

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

ESTUDO FUNCIONAL DA PROTEÍNA QUINASE JNK DE *Schistosoma mansoni*  
ATRAVÉS DE EXPRESSÃO HETERÓLOGA NO ORGANISMO MODELO  
*Caenorhabditis elegans*

por

Sandra Grossi Gava

Belo Horizonte

Abril / 2013

Dissertação MBCM-CPqRR

S.G. GAVA

2013

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

ESTUDO FUNCIONAL DA PROTEÍNA QUINASE JNK DE *Schistosoma mansoni*  
ATRAVÉS DE EXPRESSÃO HETERÓLOGA NO ORGANISMO MODELO  
*Caenorhabditis elegans*

por

Sandra Grossi Gava

Dissertação apresentada com vistas à  
obtenção do título de Mestre em Ciências na  
área de concentração Biologia Celular e  
Molecular.

Orientação: Dr. Guilherme Corrêa Oliveira

Coorientação: Dra. Riva de Paula Oliveira

Belo Horizonte

Abril / 2013

Catálogo-na-fonte  
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do CPqRR  
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

G279e Gava, Sandra Grossi.  
2013

Estudo funcional da proteína quinase JNK de *Schistosoma mansoni* através de expressão heteróloga no organismo modelo *Caenorhabditis elegans* / Sandra Grossi Gava. – Belo Horizonte, 2013.

XVII, 66 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 74 - 83

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Esquistossomose mansoni/genética 2. *Schistosoma mansoni*/parasitologia 3. Expressão Gênica/genética I. Título. II. Oliveira, Guilherme Corrêa (Orientação). III. Oliveira, Riva de Paula (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.963

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

ESTUDO FUNCIONAL DA PROTEÍNA QUINASE JNK DE *Schistosoma mansoni*  
ATRAVÉS DE EXPRESSÃO HETERÓLOGA NO ORGANISMO MODELO  
*Caenorhabditis elegans*

por

Sandra Grossi Gava

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Guilherme Corrêa Oliveira (Presidente)

Prof. Dra. Roberta Lima Caldeira

Prof. Dra. Héliida Monteiro de Andrade

Suplente: Carlos Eduardo Calzavara Silva

Dissertação defendida e aprovada em: 18/04/2013

*“Daqui a alguns anos você estará mais arrependido pelas coisas que não fez do que pelas que fez. Então, solte suas amarras. Afaste-se do porto seguro. Agarre o vento em suas velas. Explore. Sonhe. Descubra.”*

*Mark Twain*

*Dedico aos meus pais, João e Vilma,  
e ao meu irmão Pedrinho.*

## Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus pelas pessoas especiais que sempre colocou em meu caminho, sem elas eu não chegaria até aqui.

Ao meu orientador, Dr. Guilherme Corrêa de Oliveira agradeço pela oportunidade e orientação durante a execução deste trabalho.

À minha coorientadora, Dra. Riva de Paula Oliveira, pela orientação, incentivo e atenção, por todas as horas dedicadas às microinjeções e por tudo o que me ensinou sobre *C. elegans*.

À Dra. Laila Alves Nahum, pela orientação, conversas, conselhos. Obrigada por ter me proporcionado tanto aprendizado.

À Larissa por todo apoio e amizade que tem me dedicado e por tudo que tem contribuído para minha formação.

À Dra. Marina de Moraes Mourão e Dra. Rosiane Pereira pelo incentivo e orientação durante os experimentos.

Ao Dr. Luciano Moreira pela disponibilização do microinjeter e dependências do Laboratório de Malária.

À Dra. Ângela Volpini, Eliane Moreira e as secretárias, Mariana, Mara e Márcia por gerenciarem com competência os projetos.

À Joyce, Rosana e Kênia pela organização do laboratório.

À minha amiga Nayara, obrigada pela presença constante e amizade verdadeira.

À Lívia, Paola, Núbia, Fernand Ludolf, Maíra, Luiza, Fernanda Sales, Juliana, Mercedes, Anna Christina e Flávio, por me receberem tão bem, por todo incentivo e torcida. A todos os membros do Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular e CEBio: Yesid, Luciana, Bárbara, Naiara, Assmaa, Larissa Jardim, Rafael Assis, Rafael Palhares, Silvane, Juvana, Douglas, Laila Andrade, Ana Paula, Policarpo, Fabiano, Sara, Laura, Anderson, Fausto, Aline, Izinara, Fernanda Badotti, agradeço pelos ensinamentos e bons momentos compartilhados.

À Elisângela e Mariana e à Plataforma PDTIS de sequenciamento pelo apoio técnico.

À Plataforma de PCR em Tempo Real, através da Dra. Isabela Cerávolo e da Dra. Fernanda Nogueira, pelos serviços prestados.

Ao Laboratório de Malacologia pelo fornecimento dos parasitos.

Ao Centro de Pesquisa René Rachou, na pessoa de sua diretora Zélia Maria Profeta da Luz, pela formação científica e profissional, pelo financiamento do trabalho e pela disponibilidade de espaço para execução do mesmo.

À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta dissertação e pela catalogação.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem prontamente o nosso convite.

À Coordenadoria de Pós-graduação do Centro de Pesquisa René Rachou pelo apoio durante o curso.

Ao meu pai, minha mãe e ao Pedrinho, obrigada por confiarem em mim e tornarem mais esse sonho possível, obrigada por me apoiarem, me dando força em todos os momentos, apesar da distância.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.



Ao CNPq pela bolsa concedida.

## Sumário

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>XII</b>
<b>LISTA DE QUADROS E TABELAS</b> .....	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b> .....	<b>XIV</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>XVI</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XVII</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>1.1 <i>Schistosoma mansoni</i> e esquistossomose</b> .....	<b>18</b>
1.1.1 Aspectos gerais e epidemiológicos .....	18
1.1.2 O parasito <i>S. mansoni</i> .....	21
1.1.3 O genoma e o proteoma de <i>S. mansoni</i> .....	22
<b>1.2 Proteína quinases</b> .....	<b>24</b>
1.2.1 Classificação das proteína quinases .....	24
1.2.2 Via de sinalização de MAP quinases .....	26
<b>1.3 Filogenômica</b> .....	<b>27</b>
<b>1.4 O organismo modelo <i>C. elegans</i></b> .....	<b>28</b>
1.4.1 O nematódeo <i>C. elegans</i> .....	28
1.4.2 Manipulação genética em <i>C. elegans</i> .....	30
1.4.3 O uso de <i>C. elegans</i> na análise funcional de genes .....	32
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>35</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>37</b>
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>37</b>
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>37</b>
<b>4 MÉTODOS</b> .....	<b>38</b>
<b>4.1 Seleção do gene alvo</b> .....	<b>38</b>
<b>4.2 Análise filogenética</b> .....	<b>38</b>
4.2.1 Seleção de potenciais homólogos.....	38
4.2.2 Alinhamento múltiplo de sequências.....	39
4.2.3 Reconstrução de árvores filogenéticas .....	39
<b>4.3 Crescimento e manutenção de <i>C. elegans</i></b> .....	<b>40</b>
<b>4.4 Extração de DNA genômico de <i>C. elegans</i></b> .....	<b>40</b>
<b>4.5 Extração de RNA total de <i>C. elegans</i> e <i>S. mansoni</i></b> .....	<b>41</b>
<b>4.6 Síntese de cDNA</b> .....	<b>42</b>
<b>4.7 Construção dos cassetes de expressão</b> .....	<b>42</b>
4.7.1 Desenho de iniciadores.....	42
4.7.2 Amplificação .....	43
4.7.3 Clonagens .....	44
4.7.4 Subclonagens .....	44
<b>4.8 Sincronização de <i>C. elegans</i> por lise alcalina</b> .....	<b>46</b>
<b>4.9 Transformação de <i>C. elegans</i></b> .....	<b>47</b>

4.10 Análise da expressão de JNK nas linhagens transgênicas – RT-qPCR.....	48
4.11 Ensaio de longevidade.....	50
5 RESULTADOS.....	51
5.1 Análise das relações evolutivas .....	51
5.2 Construção dos cassetes de expressão .....	55
5.3 Obtenção de linhagens transgênicas de <i>C. elegans</i> .....	59
5.4 Estudo dos níveis de transcrito de <i>jnk</i> nas linhagens transgênicas .....	60
5.5 Análise da longevidade das linhagens transgênicas.....	62
6 DISCUSSÃO .....	64
6.1 Análise da relações evolutivas .....	64
6.2 Superexpressão de JNK e longevidade de <i>C. elegans</i> .....	65
7 CONCLUSÕES .....	71
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	72
9 PERSPECTIVAS.....	73
10 REFERÊNCIAS.....	74

## Lista de figuras

Figura 1 – Distribuição global da esquistossomose. ....	18
Figura 2 – Distribuição da esquistossomose no Brasil. ....	20
Figura 3 – Ciclo biológico do <i>S. mansoni</i> . ....	21
Figura 4 – Ciclo de vida de <i>C. elegans</i> a 20 °C. ....	29
Figura 5 – Microinjeção na gônada de <i>C. elegans</i> . ....	31
Figura 6 - Construção dos cassetes de expressão. ....	46
Figura 7 – Movimento <i>roller</i> . ....	47
Figura 8- Distribuição das proteína quinases do grupo CMGC. ....	52
Figura 9 - Relações evolutivas entre proteína quinases do grupo CMGC de <i>S. mansoni</i> (Sm) e <i>H. sapiens</i> (Hs). ....	55
Figura 10 - Relações evolutivas entre proteína quinases JNK e p38 de diversos organismos. ....	55
Figura 11 - Produtos de PCR amplificados. ....	56
Figura 12 – PCR de colônia para confirmação de clonagens. ....	57
Figura 13 - Digestão para obtenção do plasmídeo recombinante contendo a região promotora e dos fragmentos das regiões codificantes. ....	58
Figura 14 – PCR de colônia para confirmação de subclonagens. ....	58
Figura 15 - Digestão para confirmação de subclonagens. ....	59
Figura 16 - Eficiência da reação de RT-qPCR. ....	61
Figura 17 – Curva de dissociação dos produtos amplificados por RT-qPCR. ....	61
Figura 18 – Níveis de transcritos de Ce_JNK-1 e Sm_JNK. ....	62
Figura 19 - Sobrevivência das linhagens transgênicas de <i>C. elegans</i> a 20 °C. ....	62

## Lista de quadros e tabelas

Quadro 1 - Lista de iniciadores utilizados nas ampliações do promotor de <i>jnk-1</i> e das CDS de Ce_JNK-1 e Sm_JNK. ....	42
Quadro 2 - Programa de termociclagem das reações de PCR. ....	44
Quadro 3 - Lista de iniciadores utilizados na RT-qPCR. ....	49
Tabela 1 – Classificação das proteína quinases. ....	26
Tabela 2 - Análise da longevidade das linhagens transgênicas de <i>C. elegans</i> . ....	63

## Lista de abreviaturas e símbolos

aLRT - *Approximate likelihood ratio test*  
Blast - *Basic Local Alignment Search Tool*  
CaCl<sub>2</sub> – Cloreto de cálcio  
cDNA – DNA complementar  
CDS – *Coding DNA sequence*  
C<sub>t</sub> – *Cycle threshold*  
dATP – desoxiadenosina trifosfato  
DNA – Ácido desoxirribonucléico  
dNTP – Deoxinucleosídeo trifosfato  
DTT – Ditioneitol  
EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético  
F – *Forward* (senso)  
g – Força centrífuga  
IPTG – Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo  
JNK - *c-jun N-terminal kinase*  
Kb – Kilobases  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – Fosfato de potássio monobásico  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – Fosfato de potássio dibásico  
M – Molar  
MAPK - *Mitogen-Activated Protein Kinases*  
Mb – Megabase  
ML - *Maximum Likelihood*; Máxima Verossimilhança  
mM – Milimolar  
mRNA – RNA mensageiro  
MUSCLE - *Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation*  
NaCl – Cloreto de sódio  
NCBI - *National Center for Biotechnology Information*  
NGM – Meio para de cultura para crescimento de nematóides  
nM - nanomolar  
oligo-d(T) – Oligonucleotídeo de deoxitimina  
pb – Pares de bases  
PCR – Reação em cadeia da polimerase  
pH – Potencial de hidrogênio

R – *Reverse* (anti-senso)

RNA – Ácido ribonucléico

RNase – Ribonuclease A

mRNA – RNA mensageiro

TBE – Tampão Tris-borato EDTA, pH 8,0

UTR – *Untranslated region*

X-Gal – 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactosídeo

## Resumo

A identificação e caracterização dos mecanismos e moléculas envolvidos em sinalização celular são essenciais para o entendimento da biologia parasitária do *S. mansoni*. Proteína quinases desempenham papel chave em vias de sinalização e tem sido propostas como potenciais alvos para o desenvolvimento de novas drogas anti-*Schistosoma*. Visto que a caracterização funcional em *S. mansoni* é dificultada por limitações nos métodos de transformação genética deste parasito, o presente estudo propõe o uso de *C. elegans* como um modelo para a expressão heteróloga de genes de *S. mansoni* que codificam proteínas quinases. Genes que codificam proteína quinases em *S. mansoni*, homólogos aos identificados em *C. elegans*, foram selecionados pelo nosso grupo a partir do proteoma do parasito através de uma abordagem filogenômica. Inicialmente, foi selecionada a proteína quinase JNK, que participa da via de sinalização das MAP quinases para a realização das análises experimentais. Em *C. elegans*, a proteína JNK está relacionada ao aumento de longevidade e da resistência aos estresses térmico e oxidativo. Oligonucleotídeos específicos foram desenhados para amplificar a região promotora do gene em *C. elegans* bem como as regiões codificantes (CDS) em ambos os organismos. A região promotora foi amplificada a partir do DNA genômico extraído de *C. elegans* adultos. O RNA total foi extraído de esquistossômulos e *C. elegans* adultos. As CDS foram amplificadas a partir do cDNA sintetizado e os fragmentos de DNA resultantes foram clonados em *E. coli* DH5 $\alpha$ . As construções obtidas foram digeridas com enzimas de restrição selecionadas de forma a linearizar o vetor contendo a região promotora e recuperar as CDS. Posteriormente, foram realizadas subclonagens através da ligação das CDS de *C. elegans* e *S. mansoni* com a construção contendo a região promotora. *C. elegans* N2 receberam as construções finais através de microinjeção. Foram obtidas três linhagens que expressam Ce\_JNK-1, denominadas N2 Ex01[Ce\_jnk-1], N2 Ex02[Ce\_jnk-1] e N2 Ex03[Ce\_jnk-1] e duas linhagens expressando Sm\_JNK, denominadas N2 Ex04[Sm\_jnk] e N2 Ex05[Sm\_jnk]. Os níveis de expressão de Sm\_JNK e Ce\_JNK-1 nas linhagens transgênicas foram avaliados por RT-PCR quantitativo. Apesar do aumento da expressão de JNK observado nas linhagens transgênicas, não houve aumento na longevidade das mesmas. Embora esta seja a primeira utilização de expressão heteróloga em *C. elegans* para investigar a função de genes de *S. mansoni*, esta técnica tem sido utilizada com sucesso para nematóides parasitos e pode tornar-se uma abordagem alternativa para os estudos funcionais em outros parasitos.



## Abstract

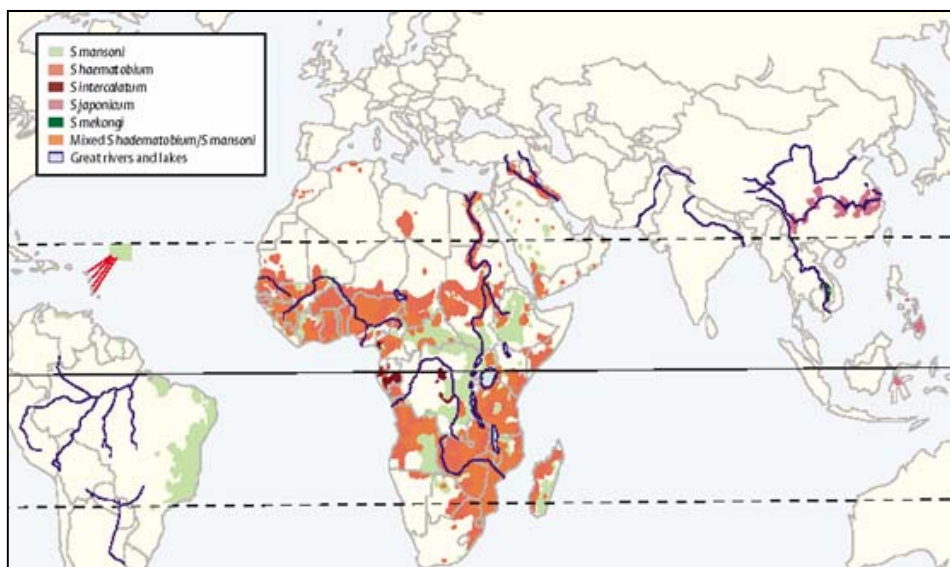
The identification and characterization of mechanisms and molecules involved in cell signaling are essential to the understanding of the *S. mansoni* parasite's biology. Protein kinases play key roles in signaling pathways and have been proposed as potential targets for the development of new anti-schistosome drugs. Since functional characterization in *S. mansoni* is hampered by limitations in methods for genetic transformation in this parasite, the present study proposes to use *C. elegans* as a model for heterologous expression of *S. mansoni* genes encoding protein kinases. *S. mansoni* protein kinase coding genes orthologous to those identified in *C. elegans* were selected from the parasite's proteome by using a phylogenomic approach. Initially, the protein kinase JNK that participates in the MAP kinases signaling pathway was selected to perform the experimental analyses. In *C. elegans*, JNK is related to increased longevity and resistance to oxidative and thermal stress. Specific primers were designed to amplify promoter regions of the JNK gene in *C. elegans* as well as the protein coding regions (CDS) in both organisms. The promoter region was amplified from the adult nematode's DNA. Total RNA was extracted from schistosomula and mature *C. elegans*. CDS were amplified from synthesized cDNA and the resulting DNA fragments were cloned in *E. coli* DH5 $\alpha$ . The construction obtained was digested with restriction enzymes to linearize the vector containing the promoter region and recover the CDS. Subsequently, subcloning was performed by ligation of *C. elegans* and *S. mansoni* CDS with the final construct containing the promoter region. *C. elegans* N2 received the final constructions through microinjections. We obtained three lineages that express Ce\_JNK-1, named N2 *Ex01*[Ce\_ *jnk-1*], N2 *Ex02*[Ce\_ *jnk-1*] and N2 *Ex03*[Ce\_ *jnk-1*] and two lineages that express Sm\_JNK, named N2 *Ex04*[Sm\_ *jnk*] and N2 *Ex05*[Sm\_ *jnk*]. The expression levels of Ce\_JNK-1 and Sm\_JNK in transgenic lineages were measured by quantitative RT-PCR. Despite the increased expression of the JNK gene in the transgenic lineages, increased longevity was not observed in these organisms. Although this is the first use of heterologous expression in *C. elegans* to investigate gene functions in *S. mansoni*, it has been used successfully for nematode parasites and may become an alternative approach to functional studies in other parasites.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 *Schistosoma mansoni* e esquistossomose

### 1.1.1 Aspectos gerais e epidemiológicos

A esquistossomose é uma doença causada por trematódeos digenéticos que pertencem à família Schistosomatidae. Cinco espécies do gênero *Schistosoma* estão envolvidas na infecção humana, sendo três as principais espécies: *Schistosoma mansoni* e *Schistosoma japonicum*, causadores da esquistossomose intestinal, e *Schistosoma haematobium*, agente etiológico da esquistossomose urinária. As outras duas espécies responsáveis pela doença intestinal, embora com baixa frequência, são *Schistosoma intercalatum* e *Schistosoma mekongi* (ROKNI, 2012). Essas espécies apresentam distribuição geográfica e topográfica distintas, bem como diferente tropismo no organismo do hospedeiro vertebrado, além de características morfológicas e fisiológicas peculiares (ROLLINSON; SIMPSON, 1987) (Figura 1).



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

A esquistossomose se manifesta clinicamente sob as formas aguda e crônica. A esquistossomose aguda é uma reação de hipersensibilidade sistêmica contra os

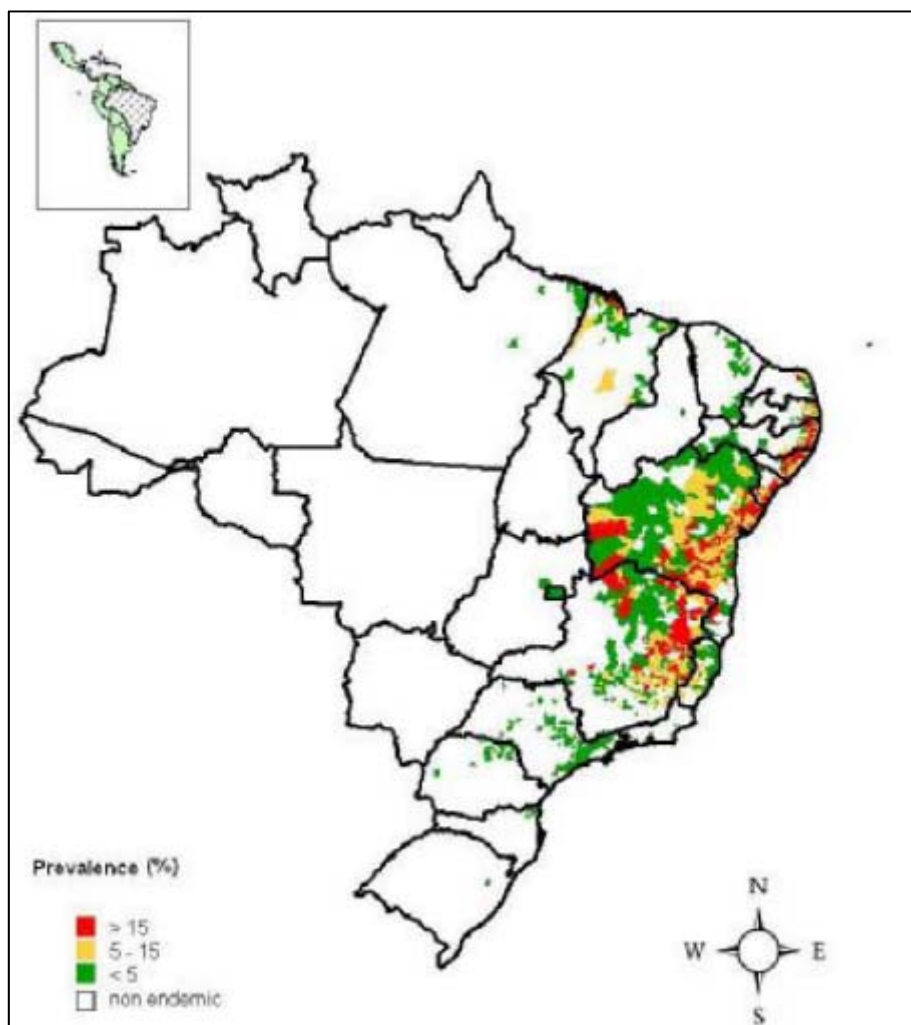
esquistossômulos que migram, a qual ocorre algumas semanas ou até meses após a infecção pelas cercárias (BOTTIEAU *et al.*, 2006; LAMBERTUCCI, 1993). No entanto, os principais danos ao hospedeiro estão relacionados à esquistossomose crônica. Os ovos depositados pelas fêmeas adultas podem ficar retidos no fígado, intestinos e outros tecidos do hospedeiro, provocando inflamações e reações granulomatosas, que são progressivamente substituídas por tecidos fibróticos (CHEEVER *et al.*, 2000).

Dentre as doenças tropicais causadas por parasitos, a esquistossomose é uma das mais importantes em termos de saúde pública, com número de casos inferior apenas à malária (WAKNINE-GRINBERG *et al.*, 2010). Segundo a Organização Mundial de Saúde (World Health Organization - WHO), a esquistossomose é endêmica em 78 países onde aproximadamente 237 milhões de pessoas requerem tratamento preventivo, sendo mais de 100 milhões crianças em idade escolar (WHO, 2013).

Estima-se que mais de 700 milhões de pessoas vivam em áreas endêmicas, sob o risco de infecção (WHO, 2012). Embora seja uma doença de foco rural, normalmente associada aos produtores de arroz e pescadores pobres que vivem nos trópicos, há um aumento do relato de casos entre europeus com histórico de viagens para áreas endêmicas na África e Ásia. A transmissão ocorre em fluxos de água doce onde há caramujos infestados com cercárias. Os caramujos pertencentes às espécies *Bulinus*, *Biomphalaria* e *Onchomelania* são os vetores de *S. haematobium*, *S. mansoni* e *S. japonicum*, respectivamente (ROKNI, 2012).

No Brasil, estima-se que cerca de 25 milhões de pessoas vivam em áreas endêmicas (WHO, 2012). Em 2011, 26 677 de pessoas receberam tratamento em 22 estados, representando uma diminuição de 35 % no número de pessoas tratadas em comparação ao ano anterior (WHO, 2013). Os estados das regiões Nordeste e Sudeste são os mais afetados sendo a ocorrência diretamente relacionada à presença dos moluscos transmissores. Atualmente, a doença é detectada em todas as regiões do país. As áreas endêmicas e focais abrangem 19 Unidades Federadas e compreendem os Estados de Alagoas, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte (faixa litorânea), Paraíba, Sergipe, Espírito Santo e Minas Gerais (predominantemente no Norte e Nordeste do Estado). No Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul,

Goiás e no Distrito Federal, a transmissão é focal, não atingindo grandes áreas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009) (Figura 2).



**Figura 2 – Distribuição da esquistossomose no Brasil.** Áreas endêmicas e focais da esquistossomose mansônica no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

O controle da esquistossomose visa a redução da morbidade e mortalidade da parasitose. Os métodos disponíveis para o controle consistem em melhorias no tratamento de água, implementação de saneamento básico, controle dos hospedeiros intermediários e quimioterapia contra as infecções no hospedeiro humano (FENWICK; WEBSTER, 2006).

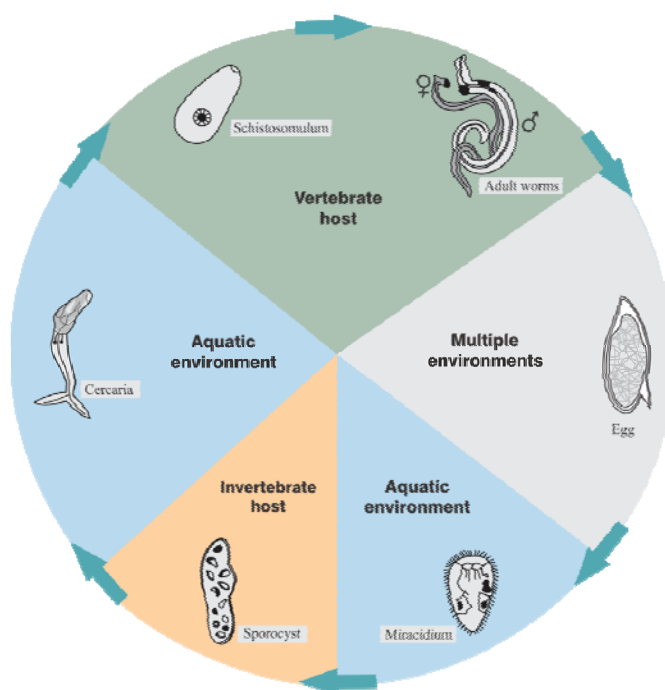
Atualmente, o controle da esquistossomose depende principalmente do tratamento de pacientes infectados, utilizando Praziquantel® (PZQ), a única droga disponível para tratamento (BERRIMAN *et al.*, 2009; BRUUN; AAGAARD-HANSEN, 2008; TDR, 2007). O PZQ é uma droga de baixo custo, administrada em dose única e que pode ser utilizada no tratamento contra todas as espécies de *Schistosoma*. Seu mecanismo de ação permanece desconhecido, embora alguns trabalhos

evidenciem uma possível interferência nos canais de cálcio do parasito (HOTEZ; FENWICK, 2009; ROKNI, 2012). Entretanto, esta droga não previne a reinfecção e sua eficácia é variável dependendo do sexo do parasito, estágio de desenvolvimento e período de infecção. Além disso, há evidências de parasitos resistentes a esta droga em laboratório e no campo (e. g. BOTROS; BENNETT, 2007; LIANG *et al.*, 2003; MELMAN *et al.*, 2009; PICA-MATTOCCIA; CIOLI, 2004).

### 1.1.2 O parasito *S. mansoni*

O *S. mansoni* é a única espécie do gênero *Schistosoma* encontrada no Brasil devido à ocorrência do hospedeiro intermediário apenas para essa espécie (NEVES, 2001; SOUZA *et al.*, 2011). Os hospedeiros intermediários do *S. mansoni* são três espécies do gênero *Biomphalaria*: *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*. Os caramujos do gênero *Biomphalaria* são espécies de água doce com susceptibilidade variada ao *S. mansoni*, sendo *B. glabrata* a espécie mais susceptível (NEVES, 2001; PORDEUS *et al.*, 2008).

O parasito se desenvolve por um ciclo de vida complexo, apresentando diversas fases bem adaptadas ao seu ambiente ou hospedeiros. O ciclo do *S. mansoni* 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 (HAN *et al.*, 2009). (Figura 3).



**Figura 3 – Ciclo biológico do *S. mansoni*.** Estágios de desenvolvimento do ciclo de vida do *S. mansoni* (ANDRADE *et al.*, em preparação).

O ciclo de vida do parasito tem início quando ovos são liberados nas fezes do hospedeiro definitivo infectado. Os ovos são excretados nas fezes e, quando em contato com a água, em condições ambientais favoráveis, liberam os miracídios. Os miracídios migram até o hospedeiro intermediário utilizando estímulos químicos e luminosos. Após penetrarem no hospedeiro intermediário, os miracídios se multiplicam assexuadamente em esporocistos multicelulares e, mais tarde, em larvas cercárias com ventosas embrionárias e cauda bifurcada característica (HAN *et al.*, 2009). As cercárias são liberadas em ambientes aquáticos a partir de um hospedeiro intermediário infectado, o caramujo, e utilizam uma variedade de estímulos ambientais, como contraste claro-escuro e gradientes térmicos e químicos, para encontrar seu hospedeiro definitivo (HAAS *et al.*, 1997). Subsequentemente, para iniciar a infecção humana, as cercárias penetram na pele do hospedeiro, perdem suas caudas transformando-se em vermes jovens denominados esquistossômulos, que migram, através do sangue, dos pulmões até o fígado. Os esquistossômulos amadurecem em 4-6 semanas na veia porta onde se acasalam e em seguida migram para as vênulas mesentéricas. Vermes adultos são dióicos, apresentam dimorfismo sexual, possuem trato digestivo cego e ingerem sangue e globulinas do hospedeiro para sua nutrição (BOAG *et al.*, 2001; MORAND; MÜLLER-GRAF, 2000). As fêmeas produzem um grande número de ovos com larvas ciliadas denominadas miracídios, que secretam enzimas proteolíticas que facilitam a migração dos ovos no lúmen do intestino. Cerca de 60% desses ovos são liberados nas fezes do hospedeiro definitivo reiniciando o ciclo (SOUZA *et al.*, 2011) (Figura 3).

### **1.1.3 O genoma e o proteoma de *S. mansoni***

*Schistosoma* tem oito pares de cromossomos, sendo sete pares de cromossomos autossomos e um par de cromossomos sexuais (HAN *et al.*, 2009; HILLYER, 1974; OLIVEIRA; JOHNSTON, 2001). Inicialmente, o tamanho do genoma haplóide de *S. mansoni* foi previsto em  $2,7 \times 10^8$  pares de base (bp), composto por 35 % de sequências de DNA moderadamente ou altamente repetitivas, e 60 % sequências únicas (SIMPSON *et al.*, 1982).

Recentemente, os genomas nucleares de *S. mansoni*, *S. japonicum* e *S. haematobium* foram publicados (BERRIMAN *et al.*, 2009; YOUNG *et al.*, 2012; ZHOU, Y. *et al.*, 2009). O genoma nuclear de *S. mansoni*, foi sequenciado pelo extinto *The Institute for Genomic Research* (TIGR) em associação com o *Wellcome*

*Trust Sanger Institute* (WTSI); utilizando a técnica de *Whole Genome Shotgun* (WGS) com uma cobertura de seis vezes (WILSON *et al.*, 2007), guiado pelo mapeamento físico pela técnica de *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH) (BERRIMAN *et al.*, 2009; ZERLOTINI *et al.*, 2009). Uma nova versão do genoma de *S. mansoni* foi recentemente liberada. O genoma contém 364,5 megabases (Mb) e está fragmentado em 885 *scaffolds*, com 81 % das sequências ordenadas em cromossomos. Um total de 10852 genes foram identificados, codificando cerca de 11000 proteínas, das quais 45 % permanecem sem função conhecida ou predita (PROTASIO *et al.*, 2012; ZERLOTINI *et al.*, 2013).

Atualmente encontram-se disponíveis dados de transcriptoma de *S. mansoni* e *S. japonicum*, derivados do sequenciamento de EST (do inglês, *Expressed Sequence Tag*), SAGE (do inglês, *Serial Analysis of Genes Expression*), cDNA e microarranjo e RNASeq. Os padrões globais de expressão entre estágios do ciclo de vida, entre sexos, ou aqueles em resposta a calor, óxido nítrico e estresse oxidativo, fornecem uma plataforma para o entendimento da complexa biologia do parasito, incluindo sua diferenciação sexual, desenvolvimento e maturação, bem como a interação com os hospedeiros, e, devem facilitar a identificação de novos alvos para o controle e diagnóstico da doença (HAN *et al.*, 2009).

A disponibilidade de dados de genoma e transcriptoma permitiu ainda a identificação de proteínas por espectrometria de massa, em combinação com outras estratégias de isolamento de proteínas como eletroforese uni- e bidimensional e cromatografia líquida (HAN *et al.*, 2009). Nos últimos anos, diversas metodologias têm sido utilizadas para acessar as informações a cerca da biologia do parasito e sua interação com o hospedeiro, incluindo perfis proteômicos dos diferentes estágios do ciclo de vida, de sexos, do tegumento, de casca de ovos, de proteínas excretadas e secretadas, e do conteúdo do intestino (e. g. CASS *et al.*, 2007; CURWEN *et al.*, 2006; GUILLOU *et al.*, 2007; KNUDSEN *et al.*, 2005).

A ampla quantidade de dados de genoma, transcriptoma e proteoma deve contribuir para um melhor entendimento sobre a evolução e desenvolvimento do *Schistosoma*, bem como da sua interação com os hospedeiros, evasão do sistema imune e patogênese da esquistossomose. Desta forma, espera-se facilitar o desenvolvimento de novas estratégias de intervenção, incluindo a busca por novos alvos de drogas e vacinas (HAN *et al.*, 2009; WALKER, 2011).

Ferramentas moleculares são necessárias para elucidar a importância dos genes recentemente identificados. Infelizmente, poucas ferramentas de genômica funcional estão disponíveis para *Schistosoma*, incluindo as técnicas de RNA de interferência, mutagênese insercional e, recentemente, o desenvolvimento de transgenia em *Schistosoma*, a qual ainda não se encontra bem estabelecida (MANN *et al.*, 2011).

## **1.2 Proteína quinases**

### **1.2.1 Classificação das proteína quinases**

As proteína quinases (PKs) desempenham papel central transdução de sinais em resposta a estímulos externos em células eucarióticas. PKs promovem a fosforilação reversível de proteínas através da adição de grupos fosfato do ATP ou GTP a resíduos de aminoácidos (Serina, Treonina ou Tirosina), alterando sua atividade enzimática, interação com outras proteínas e moléculas, localização celular e propensão à degradação por proteases (JOHNSON; LAPADAT, 2002).

PKs atuam no controle de diversos processos celulares, incluindo metabolismo, transcrição, progressão do ciclo celular, rearranjo do citoesqueleto e movimento celular, apoptose e diferenciação. Desempenham papel na comunicação celular durante o desenvolvimento, em respostas fisiológicas e na homeostase, além de participar do funcionamento do sistema nervoso e imune (HANKS *et al.*, 1988).

PKs estão entre as maiores famílias gênicas em eucariotos e têm sido extensivamente estudadas. Estas enzimas são consideradas potenciais alvos de drogas do ponto de vista médico e químico com um número crescente de inibidores de PKs sendo desenvolvidos e aprovados para o tratamento de diversas doenças humanas (BOYLE; KOLESKE, 2007). Além disso, PKs ganharam interesse como alvos para combater muitos parasitos, incluindo *S. mansoni* (e. g. DISSOUS *et al.*, 2007; NAULA *et al.*, 2005; WARD *et al.*, 2004). Recentemente um estudo demonstrou o efeito do inibidor para proteína quinases eucarióticas (ePKs) humanas Gleevec<sup>®</sup> na morfologia e fisiologia de *S. mansoni* em experimentos *in vitro*. O inibidor causou alterações patológicas na gastroderme dos vermes adultos que causaram a morte dos parasitos (BECKMANN; GREVELDING, 2010).

As PKs são classificadas em duas superfamílias contendo as proteínas quinases eucarióticas ou convencionais (ePKs), que compartilham um domínio



catalítico conservado, e as proteína quinases atípicas (aPKs). A classificação é baseada na similaridade de sequência dos domínios catalíticos, presença e similaridade dos domínios acessórios e no modo de regulação (HANKS *et al.*, 1988; MIRANDA-SAAVEDRA; BARTON, 2007) (Tabela 1).

A maioria das PKs tem um domínio catalítico, que se liga e fosforila a proteína alvo; e uma região regulatória, que controla a interação entre duas proteínas. O domínio catalítico das ePKs é composto por 250 a 300 aminoácidos, dividido em 12 subdomínios compostos por aminoácidos individuais ou motivos altamente conservados (HANKS, 2003). As PKs podem ser auto-fosforiladas ou sofrerem fosforilação por outras PKs, em uma interação regulada pelos domínios acessórios da proteína (MANNING *et al.*, 2002).

As ePKs são classificadas em duas diferentes classes: serina/treonina quinases e tirosina quinases, de acordo com os resíduos de aminoácidos que essas quinases fosforilam nas moléculas alvo. As duas diferentes classes de ePKs compreendem nove grupos, sendo cinco grupos pertencentes à classe serina/treonina quinases e dois grupos pertencentes à classe tirosina quinases. Dentro da classe das serina/treonina quinases estão os grupos AGC (do inglês, *cAMP dependent protein kinase*), CaMK (do inglês, *calcium/calmodulin dependent protein kinase*), CK1 (do inglês, *Cell kinase 1*), CMGC (do inglês, *cyclin-dependent kinases*) e STE (*MAP kinase cascade kinase*). A classe das tirosina quinases engloba os grupos TK (do inglês, *protein tyrosine kinases*) e RGC (do inglês, *Receptor Guanylate Cyclases*). As quinases híbridas, assim chamadas por fosforilarem tanto resíduos de aminoácidos de tirosina quanto serina/treonina, também pertencem às ePKs e estão divididas em TK-like (do inglês, *Tyrosine kinase-like*) e em Outras (do inglês, *others*). Membros do grupo Outras são assim chamados por não possuírem similaridade no nível da sequência que permita agrupá-los em outros grupos de classificação (HANKS *et al.*, 1988) (Tabela 1).

Aproximadamente 1,9% do proteoma predito de *S. mansoni* corresponde à ePKs, totalizando 252 proteínas, das quais apenas 24 possuem evidência experimental. A escassez de dados sobre a função das ePKs de *S. mansoni* nos motiva a aprofundarmos em níveis cada vez mais detalhados os estudos que visam contribuir para o entendimento da participação desta família de proteínas no desenvolvimento do parasito (ANDRADE *et al.*, 2011).

**Tabela 1 – Classificação das proteína quinases.** (Adaptado de ANDRADE *et al.*, 2011)

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

### 1.2.2 Via de sinalização de MAP quinases

As MAPKs (do inglês, *Mitogen-Activated Protein Kinases*) compreendem uma família de ePKs cuja função e regulação foi conservada durante a evolução desde organismos unicelulares, como leveduras, até organismos complexos, incluindo humanos (WIDMANN *et al.*, 1999). 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).

MAPKs catalisam a fosforilação reversível de proteínas resultando em sua ativação ou inativação. Entre seus substratos estão outras proteína quinases, fosfolipases, fatores de transcrição e proteínas do citoesqueleto. Os fosfatos adicionados pelas MAPKs podem ser removidos por proteínas fosfatases e, dessa forma a ação de MAPKs e fosfatases podem rapidamente alterar as condições celulares em resposta às mudanças do ambiente (JOHNSON; LAPADAT, 2002).

As MAPKs são parte de um sistema de fosforilação composto por três quinases (MKKKs, MKKs e MAPKs) que são ativadas sequencialmente. Assim como seus substratos, MAPKs são reguladas através de fosforilação (RAY; STURGILL, 1988). MKKKs (*MAPK Kinase Kinase*) fosforilam e ativam MKKs (*MAPK Kinase*) específicas, e estas, por sua vez, fosforilam MAPKs específicas com alta seletividade, resultando na ativação de resposta a diferentes estímulos (JOHNSON; LAPADAT, 2002).

A via das MAPKs é um dos sistemas de sinalização mais bem caracterizados. Mamíferos possuem pelo menos cinco vias descritas, dentre elas ERK (do inglês, *extracellular signal regulated-kinase*), JNK/SAPK (do inglês, *c-jun N-terminal kinase / stress-activated protein kinase*) e p38 MAPK (ANDRADE *et al.*, 2012). A via de sinalização de JNK é requerida na morfogênese embrionária, além de ter participação na regulação da proliferação celular e apoptose. A cascata de sinalização de JNK é ativada por citocinas, incluindo TNF e IL-1, e por exposição a diversas formas de estresse extracelulares, como estresse osmótico, estresse oxidativo e radiação, tendo participação em processos biológicos críticos como câncer, desenvolvimento, apoptose e sobrevivência celular (DAVIS, 2000). Em *Drosophila melanogaster* e *C. elegans*, JNK está envolvida na regulação da longevidade e resistência a estresse (OH *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2003).

A proteína JNK se liga e fosforila c-Jun, um fator de transcrição que faz parte do complexo de transcrição AP-1, importante na regulação da expressão gênica (JOHNSON; LAPADAT, 2002). A via de p38 pode atuar sinergicamente com JNK, reforçando a atividade de ligação do complexo AP-1 (CHEN *et al.*, 2003).

Em *S. mansoni* apenas uma ePK de cada foi identificada nas subfamílias JNK (Smp\_172240) e p38 (Smp\_133020) (ANDRADE *et al.*, 2011). O silenciamento da expressão de Sm\_JNK por RNA de interferência promove diminuição significativa no número de ovos e de parasitos adultos em camundongos infectados com esquistossômulos silenciados para Sm\_JNK, sugerindo que esta proteína seja essencial na transformação e/ou sobrevivência do *S. mansoni* no hospedeiro. Além disso, os vermes recuperados apresentam má formação do tegumento e de estruturas envolvidas na reprodução (ANDRADE, 2012).

### 1.3 Filogenômica

A grande maioria das sequências de proteínas depositadas em bancos de dados públicos não possui caracterização experimental, tendo função atribuída com base em predição computacional (e. g. SCHNOES *et al.*, 2009). Entretanto, a predição funcional fundamentada em métodos baseados em buscas por similaridade, como aqueles usando o pacote BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool* (ALTSCHUL *et al.*, 1990), produzem erros sistemáticos. Isso porque a identificação de sequências similares frequentemente não é suficiente para prever

a função de um gene ou produto gênico não caracterizado experimentalmente (e. g. BRENNER, 1999; BROWN; SJÖLANDER, 2006; NAHUM; PEREIRA, 2008).

A análise filogenética acrescenta uma perspectiva evolutiva às análises biológicas comparativas tornando a predição de função de proteínas mais robusta e confiável. Nesse contexto, as predições são aperfeiçoadas focando nos processos evolutivos que moldaram os genes e seus produtos ao longo do tempo e não somente na similaridade de sequência (EISEN, 1998).

A abordagem filogenômica (filogenética + genômica) se baseia em um processo de múltiplas etapas envolvendo a identificação de potenciais homólogos dos genes/proteínas alvo através de métodos baseados na busca por similaridade de sequências, alinhamento múltiplo, construção e anotação de árvores filogenéticas, discriminação entre ortólogos e parálogos e, finalmente, predição da função da proteína a partir das informações disponíveis para os ortólogos identificados em bancos de dados e/ou na literatura (BROWN; SJÖLANDER, 2006). Visto que a diversidade funcional resulta de mecanismos evolutivos, a inferência filogenética foi proposta como uma alternativa para evitar os erros de anotação baseados apenas em similaridade, bem como melhorar a precisão da classificação funcional (e. g. EISEN, 1998; NAHUM; PEREIRA, 2008; SJÖLANDER, 2004).

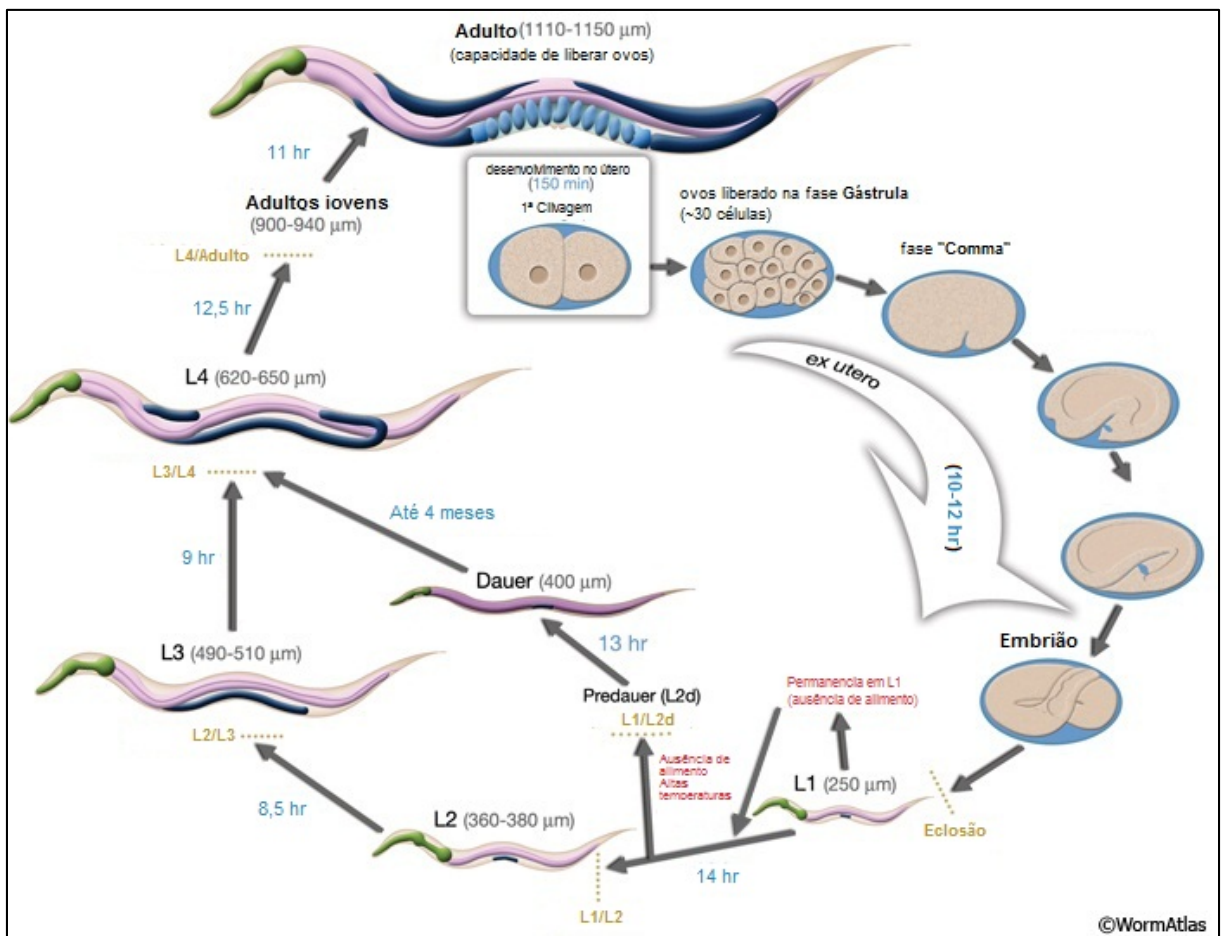
#### **1.4 O organismo modelo *C. elegans***

##### **1.4.1 O nematódeo *C. elegans***

*C. elegans* é um pequeno nematóide de vida livre, eucarioto, multicelular, transparente, que habita o solo e se alimenta de fungos e bactérias. *C. elegans* é muito utilizado como um modelo experimental desde a década de 60 com as pesquisas de Sydney Brenner, sendo hoje um dos organismos sobre o qual se tem maior conhecimento nível molecular. *C. elegans* apresenta um grande potencial para análises genéticas, em parte por apresentar ciclo de vida curto (três dias), pequeno tamanho (1,5 mm quando adulto) e fácil manutenção e manipulação em laboratório (RIDDLE *et al.*, 1997).

O nematóide *C. elegans* pode ser encontrado como hermafrodita ou macho. Entretanto, a linhagem N2 selvagem apresenta maioria de hermafroditas, com apenas 0,1 % de machos na população. Os machos produzem somente esperma e devem cruzar com hermafroditas para se reproduzirem. Já os hermafroditas

produzem tanto espermatozoides como óvulos e podem se auto-fecundar. O espermatozoide é produzido na espermateca e os óvulos nas gônadas. Através da autofecundação, um hermafrodita produz, aproximadamente, 300 descendentes. Caso ocorra fecundação cruzada com um macho, o número de descendentes pode ser superior a 1000. *C. elegans* possui seis pares de cromossomos, sendo cinco pares de cromossomos autossomos. Hermafroditas possuem um par de cromossomos sexuais (XX) e machos têm apenas um cromossomo sexual (X0) (HODGKIN *et al.*, 1979). O hermafrodita grávido expelle os ovos, o qual, após a eclosão, passa por quatro estágios larvais (L1, L2, L3 e L4) até chegar à fase adulta (Figura 4).



**Figura 4 – Ciclo de vida de *C. elegans* a 20 °C.** A fertilização é considerada como 0 minutos. Números em azul ao longo das setas indicam o tempo que os animais passam em uma determinada fase. A primeira clivagem ocorre cerca de 40 minutos após a fertilização. Os ovos são liberados, na fase de gástrula, cerca de 150 minutos após a fertilização. Ao lado do nome de cada fase, encontra-se o comprimento do animal em micrometros ( $\mu\text{m}$ ) (Adaptado de [www.wormatlas.org](http://www.wormatlas.org)).

O genoma de *C. elegans* foi completamente sequenciado pelo *The Wellcome Trust Sanger Institute* e o *Genome Sequencing Center*, totalizando 97 Mb e mais de 19000 genes. Aproximadamente 42% do proteoma predito apresenta importante

correspondência com proteínas de outros organismos, possibilitando o desenvolvimento de diversas abordagens de genômica comparativa (THE C. ELEGANS SEQUENCING CONSORTIUM, 1998). Os dados de genoma, transcriptoma e proteoma de *C. elegans* podem ser facilmente acessados utilizando a plataforma Wormbase (<http://wormbase.org/>).

A estrutura gênica em *C. elegans* é similar a de outros animais, entretanto, alguns aspectos devem ser mencionados. Em geral, o genoma de *C. elegans* apresenta poucos íntrons por gene, os íntrons são pequenos e há pouco espaço intergênico. A existência de operons e transcrição policistrônica permite adicional compactação ao genoma. Além disso, *C. elegans* utiliza *cis-* e *trans-splicing* para processar pré-mRNAs (BLUMENTHAL; STEWARD, 1997).

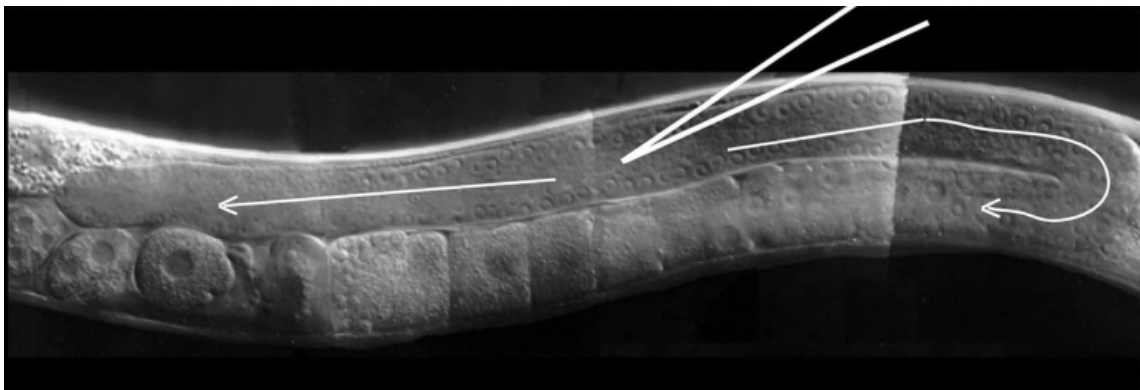
#### **1.4.2 Manipulação genética em *C. elegans***

Técnicas elaboradas para a manipulação de *C. elegans*, como métodos eficientes para criar e resgatar fenótipos em mutantes, cruzamentos genéticos, RNA de interferência, transformação genética, hibridização *in situ* e imunolocalização permitem uma compreensão aprofundada sobre a biologia deste nematóide. Uma extensa coleção de mutantes com diversos fenótipos e uma variedade de mapas cromossômicos dos genes mutados e marcadores moleculares também encontram-se disponíveis (<http://elegans.swmed.edu/genome.shtml>) (HASHMI *et al.*, 2001).

A transformação e microinjeção de DNA são ferramentas essenciais para a pesquisa em *C. elegans*. A transformação é usada para clonar genes para o resgate de mutantes, superexpressar ou expressar ectopicamente genes, expressar proteínas alvo, estudar a estrutura e função de domínios de proteínas e analisar elementos regulatórios de DNA ou RNA (EVANS, T., 2006). As técnicas de transformação disponíveis geram grandes arranjos extracromossômicos de DNA (MELLO *et al.*, 1991) ou promovem a integração aleatória do DNA exógeno no genoma (FIRE, 1986).

Duas diferentes estratégias foram desenvolvidas e amplamente utilizadas na transformação genética de *C. elegans*, sendo elas a microinjeção e o bombardeamento de DNA. Ambas as metodologias promovem a introdução do DNA exógeno durante o desenvolvimento dos oócitos em hermafroditas adultos gerando animais transgênicos na progênie (RIECKHER *et al.*, 2009). A microinjeção é um

método relativamente simples e efetivo para introduzir o DNA, sendo a injeção do DNA no braço distal das gônadas a abordagem mais utilizada para a introdução do DNA exógeno (EVANS, 2006; MELLO *et al.*, 1991; MELLO; FIRE, 1995) (Figura 5). Cada hermafrodita possui dois braços da gônada. O braço distal de cada gônada é um sincício com citoplasma comum rodeado por núcleos da linhagem germinativa. Passando através dos braços de cada gônada, os núcleos são envolvidos pela membrana celular, formando os oócitos imaturos. Os oócitos são posteriormente fertilizados ao passar pela espermateca. Portanto, a injeção de DNA exógeno no citoplasma do braço distal da gônada permite a incorporação deste DNA durante a formação dos oócitos (STINCHCOMB *et al.*, 1985).



**Figura 5 – Microinjeção na gônada de *C. elegans*.** O DNA deve ser injetado no sincício do braço distal da gônada, que contém células germinativas mitóticas e indiferenciadas. A posição ideal da agulha de injeção no centro do braço distal da gônada está demonstrada. As setas indicam o fluxo do líquido injetado na gônada. O DNA injetado é incorporado durante o desenvolvimento dos oócitos que são posteriormente fertilizados na espermateca, originando embriões transgênicos (EVANS, 2006).

A maneira mais fácil de criar linhagens transgênicas é através da coinjeção de dois ou mais DNAs no sincício da gônada distal, sendo um ou mais DNAs carreadores dos genes que se deseja inserir e um plasmídeo contendo um marcador de transformação. O DNA exógeno pode ser um plasmídeo, cosmídeo, fago, YACs ou produtos de PCR. Os marcadores de transformação induzem um fenótipo dominante que permite a identificação dos transformantes, desde que o fenótipo do hospedeiro não interfira com o fenótipo induzido pelo marcador (EVANS, T., 2006).

Os animais transgênicos obtidos por microinjeção tipicamente carregam grandes arranjos extracromossomais contendo muitas cópias dos DNAs injetados. Estes arranjos são concatâmeros de DNA com alto peso molecular, usualmente instáveis durante as divisões celulares, mas que podem tornar-se herdáveis. Uma fração da primeira geração (F1) da progênie transgênica, em que a introdução do

DNA ocorreu na linhagem germinativa, poderá transmitir o arranjo através das gerações subsequentes sem que ocorram alterações em sua herança ou expressão (EVANS, 2006; STINCHCOMB *et al.*, 1985).

Apesar do DNA exógeno ser herdável, a segregação ocorre de forma anormal. Em geral, cada animal transgênico passa o DNA exógeno para aproximadamente metade da sua progênie. Acredita-se que os arranjos de alto peso molecular do DNA exógeno se propaguem de forma semelhante aos fragmentos cromossômicos de duplicação livre (do inglês, *free duplication*) existentes em *C. elegans*, e sem que a presença de nenhuma sequência específica seja requerida (STINCHCOMB *et al.*, 1985).

### **1.4.3 O uso de *C. elegans* na análise funcional de genes**

De fato, *C. elegans* vem sendo usado cada vez mais como um sistema modelo no estudo de genes de nematóides parasitos e organismos superiores, nos quais a definição da função de genes de interesse pode ser dificultada devido à falta de abordagens *knock-out* ou ensaios funcionais apropriados (BRITTON; MURRAY, 2006). Além disso, este organismo tem sido utilizado como um modelo razoável para a descoberta de drogas anti-helmintos e seus mecanismos de ação (GEARY; THOMPSON, 2001).

A utilização contínua de *C. elegans* como um sistema heterólogo para estudar a função e regulação de genes pode ser vantajosa para explorar dados de sequência e aprimorar a compreensão da biologia de outros organismos, particularmente quando abordagens diretas são limitadas. No entanto, como em todo sistema de expressão heteróloga, deve-se ter cuidado na extrapolação de dados, principalmente na análise funcional de espécies distantemente relacionadas, onde genes conservados em nível de sequência podem estar envolvidos em atividades biológicas diferentes (BRITTON; MURRAY, 2006). Assim, a habilidade de um gene de outra espécie em resgatar um fenótipo em um mutante de *C. elegans* não necessariamente implica em relação de ortologia ou significa que os genes funcionam da mesma maneira e em vias idênticas em ambas as espécies. Da mesma forma, a incapacidade em resgatar um fenótipo não necessariamente sugere que os genes estejam envolvidos em processos diferentes. Devido aos mecanismos de coevolução entre moléculas, genes com funções similares em vias similares



podem não exercer a sua função pelo fato de não interagirem com seus alvos *downstream* em *C. elegans* (GILLEARD, 2004).

O gene da  $\beta$ -tubulina 1 (*tub-1*) de *Haemonchus contortus* foi o primeiro gene de um parasito a ser funcionalmente expresso em *C. elegans* para testar alelos de resistência a drogas (KWA *et al.*, 1995). Os ensaios funcionais de resgate de fenótipo do mutante *ben-1* representam um clássico exemplo de como este tipo de experimento pode ser útil no estudo detalhado da função de genes de um parasito (GILLEARD, 2004). Em outro estudo mais recente, a expressão heteróloga em *C. elegans* do gene *slo-1* de *Ancylostoma caninum* e *Cooperia oncophora*, parasitos nematóides de importância veterinária, foi capaz de resgatar o fenótipo de susceptibilidade à droga emodepside em mutantes de *C. elegans* nocautes para *slo-1* (WELZ *et al.*, 2011).

A determinação da função de genes de parasitos é dificultada quando não existe um fenótipo detectável relacionado a um potencial homólogo em *C. elegans*. Este fato indica que o gene não tem um papel essencial durante a manutenção *in vitro* ou seu papel é redundante. Nestes casos, a função do gene pode ser verificada através de sua superexpressão em *C. elegans* e posterior caracterização do fenótipo (BRITTON; MURRAY, 2006). Através desta estratégia foi demonstrado que a superexpressão da enzima glutationa-S-transferase (GST) de *Onchocerca volvulus* em *C. elegans* confere aumento da resistência ao estresse oxidativo (KAMPKÖTTER *et al.*, 2003).

A superexpressão da proteína JNK-1, alvo de estudo deste trabalho, em *C. elegans* promoveu aumento da longevidade e da resistência a estresse térmico e oxidativo (OH *et al.*, 2005). A ativação da via de sinalização de JNK atua como um sensor molecular para diversos estresses, JNK-1 fosforila o fator de transcrição DAF-16 e modula sua translocação para o núcleo. Uma vez no núcleo, DAF-16 aumenta a expressão de numerosos alvos de forma a prevenir danos celulares, incluindo a ativação de mecanismos de defesa antioxidante, conferindo maior resistência ao estresse e ajudando na manutenção da vida normal em *C. elegans* (OH *et al.*, 2005; WOLF *et al.*, 2007). Além disso, a via de sinalização de JNK em *C. elegans* está envolvida na coordenação do movimento corporal e na resposta a metais pesados (VILLANUEVA *et al.*, 2001).

*C. elegans* pode, portanto, ser investigado como um sistema modelo para estudar a provável função de um gene de interesse, como, por exemplo, genes do parasito *S. mansoni*, desde que o gene desta espécie tenha um ortólogo em *C. elegans* (HASHMI *et al.*, 2001). Acreditamos que a compreensão da função de proteína quinases de *S. mansoni* utilizando sistema de expressão heteróloga em *C. elegans* pode auxiliar no melhor entendimento a cerca da biologia do parasito bem como no desenvolvimento de novas drogas que auxiliem no controle da esquistossomose.

## 2 JUSTIFICATIVA

Embora a distribuição da esquistossomose tenha mudado nos últimos 50 anos com o sucesso de alguns programas de controle, o número estimado de pessoas infectadas ou sob risco de infecção não foi alterado, uma vez que resultados positivos das medidas de controle foram obtidos em áreas onde o número de pessoas infectadas e em risco de infecção é muito pequeno (ENGELS, 2003). Em virtude dos registros de resistência ao Praziquantel<sup>®</sup>, do insucesso 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, responsável por altos índices de morbidade e mortalidade, e gerando perdas econômicas significativas, especialmente em países em desenvolvimento.

A descoberta de alvos alternativos para o desenho de novas drogas e vacina contra a esquistossomose é considerada uma demanda urgente pela comunidade científica. Nesse sentido, a identificação e caracterização dos mecanismos e moléculas envolvidas em processos de sinalização que regulam funções celulares são essenciais para compreensão da biologia parasitária do *S. mansoni*, tendo o potencial de identificar alvos moleculares para uso na terapia anti-schistosoma. As ePKs de *S. mansoni*, *S. japonicum* e *S. haematobium* foram previamente identificadas pelo nosso grupo. A partir de informações funcionais de ortólogos identificados foi possível selecionar um grupo de ePKs cuja função predita é essencial para o desenvolvimento e sobrevivência desses organismos. Dentre as ePKs identificadas selecionamos como alvo do presente estudo a proteína Sm\_JNK que atua na via de sinalização de MAPKs e está relacionada à ativação de resposta ao estresse em diversos organismos (BANTON; TUNNACLIFFE, 2012).

No entanto, o estudo funcional dos genes identificados em *S. mansoni* é dificultado por limitações nos sistemas de transformação genética deste parasito. A utilização de *C. elegans* como um sistema heterólogo para estudar a função e regulação de genes pode ser vantajosa para explorar dados de sequência e aprimorar a compreensão da biologia de outros organismos, particularmente quando abordagens diretas são limitadas (BRITTON; MURRAY, 2006). *C. elegans* apresenta atributos experimentais que o tornam extremamente úteis à pesquisa, dentre eles, a existência de potenciais ortólogos para o gene de *S. mansoni*. Neste contexto,

propomos a expressão heteróloga da proteína JNK de *S. mansoni* no organismo modelo *C. elegans*, como uma abordagem para inferir a função gênica de Sm\_JNK.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

O presente trabalho tem como objetivo o estudo funcional da proteína quinase JNK de *S. mansoni*, através de sua expressão heteróloga no organismo modelo *C. elegans*.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Analisar as relações evolutivas das proteínas quinases do grupo CMGC e das subfamílias JNK e p38 de *S. mansoni* e outros organismos;
- Obter linhagens de *C. elegans* N2 superexpressando as proteínas JNK de *C. elegans* e *S. mansoni*, através da técnica de microinjeção de DNA;
- Verificar os níveis de expressão do gene que codifica a proteína JNK nas linhagens obtidas;
- Verificar o fenótipo associado à superexpressão do gene nas linhagens obtidas.

## 4 MÉTODOS

### 4.1 Seleção do gene alvo

A partir do genoma predito de *S. mansoni*, disponível no banco de dados SchistoDB (<http://www.schistodb.net/>) (ZERLOTINI *et al.*, 2009) e com base em trabalhos anteriores realizados pelo grupo, o gene que codifica a proteína quinase Sm\_JNK (Smp\_172240) foi selecionado como alvo deste estudo. O gene possui possíveis ortólogos em *C. elegans* e a existência de linhagens mutantes com deleção do gene *jnk-1* aumentam as possibilidades de estudos futuros envolvendo a caracterização funcional desta proteína.

### 4.2 Análise filogenética

#### 4.2.1 Seleção de potenciais homólogos

As filogenias reconstruídas neste estudo compreendem as relações evolutivas de proteína quinases do grupo CMGC codificadas no genoma nuclear de *S. mansoni* (Platelminto, NCBI taxid: 6183) e *Homo sapiens* (Cordado, NCBI taxid: 9606). Com relação às proteínas quinases das subfamílias JNK e p38 (grupo CMGC, família MAPK) foram selecionados outros quatro organismos: *Amphimedon queenslandica* (Porífero, NCBI taxid: 400682), *C. elegans* (Nematóide, NCBI taxid: 6239), *D. melanogaster* (Artrópode, NCBI taxid: 7227) e *Strongylocentrotus purpuratus* (Equinodermo, NCBI taxid: 7668).

Sequências de aminoácidos das proteína quinases de *S. mansoni* foram extraídas do SchistoDB (<http://www.schistodb.net/>) (ZERLOTINI *et al.*, 2009). A ferramenta InterProScan (QUEVILLON *et al.*, 2005) foi utilizada para obtenção das coordenadas de início e fim do domínio catalítico no conjunto de sequências selecionadas. Em seguida, um *script* em *Perl* foi utilizado para extrair a sequência correspondente ao domínio catalítico (Pfam: PF00069).

Sequências de aminoácidos do domínio catalítico (PF00069) das proteínas quinases codificadas pelo genoma das demais espécies foram obtidas no KinBase (<http://kinase.com/kinbase/>). O conjunto de espécies selecionado corresponde a sequências de organismos eucariotos multicelulares disponíveis no KinBase, com exceção de *Mus musculus* (Cordado, NCBI taxid: 10090) em função da proximidade

evolutiva com proteínas de *H. sapiens* e *Selaginella moellendorffii* (Estreptófitas, NCBI taxid: 88036) que não possui proteínas das subfamílias JNK e p38.

Com o intuito de reconstruir as relações evolutivas entre as proteína quinases do grupo CMGC de *S. mansoni* e *H. sapiens*, 107 sequências do domínio catalítico (PF00069) foram utilizadas, sendo 43 provenientes do proteoma de *S. mansoni* e 64 do proteoma de *H. sapiens*. Para a reconstrução das relações evolutivas entre proteína quinases JNK e p38, 27 sequências do domínio catalítico (PF00069) foram utilizadas, sendo quatro sequências de *A. queenslandica*, oito de *C. elegans*, quatro de *D. melanogaster*, sete de *H. sapiens*, duas de *S. mansoni* e duas de *S. purpuratus*.

#### **4.2.2 Alinhamento múltiplo de sequências**

Sequências do domínio catalítico de proteína quinases do grupo CMGC de *H. sapiens* e *S. mansoni* foram alinhadas utilizando os parâmetros padrão do MUSCLE versão 3.6 (EDGAR, 2004), um programa que realiza o alinhamento global de múltiplas sequências moleculares. Essas análises foram realizadas através do Phylogeny.fr (DEREEPER *et al.*, 2008), uma plataforma dedicada à reconstrução e análise de relações filogenéticas entre sequências moleculares que inclui programas de alinhamento.

A mesma abordagem foi utilizada para o alinhamento das sequências do domínio catalítico de proteína quinases das subfamílias JNK e p38 de *A. queenslandica*, *C. elegans*, *D. melanogaster*, *H. sapiens*, *S. mansoni* e *S. purpuratus*.

#### **4.2.3 Reconstrução de árvores filogenéticas**

A partir dos alinhamentos foram obtidas árvores filogenéticas utilizando o método probabilístico de máxima verossimilhança (do inglês, *Maximum Likelihood - ML*) (FELSENSTEIN, 1981). Para tal, utilizou-se o algoritmo PhyML (GUINDON *et al.*, 2003), disponível na plataforma Phylogeny.fr (DEREEPER *et al.*, 2008), com parâmetros padrão. O modelo evolutivo utilizado foi o WAG (WHELAN; GOLDMAN, 2001). Valores de apoio para as diferentes partições das árvores filogenéticas foram calculados pelo teste aLRT (do inglês, *approximate likelihood ratio test*), como implementado no PhyML (ANISIMOVA; GASCUEL, OLIVIER, 2006; GUINDON *et*

al., 2003). As árvores filogenéticas obtidas foram visualizadas e editadas em formato gráfico utilizando o programa FigTree, versão 1.3.1 (RAMBAUT, 2010).

### **4.3 Crescimento e manutenção de *C. elegans***

As linhagens de *C. elegans* tipo selvagem N2 Bristol e N2 *Ex[rol-6]* foram obtidas do *Caenorhabditis Genetics Center (CGC)*, *University of Minnesota, USA* (<http://www.cbs.umn.edu/CGC>) e gentilmente cedidas pela pesquisadora Dra. Riva de Paula Oliveira, ICEB-UFOP.

As linhagens foram mantidas a 20 °C em placas de Petri contendo meio NGM (BRENNER, S., 1974) acrescido de estreptomicina 100 µg/mL e uma camada de *E. coli* OP50 como alimento. A manutenção das linhagens foi realizada pela transferência de animais de diferentes estágios para novas placas, à medida que a comida ficava escassa, com o auxílio de uma lupa (OPTON) e um alça de platina.

### **4.4 Extração de DNA genômico de *C. elegans***

O DNA genômico de *C. elegans* foi extraído a partir da linhagem N2 Bristol, utilizando o kit de extração de DNA *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega). *C. elegans* foram cultivados em meio NGM por aproximadamente 3 dias. Os vermes foram removidos da placa com tampão M9 e a suspensão foi centrifugada a 2000 g por 2 minutos, em tubos de 1,5 mL. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 600 µL do tampão *Nuclei Lysis Solution* gelado e incubado a 65 °C por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 3 µL de *RNase Solution*, a amostra foi homogeneizada por inversão e incubada a 37 °C por 30 minutos. Após 5 minutos a temperatura ambiente, foram adicionados 200 µL de *Protein Precipitation Solution* e a amostra foi agitada vigorosamente, por 20 s, com auxílio de aparelho do tipo Vortex. A amostra foi centrifugada a 16000 g por 4 minutos e o sobrenadante, contendo o DNA, foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL com 600 µL de isopropanol à temperatura ambiente. A solução foi misturada por inversão até uma massa de DNA tornar-se visível. A amostra foi centrifugada a 16000 g por 1 minuto, o sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foram adicionados 600 µL de etanol 70 %. A amostra foi centrifugada a 16000 g por 1 minuto, o sobrenadante foi descartado, e o *pellet*, após secar, reidratado com 100 µL de *DNA Rehydration Solution* por 1 h a 65 °C. O DNA obtido foi quantificado utilizando o



*Nanodrop*<sup>®</sup> *Spectometer* ND-100 (Nanodrop) e visualizado em gel de agarose para verificação de sua integridade. A amostra de DNA foi armazenada a -20 °C.

#### **4.5 Extração de RNA total de *C. elegans* e *S. mansoni***

A extração de RNA total de *C. elegans* e *S. mansoni* foi realizada pelo método de TRIzol<sup>®</sup> *Reagent* (Invitrogen) associado ao método de purificação com kit de extração de RNA *RNeasy*<sup>®</sup> *Mini kit* (QIAGEN). O RNA total de *C. elegans* foi extraído a partir da linhagem N2 Bristol. O RNA total de *S. mansoni* foi obtido a partir de culturas de esquistossômulos, gentilmente cedidas pela pesquisadora Dra. Marina de Moraes Mourão, CPqRR-FIOCRUZ/MG.

*C. elegans* foram cultivados em meio NGM por aproximadamente 3 dias. Os vermes foram removidos da placa com tampão M9 e a suspensão foi centrifugada a 2000 g por 2 minutos, em tubos de 1,5 mL. O sobrenadante foi descartado, foram adicionados 50 µL de TRIzol e os animais foram macerados com auxílio de um pistilo. Em seguida, foram adicionados 950 µL de TRIzol e as amostras foram mantidas por 5 minutos à temperatura ambiente. Foram acrescentados 500 µL de clorofórmio, as amostras foram agitadas vigorosamente por 15 segundos e mantidas à temperatura ambiente por 3 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos a 4 °C. A fase aquosa, na qual se encontra o RNA, foi transferida para novo tubo e foram adicionados 280 µL de etanol 70%. A mistura foi transferida para a coluna do *RNeasy mini Kit* (QIAGEN) e centrifugada a 8000 g por 1 minuto a 4 °C. O eluato foi descartado e 700 µL do *Buffer RW1* foram acrescentados à coluna, que foi então centrifugada a 8000 g por 15 segundos. O eluato foi novamente descartado e a coluna lavada por 2 vezes com 500 µL de solução RPE, centrifugada a 8000 g por 15 segundos na primeira lavagem e por 2 minutos na segunda. Adicionalmente, as amostras foram centrifugadas por 1 minuto e a coluna transferida para tubo novo. O RNA foi eluído da coluna com 30 µL de água livre de RNase, centrifugando a 8000 g por 1 minuto.

O RNA total de *S. mansoni* foi extraído a partir de uma cultura de aproximadamente 8000 esquistossômulos, conforme descrito acima.

Para a remoção do DNA genômico presente nas amostras de RNA, as mesmas foram tratadas com DNase por 30 minutos a 37°C, utilizando o *kit TURBO DNA-free* (Ambion - Life Technologies), de acordo com o manual do fabricante.

Posteriormente, os RNA tratados foram quantificados utilizando o *Nanodrop Spectrometer ND-1000* (Thermo Fisher Scientific). As amostras de RNA foram armazenadas a -80 °C.

#### 4.6 Síntese de cDNA

O cDNA foi sintetizado a partir de 100 µg de RNA total extraído de *C. elegans* ou *S. mansoni* utilizando o iniciador oligo(dT)<sub>18</sub> e o kit *SuperScript™ II Reverse Transcriptase* (Invitrogen). Aos RNAs foram adicionados 1 µL de oligo(dT)<sub>18</sub> (500 µg/mL) e 1 µL de dNTP (10 mM) e água estéril para um volume final de 12 µL. As amostras foram incubadas a 65 °C por 5 minutos e então transferidas para o gelo. Foram acrescentados 4 µL de tampão *5X First-Strand*, 2 µL de DTT (0,1 M) e 1 µL de *RNaseOUT™* (40 U/µL) e as amostras foram incubadas a 42 °C por 2 minutos. A seguir, foi acrescentado 1 µL de *SuperScript™ II RT* (200 U/µL) e as amostras foram incubadas a 42 °C por 50 minutos e, em seguida, incubadas a 70 °C por 15 minutos. O cDNA foi armazenado a -20 °C.

#### 4.7 Construção dos cassetes de expressão

##### 4.7.1 Desenho de iniciadores

Foram desenhados, manualmente, oligonucleotídeos iniciadores para amplificar o promotor do gene que codifica a proteína quinase Ce\_JNK-1 em *C. elegans*, bem como para amplificar as regiões codificadoras dessa proteína em *C. elegans* e *S. mansoni* (Quadro 1).

**Quadro 1 - Lista de iniciadores utilizados nas ampliações do promotor de *jnk-1* e das CDS de Ce\_JNK-1 e Sm\_JNK.** Os sítios para enzimas de restrição inseridos estão destacados em negrito. Os sítios de iniciação da tradução (ATG) estão sublinhados.

Alvo	Nome	Sequência (5'→3')
Promotor_Ce_jnk-1	pro_ce_jnk-1_F	GCGCGCAAACCTTCCATCTCCTGTTTCTC
	pro_ce_jnk-1_R	GCGCGCGTGACAGGATCACACACTTTA
CDS_Ce_JNK-1	CDS_ce_jnk-1_F	<b>GCGGCCGC</b> <u>ATGG</u> GAGGAACGATTATCCAC
	CDS_ce_jnk-1_R	<b>GTCGACT</b> CAGGAATAAATGTCATGGG
CDS_Sm_JNK	CDS_sm_jnk-1_F	<b>GCGGCCGC</b> <u>ATGG</u> CAAACAACATTCCTCC
	CDS_sm_jnk-1_R	<b>GTCGACT</b> TAAATTTGAATATTACGTA

A sequência completa do cromossomo IV de *C. elegans* obtida do *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>?)

term=caenorhabditis%20elegans), onde se localiza o gene que codifica a proteína quinase Ce\_JNK-1, foi utilizada para o desenho de iniciadores complementares às extremidades 3' e 5' do promotor do gene. Os iniciadores foram desenhados para amplificar uma região de 3 Kb, a montante (*upstream*) ao códon de iniciação (ATG), onde se espera que esteja localizado o promotor do gene.

Para amplificação das regiões codificadoras (CDS) foram desenhados iniciadores com inserção de sítio para a endonuclease de restrição *NotI* no iniciador direto (F), imediatamente a jusante (*downstream*) ao códon de iniciação, e inserção de sítio para a endonuclease de restrição *SalI*, no iniciador reverso (R), na extremidade 3' imediatamente após o códon de parada de tradução. Os iniciadores para a amplificação da CDS da proteína quinase Ce\_JNK-1 de *C. elegans*, foram desenhados com base na sequência B0478.1a, obtida do WormBase ([http://www.wormbase.org/species/c\\_elegans/gene/WBGene00002178](http://www.wormbase.org/species/c_elegans/gene/WBGene00002178)). Os iniciadores para a amplificação da CDS da proteína quinase Sm\_JNK de *S. mansoni* foram desenhados a partir da sequência Smp\_172240 obtida no banco de dados SchistoDB (<http://www.schistodb.net/>).

#### 4.7.2 Amplificação

A região promotora do gene *jnk-1* de *C. elegans* foi amplificada por reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os oligonucleotídeos iniciadores desenhados e o DNA genômico extraído de *C. elegans* como molde. As CDS da proteína quinase Ce\_JNK e Sm\_JNK foram amplificadas utilizando os oligonucleotídeos iniciadores desenhados R e F contendo sítios para as endonucleases de restrição *NotI* e *SalI*, respectivamente, e o cDNA sintetizado a partir do RNA extraído de *C. elegans* ou *S. mansoni* como molde. Para as amplificações foi utilizado o kit *Platinum® PCR SuperMix High Fidelity* (Invitrogen). As reações continham: 45 µL de *Platinum® PCR SuperMix High Fidelity*, 1 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (10 µM), 1 µL de DNA ou cDNA e água estéril para volume final de 50 µL. Foi utilizado o termociclador *Gene Amp – PCR System 9700* (Applied Biosystems), e ciclos de amplificação conforme descrito no Quadro 2.

Após amplificação, os produtos da reação de PCR foram aplicados em gel de agarose 1% (p/v), submetidos à eletroforese e corados com brometo de etídeo. A imagem foi digitalizada com o aparelho *ImageQuant LAS 4000* (GE Healthcare Life Sciences). Os produtos de PCR obtidos foram purificados, a partir do gel de

agarose, utilizando o kit *Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare), segundo orientações do fabricante.

**Quadro 2 - Programa de termociclagem das reações de PCR.**

PCR	Desnaturação inicial	35 ciclos			Extensão final
		Desnaturação	Anelamento	Extensão	
Pro_Ce_jnk-1	94 °C / 5'	94 °C / 30"	55 °C / 30"	72 °C / 3'30"	72 °C / 10'
CDS_Ce_JNK-1				72 °C / 2'	
CDS_Sm_JNK					

#### 4.7.3 Clonagens

Os produtos de PCR purificados foram submetidos à reação de ligação com o vetor pGEM<sup>®</sup>-T, utilizando o kit de clonagem *pGEM<sup>®</sup>-T Vector Systems* (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. Os produtos da reação de ligação foram utilizados para transformação de *E. coli* DH5α eletrocompetente, por eletroporação no equipamento *Gene Pulser Xcell™ Total System* (Bio-Rad). Os transformantes foram selecionados em meio LB contendo ampicilina (150 µg/mL), X-Gal (10 µg/mL) e IPTG (125 µM).

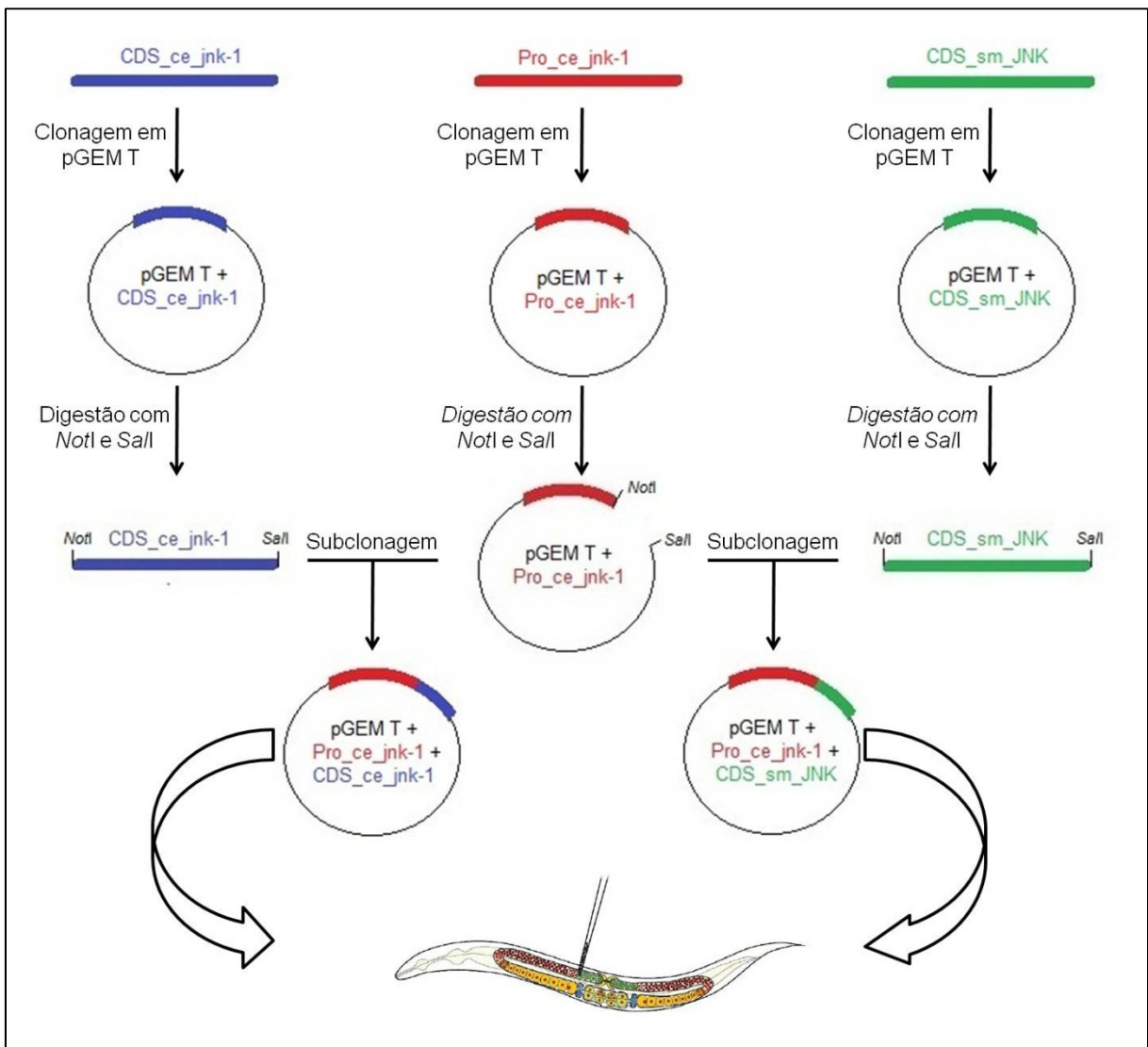
As clonagens foram confirmadas por PCR de colônia e sequenciamento do DNA plasmidial, o qual foi extraído utilizando-se o kit *NucleoSpin® Plasmid* (MACHEREY-NAGEL), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA plasmidial extraído foi quantificado utilizando o *Nanodrop® Spectrometer ND-100* (Nanodrop). O sequenciamento foi realizado pela Plataforma de Sequenciamento de DNA do CPqRR-FIOCRUZ/MG utilizando o kit de sequenciamento *DYEnamic ET Dye terminator* (GE Healthcare Life Sciences) no sequenciador de capilar MegaBACE 1000 (GE Healthcare Life Sciences). As sequências geradas foram comparadas às sequências utilizadas para o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores, através de alinhamento múltiplo global utilizando o programa ClustalX2 (<http://www.clustal.org>).

#### 4.7.4 Subclonagens

O plasmídeo recombinante contendo a região promotora (Pro\_Ce\_jnk-1), bem como os plasmídeos contendo as CDS de *C. elegans* e *S. mansoni*, foram digeridos com as endonucleases de restrição *NotI* e *SalI* (Promega), submetidos à eletroforese

em gel de agarose e, posteriormente purificados, utilizando o kit Illustra™ GFX™ PCR DNA *and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare).

Os fragmentos correspondentes às CDS da proteína Ce\_JNK-1 e Sm\_JNK digeridas foram submetidos à reação de ligação com o plasmídeo recombinante contendo a região promotora do gene *jnk-1* linearizado, utilizando-se a enzima *T4 DNA ligase* (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. Os produtos das reações de ligação foram utilizados para transformação de *E. coli* DH5α eletrocompetente, por eletroporação no equipamento *Gene Pulser Xcell™ Total System* (Bio-Rad). Os transformantes foram selecionados em meio LB contendo ampicilina (150 µg/mL). As clonagens foram confirmadas por PCR de colônia, digestão com as endonucleases de restrição *NotI* e *SalI*, e sequenciamento do DNA plasmidial, conforme descrito anteriormente (Figura 6).



**Figura 6 - Construção dos cassetes de expressão.** Esquema das clonagens e subclonagens realizadas na construção dos cassetes de expressão que foram utilizados na microinjeção.

#### 4.8 Sincronização de *C. elegans* por lise alcalina

Para obtenção de culturas sincronizadas de *C. elegans*, em que todos os espécimes encontram-se no mesmo estágio de desenvolvimento, hermafroditas grávidos foram submetidos à lise alcalina, procedimento que permite a sobrevivência apenas de ovos.

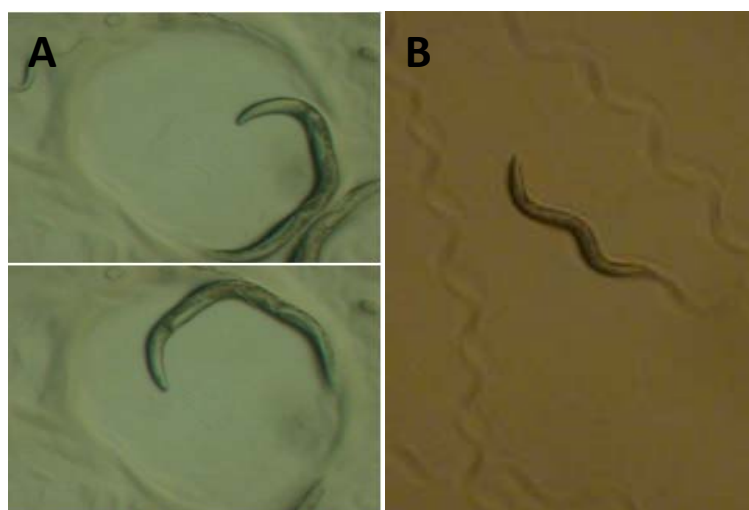
Os vermes foram removidos da placa com tampão M9 e a suspensão foi centrifugada a 2000 g por 2 minutos, em tubos de 1,5 mL. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 1 mL de solução de lise. Os vermes foram agitados com auxílio de equipamento do tipo Vortex por, no máximo, 5 minutos, até que os vermes fossem dissolvidos e os ovos liberados. A suspensão foi centrifugada a 2000 g por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado por pelo

menos 3 vezes com tampão M9. O *pellet* foi então ressuspendido em tampão M9 e os tubos mantidos, *overnight*, a 20 °C, sob leve agitação, permitindo a eclosão das larvas e obtenção de cultura sincronizada no estágio larval L1, devido à ausência de alimento. Os animais em L1 foram então transferidos para placas de NGM com *E. coli* OP50 e mantidos a 20 °C, pelo tempo necessário para o *C. elegans* chegar ao estágio de interesse.

#### 4.9 Transformação de *C. elegans*

O DNA plasmidial das construções obtidas foi utilizado para transformar a linhagem N2 Bristol de *C. elegans*. A inserção do DNA foi realizada através da técnica de microinjeção de DNA, utilizando o microinjetor *FemtoJet* (Eppendorf) e o microscópio *Eclipse TS100* (Nikon) disponíveis no Laboratório de Malária, gentilmente disponibilizados pelo Dr. Luciano Andrade Moreira, CPqRR-FIOCRUZ/MG.

Para a transformação foram utilizados *C. elegans* adultos jovens (aproximadamente 65 h após plaqueamento do estágio L1), bem alimentados, da linhagem N2 Bristol. Os cassetes de expressão obtidos foram co-transformados com o plasmídeo pRF4 (*rol-6(su1006)*), um marcador de transformação que induz o fenótipo *roller* dominante, em que os animais se movimentam em círculos (Figura 7). Os plasmídeos recombinantes foram utilizados na concentração de 50 ng/μL e o plasmídeo pRF4 na concentração de 100 ng/μL, conforme descrito em Oh *et al.*, (2005). Porém, o volume injetado em cada animal não é controlado.



**Figura 7 – Movimento *roller*.** Animais que carregam o alelo *rol-6(su1006)* exibem movimento helicoidal retorcido na cutícula e corpo (A) em comparação ao movimento normal (B). (Imagens: Worm pics: <https://qshare.queensu.ca/Users01/chinsang/www/chinsanglab/photos.htm>)

Os animais foram posicionados em lâminas contendo uma fina camada de agarose 2 % e recobertos com óleo para microinjeção (*Injectol-700, Knudra*). A solução contendo o DNA dos plasmídeos recombinantes juntamente com o plasmídeo pRF4 foi carregada em agulhas de microinjeção produzidas a partir de capilares de vidro (*Glass Capillary with Filament GD-1, NARISHIGE*), utilizando um puxador de agulhas mecânico (*Model PC-10 Puller, NARISHIGE*) com os parâmetros Step1, 68,2 °C. O DNA foi injetado no braço distal das gônadas dos vermes, com o auxílio de um micromanipulador (*Model MM-151, NARISHIGE*) e utilizando o *FemtoJet* com 20,0 psi de pressão de injeção e 1,50 psi de pressão de compensação. Após a injeção os animais foram recuperados com tampão M9 e transferidos para placas de Petri contendo NGM e uma camada de *E. coli* OP50. Nos dias seguintes os animais rolantes obtidos na geração F1 foram individualmente clonados em novas placas, e cada F1 considerada uma diferente linhagem. As linhagens que herdaram e manifestaram o fenótipo *roller* na geração F2 e posteriores foram consideradas estáveis. As linhagens transgênicas obtidas foram cultivadas e mantidas separadamente, conforme descrito no item 4.3.

#### **4.10 Análise da expressão de JNK nas linhagens transgênicas – RT-qPCR**

Os níveis de transcrito do gene *jnk-1* de *C. elegans*, bem como os níveis de transcrito do gene *jnk* de *S. mansoni* foram avaliados por PCR em tempo real quantitativa (RT-qPCR). Os níveis de transcritos nas linhagens transgênicas obtidas foram comparados com o nível de transcritos nas linhagens N2 e N2 *Ex[rol-6]*.

O RNA total foi extraído a partir de 100 animais rolantes pelo método de TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen). A síntese de cDNA foi realizada com *SuperScript II reverse transcriptase* (Invitrogen – Life Technologies) (ver item 4.6), utilizando-se a mesma quantidade de RNA total para cada amostra. Para remoção de RNA do híbrido cDNA:RNA foi realizada a digestão com RNase H após a síntese da primeira fita de DNA. As amostras foram armazenadas a -20 °C para posterior utilização.

Os oligonucleotídeos iniciadores para os experimento de RT-qPCR foram desenhados para amplificar fragmentos de 100 a 150 pb utilizando o programa Primer, versão 4 (<http://Frodo.wi.mit.edu/primer3>), com os seguintes parâmetros modificados: *Max Polly x = 2*, *GC clamp = 2* e *Product Size Ranges = 100-150 pb*. (Quadro 1). O programa *Oligo Analyzer* (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>), foi utilizado para verificar a possível formação de dímeros de primer,



grampos, estruturas secundárias e para evitar a baixa especificidade na ligação na extremidade 3'. Em seguida foi realizada uma busca por similaridade com BLAST para verificar se as sequências alinhavam apenas com a sequência de interesse.

**Quadro 3 - Lista de iniciadores utilizados na RT-qPCR.**

Alvo	Nome	Sequência (5'→3')
Sm_JNK	RT_Sm_JNK_F	TTAAGTAGAATGTTGGTGATTGATCC
	RT_Sm_JNK_R	TTACTTCAGAGTCTTCATACCATACG
Ce_JNK-1	RT_Ce_JNK-1_F	ACAACACTCTGCTCGCATCC
	RT_Ce_JNK-1_R	TCTCGACCAGATGATGATGG
RHO GTPase	RT_Ce_cdc-42_F	CTGCTGGACAGGAAGATTACG
	RT_Ce_cdc-42_R	CTCGGACATTCTCGAATGAAG

As reações de amplificação foram padronizadas para verificar a eficiência da amplificação e definição das concentrações. Para isso, três diferentes concentrações: 200 nM, 400 nM e 600 nM foram utilizadas para cada iniciador. Para o iniciador RT\_Ce\_JNK-1 foram também utilizadas as concentrações de 1 mM, 3 mM, 6mM e 10 mM. O cDNA foi utilizado em diferentes concentrações (diluição seriada do cDNA a partir de 50 ng/μL de RNA total). Como normalizador foi utilizado o gene da RHO GTPase (*cdc-42*) de *C. elegans*, que apresenta níveis de expressão estáveis (HOOGEWIJS *et al.*, 2008) (Quadro 3). Os valores  $C_t$  (*Cycle threshold*) foram plotados em função da diluição do cDNA. A eficiência dos iniciadores foi medida através da análise das inclinações das curvas (entre -3,2 e -2,1) combinada aos cálculos dos coeficientes  $R^2$  (foram considerados valores maiores que 0,92) indicando reprodutibilidade entre as triplicatas.

Para verificar o nível de transcrito dos genes inseridos, utilizamos cDNA extraído das linhagens N2, N2 *Ex[rol-6]* e das linhagens transgênicas obtidas. As amostras foram amplificadas com iniciadores específicos e com iniciadores para o gene *cdc-42* (controle para normalização) em triplicata. As reações foram compostas de 12,5 μL de SYBR<sup>®</sup> *Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 1,0 μL de cDNA e cada iniciador na concentração padronizada, em um volume final de 25 μL. Foram realizados também controles negativos (contendo todos os reagentes para síntese de cDNA e para amplificação, exceto o RNA) e controle de DNA genômico das amostras (onde todos os reagentes foram adicionados, com exceção da transcriptase reversa). As reações foram realizadas em placas *96-Well Optical Reaction Plate* (ABI PRISM, Applied Biosystems) no aparelho *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems). A expressão relativa foi analisada através do método

do  $\Delta\Delta C_t$  onde os valores  $C_t$  de cada amostra foram subtraídos do  $C_t$  do normalizador (*cdc-42*) ( $\Delta C_t$ ) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Em seguida, os valores correspondentes ao  $\Delta C_t$  encontrados para cada amostra foi subtraído do  $\Delta C_t$  normalizado. Os níveis de expressão de cada gene foram comparados com os níveis de expressão do gene *jnk-1* na linhagem N2 *Ex[rol-6]*.

#### **4.11 Ensaio de longevidade**

Os ensaios de longevidade foram realizados a 20 °C, para as linhagens N2, N2 *Ex[rol-6]* e para as linhagens transgênicas obtidas. Foram transferidos 90 animais de cada linhagem, em estágio L4, para 3 placas de NGM contendo FUdR (12 µg/mL), que inibe o crescimento da progênie, e OP50 como alimento. A cada dois dias foi verificada a sobrevivência dos animais. Os ensaios de longevidade foram repetidos 3 vezes. Os dados obtidos foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism, versão 5.01 e a significância foi verificada com o teste de *Log-rank* (*Mantel-Cox*).

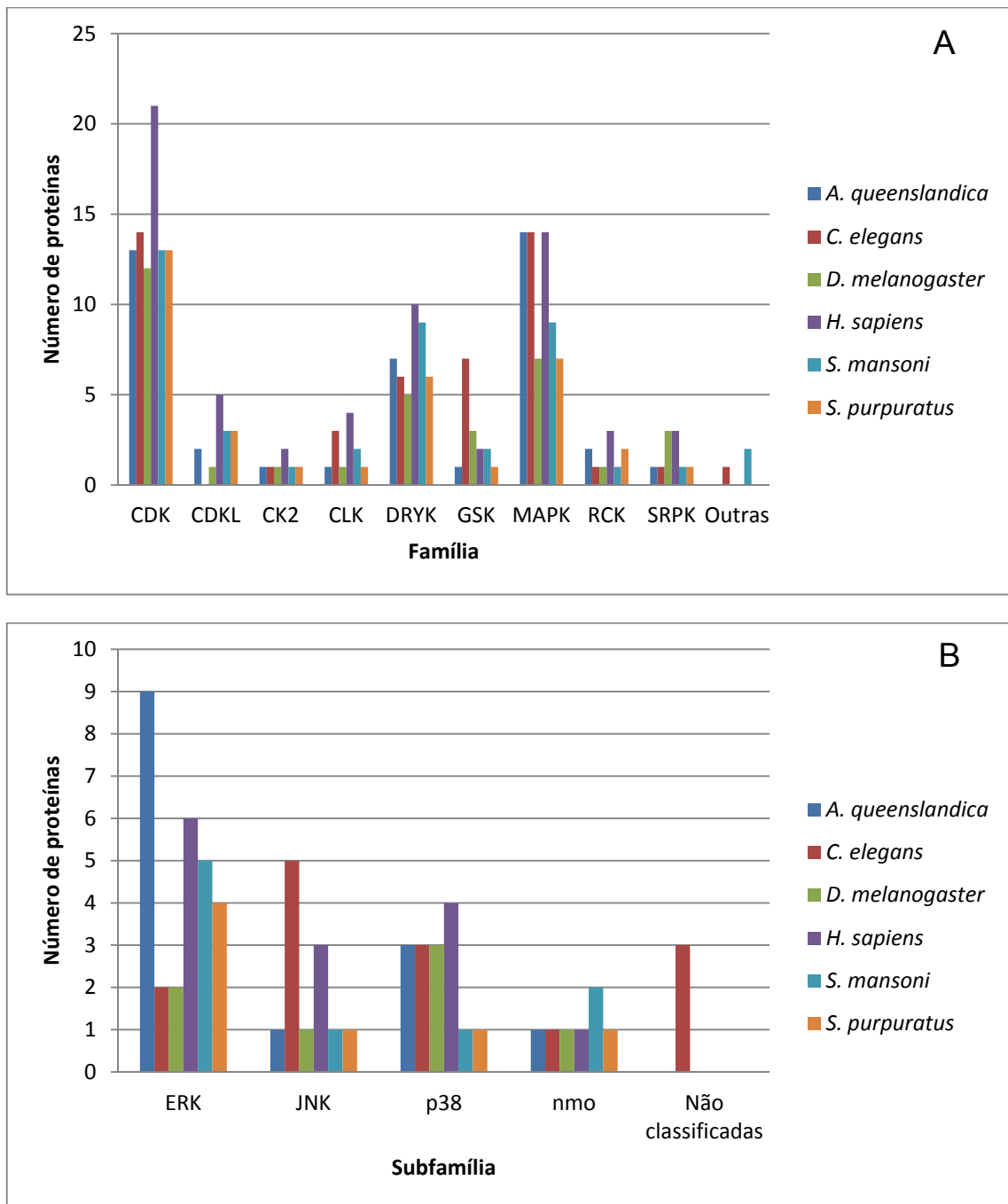
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análise das relações evolutivas

O grupo CMGC inclui as famílias CDK (*Cyclin Dependent Kinase*), CDKL (*CDK-like Kinases*), CK2 (*Cell Kinase 2*), CLK (*CDC-Like Kinase*), DRYK (*Dual-specificity Tyrosine Regulated Kinase*), GSK (*Glycogen Synthase 3 Kinase*), MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*), RCK (*ros cross-hybridizing kinase*) e SRPK (*SR-rich Protein Kinase*).

Potenciais homólogos das proteína quinases do grupo CMGC de *S. mansoni* nos organismos *A. queenslandica*, *C. elegans*, *D. melanogaster*, *H. sapiens* e *S. purpuratus* foram identificados através do KinBase (<http://kinase.com/KinBase/>). *S. mansoni* possui 43 proteínas deste grupo (ANDRADE *et al.*, 2011), *A. queenslandica* 42 proteínas, *C. elegans* 48 proteínas, *D. melanogaster* 34 proteínas, *H. sapiens* 64 proteínas e *S. purpuratus* 35 proteínas. A diversidade de genes codificantes de proteína quinases do grupo CMGC nas espécies foi comparada de acordo com a classificação de quinases em grupos, famílias e subfamílias baseada na taxonomia de Hanks e Hunter (HANKS; HUNTER, 1995). *S. mansoni* possui representantes em todas as famílias deste grupo (Figura 8 A), sendo CDK a família com maior número de representantes e CK2 a família com menor número de representantes.

A proteína JNK, alvo deste estudo, pertence à família MAPK que inclui as subfamílias ERK1, ERK3, ERK5 e ERK7 (*Extracellular Signal-Regulated Kinase*), JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), p38 (*P38 mitogen-activated protein kinase*) e nmo (*nemo-like kinase*). *S. mansoni* possui representantes em todas as subfamílias desta família (Figura 8 B), sendo ERK a subfamília com maior número de representantes. As subfamílias JNK e p38 possuem apenas um representante em *S. mansoni*.



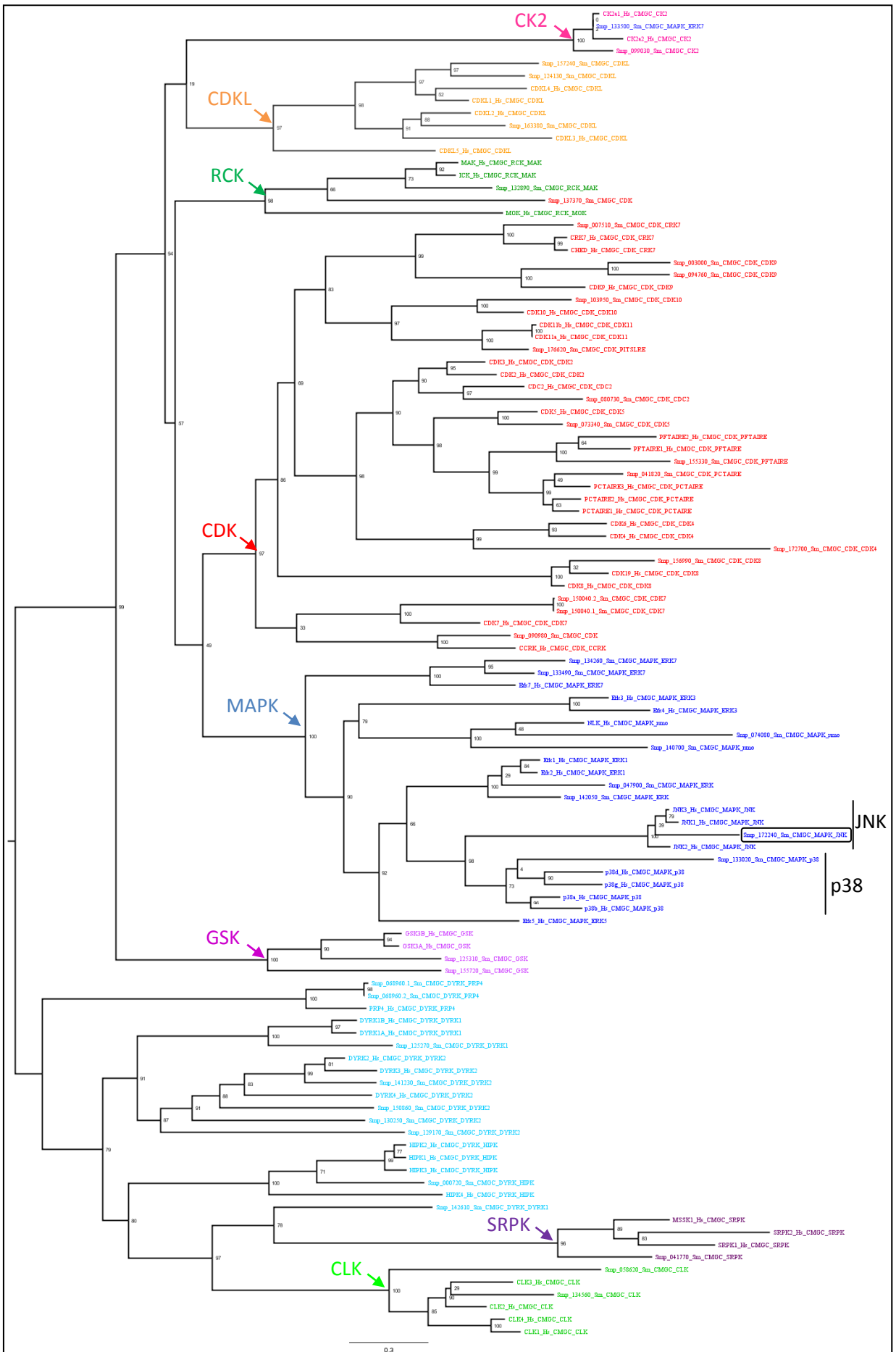
**Figura 8- Distribuição das proteína quinases do grupo CMGC.** Proteína quinases de *A. queenslandica*, *C. elegans*, *D. melanogaster*, *H. sapiens*, *S. mansoni* e *S. purpuratus* foram classificadas de acordo com a taxonomia adotada pelo KinBase (<http://kinase.com/KinBase/>). (A) Distribuição por família das proteína quinases do grupo CMGC de *A. queenslandica*, *C. elegans*, *D. melanogaster*, *H. sapiens*, *S. mansoni* e *S. purpuratus*. (B) Distribuição por subfamília da família MAPK de *A. queenslandica*, *C. elegans*, *D. melanogaster*, *H. sapiens*, *S. mansoni* e *S. purpuratus*.

As relações evolutivas entre as proteína quinases do grupo CMGC de *S. mansoni* e *H. sapiens* foram reconstruídas a partir das 107 sequências do domínio quinase, sendo 43 provenientes do proteoma de *S. mansoni* e 64 do proteoma de *H.*

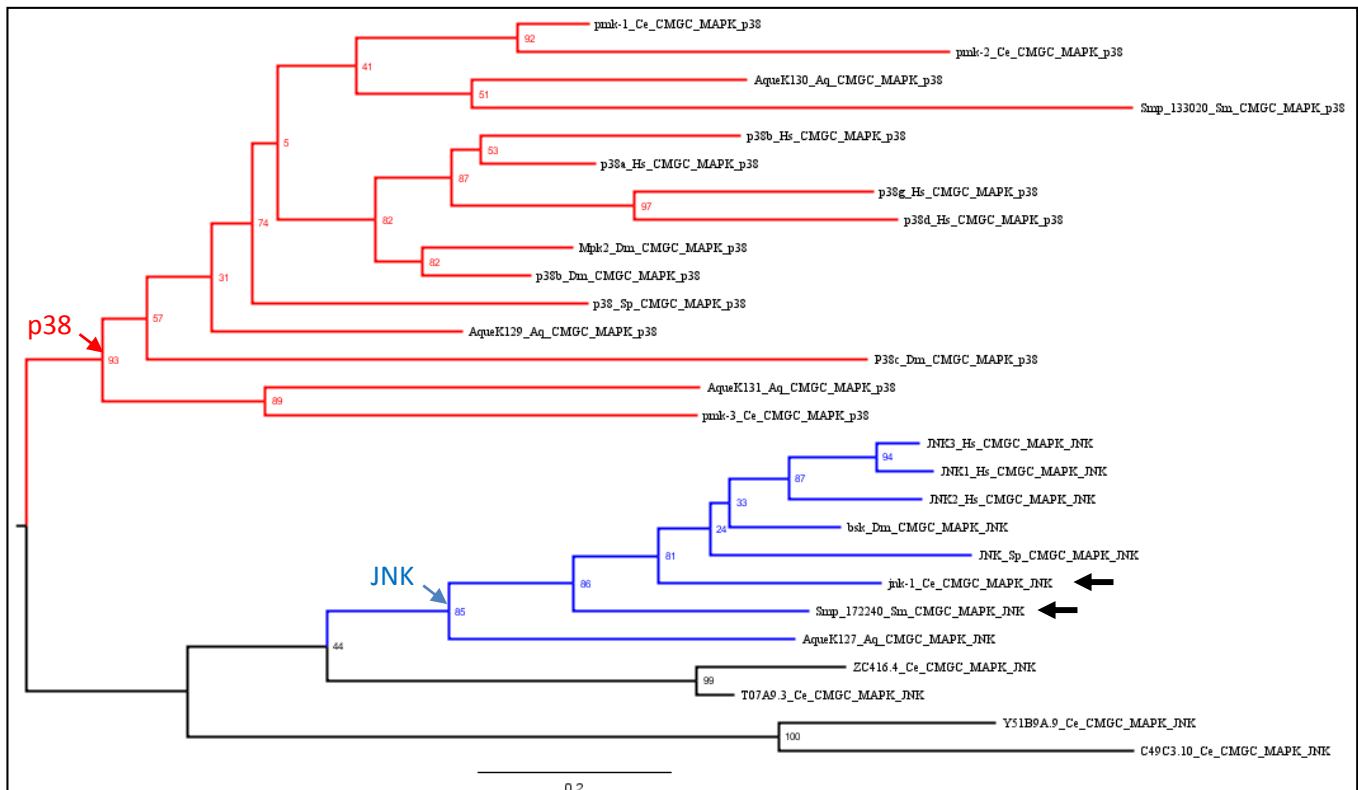
*sapiens* (Figura 9). A maioria das famílias tem origem monofilética (indicada pelas setas) e pode ser identificada em clados com apoio estatístico maior que 80 %.

Na família MAPK, as subfamílias JNK e p38 são grupos irmãos, porém as relações evolutivas entre as proteínas JNK de *S. mansoni* e as 3 proteínas JNK de *H. sapiens* não estão bem resolvidas. Para melhor compreender as relações evolutivas entre as proteínas quinases JNK e p38 foram reconstruídas árvores filogenéticas a partir de 27 sequências do domínio quinase, sendo quatro sequências de *A. queenslandica*, oito de *C. elegans*, quatro de *D. melanogaster*, sete de *H. sapiens*, e duas de *S. purpuratus* (Figura 10). As subfamílias JNK e p38 separam-se em 2 clados com apoio estatístico maior que 80 %.

No KinBase, as 4 proteínas de *C. elegans* (ZC416.4, T07A9.3, Y51B9A.9 e C49C3.10) são classificadas como pertencentes à subfamília JNK, porém seu agrupamento com o clado de JNK não tem apoio estatístico. Já no UniProt, as proteínas ZC416.4 e T07A9.3 são classificadas como pertencentes à subfamília JNK, entretanto, as proteínas Y51B9A.9 e C49C3.10 não possuem classificação no nível de grupo, família e subfamília. A proteína JNK de *S. mansoni* está mais proximamente relacionada à proteína JNK-1 de *C. elegans* em relação às demais proteínas (ZC416.4, T07A9.3, Y51B9A.9 e C49C3.10) classificadas como pertencentes à subfamília JNK, o que justifica a escolha do homólogo *jnk-1* para os ensaios de expressão heteróloga.



**Figura 9 - Relações evolutivas entre proteína quinases do grupo CMGC de *S. mansoni* (Sm) e *H. sapiens* (Hs).** Árvore filogenética das proteína quinases do grupo CMGC de *S. mansoni* e *H. sapiens*, reconstruída a partir do alinhamento dos aminoácidos do domínio quinase (PF00069) pelo método de máxima verossimilhança. Os valores de apoio dos agrupamentos apresentados na árvore foram obtidos através do *approximate Likelihood Ratio Test* (aLRT) (ANISIMOVA; GASCUEL, 2006; GUINDON *et al.*, 2003). As famílias com origem monofilética estão indicadas por setas. As subfamílias JNK e p38 estão assinaladas pelas barras verticais. A proteína quinase JNK de *S. mansoni* em estudo neste trabalho está destacada por um retângulo preto. As proteínas em rosa pertencem à família CK2, amarelo: CDKL, verde: RCK, vermelho: CDK, azul escuro: MAPK, lilás: GSK, azul claro: DYRK, roxo: SRPK e verde claro: CLK.



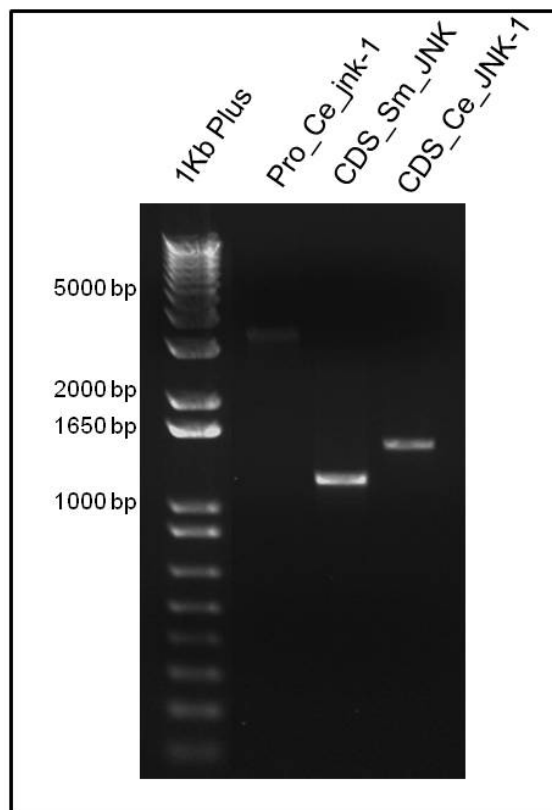
**Figura 10 - Relações evolutivas entre proteína quinases JNK e p38 de diversos organismos.** Árvore filogenética das proteína quinases das subfamílias JNK (azul) e p38 (vermelho) de *A. queenslandica* (Aq), *C. elegans* (Ce), *D. melanogaster* (Dm), *H. sapiens* (Hs), *S. mansoni* (Sm) e *S. purpuratus* (Sp), reconstruída a partir do alinhamento dos aminoácidos do domínio quinase (PF00069) pelo método de máxima verossimilhança. Os valores de apoio dos agrupamentos apresentados na árvore foram obtidos através do *approximate Likelihood Ratio Test* (aLRT) (ANISIMOVA; GASCUEL, 2006; GUINDON *et al.*, 2003). As setas indicam a proteína JNK-1 de *C. elegans* e a proteína JNK de *S. mansoni* em estudo.

## 5.2 Construção dos cassetes de expressão

A anotação funcional das ePKS de *S. mansoni* realizada por Andrade *et al.* (2011) permitiu um melhor entendimento da diversidade e do papel dessas proteínas neste organismo. Com base na importância funcional dos ortólogos identificados, foi

selecionada a proteína quinase Sm\_JNK, que apresenta função predita essencial para o desenvolvimento e sobrevivência de outros organismos. A proteína Sm\_JNK é uma proteína quinase da classe serina/treonina pertencente ao grupo CMGC, família MAPK e subfamília JNK, que tem um único representante em *S. mansoni*. Em *C. elegans* foi selecionado o gene *jnk-1* que codifica uma proteína quinase que é um provável ortólogo da proteína Sm\_JNK de *S. mansoni*.

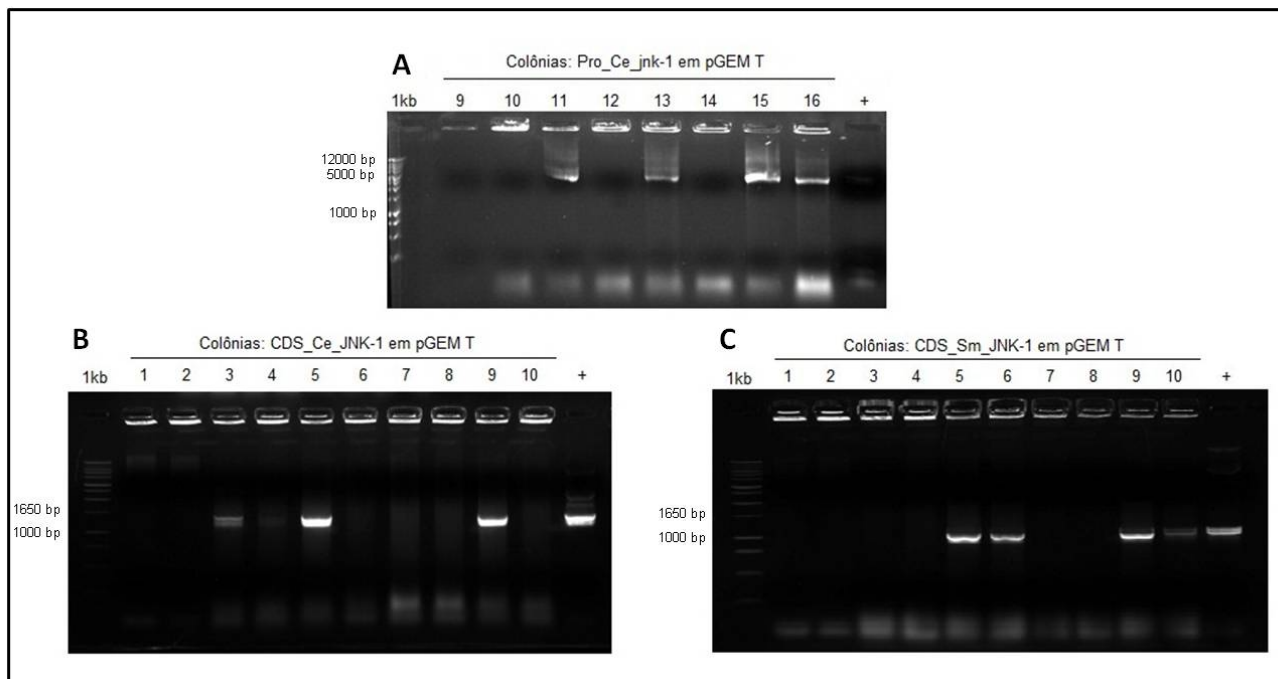
Para a construção dos cassetes de expressão, utilizando os iniciadores desenhados e o cDNA sintetizado a partir do RNA extraído da linhagem N2 de *C. elegans*, foi amplificada a região promotora do gene *jnk-1* (Pro\_Ce\_jnk-1) por reação em cadeia da polimerase (PCR). Foi obtida uma banda de tamanho correspondente ao esperado (3000 pb). A região codificadora da proteína Ce\_JNK-1 de *C. elegans* (CDS\_Ce\_JNK-1) foi amplificada por PCR. Foi obtida uma banda de tamanho correspondente ao esperado (1392 pb). A região codificadora da proteína Sm\_JNK de *S. mansoni* (CDS\_Sm\_JNK) foi amplificada por PCR, utilizando os iniciadores desenhados e o cDNA sintetizado a partir do RNA extraído de cultura de esquistossômulos. Foi obtida uma banda de tamanho correspondente ao esperado (1128 pb) (Figura 11).



**Figura 11 - Produtos de PCR amplificados.** Gel de agarose 1 % dos produtos de PCR obtidos nas amplificações da região promotora (Pro\_Ce\_jnk-1) e das regiões codificantes (CDS\_Sm\_JNK e CDS\_Ce\_JNK-1).

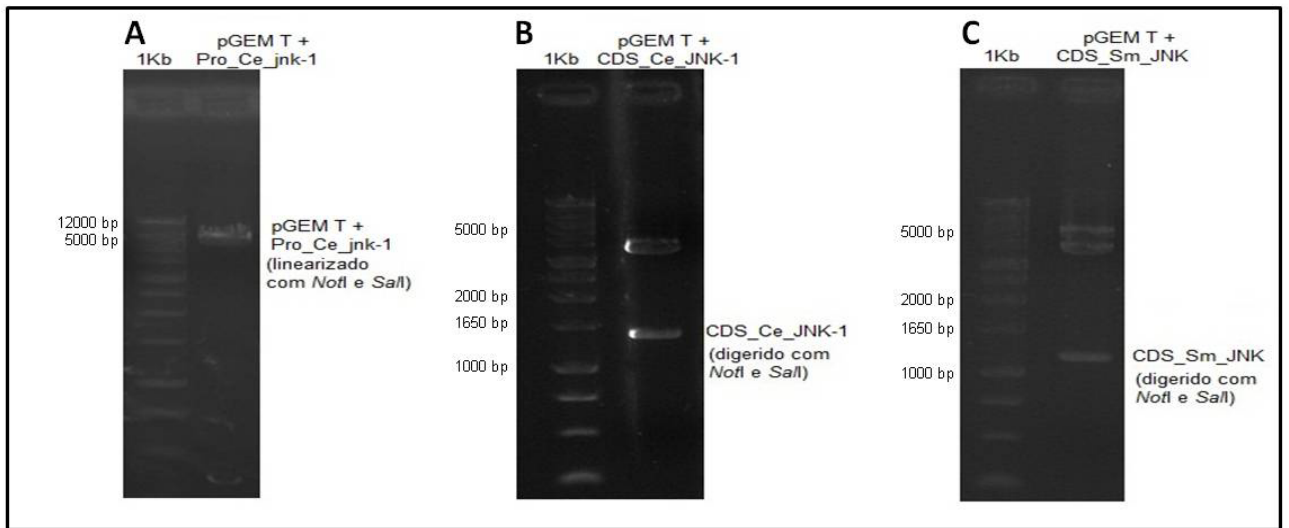


Os fragmentos amplificados, foram purificados a partir de géis de agarose 1 %, e clonados em vetor pGEM<sup>®</sup>-T. As clonagens foram confirmadas por PCR de colônia (Figura 12), e sequenciamento dos plasmídeos recombinantes obtidos. Foi realizado o alinhamento das sequências obtidas com as sequências utilizadas para o desenho dos iniciadores e verificou-se que as mesmas estavam na orientação correta.



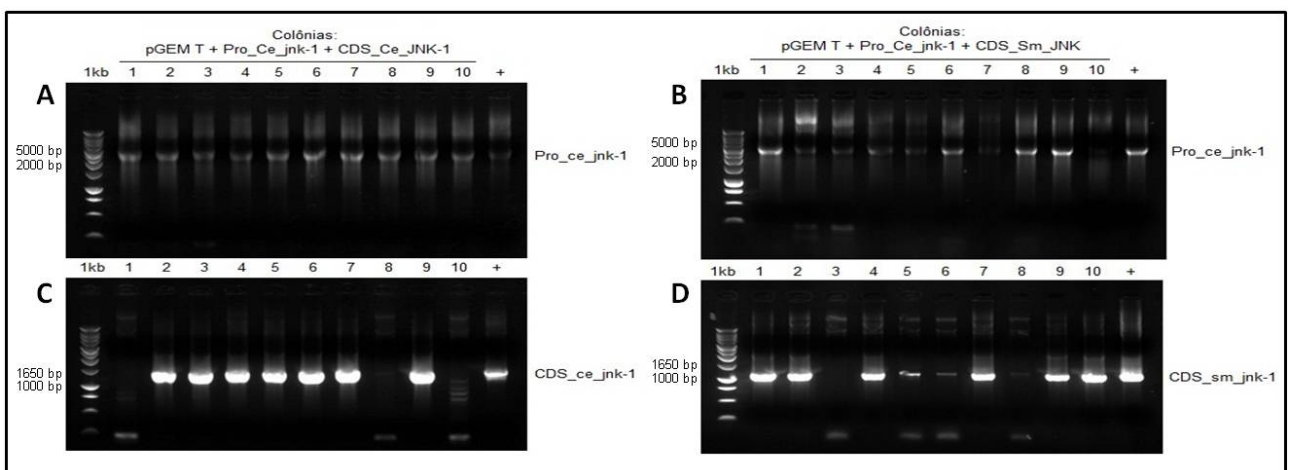
**Figura 12 – PCR de colônia para confirmação de clonagens.** Gel de agarose 1 % dos produtos amplificados por PCR de colônia para confirmação das clonagens da região promotora (A), da CDS da proteína Ce\_JNK-1 (B) e da CDS da proteína Sm\_JNK (C).

Após a confirmação, foram realizadas subclonagens através da ligação das CDS de *C. elegans* (CDS\_Ce\_JNK-1) e *S. mansoni* (CDS\_Sm\_JNK) com o plasmídeo recombinante contendo a região promotora (Pro\_Ce\_jnk-1). As CDS foram obtidas por digestão dos plasmídeos acima com as enzimas de restrição *NotI* e *SaII*, que também foram utilizadas para linearizar o plasmídeo recombinante contendo a região promotora (Figura 13).

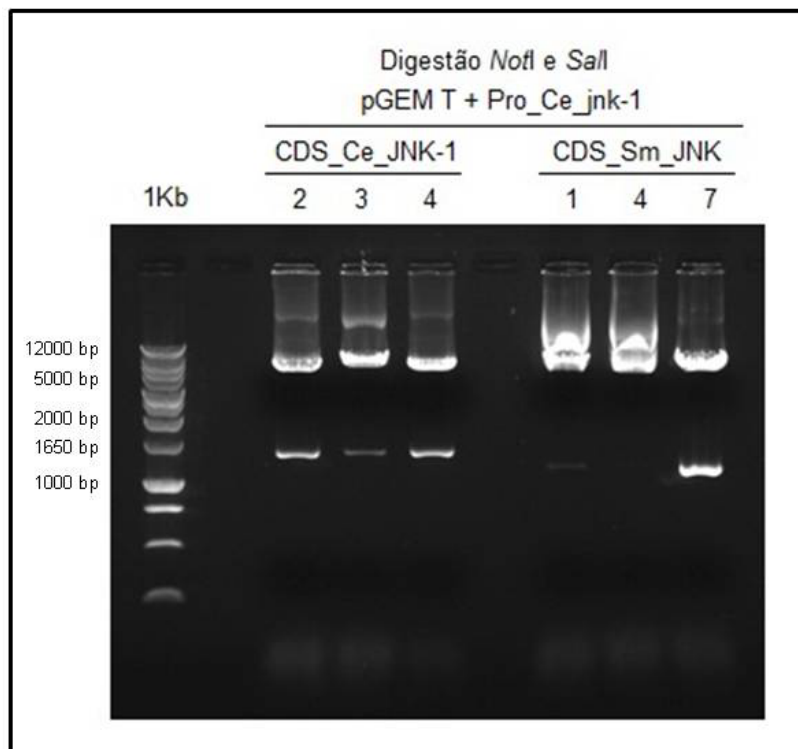


**Figura 13 - Digestão para obtenção do plasmídeo recombinante contendo a região promotora e dos fragmentos das regiões codificantes.** Gel de agarose 1 % dos produtos da digestão dos plasmídeos recombinantes com as enzimas de restrição *NotI* e *Sall*, obtendo-se o plasmídeo pGEM T com a região promotora do gene *jdk-1* linearizado (A) e as CDS da proteína Ce\_JNK-1 (B) e da proteína Sm\_JNK (C) digeridas.

As clonagens foram confirmadas por PCR de colônia (Figura 14), digestão com as endonucleases de restrição *NotI* e *Sall* (Figura 15), e sequenciamento do plasmídeos recombinantes obtidos. A seguir, foi realizado o alinhamento das seqüências obtidas com as seqüências utilizadas para o desenho dos iniciadores e verificou-se que as mesmas estavam na orientação correta. Dessa forma, foram obtidas a construção contendo a região promotora de *jdk-1* e a região codificante da proteína Ce\_JNK-1 e a construção contendo a região promotora de *jdk-1* de *C. elegans* e a região codificante da proteína Sm\_JNK (Figura 6).



**Figura 14 – PCR de colônia para confirmação de subclonagens.** Gel de agarose 1 % dos produtos amplificados por PCR de colônia para confirmação da presença da região promotora (A e B) e das clonagens das CDS da proteína Ce\_JNK-1 (C) e da proteína Sm\_JNK (D).



**Figura 15 - Digestão para confirmação de subclonagens.** Gel de agarose 1 % dos produtos da digestão dos plasmídeos recombinantes com as enzimas de restrição *NotI* e *Sall*, obtendo-se o plasmídeo pGEM T com a região promotora do gene *jnk-1* e as CDS da proteína Ce\_JNK-1 e da proteína Sm\_JNK.

### 5.3 Obtenção de linhagens transgênicas de *C. elegans*

A completa transformação de *C. elegans* requer a introdução de DNA exógeno na linhagem germinativa, o DNA exógeno deve ser mantido e transmitido para as gerações posteriores. Para a obtenção de linhagens de *C. elegans* superexpressando os genes *Ce\_jnk-1* e *Sm\_jnk*, os cassetes de expressão obtidos foram utilizados na microinjeção de *C. elegans* e co-transformados com o plasmídeo pRF4 (*rol-6(su1006)*). Cerca de 25 animais da linhagem N2 foram injetados com 100 ng/ $\mu$ L do plasmídeo pRF4 e 50 ng/ $\mu$ L dos plasmídeos obtidos (Pro\_Ce\_CDS\_Ce\_JNK-1 ou Pro\_Ce\_CDS\_Sm\_JNK). Os animais injetados foram transferidos para placas de Petri e propagados por duas gerações.

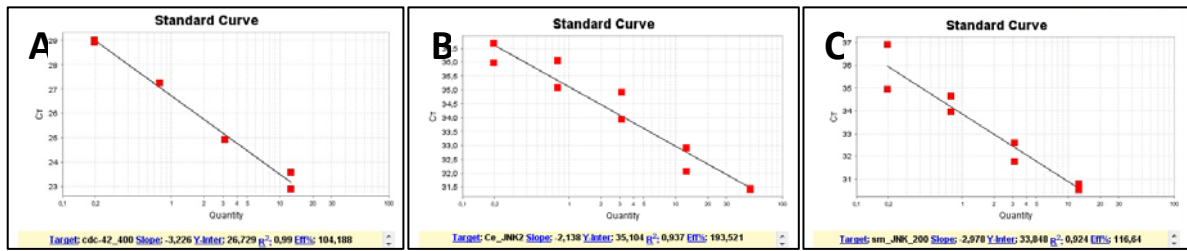
A análise da F1 dos animais microinjetados com o plasmídeo Pro\_Ce\_CDS\_Ce\_JNK-1 resultou em 43 animais rolantes dos quais 7 % foram estáveis, obtendo-se três linhagens transgênicas, denominadas N2 Ex01[*Ce\_jnk-1*], N2 Ex02[*Ce\_jnk-1*] e N2 Ex03[*Ce\_jnk-1*]. A análise da F1 dos animais microinjetados com o plasmídeo Pro\_Ce\_CDS\_Sm\_JNK apresentou 21 animais rolantes dos quais aproximadamente 10 % foram estáveis, obtendo-se duas linhagens transgênicas

que foram denominadas N2 *Ex04[Sm\_jnk]* e N2 *Ex05[Sm\_jnk]*. A microinjeção da linhagem N2 utilizando apenas o plasmídeo pRF4 resultou em quatro animais rolantes na F1, porém nenhuma linhagem foi estável. Desta forma, nas análises posteriores, passou-se a utilizar a linhagem N2 *Ex[rol-6]* gentilmente cedida pela Dra. Riva de Paula Oliveira.

#### **5.4 Estudo dos níveis de transcrito de *jnk* nas linhagens transgênicas**

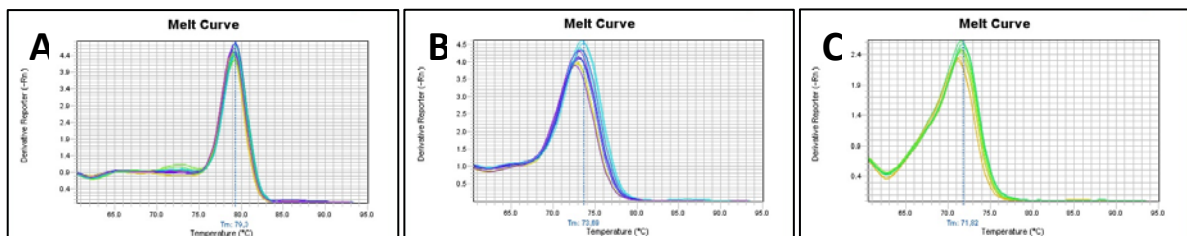
Para verificar se as linhagens transgênicas estavam expressando os genes inseridos foi realizada a quantificação por RT-qPCR dos níveis de mRNA de Ce\_JNK-1 e Sm\_JNK. Os níveis de transcritos em cada linhagem foram comparados com o nível de transcritos na linhagem N2 *Ex[rol-6]*. A quantidade de RNA total nas diferentes amostras foi normalizada utilizando o gene *cdc-42* que codifica uma RHO GTPase (HOOGEWIJS *et al.*, 2008).

Primeiramente, a concentração de oligonucleotídeo em cada reação foi padronizada seguindo uma matriz com diferentes molaridades, a saber, 200, 400 e 600 nM. Para o iniciador RT\_Ce\_JNK-1 foram também utilizadas as concentrações de 1 mM, 3 mM, 6mM e 10 mM. A quantidade de cDNA foi estimada a partir da concentração inicial de RNA total dada em ng/ $\mu$ L para verificar a eficiência da amplificação e definição das concentrações. Para testar a eficiência da amplificação e definição das concentrações, foram construídas curvas padrão para cada concentração de cada iniciador, utilizando uma diluição seriada (1:4) a partir de 50 ng/ $\mu$ L do cDNA extraído da linhagem N2 para os iniciadores RT\_Ce\_cdc-42 e RT\_Ce\_JNK-1, e 50 ng/ $\mu$ L do cDNA extraído de esquistossômulos para os iniciadores RT\_Sm\_JNK (Figura 16). Foram considerados coeficientes  $R^2$  com valores maiores que 0,92 e inclinação da curva -3,2 e -2,1. Para cada par de iniciador, foi escolhida a concentração que mais se aproximou dos parâmetros desejados, a saber, 400 nM para o iniciador RT\_Ce\_cdc-42, 3 mM para o iniciador RT\_Ce\_JNK-1 e 200 nM para o iniciador RT\_Sm\_JNK.



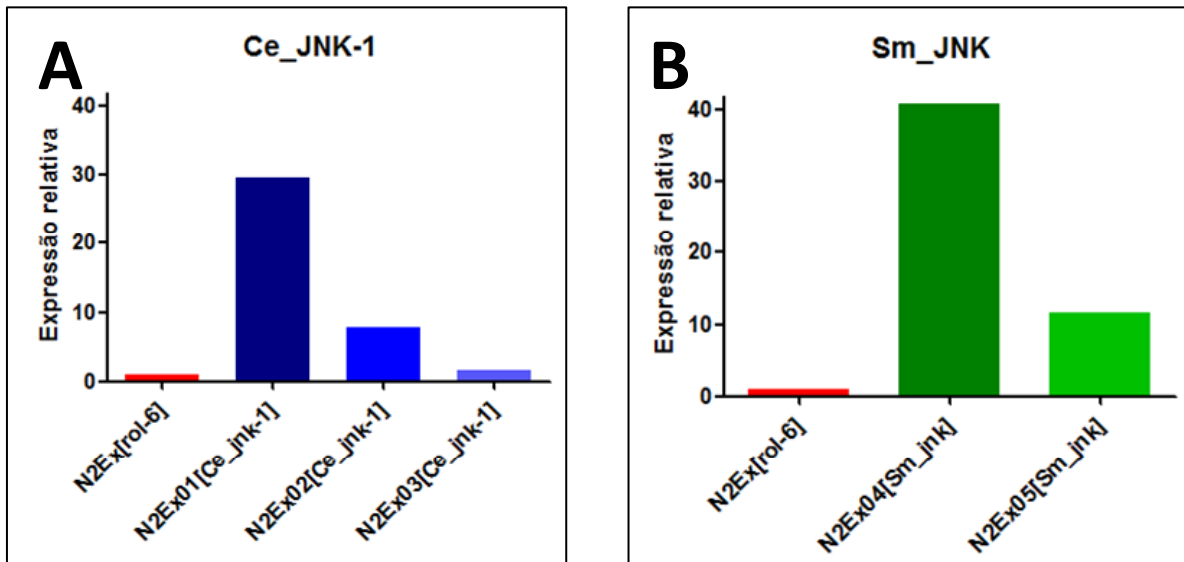
**Figura 16 - Eficiência da reação de RT-qPCR.** Curva padrão obtida a partir da diluição seriada de cDNA para os iniciadores RT\_Ce\_cdc-42 (A), RT\_Ce\_JNK-1 (B) e RT\_Sm\_JNK (C).

Outro ponto a ser observado durante a análise é a curva de dissociação, que mostra a temperatura em que ocorreu a dissociação do corante fluorescente SYBR<sup>®</sup> Green da dupla fita de DNA. O SYBR<sup>®</sup> Green é um composto fluorescente utilizado na detecção de moléculas de DNA, que intercala preferencialmente em DNA dupla fita. Na presença de contaminantes ou dímeros de iniciadores na amostra, o corante pode intercalar nas duplas fitas de acordo com o tamanho e a composição da sequência amplificada e, assim apresentar temperatura de dissociação diferente nas amostras analisadas. As curvas de dissociação dos produtos amplificados pelos iniciadores RT\_Ce\_cdc-42, RT\_Ce\_JNK-1 e RT\_Sm\_JNK, obtidas durante a reação de RT-qPCR apresentam um pico único de dissociação, indicando a presença de um único produto de PCR e, portanto, especificidade dos iniciadores para a amplificação (Figura 17).



**Figura 17 – Curva de dissociação dos produtos amplificados por RT-qPCR.** Curvas de dissociação para os iniciadores RT\_Ce\_cdc-42 (A), RT\_Ce\_JNK-1 (B) e RT\_Sm\_JNK (C).

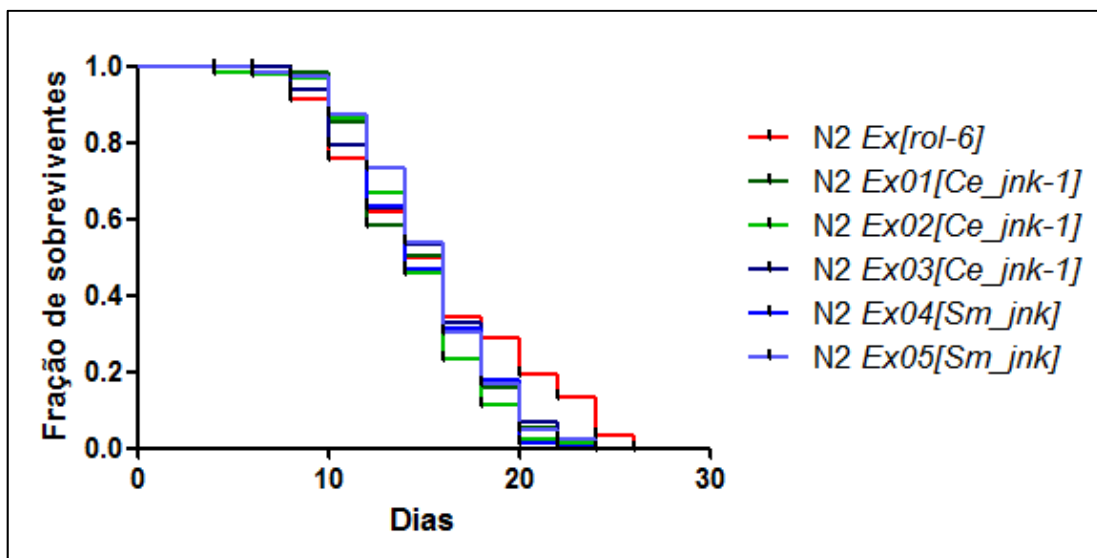
Os resultados de RT-qPCR mostraram um aumento do nível de transcritos de Ce\_JNK-1 de aproximadamente 29 vezes na linhagem N2Ex01[Ce\_jnk-1], 8 vezes na linhagem N2Ex02[Ce\_jnk-1] e 1,5 vezes na linhagem N2Ex03[Ce\_jnk-1]. Também foi observado o aumento do nível de transcritos de Sm\_JNK de aproximadamente 40 vezes na linhagem N2Ex04[Sm\_jnk] e 11 vezes na linhagem N2Ex04[Sm\_jnk].



**Figura 18 – Níveis de transcritos de Ce\_JNK-1 e Sm\_JNK.** Níveis de expressão dos transcritos Ce\_JNK-1 (A) e Sm\_JNK (B) nas linhagens transgênicas obtidas em relação à linhagem N2Ex[rol-6].

### 5.5 Análise da longevidade das linhagens transgênicas

A fim de verificar se a superexpressão de *jnk* aumenta a longevidade de *C. elegans*, a sobrevivência das linhagens transgênicas obtidas foi acompanhada, em condições normais de cultivo, a 20 °C (Figura 19 e Tabela 2). Não foi observado aumento da longevidade máxima, apenas aumento no tempo de vida médio nas linhagens N2 Ex01[Ce\_jnk-1], N2 Ex01[Ce\_jnk-1] e N2 Ex05[Sm\_jnk]. Porém o aumento de longevidade não apresenta correlação com os níveis de expressão da proteína JNK observados (Figura 18).



**Figura 19 - Sobrevivência das linhagens transgênicas de *C. elegans* a 20 °C.** Os animais foram mantidos à 20 °C. A sobrevivência foi verificada a cada dois dias. As curvas de sobrevivência Kaplan-Meier foram obtidas utilizando o GraphPad Prism, versão 5.01.

**Tabela 2 - Análise da longevidade das linhagens transgênicas de *C. elegans*.**

Linhagem	Tempo de vida médio (dias)	Tempo de vida máximo (dias)	Valor p em relação ao controle <sup>a</sup>	n <sup>b</sup>	Número de experimentos
N2 <i>Ex[rol-6]</i>	14	26	-	266/291	3
N2 <i>Ex01[Ce_jnk-1]</i>	16	24	0,0020	252/299	3
N2 <i>Ex02[Ce_jnk-1]</i>	14	24	0,0001	262/310	3
N2 <i>Ex03[Ce_jnk-1]</i>	16	24	0,0051	243/302	3
N2 <i>Ex04[Sm_jnk-1]</i>	14	24	0,0027	220/292	3
N2 <i>Ex05[Sm_jnk-1]</i>	16	24	0,0215	246/301	3

<sup>a</sup> valor de p calculado por teste *Mantel-Cox*

<sup>b</sup> n representa o número total de animais que morrem por envelhecimento normal contra aqueles no total dos experimentos

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Análise da relações evolutivas

A análise do proteoma predito de *S. mansoni* identificou 252 ePKs, representando 1,9 % do total de proteínas codificado pelo genoma do parasito, total semelhante ao observado previamente em outros organismos (ANDRADE *et al.*, 2011; MANNING, 2005). Das 252 ePKs identificadas, apenas 24 foram caracterizadas experimentalmente. O grupo CMGC é o que possui maior representatividade dentre as ePKs em *S. mansoni*. Essa abundância pode ser explicada pelo requerimento dessas proteínas para o controle da proliferação celular, bem como para garantir a correta replicação e segregação de organelas, mecanismos essenciais para o desenvolvimento de parasitos com ciclos de vida complexos. As principais famílias do grupo CMGC estão conservadas em *S. mansoni*, *S. cerevisiae*, *C. elegans*, *M. musculus*, *H. sapiens* e *D. melanogaster*, incluindo as subfamílias CDK, CDKL, CK2, CLK, DRYK, GSK, MAPK, RCK e SRPK (ANDRADE *et al.*, 2011).

Do total de 43 membros do grupo CMGC em *S. mansoni*, cerca de 21 % correspondem a membros da via MAPK, um dos mais bem caracterizados sistemas de sinalização em metazoários. Em *D. melanogaster* e *C. elegans*, a via MAPK está envolvida em processos celulares críticos e no desenvolvimento (e. q. OH *et al.*, 2005; STRONACH; PERRIMON, 2002). Os mamíferos possuem pelo menos cinco cascatas de sinalização MAPK, incluindo a via das proteínas ERK (DAVIS, R J, 1993), que regula o crescimento e diferenciação celular; a via das JNK/SAPK (DÉRIJARD *et al.*, 1994) e a via das proteínas p38 MAPKs (HAN, J. *et al.*, 1994), que funcionam essencialmente em resposta a estresse, tais como inflamação e apoptose. Em *S. mansoni* foram encontradas nove ePKs da família MAPK. As vias de sinalização de MAPKs parecem estar bem conservadas, sendo encontrados representantes das subfamílias ERK, p38, JNK e nmo. Em geral, na via das MAPK, cada subfamília é ativada por estímulos diferentes que geram diversas respostas biológicas (e. q. KONDOH; NISHIDA, 2007; NISHIMOTO; NISHIDA, 2006; WILKINSON; MILLAR, 2000).

Lidar com condições ambientais adversas é uma necessidade fundamental para todos os organismos. Portanto, não é surpreendente que vias de proteína quinases ativadas por estresse estejam entre os módulos de sinalização mais



antigos e conservados em metazoários. As duas vias arquetípicas compreendendo esta categoria são JNK e p38. Estas vias são ativadas por uma variedade de condições ambientais adversas, resultando na modificação da atividade de diversos e numerosos alvos (TWUMASI-BOATENG *et al.*, 2012).

Em *S. mansoni*, Sm\_JNK (Smp\_172240) é o único membro da subfamília JNK codificado pelo genoma deste parasito. Esta proteína possui três potenciais homólogos em humanos e cinco em *C. elegans* (Figura 10). Neste último, a Ce\_JNK-1 é ativada pela proteína CaMK2 (*unc-43*) em resposta ao estresse, regulando a apoptose celular (SAGASTI *et al.*, 2001; SUNDARAM, 2006). Vale lembrar que a existência de três representantes da subfamília JNK em humanos formando um clado monofilético, com alto valor de apoio, com a proteína Sm\_JNK de *S. mansoni* deve ser levada em consideração durante o desenvolvimento de uma possível droga anti-JNK de *S. mansoni*. Do contrário, caso essas sequências homólogas compartilhem regiões de alta identidade, existe o risco iminente de se obter efeitos colaterais que podem comprometer a saúde do hospedeiro em decorrência de efeitos *off-target* (inespecificidade do fármaco à proteína alvo) podendo resultar em reações adversas, o que corresponde a cerca de um terço das falhas durante o desenvolvimento de drogas (KENNEDY, 1997).

Homólogos à proteína Sm\_JNK desempenham papéis importantes em células humanas (NISHIMOTO; NISHIDA, 2006) e no desenvolvimento de *C. elegans*, incluindo fenótipo de letalidade embrionária e esterilidade em vermes silenciados (SUNDARAM, 2006). Além de um único representante da subfamília JNK ter sido identificado em *S. mansoni*, em contraste com o número de homólogos em *H. sapiens* e *C. elegans*, apenas um membro da subfamília p38 (Smp\_133020) foi identificado em *S. mansoni* e está envolvido na transformação do miracídio em esporocisto, porém o papel em vermes adultos ainda não foi caracterizado (RESSURREIÇÃO *et al.*, 2011a, 2011b).

## **6.2 Superexpressão de JNK e longevidade de *C. elegans***

A via de sinalização de JNK é altamente conservada e está envolvida em uma variedade de funções biológicas, incluindo desenvolvimento, apoptose e resposta a estresse (DAVIS, 2000). Como mencionado anteriormente, *C. elegans* tem três proteínas JNK preditas, sendo estas KGB-1, KGB-2 e JNK-1, expressas em células somáticas e germinativas. A perda de função de *kgb-1* resulta em esterilidade

completa em temperaturas não permissivas, enquanto a perda de função de *kgb-2* não apresenta alteração fenotípica detectável (ORSBORN *et al.*, 2007; SMITH *et al.*, 2002). A via KGB-1 está também relacionada à regulação da resposta a estresse por metais pesados (MIZUNO *et al.*, 2004). O terceiro membro da subfamília, JNK-1, atua no sistema nervoso, regulando o movimento coordenado via receptores GABA tipo D em neurônios motores (KAWASAKI *et al.*, 1999), além de ter papel no transporte de vesículas sinápticas (BYRD *et al.*, 2001). A via de sinalização de JNK consiste do homólogo JNK-1 e duas MAPKKs (JKK-1 e MEK-1). (KAWASAKI *et al.*, 1999; KOGA *et al.*, 2000; VILLANUEVA *et al.*, 2001). Estudos genéticos têm demonstrado que *jkk-1* e *jnk-1* estão envolvidos na regulação da longevidade e resposta ao estresse. JKK-1 estimula especificamente a atividade quinase de JNK-1 (KAWASAKI *et al.*, 1999). *C. elegans* mutantes de deleção para *jnk-1* tem menor tempo de vida e maior suscetibilidade ao estresse por metais pesados. Por outro lado, foi demonstrado que a superexpressão de *jnk-1* aumenta a resistência ao estresse oxidativo e prolonga a longevidade de *C. elegans* (OH *et al.*, 2005; VILLANUEVA *et al.*, 2001). No nosso experimento não observamos aumento de longevidade de *C. elegans* no caso da superexpressão do gene homólogo e nem do gene heterólogo de *S. mansoni*.

No estudo conduzido por Oh *et al.*, (2005) a região de 3 kb que inclui a região promotora de *jnk-1*, a região codificante completa e 500 pb da 3'-UTR (do inglês, *untranslated region*) do gene foram amplificadas por PCR a partir do DNA genômico de *C. elegans*, resultando em um fragmento de 9,3 kb que foi utilizado nas microinjeções de *C. elegans* N2 selvagem, na concentração de 50 ng/μL. Como marcador de transformação, foi coinjectado o plasmídeo pRF4[*rol-6(su1006)*] na concentração de 100 ng/μL. Foram obtidas linhagens transgênicas extracromossomais e integradas superexpressando o gene *jnk-1*, as quais apresentaram resultados similares, aumentando o tempo de vida de *C. elegans* em 40 % em comparação ao grupo controle. As linhagens transgênicas também apresentaram significativo aumento da resistência ao estresse térmico e oxidativo.

No presente trabalho, foi construído um cassete de expressão contendo a região de 3 kb, que inclui a região promotora de *jnk-1* amplificada por PCR a partir do DNA genômico de *C. elegans*, e a região codificante amplificada a partir do cDNA, sintetizado a partir do mRNA de *C. elegans*. Esta construção foi realizada para ser o controle positivo da superexpressão de Ce\_JNK-1 em *C. elegans*. À

semelhança, foi realizada uma construção contendo a região promotora de *C. elegans* e a região codificante de *S. mansoni*, de forma a verificar se a superexpressão da proteína quinase Sm\_JNK desempenharia a mesma função da proteína Ce\_JNK-1 em *C. elegans*. Porém, em ambas as construções, os íntrons e a região de 500 pb da 3'-UTR não foram incluídos devido a limitações na metodologia utilizada para as construções.

Sabe-se que elementos regulatórios de genes específicos podem estar localizados nos primeiros íntrons de alguns genes (OKKEMA; KRAUSE, 2005). A expressão de proteínas a partir de cDNA em *C. elegans* é possível, porém, pode não ser eficiente sem que ao menos um ou dois íntrons sejam inseridos na sequência de cDNA (EVANS, T., 2006). Neste trabalho, optou-se por utilizar cDNA para amplificar as regiões codificantes devido ao fato de que os íntrons de *S. mansoni* poderiam não ser reconhecidos pela maquinaria de *splicing* de *C. elegans*. Porém, observamos que houve a superexpressão dos genes homólogo e heterólogo. O efeito de algum fator regulador em *cis* presente nos íntrons poderia ser um aumento ainda maior no nível de expressão observado.

A 3'-UTR não foi incluída devido à inexistência de enzimas de restrição cujo sítio de reconhecimento não estivessem presentes no DNA das regiões a serem inseridas, nem no vetor utilizado, e que possibilitassem a junção das seguintes sequências: 1) região promotora e 5'-UTR de *C. elegans*, 2) região codificante de *C. elegans* ou *S. mansoni* e 3) região 3'-UTR de *C. elegans*. Uma alternativa seria a clonagem das regiões codificantes em vetores de expressão específicos para *C. elegans* que permitem sua recombinação com diferentes promotores e regiões 3'-UTR, porém, com a desvantagem de não estar sob o controle do promotor do gene específico (MERRITT; SEYDOUX, 2010). Outra possibilidade é construção de um DNA sintético contendo essas três regiões do gene de interesse.

A técnica de microinjeção para obtenção de linhagens transgênicas carregando arranjos extracromossômicos repetitivos é relativamente rápida e eficiente. Porém, uma de suas desvantagens é o fato de ser difícil prever e controlar o nível de expressão entre os diferentes arranjos, ou seja, entre as diferentes linhagens obtidas (EVANS, 2006). Nas linhagens transgênicas obtidas em nosso trabalho, o nível de expressão de Ce\_JNK-1 variou de 30 vezes na linhagem N2 *Ex01*[Ce\_ *jnk-1*] a 1,5 vezes na linhagem N2 *Ex03*[Ce\_ *jnk-1*] em comparação com o

controle. O nível de expressão de Sm\_JNK também variou, sendo de 40 vezes na linhagem N2 *Ex04[Sm\_jnk]* e de 11 vezes na linhagem N2 *Ex05[Sm\_jnk]* em relação ao controle.

Para as linhagens transgênicas obtidas, tanto superexpressando Ce\_JNK-1 quando Sm\_JNK, não foi observado aumento de longevidade em comparação com o grupo controle que recebeu por microinjeção apenas o plasmídeo pRF4. O fato das linhagens que superexpressaram o gene *jnk-1* de *C. elegans* não apresentarem aumento na longevidade conforme foi descrito por Oh *et al.*, (2005) pode estar relacionado à ausência dos íntrons ou da região 3'-UTR nas construções utilizadas neste trabalho. Foi previamente descrito na literatura que o sucesso em ensaios de resgate de fenótipo depende de fatores como os elementos regulatórios presentes na região promotora, o correto processamento por *cis* e *trans-splicing*, além da formação das regiões 5' e 3' durante o processamento do pré-mRNA para gerar um mRNA maduro (GILLEARD, 2004).

Sabe-se que a região 3'-UTR é reconhecida durante a maturação do pré-mRNA para adição da cauda poli-A. Os mecanismos utilizados pelas células na maturação do pré-mRNA são etapas cruciais para a expressão dos genes. Em vertebrados, a formação da região 3' do mRNA é dependente de um complexo de proteínas que se ligam a sequências *upstream* e *downstream* ao sítio de clivagem, seguido pela clivagem do pré-mRNA e poliadenilação da extremidade 3' livre resultante. *C. elegans* usa a mesma sequência conservada que vertebrados, porém, o requerimento de sequência é menos estrigente. O mecanismo de *trans-splicing* também está envolvido na formação da extremidade 3' de alguns mRNAs (BLUMENTHAL; STEWARD, 1997).

Outra característica de *C. elegans* é a presença de pré-mRNAs poliscitrônicos transcritos a partir de operons (BLUMENTHAL; GLEASON, 2003). O controle da tradução de mRNAs individuais se baseia em elementos regulatórios *cis* que incluem a sequência do *splice leader* 5'- terminal e elementos de sequência adicionais nas regiões 5' e 3'-UTR (RHOADS *et al.*, 2006).

As estruturas presentes na extremidade 5' são o *cap*, o *splice leader*, que é adicionado a mRNAs por mecanismo de *trans-splicing*, além de sequências específicas presentes na região 5'-UTR com as quais as proteínas de ligação ao RNA interagem. É necessário ainda saber se o gene de interesse é processado por

*trans-splicing* utilizando o *splice leader* SL1 ou SL2. Entretanto, os mecanismos de regulação da transcrição mediados pelas estruturas na região 5' permanecem desconhecidos em *C. elegans* (RHOADS *et al.*, 2006).

Os elementos presentes na extremidade 3' desempenham papel importante na regulação da expressão de mRNAs em *C. elegans*. A presença de mutações nesses elementos pode causar perturbações na regulação da tradução dos mRNAs (EVANS; HUNTER, 2005). A cauda poli-A, adicionada por uma poli-A polimerase após a clivagem durante o processamento do mRNA por *splicing*, também requer sinais de poliadenilação *upstream* ao sítio de clivagem (RHOADS *et al.*, 2006). A cauda poli-A aumenta a taxa de iniciação da tradução em leveduras e plantas, estabilizando o complexo de iniciação da tradução (LE *et al.*, 1997; TARUN; SACHS, 1996). Em *C. elegans*, há diversos mecanismos regulatórios que envolvem mudanças no comprimento da cauda poli-A, sendo que a tradução de alguns mRNAs é regulada por proteínas que se ligam à 3'-UTR e alteram o comprimento da cauda poli-A (KUERSTEN; GOODWIN, 2003).

Além disso, apesar do termo "expressão gênica" ser usualmente usado como sinônimo de transcrição, os níveis de proteínas em células eucarióticas são também fortemente dependentes dos mecanismos que regulam a tradução. O controle da tradução pode ser global ou mRNA específico. O controle global envolve alterações nos níveis, atividade intrínseca ou disponibilidade de fatores de transcrição. Já o controle mRNA específico depende de proteínas e RNAs que interagem com um determinado conjunto de mRNAs. A taxa de síntese de proteínas, bem como a eficiência na tradução de mRNAs individuais, são reguladas em resposta a sinais nutricionais, hormonais e estresse (RHOADS *et al.*, 2006). A análise por *Western blot* dos níveis da proteína JNK nas linhagens transgênicas possibilitaria a confirmação de que o aumento no nível de mRNA observado, de fato implica em aumento da expressão da proteína.

Portanto, durante a construção de transgênicos específicos, as regiões não-codificantes devem ser cuidadosamente consideradas. É importante incluir a região flanqueadora 5' contendo o promotor e os elementos de controle da transcrição, a região flanqueadora 3' que pode conter elementos adicionais, a 5'-UTR que contém o sítio de iniciação da tradução e a 3'-UTR que contém os sinais de clivagem e poliadenilação, além de elementos de controle da tradução (EVANS, T., 2006).

Utilizar a 3'-UTR do gene de interesse é essencial quando se deseja obter um padrão de expressão similar ao do gene de interesse (MERRITT; SEYDOUX, 2010). Além disso, os íntrons são importantes pois o mecanismo de *splicing* do pré-mRNA está envolvido na exportação, tradução e estabilidade do mRNA (MANIATIS; REED, 2002; NOTT *et al.*, 2004).

## 7 CONCLUSÕES

Como conclusões para este estudo, temos:

- A análise das relações evolutivas mostrou que a proteína JNK-1 de *C. elegans* é o provável ortólogo da proteína JNK de *S. mansoni*;
- A técnica de microinjeção de DNA mostrou-se eficiente para a obtenção de linhagens transgênicas de *C. elegans*;
- Os níveis de expressão dos genes inseridos variaram entre as linhagens obtidas;
- A superexpressão dos genes Ce\_JNK-1 e Sm\_JNK não promoveram aumento da longevidade de *C. elegans*;
- Foi estabelecido o modelo *C. elegans* como um sistema heterólogo para estudos funcionais de genes de *S. mansoni*.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise das relações evolutivas mostrou que a proteína JNK-1 de *C. elegans* é o provável ortólogo da proteína JNK de *S. mansoni* alvo deste estudo. Portanto, dentre as proteínas da subfamília JNK, o gene *jnk-1* é o homólogo ideal para os ensaios de expressão heteróloga utilizando o nematóide *C. elegans*, assim como para futuros ensaios de complementação heteróloga utilizando o mutante de deleção *jnk-1*.

A técnica de microinjeção de DNA mostrou-se eficiente para a obtenção de linhagens transgênicas, visto que através dessa metodologia foram obtidas três linhagens transgênicas de *C. elegans* superexpressando a proteína Ce\_JNK-1 e duas linhagens transgênica de *C. elegans* superexpressando a proteína Sm\_JNK. O nível de expressão do gene inserido variou entre as linhagens obtidas. A técnica de microinjeção para obtenção de linhagens transgênicas carregando arranjos extracromossomais repetitivos tem a limitação de ser difícil prever e controlar o nível de expressão entre os diferentes arranjos, ou seja, entre as diferentes linhagens obtidas. Devido à inexistência de um método qualitativo que permita verificar o total de construções em cada linhagem não é possível afirmar se tal fato se deve a variações no número de cópias inseridas ou a especificidades de cada linhagem.

Foi estabelecido no grupo o modelo de *C. elegans* como um sistema heterólogo para estudos funcionais de genes de *S. mansoni*. O modelo, mesmo com as limitações descritas, pode ser interessante enquanto a manipulação genética do *S. mansoni* ou de outra espécie filogeneticamente mais próxima não estiverem disponíveis.

A superexpressão das proteínas Ce\_JNK-1 e Sm\_JNK não promoveram aumento da longevidade de *C. elegans*, como previamente observado na literatura. É provável que a ausência dos íntrons e/ou da região 3'-UTR nas construções devido a limitações na metodologia utilizada, esteja diretamente relacionada à ausência de alteração fenotípica. Uma alternativa seria a clonagem das regiões codificantes em vetores de expressão específicos para *C. elegans* ou a construção de um DNA sintético contendo as regiões promotora e 3'-UTR, além da região codificante do gene de interesse, seguido da avaliação do fenótipo associado à superexpressão.



## 9 PERSPECTIVAS

Como perspectivas para este estudo, pretendemos:

- Obter uma linhagem N2 *Ex[rol-6]* a partir da linhagem N2 utilizada nas demais microinjeções;
- Analisar a expressão das proteínas Ce\_JNK-1 e Sm\_JNK nas linhagens transgênicas por *Western Blot*;
- Obter o controle positivo que superexpressa JNK-1 de *C. elegans* (*lpln1* ou *lpln2*) (OH *et al.*, 2005);
- Realizar os ensaios de longevidade utilizando o controle positivo que superexpressa JNK-1 de *C. elegans* e o controle N2 *Ex[rol-6]* obtido em nosso laboratório.
- Testar genes sintéticos que incluam íntrons e a região 3' dos genes de interesse.

## 10 REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403-10, 5 out 1990.
- ANDRADE, L. F. **Proteínas quinase eucarióticas (ePKs) de Schistosoma ssp: identificação, anotação funcional e seleção de alvos para o desenvolvimento de droga**. [S.l.]: Centro de Pesquisas René Rachou, 2012.
- ANDRADE, L. F.; NAHUM, L. A; AVELAR, L. G. A; *et al.* Eukaryotic protein kinases (ePKs) of the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. **BMC genomics**, v. 12, n. 1, p. 215, jan 2011.
- ANISIMOVA, M.; GASCUEL, OLIVIER. Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. **Systematic biology**, v. 55, n. 4, p. 539-52, ago 2006.
- BANTON, M. C.; TUNNAcliffe, A. MAPK phosphorylation is implicated in the adaptation to desiccation stress in nematodes. **The Journal of experimental biology**, v. 215, n. Pt 24, p. 4288-98, 15 dez 2012.
- BECKMANN, S.; GREVELDING, C. G. Imatinib has a fatal impact on morphology, pairing stability and survival of adult *Schistosoma mansoni* in vitro. **International journal for parasitology**, v. 40, n. 5, p. 521-6, abr 2010.
- BERRIMAN, M.; HAAS, B. J.; LOVERDE, P. T. *et al.* The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. **Nature**, v. 460, n. 7253, p. 352-8, jul 2009.
- BLUMENTHAL, T.; GLEASON, K. S. *Caenorhabditis elegans* operons: form and function. **Nature reviews. Genetics**, v. 4, n. 2, p. 112-20, mar 2003.
- BLUMENTHAL, T.; STEWARD, K. RNA Processing and Gene Structure. In: RIDDLE, D. L.; BLUMENTHAL, T.; MEYER, B. J.; PRIESS, J. R. (Eds.). **C. elegans II**. 2. ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. .
- BOAG, P. R.; NEWTON, S. E.; GASSER, R B. Molecular aspects of sexual development and reproduction in nematodes and schistosomes. **Advances in Parasitology**, v. 50, p. 153-198, 2001.
- BOTROS, S.; BENNETT, J. Praziquantel resistance. **Expert Opinion on Drug Discover**, v. 2, p. S35-S40, 2007.
- BOTTIEAU, E.; CLERINX, J.; VEGA, M. R. DE; *et al.* Imported Katayama fever: clinical and biological features at presentation and during treatment. **The Journal of infection**, v. 52, n. 5, p. 339-45, maio 2006.
- BOYLE, S. N.; KOLESKE, A. J. Dissecting kinase signaling pathways. **Drug Discovery Today**, v. 12, n. 17-18, p. 717-24, 2007.
- BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 77, p. 71-94, 1974.

BRENNER, S. E. Errors in genome annotation. **Trends in genetics** □: **TIG**, v. 15, n. 4, p. 132-3, abr 1999.

BRITTON, C.; MURRAY, L. Using *Caenorhabditis elegans* for functional analysis of genes of parasitic nematodes. **International journal for parasitology**, v. 36, n. 6, p. 651-9, 31 maio 2006.

BROWN, DUNCAN; SJÖLANDER, K. Functional classification using phylogenomic inference. **PLoS computational biology**, v. 2, n. 6, p. e77, 30 jun 2006.

BRUUN, B.; AAGAARD-HANSEN, J. **The social context of schistosomiasis and its control: an introduction and annotated bibliography**. Disponível em: <<http://apps.who.int/tdr/svc/publications/tdr-research-publications/social-context-schistosomiasis>>. Acesso em: 20 jan. 2013.

BYRD, D. T.; KAWASAKI, MASATO; WALCOFF, M. *et al.* UNC-16 , a JNK-Signaling Scaffold Protein , Regulates Vesicle Transport in *C. elegans*. v. 32, p. 787-800, 2001.

CASS, C. L.; JOHNSON, J. R.; CALIFF, L. L. *et al.* Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* egg secretions. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 155, n. 2, p. 84-93, out 2007.

CHEEVER, A. W.; HOFFMANN, K. F.; WYNN, T. A. Immunopathology of schistosomiasis mansoni in mice and men. **Immunology today**, v. 21, n. 9, p. 465-6, set 2000.

CHEN, R.-W.; QIN, Z.-H.; REN, M. *et al.* Regulation of c-Jun N-terminal kinase, p38 kinase and AP-1 DNA binding in cultured brain neurons: roles in glutamate excitotoxicity and lithium neuroprotection. **Journal of neurochemistry**, v. 84, n. 3, p. 566-75, fev 2003.

CURWEN, R. S.; ASHTON, P. D.; SUNDARALINGAM, S.; WILSON, R. A. Identification of novel proteases and immunomodulators in the secretions of schistosome cercariae that facilitate host entry. **Molecular & cellular proteomics** □: **MCP**, v. 5, n. 5, p. 835-44, maio 2006.

DAVIS, R J. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. **The Journal of biological chemistry**, v. 268, n. 20, p. 14553-6, 15 jul 1993.

DAVIS, R J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. **Cell**, v. 103, n. 2, p. 239-52, 13 out 2000.

DEREEPER, A; GUIGNON, V.; BLANC, G. *et al.* Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. **Nucleic acids research**, v. 36, n. Web Server issue, p. W465-9, 1 jul 2008.

DÉRIJARD, B.; HIBI, M.; WU, I. H. *et al.* JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. **Cell**, v. 76, n. 6, p. 1025-37, 25 mar 1994.

DISSOUS, C.; AHIER, A.; KHAYATH, N. Protein tyrosine kinases as new potential targets against human schistosomiasis. **BioEssays news and reviews in molecular cellular and developmental biology**, v. 29, n. 12, p. 1281-1288, 2007.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 5, p. 1792-7, jan 2004.

EISEN, J. A. Phylogenomics: improving functional predictions for uncharacterized genes by evolutionary analysis. **Genome research**, v. 8, n. 3, p. 163-7, mar 1998.

ENGELS, D.; L. CHITSULO. Schistosomiasis. In: CROMPTON, D.; MONTRESOR A; NESHEIM, M.; SAVIOLI, L. (Eds.). **Controlling disease due to helminth infections**. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2003. .

EVANS, T. Transformation and microinjection. **WormBook**, p. 1-15, 2006.

EVANS, T. C.; HUNTER, C. P. Translational control of maternal RNAs. **WormBook**: the online review of *C. elegans* biology, p. 1-11, jan 2005.

FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. **Journal of molecular evolution**, v. 17, n. 6, p. 368-76, jan 1981.

FENWICK, A.; WEBSTER, J. P. Schistosomiasis: challenges for control, treatment and drug resistance. **Current opinion in infectious diseases**, v. 19, n. 6, p. 577-82, dez 2006.

FIRE, ANDREW. Integrative transformation of *Caenorhabditis elegans*. **The EMBO journal**, v. 5, n. 10, p. 2673-80, out 1986.

GEARY, T. G.; THOMPSON, D. P. *Caenorhabditis elegans*: how good a model for veterinary parasites? **Veterinary parasitology**, v. 101, n. 3-4, p. 371-86, 22 nov 2001.

GILLEARD, J. S. The use of *Caenorhabditis elegans* in parasitic nematode research. **Parasitology**, v. 128 Suppl , p. S49-70, jan 2004.

GRYSEELS, B.; POLMAN, K.; CLERINX, J.; KESTENS, L. Human schistosomiasis. **Lancet**, v. 368, n. 9541, p. 1106-1118, 2006.

GUILLOU, F.; ROGER, E.; MONÉ, Y. *et al.* Excretory-secretory proteome of larval *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma caproni*, two parasites of *Biomphalaria glabrata*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 155, n. 1, p. 45-56, set 2007.

GUINDON, STÉPHANE; GASCUEL, OLIVIER. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. **Systematic Biology**, v. 52, n. 5, p. 696-704, 1 out 2003.

HAAS, W.; DIEKHOF, D.; KOCH, K.; SCHMALFUSS, G.; LOY, C. *Schistosoma mansoni* cercariae: stimulation of acetabular gland secretion is adapted to the chemical composition of mammalian skin. **The Journal of parasitology**, v. 83, n. 6, p. 1079-1085, 1997.

HAN, J.; LEE, J. D.; BIBBS, L.; ULEVITCH, R. J. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 265, n. 5173, p. 808-11, 5 ago 1994.

HAN, Z.-G.; BRINDLEY, P. J.; WANG, S.-Y.; CHEN, Z. Schistosoma genomics: new perspectives on schistosome biology and host-parasite interaction. **Annual review of genomics and human genetics**, v. 10, p. 211-40, jan 2009.

HANKS, S K; QUINN, A. M.; HUNTER, T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. **Science (New York, N.Y.)**, v. 241, n. 4861, p. 42-52, 1 jul 1988.

HANKS, STEVEN K. Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. **Genome biology**, v. 4, n. 5, p. 111, jan 2003.

HANKS, STEVEN K; HUNTER, TONY. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. **The FASEB Journal**, v. 9, n. 8, p. 576-596, 1995.

HASHMI, S.; TAWA, W.; LUSTIGMAN, S. Caenorhabditis elegans and the study of gene function in parasites. **Trends in parasitology**, v. 17, n. 8, p. 387-93, ago 2001.

HILLYER, G. V. Buoyant density and thermal denaturation profiles of schistosome DNA. **The Journal of parasitology**, v. 60, n. 4, p. 725-727, 1974.

HODGKIN, J.; HORVITZ, H. R.; BRENNER, SYDNEY. Nondisjunction mutants of the nematode Caenorhabditis elegans. **Genetics**, v. 91, n. 1, p. 67-94, 1979.

HOOGEWIJS, D.; HOUTHOOFD, K.; MATTHIJSSSENS, F.; VANDESOMPELE, J.; VANFLETEREN, J. R. Selection and validation of a set of reliable reference genes for quantitative sod gene expression analysis in C. elegans. **BMC molecular biology**, v. 9, p. 9, jan 2008.

HOTEZ, P. J.; FENWICK, A. Schistosomiasis in Africa: an emerging tragedy in our new global health decade. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 3, n. 9, p. e485, jan 2009.

JOHNSON, GARY L; LAPADAT, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. **Science (New York, N.Y.)**, v. 298, n. 5600, p. 1911-2, 6 dez 2002.

KAMPKÖTTER, A.; VOLKMANN, T. E.; CASTRO, S. H. DE; *et al.* Functional analysis of the glutathione S-transferase 3 from Onchocerca volvulus (Ov-GST-3): a parasite GST confers increased resistance to oxidative stress in Caenorhabditis elegans. **Journal of molecular biology**, v. 325, n. 1, p. 25-37, 3 jan 2003.

KAWASAKI, M; HISAMOTO, N; IINO, Y. *et al.* A Caenorhabditis elegans JNK signal transduction pathway regulates coordinated movement via type-D GABAergic motor neurons. **The EMBO journal**, v. 18, n. 13, p. 3604-15, 1 jul 1999.

KENNEDY, T. Managing the drug discovery/development interface. **Drug Discovery Today**, v. 2, n. 10, p. 436-444, out 1997.

KNUDSEN, G. M.; MEDZIHRADESKY, K. F.; LIM, K.-C.; HANSELL, E.; MCKERROW, J. H. Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* cercarial secretions. **Molecular & cellular proteomics**: MCP, v. 4, n. 12, p. 1862-75, dez 2005.

KOGA, M.; ZWAAL, R.; GUAN, K. L.; AVERY, L.; OHSHIMA, Y. A *Caenorhabditis elegans* MAP kinase kinase, MEK-1, is involved in stress responses. **The EMBO journal**, v. 19, n. 19, p. 5148-56, out 2000.

KONDOH, K.; NISHIDA, E. Regulation of MAP kinases by MAP kinase phosphatases. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1773, n. 8, p. 1227-37, ago 2007.

KUERSTEN, S.; GOODWIN, E. B. The power of the 3' UTR: translational control and development. **Nature reviews. Genetics**, v. 4, n. 8, p. 626-37, ago 2003.

KWA, M. S.; VEENSTRA, J. G.; DIJK, M. VAN; ROOS, M. H. Beta-tubulin genes from the parasitic nematode *Haemonchus contortus* modulate drug resistance in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of molecular biology**, v. 246, n. 4, p. 500-10, 3 mar 1995.

LAMBERTUCCI, J. R. Acute schistosomiasis: clinical, diagnostic and therapeutic features. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 35, n. 5, p. 399-404, 1 out 1993.

LE, H.; TANGUAY, R. L.; BALASTA, M. L. *et al.* Translation initiation factors eIF-iso4G and eIF-4B interact with the poly(A)-binding protein and increase its RNA binding activity. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 26, p. 16247-55, 27 jun 1997.

LIANG, Y.; DAI, J.; ZHU, Y.; COLES, G. C.; DOENHOFF, M. J. GENETIC ANALYSIS OF PRAZIQUANTEL RESISTANCE IN *SCHISTOSOMA MANSONI*. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 34, n. 2, 2003.

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 (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402-8, dez 2001.

MANIATIS, T.; REED, R. An extensive network of coupling among gene expression machines. **Nature**, v. 416, n. 6880, p. 499-506, 4 abr 2002.

MANN, V. H.; SUTTIPRAPA, S.; RINALDI, G.; BRINDLEY, P. J. Establishing transgenic schistosomes. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 8, p. e1230, ago 2011.

MANNING, G. Genomic overview of protein kinases. **WormBook**: the online review of *C. elegans* biology, p. 1-19, jan 2005.

MANNING, G.; PLOWMAN, G. D.; HUNTER, TONY; SUDARSANAM, S. Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 27, n. 10, p. 514-20, 2002.

- MELLO, C. C.; KRAMER, J. M.; STINCHCOMB, D.; AMBROS, V. Efficient gene transfer in *C.elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. **EMBO Journal**, v. 10, n. 1, p. 3959 - 3970, 1991.
- MELLO, C.; FIRE, A. DNA transformation. **Methods In Cell Biology**, v. 48, p. 451-482, 1995.
- MELMAN, S. D.; STEINAUER, M. L.; CUNNINGHAM, C. *et al.* Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 3, n. 8, p. e504, jan 2009.
- MERRITT, C.; SEYDOUX, G. Transgenic solutions for the germline. **WormBook**: the online review of *C. elegans* biology, p. 1-21, jan 2010.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de vigilância epidemiológica**. 7. ed. Brasilia, Brazil: [s.n.], 2009. p. 816
- MIRANDA-SAAVEDRA, D.; BARTON, G. J. Classification and functional annotation of eukaryotic protein kinases. **Proteins**, v. 68, n. 4, p. 893-914, 2007.
- MIZUNO, T.; HISAMOTO, NAOKI; TERADA, T. *et al.* The *Caenorhabditis elegans* MAPK phosphatase VHP-1 mediates a novel JNK-like signaling pathway in stress response. **The EMBO journal**, v. 23, n. 11, p. 2226-34, 2 jun 2004.
- MORAND, S.; MÜLLER-GRAF, C. D. Muscles or testes? Comparative evidence for sexual competition among dioecious blood parasites (*Schistosomatidae*) of vertebrates. **Parasitology**, v. 120 ( Pt 1, n. 1, p. 45-56, 2000.
- NAHUM, L. A.; PEREIRA, S. L. Phylogenomics, Protein Family Evolution, and the Tree of Life: An Integrated Approach between Molecular Evolution and Computational Intelligence. In: SMOLINSKI, T. G.; MILANOVA, M. G.; HASSANIEN, A.-E. (Eds.). **Applications of Computational Intelligence in Biology**. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008. v. 122p. 259–279.
- NAULA, C.; PARSONS, M.; MOTTRAM, J. C. Protein kinases as drug targets in trypanosomes and *Leishmania*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1754, n. 1-2, p. 151-159, 2005.
- NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2001. p. 518
- NISHIMOTO, S.; NISHIDA, E. MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2. **EMBO reports**, v. 7, n. 8, p. 782-6, ago 2006.
- NOTT, A.; HIR, H. LE; MOORE, M. J. Splicing enhances translation in mammalian cells: an additional function of the exon junction complex. **Genes & development**, v. 18, n. 2, p. 210-22, 15 jan 2004.
- OH, S. W.; MUKHOPADHYAY, A.; SVRZIKAPA, N. *et al.* JNK regulates lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor/DAF-16. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 12, p. 4494-9, 22 mar 2005.

OKKEMA, P. G.; KRAUSE, M. Transcriptional regulation. **WormBook**: the online review of *C. elegans* biology, p. 1-40, jan 2005.

OLIVEIRA, G; JOHNSTON, D. A. Mining the schistosome DNA sequence database. **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 10, p. 501-503, 2001.

ORSBORN, A. M.; LI, W.; MCEWEN, T. J. *et al.* GLH-1, the *C. elegans* P granule protein, is controlled by the JNK KGB-1 and by the COP9 subunit CSN-5. **Development (Cambridge, England)**, v. 134, n. 18, p. 3383-92, set 2007.

PICA-MATTOCCIA, L.; CIOLI, D. Sex- and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to in vivo and in vitro praziquantel treatment. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 4, p. 527-33, 2004.

PORDEUS, L. C.; AGUIAR, L. R.; QUININO, L. R. D. M.; BARBOSA, C. S. A ocorrência das formas aguda e crônica da esquistossomose mansônica no Brasil no período de 1997 a 2006: uma revisão de literatura. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 17, n. 3, p. 163-175, set 2008.

PROTASIO, A. V; TSAI, I. J.; BABBAGE, A. *et al.* A systematically improved high quality genome and transcriptome of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 1, p. e1455, jan 2012.

QUEVILLON, E.; SILVENTOINEN, V.; PILLAI, S. *et al.* InterProScan: protein domains identifier. **Nucleic acids research**, v. 33, n. Web Server issue, p. W116-20, 1 jul 2005.

RAMBAUT, A. **FigTree**.

RAY, L. B.; STURGILL, T. W. Insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase is phosphorylated on tyrosine and threonine in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 11, p. 3753-7, jun 1988.

RESSURREIÇÃO, M.; ROLLINSON, D.; EMERY, A. M.; WALKER, ANTHONY J. A role for p38 MAPK in the regulation of ciliary motion in a eukaryote. **BMC cell biology**, v. 12, n. 1, p. 6, jan 2011a.

RESSURREIÇÃO, M.; ROLLINSON, D.; EMERY, A. M.; WALKER, ANTHONY J. A role for p38 mitogen-activated protein kinase in early post-embryonic development of *Schistosoma mansoni*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 180, n. 1, p. 51-5, nov 2011b.

RHOADS, R. E.; DINKOVA, T. D.; KORNEEVA, N. L. Mechanism and regulation of translation in *C. elegans*. **WormBook**: the online review of *C. elegans* biology, p. 1-18, jan 2006.

RIDDLE, D. L.; BLUMENTHAL, T.; MEYER, B. J.; PRIESS, J. R. (EDS.). **C. elegans II**. 2. ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.

RIECKHER, M.; KOURTIS, N.; PASPARAKI, A.; TAVERNARAKIS, N. Transgenesis in *Caenorhabditis elegans*. In: CARTWRIGHT, E. J. (Ed.). **Methods in Molecular**



**Biology - Transgenesis Techniques Principles and Protocols**. 3. ed. Totowa, NJ: Humana Press, 2009. v. 561p. 21-39.

ROKNI, M. B. **Schistosomiasis**. Croatia: InTech, 2012. p. 322

ROLLINSON, D.; SIMPSON, A. J. G. **The Biology of Schistosomes from Genes to Latrines**. London: Academic Press, 1987. p. 472

SAGASTI, A.; HISAMOTO, NAOKI; HYODO, J. *et al.* The CaMKII UNC-43 Activates the MAPKKK NSY-1 to Execute a Lateral Signaling Decision. v. 105, p. 221-232, 2001.

SCHNOES, A. M.; BROWN, S. D.; DODEVSKI, I.; BABBITT, P. C. Annotation error in public databases: misannotation of molecular function in enzyme superfamilies. **PLoS computational biology**, v. 5, n. 12, p. e1000605, dez 2009.

SIMPSON, A. J.; SHER, A.; MCCUTCHAN, T. F. The genome of *Schistosoma mansoni*: isolation of DNA, its size, bases and repetitive sequences. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 6, n. 2, p. 125-137, 1982.

SJOLANDER, K. Phylogenomic inference of protein molecular function: advances and challenges. **Bioinformatics**, v. 20, n. 2, p. 170-179, 20 jan 2004.

SMITH, P.; LEUNG-CHIU, W.-M.; MONTGOMERY, R. *et al.* The GLH Proteins, *Caenorhabditis elegans* P Granule Components, Associate with CSN-5 and KGB-1, Proteins Necessary for Fertility, and with ZYX-1, a Predicted Cytoskeletal Protein. **Developmental Biology**, v. 251, n. 2, p. 333-347, nov 2002.

SOUZA, F. P. C. DE; VITORINO, R. R.; COSTA, A. DE P. *et al.* Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural\*. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 9, n. 4, p. 300 - 307, 2011.

STINCHCOMB, D. T.; SHAW, J. E.; CARR, S. H.; HIRSH, D. Extrachromosomal DNA transformation of *Caenorhabditis elegans*. **Molecular and cellular biology**, v. 5, n. 12, p. 3484-96, dez 1985.

STRONACH, B.; PERRIMON, N. Activation of the JNK pathway during dorsal closure in *Drosophila* requires the mixed lineage kinase, slipper. **Genes & development**, v. 16, n. 3, p. 377-87, 1 fev 2002.

SUNDARAM, M. V. RTK/Ras/MAPK signaling. **WormBook: the online review of C. elegans biology**, p. 1-19, jan 2006.

TARUN, S. Z.; SACHS, A. B. Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. **The EMBO journal**, v. 15, n. 24, p. 7168-77, 16 dez 1996.

TDR. **Tropical Disease Research (TDR): progress 2005-2006**. Disponível em: <<http://apps.who.int/tdr/svc/publications/about-tdr/progress-reports/progress-report-05-06>>. Acesso em: 20 jan. 2013.

THE C. ELEGANS SEQUENCING CONSORTIUM. Genome Sequence of the Nematode *C. elegans*: A Platform for Investigating Biology. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2012-2018, 11 dez 1998.

TWUMASI-BOATENG, K.; WANG, T. W.; TSAI, L. *et al.* An age-dependent reversal in the protective capacities of JNK signaling shortens *Caenorhabditis elegans* lifespan. **Aging cell**, v. 11, n. 4, p. 659-67, ago 2012.

VILLANUEVA, A; LOZANO, J.; MORALES, A; *et al.* *jdk-1* and *mek-1* regulate body movement coordination and response to heavy metals through *jnk-1* in *Caenorhabditis elegans*. **The EMBO journal**, v. 20, n. 18, p. 5114-28, 17 set 2001.

WAKNINE-GRINBERG, J. H.; GOLD, D.; OHAYON, A. *et al.* *Schistosoma mansoni* infection reduces the incidence of murine cerebral malaria. **Malaria Journal**, v. 9, n. 1, p. 5, 2010.

WALKER, ANTHONY JOHN. Insights into the functional biology of schistosomes. **Parasites & vectors**, v. 4, n. 1, p. 203, jan 2011.

WANG, M. C.; BOHMANN, D.; JASPER, H. JNK signaling confers tolerance to oxidative stress and extends lifespan in *Drosophila*. **Developmental cell**, v. 5, n. 5, p. 811-6, nov 2003.

WARD, P.; EQUINET, L.; PACKER, J.; DOERIG, C. Protein kinases of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: the kinome of a divergent eukaryote. **BMC Genomics**, v. 5, n. 1, p. 79, 2004.

WELZ, C.; KRÜGER, N.; SCHNIEDERJANS, M. *et al.* SLO-1-channels of parasitic nematodes reconstitute locomotor behaviour and emodepside sensitivity in *Caenorhabditis elegans slo-1* loss of function mutants. **PLoS pathogens**, v. 7, n. 4, p. e1001330, abr 2011.

WHELAN, S.; GOLDMAN, N. A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. **Molecular biology and evolution**, v. 18, n. 5, p. 691-9, maio 2001.

WHO. Schistosomiasis: population requiring preventive chemotherapy and number of people treated in 2010. **The Weekly Epidemiological Record**, v. 87, n. 4, p. 37-44, 2012.

WHO. Schistosomiasis: number of people treated in 2011. **Weekly Epidemiological Record**. Switzerland: [s.n.], 2013. p. 81-88.

WIDMANN, C.; GIBSON, S.; JARPE, M. B.; JOHNSON, G L. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. **Physiological reviews**, v. 79, n. 1, p. 143-80, jan 1999.

WILKINSON, M. G.; MILLAR, J. B. Control of the eukaryotic cell cycle by MAP kinase signaling pathways. **FASEB journal** □: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, v. 14, n. 14, p. 2147-57, nov 2000.

WILSON, R. A.; ASHTON, P. D.; BRASCHI, S. *et al.* 'Oming in on schistosomes: prospects and limitations for post-genomics. **Trends in parasitology**, v. 23, n. 1, p. 14-20, jan 2007.

WOLF, M.; NUNES, F.; HENKEL, A.; HEINICK, A.; AL, W. E. T. The MAP Kinase JNK-1 of *Caenorhabditis elegans*: Location , Activation , and Influences Over Insulin-Like Signaling , Stress Responses , and Fitness. n. July, p. 721-729, 2007.

YOUNG, N. D.; JEX, A. R.; LI, B. *et al.* Whole-genome sequence of *Schistosoma haematobium*. **Nature Genetics**, n. January, 15 jan 2012.

ZERLOTINI, A.; AGUIAR, E. R. G. R.; YU, F. *et al.* SchistoDB: an updated genome resource for the three key schistosomes of humans. **Nucleic acids research**, v. 41, n. Database issue, p. D728-31, jan 2013.

ZERLOTINI, A.; HEIGES, M.; WANG, H. *et al.* SchistoDB: a *Schistosoma mansoni* genome resource. **Nucleic acids research**, v. 37, n. Database issue, p. D579-82, jan 2009.

ZHOU, Y.; ZHENG, H.; CHEN, Y. *et al.* The *Schistosoma japonicum* genome reveals features of host-parasite interplay. **Nature**, v. 460, n. 7253, p. 345-351, 2009.