGTATGTGC	122 bp
SmPAI-RBP1	Sm_009310	TAGTCCGACAGAAGCACCT	ACGACCTCGACCAAACATTC	119 bp
Unspecific control dsRNA primers				
GFP	pCRII-GFP	taatacgactcactatagggTCTCAAGT CCGCCATG	taatacgactcactatagggTGCTCAGG TAGTGTTGTC	360 bp
Housekeeping primers				
Sm_COXI	Smp_900000	TACGGTTGGTGGTGTCACAG	ACGGCCATCACCATACTAGC	152 bp
Sm_Arp10	Smp_093230	GAAGGCTTGAAGGATTCTG	CAACTGCCAACTCTCGGATA	137 bp
Sm_FAD	Smp_089880	TACGGTTTCTCTTCCAACC	CATGGACCTGCTGCATTTAC	72 bp

dsRNA exposure in sporocysts

The sporocysts (20,000/well) were maintained in 6-well polystyrene tissue culture plates with Chernin's balanced saline solution (CBSS) supplemented with 1 g/L glucose (Vetec), 1 g/L trehalose, and 1 % penicillin/streptomycin (Gibco). In each well were added 50 nM of dsRNA (SmHGPRT 1, SmHGPRT 2/4/5, SmHGPRT 3, SmPAI-RBP1, or GFP – termed as unspecific control) (MOURÃO; DE MORAES MOURÃO; DINGUIRARD; FRANCO *et al.*, 2009). For the combination of the dsRNAs targeting the five SmHGPRTases – termed as combined, 50 nM of each dsRNA were added, and for unspecific control (GFP) were added 150 nM of dsRNA. An untreated control, parasites non expose to any ds-RNA, was also included. The parasite cultures were observed daily using an inverted microscope (ABO 100 - ZEISS) to verify phenotypic changes and the viability with the addition of 5 ug/mL of propidium iodide and observation under a fluorescent inverted microscope (ABO 100 - ZEISS) using 544 nm wavelength. Parasite images were recorded using the Axion Vision REL 4 (ZEISS) software during ten days. The experiments were performed in three independent biological replicates.

dsRNA exposure in schistosomula

Schistosomula cultures (30,000/well) were maintained in 6-well polystyrene tissue culture plates in 3 mL GMEM supplemented as mentioned for schistosomula exposure to inhibitors. After cercariae transformation, schistosomula were exposed to 100 nM of dsRNAs (SmHGPRT 1, SmHGPRT 2/4/5, SmHGPRT 3, SmPAI-RBP1, or GFP) (ANDRADE; MOURÃO; GERALDO; COELHO *et al.*, 2014). For the combined group, were added 200

nM of dsRNA (~70 nM of each dsRNA), as well as for the unspecific control (GFP). A group non expose to dsRNA, untreated control, was also included. Cultures were incubated at 37 °C, 5% CO₂, and 95% humidity and were observed daily under a fluorescent inverted microscope (ABO 100 - ZEISS) to verify the viability as described for sporocysts. The experiments were performed in three independent biological replicates.

dsRNA exposure in adult worms

Adult worms were recovered by perfusion, washed three times with Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI) supplemented with 1 % penicillin and streptomycin (Gibco). Worm couples were manually separated and washed as described. The worms were electroporated with 25 µg of each specific dsRNA (SmHGPR1, SmHGPR2/4/5, SmHGPR3, SmPAI-RBP1, or GFP) using 4 mm cuvettes at 125 V for 20 ms (NDEGWA; KRAUTZ-PETERSON; SKELLY, 2007). For the combined group, were added approximately 9 µg of each dsRNA (25 µg total). An untreated control was also evaluated. Eight couples were transferred to 6-well polystyrene tissue culture plates. Egg-laying was evaluated for ten consecutive days. Worm motility was assessed using 24-well polystyrene culture plates containing eight male or eight female worms per well, maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 2% penicillin and streptomycin (Gibco) and 10% FBS (Gibco) at 37 °C, 5% CO₂, and 95% humidity in a CO₂ incubator. The WormAssay software (MARCELLINO; GUT; LIM; SINGH *et al.*, 2012) was used to record the worm movement for 90 seconds for ten days. The experiments were performed in three replicates.

RNA Extraction, cDNA Synthesis, and Real-Time Quantitative PCR (qPCR) analysis

For sporocyst and schistosomula RNA extractions were performed using 5,000 parasites on days 2, 4 and 7 and on days 2, 3 and 7 after dsRNA exposure, respectively, using the TRIzol Reagent (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. For adult worms, two worm pairs on days 2, 4 and 7 were removed and macerated with TRIzol Reagent (Invitrogen), the RNA extractions were carried associated with the SV Total RNA Isolation System (Promega). All RNA samples were treated with Turbo DNase (Ambion) and the RNAs were quantified using a Qubit Fluorometer 2.0 (Invitrogen) and stored at -70 °C. The cDNA was synthesized using ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega). RT-qPCR was performed in three technical replicates using GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) on a ViiA 7 Real-Time PCR System (Thermo Scientific). The samples were normalized using the Cytochrome C oxidase I (SmCOXI, Smp_900000) and the actin-related protein 10 (Sm-arp10, Smp_093230). Primers for RT-qPCR were designed using the Primer 3 software (<http://primer3.sourceforge.net>) to amplify fragments of 100–150 bp (Table 1). The relative expression was analyzed by the $\Delta\Delta C_t$ method (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; SCHMITTGEN, 2001), comparing the expression levels of each gene with those in samples exposed to dsRNA-GFP (unspecific control) or untreated control.

To investigate the expression profile of each target gene throughout different parasite's life stages, we used relative RT-qPCR quantification. For that, the transcription levels of each gene in miracidia, sporocysts, cercariae, schistosomula, adult males, and adult females were normalized using the geometric mean transcription rate of three reference genes: SmCOXI, Smarp10 and FAD-dependent oxidoreductase (SmFAD, Smp_089880).

Plasminogen-activation assay

In order to check whether plasminogen (PLMG) was active after SmPAI-RBP1 knockdown, the amidolytic activity of plasmin was evaluated as previously described (FIGUEIREDO; DA'DARA; OLIVEIRA; SKELLY, 2015). Briefly, parasites of untreated control group, parasites of unspecific control group (GFP) and knocked-down for *SmPAI-RBP1* (~1,000 schistosomula, ~1,000 sporocyst or individual adult male or female parasites) were first washed and then incubated in 100 μ L PBS in 96-well plates. Then, 1.5 μ g of human PLMG and 15 ng of tissue-PLMG activator (t-PA) in 100 μ L PBS were added. Plates were incubated for 1 hour at 37 °C to permit plasmin generation. Finally, 2 μ g of synthetic plasmin substrate (D-Valyl-L-Leucyl-L-Lysine4-nitroanilide dihydrochloride) was added to 50 μ L PBS to complete the reaction. Changes in OD₄₀₅ were analyzed. The experiments were performed in three replicates.

High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

In order to check whether adenosine levels were decreased after *SmHGPRTases* knockdown, the High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) method was performed to separate and quantify the adenosine content in the samples. First, a calibration curve of the metabolites in seven different concentrations (1,000; 500; 250; 125; 62.5; 31.25; 15.625 ng/mL) was generated. To perform the experiment, 150 μ L of methanol containing 100 ng/mL of phenacetin were added to the reactions from the curve and samples. Following, parasites of the untreated control group, unspecific control group and parasites treated with SmHGPRTase 1, 2/4/5 and 3-dsRNAs separately or in combination (~3,000 sporocysts, ~3,000 schistosomula, four adult male worms, and four adult female worms) were macerated and centrifuged at 13,000 rpm for 10 min. The supernatant was transferred to a tube containing C18 resins (Sigma-Aldrich) and centrifuged. Then, the supernatant recovered from the resin were lyophilized in a Vacuum Concentrator (Eppendorf) for 30 min, then resuspended in 50 μ L of Milli-Q water and transferred to LC-MS tubes (Sigma-Aldrich). The adenosine detection was based on the exact mass and retention time from the standard calibration curve. Individual variations in extraction efficiency were normalized using the internal phenacetin standard. The HPLC was performed on a Nexera UHPLC (Shimadzu) hyphenated system on a maXis ETD high-resolution ESI-QTOF mass spectrometer (Bruker) controlled by Compass 1.5 software (Bruker). The 20 μ L volume of the metabolite extracts were injected into a Shimadzu Shim-Pack XR-ODS-III column (C18, 2.2 μ m, 2.0 x 150mm) at 30 °C in a flow of 400 μ L/min. Adenosine detection and quantification were performed using the QuantAnalysis program from the Compass software. The experiments were performed in three replicates.

In vivo experiments

Knocked-down schistosomula (SmPAI-RBP1 and the five SmHGPRTases in combination) were used for *in vivo* experiments. As mentioned before, schistosomula were exposed to specific and unspecific dsRNAs, and after three days of exposure and transcript levels confirmation, 350 parasites from each experimental group, including the untreated control, were subcutaneously inoculated in six-week-old female Swiss mice (*Mus musculus*).

Forty-two days after infection, animals were first anesthetized with xylazine hydrochloride (10 mg/kg) (Syntec) and ketamine hydrochloride (150 mg/kg) (Syntec) by intramuscular administration and euthanized by overdose using 2.5% sodium thiopental (150 mg/kg) (Cristália).

Following, perfusion for adult worms' recovery was performed. After counting the worms were fixed in Alcohol-Formalin-Acetic Acid (AFA) and stained with chloride carmine (Tavares et al.). Then, confocal images were captured using an inverted microscope Eclipse Ti-E (Nikon) with Confocal C2 plus (Nikon) using 546-and 488-nm wavelengths. Were analyzed 15 and 12 females for SmHGPRases and SmPAI-RBP1, respectively, and 12 males for both groups. The area of ovary and tubercles height were analyzed using NIS-Elements software (Nikon).

Also, mice's livers and intestines were removed, weighed, and incubated with 10% KOH for egg recovery and counting (AVELAR; GAVA; NEVES; SILVA *et al.*, 2019). The mice ileum were pressed into microscope slides to analyze the egg maturation (MATI; MELO, 2013). Six mice were infected for each experimental group and three independent biological replicates were performed.

Results

SmHGPRases and SmPAI-RBP1 are different from human orthologs

In order to check the identity of *S. mansoni* proteins targets of this study in comparison to the human proteins, an *in silico* analysis was performed comparing the five SmHGPRases and SmPAI-RBP1 proteins from *S. mansoni* with their respective human orthologs. The HGPRase characteristic domain is the Phosphoribosyl-transferase domain (Family Pribosyltran - PF00156), which catalyzes the substitution of the PRPP group 1-pyrophosphate (5-phospho-a-D-ribose-1-diphosphate) with a purine base (adenine, guanine, hypoxanthine or xanthine) to form the corresponding nucleoside in the 'nucleoside-5-monophosphate' form (EL-GEBALI; MISTRY; BATEMAN; EDDY *et al.*, 2019). The percentage of identity between the Phosphoribosyl-transferase domain sequences from *S. mansoni* and their human ortholog is 50.61% for SmHGPRase 1, 35.23% for SmHGPRase 2, 40.49% for SmHGPRase 3 and 36.87% for SmHGPRase 4/5. The position of each domain is represented in Supplementary material 1.

Plasminogen activator inhibitor (PAI-1) belongs to the serine protease inhibitor superfamily (serpin) and has the Serpin domain (Family Serpin – PF00079). The serpin family members can act as serine protease inhibitors (HUNTINGTON, 2011) and, in some cases, can also inhibit cysteine protease family members such as the caspases and cathepsins (GONÇALVES; BRESSAN; SAITO; MORELLO *et al.*, 2011; TAKEDA; YAMAMOTO; NAKAMURA; TAKAHASHI *et al.*, 1995). In humans, PAI-RBP1 has two different domains: the intracellular 4 N terminal hyaluronan (Family IHABP4_N - PF16174) and the hyaluronan/mRNA binding protein (Family HABP4_PAIRBP1 - PF04774). The IHABP4_N domain is involved in the binding of some important components of the translational machinery (GONÇALVES; BRESSAN; SAITO; MORELLO *et al.*, 2011). The schistosomal PAI-RBP1 protein carries only the domain HABP4_PAIRBP1. This domain specifically

binds to PAI-1 and may regulate their mRNA stability (HEATON; DLAKIC; DLAKIC; GELEHRTER, 2001). The percentage of identity between the HABP4_PAI-RBP1 domain sequences from *S. mansoni* and their human ortholog is 31.25% (Supplementary material 1).

Overlapping the tridimensional structures of HGPRTase proteins predicted by Phyre2, the SmHGPRTase 1 showed the greatest identity with the human protein (48%) (Figure 1 A, B, F). The protein that had a lower identity considering the domain sequence, SmHGPRTase 2 and SmHGPRTase 4/5, also showed low similarity when comparing the tridimensional structure of the complete protein (~28%) (Figure 1 A, C, G and 1 A, E, I), while SmHGPRTase 3 shows an identity of 39% when the whole protein sequence was compared (Figure 1 A, D, H).

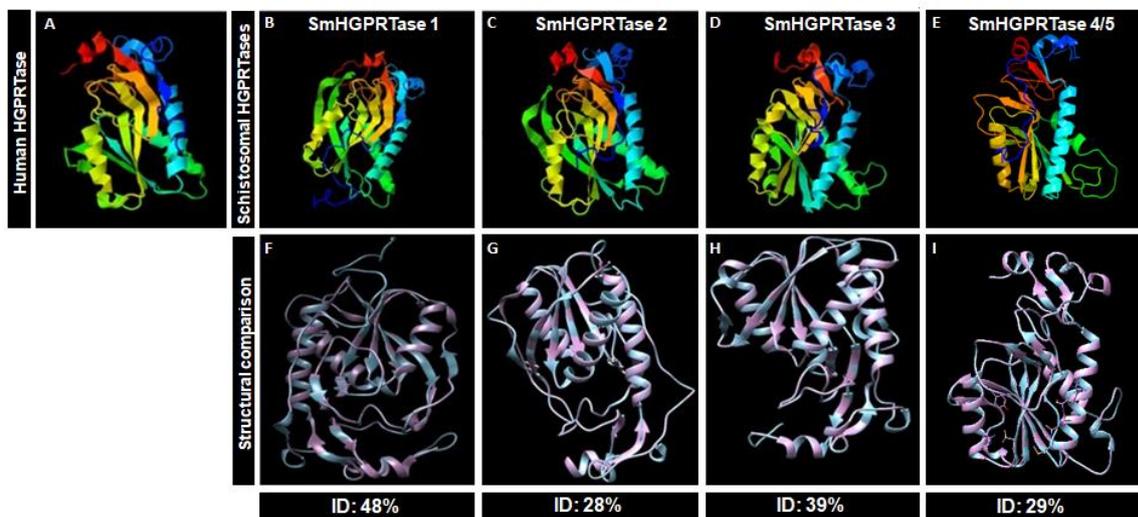


Figure 1: Predicted tridimension structures for HGPRTases from *S. mansoni* and the human ortholog. Using Phyre2 program the HGPRTase proteins from human (A) and *S. mansoni* (SmHGPRTase 1 - B, SmHGPRTase 2 - C, SmHGPRTase 3 - D, and SmHGPRTase 4/5 - E) were modeled and aligned. The identities percentage were calculated using the predicted models and the overlaps between the respective structures are represented in F, G, H, and I.

The information available on the Protein Data Bank (PDB) about *SmPAI-RBP1* gene was not sufficient to perform their modeling.

SmJNK and Smp38 MAPK pathways seems to regulate SmHGPRTases and SmPAI-RBP1 expression

After the *in silico* analysis, we sought to confirm whether *SmHGPRTases* and *SmPAI-RBP1* were regulated by the SmJNK and Smp38 MAPK pathways as previously described (GAVA; TAVARES; FALCONE; OLIVEIRA *et al.*, 2019). Thus schistosomula were exposed to SmJNK (NCC -00029042) or Smp38 (NCC - 00001994) predicted inhibitors. After 30h of culture, was observed alterations in schistosomula phenotype, like the presence of a dark mid-region and round bodies (Figure 2 D and E). The transcripts levels of *SmHGPRTase 1*, *2/4/5*, *3*, and *SmPAI-RBP1* were evaluated after parasites exposure to these molecules. When the Smp38 predicted inhibitor was used the *SmHGPRTase 1*, *3*, and *SmPAI-*

RBPI transcript levels were decreased by 37%, 50%, and 41%, respectively, compared with the control (DMSO 0.2%) (Figure 2A). *SmHGPRTases 2/4/5* transcript levels were not altered after the exposure to the predicted Smp38 inhibitor. With the SmJNK potential inhibitor, it was observed a reduction of 49% in the *SmPAI-RBPI* transcript levels (Figure 2B).

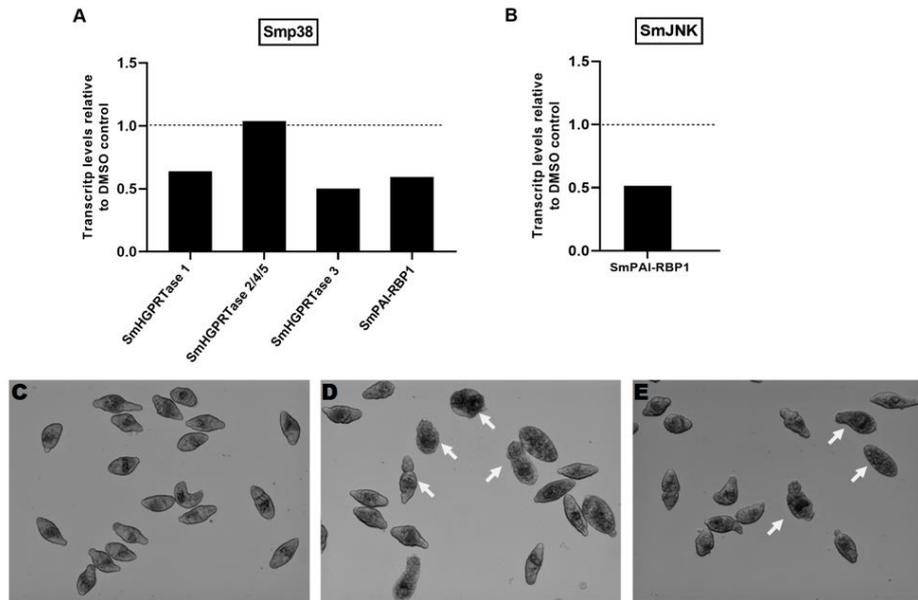


Figure 2. Validation of SmJNK and Smp38 MAP kinase pathways regulation of *SmHGPRTase 1, 2/4, 3,* and/or *SmPAI-RBPI*. Bars represent the transcript levels of *SmHGPRTase 1, 2/4/5, 3,* and *SmPAI-RBPI* in schistosomula exposed to Smp38 inhibitor (A), and *SmPAI-RBPI* transcript levels in schistosomula exposed to SmJNK inhibitor (B). Data were normalized with the DMSO treated group (dotted line). Representative images of schistosomula exposed to DMSO (control group) (C), schistosomula exposed to Smp38 inhibitor (D), and schistosomula exposed to SmJNK inhibitor (E). Arrows indicate morphological changes in parasite phenotype.

Expression profile of *SmHGPRTases* and *SmPAI-RBPI* throughout different *S. mansoni* life stages

Once *SmHGPRTases* and *SmPAI-RBPI* are part of the SmJNK and Smp38 pathways and are different from their human counterparts, we have engaged in the characterization of those proteins. To investigate the expression profile of each target gene throughout different *S. mansoni* life stages, the transcript levels were assessed in miracidia, sporocysts, cercariae, schistosomula, male and female adult worms.

SmHGPRTase 1 gene exhibited the highest expression levels in sporocyst, followed by female adult worm and the lowest levels in schistosomulum. Miracidium, male adult worm, and cercaria presented approximately half of the amount exhibited by sporocyst (Figure 3A). *SmHGPRTases 2/4/5* genes also showed the highest expression levels in sporocyst and the second highest expression levels is female adult worm, followed by cercaria. Schistosomulum and male adult worm presented low expression levels and miracidium present the lowest

levels, being 33 times less express than in sporocyst (Figure 3B). For *SmHGPRTase 3*, the highest expression levels was in female adult worm, two times the amount presented by miracidium that exhibited the second highest expression levels. Sporocyst presented the lowest expression levels. *SmPAI-RBP1* is higher expressed in sporocyst, five times the amount expressed by female adult worm. Miracidium, male adult, cercaria, and schistosomulum showed lower expression levels (Figure 3D).

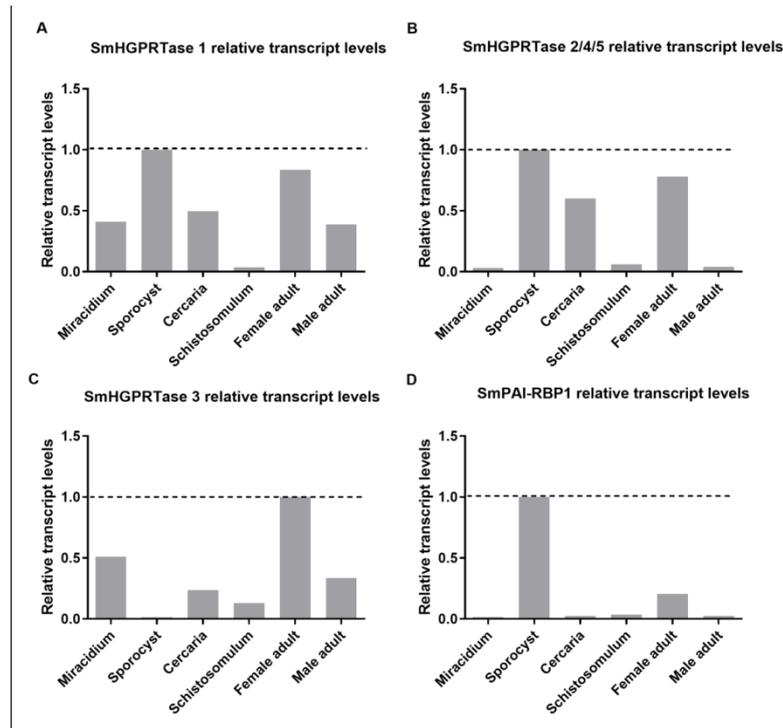


Figure 3. Expression profile of *SmHGPRTases* and *SmPai-RBP1* genes throughout different parasite's life stages. Bars show the relative transcript levels of *SmHGPRTase 1* (A), *SmHGPRTase 2/4/5* (B), *SmHGPRTase 3* (C), and *SmPAI-RBP1* (D) in the different *S. mansoni* life stages: miracidium, sporocyst, cercaria, schistosomulum, adult male, and adult female.

***SmHGPRTase* knocked-down reduce adenosine levels in sporocysts and influences in their viability**

In order to interrogate the functional roles of the *SmHGPRTase* genes, they were knocked-down in sporocysts by exposure to dsRNAs specific for each gene or in combination targeting the five *SmHGPRTases*.

SmHGPRTase 1 transcript levels were reduced by up to ~71% after four days of dsRNA exposure. A reduction of ~52% after two days and ~69% after seven days of dsRNA exposure were also observed. For *SmHGPRTase 2/4/5*, seven days of exposure presented the lower transcript levels (~80%), followed by ~75% after four days and ~38% after two days of dsRNA exposure. *SmHGPRTase 3* did not reduce the transcript levels after two days of dsRNA exposure, while after 4 days it reduces in ~15% and after 7 days a reduction of ~25% were observed. Similar knockdown effects were observed when we used a dsRNA combination for the five *SmHGPRTases* (Figure 4A).

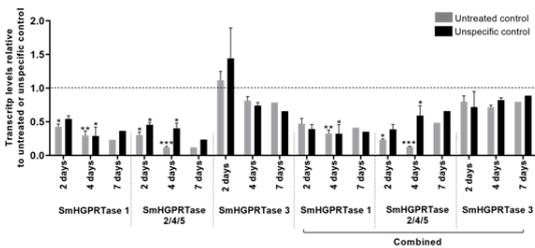
Once we determined the days when the transcript levels were lower after knockdown for *SmHGPRTase 1*, *2/4/5*, and *3* in sporocysts, biochemical tests were performed to check

whether adenosine levels were also decreased, since these enzymes are supposed to be involved in the purine salvage pathway. We observed that the adenosine levels for sporocyst are 30% lower in the group knocked-down for *SmHGPRTase 1* and *SmHGPRTase* combined group a 50% decrease in adenosine levels was observed when compared with the unspecific control (GFP) (Figure 6B).

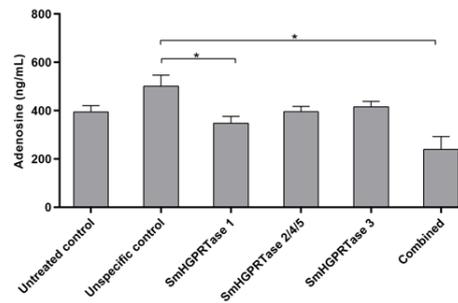
To assess the viability of sporocysts and schistosomula exposed or not to dsRNAs, parasites were daily observed. A significant increase of 62% in mortality rates in sporocysts exposed to *SmHGPRTase 1*-dsRNA was observed after four days of exposure compared with the untreated control. This value was maintained until the seventh day on which it reached the value of 57%. For sporocysts exposed to *SmHGPRTase 2/4/5*-dsRNA, it was observed a rise of 58% in the mortality rate compared with the unspecific control (GFP) after seven days of dsRNA exposure. The combined group had the highest number of dead sporocysts. From the third day of dsRNA exposure, it was observed an increase of 75% in mortality, reaching the rate of ~65% on the seventh day compared with the controls (Figure 4C). The Figure 5 shows representative images evidencing the higher number of dead sporocysts in these groups.

Assessment of parasite phenotypes after *SmHGPRTase 1*, *2/4/5* and *3*- knockdown were also performed. Sporocysts area was delimited considering the day in which each gene presented the lower transcript levels compared to control groups. A significant reduction (~8-13%) in the area of sporocyst exposed to *SmHGPRTase 1*-, *2/4/5*-dsRNA, was noted when compared to control groups after four days of exposure. Knocked-down sporocysts for *SmHGPRTase 3* did not present significant alteration in their size (Figure 4D).

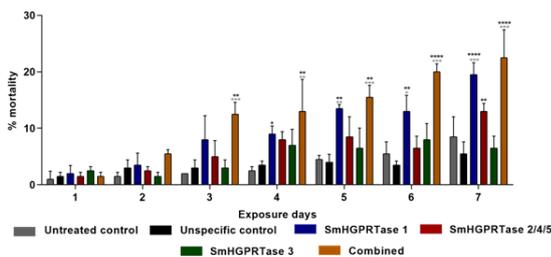
A Transcript levels in sporocyst knocked-down for *SmHGPRTases*



B Adenosine levels in sporocyst after *SmHGPRTases*-dsRNA exposure



C Sporocyst mortality rate after *SmHGPRTases*-dsRNA exposure



D Sporocyst area after *SmHGPRTases*-dsRNA exposure

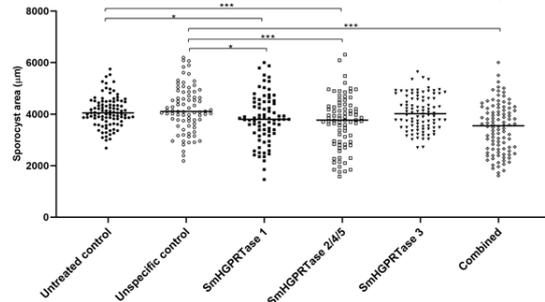


Figure 4. *SmHGPRTases* transcript levels after sporocysts exposure to dsRNA and knockdown effects in their adenosine level and in parasite viability. (A) Bars represent the transcript levels of *SmHGPRTase 1*, *SmHGPRTase 2/4/5*, *SmHGPRTase 3* in sporocysts after exposure to the specific dsRNAs separately or in combination (combined) relative to the untreated control (grey) and the unspecific control (GFP) (black) after 2, 4 and 7 days. Above the bars are represented the standard error of the mean of three replicates. (B) Bars represent the measurement of adenosine levels in sporocysts by HPLC. Following the controls, bars represent, respectively, parasites treated with *SmHGPRTase 1*-dsRNA, *SmHGPRTase 2/4/5*-dsRNA, *SmHGPRTase 3*-dsRNA and the combined group. Above the bars are represented the standard error of the mean of three replicates. (C) Bars represent the mortality percentage of sporocysts exposed to specific dsRNAs. Grey: untreated control. Black: unspecific control. Blue: sporocysts exposed to *SmHGPRTase 1*-dsRNA. Red: sporocysts exposed to *SmHGPRTase 2/4/5*-dsRNA. Green: sporocysts exposed to *SmHGPRTase 3*-dsRNA. Orange: combined group. Above the bars are represented the standard error of the mean of two biological replicates. As the statistic test, Two-way ANOVA with multiple comparisons using Sidak's post-test was used. Black asterisks represent significant differences from untreated control conditions and grey asterisks from unspecific control conditions. (D) Area of sporocysts exposed to the *SmHGPRTase*-dsRNAs. Symbols represent a single parasite for each experimental group. Black circles: untreated control, white circles: unspecific control, black square: parasites treated with *SmHGPRTase 1*-dsRNA, white squares: parasites treated with *SmHGPRTase 2/4/5*-dsRNA, black triangles: parasites treated with *SmHGPRTase 3*-dsRNA, and white rhombus: combined group. The horizontal black bars represent the median area of the sample population. A, B and D: Significant differences compared to control conditions were analyzed by unpaired t test (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p < 0.0001$).

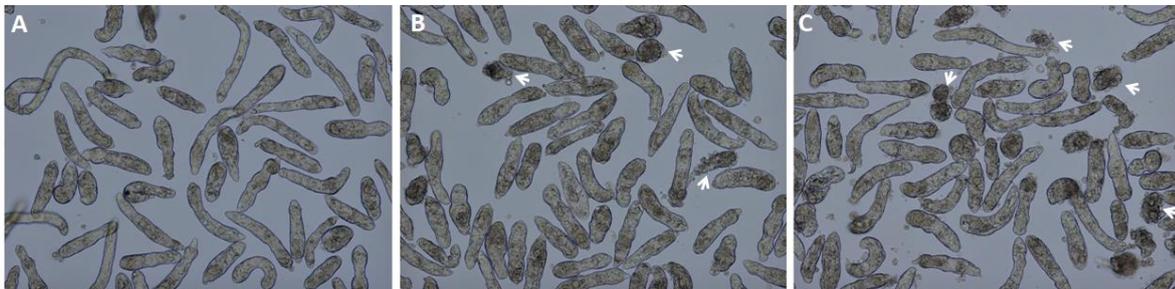


Figure 5. Viability of sporocysts exposed to *SmHGPRTases*-dsRNAs. Representative images of the untreated control group (A), sporocysts exposed to *SmHGPRTase 1*-dsRNA (B), and sporocyst exposed to the combination of three *SmHGPRTase*-dsRNAs (D). White arrows indicate changes in phenotype or dead sporocysts.

***SmHGPRTase* knocked-down can be involved in schistosomula growth**

In the schistosomula stage, transcript levels were reduced by up to ~85% for *SmHGPRTase 1* after two days of dsRNA exposure, ~68% after four days and ~70% after seven days. Using *SmHGPRTase 2/4/5*-dsRNA, were observed a reduction of ~50% after two days, ~55% after three days and ~70% after seven days of exposure. For *SmHGPRTase 3*, lower transcript levels were observed after seven days of dsRNA exposure (~50%), ~30% after three days and ~21% after 2 days. When a combination of dsRNAs was used (combined), the transcript levels reduction reached up to ~68% after seven days of dsRNA exposure for *SmHGPRTase 1*, ~38% for *SmHGPRTase 2/4/5* and ~49% for *SmHGPRTase 3*.

In two days of exposure, the transcript levels were not reduced compared with controls, while in three days were detected a reduction of ~55% for *SmHGPRTase 1*, ~68% for *SmHGPRTase 2/4/5* and ~35% for *SmHGPRTase 3* (Figure 6A).

Concerning the adenosine levels measurement for schistosomula, no statistically significant difference was observed when the results were compared with controls (Supplementary material 2A). On the other hand, when schistosomula area was delimited considering the day in which each gene presented the lower transcript levels compared to control groups, it was observed a significant area reduction of 12% for parasites treated with *SmHGPRTase 1*-dsRNA compared with untreated control and 8% compared with unspecific control. For *SmHGPRTase 2/4/5*-dsRNA, was observed a reduction of 7% and for *SmHGPRTase 3*-dsRNA a reduction of 8% compared with the untreated control. The combined group was also evaluated, and a significant reduction in schistosomula size of 9% was observed when compared with the untreated control (Figure 6B, C). In addition to the size reduction, dark mid-region in parasites from all the groups treated with specific dsRNAs were noted. Mortality rate in schistosomula did not present a difference between the groups (data not shown).

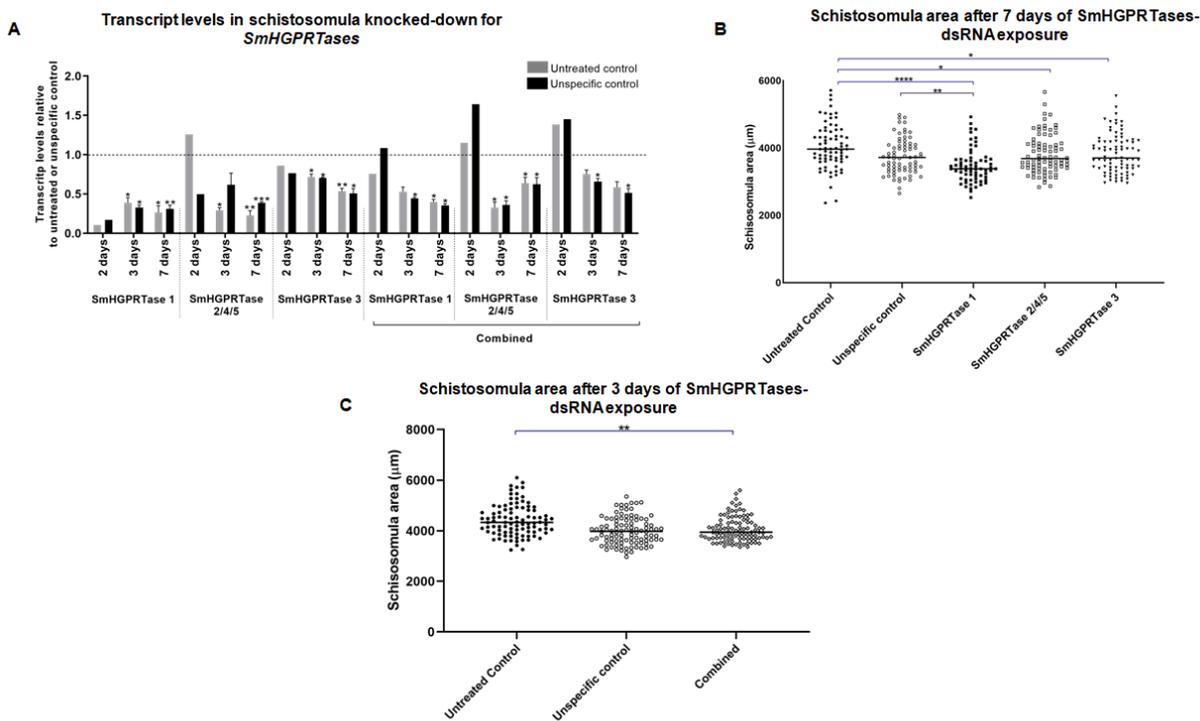


Figure 6. *SmHGPRTases* transcript levels after schistosomula exposure to dsRNA and knockdown effects in their adenosine level and in parasite phenotype. (A) Bars represent the transcript levels of *SmHGPRTase 1*, *SmHGPRTase 2/4/5*, *SmHGPRTase 3* in schistosomula after exposure to the specific dsRNAs separately or in combination (combined) relative to the untreated control (grey) and the unspecific control (GFP) (black) after 2, 3 and 7 days. Above the bars are represented the standard error of the mean of three replicates. (B) Area of sporocysts exposed to the *SmHGPRTase*-dsRNAs. Symbols represent a single parasite for each experimental group. Black circles: untreated control, white circles: unspecific control, black square: parasites treated with *SmHGPRTase 1*-dsRNA, white squares: parasites treated with *SmHGPRTase 2/4/5*-dsRNA, black triangles: parasites treated with *SmHGPRTase 3*-dsRNA. (C) Area of sporocysts exposed to the combined group represented by white rhombus. The horizontal black bars represent the median area of the sample population.

Significant differences compared to control conditions were analyzed by unpaired t test (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p < 0.0001$).

SmHGPRTase* knocked-down in female adult worm decreased adenosine levels and affect their motility *in vitro

When adult worms were electroporated with the specific dsRNAs, *SmHGPRTase 1* gene presented ~70% reduction in transcript levels on the seventh day after electroporation, ~50% on the fourth day and ~55% on the second day. *SmHGPRTase 2/4/5* gene present a reduction of ~50% in the transcript levels after two days after electroporation, ~35% after four days and on the seventh day any reduction was observed. A decrease in the transcript levels of ~62% for *SmHGPRTase 3* gene after seven days was noted. On the second day occurred a reduction of ~58% and on fourth day of ~49%. When the combined group was analyzed similar results were seen for *SmHGPRTase 1* and *SmHGPRTase 3*, however for *SmHGPRTase 2* lower transcript levels were detected. On second, fourth and seventh days after electroporation, a decrease of ~72%, ~70% and ~45%, respectively, were noted (Figure 7A).

After that, the adenosine levels were checked to certify if it were also decreased in adult worm. In female adult worms, the adenosine levels reduced by ~45% for all the SmHGPRTases knocked-down parasites compared with the unspecific control (Figure 7B). On the other hand, for adult male worms no statistically significant difference in the detection of adenosine was observed (Supplementary material 2B).

To analyze alterations in adult worms viability after SmHGPRTase-dsRNA exposure, the parasite movement was quantified. Female adult worms electroporated with the combined SmHGPRTase-dsRNAs showed a significant reduction in their movement in the eighth day (34%) and tenth day (43%) compared to the control groups (Figure 7C). In male adult worms no significant difference in their movement was observed (Supplementary material 4A).

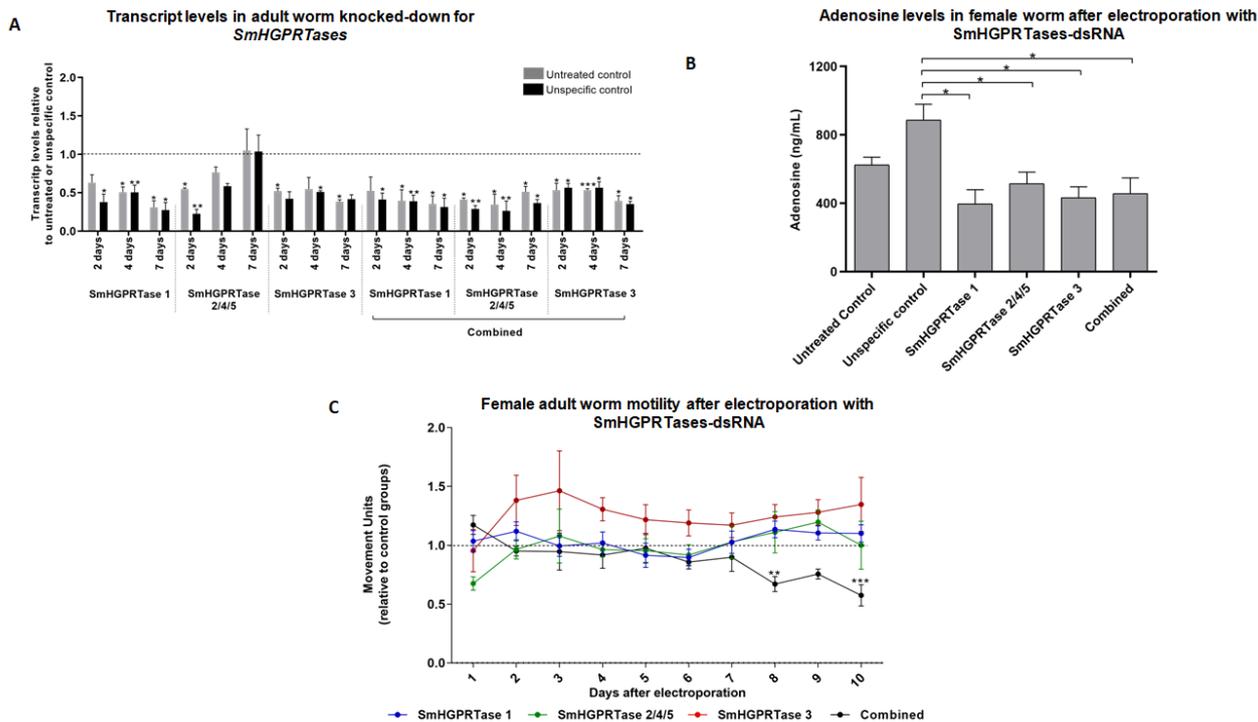


Figure 7. *SmHGPRTases* transcript levels after adult worm electroporation with dsRNA and knockdown effects in their adenosine level and motility. (A) Bars represent the transcript levels of *SmHGPRTase 1*, *SmHGPRTase 2/4/5*, *SmHGPRTase 3* in adult worm after electroporation with specific dsRNAs separately or in combination (combined) relative to the untreated control (grey) and the unspecific control (GFP) (black) after 2, 4 and 7 days. Above the bars are represented the standard error of the mean of three replicates. (B) Bars represent the measurement of adenosine levels in adult female worm by HPLC. Following the controls, bars represent, respectively, parasites treated with *SmHGPRTase 1*-dsRNA, *SmHGPRTase 2/4/5*-dsRNA, *SmHGPRTase 3*-dsRNA and the combined group. Above the bars are represented the standard error of the mean of three replicates. (C) Motility of adult worms exposed to *SmHGPRTase*-dsRNAs. Dots represent the average of the movement units of female adult worms that were electroporated with *SmHGPRTase*-dsRNAs. Blue: parasites exposed to *SmHGPRTase 1*-dsRNA; green: parasites exposed to *SmHGPRTase 2/4/5*-dsRNA; red: parasites exposed to *SmHGPRTase 3*-dsRNA; black: parasites exposed to the combination of the three *SmHGPRTase*-dsRNAs. The results were normalized according to the movement units of adult worms from control groups (dotted line). Standard errors of the mean of three biological replicates are represented above the dots. Statistical analysis was performed using Two-way ANOVA followed by the Sidak post-test (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).

***SmPAI-RBP1* knocked-down alters plasminogen activation in sporocysts and can be related with their development**

Regarding the transcript levels of *SmPAI-RBP1* after ds-RNA exposure in sporocysts, a reduction of ~34% were observed after two days of exposure and ~51% after four days. On the seventh day of exposure, a decrease of ~11% comparing with the unspecific control was noted, however when is compared with the untreated control the transcript levels were not reduced (Figure 8A).

Likewise, to determine whether *SmPAI-RBP1* alters the activity of plasminogen activators (tPA and uPA), thus affecting the fibrinolytic pathway, *SmPAI-RBP1* knocked-down live parasites were used for the detection of plasmin activity. For that, plasminogen

(PLMG) was activated *in vivo* by tissue plasminogen activator (tPA) to generate plasmin. This plasmin can cleave the synthetic substrate D-Valyl-L-Leucyl-L-Lysine 4-nitroanilide dihydrochloride to generate a product that is detected at OD₄₀₅. For *SmPAI-RBP1* knocked-down sporocysts, a significant decrease of 11% in PLMG activation compared to the control groups was observed (Figure 8B).

Although no significant difference in the mortality rate of *SmPAI-RBP1* knocked-down sporocysts has been seen (data not shown), phenotype alterations were observed on the fourth day of dsRNA exposure, the day that *SmPAI-RBP1* presented the lower transcript levels compared to control groups. Phenotypes assessment were performed through the delimitation of the sporocyst area. A significant reduction of 9% in the area of parasites exposed to *SmPAI-RBP1*-dsRNAs was noted when compared to control groups (Figure 7C).

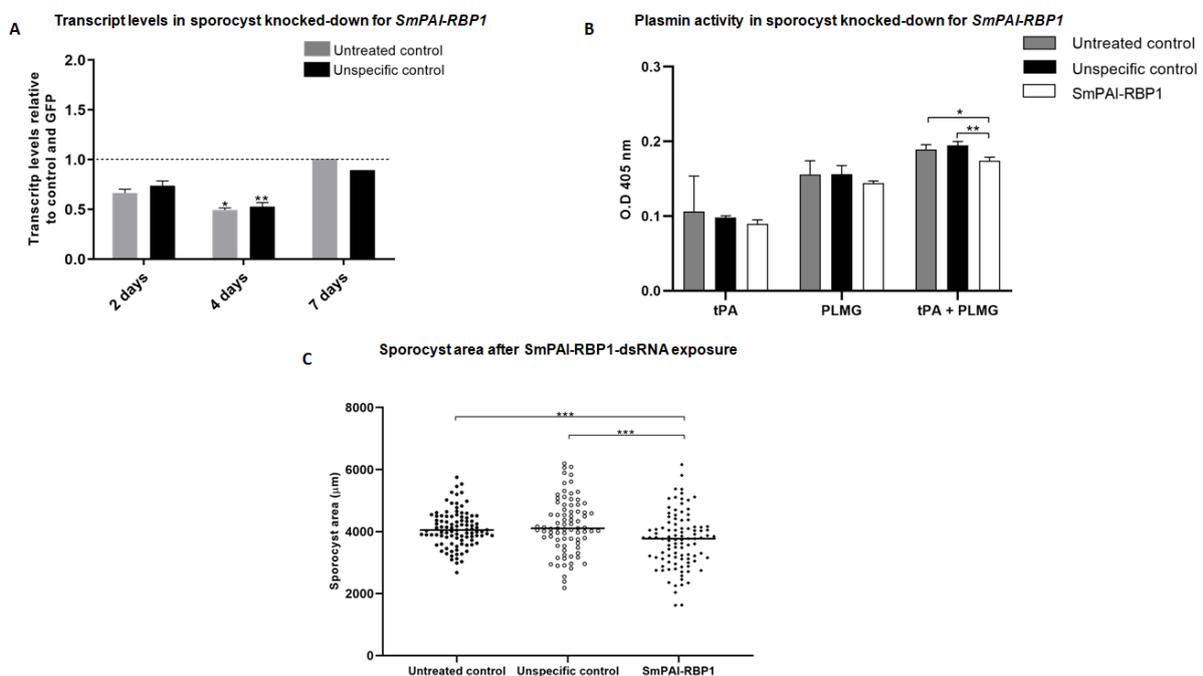


Figure 8. *SmPAI-RBP1* transcript levels after sporocysts exposure to dsRNA and knockdown effects in their plasmin activity and in parasite phenotype. (A) Bars represent the *SmPAI-RBP1* transcript levels in sporocysts, relative to the untreated control (grey) and the unspecific control (GFP) (black) after 2, 4 and 7 days after dsRNA exposure. Above the bars are represented the standard error of the mean of three replicates. (B) Bars represent plasmin activity in live sporocysts knocked-down for *SmPAI-RBP1* detected in the presence of t-PA and/or PLMG. Grey bars: untreated control. Black bars: unspecific control. White bars: parasites exposed to *SmPAI-RBP1*-dsRNA. Above the bars are represented the standard error of the mean of three replicates. (C) The area of sporocysts exposed to *SmPAI-RBP1*-dsRNAs (black rhombus) were compared to the area of untreated (black circles) and unspecific (white circles) controls. Symbols represent a single parasite for each experimental group. The horizontal black bars represent the median area of the sample population. Significant differences compared to control conditions were analyzed by unpaired t test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

***SmPAI-RBP1* knocked-down alters plasminogen activation in schistosomula and can be related with their development**

After expose schistosomula to *SmPAI-RBP1*-dsRNA, the transcript levels were reduced by up to ~50% after seven days of dsRNA exposure and ~37% after three days. Otherwise, after two days of dsRNA exposure significant reduction in the transcript levels was not observed (Figure 9A).

To check if these parasites are able to activate plasminogen we also evaluate the plasmin activity. As shown in Figure 9B, *SmPAI-RBP1* knocked-down schistosomula promote a significant enhance of 22% in the plasminogen activation in the presence of tPA compared to the control groups.

In regard to schistosomula viability, mortality rate did not present difference between the groups (data not shown), but concerning the parasite size, a significant area reduction of 11% in *SmPAI-RBP1* knocked-down parasites compared to the untreated group was observed after seven days of dsRNA exposure (Figure 9C). Moreover, parasites treated with *SmPAI-RBP1*-dsRNA presented alterations in their color, demonstrated by the presence of a dark mid-region in their bodies.

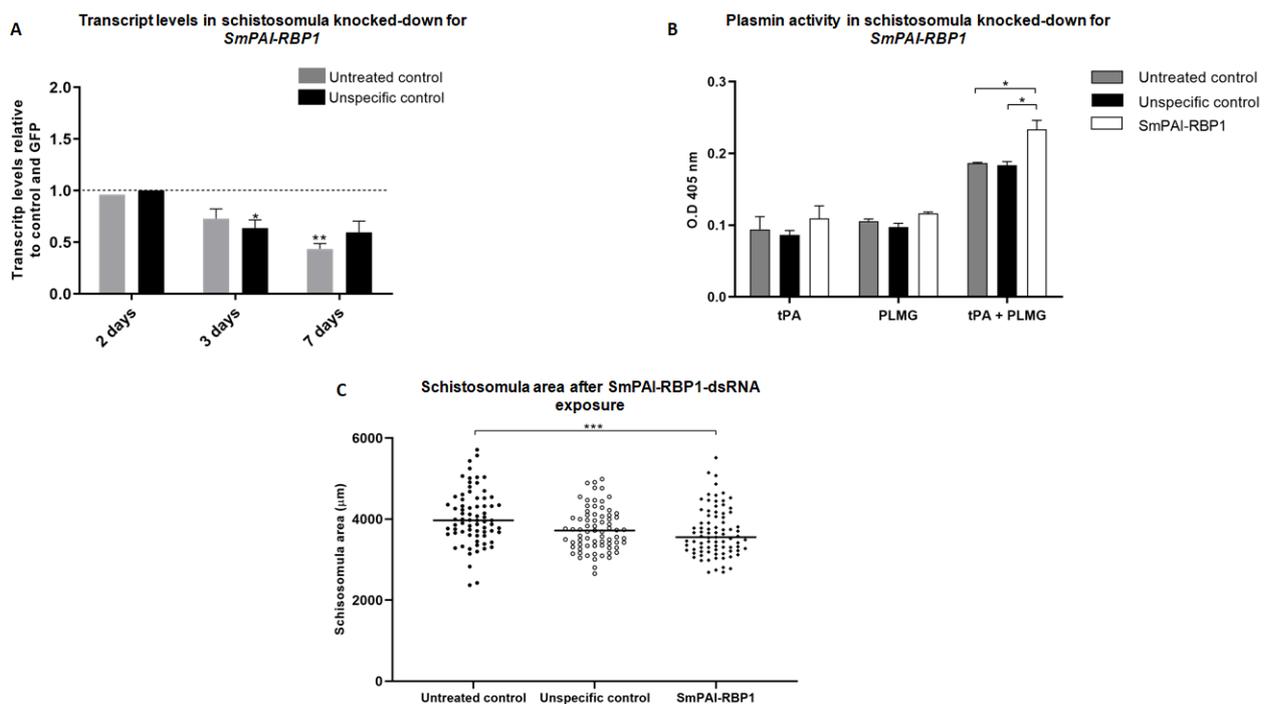


Figure 9. *SmPAI-RBP1* transcript levels after schistosomula exposure to dsRNA and knockdown effects in their plasmin activity and in parasite phenotype. (A) Bars represent the *SmPAI-RBP1* transcript levels in schistosomula, relative to the untreated control (grey) and the unspecific control (GFP) (black) after 2, 3 and 7 days after dsRNA exposure. Above the bars are represented the standard error of the mean of three replicates. (B) Bars represent plasmin activity in live schistosomula knocked-down for *SmPAI-RBP1* detected in the presence of t-PA and/or PLMG. Grey bars: untreated control. Black bars: unspecific control. White bars: parasites exposed to *SmPAI-RBP1*-dsRNA. Above the bars are represented the standard error of the mean of three replicates. (C) The area of schistosomula exposed to *SmPAI-RBP1*-dsRNAs (black rhombus) were compared to the area of untreated (black circles) and unspecific (white circles) controls. Symbols represent a

single parasite for each experimental group. The horizontal black bars represent the median area of the sample population.

Significant differences compared to control conditions were analyzed by unpaired t test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

***SmPAI-RBP1* knocked-down influences in plasminogen activation in adult female worm**

Adult worms electroporated with *SmPAI-RBP1*-dsRNA presented a significant decrease in transcript levels by up to ~69% on the fourth day, following a reduction of ~64% on the seventh day and ~45% on the second day after electroporation (Figure 10A).

After determine the day that present the lower transcript levels after knockdown for *SmPAI-RBP1* in adult worms, the plasmin activity were assessed and we observed that female adult worms exposed to *SmPAI-RBP1*-dsRNA enhance plasminogen activation in 23% in the presence of tPA compared to the controls (Figure 10B). In male adult worms no statistically significant difference was detected (Supplementary material 3).

Alterations e adult worm viability was also evaluated, however *SmPAI-RBP1* knockdown did not result in significant changes in male or female movement during the ten days evaluated (Supplementary material 4B).

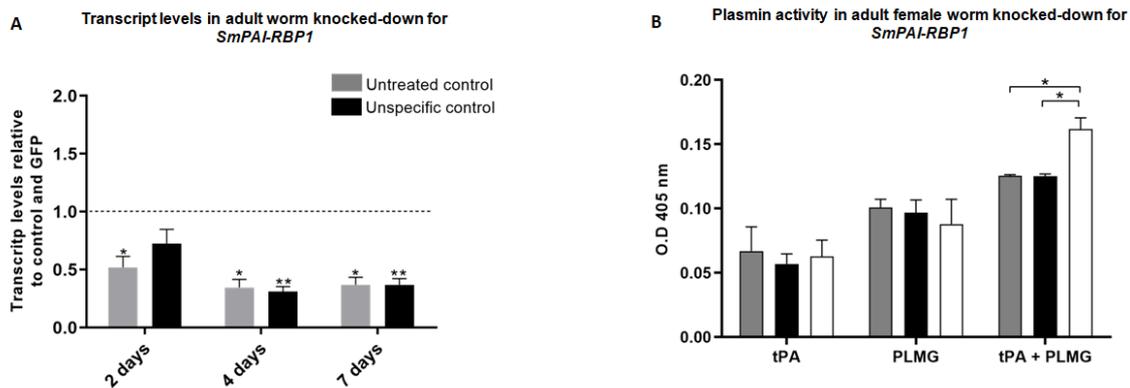


Figure 10. *SmPAI-RBP1* transcript levels after adult worm exposure to dsRNA and knockdown effects in their plasmin activity and in parasite phenotype. (A) Bars represent the *SmPAI-RBP1* transcript levels in adult worms, relative to the untreated control (grey) and the unspecific control (GFP) (black) after 2, 3 and 7 days after dsRNA exposure. Above the bars are represented the standard error of the mean of three replicates. (B) Bars represent plasmin activity in live female adult worm knocked-down for *SmPAI-RBP1* detected in the presence of t-PA and/or PLMG. Grey bars: untreated control. Black bars: unspecific control. White bars: parasites exposed to *SmPAI-RBP1*-dsRNA. Above the bars are represented the standard error of the mean of three replicates. Above the bars are represented the standard error of the mean of three replicates. Significant differences compared to control conditions were analyzed by unpaired t test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

SmHGPR*Tases knockdown interferes in development of ovary and egg maturation in female adult worm *in vivo

In order to evaluate the function of *SmHGPR*Tases in the infection establishment, schistosomula exposed to the combined *SmHGPR*Tase-dsRNAs were used for *in vivo* experiments.

After perfusion, the number of recovered adult worms and eggs from liver and intestine from the experimental groups did not show significant difference when compared to the control groups (data not shown). However, the ileum of mice infected with schistosomula exposed to the combined *SmHGPRTase*-dsRNAs presented a significant increase of immature eggs (stages 1, 2, 3, and 4; as previously described [30]). A significant difference of 8% more eggs on stage 3 was found in the *SmHGPRTases* combined group when compared to the control groups. Also, in the ileum of mice infected with schistosomula exposed to the combined *SmHGPRTase*-dsRNAs, an increase (9%) in eggs on stage 2 when compared to the unspecific control group. A significant reduction (16%) in mature eggs was also observed in the combined group (Figure 11). A representative image in Figure 11 B shows the differences of eggs found in the ileum.

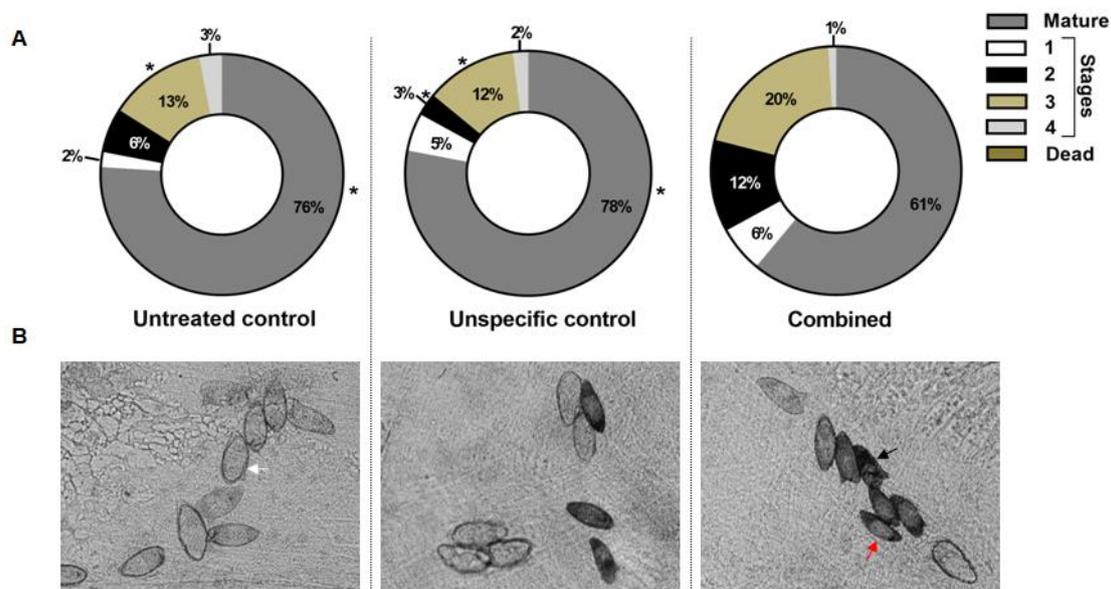


Figure 11. Egg maturation in the ileum of mice infected with schistosomula treated with combined *SmHGPRTase*-dsRNAs. (A) The percentage of egg in each maturation stage is represented in the circle section: mature (grey), stage 1 (white), stage 2 (black), stage 3 (beige), stage 4 (light grey) and dead (brown). (B) Representative images of the maturation pattern in each experimental group. White arrow: mature egg. Black arrow: egg in stage 2. Red arrow: egg in stage 3. Statistical analysis was performed using unpaired t test (* $p \leq 0.05$).

Confocal microscopy was performed to understand if parasite morphology was also altered in association with the high number of immature eggs production after *SmHGPRTases* knockdown. Despite the oocytes maturation did not show differences among the groups, a significant reduction of 36% in ovary area was observed in adult females knocked-down for all *SmHGPRTases* compared with control groups (Figure 12 A). In Figure 12 B-D are demonstrate confocal images of the structural changes due to *SmHGPRTases* knockdown. No alterations were observed in male adult worms.

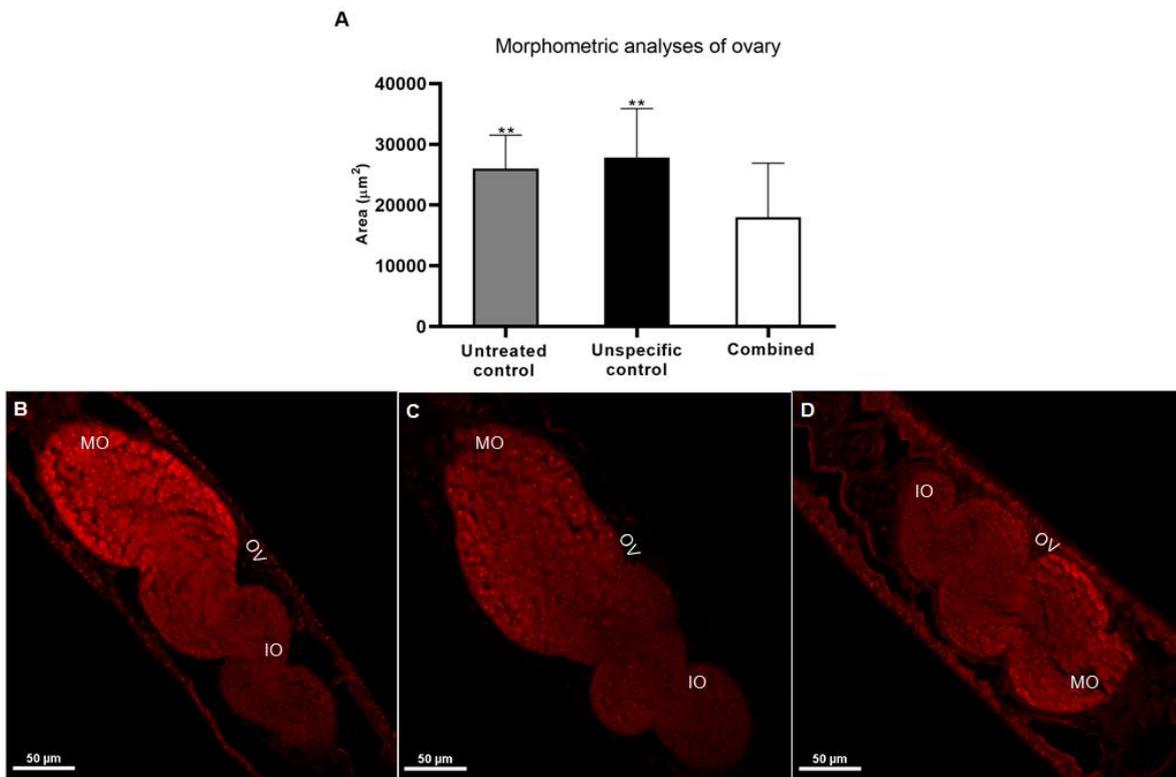


Figure 12. Female adult worms recovered 42 days after *SmHGPRTases* schistosomula knockdown and subsequent injection into mice. A: Bars represent ovary area from adult female worm comparing the untreated control (grey) and unspecific control (black) with the combination of the three *SmHGPRTase*-dsRNA (combined group). B-D: Confocal images demonstrating recovered worms from the untreated control group (B), unspecific control group (C) and the combined group (D). MO: mature oocyte, IO: immature oocyte, OV: Ovary. Scale bars, 50µm. Above the bars are represented the standard error of the mean of three replicates. Statistical analysis was performed using unpaired t test (** $p \leq 0.01$).

SmPAI-RBP1* knockdown alters male adult worm tegument morphology *in vivo

SmPAI-RBP1 was also used to study its function in the infection establishment. Any alteration on number and in the maturation eggs were observed, as well as the number of recovered worms after perfusion. However, *SmPAI-RBP1* knocked-down parasites inoculated in mice and recovered after 42 days presented morphological changes characterized by a significant reduction on tubercles height (40%) (Figure 13 A). Structural changes in the tegument are evidenced in confocal images when recovered worms from the control groups (Figure 13 B and C) are compared with worms recovered from the *SmPAI-RBP1* group (Figure 13 D). No alteration was observed in female adult worms.

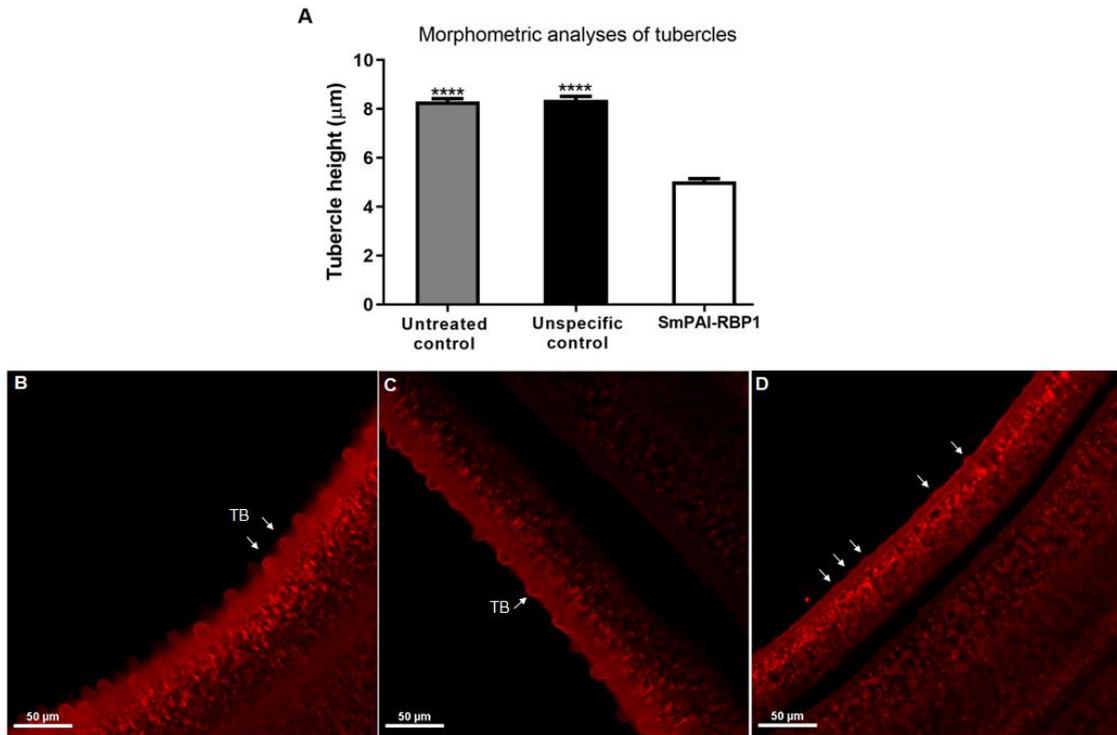


Figure 13. Male adult worms recovered 42 days after *SmPAI-RBP1* schistosomula knockdown and subsequent injection into mice. A: Bars represent tubercles height from adult male worm comparing the untreated control (grey) and unspecific control (black) with the group treated with SmPAI-RBP1-dsRNA. B-D: Confocal image demonstrating recovered worms from the untreated control group (B), unspecific control group (C) and SmPAI-RBP1 group (D). TB: tubercles. White arrows indicate the normal tubercles in B and C and its reduction in D. Scale bars, 50µm. Above the bars are represented the standard error of the mean of two replicates. Statistical analysis was performed using unpaired t test (**** p <0.0001).

Discussion

Functional studies have demonstrated that SmJNK is important for *Schistosoma mansoni* infection establishment in the mammalian host. This protein seems to be involved in the tegument integrity maintenance in male adult worms and the maturation of vitelline organs in female adult worms (ANDRADE; MOURÃO; GERALDO; COELHO *et al.*, 2014). Which corroborates the finding that SmJNK might be related to egg production *in vitro* (GAVA; TAVARES; FALCONE; OLIVEIRA *et al.*, 2019). Transcriptomic analysis of SmJNK knocked-down schistosomula demonstrated that this MAP kinase regulates different genes, among those, genes involved in the purine nucleotide metabolism, genes coding for nucleic acid binding proteins and proteins involved in the phagosome and spliceosome pathways (GAVA; TAVARES; FALCONE; OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Another protein that has been extensively studied in *S. mansoni* is the Smp38 MAP kinase. Previous studies showed that Smp38 plays an important role in the development of reproductive structures, the antioxidant defense, and egg maturation in this parasite (AVELAR; GAVA; NEVES; SILVA *et al.*, 2019). In addition, studies have shown that Smp38 is essential in the regulation of miracidia ciliary movement and the early post-embryonic parasite development (RESSURREIÇÃO; ROLLINSON; EMERY; WALKER,

2011a; b). The transcriptome of Smp38 knocked-down schistosomula showed that Smp38 regulates signaling pathways essential for the establishment of parasite homeostasis, like genes coding for proteins related to the structural composition of ribosomes, spliceosomes, and cytoskeleton, besides genes involved in the purine and pyrimidine metabolism pathways (AVELAR; GAVA; NEVES; SILVA *et al.*, 2019).

Analyzing Smp38 and SmJNK protein structure (KELLEY; MEZULIS; YATES; WASS *et al.*, 2015) were observed approximately 60% of similarity with their respective human orthologs. The identity is even greater when we compare the domains sequence. Accordingly, it would be interesting to explore parasite genes, regulated by these MAPK kinase pathways, that differ from the human orthologs, since several studies have proved the importance of Smp38 and SmJNK for *S. mansoni* development. Thus, we seek to better understand whether the existence of genes, which may be responsible for the phenotypic alterations observed in knockdown parasites. Trying to answer this question, we aim to investigate genes commonly regulated by these pathways, considering that it has been shown the SmJNK and Smp38 pathways have an overlap, in which both kinases seems to regulate the expression of a large set of genes, among those are the *SmHGPRTase 1* (Smp38 pathway) and *SmPAI-RBP1* (Smp38 and SmJNK pathway) (AVELAR; GAVA; NEVES; SILVA *et al.*, 2019; GAVA; TAVARES; FALCONE; OLIVEIRA *et al.*, 2019). In this study, we sought to confirm and understand the biological functions in the parasite development of genes that are regulated by those two kinases.

Different from their mammalian hosts, schistosomes lack the *de novo* purine biosynthesis and depend on the salvage pathway for their purine requirements. One of the parasite's advantages in using the salvage pathway is the fact that the *de novo* biosynthesis requires a large amount of energy to synthesize puric bases. However, it also implies that schistosomes present a great dependence on an external supply of preformed puric bases (SENFT; CRABTREE, 1977; 1983). For this reason, the salvage pathway has been raised as an interesting target for the development of new specific drugs to support schistosomiasis treatment (CRAIG; MCKERROW; NEWPORT; WANG, 1988; SENFT; CRABTREE, 1983; YUAN; CRAIG; MCKERROW; WANG, 1992). Furthermore, studies have already shown that several purine analogs inhibit enzymes of the salvage pathway (ROSS; JAFFE, 1972; SENFT; CRABTREE, 1977). Tubercidin is one of those and causes the separation of *S. mansoni* couples, loss of suction capacity of the ventral suction cup, alteration of the muscular activity pattern, and egg-laying inhibition (ROSS; JAFFE, 1972). Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRTase), one of the targets of this study, is an essential enzyme in the purine salvage pathway.

Constituents of the coagulation pathway are also widely studied due their important roles in the parasite biology within the host and as therapeutic targets. The parasite capacity of preventing stable blood clots in the vascular microenvironment, allows parasite migration and promotes survival *in vivo* (DA'DARA; SKELLY, 2014; FIGUEIREDO; DA'DARA; OLIVEIRA; SKELLY, 2015; PIROVICH; DA'DARA; SKELLY, 2020). Fibrinolysis is the resulting of interactions among plasminogen activators and inhibitors constituting the enzymatic cascade leading to the degradation or not of fibrin (MIYASHITA; WENZEL; HEIDEN, 1988). PAI-1 is an important protein of the coagulation pathway and is secreted as

an active antiprotease, but it rapidly converts to an inactive latent form, which can be reactivated by exposure to chaotropic agents or phospholipids (KAPLAN; AUSTEN, 1972; SEIFFERT; MIMURO; SCHLEEF; LOSKUTOFF, 1990). Its functions is to inhibit the plasminogen activators, tissue plasminogen activator (tPA) and urokinase (uPA) activity, and control the fibrinolysis. A RNA-binding protein, PAI-RBP1, was recently discovered in rats and its function can be related to stabilizing PAI-1 mRNA. Previously studies had shown that the PAI-1 mRNA binding site is a cyclic nucleotide-responsive sequence, and binding activity of PAI-RBP1 may be influenced by its phosphorylation state (HEATON; DLAKIC; DLAKIC; GELEHRTER, 2001). The control of mRNA stability is an important component of the gene expression regulation, thus, SmPAI-RBP1 was also chose as a target of our study.

Since transcriptomic data are a snapshot of transcription in a certain moment, generating a general insight of biological data that requires posterior refinement, first, we have used specific molecules predicted to bind to Smp38 and SmJNK ATP-binding site to confirm the regulation of *SmHGPRTase* and *SmPAI-RBP1*. We observed significant changes in the parasite phenotype indicating that they can be promising protein inhibitors, even more by the fact that these kinases are unique members of their families in *S. mansoni*. Besides that, we confirm that SmJNK and Smp38 seem to regulate the expression of SmPAI-RBP1 and/or SmHPRTase 1. In addition, we investigated whether Smp38 MAPK also regulates the expression of other *SmHGPRTase* family members. We observed that, although *SmHGPRTase 3* was not detected as differentially expressed using the transcriptome data, the Smp38 inhibition seems to negatively regulate the expression of this gene. Looking at the parasite's genome organization, we noticed that the five genes encoding SmHGPRTases are located on chromosome IV, with *SmHGPRTases 1* and *3*, that appear to be regulated by Smp38 MAPK, are proximally located. On the other hand, the genes encoding SmHGPRTases 2, 4, and 5 which are not regulated by this signaling pathway are also closely distributed evidencing in tandem duplications as already described by Wang et al (WANG; ZHU; CAI, 2017). The gene duplication analysis revealed that genes derived from proximal duplications, as we observed for SmHGPRTases 2, 4, and 5, diverge less in gene structure and expression levels than the dispersed duplicated genes. The retention of duplicated genes is a mechanism described to contribute to the expansion of gene families associated with pathogenesis and consequent adaptations to parasitism for *S. mansoni* (WANG; ZHU; CAI, 2017).

Other evidence that *SmHGPRTases* and *SmPAI-RBP1* are regulated by Smp38 and SmJNK MAPK pathways is that previously studies showed that adult worms recovered 44 days after *Smp38* knockdown and subsequent injection of schistosomula into mice showed a reduction of 32.5% in ovary area in female worms and in male worms a reduction of 15% in the tubercles height (AVELAR; GAVA; NEVES; SILVA *et al.*, 2019). Furthermore, in SmJNK knocked-down parasites also recovered from mice was observed a damage tegument of male adult worms in which the tubercles were also reduced (ANDRADE; MOURÃO; GERALDO; COELHO *et al.*, 2014). Our results demonstrated that female adult worms recovered after 42 days of schistosomula *SmHGPRTases* knocked-down and subsequent inoculation of parasites into mice also presented a reduction of 36% in the ovary area.

Interestingly, male adult worm knocked-down for *SmPAI-RBP1* also recovered from mice, showed a reduction of 40% in the tubercles height.

In silico analysis showed that SmHGPRTases present important differences in protein structures and domain sequences when compared to their respective human orthologs. This data reaffirms other studies whereupon schistosomal HGPRTase structure has been compared with the human HGPRTase by circular dichroism. Significant differences were observed in thermostability and in the chains. The schistosomal protein contains 27% α -helix and 30% β -sheet, whereas the human enzyme contains 21% α -helix and 53% β -sheet (YUAN; WU; CRAIG; LIU *et al.*, 1993). In addition, the steady-state kinetics mechanism was determined and suggested that the design of a highly specific SmHGPRTase inhibitor, that binds exclusively to the enzyme-purine nucleotide binary complex, may be possible (YUAN; CRAIG; MCKERROW; WANG, 1992). In the other hand, a recently study compare the isothermal titration and calorimetry of SmHGPRTase 1, 2 and 3 and they observe that K_M values for schistosomal HGPRTase are very similar to human HGPRTase indicating that SmHGPRTase alone is unlikely to be an efficient therapeutic target (ROMANELLO; ZERAIK; DE FREITAS FERNANDES; TORINI *et al.*, 2019).

Our data had shown that *SmHGPRTase 1* and *SmHGPRTase 2/4/5* genes exhibited the highest expression levels in the *Schistosoma* sporocyst stage. In fact, in the snail host, extensive parasite asexual reproduction takes place, and several generations of multiplying sporocysts develop (MALDONADO; ACOSTA MATIENZO, 1947), which would demand energy and nucleotides for DNA synthesis, supporting the greater expression of SmHGPRTases in this stage. Corroborating these data, the analysis of the *in vivo* parasite transcriptome three days post-infection in *Biomphalaria pfeifferi*, demonstrated an up-regulation of genes related to the purine salvage and nucleotide biosynthesis pathways (BUDDENBORG; KAMEL; HANELT; BU *et al.*, 2019).

SmHGPRTases also show high expression in female adult worms. Previous studies suggest that these genes may be involved in the sexual maturation (ROMANELLO; ZERAIK; DE FREITAS FERNANDES; TORINI *et al.*, 2019). Also, whole mount in situ hybridization experiments shows that *SmHGPRT 2* is present along the body of male and female worms, possibly indicating a sexual specialization role of this enzyme (ROMANELLO; ZERAIK; DE FREITAS FERNANDES; TORINI *et al.*, 2019). Genes that coding SmHGPRTases is also found up-regulated in parasites 28 days after infection in the mammalian host, suggesting a possible role for this signaling pathway in the synthesis of compounds necessary for egg production (BUDDENBORG; KAMEL; HANELT; BU *et al.*, 2019). Our results corroborate with these findings, whereas we observed a reduction in the ovary area and a higher number of immature eggs in the intestine of mice infected with schistosomula knocked-down for all *SmHGPRTases* genes. In addition, female adult worms knocked-down for all *SmHGPRTases* reduced their movement eight days after dsRNA exposure *in vitro*.

Small interfering RNAs (siRNA) targeting *SmHGPRTase 1* have already been used to interrogate this enzyme roles during mice infection. In this study, siRNA was inoculated in the tail of *Schistosoma* infected mice, resulting in 27% reduction in worm burden after a 60% reduction on the transcript levels (PEREIRA; PASCOAL; MARCHESINI; MAIA *et al.*, 2008). Our results reinforce the importance to knockdown all genes of this enzyme family,

since one gene can perform the function of the others. This mechanism is evident by the higher mortality levels found in sporocyst, when all the genes are knocked-down simultaneously. Our results also suggested that SmHGPRase 1 may play more relevant functions than the others members of the family for the sporocyst viability, since the mortality rate is also high when we knocked-down the parasites only for this gene. However, it is important to point that *SmHGPRase 3* gene did not have a significant reduction in the transcript levels in sporocysts, thus did not present significant phenotypic alterations.

The cycle of *S. mansoni* is maintained when parasite eggs are eliminated with infected human feces. When in contact with water and, under appropriate conditions, occurs the miracidium hatching. The miracidium can swim and penetrate in specific snail intermediate hosts (*Biomphalaria spp.*) After penetrating, miracidia multiply asexually in multicellular sporocysts (HAN; BRINDLEY; WANG; CHEN, 2009; PETERSON; HOKKE; DEELDER; YOSHINO, 2009). In our study, results suggest that SmHGPRases activity is related to development of ovary in adult female worm, egg maturation and sporocyst viability. In this way, it is possible that SmHGPRases are also involved in the development of miracidium and, consequently, interfere in the sporocyst development. Despite the existence of this evidence, further studies should be done in the miracidia stage.

Since *S. mansoni* parasites can live for years within human blood vessels, it is known that some parasite genes are responsible for the worm viability and infection establishment. Several mechanisms have been proposed to explain how schistosomes might inhibit blood clotting, including the exchange and mimicry of molecules (DA'DARA; SKELLY, 2014; FIGUEIREDO; DA'DARA; OLIVEIRA; SKELLY, 2015; FIGUERA; GÓMEZ-ARREAZA; AVILÁN, 2013; MEBIUS; VAN GENDEREN; URBANUS; TIELENS *et al.*, 2013; PIROVICH; DA'DARA; SKELLY, 2020). Studies demonstrated the interaction of different proteins in the worm tegument with the host's coagulation pathway. In male *Schistosoma bovis*, the host plasminogen is capable to bind to the worm tegument surface due to an interaction with several proteins, mainly enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and actin. In addition, these proteins are able to enhance the plasmin generate by t-PA (FIGUEIREDO; DA'DARA; OLIVEIRA; SKELLY, 2015; RAMAJO-HERNÁNDEZ; PÉREZ-SÁNCHEZ; RAMAJO-MARTÍN; OLEAGA, 2007). Thus, recruiting host plasminogen to the tegument surface and generating plasmin, the worm is able to degrade the blood clots around them in the host's vascular system, allowing them freely move and feed *in vivo* (PIROVICH; DA'DARA; SKELLY, 2020; RAMAJO-HERNÁNDEZ; PÉREZ-SÁNCHEZ; RAMAJO-MARTÍN; OLEAGA, 2007). Our results showed that *SmPAI-RBP1* knocked-down reduced the tubercles in 40% in male adult worms recovered from mice after 42 days of infection with schistosomula. Tubercles perform different roles for *Schistosoma* survival including increase the contact surface with the host blood to uptake of nutrients and help to promote the adherence to the walls of the host blood vessels (EL-SHABASY; REDA; ABDEEN; SAID *et al.*, 2015). Thus, reduced tubercles may affect the *Schistosoma* viability and survival and probably SmPAI-RBP1 may be involved in the formation of these structures.

Little information about SmPAI-RBP1 is available on the Protein Data Bank (PDB), in this way it was not possible to perform their modeling. However, alignments of its domain sequence also showed important differences when compared to their respective human

orthologs. In addition, the *SmPAI-RBP1* expression data shows that this gene is higher expressed in sporocysts and these results confirm those obtained by the meta-analysis of published RNAseq data (ZHIGANG LU 2018). One possible explanation for it is that the use of factors from coagulation pathway could allow easier migration of sporocysts from the penetration site to the digestive glands through mollusk tissues (MALDONADO; ACOSTA MATIENZO, 1947).

In summary, here we show that SmJNK pathway regulates the expression of *SmPAI-RBP1* and Smp38 pathway regulates the expression of *SmHGPRTase 1*, *SmHGPRTase 3* and *SmPAI-RBP1*. *SmPAI-RBP1* may be involved in sporocyst and schistosomula development, since phenotype alterations, like round body and dark mid-region, were observed. In addition, this gene can also be related with damage in the adult male tegument in which the tubercles were reduced. Our results also suggest that SmHGPRTases activity are important in schistosomula development and that SmHGPRTase 1 and SmHGPRTase 2/4/5 are important to sporocyst viability and development. Phenotypes alterations, like parasites with dark mid-region, were more evident when all isoforms were knocked down simultaneously, implying that one SmHGPRTase may exercise the function of the other. SmHGPRTases also affects the parasite reproduction, demonstrated by the reduced ovary area in females and a significant increase in the number of immature eggs *in vivo* and female movement *in vitro*. In conclusion, this study is a step forward in the elucidation of parasite biology and the functional roles of *SmHGPRTase* and *SmPAI-RBP1* genes in the *S. mansoni* life cycle.

References

1. Organisation, W.a.H., *Weekly epidemiological record:Schistosomiasis and soiltransmitted helminthiasis: numbers of people treated in 2017*. 2018, Wkly. Epidemiol.Rec. p. 445–452.
2. Pearce, E.J. and A. Sher, *Mechanisms of immune evasion in schistosomiasis*.Contrib Microbiol Immunol, 1987. **8**: p. 219-32.
3. Doenhoff, M.J., D. Cioli, and J. Utzinger, *Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis*.CurrOpin Infect Dis, 2008. **21**(6): p. 659-67.
4. Greenberg, R.M., *New approaches for understanding mechanisms of drug resistance in schistosomes*. Parasitology, 2013. **140**(12): p. 1534-46.
5. Botros, S.S. and J.L. Bennett, *Praziquantel resistance*. Expert Opin Drug Discov, 2007. **2**(s1): p. S35-40.
6. Cuesta-Astroz, Y., et al., *Analysis of Predicted Host-Parasite Interactomes Reveals Commonalities and Specificities Related to Parasitic Lifestyle and Tissues Tropism*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 212.
7. Hanks, S.K., A.M. Quinn, and T. Hunter, *The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains*. Science, 1988. **241**(4861): p. 42-52.
8. Andrade, L.F., et al., *Eukaryotic protein kinases (ePKs) of the helminth parasite Schistosoma mansoni*. BMC Genomics, 2011. **12**: p. 215.
9. Boyle, S.N. and A.J. Koleske, *Dissecting kinase signaling pathways*. Drug Discov Today, 2007. **12**(17-18): p. 717-24.
10. Eglén, R.M. and T. Reisine, *The current status of drug discovery against the human kinome*. Assay Drug Dev Technol, 2009. **7**(1): p. 22-43.
11. Avelar, L.D.G.A., et al., *Smp38 MAP Kinase Regulation in*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 21.

12. Gava, S.G., et al., *Profiling Transcriptional Regulation and Functional Roles of*. Front Genet, 2019. **10**: p. 1036.
13. Nutter, F.H., J.L. Haylor, and A. Khwaja, *Inhibiting ERK Activation with CI-1040 Leads to Compensatory Upregulation of Alternate MAPKs and Plasminogen Activator Inhibitor-1 following Subtotal Nephrectomy with No Impact on Kidney Fibrosis*. PLoS One, 2015. **10**(9): p. e0137321.
14. Miyashita, C., E. Wenzel, and M. Heiden, *Plasminogen: a brief introduction into its biochemistry and function*. Haemostasis, 1988. **18 Suppl 1**: p. 7-13.
15. Heaton, J.H., et al., *Identification and cDNA cloning of a novel RNA-binding protein that interacts with the cyclic nucleotide-responsive sequence in the Type-1 plasminogen activator inhibitor mRNA*. J Biol Chem, 2001. **276**(5): p. 3341-7.
16. Sun, H., *The interaction between pathogens and the host coagulation system*. Physiology (Bethesda), 2006. **21**: p. 281-8.
17. Figueiredo, B.C., et al., *Schistosomes Enhance Plasminogen Activation: The Role of Tegumental Enolase*. PLoS Pathog, 2015. **11**(12): p. e1005335.
18. Senft, A.W. and G.W. Crabtree, *Pathways of nucleotide metabolism in Schistosoma mansoni--VII. Inhibition of adenine and guanine nucleotide synthesis by purine analogs in intact worms*. Biochem Pharmacol, 1977. **26**(20): p. 1847-55.
19. PELLEGRINO, J. and A.F. SIQUEIRA, *[A perfusion technic for recovery of Schistosoma mansoni from experimentally infected guinea pigs]*. Rev Bras Malariol Doencas Trop, 1956. **8**(4): p. 589-97.
20. Mourão, M.M., et al., *Phenotypic screen of early-developing larvae of the blood fluke, schistosomamansoni, using RNA interference*. PLoS Negl Trop Dis, 2009. **3**(8): p. e502.
21. Milligan, J.N. and E.R. Jolly, *Cercarial transformation and in vitro cultivation of Schistosoma mansoni schistosomules*. J Vis Exp, 2011(54).
22. Waterhouse, A.M., et al., *Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench*. Bioinformatics, 2009. **25**(9): p. 1189-91.
23. Kelley, L.A., et al., *The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis*. Nat Protoc, 2015. **10**(6): p. 845-58.
24. Pettersen, E.F., et al., *UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis*. J Comput Chem, 2004. **25**(13): p. 1605-12.
25. Andrade, L.F., et al., *Regulation of Schistosoma mansoni development and reproduction by the mitogen-activated protein kinase signaling pathway*. PLoS Negl Trop Dis, 2014. **8**(6): p. e2949.
26. Ndegwa, D., G. Krautz-Peterson, and P.J. Skelly, *Protocols for gene silencing in schistosomes*. Exp Parasitol, 2007. **117**(3): p. 284-91.
27. Marcellino, C., et al., *WormAssay: a novel computer application for whole-plate motion-based screening of macroscopic parasites*. PLoS Negl Trop Dis, 2012. **6**(1): p. e1494.
28. Schmittgen, T.D., *Real-time quantitative PCR*. Methods, 2001. **25**(4): p. 383-5.
29. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
30. Mati, V.L. and A.L. Melo, *Current applications of oogram methodology in experimental schistosomiasis; fecundity of female Schistosoma mansoni and egg release in the intestine of AKR/J mice following immunomodulatory treatment with pentoxifylline*. J Helminthol, 2013. **87**(1): p. 115-24.
31. El-Gebali, S., et al., *The Pfam protein families database in 2019*. Nucleic Acids Res, 2019. **47**(D1): p. D427-D432.
32. Huntington, J.A., *Serpin structure, function and dysfunction*. J Thromb Haemost, 2011. **9 Suppl 1**: p. 26-34.
33. Takeda, A., et al., *Squamous cell carcinoma antigen is a potent inhibitor of cysteine proteinase cathepsin L*. FEBS Lett, 1995. **359**(1): p. 78-80.

34. Gonçalves, K.e.A., et al., *Evidence for the association of the human regulatory protein Ki-1/57 with the translational machinery*. FEBS Lett, 2011. **585**(16): p. 2556-60.
35. Ressurreição, M., et al., *A role for p38 mitogen-activated protein kinase in early post-embryonic development of Schistosoma mansoni*. Mol BiochemParasitol, 2011. **180**(1): p. 51-5.
36. Ressurreição, M., et al., *A role for p38 MAPK in the regulation of ciliary motion in a eukaryote*. BMC Cell Biol, 2011. **12**: p. 6.
37. Senft, A.W. and G.W. Crabtree, *Purine metabolism in the schistosomes: potential targets for chemotherapy*. PharmacolTher, 1983. **20**(3): p. 341-56.
38. Yuan, L., et al., *Steady-state kinetics of the schistosomal hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*. Biochemistry, 1992. **31**(3): p. 806-10.
39. Craig, S.P., et al., *Analysis of cDNA encoding the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRase) of Schistosoma mansoni; a putative target for chemotherapy*. Nucleic Acids Res, 1988. **16**(14B): p. 7087-101.
40. Ross, A.F. and J.J. Jaffe, *Effects of tubercidin and its ribonucleotides on various metabolic pathways in Schistosoma mansoni*. BiochemPharmacol, 1972. **21**(22): p. 3059-69.
41. Da'dara, A.A. and P.J. Skelly, *Schistosomes versus platelets*. Thromb Res, 2014. **134**(6): p. 1176-81.
42. Pirovich, D.B., A.A. Da'dara, and P.J. Skelly, *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase enhances formation of the blood-clot lysis protein plasmin*. Biol Open, 2020. **9**(3).
43. Kaplan, A.P. and K.F. Austen, *The fibrinolytic pathway of human plasma. Isolation and characterization of the plasminogen proactivator*. J Exp Med, 1972. **136**(6): p. 1378-93.
44. Seiffert, D., et al., *Interactions between type 1 plasminogen activator inhibitor, extracellular matrix and vitronectin*. Cell Differ Dev, 1990. **32**(3): p. 287-92.
45. Wang, S., X.Q. Zhu, and X. Cai, *Gene Duplication Analysis Reveals No Ancient Whole Genome Duplication but Extensive Small-Scale Duplications during Genome Evolution and Adaptation of*. Front Cell Infect Microbiol, 2017. **7**: p. 412.
46. Yuan, L., et al., *Comparing the human and schistosomal hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferases by circular dichroism*. BiochimBiophys Acta, 1993. **1162**(1-2): p. 10-6.
47. Romanello, L., et al., *In vitro and in vivo characterization of the multiple isoforms of Schistosoma mansoni hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferases*. Mol BiochemParasitol, 2019. **229**: p. 24-34.
48. MALDONADO, J.F. and J. ACOSTA MATIENZO, *The development of Schistosoma mansoni in the snail intermediate host, Australorbis glabratus*. PR J Public Health Trop Med, 1947. **22**(4): p. 331-73, Spanish transl, 374-404.
49. Buddenborg, S.K., et al., *The in vivo transcriptome of Schistosoma mansoni in the prominent vector species Biomphalaria pfeifferi with supporting observations from Biomphalaria glabrata*. PLoSNegl Trop Dis, 2019. **13**(9): p. e0007013.
50. Pereira, T.C., et al., *Schistosoma mansoni: evaluation of an RNAi-based treatment targeting HGPRase gene*. Exp Parasitol, 2008. **118**(4): p. 619-23.
51. Han, Z.G., et al., *Schistosoma genomics: new perspectives on schistosome biology and host-parasite interaction*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2009. **10**: p. 211-40.
52. Peterson, N.A., et al., *Glycotope analysis in miracidia and primary sporocysts of Schistosoma mansoni: differential expression during the miracidium-to-sporocyst transformation*. Int J Parasitol, 2009. **39**(12): p. 1331-44.
53. Figuera, L., A. Gómez-Arreaza, and L. Avilán, *Parasitism in optima forma: exploiting the host fibrinolytic system for invasion*. Acta Trop, 2013. **128**(1): p. 116-23.
54. Mebius, M.M., et al., *Interference with the host haemostatic system by schistosomes*. PLoSPathog, 2013. **9**(12): p. e1003781.

55. Ramajo-Hernández, A., et al., *Schistosoma bovis: plasminogen binding in adults and the identification of plasminogen-binding proteins from the worm tegument*. *Exp Parasitol*, 2007. **115**(1): p. 83-91.
56. El-Shabasy, E.A., et al., *Transmission electron microscopic observations on ultrastructural alterations in Schistosoma mansoni adult worms recovered from C57BL/6 mice treated with radiation-attenuated vaccine and/or praziquantel in addition to passive immunization with normal and vaccinated rabbit sera against infection*. *Parasitol Res*, 2015. **114**(4): p. 1563-80.
57. Zhigang Lu , M.B., *Meta-analysis of RNA-seq studies reveals genes responsible for life stage-dominant functions in Schistosoma mansoni*. bioRxiv 2018.

Apêndice 3 – Artigo em fase de escrita

Docking-based virtual screening enables prioritizing Protein Kinases potential inhibitors with in vitro phenotypic activity against *Schistosoma mansoni*.

Naiara Clemente Tavares¹, Izabella Cristina Andrade Batista^{1,2}, Tom Armstrong³, Sandra Grossi Gava¹, Bernardo Pereira Moreira³, Franco Falcone³, Marina de Moraes Mourão¹

¹Helmintologia e Malacologia Médica, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Brazil

²Imunologia Celular e Molecular Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Brazil

³School of Pharmacy, Division of Molecular Therapeutics and Formulation, University of Nottingham, Nottingham, UK.

10. ANEXOS

Anexo 1 – Aprovação do uso de camundongos pelo CEUA - FIOCRUZ



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



CEUA
FIOCRUZ
Comissão de Ética
no Uso de Animais

LICENÇA

LW-12/16

Certificamos que o protocolo (P-22/15-3), intitulado "Triagem e validação de genes alvos para o desenvolvimento de novas drogas contra esquistossomose", sob a responsabilidade de MARINA DE MORAES MOURAO, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 02/05/2020 e inclui o uso total de :

Mesocricetus auratus

- 279 Fêmeas de Golden, Idade: 6 Semana(s), Peso: 120,000 Grama(s).

Rio de Janeiro, 2 de maio de

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA

Anexo 2 - Aprovação do uso de hamster pelo CEUA - FIOCRUZ



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-Presidência de Pesquisa e
Coleções Biológicas - VPPCB



Comissão de Ética
no Uso de Animais

LICENÇA

LM-5/18

Certificamos que o protocolo (P-29/17.2), intitulado "**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E VALIDAÇÃO DE GENES DO PARASITO *Schistosoma mansoni***", sob a responsabilidade de **MARIANA DE MORAES MOURÃO** atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 16/04/2022 e inclui o uso total de:

Mus musculus

- 1.400 fêmeas *Swiss webster*, idade: 4 semanas, peso: 20 gramas;

Rio de Janeiro, 08 de maio de 2018.


Etelcia Moraes Molinaro
Vice-Coordenadora da CEUA/FIOCRUZ

Etelcia M. Molinaro
Vice - Coordenadora
CEUA/FIOCRUZ
SIAPE 0463096