

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia
Departamento de Parasitologia



**CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO PROTEOLÍTICO
PROTEASSOMA EM *Strongyloides venezuelensis*.**

Fabiana Martins de Paula

Orientador: Prof. Dr. Vanderlei Rodrigues

Co-orientadora: Marlene Tiduko Ueta

2004081530

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)

*Fabiana Martins
de Paula*

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Departamento de Parasitologia
do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de
Campinas para a obtenção do título de Doutora em
Parasitologia.

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Ueta".

Campinas
2004

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE BC
Nº CHAMADA T/UNICAMP
P281c
V _____ EX _____
TOMBO BC/ S8464
PROC 16-113-04
C _____ D X
PREÇO R\$ 11,00
DATA 22-08-04
Nº CPD _____

CM00198319-7

BIB ID 317717

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

P281c

Paula, Fabiana Martins de

Caracterização do complexo proteolítico proteassoma em *Strongyloides venezuelensis* / Fabiana Martins de Paula. --
Campinas, SP:[s.n.], 2004.

Orientador: Vanderlei Rodrigues

Co-orientadora: Marlene Tiduko Ueta

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Strongylidae. 2. Biologia Molecular. 3. Bioquímica. I. Rodrigues, Vanderlei.
II. Ueta, Marlene Tiduko. III. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. IV. Título.

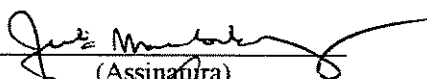
Data da Defesa: 19 de março de 2004.

Banca Examinadora:

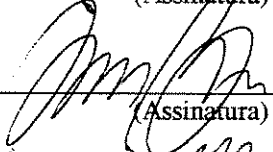
Prof. Dr. Vanderlei Rodrigues (Orientador)


(Assinatura)

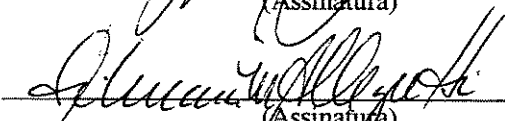
Profa. Dra. Julia Maria Costa-Cruz


(Assinatura)

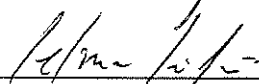
Prof. Dr. Marcelo Brocchi


(Assinatura)

Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti


(Assinatura)

Profa. Dra. Selma Giorgio


(Assinatura)

Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo

(Assinatura)

Prof. Dr. Sergio Furtado dos Reis

(Assinatura)

A meta sempre se afasta de nós, pois quanto mais progredimos, mais nos tornamos conscientes de nossa fraqueza. Mas é no esforço que encontramos a satisfação, não no êxito. O esforço sem reserva vale vitória total. (Mahatma Gandhi)

Dedico

*Ao nosso Criador...
“Vós sois a luz do mundo...
Deixai brilhar a vossa luz perante os homens, para que vejam as vossas obras
excelentes e dêem glória ao Vosso Pai, que está nos céus.” (Mateus, 5:16)*

*Com carinho para meus pais, Fábio e Delícia,
e minha irmã, Fernanda.
Meu muito obrigada pelo amor sempre constantes.*

Marcio,
"O medo de sofrer é pior do que o próprio sofrimento:
E nenhum coração jamais sofreu quando foi em busca de seus sonhos."
(Paulo Coelho)

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade de São Paulo (USP), através do programa de pós-graduação de Parasitologia do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), sob apoio financeiro do Centro Nacional de Pesquisa (CNPq).

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Vanderlei Rodrigues, minha sincera gratidão, pela acolhida e pelo profissionalismo na orientação deste trabalho e pela amizade.

À Profa. Dra Marlene Tiduko Ueta pela co-orientação, mas principalmente pelo carinho, dedicação e amizade durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra Julia Maria Costa-Cruz por acreditar e incentivar os meus objetivos profissionais, pela amizade e dedicação sempre constantes.

Aos Prof. Dr. Marcelo Brocchi, a Profa. Dra Silmara Allegretti, pela participação na análise prévia e na defesa pública da tese, e pelas sugestões e recomendações feitas para a melhoria do trabalho.

Aos docentes do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, pelos conhecimentos compartilhados, especialmente a Profa. Dra Selma Giorgio pela participação na defesa pública.

Às amigas do Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual de São Paulo, Ribeirão Preto, Elenice e Olinda Mara, pela amizade e carinho dispensados durante todo o tempo de pesquisa.

Aos amigos do Laboratório de Helminologia do Departamento de Parasitologia do IB-UNICAMP: Ivo, João e Rubens, que de uma forma ou de outra, me auxiliaram na concretização desta pesquisa.

Às amigas Ângela e Janáina, que nunca estiveram ausentes, pela amizade e incentivo durante todo o curso, além das horas de descontração.

À amiga Adriana, não só pela amizade mas pelas horas compartilhadas em nossa casa.

Aos amigos e companheiros da pós-graduação e de bancada, Olavo e William, meus sinceros agradecimentos pela ajuda laboratorial e na análise dos resultados, sobretudo pelo incentivo constantes durante toda a pesquisa.

À colega Renata, pelo auxílio na análise dos resultados e na leitura dos manuscritos.

Aos novos amigos de laboratório: Fernanda, Lisandra, Andressa e Sergio.

Às pessoas, que direta ou indiretamente, contribuíram para a elaboração deste trabalho.

Meu muito obrigada.

Índice

<u>Abreviaturas</u>	x
<u>Resumo</u>	xi
<u>Abstract</u>	xii
<u>Introdução Geral</u>	1
<u>Capítulo 1:</u> Caracterização do proteassoma 26S em <i>Strongyloides venezuelensis</i>	15
1. Introdução	16
2. Material e Métodos	17
3. Resultados	20
4. Discussão	24
5. Referências Bibliográficas	28
<u>Capítulo 2:</u> Análise molecular das subunidades alfa 6 e beta 6 do proteassoma 20S em <i>Strongyloides venezuelensis</i>	32
1. Introdução	33
2. Material e Métodos	34
3. Resultados	37
4. Discussão	48
5. Referências Bibliográficas	51
<u>Capítulo 3:</u> Análise molecular das subunidades ATPase 3 e S5a do complexo 19S do proteassoma 26S em <i>Strongyloides venezuelensis</i>	53
1. Introdução	56
2. Material e Métodos	57
3. Resultados	61
4. Discussão	74
5. Referências Bibliográficas	78
<u>Conclusões</u>	82
<u>Referências Bibliográficas</u>	84

Abreviaturas

ATP: Trifosfato adenosina

cDNA: DNA complementar

DNA: Ácido dextrorribonucleico

IFN γ : Interferon gama

MG132: Carbobenzoni-L-leucil-L-leucil-L-leucinal

MHC classe I: Complexo maior de histocompatibilidade de classe I

μ g: micrograma

μ l: microlitro (s)

μ M: micromolar

mg: miligrama

mM: milimolar

M: molar

PMSF: Fluorido fenilmetilsulfonil

PSI: Carbobenzoni-ileu-glu (O-t-Bu)-ala-leucinal

RNA: Ácido ribonucleico

SDS: Sulfato duodecil de sódio

As proteases, sobretudo os complexos enzimáticos como o proteassoma 26S, têm sido relacionadas com diferentes processos biológicos em parasitas. O presente trabalho, teve como objetivo realizar um estudo inicial do proteassoma 26S no nematódeo *Strongyloides venezuelensis*, por meio de ensaios bioquímicos e da caracterização de alguns componentes deste complexo multienzimático. Este nematódeo é utilizado como modelo experimental para o estudo da estrongiloidíase humana, uma helmintíase com alta prevalência em regiões tropicais e subtropicais. Para tanto, foram obtidos dois estágios de desenvolvimento de *S. venezuelensis* a partir de infecções experimentais em *Rattus norvegicus*, o estágio infectante de vida-livre (larva filarióide, L3) e o parasitário (fêmea partenogenética, F). Para os ensaios bioquímicos foram obtidos os extratos brutos de ambos estágios, os quais foram submetidos aos ensaios de atividades (quimiotripsina e tripsina-símile), utilizando substratos sintéticos fluorogênicos, na presença e na ausência de inibidores específicos do proteassoma 26S (MG132 e PSI). Além disso, o extrato foi submetido ao SDS-PAGE, seguido pela técnica de “Western-blot” utilizando anticorpos específicos para o proteassoma 20S e para ubiquitina. Para os experimentos moleculares foram obtidos RNA de ambos os estágios, os quais foram submetidos a amplificações utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para as subunidades alfa 6 e beta 6 do proteassoma 20S (“core” proteolítico) e as subunidades ATPase 3 e S5a do complexo regulatório 19S do proteassoma 26S. O DNA genômico foi amplificado para todas as subunidades com exceção da S5a. Os produtos de amplificação obtidos foram submetidos à busca de homologia no banco de dados, após sequenciamento dos mesmos. Os resultados confirmaram a presença do proteassoma 26S no nematódeo *S. venezuelensis*, através da atividade específica de quimiotripsina e tripsina-símile e a presença de bandas protéicas características reveladas pelos anticorpos específicos, bem como pela análise molecular das subunidades. No entanto, novos estudos serão necessários para inferir a importância deste complexo multienzimático neste parasita.

Protease is an important biological process in different parasites, especially in enzymatic complex like 26S proteasome. The objective of the present work was to initiate the study of the 26S proteasome in the nematode *Strongyloides venezuelensis* using biochemical experiments and identifying some components of this multienzymatic complex. This nematode has been used as a model and tool for the studies on strongyloidiasis, a helminthiasis of high prevalence in tropical and subtropical regions. In this study, two development stages of *S. venezuelensis*, namely infective larvae (third-stage larvae) and parasitic stages, were used for experimental infections in *Rattus norvegicus*. In biochemical experiments the crude extracts of the both stages were submitted at proteolytic activities (chymotrypsin-like and trypsin-like) using fluorogenic peptides in presence and absence of proteasome inhibitors (MG132 and PSI). Moreover, the crude extracts were submitted at SDS-PAGE and western-blot methods using specific antibodies. In molecular experiments, RNA of both stages were amplified with specific oligonucleotides to α 6 and β 6 subunits of the 20S proteasome (proteolytic core) and ATPase 3 and S5a of the regulatory particle (19S). The genomic DNA was amplified to all subunits, excepting of S5a subunit. Results show the presence of the 26S proteasome in proteolytic activities from *S. venezuelensis* of the chymotrypsin-like and trypsin-like and the presence of the labeled bands by the antibodies, as well as molecular analysis of the subunits. However, new studies will be necessary to define the importance of these multienzymatic complex on the parasite biology.

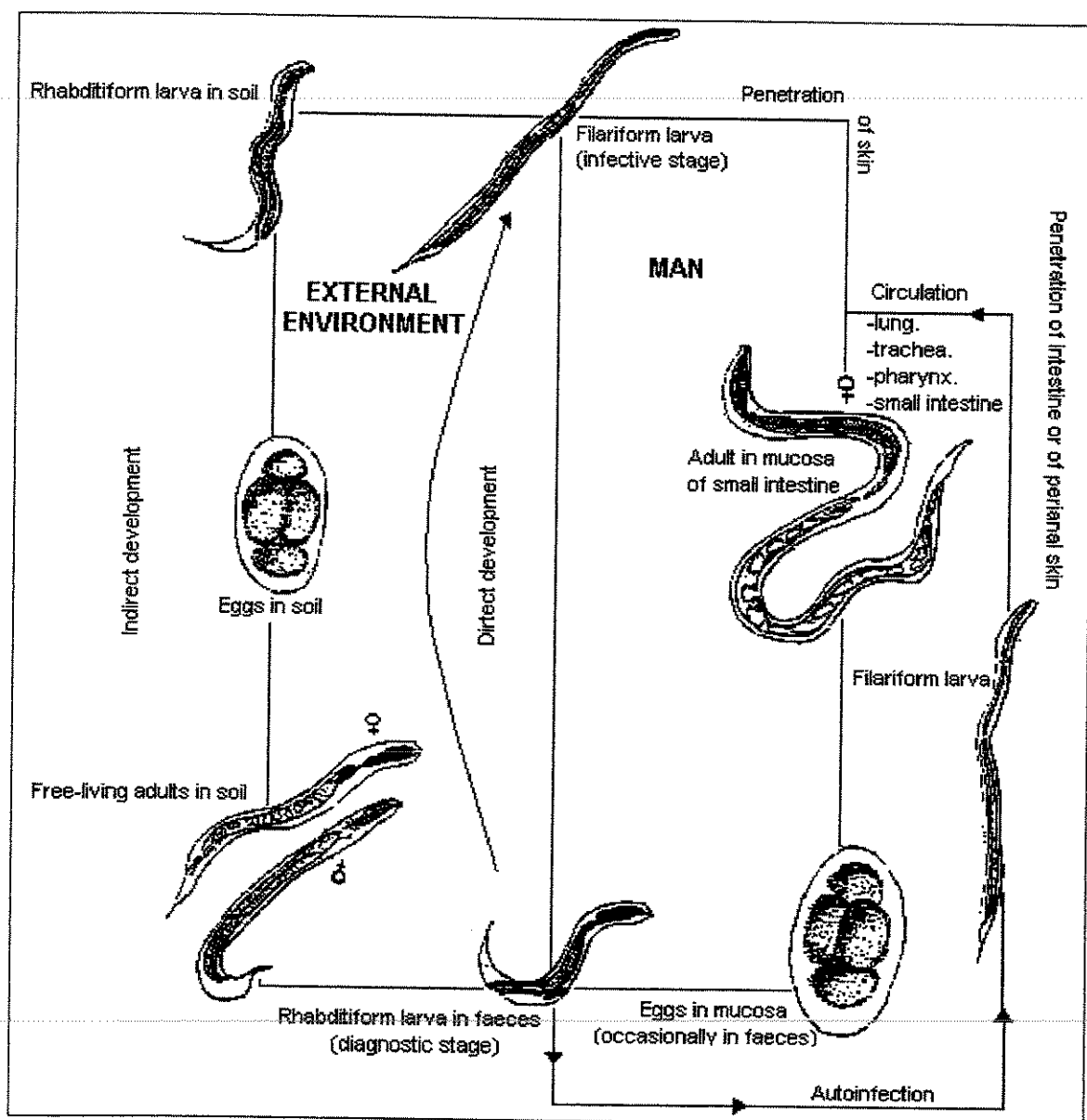
Introdução

O gênero *Strongyloides* pertence ao reino Animalia, sub-reino Metazoa, filo Nematoda, classe Secernentea, ordem Rhabdiasoidea. A família Strongyloididae é composta por parasitas de interesse médico e veterinário. No gênero *Strongyloides* estão incluídas 52 espécies, sendo que somente duas foram descritas como infectantes para o homem: *S. stercoralis* (Bavay, 1876) e *S. fuelleborni* (von Linstow, 1905) (LEVINE, 1979). Este gênero ocorre no homem, em mamíferos domésticos e silvestres, aves, répteis e anfíbios, causando a estrongiloidíase (GROVE, 1996). *S. fuelleborni*, parasita natural de macacos do velho Mundo, provoca a estrongiloidíase humana em algumas regiões da África e Ásia. Uma sub-espécie *S. fuelleborni kellyi* foi descrita recentemente parasitando habitantes de Papua-Nova Guiné (ASHFORD et al., 1992).

A estrongiloidíase tem distribuição mundial heterogênea, sendo a prevalência da infecção humana pelo *S. stercoralis* dividida em três categorias: esporádica (<1%), endêmica (1-5%) e hiperendêmica (>5%) (PIRES & DREYER, 1993). Todas as áreas agrupadas como hiperendêmicas estão situadas nos trópicos, onde as condições climáticas favorecem a disseminação deste parasito. Na Europa, a infecção prevalece em pessoas que trabalham no campo, enquanto que nos trópicos a doença acomete principalmente as crianças pela freqüente permanência em solos contaminados (GROVE, 1996).

No Brasil, a estrongiloidíase é uma doença de grande importância em saúde pública com taxas de infecção atingindo até 41,5% (COSTA-CRUZ, 2000), de acordo com as diferentes regiões e métodos de escolha para o diagnóstico parasitológico. Na região sudeste, a prevalência da estrongiloidíase em crianças, varia de 0,39% (ALMEIDA & COSTA-CRUZ, 1988) a 13,0% (MACHADO & COSTA-CRUZ, 1998).

S. stercoralis é uma espécie dimorfbiótica, isto é, apresenta uma forma parasitária e outra de vida-livre, distintas entre si, que se intercalam no ciclo evolutivo. O ciclo de vida de *S. stercoralis* é considerado complexo, uma vez que se pode desenvolver no meio ambiente (ciclo de vida livre ou indireto) ou no hospedeiro humano (ciclo parasitário ou direto) (Esquema 01).



Esquema 01: Ciclo de vida de *Strongyloides stercoralis* (Adapted and redrawn from NCDC)

No ciclo de vida livre, as larvas rabditóides eliminadas no meio externo junto com as fezes, em ambiente propício, isto é, úmido e quente (25 a 32°C), podem sofrer muda e evoluírem

dentro de 24 a 48 horas em larvas filarióides infectantes, capazes de penetrar em outro indivíduo e iniciar novo ciclo parasitário sem a interposição do estágio de adulto de vida-livre. Ou ainda, outras larvas rabditóides, ao final de dois a cinco dias se diferenciam em macho e fêmea de vida livre. O macho insemina a fêmea, a qual deposita os ovos no solo, e estes se desenvolvem rapidamente liberando larvas rabditóides que por sua vez evoluem para larvas filarióides, as quais retornam ao parasitismo (GROVE, 1996).

No ciclo de vida parasitário, as larvas filarióides quando em contato com a pele ou mucosa do homem, penetram ativamente atingindo os pequenos vasos sendo levadas pela circulação venosa até o lado direito do coração. A partir daí, através das artérias pulmonares, chegam aos capilares, penetram nos alvéolos e ascendem até a traquéia levadas passivamente pelos cílios do epitélio respiratório, até à nasofaringe, onde são deglutidas alcançando, então, o duodeno, para se transformarem em fêmeas partenogenéticas e iniciarem a oviposição dando origem às larvas rabditóides (COSTA-CRUZ, 2000).

Entre as infecções humanas causadas por nematódeos, *S. stercoralis* é o único que possui a habilidade de auto-infecção. Como resultado da auto-infecção contínua, a estrongiloidíase pode persistir por muitas décadas após o indivíduo ter sido infectado mesmo na ausência de novas infecções (LIU & WELLER, 1993; RAMACHANDRAN et al., 1998).

A interação entre *S. stercoralis* e o hospedeiro humano é complexa, existindo três possibilidades de evolução em indivíduos infectados, como: a erradicação, a cronicidade da infecção, e a forma severa ou grave, dependendo de fatores relacionados ao sistema imune do hospedeiro e da habilidade de evasão por parte do parasito (GROVE, 1996). Muitos indivíduos infectados são completamente assintomáticos, enquanto que outros podem apresentar desconfortos intestinais. Além disso, em algumas circunstâncias ocorre uma intensa multiplicação do parasito, caracterizando a hiperinfecção (ou acelerada taxa de autoinfecção) ou ainda a infecção disseminada, quando um grande número de helmintos está presente em vários órgãos, fora dos sítios usuais, como por exemplo, o trato gastrointestinal e os pulmões (NEVA, 1986). A mortalidade nestes casos é alta, refletindo não somente a infecção parasitária, mas também as condições que predis põem a disseminação. Muitas infecções severas têm sido associadas com a imunossupressão especialmente quando há comprometimento da imunidade mediada por células, como ocorre nos linfomas, leucemia, tumores sólidos, infecções por

micobactérias, desnutrição, uso de corticosteróide ou outros agentes imunossupressores e infecção retroviral (LIU & WELLER, 1993).

As manifestações clínicas desta helmintíase estão ligadas à migração do parasito no organismo do hospedeiro, ao sistema imunológico, ao grau da infecção parasitária, ao estado nutricional do hospedeiro e infecções concomitantes (LIU & WELLER, 1993).

O diagnóstico da estrogiloidíase é confirmado pela presença das formas parasitárias de *S. stercoralis*, usualmente encontradas nas fezes, podendo ser vistos no escarro, no aspirado duodenal, urina, ou ocasionalmente em outros fluidos corporais ou amostras de tecidos (GROVE, 1996; COSTA-CRUZ et al., 1997; SIDDIQUI & BERK, 2001).

Várias técnicas têm sido usadas para demonstrar as formas larvárias nas fezes incluindo o esfregaço fecal direto em solução salina, concentração pelo formol-éter (Ritchie) (GROVE, 1996), método de Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948), cultura em papel de filtro (Harada-Mori) e cultura em placa de ágar (KOGA et al., 1991). A identificação torna-se mais precisa quando os parasitos são avaliados pelo exame morfológico, porém isto é raramente possível com espécimes clínicos, uma vez que, a liberação larval nas fezes é mínima e irregular, o que resulta em número muito pequeno na maioria das pessoas infectadas. Desta forma, a confirmação da presença da infecção torna-se extremamente difícil (SATO et al., 1995; GROVE, 1996).

Diante da dificuldade de diagnóstico parasitológico, tem-se a necessidade de se recorrer a métodos sorológicos para o diagnóstico da estrogiloidíase. Vários ensaios imunológicos têm sido desenvolvidos ao longo dos anos, incluindo testes intradérmicos com extratos larvais, imunofluorescência indireta, métodos para a detecção de IgE, hemaglutinação indireta de partículas de gelatina, teste imunoenzimático (ELISA) e “Western Blotting” (GROVE, 1996, SIDDIQUI & BERK, 2001).

Relatos sobre a utilização dos testes sorológicos demonstram que os mesmos podem ser utilizados em conjunto com os exames de fezes no diagnóstico da estrogiloidíase, ou ainda no monitoramento de pacientes (SATO et al., 1995; COSTA-CRUZ et al., 1997; PAULA et al., 2000, SCHAFFEL et al., 2001; SILVA et al., 2003). Os testes sorológicos possuem algumas limitações, como: a obtenção de quantidades de antígenos para fracionamento e análise, e o fenômeno de “reação cruzada”, devido à grande complexidade antigênica que estes parasitas

possuem em relação a bactérias e protozoários (ROSSI et al., 1993). Diante disto, a identificação e caracterização de antígenos específicos através de técnicas de biologia molecular são essenciais para o desenvolvimento de testes de diagnósticos específicos (SATO et al., 1990; CONWAY et al., 1993; SIDDIQUI et al., 1997, 2000 e 2001; RAMACHANDRAN et al., 1997 e 1998; RAVI et al., 2002).

Devido à capacidade de autoinfecção de *S. stercoralis*, da possibilidade de hiperinfecção principalmente em indivíduos imunodeprimidos (FERREIRA et al., 1999; SCHAFFEL et al., 2001) e da eliminação larval mínima e irregular na maioria dos pacientes infectados (RAMACHANDRAM et al., 1998; SIDDIQUI & BERK, 2001), tem-se a necessidade de uma melhor compreensão dos mecanismos biológicos deste parasita.

Algumas espécies do gênero *Strongyloides* sp. (*S. ratti* e *S. venezuelensis*) têm apresentado uma alta correlação com *S. stercoralis*, em relação à especificidade e sensibilidade, permitindo que estas espécies sejam consideradas como fonte heteróloga de antígeno no imunodiagnóstico da infecção humana (SATO et al., 1995; COSTA-CRUZ et al., 1997; MACHADO et al., 2001 e 2003) ou ainda no melhor entendimento da relação parasita-hospedeiro na estrogiloidíase.

S. venezuelensis têm sido utilizado como modelo experimental para o estudo desta helmintíase (TSUJI & FUJISAKI, 1994; SILVEIRA et al., 2002; NEGRÃO-CORRÊA et al., 2003). Mudanças na composição protéica do estágio de larva infectante e o de fêmea parasita em *S. venezuelensis* têm sido demonstrados por Tsuji et al. (1993 e 1997), porém os mecanismos biológicos e bioquímicos necessários para uma adaptação rápida às novas condições ambientais (do estágio de vida livre para o parasitário) permanecem desconhecidos.

O conteúdo e a diversidade das proteínas celulares estão em um estado dinâmico de síntese e degradação em resposta às mudanças ambientais e as condições patofisiológicas dos organismos (GLICKMAN & CIECHANOVER, 2002). As proteases intracelulares apresentam um importante papel nos processos fisiológicos essenciais através do controle dos níveis de proteínas intracelulares. Este processo de degradação é extensivo, complexo e altamente seletivo, onde proteínas específicas são degradadas dentro da célula em diferentes taxas (CIECHANOVER, 1994).

A importância das proteases em vários processos biológicos de parasitas tem sido relacionada com a invasão de células do hospedeiro, o encistamento, o excistamento, a diferenciação, a progressão do ciclo celular, a eliminação e a evasão da resposta imune do hospedeiro (HARROP et al., 1995; HADÁS & STANKIEWICZ, 1997; KLEMB & GOLDBERG, 2002).

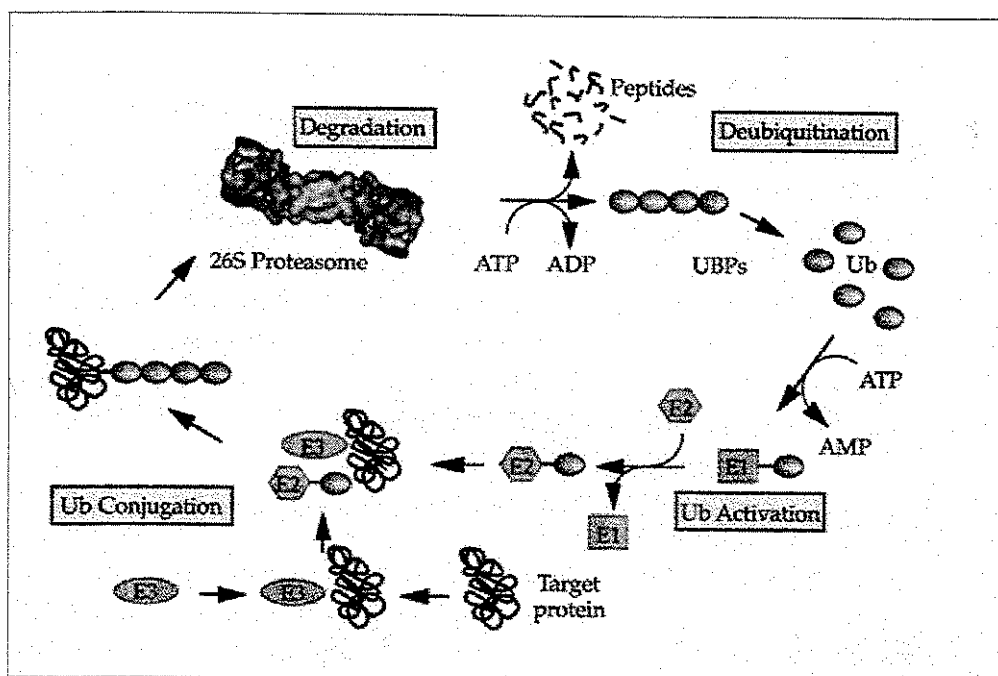
Enquanto proteínas estruturais apresentam uma meia vida longa, as proteínas regulatórias são rapidamente degradadas. Além disso, as proteases com alta especificidade são precisamente reguladas e fisicamente compartimentalizadas. Desta forma, a proteólise celular é um processo complexo, desempenhando inúmeras funções durante a vida e a morte celular (CIECHANOVER & SCHWARTZ, 1998; ROCK et al., 2002). A biosíntese de proteínas e seus mecanismos reguladores estão bem elucidados, porém não são ainda totalmente conhecidos os processos proteolíticos intracelulares, nem os fatores e sinais que controlam as vias de degradação (GLICKMAN & CIECHANOVER, 2002).

Atualmente admite-se a importância de três vias proteolíticas principais envolvidas com a manutenção do conjunto de proteínas de um organismo: a via lisossomal, a via Ca^{+2} dependente e a via proteassoma ubiquitina (ROCK et al., 2002).

A proteólise lisossomal foi o primeiro sistema proteolítico identificado e durante diversos anos pensou-se que toda a atividade degradativa do interior da célula era dependente do lisossomo, porém esta via proteolítica é responsável pela degradação de proteínas extracelulares endocitadas e de proteínas intracelulares em condições de estresse celular (CIECHANOVER, 1994). As proteases dependentes de cálcio, denominadas calpaínas, são cisteíno-proteases, existentes nos diferentes organismos, e estão envolvidas preferencialmente no controle dos níveis de outras proteínas constituintes de vias metabólicas ou de transdução de sinal (BELCASTRO et al., 1998).

Uma importante via proteolítica localizada no citoplasma e no núcleo de células eucarióticas, é a via proteassoma dependente de ubiquitina (esquema 02). Esta via proteolítica é de fundamental importância na degradação de proteínas envolvidas no ciclo celular, na diferenciação, na adaptação ao estresse celular e na geração de peptídeos envolvidos no reconhecimento imune (GROLL & HUBER, 2003). O descobrimento desta via e da sua função biológica caracterizada como o maior sistema de degradação extralisossomal, têm proporcionado

uma nova concepção para a compreensão da regulação de processos celulares básicos através do controle seletivo e temporário da degradação proteolítica (NAUJOKAT & HOFFMANN, 2002).



Esquema 02: Via proteolítica proteassoma-ubiquitina (<http://www.hgu.mrc.ac.uk/Research/Gordon>)

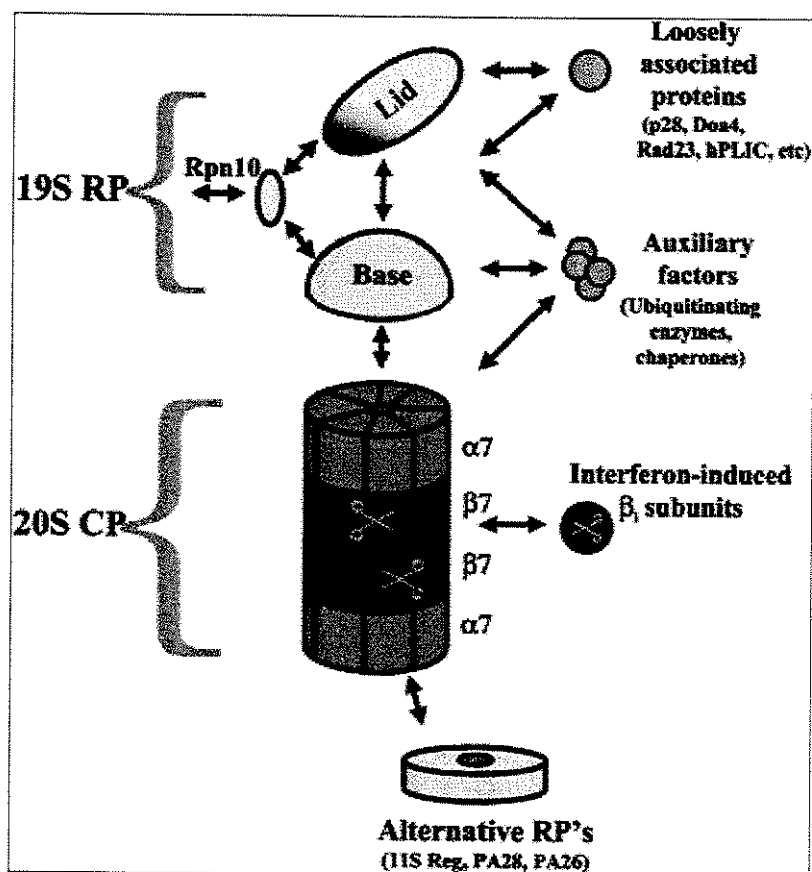
O proteassoma tem importante papel no “turnover” de proteínas presentes no citoplasma e no núcleo de células eucarióticas. Nesta via de degradação o substrato a ser degradado é primariamente marcado com múltiplas moléculas de ubiquitina (HERSHKO, 1996; PAUGAM et al., 2003). As proteínas conjugadas a cadeias de poli-ubiquitina são então, rapidamente degradadas pelo proteassoma 26S em pequenos peptídeos de 3 a 25 aminoácidos (CIECHANOVER & SCHWARTZ, 1998; GROLL & HUBER, 2003).

A conjugação da ubiquitina, um polipeptídeo de 76 aminoácidos, ocorre via mecanismo de adição seqüencial enzimática, onde a ubiquitina livre é carregada até a proteína alvo, através de uma enzima ativadora de ubiquitina dependente de ATP (E1), uma conjugadora de ubiquitina (E2) e uma ligase (E3). Nesta cascata ocorre a ligação covalente da ubiquitina na sua região glicina C-terminal em um grupo amino livre sobre a proteína alvo, usualmente no resíduo de lisina 48 (DeMARTINO & SLAUGHTER, 1999). A ligação isopeptídica pode ocorrer em outros resíduos de lisinas (6, 11, 29 ou 63), resultando em diferentes funções biológicas. As cadeias formadas sobre o resíduo de lisina 63 estão envolvidas na endocitose de proteínas de membrana, no reparo do DNA, na resposta ao estresses e em funções ribossomais (MYKLES, 1998; PICKART, 2000, AGUIAR & WENDLAND, 2003; HATAKEYAMA & NAKAYAMA, 2003). As cadeias curtas formadas sobre os resíduos de lisina 29, parecem estar associadas com o alongamento da cadeia de poli-ubiquitina no substrato alvo, enquanto que múltiplas cadeias formadas nos resíduos 6 e 11, podem se ligar a subunidade S5a do complexo 19S, porém não é claro se estas possam ser reconhecidas e degradadas pelo proteassoma 26S (GLICKMAN, & CIECHANOVER, 2002).

Existe uma hierarquia estrutural, das enzimas (ubiquitinação) identificadas em leveduras e mamíferos, onde somente se conhece uma E1, algumas E2 (em torno de 20) e centenas de E3, a qual confere uma interação altamente específica do substrato destinado a ubiquitinação (ADAMS, 2003).

Considerações sobre o entendimento da conjugação de ubiquitina, e o seu papel na regulação da degradação e na modificação de proteínas têm sido realizados por diversos autores. Estudos têm demonstrado que a regulação ocorre através da deubiquitinação (WILKINSON, 1997). Assim, as enzimas deubiquitinadoras (DUBs) têm sido reconhecidas como um fator regulatório importante da via ubiquitina dependente (CHUNG & BACK, 1999), uma vez que estas possuem duas funções principais: a remoção da ubiquitina da proteína substrato, resultando na não destruição proteolítica; e na geração de monômeros de ubiquitina pela clivagem de cadeias de poli-ubiquitinas das proteínas degradadas (MYKLES, 1998).

O proteassoma 26S consiste de dois subcomplexos, o 20S (core proteolítico) e o 19S (core regulatório) (Esquema 03). O core proteolítico 20S é um complexo enzimático em forma de barril ligado em suas extremidades ao complexo regulatório 19S (NAUJOKAT, HOFFMANN, 2002).



Esquema 03: Proteassoma 26S (Glickman, Ciechanover, 2002)

O proteassoma 20S é composto por dois tipos de subunidades alfa e beta, dispostas na forma de um cilindro formado por quatro anéis, onde cada um contém sete diferentes subunidades (α 1-7 β 1-7 β 1-7 α 1-7), as quais favorecem a formação de um poro central responsável pela hidrólise das proteínas alvos no sítio proteolítico (GLICKMAN & CIECHANOVER, 2002). Nos anéis formados pela subunidade beta, estão localizados os sítios proteolíticos nos resíduos de treonina amino-terminal voltado para a cavidade central do complexo 20S (NAUJOKAT & HOFFMANN, 2002). As subunidades alfa não proteolítica auxiliam na translocação do substrato ubiquitinado para dentro da cavidade central e interagem conformacionalmente com o complexo regulatório 19S (VOGES et al., 1999).

O proteassoma 20 S tem sido chamado de protease multicatalítica, devido à presença de três subunidades proteolíticas ativas para sítios diferentes em um único anel beta. Estes sítios atuam juntos na degradação de polipeptídeos, com diferentes especificidades na sequência de aminoácidos (ROCK et al., 2002). Uma atividade referida como quimiotripsina-símile cliva preferencialmente o sítio carboxílico de aminoácidos hidrofóbicos, a atividade de tripsina-símile cliva após resíduos básicos e a terceira cliva primariamente após resíduos ácidos (GLICKMAN & CIECHANOVER, 2002). Este último sítio tradicionalmente chamado de peptidilglutamilpeptídeo hidrolase, por clivar após resíduos de ácidos aspárticos e de ácidos glutâmicos podem ser chamados ainda de pós-acídicos ou caspase-símile. Baseando-se na análise da difração raio X, o sítio de quimiotripsina-símile, o tripsina-símile e o pós-acídico estão localizados nas subunidades $\beta 5$, $\beta 2$, e $\beta 1$, respectivamente (ROCK et al., 2002, GROLL & HUBER, 2003).

As subunidades alfa e beta do 20S foram classificadas baseando-se na sua homologia com o proteassoma primitivo encontrado na arqueobactéria *Thermoplasma acidophilum* (LOWE et al., 1995).

O complexo regulatório 19S, consiste do subcomplexo base composto de seis subunidades ATPases (Rpt 1-6) pertencentes a família AAA e duas não ATPases (Rpn2/S1, Rpn1/S2), e o subcomplexo tampa composto de 8 subunidades não ATPases (Rptn 3/S3, 5/p55, 6/S9, 7S10a, 8/S12, 9/S11, 11/S13 e 12/S14) (NAUJOKAT & HOFFMANN, 2002; FERREL et al., 2000). A base está em contato com as subunidades alfa do 20S, promovendo a abertura do canal proporcionando assim a translocação do substrato até a região central do 20S, onde será degradado. As subunidades que formam a tampa e a base apresentam uma elevada similaridade em composição de aminoácidos desde leveduras a mamíferos, sugerindo uma importante função biológica para estas estruturas (ROCK et al., 2002). O 19S é responsável por diferentes funções bioquímicas, como reconhecimento de substrato poli-ubiquitinado, e atividade isopeptidase para a clivagem das cadeias de poli-ubiquitina em monômeros de ubiquitina (FERREL et al., 2000; GLICKMAN & CIECHANOVER, 2002; NAUJOKAT & HOFFMANN, 2002).

As subunidades ATPases da partícula regulatória (19S) pertencem a superfamília das AAA (ATPases associadas com várias atividades celulares), porém as subunidades do proteassoma formam um grupo separado dos outros 17 membros da família AAA (PATEL & LATTERICH, 1998). Os membros desta superfamília possuem um domínio AAA de 230

aminoácidos altamente conservados entre seus membros (VALE, 2000; WOLLENBERG, & SWAFFIELD, 2001). A superfamília das AAA está envolvida em diversas funções celulares, como na replicação do DNA, no transporte através da membrana, regulação do citoesqueleto, biogênese de organelas e na motilidade intracelular (PATEL & LATTERICH, 1998; VALE, 2000; MAURIZI & LI, 2001). Por outro lado, as subunidades que fazem parte do complexo 19S podem ser responsáveis pelo consumo de ATP pelo proteassoma 26S durante a proteólise, e assim auxiliar no reconhecimento e desdobramento do substrato alvo, e na translocação do mesmo até o canal central do proteassoma 20S (FU et al., 1999).

A subunidade S5a (Rpn10) do complexo 19S está localizada na interfase dos subcomplexos base e tampa, e é capaz de se ligar a cadeias de poliubiquitina (SAEKI et al., 2002). Com isso tem sido proposto que a S5a pode ser o componente reconhecedor de conjugados ubiquitinados do complexo 19S (VOGES et al., 1999). Recentemente existem evidências de que a subunidade ATPase3 interage com cadeias poliubiquitinadas, funcionando também como um sinal para a degradação pelo proteassoma 26S em eucariotos (LAM et al., 2002).

Além do complexo regulatório 19S (PA700), existe outro complexo regulatório, o 11S (PA28), o qual em eucariotos superiores, desempenha um importante papel na apresentação de antígenos através de moléculas do complexo maior de histocompatibilidade classe I, MHC I (ROCK et al., 2002; PAUGAM et al., 2003). O PA28 é composto de três subunidades alfas e três ou quatro beta idênticas que podem estar associadas com as subunidades alfa de um ou ambos os lados do proteassoma 20S. Em eucariotos superiores as subunidades betas catalíticas ($\beta 1$, $\beta 2$, e $\beta 5$) são substituídas pelas homólogas (LMP2, MECL-1 e LMP7), respectivamente, após estímulo com IFN- γ formando o proteassoma conhecido como imunoproteassoma (DeMARTINO, & SLAUGHTER, 1999, 2000; ROCK et al., 2002). O imunoproteassoma tem a capacidade de formar peptídeos com aminoácidos hidrofóbicos ou básicos no C-terminal, sendo estes associados com o MHC de classe I, epítopos próprios para a via de apresentação de antígeno (BOCHTLER et al., 1999). As subunidades do PA28 não possuem homologia com os componentes do complexo 19S, podendo indicar uma evolução relativamente recente (DeMARTINO & SLAUGHTER, 1999; ROCK et al., 2002).

A ocorrência do proteassoma 26S como uma maquinaria proteolítica altamente elaborada é restrita às células eucarióticas. O proteassoma *T. acidophilum* possui uma composição relativamente simples contendo somente duas diferentes subunidades alfa e beta, porém um complexo proteolítico estruturalmente similar aos eucariotos superiores (BAUMEISTER et al., 1998). A primeira evidência da existência do proteassoma em bactérias foi através de pesquisas na base de dados por comparações de seqüências depositadas (LUPAS et al., 1994), as quais indicam a existência de dois proteassomas, um contendo somente duas subunidades beta associadas diretamente com uma subunidade ATPásica e outro muito similar ao encontrado em arqueobactéria (BAUMEISTER et al., 1998).

Assim, a degradação de proteínas pelo proteassoma 26S nas células eucarióticas como sendo um processo altamente conservado pode estar relacionado não somente com as funções metabólicas, mas também com funções regulatórias. De fato, os processos celulares básicos como degradação de proteínas durante a proliferação celular é devido ao proteassoma 26S (NAUJOKAT & HOFFMANN, 2002). Existem evidências, de que a não regulação da degradação de proteínas pelo proteassoma contribui para diversas patologias de doenças humanas, como: câncer, doenças neuro e miodegenerativas (GLICKMAN & CIECHANOVER, 2002).

Uma das formas de se entender a função do proteassoma é modular a sua atividade 'in vivo'. Atualmente várias classes de pequenas moléculas inibidoras têm sido descritas, dentre essas se têm os peptídeos aldeídos sintéticos, como o MG132 e PSI, e os produtos naturais lactacistina, epoxomicina, e a caetacistina (LEE & GOLDBERG, 1998). Alguns destes inibidores são capazes de penetrar nas células, bloquear drasticamente as funções do proteassoma reversível ou irreversivelmente, sem afetar os processos biológicos vitais, como a síntese de ATP e de proteínas, através da formação de ligações covalentes com o sítio de treonina ativo das subunidades beta do proteassoma 20S (RURPP et al., 1998; ADAMS, 2003). Em estudos pré-clínicos, utilizando modelos animais, os inibidores do proteassoma promoveram a morte celular de diversos tipos de tumores 'in vitro' e 'in vivo' (ADAMS, 2003), por tanto, estes compostos podem ser alternativos promissores no tratamento de diversos tumores humanos (LEE & GOLDBERG, 1998).

O arranjo desta protease em uma estrutura com várias atividades altamente compartimentalizada, conservada através da evolução, faz com que esta partícula seja praticamente indistinguível entre leveduras e o homem (ROCK et al., 2002).

O proteassoma 20S tem sido identificado em diferentes organismos, desde arqueobactérias até eucariotos superiores, sendo altamente conservado durante a evolução das espécies, com uma grande similaridade estrutural e sequencial (BOUZAT et al., 2000; GROLL & HUBER, 2003). Como mencionado anteriormente em eucariotos superiores o proteassoma está envolvido em diversas funções celulares, porém, o seu papel fisiológico em arqueobactérias ainda não é claro. Estudos com inibidores sugerem que o 20S nestes organismos não é essencial, indicando a possibilidade da existência de outras vias de degradação de proteínas (BOCHTLER et al., 1999), uma vez que, tais inibidores possuem o efeito marginal dentro de condições normais de crescimento destes organismos (RURPP et al., 1998).

Nos últimos anos, diversos grupos independentes têm mostrado a importância dos proteassomas para o desenvolvimento normal de parasitos, especialmente tripanossomatídeos. Em caracterização do proteassoma 20S de *Trypanosoma brucei* em relação ao de ratos, tem-se demonstrado que eles são estruturalmente similares, porém funcionalmente distintos (HUA et al., 1996).

Além disso, a importância do proteassoma em diferentes organismos vem sendo relatada recentemente por diversos autores. No protozoário parasita, *T. cruzi*, quando a atividade do proteassoma é inibida ocorrem profundas mudanças estruturais, impedindo a transformação do estágio de amastigota para tripomastigota (DIEGO et al., 2001). No causador da malária, *Plasmodium falciparum*, a lactacistina tem sido um promissor candidato a drogas, uma vez que tem o efeito bloqueador sobre o crescimento de cepas do parasito resistentes e sensíveis a cloroquina (CERTAD et al., 1999). De modo semelhante, inibidores do proteassoma tem bloqueado o crescimento intracelular e a replicação de *Toxoplasma gondii* (SHAW et al., 2000). Além disso, a caracterização do proteassoma através da clonagem de algumas subunidades que compõe o complexo regulatório em outros protozoários intestinais de importância médica, como *Giardia* sp e *Entamoeba* sp, indicam uma alta similaridade com os proteassomas já descritos com os de arqueobactérias e eucariotos superiores (PAUGAM et al., 2003).

Por outro lado, existem poucos relatos sobre a função e caracterização molecular em helmintos. No nematódeo parasita, *Trichostrongylus colubriformis*, o tratamento com frações enriquecidas do proteassoma deste parasito, pode levar a propriedades moduladoras quando utilizado para imunizar carneiros infectados com este parasito (STANKIEWICZ, HADÁS, 2000). O nematódeo de vida-livre, *Caenorhabditis elegans*, tem sido utilizado como modelo para a análise das interações das subunidades que compõe o proteassoma 26S, além de isolar outras proteínas potenciais para a interação com este complexo multienzimático, através de extensa pesquisa no banco de dados (DAVY et al., 2001), estes dados constituem o início do estudo da via proteolítica em helmintos. No trematódeo, *Schistosoma mansoni* algumas subunidades que compõe esta via tem sido evidenciadas em nosso laboratório, bem como estudos “in vitro” utilizando inibidores específicos do proteassoma (dados não publicados).

Mecanismos moleculares envolvidos na regulação da diferenciação da larva infectante para a forma parasitária de *Strongyloides* sp. são pouco conhecidos. Relatos sobre a importância de proteínas neste processo têm sido mencionados por Gallego et al. (1998) e Massey-Jr et al. (2001), porém não tem sido identificada a presença do proteassoma neste helminto.

Questões sobre o complexo ciclo de vida do nematódeo *Strongyloides*, permanecem sem respostas. O que determina o direcionamento do ciclo de vida direto ou indireto pela fêmea partenogenética? Ou ainda, o que explicaria a manutenção da direção tomada? Pode-se especular a atuação da via proteassoma-ubiquitina no controle do ‘turnover’ de proteínas intracelulares deste parasita, as quais podem ser de crucial importância neste direcionamento.

Diante destas considerações pode-se entender que a investigação do proteassoma em *S. venezuelensis*, através da caracterização molecular de algumas subunidades e da atividade enzimática deste complexo proteolítico certamente contribuirá para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no ciclo complexo deste parasito e das manifestações desta parasitose.

Capítulo 1

CARACTERIZAÇÃO DO PROTEASSOMA 26S EM *STRONGYLOIDES VENEZUELENSIS*

Paula, Fabiana Martins¹; Borges, William Castro²; Guerra-Sá, Renata²; Ueta, Marlene Tiduko¹; Rodrigues, Vanderlei².

1. Laboratório de Helminologia, Departamento de Parasitologia, Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.
2. Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo.

O proteassoma 26S é um complexo multienzimático intracelular, com importante papel na proteólise celular. O presente trabalho é o primeiro relato da presença deste complexo no nematódeo *Strongyloides venezuelensis*. Para tanto foram obtidos extratos brutos de dois estágios de desenvolvimento, larva filarióide e fêmea partenogenética. Os extratos brutos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes 12%, seguido pelo “Western-blotting” na presença de anticorpos anti-ubiquitina e anti- α 20S. A atividade peptidásica de quimiotripsina-símile e tripsina-símile utilizando-se os extratos brutos foi determinada por substratos fluorogênicos. Os extratos dos dois estágios demonstraram a presença de conjugados ubiquitinados. O anticorpo anti- α 20S detectou bandas (29, 30 e 32kDa) características do proteassoma 20S em *S. venezuelensis*; semelhante aos observados em outros organismos. As atividades peptidásicas foram presentes nos dois estágios de desenvolvimento de *S. venezuelensis*, porém com valores maiores no estágio de fêmea partenogenética.

Palavras chaves: *Strongyloides*, atividade proteolítica, proteassoma 20S, e proteassoma 26S.

1. Introdução

As proteases apresentam um importante papel nos processos fisiológicos uma vez que controlam os níveis de proteínas intracelulares (GLICKMAN & CIECHANOVER, 2002). Em vários parasitas, as proteases têm sido caracterizadas e seu papel proposto em diversos processos, como na invasão das células do hospedeiro, no encistamento, no excistamento, na diferenciação, na progressão do ciclo celular, na eliminação e na evasão da resposta imune do hospedeiro (KLEMBBA & GOLDBERG, 2002).

As proteases com alta especificidade são precisamente reguladas e fisicamente compartimentalizadas (ROCK et al., 2002). A via proteassoma-ubiquitina é o principal complexo enzimático para a destruição seletiva de proteínas em eucariotos (GLICKMAN, CIECHANOVER, 2002).

O proteassoma ou complexo 26S, localizado tanto no núcleo como no citoplasma, consiste de dois subcomplexos, o 20S (core proteolítico) ligado nas suas extremidades ao 19S (core regulatório). O complexo 19S é formado por subunidades ATPases e não-ATPases (TANAKA, 1998). O 19S participa de diferentes funções bioquímicas, tais como: reconhecimento de substratos poli-ubiquitinados, atividade isopeptidase para a clivagem das cadeias poliubiquitinadas em monômeros de ubiquitinas, além de estar localizado nas porções finais do proteassoma 20S, funcionando como um poro de entrada para as proteínas alvos (FERREL et al., 2000).

O proteassoma 20S é um complexo enzimático composto por dois tipos de subunidades, alfa (estruturais) e beta (catalíticas) (HENDIL et al., 2002). Estas subunidades estão dispostas na forma de um cilindro composto por quatro anéis ($\alpha_1-7\beta_1-7\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$), o qual favorecem a formação de um poro central para a hidrólise das proteínas alvos no sítio proteolítico, localizado nas subunidades beta (TANAKA, 1998).

O proteassoma 20S tem sido denominado de protease multicatalítica, uma vez que três subunidades betas de um único anel são proteoliticamente ativas, funcionando juntas na degradação de polipeptídeos alvos em diferentes taxas de especificidade (ROCK et al., 2002). As atividades principais catalisadas pelo 20S incluem a hidrólise de ligações peptídicas para resíduos

de aminoácidos hidrofóbicos (quimiotripsina-símile), básicos (tripsina-símile) e ácidos (peptidilglutamilpeptídeo hidrolase ou caspase-símile) (MAUPIN-FURLOW et al., 2003).

A importância do proteassoma em diferentes organismos vem sendo recentemente relatada. Existem evidências de que o proteassoma esteja envolvido em diversas funções celulares em eucariotos, como: na regulação do ciclo celular, na ativação de processos de transcrição e no processamento intracelular de antígenos (GLICKMAN & CIECHANOVER, 2002).

Em protozoários parasitas (*Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium falciparum* e *Toxoplasma gondii*), onde a remodelação estrutural é um fator crucial no ciclo de vida, tem sido demonstrado que uma inibição transitória desta via proteolítica resulta em falhas nos processos de transformação estágio-específico e na interrupção do ciclo de vida (LI et al., 2000; SHAW et al., 2000; DIEGO et al., 2001). Em alguns nematódeos (*Trichostrongylus colubriformis* e *Caenorhabditis elegans*) tem sido verificada a presença desta via (STANKIEWICZ, HADÁS, 2000; DAVY et al., 2001). Contudo ainda são escassos os relatos sobre a presença e a importância desta via proteolítica em helmintos, sobretudo em nematódeos.

Mudanças na composição protéica entre os estágios de larva infectante e de fêmea parasita de *Strongyloides venezuelensis* foi demonstrado por Tsuji et al., (1993), porém os mecanismos biológicos e bioquímicos necessários para adaptação às novas condições ambientais, do estágio de vida livre para o parasitário, permanecem desconhecidos. Em *S. venezuelensis* esta via proteolítica ainda permanece por ser evidenciada, bem como a sua eventual contribuição para o seu desenvolvimento. Diante disto, o presente trabalho teve como objetivo realizar a caracterização enzimática inicial deste complexo multicatalítico nos estágios de desenvolvimento de larva filarióide e de fêmea partenogenética deste parasita.

2. Material e Métodos

2.1. Obtenção dos estágios evolutivos de *S. venezuelensis*

As larvas filarióides foram obtidas a partir de cultura de fezes de *Rattus norvegicus* em carvão animal por aproximadamente 48 horas a 28°C. As fêmeas partenogenéticas foram retiradas do intestino delgado de *R. norvegicus* com 15 dias de infecção, onde o intestino foi

seccionado longitudinalmente e colocado em solução salina, e levado para estufa a 37°C por uma hora. Em seguida procedeu-se à colheita do parasita individualmente com auxílio de uma pipeta 'Pasteur'. Os estágios evolutivos obtidos foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -70°C até o momento de uso.

2.2. Preparação dos extratos brutos

Aproximadamente 100mg dos estágios de larvas filarioídes ou fêmeas partenogenéticas foram homogeneizados em homogeneizador de teflon durante 15 minutos em banho de gelo, em 1mL de tampão de homogeneização (Tris-HCl 0,1M, acrescido de glicerol 7%, para a análise da atividade proteolítica). Para as análises eletroforéticas, o tampão de homogeneização foi acrescido de inibidores de proteases como o EDTA (Ácido tetracético etilenodiamino) 0,5 M, PMSF (Fluorido fenilmetilsulfonil) 50mM e E-64 10mM. Os respectivos extratos foram centrifugados a 12000xg por 30 minutos a 4°C (sobrenadante A). O precipitado foi submetido a um novo tratamento com tampão de homogeneização acrescido de outros inibidores de proteases, SDS (Sulfato duodecil de sódio) 0,5%, Triton X 100 (9,10 Fenol octil polioxietileno) 0,2% e NaOH (Hidróxido de sódio) 0,36%, seguido por centrifugação para a obtenção de proteínas de membranas (sobrenadante B). O sobrenadante B foi submetido à diálise, durante 12 horas a 4°C em Tris-HCl 10mM pH 7,0.

Com o objetivo de aumentar o perfil de bandas protéicas, o sobrenadante B, após o seu tratamento com tampão de homogeneização acrescido de inibidores de proteases, foi precipitado com acetona PA (1/5 do volume) durante 30 minutos a -20°C, seguido por centrifugação a 12000xg a 4°C durante 30 minutos.

A dosagem protéica das preparações foi realizada pelo método de Lowry et al. (1951). Para a construção da curva padrão foi utilizado uma solução de soroalbumina bovina a 100µg/mL em diferentes concentrações.

2.3. Purificação de conjugados ubiquitinados

Para a obtenção de proteínas poliubiquitinadas presentes nos extratos de larvas e de vermes adultos, o sobrenadante A foi submetido a uma coluna de afinidade (GST-S5a agarose humana,

Affinit UK), segundo instruções do fabricante. A fração eluída foi dialisada durante 12 horas a 4°C em Tris-HCl 10mM pH 7,0.

2.4. "Western Blotting" das frações citossólicas

As análises eletroforéticas das frações citossólicas foram realizadas em gel de poliacrilamida 12% em condições desnaturantes (SDS-PAGE), com cada poço contendo 20µg de proteína, segundo a técnica de Laemmli (1970). As corridas eletroforéticas tiveram duração de 150 minutos a 200V e os géis foram corados por azul de Comassie 0,2% ou pelo método da prata (GIULIAN et al. 1983) para observar o perfil protéico dos estágios evolutivos de *S. venezuelensis*.

A transferência das frações proteicas obtidas por SDS-PAGE para membranas de nitrocelulose, foi realizada no sistema Mini Trans-blot (Bio-Rad), utilizando o tampão de transferência (Tris-HCl 25mM pH 8,3, glicina 192mM e 20% de metanol), durante 1 hora a 100V (TOWBIN et al., 1979). Após a transferência, as membranas foram coradas com Ponceau S, seguido pela descoloração com água destilada. A membrana foi bloqueada durante 12 horas a 4°C em tampão TBST (10mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl, 0,05% Tween 20), contendo 5% leite em pó desnatado, foi colocado para reagir com o anticorpo primário IgG anti-ubiquitina de coelho, na diluição de 1:150 em tampão de "imunoblotting" (Tampão TBST, acrescido de 5% de leite desnatado), durante 4 horas, seguido da incubação com o anticorpo secundário, policlonal anti-IgG de coelho conjugado a biotina (Gibco-BRL), na diluição de 1:1000. O anticorpo foi amplificado com streptoavidina durante 1 hora. A reação antígeno-anticorpo foi revelada com a utilização dos substratos para fosfatase alcalina, o NBT (nitrobluetetrazolium) e o BCIP (5-bromo-4-cloro-3 indolil-fosfato), durante 5 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

O procedimento experimental para verificar a presença de proteassoma 20S foi semelhante ao descrito anteriormente, porém utilizando como anticorpo primário (anticorpo anti-proteassoma humano produzido em células de camundongo, na diluição de 1:1000) e como secundário o monoclonal anti-IgG de camundongo conjugado a fosfatase alcalina (Affinit, UK), na diluição de 1:4000. O anticorpo monoclonal anti-20S possui epítomos conservados para as cadeias α (HC2, HC3, HC8, HC9, Iota e Zeta).

2.5. Medida da atividade proteolítica do proteassoma de *S. venezuelensis*

Para avaliar as atividades de quimiotripsina-símile e de tripsina-símile, foram utilizados os substratos (Affinit, UK): o N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Try-MCA (PM= 763,9 -10mg, S.6510) e o Z-Gly-Gly-Arg-MCA (PM= 616,1 - 5mg, C. 9396), respectivamente. Os extratos brutos, de larvas filarióides e fêmeas partenogenéticas, foram utilizados na concentração de 100µg/ml. Em cada reação foram utilizados: 100µg de cada extrato bruto, 50 µM de cada substrato, 2mM de DTT (Diititreitol), 2mM de MgCl₂ (Cloreto de Magnésio), na presença e/ou ausência de 5 µM de ATP (Trifosfato de adenosina, estoque 50mM) e 25µM de inibidores do proteassoma (MG132, Carbobenzoni-L-leucil-L-leucil-L-leucinal; estoque 10mM, e PSI, Carbobenzoni-ileu-glu(O-t-Bu)-ala-leucinal, estoque 1mM), em um volume final de 240µl de tampão Tris-HCl pH 7,5.

Após a adição da amostra no tubo, a reação foi imediatamente interrompida com etanol absoluto, e mantida no gelo até o momento da leitura. As amostras testes foram incubadas em banho-maria a 37°C por 60 minutos. Logo em seguida, a reação foi interrompida pela adição de 1760µl de etanol absoluto. A leitura foi realizada em fluorímetro (Shimadzul, RF-540, Japan) no comprimento de onda de 380nm de emissão e 440nm de excitação.

3. Resultados

As frações dos sobrenadantes A e B de cada estágio de desenvolvimento, foram obtidos por SDS-PAGE estão demonstrados na Figura 1A. As frações transferidas para a membrana de nitrocelulose e reveladas com anticorpo anti-IgG proteína ubiquitinada biotinilado, estão demonstradas na Figura 1B. Estes resultados mostram que o anticorpo anti-ubiquitina reconhece conjugados poliubiquitinados em extratos citossólicos de *S. venezuelensis* de vários pesos moleculares.

O sobrenadante A transferido para a membrana de nitrocelulose e revelado com anticorpo monoclonal anti-α 20S marcado com fosfatase alcalina esta representado na Figura 1C. Não foi observada variação no perfil de bandas protéicas, utilizando-se o anticorpo anti-α 20S nos dois

estágios de desenvolvimento. O anticorpo anti- α proteassoma humano reconhece bandas características de proteassoma 20S (29, 30 e 32kDa) em extratos de *S. venezuelensis*.

Os extratos dos dois estágios de desenvolvimento submetidos à purificação em cromatografia de afinidade (a qual apresenta a subunidade S5a/Rpn10 recombinante humana acoplada a uma matriz de agarose), estão demonstrados na Figura 2. As frações eluídas da coluna submetidas ao SDS-PAGE 12%, seguida pela transferência para membrana e posterior detecção dos conjugados ubiquitinados, estão representadas na Figura 2A e 2B. O perfil eletroforético das frações (sobrenadante A e B, fração eluída da coluna) apresenta-se diferenciado no padrão de ubiquitinação observado.

Os ensaios de atividade proteolítica utilizando 100mg, dos extratos brutos de cada um dos estágios de desenvolvimento de *S. venezuelensis*, foram realizados na ausência e/ou presença dos inibidores do proteassoma (MG132 e PSI). Os valores estão apresentados em unidades arbitrárias de fluorescências e estão demonstrados nas Tabela 1 e 2, respectivamente para as atividades de quimiotripsina e de tripsina símile nos dois estágios.

Em relação à atividade de quimiotripsina símile, utilizando o substrato fluorescente N-Suc-Leu-Leu-Val-Try-MCA, na presença do inibidor MG132 ocorreu uma redução na atividade de 73,75% e 58,45% nos estágios de larva filarióide e de fêmea partenogenética, respectivamente, em relação ao controle sem inibidor. De modo semelhante ocorreu com o inibidor PSI, com redução de 75% e 62% nos dois estágios estudados, respectivamente larva filarióide e de fêmea partenogenética.

Os valores de fluorescência para a atividade de tripsina-símile, utilizando o substrato Z-Gly-Gly-Arg-MCA, não apresentaram diferenças em relação ao controle sem inibidor e os com inibidores (MG132 e PSI) nos dois estágios evolutivos de *S. venezuelensis*, fato este esperado, uma vez que estes inibidores não atuam sobre a atividade de tripsina-símile.

As atividades tanto de quimiotripsina-símile quanto de tripsina-símile foram maiores no estágio de fêmea partenogenética do que no estágio de larva filarióide.

Os dois ensaios proteolíticos foram realizados na presença e ausência de ATP, porém não houve diferença nos valores de fluorescência.

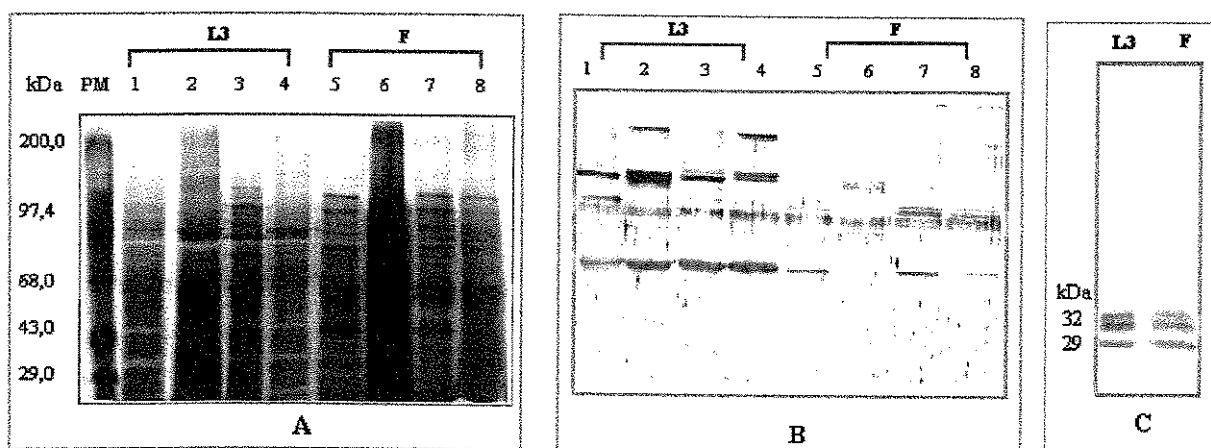


Figura 1: As diferentes preparações do extrato bruto nos estágios de larva infectante (L3) e de fêmea partenogenética (F) de *Strongyloides venezuelensis*. Painel A: Gel de poliacrilamida em condições desnaturantes 12% (SDS-PAGE), Painel B: Membrana de nitrocelulose revelada com anticorpo anti-ubiquitina e Painel C: Membrana de nitrocelulose revelada com anticorpo anti- α 20S.

PM. Peso Molecular. 1 e 5 Sobrenadante A; 2 e 6 Sobrenadante B, precipitado com acetona; 3 e 7 Sobrenadante A, com tampão de homogeneização sem inibidor de proteases; 4 e 8 Sobrenadante B, dialisado durante 12 horas.

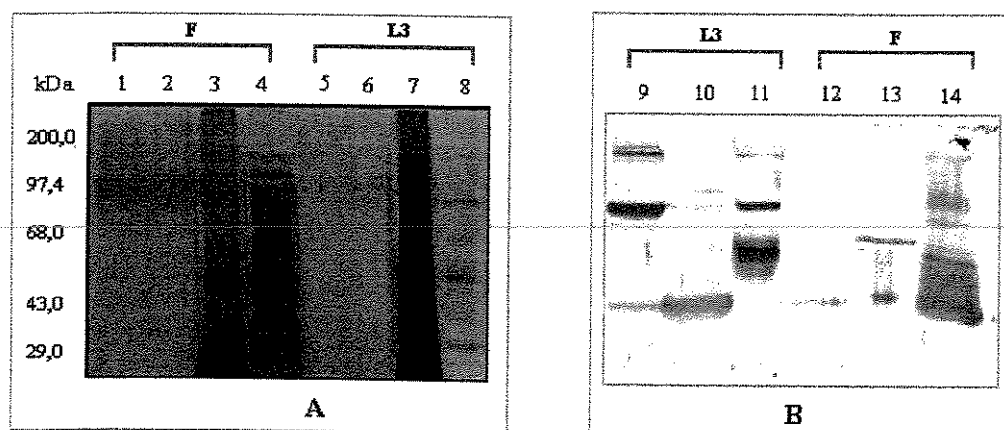


Figura 2: Frações do extrato bruto submetido à coluna de afinidade sepharose S5a humana, nos estágios de larva infectante (L3) e fêmea partenogenética (F). Painel A: Gel de poliacrilamida em condições desnaturantes 12% (SDS-PAGE) e Painel B: Membrana de nitrocelulose revelada com anticorpo anti-ubiquitina. PM- Peso Molecular; 1, 5, 9 e 12 Sobrenadante A; 2, 6, 10 e 13 Sobrenadante B, dialisado durante 12 horas; 3 e 7 fração inicial, e 4 e 8 fração final colhidas da coluna; 11 e 14 fração eluída da coluna.

Tabela 1: Atividade de quimitripsina-símile em extrato bruto dos diferentes estágios (L3 e F) de desenvolvimento de *Strongyloides venezuelensis*, na ausência (controle) e na presença de inibidores do proteassoma (MG132 e PSI). Os valores estão expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF/mg.min⁻¹) e representam a média de três experimentos.

Quimitripsina-símile	Estágios de desenvolvimento de <i>S. venezuelensis</i>	
	Larva Filarióide (L3)	Fêmea Parasita (F)
Controle	161,87 ± 3,49	424,17 ± 24,25
MG 132	42,50 ± 4,02	176,25 ± 53,96
PSI	40,42 ± 4,17	161,00 ± 57,82

Tabela 2: Atividade de tripsina-símile em extrato bruto de diferentes estágios (L3 e F) de desenvolvimento de *Strongyloides venezuelensis*, na ausência (controle) e na presença de inibidores do proteassoma (MG132 e PSI). Os valores estão expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF/mg.min⁻¹) e representam a média de três experimentos.

Tripsina-símile	Estágios de desenvolvimento de <i>S. venezuelensis</i>	
	Larva Filarióide (L3)	Fêmea Parasita (F)
Controle	85,29 ± 23,67	387,50 ± 75,93
MG 132	63,25 ± 10,53	346,86 ± 39,26
PSI	62,66 ± 6,34	364,33 ± 30,02

4. Discussão

As proteases estão envolvidas na diferenciação dos estágios infecciosos de parasitos protozoários até seus respectivos estágios causadores de doença (GONZÁLEZ et al., 1999). Durante o processo de transformação de um estágio de vida-livre para o parasitário, genes podem ser ligados e desligados, e proteínas podem ser seletivamente degradadas e sintetizadas (DIEGO et al., 2001).

Em eucariotos superiores, o substrato destinado para a degradação pelo proteassoma 26S é reconhecido e marcado com moléculas de ubiquitina pelo sistema de ubiquitinação, porém são escassos os relatos sobre este sistema em parasitas (GONZÁLEZ et al., 1996). A expressão de genes codificadores para a ubiquitina tem sido mencionada em *T. cruzi* (KIRCHHOFF et al., 1988) e em *Entamoeba histolytica* (WÖSTMANN et al., 1996).

A participação da via ubiquitina tem sido sugerida em *T. cruzi*, pelo o aumento dos níveis de proteína ubiquitinada quando ocorre a transformação da forma tripomastigota em amastigota (DIEGO et al., 2001). No presente trabalho houve diferença no perfil de proteínas ubiquitinadas na presença do anticorpo anti-ubiquitina, nas diferentes preparações do extrato bruto no estágio de larva em relação ao estágio de fêmea partenogenética. Podendo assim inferir a presença de conjugados ubiquitinados no nematódeo *S. venezuelensis*, uma vez que os mesmos estiveram presentes em todas preparações do extrato bruto, e constituem substratos naturais reconhecidos pelo proteassoma 26S.

Em relação à subunidade S5a/Rpn10 recombinante humana acoplada a uma matriz de agarose (coluna de afinidade), vale-se ressaltar que esta proteína refere-se a uma subunidade presente na porção regulatória do proteassoma 26S, caracterizada como um componente responsável pelo reconhecimento e ligação de conjugados poliubiquitinados destinados à degradação (GLICKMAN & CIECHANOVER, 2002). Neste sentido, devido ao alto grau de conservação desta proteína, já descrita para eucariotos superiores, seria razoável imaginar que as proteínas ligantes eluidas desta coluna poderiam representar substratos naturais do proteassoma 26S de *S. venezuelensis* e ainda, fornecer evidências da existência de uma subunidade homóloga a S5a/Rpn10 na porção regulatória do proteassoma deste organismo. Deste modo, é possível sugerir que os constituintes das frações (amostras 11 e 14, na figura 2B) representam substratos

naturais do proteassoma, e pela diferença do perfil observado em relação às outras frações (sobrenadante A e B, na figura 2B) a poli-ubiquitinação deve constituir a modificação pós-traducional predominante.

Além disso, torna-se importante ressaltar que os conjugados poli-ubiquitinados apresentam uma meia-vida curta, após a modificação pela ubiquitina, sendo rapidamente degradados e ainda susceptíveis a ação proteolítica de enzimas desubiquitinadoras (GROLL & HUBER, 2003). Isto contribui para a manutenção de baixos níveis basais de conjugados ubiquitinados, o que infelizmente torna difícil a identificação e purificação em larga escala destas proteínas.

As frações do sobrenadante A dos dois estágios de desenvolvimento de *S. venezuelensis* apresentaram três bandas de 29, 30 e 32KDa características do proteassoma 20S, na presença do anticorpo anti- α 20 (MCP321). Resultados semelhantes foram obtidos por diversos autores ao analisarem a presença do proteassoma 20S, utilizando o mesmo anticorpo em diferentes protozoários parasitos: *T. gondii* (PAUGAM et al., 2001), *Entamoeba histolytica* (SCHOLZE et al., 1996), *Giardia lamblia* (EMMERLICH et al., 1999), indicando que as subunidades alfa do proteassoma 20S possam ser filogeneticamente preservadas.

Modificações químicas e mutagêneses têm demonstrado que as três principais atividades dos proteassomas em eucariotos (quimiotripsina-símile, tripsina-símile e peptidilglutamilpeptídeo hidrolase) definidas pela degradação de pequenos peptídeos fluorogênicos, podem ser abolidas pela modificação dos sítios ativos de suas subunidades proteolíticas (BAUMEISTER et al., 1998).

Poucos são os conhecimentos sobre o envolvimento do proteassoma nas diferentes funções biológicas de parasitas. Enquanto que a partícula 20S em procariotos tem somente dois tipos de subunidades e possui uma atividade quimiotripsina primária, o proteassoma 20S de levedura, mamíferos e *T. cruzi* contém 14 diferentes subunidades, com mais de uma atividade peptidásica (DIEGO et al., 2001). Como demonstrado o extrato bruto do nematódeo *S. venezuelensis* nos dois estágios de desenvolvimento apresenta as atividades peptidásicas de quimiotripsina e tripsina símile. Em geral, os proteassomas de mamíferos apresentam alta atividade de quimiotripsina e baixa atividade de tripsina, resultados semelhantes foram demonstrados com *S. venezuelensis*, onde os valores de fluorescência são maiores para a

atividade de quimiotripsina-símile em relação aos valores de tripsina-símile nos dois estágios de desenvolvimento. No entanto, os protozoários *T. cruzi*, *T. brucei* (HUA et al., 1996) e *Entamoeba invadens* (GONZÁLEZ et al., 1999) apresentam alta atividade de tripsina, moderada de peptidilglutamil e baixa de quimiotripsina.

Os resultados das atividades de quimiotripsina e tripsina-símile demonstraram serem maiores para o estágio de fêmea partenogenética em relação ao estágio de larva filarióide, o que se pode especular uma maior atividade do proteassoma nesta fase evolutiva uma vez que foi utilizado a mesma quantidade de extrato bruto para os dois estágios para ambas atividades. Além disso, o estágio de larva filarióide (vida-livre) ao passar para o estágio parasitário (fêmea partenogenética) pode necessitar de uma maior degradação e/ou de uma síntese seletiva de proteínas (TSUJI et al., 1997) pelo proteassoma 26S (DIEGO et al., 2001). Porém, novos estudos serão necessários para afirmar a importância do proteassoma neste helminto parasita, sobretudo utilizando-se de métodos de cultura “in vitro” (BAEK et al., 1998).

A recente identificação de inibidores do proteassoma como os aldeídos peptídeos (MG132, PSI), lactacistina e glicotoxina tem auxiliado a definir o papel do proteassoma em vários parasitas protozoários, como na replicação e na transformação (PAUGAM et al., 2003). Frequentes são os relatos sobre a função do proteassoma em protozoários parasitas mantidos em laboratórios através de cultura “in vitro”, como *E. invadens* e *E. histolytica* (MAKIOKA et al., 2002), *Leishmania mexicana* (ROBERTSON, 1999), *T. cruzi* (GONZÁLEZ et al., 1996; DIEGO et al., 2001), *T. brucei* (HUA et al., 1996), *P. falciparum* (GANTT et al., 1998) e *T. gondii* (SHAW et al., 2000). No entanto, helmintos parasitos apresentam dificuldades na sua manutenção em cultura “in vivo” principalmente as fases adultas, pois necessitam de passagens seriadas em animais susceptíveis (BAEK et al., 1998) limitando os ensaios com inibidores.

Os inibidores peptídeos aldeídos bloqueiam a atividade proteolítica sem influenciar as atividades de ATPase e isopeptidase do proteassoma, no qual o inibidor MG132 inibe fortemente a atividade proteolítica de quimiotripsina-símile (LEE & GOLDBERG, 1998), fato este confirmado com os extratos brutos de *S. venezuelensis*. Resultados semelhantes foram obtidos por Robertson, (1999), em extratos purificados do proteassoma 20S em *L. mexicana*. Estes resultados podem indicar a similaridade do proteassoma de *S. venezuelensis* com outros proteassomas já descritos.

No presente trabalho utilizou-se o extrato bruto sem a purificação do proteassoma, pois o extrato bruto retém as suas atividades nativas (DRISCOLL et al., 1992), além disso, processos de isolamento e de purificação ativam o proteassoma levando a mudanças estruturais (CHU-PING et al., 1992). Valores da atividade da protease publicados com extratos crus de parasitas são escassos. A atividade protease medida com o Suc-LLVY-MAC como substrato tem sido reportado em extratos crus somente em alguns protozoários como *E. invadens* (GONZÁLEZ et al., 1996), *E. histolytica* (SCHOLZE et al., 1996), *T. gondii* (PAUGAM et al., 2002) e *L. mexicana* (ROBERTSON, 1999). Em contraste, muitos dados sobre as atividades peptidásicas, têm sido obtidos com proteassomas 20S purificados de *G. lamblia* (EMMERLICH et al., 1999), *T. brucei* (HUA et al., 1996; TO & WANG, 1997), *L. mexicana* (ROBERTSON, 1999) e *E. invadens* (GONZÁLEZ et al., 1996).

O papel do proteassoma em diferentes parasitos seja na diferenciação e na replicação celular, na progressão do ciclo de vida, tem proporcionado informações sobre a biologia, sendo um promissor alvo terapêutico para as diferentes parasitoses humanas (PAUGAM et al., 2003).

Através destes resultados pode-se inferir que o presente trabalho é o primeiro relato da presença do complexo proteassoma 26S no nematódeo *S. venezuelensis*, porém não permitem fazer considerações sobre a função deste complexo enzimático, sendo necessários novos estudos utilizando inibidores deste complexo em estágios mantidos em cultura.

5. Referências Bibliográficas (ABNT/NBR 10520/2002)

- BAEK B-K et al. Viability of eggs, filariform larvae and adults of *Strongyloides venezuelensis* (Nematoda: Strongyloidea) maintained in vitro. The Korean Journal of Parasitology, v.36, n.2, p.99-107, 1998.
- BAUMEISTER W. et al. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. Cell, v.92, p.367-380, 1998.
- CHU-PING M. et al. Identification, purification and characterization of a protein activator (PA28) of the 20S proteasome (Macropain). Journal Biological Chemistry, v.267, n.15, p.10515-10523, 1992.
- DAVY A. et al. A protein-protein interaction map of the *Caenorhabditis elegans* 26S proteasome. European Molecular Biology Organization Reports, v.21, n.9, p.821-828, 2001.
- DIEGO J.L. et al. The ubiquitin-proteasome pathway plays an essential role in proteolysis during *Trypanosoma cruzi* remodeling. Biochemistry, v.40, p.1053-1062, 2001.
- DRISCOLL J. et al. An ATP-stabilized inhibitor of the proteasome is a component of the 1500kDa ubiquitin conjugate-degrading complex. Proceedings National Academy Sciences, v.89, p.4986-4990, 1992.
- EMMERLICH V. et al. H. Isolation and subunit composition of the 20S proteasome of *Giardia lamblia*. Molecular Biochemical Parasitology, v.100, p.131-134, 1999.
- FERREL K. et al. Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem. Trends in Biochemical Sciences, v.25, p.83-88, 2000.
- GANTT S.M. et al. Proteasome inhibitors block development of *Plasmodium* spp. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.42, n.10, p.2731-2738, 1998.
- GIULIAN G.G. et al. Improved methodology for analysis and quantitation of proteins on one-dimensional silver-stained slab gels. Analysis Biochemistry, v.129, n.1, p.277-287, 1983.
- GLICKMAN M.H., CIECHANOVER A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. Physiology Reviews, v.82, p.373-428, 2002.
- GONZÁLEZ J. et al. Proteasome activity is required for the stage-specific transformation of a protozoan parasite. Journal Experimental Medicine, v.184, p.1909-1918, 1996.

- GONZÁLEZ J. et al. Proteasome dependent cyst formation and stage-specific ubiquitin mRNA accumulation in *Entamoeba invadens*. European Journal Biochemistry, v.264, p.897-904, 1999.
- GROLL M., HUBER R. Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle. International Journal of Biochemistry, v.35, p.606-616, 2003.
- HENDIL K.B. et al. 26S proteasomes function as stable entities. Journal Molecular Biological, v.315, p.627-636, 2002.
- HUA S-b et al. Purification and characterization of proteasomes from *Trypanosoma brucei*. Molecular and Biochemical Parasitology, v.78, p.33-46, 1996.
- KIRCHHOFF L.V. et al. Ubiquitin genes in Trypanosomatidae. Journal of Biological Chemistry, v.263, n.25, p.12698-12704, 1988.
- KLEMB M., GOLDBERG D.E. Biological roles of proteases in parasitic protozoa. Annual Reviews of Biochemistry, v. 71, p.275-305, 2002.
- LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, v.277, p.680-685, 1970.
- LEE D.H., GOLDBERG A.L. Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. Trends in Cell Biology, v.8, p.397-403, 1998.
- LI G-D et al. Molecular cloning of a gene encoding a 20S proteasome β subunit from *Plasmodium falciparum*. International Journal for Parasitology, v.30, p.729-733, 2000.
- LOWRY O.H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal Biology Chemistry, v.93, p.265-275, 1951.
- MAKIOKA A. et al. Effect of proteasome inhibitors on the growth, encystation, and excystation of *Entamoeba invadens*. Parasitology Research, v.88, p.454-459, 2002.
- MAUPIN-FURLOW J.A. et al. Archaeal proteasomes: potential in metabolic engineering. Metabolic Engineering, v.5, p.151-163, 2003.
- PAUGAM A. et al. Evidence for the existence of a proteasome in *Toxoplasma gondii*: intracellular localization and specific peptidase activities. Parasite, v.8, p.267-273, 2001.
- PAUGAM A. et al. In vivo effects of gliotoxin, a natural proteasome inhibitor, on the infectivity

- and proteolytic activity of *Toxoplasma gondii*. Parasitology Research, v.88, p.785-787, 2002.
- PAUGAM A. et al. Characterization and role of protozoan parasite proteasomes. Trends in Parasitology, v.19, n.2, p.55-59, 2003.
- ROBERTSON C.D. The *Leishmania mexicana* proteasome. Molecular Biochemistry Parasitology, v.103, p.49-60, 1999.
- ROCK K. et al. Protein degradation and the generation of MHC class I presented peptides. Advances in Immunology, v.80, p.1-70, 2002.
- SCHOLZE H. et al. T. Evidence for the existence of both proteasomes and a novel high molecular weight peptidase in *Entamoeba histolytica*. Journal Biological Chemistry, v.271, n.11, p.6212-6216, 1996.
- SHAW M.K. et al. Proteasome inhibitors block intracellular growth and replication of *Toxoplasma gondii*. Parasitology, v.121, p.35-47, 2000.
- STANKIEWICZ M., HADÁS E. Immunomodulation of lambs following treatment with a proteasome preparation from infective larvae of *Trichostrongylus colubriformis*. Parasitology Research, v.86, p.422-426, 2000.
- TANAKA K. Proteasomes: Structure and Biology. Journal Biochemistry, v.123, p.195-204, 1998.
- TO W-Y, WANG CC. Identification and characterization of an activated 20S proteasome in *Trypanosoma brucei*. Federation of European Biochemical Societies Letters, v.404, p.253-262, 1997.
- TOWBIN H. et al. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proceedings National Academy Sciences, v.76, p.4350-4354, 1979.
- TSUJI N. et al. Protein analysis of *Strongyloides venezuelensis* by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Journal Veterinary Medicine Science, v.55, n.5, p.881-883, 1993.
- TSUJI N. et al. Expression of a 70-kDa heat-shock-related protein during transformation from free-living infective larvae to the parasitic stage in *Strongyloides venezuelensis*. Parasitology

Research, v.83, p.99-102, 1997.

WÖSTMANN C. et al. Characterization of ubiquitin genes and –transcripts and demonstration of a ubiquitin-conjugating system in *Entamoeba histolytica*. Molecular and Biochemical Parasitology, v.82, p.81-90, 1996.

Capítulo 2

ANÁLISE MOLECULAR DAS SUBUNIDADES ALFA 6 E BETA 6 DO PROTEASSOMA 20S EM *STRONGYLOIDES VENEZUELENSIS*.

Paula, Fabiana Martins¹; Pereira Jr, Olavo dos Santos²; Guerra-Sá, Renata²; Ueta, Marlene Tiduko¹; Rodrigues, Vanderlei².

1. Laboratório de Helmintologia, Departamento de Parasitologia, Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.
2. Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo.

O proteassoma 20S tem sido identificado em diversos organismos, sendo altamente conservado durante a evolução das espécies. O presente trabalho teve como objetivo a análise molecular das subunidades alfa 6 e beta 6 do proteassoma 20S em *Strongyloides venezuelensis*. A partir de dois estágios de desenvolvimento (larva filarioíde e fêmea partenogenética) deste nematódeo foram extraídos o RNA e o DNA genômico. Os produtos de amplificação a partir do cDNA e do DNA genômico utilizando os oligonucleotídeos específicos, foram seqüenciados e submetidos a busca de homologia no banco de dados. O alinhamento das seqüências nos dois estágios demonstrou 100% de similaridade para cada uma das subunidades estudadas. As seqüências preditas apresentaram homologia com várias seqüências codificadoras para as subunidades alfa 6 e beta 6 em uma grande variedade de organismos, reforçando a grande similaridade seqüencial dos componentes do proteassoma 20S entre os diferentes organismos.

Palavras-Chaves: *Strongyloides*, proteassoma 20S, subunidades alfa e beta.

1. Introdução

A via proteassoma-ubiquitina dependente de ATP é um importante mecanismo de controle da proteólise intracelular, e tem como função biológica a degradação extralissossomal de proteínas tanto no citoplasma quanto no núcleo de células eucarióticas (TANAKA et al., 1998; FERREL et al., 2000; GLICKMAN & CIECHANOVER, 2002).

O proteassoma 26S de eucariotos superiores consiste de dois subcomplexos, o proteassoma 20S e o complexo regulatório 19S. A atividade proteolítica é encontrada no 20S, o qual consiste de duas cópias de 14 diferentes subunidades, pertencentes a duas famílias, as subunidades tipo alfas (estruturais) e as betas (catalíticas) (COUX et al., 1996; HENDIL et al., 2002). Estas subunidades estão dispostas na forma de um cilindro composto por quatro anéis ($\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$). Os sítios proteolíticos, localizado nas subunidades betas, estão voltados para a cavidade central do complexo 20S (NAUJOKAT, HOFFMANN, 2002). As subunidades alfa auxiliam no deslocamento do substrato para dentro da cavidade central, além de interagirem conformacionalmente com o 19S. O complexo regulatório 19S consiste de uma base formada por seis subunidades ATPases da família AAA e duas não-ATPases e uma tampa composta de oito subunidades não-ATPases (HIRSH, PLOEGH, 2000). O 19S é responsável pelo reconhecimento de substratos poli-ubiquitinados, pela atividade isopeptidase, além de poro de entrada para as proteínas alvos (FERREL et al., 2000; GLICKMAN, CIECHANOVER, 2002).

O proteassoma 20S tem sido identificado em diferentes organismos, deste arqueobactérias até eucariotos superiores, sendo altamente conservado durante a evolução das espécies (GROLL, HUBER, 2003). Existem evidências de que o proteassoma esteja envolvido em diversas funções celulares em eucariotos, tais como: regulação do ciclo celular, ativação de processos de transcrição e processamento intracelular de antígenos (CIECHANOVER, 1994). Porém, o seu papel fisiológico em arqueobactérias não é claro, uma vez que em estudos com inibidores do proteassoma dentro de condições normais, estes organismos utilizaram outras vias de degradação de proteínas (BOCHTLER et al., 1999).

A importância do proteassoma em diferentes parasitas vem sendo relatada recentemente por diversos autores. Bloqueando as funções do proteassoma em protozoários parasitas, previne-se a mudança morfológico estágio-específica em *Trypanosoma*, *Plasmodium* e *Entamoeba*; a

replicação, mas não impede a invasão na célula hospedeira por *Trypanosoma*, *Plasmodium* e *Toxoplasma* (GONZÁLEZ et al., 1999; SHAW et al., 2000; DIEGO et al., 2001; PAUGAM et al., 2002 e 2003). Em *Giardia* sp, têm sido identificadas subunidades alfa e beta do proteassoma 20S (EMMERLICH et al., 1999).

Recentemente, *Strongyloides venezuelensis* tem sido utilizado como modelo experimental para o estudo da relação parasita-hospedeiro (NEGRÃO-CORRÊA et al., 2003) ou como fonte de antígeno para o diagnóstico da estrongiloidíase humana (MACHADO et al., 2001 e 2003). É de fundamental importância entender alguns aspectos da biologia deste parasita, e assim promover o desenvolvimento de métodos de diagnósticos mais eficazes. Portanto se baseando na importância da proteólise intracelular e tendo como princípio que a maior via proteolítica nos organismos é a via proteolítica proteassoma-ubiquitina, este trabalho teve como objetivo a caracterização molecular das subunidades alfa 6 e beta 6 do proteassoma 20S nos estágios de larva filarioide e de fêmea partenogenética de *S. venezuelensis*.

2. Material e Métodos

2.1. Obtenção dos estágios evolutivos de *S. venezuelensis*

As larvas filarióides foram obtidas a partir de cultura de fezes de *Rattus norvegicus* em carvão animal por aproximadamente 48 horas a 28°C. As fêmeas partenogenéticas foram retiradas do intestino delgado de *R. norvegicus* com 15 dias de infecção, onde o intestino foi seccionado longitudinalmente e colocado em solução salina, e levado para estufa a 37°C por uma hora. Em seguida procedeu-se à colheita do parasita individualmente com auxílio de uma pipeta 'Pasteur'. Os estágios evolutivos anteriormente coletados foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -70°C até o momento de uso.

2.2. Extração de RNA total

Aproximadamente 100mg de larvas filarióides e fêmeas partenogenéticas de *S. venezuelensis* foram ressuspensos em 1ml de trizol e lisados em homogeneizador do tipo

“politron” por aproximadamente 3 minutos. Em seguida procedeu-se à extração do RNA total pelo método de Trizol (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. A estimativa da quantidade de RNA total obtida foi realizada em espectrofotômetro (U2001 UV/Vis, Hitachi, USA), na razão de 260/280nm, e a pureza da extração foi observada por eletroforese em gel de agarose 1%.

2.3. Extração de DNA genômico

Aproximadamente 100mg de larvas filarióides e/ou fêmeas partenogênicas de *S. venezuelensis* foram submetidas sucessivas lavagens em água mili-Q, seguidas da adição de hipoclorito de sódio 1% (volume/ volume) e incubação a 40°C por 10 minutos. Depois de novas lavagens com água mili-Q, os parasitos foram incubados em estufa de CO₂ com 10% de atmosfera saturada a 40°C, durante 10 minutos (DAWKINS & SPENCER, 1989). Terminado esta etapa, o tampão de lise (Tris-HCl 100mM, EDTA 50mM, SDS 1% e β mercaptoetanol 70mM) foi adicionado na proporção de 1:10 ao tratado inicial, seguido pela adição de NaCl 200mM e proteinase K (0,1mg/ml). Após uma hora, foi adicionado CTAB/NaCl (Brometo de hexadecil trimetil amônio/Cloreto de sódio) no lisado. Em seguida, procedeu-se a extração com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e o tratamento da fase aquosa com clorofórmio (vol/vol). A fase aquosa foi precipitada com isopropanol (2/3 volume) durante 12 horas (-20°C). O precipitado foi lavado com etanol 70%, seco em temperatura ambiente e ressuspenso em 20 µl de Tampão de Extração (Tris-HCl 10mM, EDTA 1M) a 37°C. A estimativa da quantidade de DNA genômico foi realizada em espectrofotômetro (U2001 UV/Vis, Hitachi, USA) na razão de 260/280nm e a integridade da extração obtida foi observada por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

2.4. Obtenção dos cDNAs de componentes do proteassoma pela Reação da cadeia da polimerase utilizando a “Transcriptase Reverse” (RT-PCR)

Para a análise e caracterização das seqüências genômicas e dos transcritos que codificam para as subunidades alfa 6 e beta 6 do proteassoma 20S, foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores (“forward” 5’-ATGATGAGTGCCTCAACCCC-3’; “reverse” 5’-CCTGAAGATAGGATCTGCTT-3’) para a subunidade alfa 6; e os oligoiniciadores (forward 5’-

ATGCTTAGTGTACTTAACGC-3' e reverse 5'-GGAAAACCGATACACTGGAA-3') para a subunidade beta 6. Estes iniciadores foram idealizados com base em seqüências de cDNAs, obtidas do projeto "Genoma do *Schistosoma mansoni*" (VERJOVSKI-ALMEIDA et al., 2003), visando a amplificação de toda a matriz de leitura aberta dos genes alfa 6 e beta 6.

Utilizando-se da técnica de RT-PCR, a primeira fita de cDNA foi sintetizada a partir de 5µg de RNA total das larvas filarióides e das fêmeas partenogenéticas obtidos como descrito na seção 2, na presença de transcriptase reversa e do iniciador oligo (dT), de acordo com instruções do fabricante (Thermoscript RT-PCR System, Invitrogen). Posteriormente, foram realizadas amplificações utilizando 2µl dos produtos obtidos da reação anterior combinados com os iniciadores específicos para cada subunidade do proteassoma. O programa de amplificação dos transcritos foi composto de 35 ciclos, cada um contendo uma etapa de desnaturação de 1 minuto a 95°C, uma de ligação do oligoiniciador de 1 minuto a 52°C, e uma de extensão durante 2 minutos a 72°C. Uma alíquota desta reação foi analisada em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio.

O cDNA correspondente a cada subunidade, convenientemente purificado, foi ligado no vetor pGEM Teasy (Promega) durante 16 horas a 4°C e transformado em células competentes *Escherichia coli* DH5α. Para o preparo do DNA plasmidial, foi utilizado o kit "In Concert Rapid Plasmid Purification Systems" (Gibco-BRL), como descrito pelo fabricante.

2.5. Amplificação das seqüências genômicas, utilizando iniciadores específicos para as subunidades alfa 6 e beta 6 do proteassoma 20S.

Após extração do DNA procedeu-se a amplificação dos genes que codificam para as subunidades alfa 6 e beta 6 utilizando o seguinte programa: 40 ciclos, sendo cada um composto de uma etapa de desnaturação a 95°C por 4 minutos, uma etapa de ligação dos oligoiniciadores a 52° C por 1 minuto e 30 segundos, seguida por uma etapa de extensão de 2 minutos e 30 segundos a 68°C. Para esta reação de amplificação foi utilizada a enzima DNA polimerase "Elongase Enzyme MIX" (Invitrogen). Uma alíquota desta reação foi analisada em gel de agarose a 1,0% corado com brometo de etídio. A transformação ocorreu em células competentes *E. coli* DH5α e a preparação do DNA plasmidial, foi idêntica ao item anterior.

2.6. Sequenciamento dos cDNAs e do DNA genômico que expressam as subunidades do proteassoma.

Para o sequenciamento dos cDNAs e do DNA genômico, foi utilizada a técnica do término do crescimento da cadeia, inicialmente desenvolvida por Sanger et al. (1977). Em cada tubo de reação, foram adicionados 0,5µg de DNA fita dupla, do vetor pGEM T easy contendo o inserto (cDNA ou DNA genômico). Cada reação foi preparada pela adição de 1µL dos iniciadores “forward” (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') ou “reverse” (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'), 2µL de “Big Dye” (DNA Sequencing Kit), 6µL de tampão de sequenciamento (200mM de Tris-HCl, 5mM de MgCl₂, pH 9.0) e 9µL de água livre de RNase. Os tubos contendo a mistura reacional foram submetidos a 40 ciclos compostos por: desnaturação a 96°C durante 10 segundos, ligação dos oligonucleotídeos a 52°C durante 20 segundos e extensão da cadeia a 72°C durante 4 minutos, em termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf). O produto gerado em cada reação foi analisado em seqüenciador automático (ABI Prism 3100 DNA sequencer).

2.7. Análise computacional das seqüências de cDNA e DNA genômico obtidas

Com o auxílio do programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, www.ncbi.nlm.nih.gov) as seqüências obtidas de cDNA e DNA genômico que codificam para as subunidades alfa 6 e beta 6 foram submetidas a busca de homologia com seqüências de nucleotídeos (Blastn) e de aminoácidos (Blastx) depositados no Gene Bank (National Center for Biotechnology Information, USA).

2.8. Análise filogenética

A análise filogenética das seqüências obtidas de cDNA e DNA genômico que codificam para as subunidades alfa 6 e beta 6 foi realizada com auxílio do programa ClustalW (www.ebi.ac.uk/clustalw/) e MEGA versão 2 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 2.1), utilizando o método de parsimônia máxima com confiabilidade $\geq 75\%$.

3. Resultados

Na Figura 1A e 1B estão apresentados os produtos de amplificação obtidos por RT-PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores específicos para as subunidades alfa 6 e beta 6 do proteassoma 20S nos dois estágios de desenvolvimento de *S. venezuelensis*.

A sequência expressa correspondente ao gene que codifica para a subunidade alfa6, nos dois estágios de desenvolvimento, está demonstrado na Figura 2. Através do alinhamento das sequências nos dois estágios, pode-se observar 100% de similaridade (Figura 2). De modo semelhante, o alinhamento das sequências de nucleotídeos da subunidade beta6 demonstra 100% de similaridade nos dois estágios (Figura 3).

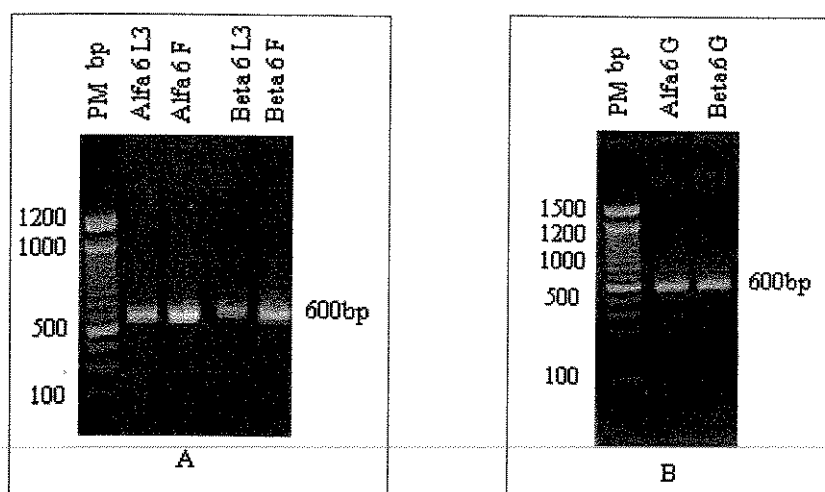


Figura 1: Produtos de amplificação, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores específicos, para as subunidades alfa 6 e beta 6 do proteassoma 20S, obtidos por RT-PCR nos estágios de larva infectante (L3) e fêmea partenogenética (F) de *Strongyloides venezuelensis* (A). Painel B, produtos de amplificação obtidos a partir do DNA genômico, para as subunidades alfa 6 e beta 6.

```

Alfa6L3      GAGTGGTTTTGATCGCTTTATGACAATTTCTCGCCAGAGGGGAGACTTTATCAAGTGGA 60
Alfa6F      GAGTGGTTTTGATCGCTTTATGACAATTTCTCGCCAGAGGGGAGACTTTATCAAGTGGA 60
*****

Alfa6L3      ATACACTTTTAAAGCTATCAGTCTTGATGGTCACTTATCCGTGGGTGTGCGGGGTAACGA 120
Alfa6F      ATACACTTTTAAAGCTATCAGTCTTGATGGTCACTTATCCGTGGGTGTGCGGGGTAACGA 120
*****

Alfa6L3      CTGCGCGGTTGTTGCTGCCAGCTGAAGCTTCCAGATAAATTAATCGACCGAAGATCTAT 180
Alfa6F      CTGCGCGGTTGTTGCTGCCAGCTGAAGCTTCCAGATAAATTAATCGACCGAAGATCTAT 180
*****

Alfa6L3      GACACGGATATTTCTGCTTTACAGATTCCACCGGGTGCATCATGACTGGCATGGCACCAGA 240
Alfa6F      GACACGGATATTTCTGCTTTACAGATTCCACCGGGTGCATCATGACTGGCATGGCACCAGA 240
*****

Alfa6L3      TTGTCGCGCCCAAGTACAACGAGCCAGATATGAGGCTGCATCATTCAAACACAAGTTTGG 300
Alfa6F      TTGTCGCGCCCAAGTACAACGAGCCAGATATGAGGCTGCATCATTCAAACACAAGTTTGG 300
*****

Alfa6L3      TTATGAAGTCCCCTGCGACGTACTGTTACACCGAATCGGTGAGATCAACCAAGTATATAC 360
Alfa6F      TTATGAAGTCCCCTGCGACGTACTGTTACACCGAATCGGTGAGATCAACCAAGTATATAC 360
*****

Alfa6L3      ACAATCCGCCGAAATGAGACCACTTGGTTGTGCCATGTTGGCTATTTCTTATGATGAAGA 420
Alfa6F      ACAATCCGCCGAAATGAGACCACTTGGTTGTGCCATGTTGGCTATTTCTTATGATGAAGA 420
*****

Alfa6L3      ACTCGGGAAACCCCAATTGTACAAATCTGATCCTAGTGGATTTGTGGCAGGACATCGGGC 480
Alfa6F      ACTCGGGAAACCCCAATTGTACAAATCTGATCCTAGTGGATTTGTGGCAGGACATCGGGC 480
*****

Alfa6L3      AGTCGCTGTTGGTGACAAGCAAACCGAAGCTATGCGTCACTTGGAAAATGAGTTTCGAAA 540
Alfa6F      AGTCGCTGTTGGTGACAAGCAAACCGAAGCTATGCGTCACTTGGAAAATGAGTTTCGAAA 540
*****

Alfa6L3      GCAAGAAAACCTACACTTTAGAGGAGGCTGTCGAACTAGCCATTGGTTGTCTTTCACATAC 600
Alfa6F      GCAAGAAAACCTACACTTTAGAGGAGGCTGTCGAACTAGCCATTGGTTGTCTTTCACATAC 600
*****

Alfa6L3      TCATTCCATGGATTTTAAAGCCACAGAATTGGAAATTGCGGTCGTGTCAA 650
Alfa6F      TCATTCCATGGATTTTAAAGCCACAGAATTGGAAATTGCGGTCGTGTCAA 650
*****

```

Figura 2: Alinhamento das seqüências de nucleotídeos da subunidade alfa 6 nos estágios de larva infectante (L3) e de fêmea partenogenética (F) de *S. venezuelensis* (www.ebi.ac.uk/Clustalw/).

```

Beta6L3      ATGCTTAGTGTACTTAACGCAAACCAGAAAAAGCTTAATGATTTACAGATGATACAAAA 60
Beta6F      ATGCTTAGTGTACTTAACGCAAACCAGAAAAAGCTTAATGATTTACAGATGATACAAAA 60
*****

Beta6L3      GGTATCAGTACTGGGACCACACTTTTTGCATGTGAGTATGATGGAGGCGTCGTTATTGGA 120
Beta6F      GGTATCAGTACTGGGACCACACTTTTTGCATGTGAGTATGATGGAGGCGTCGTTATTGGA 120
*****

Beta6L3      GCTGATTCAAGGACATCATCTGGAACGTATGTTGTAAACCGCGTAACAGACAAGCTAACA 180
Beta6F      GCTGATTCAAGGACATCATCTGGAACGTATGTTGTAAACCGCGTAACAGACAAGCTAACA 180
*****

Beta6L3      CAATTAACAAAGTCTATATACTGCTGTCCGCTCTGGGTCTGCTGCCGACACGCAAGCAGTA 240
Beta6F      CAATTAACAAAGTCTATATACTGCTGTCCGCTCTGGGTCTGCTGCCGACACGCAAGCAGTA 240
*****

Beta6L3      GCGGATATGGTGCCTACCGCTAGATTTTCACCGCCTTGAAATGAATAGAGAACCAACT 300
Beta6F      GCGGATATGGTGCCTACCGCTAGATTTTCACCGCCTTGAAATGAATAGAGAACCAACT 300
*****

Beta6L3      GTTTTGAAGCAGCTGTTTCTTGCAAACATTTCTGCTACAACCTACAGAGATGACTTGGTT 360
Beta6F      GTTTTGAAGCAGCTGTTTCTTGCAAACATTTCTGCTACAACCTACAGAGATGACTTGGTT 360
*****

Beta6L3      GCGGGCATTATAGTTGCTGGATGGGATGAGGAATTAGGTGGCCAGATATACTCGATTCCCT 420
Beta6F      GCGGGCATTATAGTTGCTGGATGGGATGAGGAATTAGGTGGCCAGATATACTCGATTCCCT 420
*****

Beta6L3      CTCGGCGGCATGCTCATAAGACAGCCAATCGTTATTGGTGGTTCTGGTAGCACATATACC 480
Beta6F      CTCGGCGGCATGCTCATAAGACAGCCAATCGTTATTGGTGGTTCTGGTAGCACATATACC 480
*****

Beta6L3      TATGGTTGCGTGGATCACGGTTTTTCGCAAGGGGATGACAAGAGAAGAGTGTGTAGTTT 540
Beta6F      TATGGTTGCGTGGATCACGGTTTTTCGCAAGGGGATGACAAGAGAAGAGTGTGTAGTTT 540
*****

Beta6L3      GTTTTAAAGGGTGTGCTCTTGCAATTAACAGAGACGGTTCAGCGGTGGTTGTGTACGT 600
Beta6F      GTTTTAAAGGGTGTGCTCTTGCAATTAACAGAGACGGTTCAGCGGTGGTTGTGTACGT 600
*****

Beta6L3      TTAGCTATTATTTCGAAGGACGGTGTGAAAGAATACTAACAAAAGGTGATGAAGTTCCA 660
Beta6F      TTAGCTATTATTTCGAAGGACGGTGTGAAAGAATACTAACAAAAGGTGATGAAGTTCCA 660
*****

Beta6L3      GTGTATCGGTTTTCC 675
Beta6F      GTGTATCGGTTTTCC 675
*****

```

Figura 3: Alinhamento das seqüências de nucleotídeos da subunidade beta 6 nos estágios de larva infectante (L3) e de fêmea partenogenética (F) de *S. venezuelensis* (www.ebi.ac.uk/Clustalw/).

O sequenciamento demonstrou que os transcritos possuem tamanhos de 650 e 675bp, alfa 6 e beta 6, respectivamente. Estas seqüências foram submetidas à busca de homologia com as seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos depositados no banco de dados, utilizando o sistema Blast (Blastn e Blastx). Como pode ser observada nas tabelas 1 e 2, a seqüência predita apresenta homologia com várias seqüências codificadoras para as subunidades alfa6 e beta6, respectivamente, em uma grande variedade de organismos.

A Figura 4 (A e B) representa o alinhamento entre a seqüência predita de aminoácido para as subunidades alfa 6 e beta 6 com outras identificadas nos bancos de dados. Baseando-se nas seqüências de aminoácidos e utilizando os programas ClustalW e MEGA versão 2, pode-se fazer uma análise filogenética das subunidades alfa 6 e beta 6 do complexo 20S do proteossoma 26S no nematódeo *S. venezuelensis* (Figura 5 A e B).

Tabela 1: Homologia da seqüência de aminoácidos da subunidade alfa 6 de *Strongyloides venezuelensis* com a subunidades alfa6 de outros organismos, utilizando o programa BLASTp.

Organismo	Número de acesso	Valor de e ⁻
<i>Mus musculus</i>	6755198	57
<i>Homo sapiens</i>	23273861	57
<i>Rattus norvegicus</i>	8394076	57
<i>Anopheles gambiae</i>	31230444	54
<i>Drosophila melanogaster</i>	24586400	51
<i>Caenorhabditis elegans</i>	17562788	45
<i>Arabidopsis thaliana</i>	15224993	42
<i>Leishmania donovani</i>	5814087	37
<i>Plasmodium falciparum</i>	23612939	32
<i>Giardia lamblia</i>	29247707	30
<i>Trypanosoma cruzi</i>	11066267	29

Mamíferos: 57% de identidade e 74% de similaridade; *C. elegans*: 46% de identidade e 71% de similaridade; insetos: 52 a 53% de identidade e 74 a 75% de similaridade.

Tabela 2: Homologia da sequência de aminoácidos da subunidade beta 6 de *Strongyloides venezuelensis* com a subunidades beta6 de outros organismos, utilizando o programa BLASTp.

Organismo	Número de acesso	Valor de e ⁻
<i>Schistosoma japonicum</i>	29841433	81
<i>Danio rerio</i>	18859271	66
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	17380244	58
<i>Caenorhabditis elegans</i>	17541700	54
<i>Arabidopsis thaliana</i>	15235889	53
<i>Drosophila melanogaster</i>	24653999	51
<i>Homo sapiens</i>	3287996	50
<i>Anopheles gambiae</i>	31239303	46
<i>Xenopus laevis</i>	2055299	44
<i>Rattus norvegicus</i>	16923940	46

S. japonicum: 81% de identidade e 86% de similaridade; mamíferos: 56% de identidade e 73% de similaridade; insetos: 53 a 58% de identidade e 64 a 73% de similaridade.

Alfa6Rn	-----MSRGSSAGFDRHITIFSP EGRLYQVEYAFKAINQGGLTSVAVRGKDC	47
Alfa6Hs	-----MSRGSSAGFDRHITIFSP EGRLYQVEYAFKAINQGGLTSVAVRGKDC	47
Alfa6Mm	-----MSRGSSAGFDRHITIFSP EGRLYQVEYAFKAINQGGLTSVAVRGKDC	47
Alfa6Ag	FSPFASKTVPGKKMSRGSSAGFDRHITIFSP EGRLYQVEYAFKAINQEGGLTSIALKGKDC	60
Alfa6Dm	-----MSRGSSAGFDRHITIFSP EGRLYQVEYAFKAINQEGGLTSIALKGKDC	47
Alfa6At	-----MSRGSGAGYDRHITIFSP EGRLYQVEYAFKAVKASAGVTSIGVRGKDS	47
Alfa6Os	-----MSRGSGAGYDRHITIFSP EGRLYQVEYAFKAVKASAGVTSIGVRGKDS	47
Alfa6Ce	-----MSRGSSAGFDRHITIFSP EGRVYQVEYAFKAINSTNLTAIVAVKGADA	47
Alfa6Sv	-----MMSASTPSGFDRTMTIFSP EGRLYQVEYTFKAIISLDGHLVSGVRGNDC	48
Alfa6Tb	-----MSR---AGFDKYITVFSPEGSLYQVEYAFKAVTYAGLLTVAIRCKDA	44
Alfa6G1	-----MSTTEGFDQALTVENPEGKLFQVEYAFRAVKTSGLSHVAIRCLDG	45
Alfa6Sc	-----MFRNNYDGDVTFTSPTGRFLQVEYALEAIKQ-GSVTVGLRSNTH	43

..* . *.* * :*****:.*: . :..

Alfa6Rn	AVIVTQKKVPDKLLDSSVTVTHLFKITE NIGCVMTGMTADSR SQVQ RARYEAA NWKYKYGY	107
Alfa6Hs	AVIVTQKKVPDKLLDSSVTVTHLFKITE NIGCVMTGMTADSR SQVQ RARYEAA NWKYKYGY	107
Alfa6Mm	AVIVTQKKVPDKLLDSSVTVTHLFKITE S IGCVM TGMTADSR SQVQ RARYEAA NWKYKYGY	107
Alfa6Ag	AVVATQKKIPDKLIDPATVTHLYRI TREIGCVMTGRIADSR SQVQ RARYEAA NWKYKYGY	120
Alfa6Dm	AVVATQKKVTEKNIVPETVTHLFRI PKDIGCAMTGRIADSR SQVQ RARYEAA NWKYKYGY	107
Alfa6At	VCVVTQKKVPDKLLDQSSVSHLFPVTKYLGLLATGMTADSR SLVQ QARNEAAEF RFGYGY	107
Alfa6Os	VCVVTQKKVPDKLLDHTSVTHLFPITKYIGLLATGLTADARSLVYQARNEAAEF RFWGY	107
Alfa6Ce	AVIAVQKRVPDSLIVADTVTSVYQISQSVGCCAIGMIPDAKFQIKRAQGEAASWKYKNGY	107
Alfa6Sv	AVVAAQLKLPDKLIDRRSMTRIFRLT DSTGCI MTGMAPDCRAQVQ RARYEAA SFKHKFGY	108
Alfa6Tb	VLVFTQHSVPDKLMRPETITSLYNVDNTGVCITGRAPDGKALVQARNEASEYKYRYGM	104
Alfa6G1	VVLVSQ LQSADRLVD TANNTFIHEINETSACMICGRIADGRRVIDRVRSEAVDFRKNWY	105
Alfa6Sc	AVLVALKRNADELS--SYQKKI IKCEHMGLSLAGLAPDARVLSNYLRQQCNYSILVFNR	101

. : . : . : * . * : : .

Alfa6Rn	EIPVDM LCKRIADISQVYTQNAEMRPLGCCMILIGID--EEQG---PQVYKCDPAGYYCG	162
Alfa6Hs	EIPVDM LCKRIADISQVYTQNAEMRPLGCCMILIGID--EEQG---PQVYKCDPAGYYCG	162
Alfa6Mm	EIPVDM LCKRIADISQVYTQNAEMRPLGCCMILIGID--EEQG---PQVYKCDPAGYYCG	162
Alfa6Ag	EIPVDVLCRRMADISQVYTQNAEMRPLGCSIVMIAFD--AENG---PAVYKTD PAGYYCG	175
Alfa6Dm	EMPVDVLCRRMADISQVYTQNAEMRPLGCSIVMIAFD--AENG---PAVYKTD PAGYYCG	162
Alfa6At	EMPADI LAKWIADKSQVYTQHAYMRPLGVVAMVLGID--EERG---PLLYKCDPAGHFGY	162
Alfa6Os	EMPVDV LAKWIADKSQVYTQHAYMRPLGVVAMVLGYD--EERN---AQLFKCDPAGHFFG	162
Alfa6Ce	DMPCELLAKKMADLNQYTTQNAEMRSLGCALLFISYD--DEKG---PEVYRVPDAGYYRG	162
Alfa6Sv	EVPCDVL LHRIGE INQVYTQSAEMRPLGCAMLAYSID--EELGK--POLYKSDPSGFFVAG	164
Alfa6Tb	PMLVSVLAKPWQDMAQVRTQAGMRLMGTIMTFVGMEQNDDEGAWIPQIYCVDPAGG-AA	163
Alfa6G1	QPTADILCTRLADINQIYTQEAWQRPFGNIAVFAGWDPEQDRS----LLFKTDPAGTNTG	161
Alfa6Sc	KLAVERAGHLLCDKAQKNTQSYGGRPYGVGLLIIGYD---KSG---AHLLEFPQSGNVTE	155

. : * ** * * . : . : : : *

Alfa6Rn	FKATAAGVKQTESTSFLEKKVKKKFDWTF---EQTVETAITCLSTVLSIDFKPSEIEVGV	219
Alfa6Hs	FKATAAGVKQTESTSFLEKKVKKKFDWTF---EQTVETAITCLSTVLSIDFKPSEIEVGV	219
Alfa6Mm	FKATAAGVKQTESTSFLEKKVKKKFDWTF---EQTVETAITCLSTVLSIDFKPSEIEVGV	219
Alfa6Ag	YHAISVGKQTEANSYLEKKLKRKAELSE---EETIQLAITCLSTVLAVDFKPTIEIGI	232
Alfa6Dm	FKACSVGAKTLEANSYLEKKY---PNLSE---EKAIQLAISCLSSVLAI DFKPNGIEIGV	217
Alfa6At	HKATSAGMKEQEA VNFLEKKMKENPAFTY---DETVQTAISALQSVLQEDFKATEIEVGV	219
Alfa6Os	HKATSAGLKEQEAINFLEKKMKDDPQFSY---EETVQIAISALQSVLQEDFKATEIEVGV	219
Alfa6Ce	MKGVS VGVKQLPATSFLEKKIKKSELTS---TEAIELAIELALQTS LGIDVRSKDLEV VV	219
Alfa6Sv	HRAVAVGDKQTEAMRHLENEFRKQENYTL---EEAVELAIGCLSHTHSM-----	210
Alfa6Tb	VHACAVGKKQIEACAFLEKKQKNAPFHTLS--QKEAAMIALAALQSALGESLRASGVEVGR	222
Alfa6G1	YFAIAGVKEVELADALTQVKSFPNGICESTQKGLDCALKIFONVISTGLTGDDVEVAI	221
Alfa6Sc	LYGTAIGARSQGA KTYLERTLDTFFIKIDGN-PDEL IKAGVEAISQSLRDES LTVDNLSIA	214

. : * : * : : . : . :

Alfa6Rn	VTVENPKFRILTEAEIDAHLVALAERD-----	246
Alfa6Hs	VTVENPKFRILTEAEIDAHLVALAERD-----	246
Alfa6Mm	VTVENPKFRILTEAEIDAHLVALAERD-----	246
Alfa6Ag	VSKEKPEFRILTEDEIEVHLTAIAEKD-----	259
Alfa6Dm	VSKSDPTFRILDEREIEEHLTKIAEKD-----	244
Alfa6At	VRADDPLFRSLRTEEIDEHLTAISERD-----	246
Alfa6Os	VRKDDRVFRALTTEEIDQHLTAISERD-----	246
Alfa6Ce	VTKDNSKFTRLTSDQVEHHLNQIANRD-----	246
Alfa6Sv	-----	
Alfa6Tb	CTADDHHFLRVSDREVKKWLTPLAKPGYRAAYVLVRHTFHVNP	266
Alfa6Gl	YTKTG--LKRLTPIEVDRRLGELAVQTE-----	247
Alfa6Sc	IVGKDTPTFTIYDGEAVAKYI-----	234

Figura 4A: Alinhamento entre as seqüências de aminoácidos da subunidade alfa 6 de *Strongyloides venezuelensis* (Sv) e genes ortólogos em outros organismos, utilizando o programa ClustalW.

Rn. *Rattus norvegicus* (246aa); Hs. *Homo sapiens* (246aa); Mm. *Mus musculus* (246aa); Ag. *Anopheles gambiae* (259aa); Dm. *Drosophila melanogaster* (244aa); At. *Arabidopsis thaliana* (246aa); Os. *Oryza sativa* (246aa); Ce. *Caenorhabditis elegans* (246aa); Tb. *Trypanosoma brucei* (266aa); Gl. *Giardia lamblia* (247aa); Sc. *Saccharomyces cerevisiae* (234aa).

```

Beta6Sv      -----MLSVLINANQKKLNDFETDDTKG--ISTGTTLFACEYDGGVVIGADSRSSSGTYV 51
Beta6Sj      -----MLSVLNS-----ASENVQG--ISTGTTLFACEYDGGVVIGADSRSSSGTYV 44
Beta6Mm      -----MAVQFNGGVVLGADSRITTTGSYI 23
Beta6Hs      MAATLLAARGAGPAPAWGPEAFPTDWSREVSTGTTIMAVQFDGGVVIGADSRITTTGSYI 60
Beta6Rn      -----MAVQFDGGVVVLGADSRITTTGSYI 23
Beta6Xl      --MKLLQAAAAGPQSSAPPG--DTDWMGREVSTGTTIMAVEFDGGVVIGADSRITTTGAYI 56
Beta6Ag      -----INLCEKTFIMDSDCSNDWRNAHHSTGTTIMAVEFDGGVVIGADSRITSTGTIV 52
Beta6Dm      -----MQPDF--DFTDTPVSTGTTIMAVEFDGGVVIGADSRITSSGAYV 41
Beta6At      -----MDLNLNLD-AP-----HSMGTIIIGVTYNGGVVLGADSRITSTGMV 38
Beta6Os      -----MDASIMGAPSAAGDNPTSGEHRMGTTIVGVCYDGGVVLAADSRITSTGMV 51
Beta6Sp      -----MATTVKDTMNVNIN-AIKKGEIRMGTITITALRYKDGVLAAADSRITTMGAYI 50
Beta6Ce      -----MRDEKRKAIPAIGFYPPQEEISTGTTLIAMEYNGGVVVGTDSTRTSAGSFI 49
Beta6Sc      --MBETAATIASEYSSEASNTPIEHQFNFPYGDNGGTILGIAGEDFAVLAGDTRNITDYSI 58
               . . . . . *:*. . . :

Beta6Sv      VNRVTDKLTQLTKSIYCCRSAGSAADTQAVADMVRYQLDFHRLEMN-REPTVLEAAVSCKH 110
Beta6Sj      VNRVTDKLTQLTKSIYCCRSAGSAADTQTVADMVRYQLDFHRLEMN-REPTVLEAAVCCQH 103
Beta6Mm      ANRVTDKLTPIHDHIFCCRSAGSAADTQAVADAVTYQLGFHSIELN-EPPLVHTAASLFKE 82
Beta6Hs      ANRVTDKLTPIHDHIFCCRSAGSAADTQAVADAVTYQLGFHSIELN-EPPLVHTAASLFKE 119
Beta6Rn      ANRVTDKLTPIHDHIFCCRSAGSAADTQAVADAVTYQLGFHSIELN-EPPLVHTAASLFKE 82
Beta6Xl      ANRVTDKLTPIHDHIFCCRSAGSAADTQAIADAVTYQLGFHSIELD-GPPLVHTAANLFKE 115
Beta6Ag      ANRVTDKLTKLTDKIYCCRSAGSAADTQAIADIVAYSILNYHENQTG-EPPLVEDAANEFRQ 111
Beta6Dm      ANRVTDKLTTRITDKVYCCRSAGSAADTQAIADIVAYSILNYHENQTN-KDALVFEEASEFRN 100
Beta6At      ANRASDKITQLTDNVYVCRSAGSAADSQVVS DYVRYFLHQHTIQHG-QPATVKVSANLIRM 97
Beta6Os      ANRASDKITQLTDNVYICRSAGSAADTQVISDYVRYFLHQHTIQLG-QPATVKVAANLIRL 110
Beta6Sp      ANRVTDKLTQLTDNIWCCRSAGSAADTQTVADLLKYLLSMYRIQFG-HDPSVHTAATLASE 109
Beta6Ce      TSRATNKITPITDNMVVCRSAGSAADTQAIADIAYKHIDVYTMTEN-KPVTIYRSSQIFRQ 108
Beta6Sc      NSRYEPKVFDCGDNIVMSANGFAADGDALVKRFKNSVKWYHFHDHNDKKLSINSAARNIQH 118
               . * * : . : . * * * : : . : : . : :

Beta6Sv      FCYNYRDD-LVAGIIVAGWDEELGGQIYSIPLGGMLIRQPIVIGGSGSTYTYGCVDHGFR 169
Beta6Sj      FCYNYRDD-LVAGIIVAGWDEEQSGGQIYSIPLGGMLIRQPIVIGGSGSTYTYGYVDHDIR 162
Beta6Mm      MCYRYRED-LMAGII IAGWD PQEGGQVYSVPMGGMMVRQSFAIGGSRSSYIYGVDATYR 141
Beta6Hs      MCYRYRED-LMAGII IAGWD PQEGGQVYSVPMGGMMVRQSFAIGGSGSSYIYGVDATYR 178
Beta6Rn      MCYRYRED-LMAGII IAGWD PQEGGQVYSVPMGGMMVRQSFAIGGSGSSYIYGVDATYR 141
Beta6Xl      MCYRYRED-LMAGIIVAGWDKRKGQVYTPMGGMLVHQQFSIGGSGSSYIYGVDSTYR 174
Beta6Ag      YCYNRYDT-LVAGIIVAGWDKRGQVYSVPMGGMQIRQSVTIGGSGSSYIYGFKENYR 170
Beta6Dm      YCYSYRES-LLAGIIVAGWDEQRGGQVYSIPLGGMLTRESCTIGGSGSSFIYGFVREHYR 159
Beta6At      LAYNNKNM-LQTGLIVGGWDKYEGGKIYGIPLGGTVVEQPFAIGGSGSSYLYGFFDQAWK 156
Beta6Os      LAYQNKNM-LQAGMIVGGWDKYEGGQIFSVPLGGTILRQPFAGGSGSSYLYGLLDHEWK 169
Beta6Sp      MCYQNKNM-LSAGLIVAGYDEKTTGGDVYSIPLGSSLHKQPLAIGGSGSAFTYGFCDANFR 168
Beta6Ce      FLYNYREQ-LSASVLVAGWDEELGGQVYAIPIGGFVSRQRSTASGSGSTFVQGFLLDSQWR 167
Beta6Sc      LLYGKRFFPYVHTII IAGLDEDKGAVYSFDPVGSYEREQCRRAGGAASLIMPFLDNQVN 178
               * : . : . * * * : : . : . : :

Beta6Sv      KGMTREECVSFVLKGVALA INRDGSSGGCVRLAII SKDGVERILTKGD----- 217
Beta6Sj      KGMTREECINFLKGVALA INRDGSSGGCIRLAI I SKDGVERILTKGD----- 210
Beta6Mm      EGMTKDECLQFTANALALAMERDGS SGGVIRLAAIQESGVERQVLLGD----- 189
Beta6Hs      EGMTKEECLQFTANALALAMERDGS SGGVIRLAAIAESGVERQVLLGD----- 226
Beta6Rn      EGMTKDECLQFTANALALAMERDGS SGGVIRLAAIQSGVERQVLLGD----- 189
Beta6Xl      FGMTKEECLKFTANALALAMERDGS SGGVIRLAAITEEGVERQVILGN----- 222
Beta6Ag      EGMPRDECVEFVKKSI FHAMYHDGSSGGVCRI GVI TKDGVEREVFFAPR-----D 220
Beta6Dm      PNMALED CVTFVKKAVQHAI YHDGSSGGVVRIGIITKDGIERIRIFYNT----- 207
Beta6At      DNMTKEEAEQLVVKAVSLAIARDGASGGVVRTVI INSEGVTRNFYPGDKLQLWHEELEPQ 216
Beta6Os      EGMSQEEAEKFVVKVVS LAIARDGASGGVVRTVTINADGVSRKFHPGDKLQLWHEELEPQ 229
Beta6Sp      ENMTQEEAEVFLKNAVALAMERDGS SGGTIRMVILNKDGMERKFFA----- 214
Beta6Ce      PNLTLEECKAIVKQAVGLATFRDGS SGGVRLAVINKAGSQFELFRPDKPG-----FPF 221
Beta6Sc      FKNQYEPGNTNGKVKKPLKYL-----VEEVIKLVRDSFTSA----- 214
               : : . : .

```

Beta6Sv	-EVPVYRFS-----	225
Beta6Sj	-EVPVYRFS-----	218
Beta6Mm	-QIPKFTIATLPPP----	202
Beta6Hs	-QIPKFAVATLPPA----	239
Beta6Rn	-QIPKVTISTLPPP----	202
Beta6Xl	-QLPRFPSS-----	230
Beta6Ag	YENVGARRAGAPSVSQA	238
Beta6Dm	-ESGASAVSSTPSFFSSE	224
Beta6At	NSLLDILNAAGPEPMAM-	233
Beta6Os	NSLLDILAAGNPDPMVQ-	246
Beta6Sp	-----IDTANPIPVFTH	226
Beta6Ce	VQTPTPHLSFPPHIEQVL	239
Beta6Sc	-----	

Figura 4B: Alinhamento entre as seqüências de aminoácidos da subunidade beta 6 em *Strongyloides venezuelensis* (Sv) e seus genes ortólogos de outros organismos, utilizando o programa ClustalW.

Sj. *Schistosoma japonicum* (218aa); Mm. *Mus musculus* (202aa); Hs. *Homo sapiens* (239aa); Rn. *Rattus norvegicus* (202aa); Xl. *Xenopus laevis* (230aa); Ag. *Anopheles gambiae* (238aa); Dm. *Drosophila melanogaster* (224aa); At. *Arabidopsis thaliana* (233aa); Os. *Oryza sativa* (246aa); Sp. *Schizoccharomyces pombe* (226aa); Ce. *Caenorhabditis elegans* (239aa), Sc. *Saccharomyces cerevisiae* (210aa).

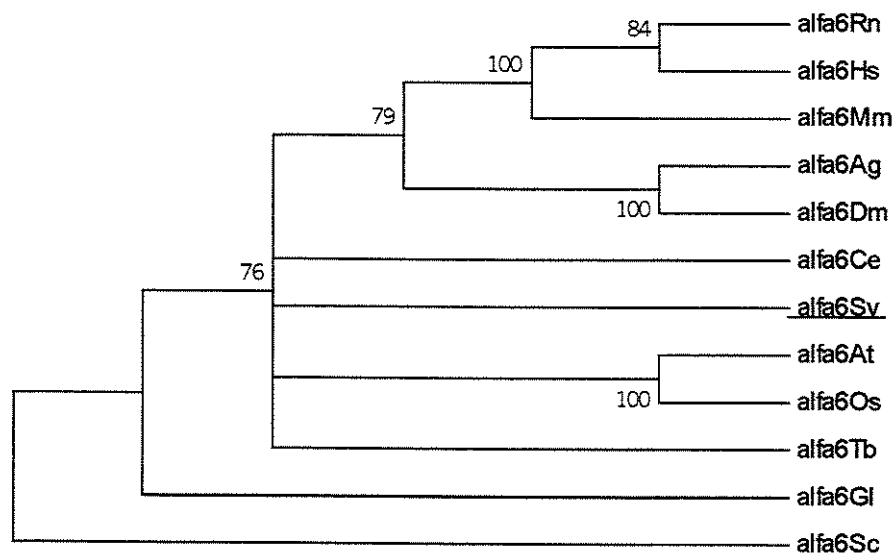


Figura 5A: Análise filogenética entre as seqüências de aminoácidos da subunidade alfa 6 em *S. venezuelensis* (Sv) e suas homólogas em outros organismos, utilizando os programas ClustalX e Mega versão 2.

Rn. *Rattus norvergicus*; Hs. *Homo sapiens*; Mm. *Mus musculus*; Ag. *Anopheles gambiae*; Dm. *Drosophila melanogaster*; At. *Arabidopsis thaliana*; Os. *Oryza sativa*; Ce. *Caenorhabditis elegans*; Tb. *Trypanosoma brucei*; Gl. *Giardia lamblia*; Sc. *Saccharomyces cerevisiae*.

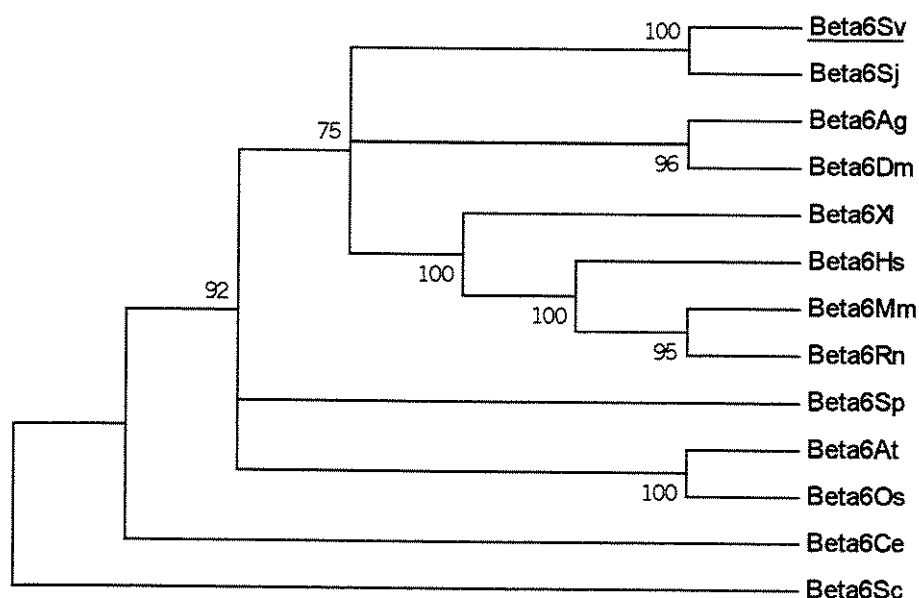


Figura 5B: Análise filogenética entre as seqüências de aminoácidos da subunidade beta 6 em *S. venezuelensis* (Sv) e suas homólogas em outros organismos, utilizando os programas ClustalX e Mega versão 2.

Sj. *Schistosoma japonicum*; Mm. *Mus musculus*; Hs. *Homo sapiens*; Rn. *Rattus norvegicus*; Xl. *Xenopus laevis*; Ag. *Anopheles gambiae*; Dm. *Drosophila melanogaster*; At. *Arabidopsis thaliana*; Os. *Oryza sativa*; Sp. *Schizoccharomyces pombe*; Ce. *Caenorhabditis elegans*, Sc. *Saccharomyces cerevisiae*.

4. Discussão

Um pequeno número de genes codificadores de proteínas em helmintos parasitas tem sido reportado e expressado, sobretudo de *S. stercoralis* (RAMACHANDRAN et al., 1998), porém visando somente a obtenção de antígenos recombinantes para o imunodiagnóstico da estrogiloidíase. Os presentes resultados identificam os primeiros genes codificadores de subunidades do proteassoma 20S no nematódeo *S. venezuelensis*.

A presença do proteassoma nos três maiores grupos de vida, Bactéria, Archaea e Eukaria está provavelmente relacionado com o importante papel deste complexo multicatalítico no controle de processos celulares básicos (BOUZAT et al., 2000; MAUPIN-FURLOW et al., 2003), como na regulação de proteínas envolvidas no ciclo celular, na diferenciação, na adaptação ao estresse celular, e na geração de peptídeos envolvidos no reconhecimento imune (GROLL, HUBER, 2003). A estrutura altamente conservada das subunidades alfa e beta do “core” proteolítico 20S sugerem funções associadas com a proteólise intracelular. No entanto, a extensa diversidade do número de sequência dos genes codificadores para as subunidades, pode indicar adaptações funcionais da via proteolítica (BOUZAT et al., 2000). Por exemplo, em eucariotos inferiores, o proteassoma está relacionado à regulação do ciclo celular, e na adaptação metabólica celular ao estresse (BAUMEISTER et al., 1998). Enquanto que em eucariotos superiores (mamíferos), o proteassoma tem papel fundamental no reconhecimento imune pela geração de peptídeos para serem reconhecidos pelo complexo maior de histocompatibilidade (MHC) de classe I (ROCK et al., 2002).

Embora os oligonucleotídeos utilizados para a amplificação das subunidades alfa 6 e beta 6 do proteassoma 20S, tenha sido baseados em um outro organismo (*S. mansoni*), obteve-se produtos de amplificação com tamanhos característicos destas subunidades de 650bp e 675bp, respectivamente, os quais foram confirmados pela busca de homologia no banco de dados. Isto reforça a grande similaridade sequencial dos componentes do proteassoma 20S entre os diferentes organismos (GROLL & HUBER, 2003).

A análise da sequência de nucleotídeos (BLASTn) do nematódeo *S. venezuelensis* revelou uma homologia significativa com genes proteassomais codificadores para a subunidade alfa 6. A sequência de aminoácido predita demonstrou alta homologia com genes codificadores da

subunidade alfa 6 de outros organismos, como mamíferos (roedores e homem com 57% de identidade e 74% de similaridade), o nematódeo de vida-livre *C. elegans* (46% de identidade e 71% de similaridade) e representantes da classe Insecta (como *D. melanogaster* com 53% e 74%; *A. gambiae* com 52% e 75% de identidade e similaridade, respectivamente). A alta identidade entre as subunidades alfas de parasitas, como *Entamoeba histolytica* e seus hospedeiros mamíferos, pode ser uma consequência do próprio parasitismo, seja pela transmissão horizontal ou pela adaptação ao ambiente interno do hospedeiro (RAMOS et al., 1997).

A literatura demonstra diversos relatos sobre as diferentes subunidades alfas do core proteolítico (20S) do proteassoma 26S. *T. brucei* (YAO et al, 1999), *D. melanogaster* (ZAISS, BELOTE, 1997), *L. donovani* (CHRISTENSEN et al., 2000), *E. histolytica* (RAMOS et al., 1997).

De modo semelhante, a análise da sequência de nucleotídeos (BLASTn) da subunidade beta 6 do helminto *S. venezuelensis* demonstrou alta homologia com as sequências de outros organismos, como o trematódeo *S. japonicum* (com 81% de identidade e 86% de similaridade), os mamíferos (com 56% de identidade e 72% de similaridade) e os representantes do grupo dos insetos (*D. melanogaster* com 58% e 73%; *A. gambiae* com 53% e 64% de identidade e similaridade, respectivamente). A subunidade beta do proteassoma 20S tem sido identificada em alguns parasitos, como: *P. falciparum* (LI et al, 2000), *T. brucei* (HUANG et al., 1999, RADWANSKA et al., 2000).

A amplificação do DNA genômico do nematódeo *S. venezuelensis* utilizando os oligonucleotídeos iniciadores específicos para as subunidades alfa 6 e beta 6, demonstrou fragmentos em torno de 600p, os quais possuem tamanho semelhante aos fragmentos obtidos com de cDNA nos estágios de larva infectante e de fêmea partenogenética. A análise das sequências dos fragmentos de DNA genômico e cDNA apresentaram uma similaridade de 100%. Estes resultados podem indicar a ausência de regiões intervenientes nos genes que codificam estas subunidades, e conseqüentemente a ausência de processamento do RNA mensageiro antes do seu direcionamento da síntese destas proteínas no citoplasma (ALBERTS et al., 1997).

A análise molecular do proteassoma em parasitas é um campo recente de estudo com resultados promissores, porém até o momento ainda incompleto (PAUGAM et al., 2003). A caracterização molecular de clones de cDNA em *L. donovani* determinou uma alta similaridade

com as subunidades alfas humana, além disso, estes clones têm sido reconhecido por soros de pacientes infectados, levando a inferir a possibilidade do proteassoma 20S como fontes de antígenos para a produção de vacinas (CHRISTENSEN et al., 2000). Subunidades betas do proteassoma 20S estão associadas à resistência a drogas em *P. falciparum* (LI et al., 2000).

A análise filogenética das subunidades alfa 6 e beta 6 de *S. venezuelensis* vem confirmar a identidade entre a seqüências de aminoácidos nos diversos organismos. Uma vez que, as seqüências de aminoácidos das subunidades alfa 6 e beta 6 com alto grau de homologia estão agrupadas em subgrupos (mamíferos, insetos e plantas). Além disso, a origem filogenética baseada no dendograma, está representada por organismos mais simples como leveduras, para as duas subunidades. Estudos filogenéticos extensivos propõe uma possível evolução do proteassoma 20S através de uma arqueobactéria, a qual é composta de uma única subunidade alfa e beta, até atingir os eucariotos superiores com sete diferentes subunidades alfa e beta (BOUZAT et al., 2000; GILLE et al., 2003).

A análise filogenética das subunidades do proteassoma releva duas principais famílias (alfa e beta), as quais a partir da duplicação gênica do ancestral tem-se a divergência entre arqueobactéria e eucariotos superiores. Numerosas duplicações ocorreram subsequente em eucariotos, onde as últimas duplicações demonstram as divergências entre animais e fungos (HUGHES, 1997).

Diante da grande similaridade entre os componentes do proteassoma 20S dos diferentes organismos, estes resultados podem contribuir para a caracterização molecular inicial das subunidades alfa 6 e beta 6 deste complexo multicatalítico no nematódeo *S. venezuelensis*.

5. Referências Bibliográficas (ABNT/NBR 10520/2002)

- ALBERTS B. et al. Biologia Molecular da célula, 3.ed. Artes Médicas: Porto Alegre, p.335-346, 1997.
- BAUMEISTER W. et al. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. Cell, v.92, p.367-380, 1998.
- BOCHTLER M. et al. The proteasome. Annual Review Biophysics Biomolecular Structural, v.23, p.295-317, 1999.
- BOUZAT J.L., Phylogenomic analysis of the α proteasome gene family from early-diverging eukaryotes. Journal Molecular Evolution, v.51, p.532-543, 2000.
- CHRISTENSEN C.B.V. et al. Molecular characterization of a *Leishmania donovani* cDNA clone with similarity to human 20S proteasome a-type subunit. Biochimica et Biophysica Acta, v.1500, p.77-87, 2000.
- CIECHANOVER A. The ubiquitin-proteasome pathway. Cell, v.79, p.13-21, 1994.
- COUX O. et al. Structure and functions of 20S and 26S proteasomes. Annual Review Biochemistry, v.65, p.801-847, 1996.
- DAWKINS H.J.S., SPENCER T.L. The isolation of nucleic acid from nematodes requires an understanding of the parasite and its cuticular structure. Parasitology Today, v.5, n.3, p.73-76, 1989.
- DIEGO J.L. et al. The biquitin-proteasome pathway plays an essencial role in proteolysis during *Trypanosoma cruzi* remodeling. Biochemistry, v.40, p.1053-1062, 2001.
- EMMERLICH V. et al. Isolation and subunit composition of the 20S proteasome of *Giardia lamblia*. Molecular Biochemical Parasitology, v.100, p.131-134, 1999.
- FERREL K et al. Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem. Trends in Biochemical Sciences, v.25, p.83-88, 2000.
- GILLE C. et al. A comprehensive view on proteasomal sequences: implications for the evolution of the proteasome. Journal Molecular Biological, v.326, p.1437-1448, 2003.
- GLICKMAN M.H., CIECHANOVER A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. Physiology Review, v.82, p.373-428, 2002.

- GONZÁLEZ J. et al. Proteasome dependent cyst formation and stage-specific ubiquitin mRNA accumulation in *Entamoeba invadens*. European Journal Biochemistry, v.264, p.897-904, 1999.
- GROLL M., HUBER R. Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle. International Journal of Biochemistry, v.35, p.606-616, 2003.
- HENDIL K.B. et al. 26S proteasome function as stable entities. Journal Molecular Biological, v.315, p.627-636, 2002.
- HIRSCH C., PLOEGH H.L. Intracellular targeting of the proteasome. Trends in Cell Biology, v.10, p.268-272, 2000.
- HUANG L. et al. Identification and isolation of three proteasome subunits and their encoding genes from *Trypanosoma brucei*. Molecular and Biochemical Parasitology, v.102, p.211-232, 1999.
- HUGHLES A.L. Evolution of the proteasome components. Immunogenetics, v.46, n.2, p.82-92, 1997.
- LI G.D. et al. Molecular cloning of gene encoding a 20S proteasome β subunit from *Plasmodium falciparum*. International Journal Parasitology, v.30, p.729-733, 2000.
- MACHADO E.R. et al. Diagnosis of human strongyloidiasis using particulate antigen of the strains of *Strongyloides venezuelensis* in indirect immunofluorescence antibody test. Experimental Parasitology, v.99, n.1, p.52-55, 2001.
- MACHADO E.R. et al. *Strongyloides venezuelensis* alkaline extract for the diagnosis of human strongyloidiasis by enzyme-linked immunosorbent assay. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.98, n.6, p.849-851, 2003.
- MAUPIN-FURLOW J.A. et al. Archaeal proteasomes: potential in metabolic engineering. Metabolic Engineering, v.5, p.151-163, 2003.
- NAUJOKAT C., HOFFMANN S. Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis. Laboratory Investigation, v.82, n.8, p.965-980, 2002.
- NEGRÃO-CORRÊA D. et al. Changes in pulmonary function and parasite burden in rats infected with *Strongyloides venezuelensis* con comitant with induction of allergic airway inflammation. Infection and Immunity, v.71, n.5, p.2607-2614, 2003.

- PAUGAM A. et al. In vivo effects of gliotoxin, a natural proteasome inhibitor, on the infectivity and proteolytic activity of *Toxoplasma gondii*. Parasitology Research, v.88, p.785-787, 2002.
- PAUGAM A. et al. Characterization and role of protozoan parasite proteasomes. Trends in Parasitology, v.19, n.2, p.55-59, 2003.
- RADWANSKA M. et al. A transcript encoding a proteasome beta-subunit and a zinc finger protein in *Trypanosoma brucei brucei*. Gene, v.225, p.43-50, 2000.
- RAMACHANDRAN S. et al. Recombinant cDNA clones for immunodiagnosis of strongyloidiasis. Journal Infectious Diseases, v.177, p.196-203, 1998.
- RAMOS M.A. et al. The *Entamoeba histolytica* proteasome α -subunit gene. Molecular and Biochemical Parasitology, v.84, p.131-135, 1997.
- ROCK K. et al. Protein degradation and the generation of MHC class I presented peptides. Advances in Immunology, v.80, p.1-70, 2002.
- SANGER F. et al. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proceedings National Academy Sciences, v.74, p.5463-5467, 1977.
- SHAW M.K. et al. Proteasome inhibitors block intracellular growth and replication of *Toxoplasma gondii*. Parasitology, v.121, p.35-47, 2000.
- TANAKA K. Proteasomes: Structure and Biology. Journal Biochemistry, v.123, p.195-204, 1998.
- VERJOVSKI-ALMEIDA S. et al. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. Nature Genetics, v.35, n.2, p.148-157, 2003.
- YAO Y. et al. Structural and functional characterizations of the proteasome-activating protein PA28 from *Trypanosoma brucei*. Journal Biology Chemistry, v.274, n.48, p.33921-33930, 1999.
- ZAIS D., BELOTE J.M. Molecular cloning of the *Drosophila melanogaster* gene $\alpha 5_{dm}$ encoding a 20S proteasome α -type subunit. Gene, v.201, p.99-105, 1997.

Capítulo 3

ANÁLISE MOLECULAR DAS SUBUNIDADES ATPase 3 E S5a DO COMPLEXO 19S DO PROTEASSOMA 26S EM *STRONGYLOIDES VENEZUELENSIS*.

Paula, Fabiana Martins¹; Pereira Jr, Olavo dos Santos²; Guerra-Sá, Renata²; Ueta, Marlene Tiduko¹; Rodrigues, Vanderlei².

1. Laboratório de Helminologia, Departamento de Parasitologia, Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.
2. Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo.

O complexo 19S tem sido relacionado com a entrada e o reconhecimento de conjugados ubiquitinados, substratos do proteassoma 26S. O presente trabalho teve como objetivo a análise molecular das subunidades ATPase 3 e S5a do complexo 19S do proteassoma 26S em *Strongyloides venezuelensis*. A partir de dois estágios de desenvolvimento (larva filarioíde e fêmea partenogenética) deste nematódeo foram extraídos o RNA e o DNA genômico. Os produtos de amplificação a partir do cDNA e do DNA genômico utilizando os oligonucleotídeos específicos, foram seqüenciados e submetidos a busca de homologia no banco de dados. O DNA genômico foi amplificado somente para a subunidade ATPase 3. O alinhamento das seqüências nos dois estágios demonstrou 100% de similaridade para cada uma das subunidades estudadas. As seqüências preditas apresentaram homologia com várias seqüências codificadoras para as subunidades ATPase 3 e S5a em uma grande variedade de organismos, levando a inferir mecanismos semelhantes de reconhecimento substrato alvo pelo proteassoma 26S.

Palavras-Chaves: *Strongyloides*, proteassoma 26S, subunidades ATPase 3 e S5a.

1. Introdução

As manifestações da strongiloidíase, bem como a biologia do seu agente causador, têm sido extensivamente estudados. *Strongyloides venezuelensis*, cujo hospedeiro é roedores, vem sendo indicado como modelo experimental para o estudo desta helmintíase (BAEK et al., 1998) seja como fonte heteróloga de antígeno para o imunodiagnóstico da infecção humana (MACHADO et al., 2001 e 2003), ou pelo estudo da relação parasita-hospedeiro (NEGRÃO-CORRÊA et al., 2003). Neste nematódeo a via proteolítica proteassoma-ubiquitina ainda permanece por ser caracterizada, bem como a sua eventual contribuição no seu desenvolvimento.

A via proteassoma-ubiquitina dependente de ATP é um mecanismo importante de controle da proteólise intracelular, e tem como função biológica a degradação extralissossomal de proteínas tanto no citoplasma quanto no núcleo de células eucarióticas (FERREL et al., 2000; GLICKMAN & CIECHANOVER, 2002). Nesta via proteolítica o substrato a ser degradado é primariamente marcado com múltiplas moléculas de ubiquitina (PAUGAM et al., 2003). As proteínas conjugadas a cadeias de poliubiquitinas são então, rapidamente degradadas pelo proteassoma 26S em pequenos peptídeos (TANAKA, 1998).

O proteassoma 26S é uma proteinase complexa, encontrada no núcleo e no citoplasma das células eucarióticas, constituinte central da via proteolítica proteassoma-ubiquitina (NAUJOKAT & HOFFMANN, 2002). O proteassoma 26S é formado por dois diferentes componentes, o proteassoma 20S e um par de partículas regulatórias (19S) ligadas nas extremidades do 20S (ROCK et al., 2002). O proteassoma 20S é um complexo enzimático, composto por 7 subunidades alfas (estruturais) e 7 betas (catalíticas). Estas subunidades estão dispostas na forma de um cilindro composto por quatro anéis ($\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$), o qual favorecem a formação de um poro central responsável pela hidrólise das proteínas alvos nos sítios catalíticos localizados nas subunidades betas (COUX et al., 1996).

A partícula regulatória 19S consiste de dois subcomplexos, a base e a tampa, os quais no proteassoma 26S correspondem às porções proximal e distal do 19S, respectivamente, do proteassoma 20S (VOGES et al., 1999). A base é composta de seis subunidades ATPases da família AAA e duas não-ATPases e uma tampa composta de oito subunidades não-ATPases (ROCK et al., 2002). O complexo 19S através da sua interação com os anéis alfa do proteassoma

20S, dependente de ATP, tem a função de poro de entrada para as proteínas alvos, e no reconhecimento de substratos poli-ubiquitinados (GLICKMAN & CIECHANOVER, 2002; KIKUKAWA et al., 2002).

A importância do proteassoma em diferentes organismos tem sido relatada por diversos autores, porém o maior enfoque é o proteassoma 20S. Algumas subunidades do proteassoma 20S têm sido identificadas, em protozoários como: *Giardia* sp (EMMERLICH et al., 1999), *Trypanosoma brucei* (HUANG et al., 1999); *T. cruzi* (BARTHOLOMEU et al., 2001); *Leishmania donovani* (CHRISTENSEN et al., 2000) e *Plasmodium falciparum* (LI et al., 2000). Além disso, o uso de inibidores específicos para o proteassoma tem permitido identificar a importância deste complexo proteolítico nestes parasitas, como: na prevenção de mudanças morfológico estágio-específica em *Trypanosoma*, *Plasmodium* e *Entamoeba*, e na invasão da célula hospedeira por *Trypanosoma*, *Plasmodium* e *Toxoplasma* (PAUGAM et al., 2003).

Em alguns helmintos (*Trichostrongylus colubriformis*, *Caenorhabditis elegans* e *Schistosoma mansoni*) esta via proteolítica tem sido estudada e demarcada a sua importância nos processos biológicos (STANKIEWICZ & HADÁS, 2000; DAVY et al., 2001; RAM et al., 2003). Diante destas considerações o objetivo do presente trabalho foi a caracterização molecular das subunidades ATPase3 e S5a do complexo 19S do proteassoma 26S em *S. venezuelensis*.

2. Material e Métodos

2.1. Obtenção dos estágios evolutivos de *S. venezuelensis*

As larvas filarióides foram obtidas a partir de cultura de fezes de *Rattus norvegicus* em carvão animal por aproximadamente 48 horas a 28°C. As fêmeas partenogenéticas foram retiradas do intestino delgado de *R. norvegicus* com 15 dias de infecção, onde o intestino foi seccionado longitudinalmente e colocado em solução salina, em estufa a 37°C por uma hora. Em seguida procedeu-se à colheita do parasita individualmente com auxílio de uma pipeta 'Pasteur'. Os estágios evolutivos anteriormente coletados foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -70°C até o momento de uso.

2.2. Extração de RNA total

Aproximadamente 100mg de larvas filarióides ou fêmeas partenogênicas foram ressuspensos em 1ml de trizol, lisados com homogeneizador do tipo “politron” por aproximadamente 3 minutos, em seguida procedeu-se à extração do RNA total pelo método de Trizol (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. A estimativa da quantidade de RNA total obtida foi realizada em espectrofotômetro (U2001 UV/Vis, Hitachi, USA), na razão de 260/280nm, e a integridade do RNA foi observada por eletroforese em gel de agarose 1% em condições desnaturantes.

2.3. Extração de DNA genômico

Aproximadamente 100mg de larvas filarióides e fêmeas partenogênicas foram submetidos sucessivas lavagens em água mili-Q, seguidas da adição de hipoclorito de sódio 1% (volume/ volume) e incubação a 40°C por 10 minutos. Após sucessivas lavagens com água mili-Q, os vermes foram incubados em estufa de CO₂ a 40°C com 10% de atmosfera saturada com CO₂, durante 10 minutos (DAWKINS & SPENCER, 1989). Terminado esta etapa, o tampão de lise (Tris-HCl 100mM, EDTA 50mM, SDS 1% e β mercaptoetanol 70mM) foi adicionado na proporção de 1:10 ao tratado inicial, seguido pela adição de NaCl 200mM e proteinase K (0,1mg/ml). Depois de 1 hora, foi adicionado CTAB/NaCl (Brometo de hexadecil trimetil amônio/Cloreto de sódio) no lisado, procedendo a extração com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e o tratamento da fase aquosa com clorofórmio (vol/vol). A fase aquosa foi precipitada com isopropanol (2/3 volume) durante 12 horas (-20°C). O precipitado foi lavado com etanol 70%, seco em temperatura ambiente e ressuspenso em 20µl de Tampão de Extração (Tris-HCl 10mM, EDTA 1M) a 37°C. A estimativa da quantidade de DNA genômico foi realizada em espectrofotômetro (U2001 UV/Vis, Hitachi, USA) na razão de 260/280nm e a integridade da extração obtida foi observada por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

2.4. Obtenção dos cDNAs de componentes do proteassoma pela Reação da Cadeia da Polimerase utilizando a Transcrição Reversa (RT-PCR)

Para a análise e caracterização das seqüências genômicas e dos transcritos que codificam para as subunidades ATPase3 e S5a do complexo 19S, foram utilizados os oligonucleotídeos

iniciadores (“forward” 5’ ATG CGC ATG TCT ACT GAA GA 3’; “reverse” 5’ GGC ATA GTA ATT TAG ATT AG 3’) para a subunidade ATPase3 (Rpt5); e os iniciadores (“forward” 5’ ATG TCT CAG GAA GCT ACG AT 3’; “reverse” 5’- CTA TTC TGC TTA TCC TCA TC -3’) subunidade S5a (Rpn10), baseados em seqüências de cDNAs, obtidas do projeto “GENOMA do *Schistosoma mansoni*” (VERJOVSKI-ALMEIDA et al., 2003), visando a amplificação de toda a matriz de leitura aberta dos genes codificadores das subunidades ATPase3 e S5a.

Utilizando-se da técnica de RT-PCR, a primeira fita do cDNA foi sintetizada a partir de 5µg de RNA total das larvas filarióides e das fêmeas partenogenéticas obtidos como descrito na seção 2, na presença de transcriptase reversa e do iniciador oligo (dT), de acordo com as recomendações do fabricante (Thermoscript RT-PCR System, Invitrogen). Posteriormente, foram realizadas amplificações utilizando 2µl dos produtos obtidos da reação anterior combinados com os iniciadores específicos para cada subunidade do proteossoma. O programa de amplificação foi idealizado para 35 ciclos, cada um constando de uma etapa de desnaturação de 1 minuto a 95°C, uma de ligação do iniciador, de 1 minuto a 52°C e uma de extensão durante 2 minutos a 72°C. Uma alíquota desta reação foi analisada em gel de agarose a 1,0% corado com brometo de etídio.

O cDNA correspondente a cada subunidade, convenientemente purificado, foi ligado no vetor pGEM Teasy (Promega) durante 16 horas a 4°C e transformado em células competentes *Escherichia coli* DH5α. Para o preparo do DNA plasmidial, foi utilizado o kit "In Concert Rapid Plasmid Purification Systems" (Gibco-BRL), como descrito no boletim técnico do fabricante.

2.5. Amplificação das seqüências genômicas, utilizando iniciadores específicos para a subunidade ATPase 3 do complexo 19S do proteossoma 26S.

Após extração do DNA procedeu-se a amplificação genômica da subunidade ATPase3 utilizando o seguinte programa para a PCR: 40 ciclos, sendo cada um composto de uma etapa de desnaturação a 95°C por 5 minutos, uma etapa de ligação dos iniciadores a 52°C por 1 minuto e 30 segundos, seguida por uma etapa de extensão de 2 minutos e 30 segundos a 68°C. Para esta reação de amplificação foi utilizada a enzima DNA polimerase “Elongase Enzyme Mix” (Invitrogen). Uma alíquota desta reação foi analisada em gel de agarose a 1,0% corado com

brometo de etídio. A transformação ocorreu em células competentes *Escherichia coli* DH5 α e a preparação do DNA plasmidial, foi idêntica ao item anterior.

2.6. Sequenciamento dos cDNAs e do DNA genômico

Para o sequenciamento dos cDNAs das subunidades ATPase3 e S5a obtidas dos dois estágios de desenvolvimento de *S. venezuelensis* e do DNA genômico obtido somente da subunidade ATPase3, foi utilizada a técnica do término do crescimento da cadeia, inicialmente desenvolvida por Sanger et al., 1977.

Em cada tubo de reação, foram adicionados 0.5 μ g de DNA fita dupla, do vetor pGEM T easy contendo o inserto (cDNA ou DNA genômico). Cada reação foi preparada pela adição de 1 μ L dos iniciadores “forward” (5'-GTAAACGACGGCCAGT-3') ou “reverse” (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'), 2 μ L de Big Dye (DNA Sequencing Kit), 6 μ L de tampão de sequenciamento (200Mm de Tris-HCl, 5mM de MgCl₂, pH 9.0) e 9 μ L de água livre de RNase. Os tubos contendo a mistura reacional foram submetidos a 40 ciclos compostos por: desnaturação a 96°C durante 10 segundos, ligação dos oligoiniciadores a 52°C durante 20 segundos e extensão da cadeia a 72°C durante 4 minutos, em termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf). O produto gerado em cada reação foi analisado em seqüenciador automático (ABI Prism 3100 DNA sequencer).

2.7. Análise computacional das sequências obtidas

Com o auxílio do programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, www.ncbi.nlm.nih.gov) as sequências obtidas foram submetidas a busca de homologia com seqüências de nucleotídeos (Blastn) e de aminoácidos (Blastx) depositados no Gene Bank (Nacional Center for Biotechnology Information, USA).

2.8. Análise filogenética

A análise filogenética foi realizada com auxílio do programa ClustalW (www.ebi.ac.uk/clustalw/) e MEGA versão 2 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 2.1), utilizando o método de parsimônia máxima com confiabilidade $\geq 75\%$.

3. Resultados

Os produtos de amplificação obtidos por RT-PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores específicos para as subunidades ATPase3 e S5a do complexo 19S nos dois estágios de desenvolvimento de *S. venezuelensis* estão demonstrados na Figura 1A e 2, respectivamente. Com a reação de amplificação utilizando os oligoiniciadores para a subunidade S5a, obteve-se um transcrito de 1220bp, enquanto que utilizando os oligoiniciadores para a subunidade ATPase3 evidenciou a presença de dois transcritos, em torno de 1224pb e 544pb, denominadas de banda alta e baixa, respectivamente (Figura 1A).

O DNA genômico foi amplificado somente para a ATPase3 (Figura 1B), uma vez que o gene que codifica a subunidade S5a de eucariotos superiores (humanos e camundongos), possui aproximadamente 10Kb, o que dificulta a sua amplificação através da técnica de PCR.

Os transcritos correspondentes à subunidade ATPase3, nos dois estágios de desenvolvimento, estão representado na Figura 3. O alinhamento das seqüências de cDNAs e de DNA genômico referentes a banda alta e banda baixa para subunidade ATPase3 entre os dois estágios, demonstrou 100% de similaridade.

O alinhamento entre as seqüências banda alta e banda baixa da subunidade ATPase3, demonstrou que os primeiros 60 nucleotídeos do fragmento menor se complementam aos primeiros 60 nucleotídeos do fragmento maior, sendo que os 484 nucleotídeos restantes, do fragmento maior, são complementares aos fragmentos finais do menor (representado no desenho esquemático na Figura 3).

O alinhamento das seqüências de nucleotídeos da subunidade S5a demonstrou 100% de similaridade nos dois estágios (Figura 4).

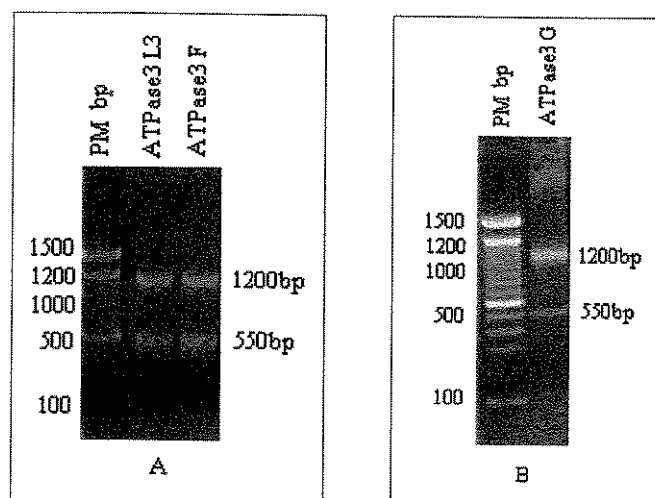


Figura 1: Produtos de amplificação utilizando os oligonucleotídeos iniciadores específicos para a subunidade ATPase3 do complexo 19S, obtido por RT-PCR nos estágios de larva infectante (L3) e fêmea partenogenética (F) (A) de *Strongyloides venezuelensis*. A amplificação do DNA genômico referente a ATPase 3 (B).

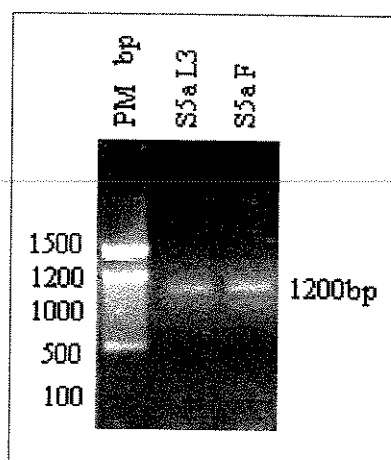


Figura 2: Os produtos de amplificação utilizando os oligonucleotídeos iniciadores específicos para a subunidade S5a do complexo 19S, obtido por RT-PCR nos estágios de larva infectante (L3) e fêmea partenogenética (F) de *Strongyloides venezuelensis*.

ATPase3BA	ATGCGCATGTCTACTGAAGAGCTGACGAGTAGAGCAAGACTGCTTGATTCTGAAATTCGT	60
ATPase3BB	ATGCGCATGTCTACTGAAGAGCTGACGAGTAGAGCAAGACTGCTTGATTCTGAAATTCGT	60

ATPase3BA	TTCATGCAGTCTGAGTTGAAACACGTCATCATGAAATAAACACGAAACAGACAAAAGTT	120
ATPase3BB	-----	
ATPase3BA	AAGGATAGTAAAAGCAAGATAAAATGAACAAGGCACTTCCCTATTAGTAGCAACCGTC	180
ATPase3BB	-----	
ATPase3BA	GTCGAATTGCTAGACGTAGAACCTCAAGAAGATGAGATAGAAGAGGAGCAAACGTTGAT	240
ATPase3BB	-----	
ATPase3BA	CTTGATTCTCAGCGTAAGGGAAAATGTGCAGTTATCAAAACAAGTACTAGGCAAACATAC	300
ATPase3BB	-----	
ATPase3BA	TTCCTTCCGGTCATTGGTCTTGACCTCCCGAAGAATTAAACCTGGCGACTTAGTTGGG	360
ATPase3BB	-----	
ATPase3BA	GTACATAAAGACTCATACTTGATCCTTGAAAACTTCCACCGGAATTCGACTCTCGAGTA	420
ATPase3BB	-----	
ATPase3BA	AAGGCTATGGAGGTTGATGAACGTCCAACCGAGAGATATAGTGACATTGGTGGGCTTGAT	480
ATPase3BB	-----	
ATPase3BA	AAACAGATACAGGAATTAATTGAAGCTGTTGTTCTCCCTATGACTCATCGTGATCGCTTC	540
ATPase3BB	-----	
ATPase3BA	GAGGCACCTGGTATTCAGCCACCAAGGGAGTCTTGTTGTATGGTCCACCAGGTACAGGA	600
ATPase3BB	-----	
ATPase3BA	AAACACCTTCTGGCTCGTGCATGTGCAGCTCAGACCAAATCCACGTTTCTTAACTTGCT	660
ATPase3BB	-----	
ATPase3BA	GGTCCTCAGTTAGTGCAAATGTTTATTGGGGACGGAGCTAAACTGGTCAGGGATGCCTTC	720
ATPase3BB	-----	
ATPase3BA	CAATTGGCCAAAGAAAAAGCTCCAGCAATTATTTTCATTGACGAGCTCGACGCCATCGGA	780
ATPase3BB	-----AGCTCCAGCAATTATTTTCATTGACGAGCTCGACGCCATCGGA	43

ATPase3BA	ACAAAGCGTTTCAATAGTGAGAAAGCTGGCGATCGTGAGGTACAGCGAACAATGTTAGAA	840
ATPase3BB	ACAAAGCGTTTCAATAGTGAGAAAGCTGGCGATCGTGAGGTACAGCGAACAATGTTAGAA	103

ATPase3BA	CTTCTTAATCAACTGGATGGTTTCCAACCAAATCATGACATCAAGGTGATTGCGGCTACA	900
ATPase3BB	CTTCTTAATCAACTGGATGGTTTCCAACCAAATCATGACATCAAGGTGATTGCGGCTACA	163

ATPase3BA	AATAGAGTAGATATATTAGACCCAGCGCTGTTACGAAGTGGTAGAGTTGACCGGAAAATC	960
ATPase3BB	AATAGAGTAGATATATTAGACCCAGCGCTGTTACGAAGTGGTAGAGTTGACCGGAAAATC	223

ATPase3BA	GAGTTTCCTGCACCAACGAAGAAGCACGTGCCCCGATTATGCAGATTCACTCTCGCAAG	1020
ATPase3BB	GAGTTTCCTGCACCAACGAAGAAGCACGTGCCCCGATTATGCAGATTCACTCTCGCAAG	283

```

ATPase3BA      ATGAATGTACAAAAGATGTCAATTTGAAGAATTAGCTCGCTGTACAGATGACTTTAAT 1080
ATPase3BB      ATGAATGTACAAAAGATGTCAATTTGAAGAATTAGCTCGCTGTACAGATGACTTTAAT 343
*****

ATPase3BA      GGAGCTCAGTGTAAGCTGTGTGTGGAAGCCGGTATGATTGCGTTGCGTCGAAGTGCA 1140
ATPase3BB      GGAGCTCAGTGTAAGCTGTGTGTGGAAGCCGGTATGATTGCGTTGCGTCGAAGTGCA 403
*****

ATPase3BA      TCAGAAGTAACACACGAAGATTACATGGATGCCATTTTGAAGTTCAAGCTAAGAAGCGC 1200
ATPase3BB      TCAGAAGTAACACACGAAGATTACATGGATGCCATTTTGAAGTTCAAGCTAAGAAGCGC 463
*****

ATPase3BA      ACTAATCTAAATTACTATGCC 1221
ATPase3BB      ACTAATCTAAATTACTATGCC 484
*****

```

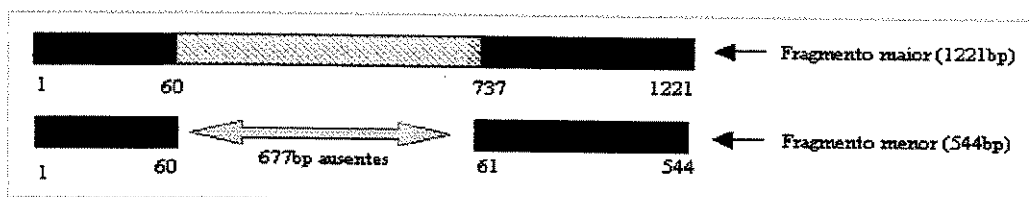


Figura 3: Alinhamento das seqüências de nucleotídeos da banda alta (BA) e banda baixa (BB) da subunidade ATPase 3 do complexo 19S do proteassoma 26S em *Strongyloides venezuelensis* (www.ebi.ac.uk/clustalw/). No final do alinhamento, está representado o desenho esquemático do alinhamento dos fragmentos maior (BA) e menor (BB) da subunidade ATPase 3.

```

S5aF      ATGTCTCAGGAAGCTACGATCATAGCAGTTGATAAATAGTGATTACATGAGGAATGGGGAC 60
S5aL3     ATGTCTCAGGAAGCTACGATCATAGCAGTTGATAAATAGTGATTACATGAGGAATGGGGAC 60
*****

S5aF      TTCTTCCCAACACGCTCTGCAGGCGCAAAATGATGCTGTCGGTTTGATCTGCCAGAGCAAG 120
S5aL3     TTCTTCCCAACACGCTCTGCAGGCGCAAAATGATGCTGTCGGTTTGATCTGCCAGAGCAAG 120
*****

S5aF      CGTCAACGTAATCCAGAAAATACCATTTGGTTTGTGTCCCTTGCAAACACCGAAGTACTT 180
S5aL3     CGTCAACGTAATCCAGAAAATACCATTTGGTTTGTGTCCCTTGCAAACACCGAAGTACTT 180
*****

S5aF      TGTACGCTAACAAATGATGTGAGTAAGATATACAATCGTTTACACCTTGTGGAGCCAAAG 240
S5aL3     TGTACGCTAACAAATGATGTGAGTAAGATATACAATCGTTTACACCTTGTGGAGCCAAAG 240
*****

S5aF      GGCAGGATTATTTTCTGCTCATCAATAAGGATAGCCACCTCGCACTTCGTATCGACAA 300
S5aL3     GGCAGGATTATTTTCTGCTCATCAATAAGGATAGCCACCTCGCACTTCGTATCGACAA 300
*****

S5aF      TTGAGACATCAGAAAATGAGGATCGTATGTTTCATCGGTAGTCCCATATTAGAAGATGAA 360
S5aL3     TTGAGACATCAGAAAATGAGGATCGTATGTTTCATCGGTAGTCCCATATTAGAAGATGAA 360
*****

S5aF      AAAGAATTGACTAGGCTTGCCAAGCGTCTCAAAAAAGAGAAAGTAAATGTCGATATTATT 420
S5aL3     AAAGAATTGACTAGGCTTGCCAAGCGTCTCAAAAAAGAGAAAGTAAATGTCGATATTATT 420
*****

S5aF      AACTTTGGTGAGAATGAAACAAATGAGCAAAAGTTGTGAGAATTCATCGACACATTGAAT 480
S5aL3     AACTTTGGTGAGAATGAAACAAATGAGCAAAAGTTGTGAGAATTCATCGACACATTGAAT 480
*****

S5aF      GGAAAGGATGGAACAGGTTCTCACCTCATATCTGTTGCCCGGGGACAGTCTTACACGAT 540
S5aL3     GGAAAGGATGGAACAGGTTCTCACCTCATATCTGTTGCCCGGGGACAGTCTTACACGAT 540
*****

S5aF      ACTTTGATGACAAGCCCCGTTGTTGCTGGTGAGGATGTTCTGGCATGGCTGGTGCCGGG 600
S5aL3     ACTTTGATGACAAGCCCCGTTGTTGCTGGTGAGGATGTTCTGGCATGGCTGGTGCCGGG 600
*****

S5aF      TTAGGTTTGGAGTTTGGATTAGATGGGGCAGAAGATCCTGATTTACTCTATGCCCTCAGA 660
S5aL3     TTAGGTTTGGAGTTTGGATTAGATGGGGCAGAAGATCCTGATTTACTCTATGCCCTCAGA 660
*****

S5aF      GTATCAATGGAAGACCAGCGCATGCGTCAAGAACATGAGGTTAATGGAGATGGTAGTAAT 720
S5aL3     GTATCAATGGAAGACCAGCGCATGCGTCAAGAACATGAGGTTAATGGAGATGGTAGTAAT 720
*****

S5aF      ACTTCAGTTGTAGCAACATCGTTACCAGCTGGGTGAGGAACGTCCGAAGAAGCTATGCTT 780
S5aL3     ACTTCAGTTGTAGCAACATCGTTACCAGCTGGGTGAGGAACGTCCGAAGAAGCTATGCTT 780
*****

S5aF      CAGCAGGCTTTGGCTATGTCAATGCAAATGAATAATACCGAGTCTTCATCCTTGCCCTATG 840
S5aL3     CAGCAGGCTTTGGCTATGTCAATGCAAATGAATAATACCGAGTCTTCATCCTTGCCCTATG 840
*****

S5aF      GATATCGATCTGGCAGCTATGTGAGAAGAAGATCAGATAGCATATGCACTGCGCATGTCT 900
S5aL3     GATATCGATCTGGCAGCTATGTGAGAAGAAGATCAGATAGCATATGCACTGCGCATGTCT 900
*****

S5aF      TTACAACAGATGGGAGAGGAAACGACTCAACCTACCACCCTACATTGGAGTCCGACAAG 960
S5aL3     TTACAACAGATGGGAGAGGAAACGACTCAACCTACCACCCTACATTGGAGTCCGACAAG 960
*****

S5aF      ACTATTGTTGAACCTCTGGTGTGGCTATGGATATAGATCAGACTCCAACCTAAAGTTACT 1020
S5aL3     ACTATTGTTGAACCTCTGGTGTGGCTATGGATATAGATCAGACTCCAACCTAAAGTTACT 1020
*****

```

```

S5aF      GAAATCCAAATTTATCTTCTAGTTCGGTACATTGGCAGCTGCAACATCAGCTGTTCT 1080
S5aL3     GAAATCCAAATTTATCTTCTAGTTCGGTACATTGGCAGCTGCAACATCAGCTGTTCT 1080
          *****
S5aF      ACATCTGCTGACTTGGATGTTATGTACGATGCTGAATTTTGAATCTGTTTACAAAGT 1140
S5aL3     ACATCTGCTGACTTGGATGTTATGTACGATGCTGAATTTTGAATCTGTTTACAAAGT 1140
          *****
S5aF      TTGCCTGGTGTGGATACTCAGAATGAAGATGTTGCAAGGCTATAAATGCTCTAACTAAG 1200
S5aL3     TTGCCTGGTGTGGATACTCAGAATGAAGATGTTGCAAGGCTATAAATGCTCTAACTAAG 1200
          *****
S5aF      TCCAGTCACAGCGAGGTTCAAAGAAAGATGAAAAAGAAGATGAGGATAAGCAGAATAGT 1260
S5aL3     TCCAGTCACAGCGAGGTTCAAAGAAAGATGAAAAAGAAGATGAGGATAAGCAGAATAGT 1260
          *****

```

Figura 4: Alinhamento das seqüências de nucleotídeos da subunidade S5a do complexo 19S do proteassoma 26S nos estágios de larva infectante (L3) e fêmea partenogenética (F) de *S. venezuelensis*. (www.ebi.ac.uk/clustalw/).

As seqüências obtidas foram submetidas a busca de homologia com as seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos depositados no banco de dados (www.ncbi.nlm.nih.gov) utilizando o sistema Blast (Blastn e Blastx). Como pode ser observada nas tabelas 1 e 2, a seqüência predita para as subunidades ATPase3 e S5a apresentam homologia com várias seqüências que codificam para estas subunidades em uma grande variedade de organismos.

A Figura 5 (A e B) representa o alinhamento entre a seqüência predita de aminoácido para as subunidades ATPase3 e S5a com outras identificadas nos bancos de dados. Baseando-se nas seqüências de aminoácidos e utilizando os programas ClustalW e MEGA versão 2, pode-se fazer uma análise filogenética das subunidades ATPase3 e S5a do complexo 19S do proteassoma 26S no nematódeo *S. venezuelensis* (Figura 5 A e B).

Tabela 1: Homologia da sequência de aminoácidos da subunidade ATPase 3 de *Strongyloides venezuelensis* com a subunidades ATPase 3 de outros organismos, utilizando o programa BLASTp.

Organismo	Número de acesso	Valor de e ⁻
<i>Mus musculus</i>	13543237	0
<i>Homo sapiens</i>	33870816	0
<i>Xenopus laevis</i>	32450569	0
<i>Rattus norvegicus</i>	1395184	0
<i>Anopheles gambiae</i>	21294245	0
<i>Drosophila melanogaster</i>	11265326	0
<i>Caenorhabditis elegans</i>	3193161	0
<i>Arabidopsis thaliana</i>	15230005	172
<i>Oryza sativa</i>	556560	172
<i>Brassica rapa</i>	2564337	171
<i>Schizoccharomyces pombe</i>	7435746	157
<i>Plasmodium yoelii</i>	23481369	156
<i>Plasmodium falciparum</i>	23508505	154
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6324691	154
<i>Trypanosoma brucei</i>	9651741	129

Mamíferos: 82% de identidade e 91% de similaridade; insetos: 82% de identidade e 91% de similaridade; plantas: 75% de identidade e 89% de similaridade; protozoários: 58 a 66% de identidade e 76 a 80% de similaridade.

Tabela 2: Homologia da sequência de aminoácidos da subunidade S5a de *Strongyloides venezuelensis* com a subunidades S5a de outros organismos, utilizando o programa BLASTp.

Organismo	Número de acesso	Valor de e ⁻
<i>Schistosoma mansoni</i>	2623826	0
<i>Schistosoma japonicum</i>	29841433	171
<i>Mus musculus</i>	6679505	83
<i>Rattus norvegicus</i>	9957071	83
<i>Homo sapiens</i>	2134662	82
<i>Xenopus laevis</i>	27882650	81
<i>Drosophila melanogaster</i>	28317298	74
<i>Anopheles gambiae</i>	31213237	61
<i>Caenorhabditis elegans</i>	17508415	52
<i>Arabidopsis thaliana</i>	21594247	44
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6321994	42
<i>Physcomitrella patens</i>	8272456	42
<i>Schizoccharomyces pombe</i>	19115540	41
<i>Oryza sativa</i>	11281550	41
<i>Neurospora crassa</i>	32419451	35
<i>Plasmodium falciparum</i>	23612936	23
<i>Trypanosoma brucei</i>	18463063	22
<i>Giardia lamblia</i>	29247683	4

S. mansoni: 89% de identidade e de similaridade; mamíferos: 46 a 47% de identidade e 62 a 63% de similaridade; insetos: 41 a 42% de identidade e 57 a 59% de similaridade; *C. elegans*: 38% de identidade e 56% de similaridade; protozoários: 31 a 39% de identidade e 53 a 60% de similaridade.

BaSv	ALRRSASEVTHEDYMDAILEVQAKKRTNLNYA 407
BbSv	ALRRSASEVTHEDYMDAILEVQAKKRTNLNYA 170
ATPase3Dm	ALRRSANSVTHEFMDAIMEVQAKKKANLNYA 428
ATPase3Hs	ALRRGATELTHEDYMEGILEVQAKKKANLQYYA 439
ATPase3Rn	ALRRGATELTHEDYMEGILEVQAKKKANLQYYA 442
ATPase3At	ALRRDATEVNHEDFNELIQVQAKKKASLNYA 423
ATPase3Sc	ALRNGQSSVKHEDFVEGISEVQARKSKSVFYA 434
ATPase3Tb	ALRNERVYVAHEDFAEGVTAVQARKKSSLNYA 445
	***. : ***: :: ***:* .:::**

Figura 5A: Alinhamento entre as seqüências de aminoácidos da subunidade ATPase 3 em *S. venezuelensis* (BaSv – banda alta, com 407aa; BbSv – banda baixa, com 170aa) com as seqüências de genes ortólogos, utilizando o programa ClustalW. O domínio AAA, está representado na seqüência de aminoácido em negrito nas seqüências BaSv (190 a 377aa) e BbSv (20 a 140aa).

Dm. *Drosophila melanogaster* (428aa); Hs. *Homo sapiens* (439aa); Rn. *Rattus norvergicus* (442aa); At. *Arabidopsis thaliana* (423aa); Sc. *Saccharomyces cerevisiae* (434aa); Tb. *Trypanosoma brucei* (445aa).

```

S5aHs -----
S5aMm -----
S5aDm -----
S5aSv -----
S5aAt -----
S5aSc -----
S5aCe MPEHEKSTQMRESAEKKPNVNSCVVIMLSASQLHRFVQHINRQASRNTWVLRRVFQPEVT 60
S5aTb -----

S5aHs -----
S5aMm -----
S5aDm -----
S5aSv -----
S5aAt -----
S5aSc -----
S5aCe PPGGVQKNPNDFHDYQKYEVVEFETQKSAGPINVILLQDVEGIGHQFDVVSVDRTLARKD 120
S5aTb -----

S5aHs -----
S5aMm -----
S5aDm -----
S5aSv -----
S5aAt -----
S5aSc -----
S5aCe LLLSKKAVYASPFDLKYYSMDKTRMAEELASRIRIPYELKVVGRLQKMWIPKVNENQ 180
S5aTb -----

S5aHs -----
S5aMm -----
S5aDm -----
S5aSv -----
S5aAt -----
S5aSc -----
S5aCe WTIDRNLVKSSRLQMGVFAENTIFLAAKPISGPNFDIEAKLFRFVVVNQQYIVPMLGR 240
S5aTb -----

S5aHs -----
S5aMm -----
S5aDm -----
S5aSv -----
S5aAt -----
S5aSc -----
S5aCe ITHISVDESKQSSYKGAQHISKVQESTMICVDNSEYMRNGDFQPTRLQSQQDAVNLVQ 300
S5aTb -----
-----MVLESTMVCVDNSEYMRNGDFLPTRLQAQQDAVNIVCH 38
-----MVLESTMVCVDNSEYMRNGDFLPTRLQAQQDAVNIVCH 38
-----MVLESTMICFDNSDFQRNGDYFPPTRLIVQRDGINLVCL 38
-----MSQEATIIAVDNSDYMRNGDFFPPTRLQAQNDAVGLICQ 38
-----MVLEATMICIDNSEWMRNGDYSPSRLQAQTEAVNLLCG 38
-----MVLEATVLVIDNSEYSRNGDFPPTRFEAQIDSVEFIFQ 38
-----MPEACFLCLDSSEFMRNGDQHPNRFVQVQEAATLLAN 37
* : . : . * . : : * * * * . * : . : :

S5aHs SKTRSNPENNVGLITLAND-CEVLTTTLPDTGRILSKLHTVQPKGK-ITFCTGIRVAHLA 96
S5aMm SKTRSNPENNVGLITLAND-CEVLTTTLPDTGRILSKLHTVQPKGK-ITFCTGIRVAHLA 96
S5aDm TKLRSNPENNVGLMTLSNT-VEVLATLTSDAGRIFSKMHLVQPKGE-INLLTGIRIAHLV 96
S5aSv SKRQRNPENTIGLLSLAN--TEVLCTLTNDVSKIYNRLHLVQPKGR-IIFCSSIRIAHLA 95
S5aAt AKTQSNPENTVGIITMAGKGVRLTTPSTDGKILACMHGLDVGGE-INLTAAIQIAQLA 97
S5aSc AKRNSNPENTVGLISGAGANPRVLSTFTAEEFKILAGLHDTQIEGK-LHMATALQIAQLT 97
S5aCe CKLRANPENAVGILSMANS-VQVLSLSTEQGRLLMMKNHSIEPFGK-CNFIAGIKIAHLA 358
S5aTb AKTSANAENTVGFLTGGNACTVFETLTSDDVRVMSTMSKISISGKQCHFSGKLQIACLA 97
* * * * * : : : : : * : : : : * : : : :

S5aHs LKHRQKGKHNKMRIIAFVGSPPVEDNEK-DLVKLAKRLKKEKVNVDIINFG---EEEVNTTEKL 153
S5aMm LKHRQKGKHNKMRIIAFVGSPPVEDNEK-DLVKLAKRLKKEKVNVDIINFG---EEEVNTTEKL 153
S5aDm LKHRQKGKHNKMRIVVFGSPINHEEG-DLVKQAKRLKKEKVNVDIVSFG---DHGNNNEIL 153
S5aSv LRHRQLRHQKMRIVCFIGSPILEDEK-ELTRLAKRLKKEKVNVDIINFG---ENETNEQKL 152
S5aAt LKHRQKNQQRQRIIVFAGSPIKYEKK-ALEIVGKRLKKNVSLDIVNFGEDDDEEKPOKL 156
S5aSc LKHRQKNVQHQRIIVAFVCSPISDSRD-ELIRLAKTLKNNVAVDIINFG---EIEQNTTELL 154
S5aCe LKHRQNRNHNKMRVVLFIGSPLEEIEMNELVKIAKMKKEKVLCDVIMFGE-NESDGHEKF 417
S5aTb LSHRTNPRAEKRIIVAFIGTPLGETDG-ELEKLAKLRKESVAVDVVSFG---VPSNVPRIL 153
* * * . * : : * : : * . * : : * * : : * : :

```

S5aHs	TAFVNTLNGKDGTSGLVTVPPGP-SLADALISSPILAGE-GGAMLG-----LGAS	202
S5aMm	TAFVNTLNGKDGTSGLVTVPPGP-SLADALISSPILAGE-GGAMLG-----LGAS	202
S5aDm	TAFINALNGKDGTSGLVSVPRGS-VLSDALLSSPIIQGEDGMGGAG-----LGGN	203
S5aSv	SEFIDTLNGKDGTSGLISVAPGT-VLHDTLMTSPVVAGEDGSGMAG-----AGLG	202
S5aAt	EALITAVNN--NDGSHIVHVPSCANALS DVLLSTPVFT--GDEGASGYVSAAAAAAAGG	212
S5aSc	DEFIAAVNNPQEETSHLLTVTPGPRLLYENIASSP IILEEGSSGMAFGGSGGSDANGT	214
S5aCe	STFVDTLNGKEGSGSSLI VVPQGS-SLTDALLQSSVCKNEDGQAAGF-----GGNGM	469
S5aTb	TAFVERLSN---NGNSRFLSVPAKVFLIDSLMSSAIFMGEDSSVSGG-----GFNGS	202
	:: ::. * : : ::	
S5aHs	DFFFGVDPSADPELALALRVSMEEQRQRQEEEEARRAAAAAASAEAG-----	247
S5aMm	DFFFGVDPSADPELALALRVSMEEQRQRQEEEEARRAAAAAASAEAG-----	247
S5aDm	VFEFGVDPNEDPELALALRVSMEEQRQRQEESEQRANPDGAPPTGGDAGGGGGVSGSGPG	263
S5aSv	-LEFGLD GAEDPDLLYALRVSMED QRMQRQEHEVNGDGSNTSVVAT-----	246
S5aAt	DFDFGVDPNIDPELALALRVSMEEERARQEAARKAADEAGQKDKDG-----	259
S5aSc	FMDFGVDPSMDPELAMALRLSMEEQRQRERLRQQQQ-----QQDQP-----	256
S5aCe	DNAFGMDVENDPDALALALRVSMEEERARQAAAAAANGGAADSGAD-----	514
S5aTb	SAGFSVDPTMDPEMVLAIQMSLEEERQAAAAALNSNAESETVER-----	249
	.: **:: *::*:*:.. **	
S5aHs	-IATTGTE---DSDDALLKMTISQ-QEFGRT---GLP---DLSSMTEEEQ-IAYAMQMSL	295
S5aMm	-IATPGTE---DSDDALLKMTINQ-QEFGRP---GLP---DLSSMTEEEQ-IAYAMQMSL	295
S5aDm	NEESAGAENEANTEEAMLQRALALSTETPED---NLP---DFANMTEEEQ-IAFAMQMSM	316
S5aSv	-SLPAGSG--- TSEERMLQQAAMSMQMN NTESSLPMDIDLAA MSSEEDQ-IAYALRMSL	301
S5aAt	DTASASQETVARTTDKNAEPMDEDSALLDQAIAMSVG-DVMSEAADEDQDLALALQMSM	318
S5aSc	-----EQSEQPEQHQQK-----	268
S5aCe	-----AEVAAAAAIVPLEEM-----DMGAMTEEQQ-LEWALRLSM	548
S5aTb	-----TDINMDEEALS-----LENMTEEM-LRRALLLSL	278
		
S5aHs	QGA---EFGQAESADIDASSAMDTSEPAKEEDDY-----	326
S5aMm	QGT---EFSQ-ESADMDASSAMTSDPVKEEDDY-----	325
S5aDm	QDA---PDDS-VTQAKRPKTDEANAPMDVDEDS-----	347
S5aSv	QQM GEETTQPTTTTLESDKTIVEPSGVAMDIDQTPTKVTENPNLSSSSGTLAAATSAVPT	361
S5aAt	SGE-----ESSEATGAGN-----	331
S5aSc	-----	
S5aCe	QEN---APAEQPQVQHEQMDVDGAPAVGGDNLD-----	578
S5aTb	QEAN-----	282
S5aHs	----DVMQDPEFLQSVLENLPGVDPNNEAIRNAMGSLASQATKDG-KKDKKEEDKK---	377
S5aMm	----DVMQDPEFLQSVLENLPGVDPNNAAIRSVMGALASQATKDG-KNDKKEEEKK---	376
S5aDm	----EVIGDPAFLQSVLENLPGVDPQSEAVRDAVGSIN--KDKDK-KSDGKDSQKK---	396
S5aSv	SADLDVMYDAEFLESVLQSLPGVDTQNEEDVRKAINALTQSQRGSKKDEKEDEDKQNS	420
S5aAt	----NLLGNQAFISSVLSSLPGVDPNDPAVKELLASLPDESKRTEEEESSKKGEDEKK	386
S5aSc	-----	
S5aCe	----DLMNPELLQQIVDDLPAANAE-----KDDDKKK-----	608
S5aTb	----KGQAAAGSNATNAADDEAFANELEKELEFQSKETLQGHDDQNEEKED---	331

Figura 5B: Alinhamento entre as seqüências de aminoácidos da subunidade S5a em *Strongyloides venezuelensis* (Sv – 410aa) com seqüências de genes ortólogos, utilizando o programa ClustalW. Os domínios de interação com ubiquitina estão representados em negrito dentro da seqüência de aminoácidos da Sv.

Hs. *Homo sapiens* (377aa); Mm. *Mus musculus* (376aa); Dm. *Drosophila melanogaster* (396aa); At. *Arabidopsis thaliana* (386aa); Sc. *Saccharomyces cerevisiae* (268aa); Tb. *Trypanosoma brucei* (331aa); Ce. *Caenorhaditis elegans* (608aa).

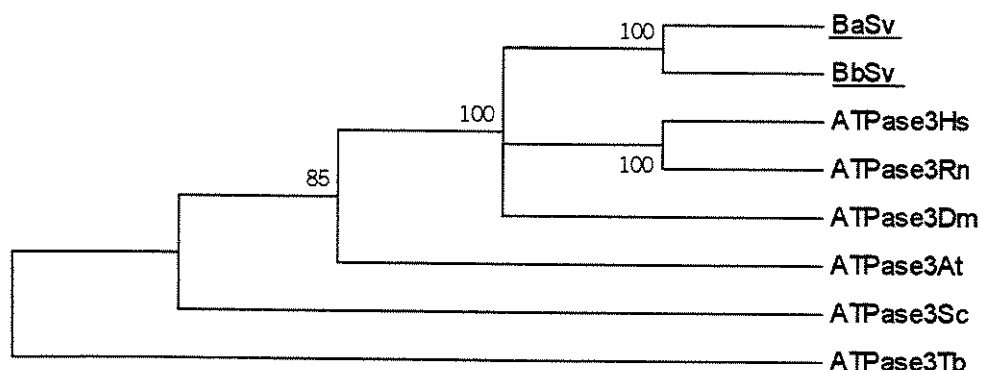


Figura 6A: Análise filogenética entre as seqüências de aminoácidos da subunidade ATPase 3 em *Strongyloides venezuelensis* (banda baixa = BbSv e banda alta = BaSv) e outros organismos, utilizando os programas ClustalW e MEGA versão 2.

Dm. *Drosophila melanogaster*; Hs. *Homo sapiens*; Rn. *Rattus norvergicus*; At. *Arabidopsis thaliana*; Sc. *Saccharomyces cerevisiae*; Tb. *Trypanosoma brucei*.

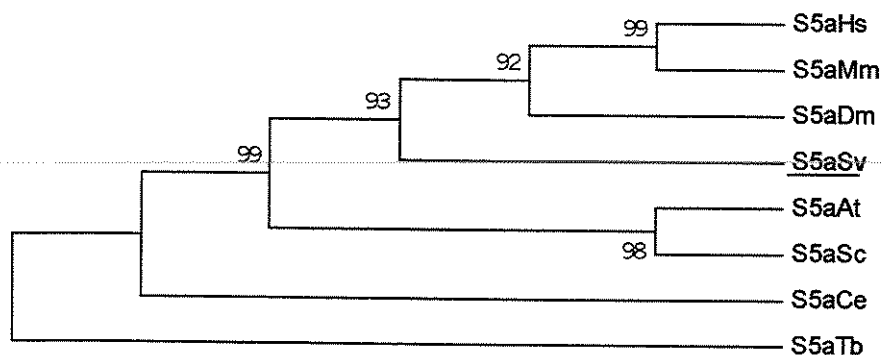


Figura 6B: Análise filogenética entre as seqüências de aminoácidos da subunidade S5a em *Strongyloides venezuelensis* (Sv) e outros organismos, utilizando os programas ClustalW e MEGA versão 2.

Hs. *Homo sapiens*; Mm. *Mus musculus*; Dm. *Drosophila melanogaster*; At. *Arabidopsis thaliana*; Sc. *Saccharomyces cerevisiae*; Tb. *Trypasoma brucei*; Ce. *Caenorhabditis elegans*.

4. Discussão

O proteassoma 20S tem sido mencionado como responsável pela atividade proteolítica do proteassoma 26S, enquanto que o complexo 19S contribui para diferentes funções, como: reconhecimento de substratos poli-ubiquitinados, reciclagem da ubiquitina, auxiliar na abertura do canal 20S e no desdobramento e na translocação do substrato até o proteassoma 20S para a degradação (MAUPIN-FURLOW et al., 2003).

Em todas as células a degradação de proteínas intracelulares necessita da hidrólise de ATP (ZWICKL et al., 1999). Em eucariotos, a hidrólise de ATP é importante para a ubiquitinação de proteínas substratos, bem como para a atividade proteolítica do proteassoma 26S, o principal sítio de proteólise no núcleo e no citoplasma (BENAROUDJ et al., 2003), esta por sua vez é proveniente das subunidades ATPases que compõe a base do complexo 19S. As ATPases associadas ao proteassoma são classificadas dentro da família das AAA, as quais são encontradas em todos os domínios da vida atuando em diversos processos biológicos como na proteólise, nas modificações conformacionais de proteínas e na replicação de DNA (MAUPIN-FURLOW et al., 2003).

Análise da sequência de nucleotídeos (BLASTn) do nematódeo *S. venezuelensis* revelou uma significativa homologia com genes proteassomais da subunidade ATPase 3. A sequência de aminoácido predita demonstrou alta homologia com genes codificadores da subunidade ATPase3 de outros organismos, como mamíferos (roedores e homem com 82% de identidade e 91% de similaridade), representantes da classe Insecta (como *D. melanogaster* e *A. gambiae* com 82% de identidade 91% de similaridade), plantas (*O.sSativa*, com 75% de identidade e 89% de similaridade) e protozoários parasitas (como *Plasmodium* sp e *T. brucei*, com 66% e 58% de identidade; 80% e 76% de similaridade, respectivamente). Embora as ATPases apresentem alta similaridade nas suas sequências, não são funcionalmente redundantes, pois coletivamente assumem múltiplos papéis dentro do complexo (GROLL & HUBER, 2003), bem como a produção de energia utilizado pelo 26S durante a degradação de proteínas (COUX et al., 1996), na manutenção do complexo 26S, no reconhecimento e na translocação do substrato alvo até o canal proteolítico 20S. Em arqueobactéria, *Methanococcus jannaschii*, as subunidades ATPases apresentaram alta similaridade com eucariotos superiores (VOGES et al, 1999).

Biologistas moleculares, em 1977, ficaram surpresos com a descoberta de que a maioria dos genes de eucariotos tem suas seqüências codificadoras (exons) interrompidas por seqüências não-codificadoras (introns) (ALBERTS et al., 1997). No presente trabalho, os transcritos para a subunidade ATPase3 são idênticos aos produtos de amplificação obtidos a partir do DNA genômico, indicando assim a ausência de processamento do mRNA antes do seu direcionamento para a síntese protéica no citoplasma. Resultados semelhantes foram obtidos por Certad et al. (1999), na caracterização de uma subunidade ATPase2 (S4) em *P. falciparum*, onde comparando as seqüências de cDNA e DNA genômico observaram que as mesmas eram idênticas sem a presença de introns.

O reconhecimento de substratos ubiquitinados pelo proteassoma 26S é um passo importante para a degradação seletiva de várias proteínas celulares. Estudos têm demonstrado que a subunidade S5a pode se ligar a cadeias poliubiquitinadas ligadas a proteínas (MAHAFFEY, RECHSTEINER, 1999; KIKUKAWA et al., 2002).

Recentemente tem sido relatado que o RNA mensageiro para a subunidade Rpn10 (S5a) é gerado a partir de um único gene, o qual sofre um processamento alternativo. A seqüência genômica da Rpn10 de camundongo é extremamente longa contendo 10Kbp, a qual é composta de 10 exons. No entanto, vários membros da família de proteínas Rpn10 são codificados por regiões intrônicas, sugerindo que a regulação da expressão desta proteína ocorre após a transcrição (KIKUKAWA et al., 2002). O tamanho do gene que codifica para a subunidade S5a dificultou a amplificação do mesmo em *S. venezuelensis*, pela técnica de PCR.

No presente trabalho, não foi observado uma expressão diferencial, através da amplificação do cDNA codificando a subunidade S5a do complexo 19S nos diferentes estágios de desenvolvimento do nematódeo *S. venezuelensis*. Embora alguns relatos sobre outros organismos mencionam a expressão diferencial de componentes do proteassoma entre os diferentes tecidos e estágios de desenvolvimento (COUX et al., 1996; VOGES et al., 1999; KAWAHARA et al., 2000). Fato este semelhante ao trematódeo *S. mansoni*, onde resultados de Northern e Western blots demonstraram que níveis diferentes de RNAm e proteínas para a subunidade S5a, bem como a taxa de modificação e não modificação para a proteína específica foi diferente entre os diferentes estágios de desenvolvimentos (RAM et al., 2003).

De modo semelhante à subunidade ATPase3, a análise da sequência de nucleotídeos (BLASTn) da subunidade S5a que constitui a interfase entre a base e a tampa do complexo 19S do proteassoma 26S no helminto *S. venezuelensis* demonstrou alta homologia com as sequências de outros organismos, como o trematódeo *S. mansoni* (com 89% de identidade e similaridade, respectivamente), mamíferos (roedores e homem com 47% e 46% de identidade e 63% e 62% de similaridade, respectivamente), insetos (*D. melanogaster* com 42% e 59%; *A. gambiae* com 41% e 57% de identidade e similaridade, respectivamente), no nematódeo de vida-livre *C. elegans* (com 38% de identidade e 56% de similaridade) e em alguns protozoários parasitas (como *P. falciparum*, *T. brucei* e *G. lamblia* com 39%, 33% e 31% de identidade e 60%, 54%, 53% de similaridade respectivamente). A importância da subunidade S5a em organismos, como *S. mansoni* tem sido relatada por Ram et al. (2003). Outras subunidades não-ATPásicas, tem sido mencionado como: Rpn1 em *T. cruzi* (ZOU et al., 2000), Rpn11 em *T. brucei* (LI, WANG, 2002), S2 em *E. histolytica* (HELLBERG et al., 1999).

Na literatura existe um maior número relatos sobre as subunidades que compõe o proteassoma 20S, em relação às subunidades que compõem o 19S, em diferentes organismos: *T. brucei* (HUANG et al., 1999; RADWANSKA et al., 2000), *D. melanogaster* (ZAISS, BELOTE, 1997), *L. donovani* (CHRISTENSEN et al., 2001), *E. histolytica* (RAMOS et al., 1997), *P. falciparum* (LI et al., 2000).

Análise filogenética dos componentes do proteassoma tem sido objetivo de estudo de diversos autores, os quais propõem diferentes mecanismos evolutivos, baseando-se na pesquisa de homologia entre os organismos nos bancos de dados (GILLE et al., 2003).

Um modelo da história evolucionária das ATPases proteassomais, tem sido proposto por Wollenberg, Swaffield, (2001), no qual a duplicação e a diversificação do gene que codifica para a ATPase proteassomal de arqueobactérias resultou nas 6 subunidades ATPásicas presentes no proteassoma de eucariotos superiores. Comparando-se os resultados do alinhamento entre as sequências de aminoácidos obtida no banco de dados e a análise filogenética, pode-se confirmar a alta similaridade e identidade entre as subunidades ATPase3 do *S. venezuelensis* com os diferentes organismos.

Outras subunidades ATPásicas (como a S4/ATPase2 de *P. falciparum*) também apresentarem uma alta identidade com levedura, ratos, insetos e homem (CERTAD et al., 1999),

como demonstrado neste nematódeo. Este fato pode ser explicado pela alta conservação no domínio AAA entre os membros da superfamília AAA (PATEL, LATTERICH, 1998). Foi identificado o domínio AAA (altamente conservado entre os membros da superfamília das AAA) na subunidade ATPase3 de *S. venezuelensis*, no qual corresponde ao aminoácido 190 a 377 e 20 ao 140, das seqüências de aminoácidos da banda alta e banda baixa, respectivamente.

A análise filogenética apresentada para a subunidade S5a, vem confirmar a evolução dos componentes do proteassoma, pois a partir de organismos mais simples (*C. elegans* e *T. brucei*) pode-se observar a diferenciação entre grupos mais complexos (mamíferos), com bactérias e representantes do reino vegetal (*O. sativa*) em ramos intermediários. Fatos estes confirmados pelo o aumento da similaridade e da identidade entre as seqüências de aminoácidos nos diversos organismos, tem-se maior proximidade entre os organismos.

Os resultados do presente trabalho vêm contribuir para análise inicial das subunidades do proteassoma 26S, sobretudo daquelas que compõem o complexo regulatório 19S no nematódeo *S. venezuelensis*. Além disso, as subunidades ATPase3 e S5a deste parasita demonstraram serem muito semelhantes com as mesmas descritas em outros organismos, levando assim inferir mecanismos semelhantes de reconhecimento e deslocamento do substrato alvo pelo proteassoma 26S. Porém novos estudos serão necessários para identificar os detalhes dos mecanismos envolvidos na degradação de proteínas alvos por este complexo multienzimático, bem como determinar a importância destes processos no ciclo biológico deste parasita.

5. Referências Bibliográficas (ABNT/NBR 10520/2002)

- ALBERTS B. et al. Biologia Molecular da Célula, 3.ed. Artes Médicas: Porto Alegre, p.335-346, 1997.
- BAEK B-K et al. Viability of eggs, filariform larvae and adults of *Strongyloides venezuelensis* (Nematoda: Strongyloidea) maintained in vitro. The Korean Journal of Parasitology, v.36, n.2, p.99-107, 1998.
- BARTHOLOMEU D.C. et al. Molecular cloning and characterization of a gene encoding the 29kDa proteasome subunit from *Trypanosoma cruzi*. Molecular Genetics Genomics, v.265, p.986-992, 2001.
- BENAROUDJ N. et al. ATP-hydrolysis by the proteasome regulatory complex PNA serves multiple functions in protein degradation. Molecular Cell, v.11, p.69-78, 2003.
- CERTAD G. et al. Cloning and partial characterization of the proteasome S4 ATPase from *Plasmodium falciparum*. Experimental Parasitology, v.93, p.123-131, 1999.
- CHRISTENSEN C.B.V. et al. Molecular characterization of a *Leishmania donovani* cDNA clone with similarity to human 20S proteasome a-type subunit. Biochimica et Biophysica Acta, v.1500, p.77-87, 2000.
- COUX O. et al. Structure and functions of 20S and 26S proteasomes. Annual Review Biochemistry, v.65, p.801-847, 1996.
- DAVY A. et al. A protein-protein interaction map of the *Caenorhabditis elegans* 26S proteasome. European Molecular Biology Organization, v.21, n.9, p.821-828, 2001.
- DAWKINS H.J.S., SPENCER T.L. The isolation of nucleic acid from nematodes requires an understanding of the parasite and its cuticular structure. Parasitology Today, v.5, n.3, p.73-76, 1989.
- EMMERLICH V. et al. Isolation and subunit composition of the 20S proteasome of *Giardia lamblia*. Molecular Biochemical Parasitology, v.100, p.131-134, 1999.
- FERREL K et al. Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem. Trends in Biochemical Sciences, v.25, p.83-88, 2000.

- GILLE C. et al. A comprehensive view on proteasomal sequences: implications for the evolution of the proteasome. Journal Molecular Biological, v.326, p.1437-1448, 2003.
- GLICKMAN M.H., CIECHANOVER A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. Physiology Review, v.82, p.373-428, 2002.
- GROLL M., HUBER R. Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle. International Journal of Biochemistry, v.35, p.606-616, 2003.
- HELLBERG A. et al. I. Primary sequence of a putative non-ATP subunit of the 26S proteasome from *Entamoeba histolytica* is similar to the human and yeast S2 subunit. Parasitology Research, v.85, p.417-420, 1999.
- HUANG L. et al. Identification and isolation of three proteasome subunits and their encoding genes from *Trypanosoma brucei*. Molecular and Biochemical Parasitology, v.102, p.211-232, 1999.
- KAWAHARA H. et al. Developmentally regulated, alternative splicing of the Rpn10 gene generates multiple forms of 26S proteasomes. European Molecular Biology Organization Journal, v.19, n.15, p.4144-4153, 2000.
- KIKUKAWA Y. et al. The 26S proteasome *Rpn10* gene encoding splicing isoforms: evolutionary conservation of the genomic organization in vertebrates. Biological Chemistry, v.383, p.1257-1261, 2002.
- LI G.D. et al. Molecular cloning of gene encoding a 20S proteasome β subunit from *Plasmodium falciparum*. International Journal Parasitology, v.30, p.729-733, 2000.
- LI Z., WANG C.C. Functional characterization of the 11 non-ATPase subunit proteins in the Trypanosome 19S proteasomal regulatory complex. Journal Biological Chemistry, v.277, n.45, p.42686-42693, 2002.
- MAHAFFEY D., RECHSTEINER M. Discrimination between ubiquitin-dependent and ubiquitin-independent proteolytic pathways by the 26S proteasome subunit 5a. Federation of European Biochemical Societies Letters, v.450, p.123-125, 1999.
- MACHADO E.R. et al. Diagnosis of human strongyloidiasis using particulate antigen of the strains of *Strongyloides venezuelensis* in indirect immunofluorescence antibody test. Experimental Parasitology, v.99, n.1, p.52-55, 2001.

- MACHADO E.R. et al. *Strongyloides venezuelensis* alkaline extract for the diagnosis of human strongyloidiasis by enzyme-linked immunosorbent assay. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.98, n.6, p.849-851, 2003.
- MAUPIN-FURLOW J.A. et al. Archaeal proteasomes: potential in metabolic engineering. Metabolic Engineering, v.5, p.151-163, 2003.
- NAUJOKAT C., HOFFMANN S. Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis. Laboratory Investigation, v.82, n.8, p.965-980, 2002.
- NEGRÃO-CORRÊA D. et al. Changes in pulmonary function and parasite burden in rats infected with *Strongyloides venezuelensis* con comitant with induction of allergic airway inflammation. Infection and Immunity, v.71, n.5, p.2607-2614, 2003.
- PATEL S., LATTERICH M. The AAA team: related ATPases with diverse functions. Trends in Cell Biology, v.8, p.65-71, 1998.
- PAUGAM A. et al. Characterization and role of protozoan parasite proteasomes. Trends in Parasitology, v.19, n.2, p.55-59, 2003.
- RADWANSKA M. et al. A transcript encoding a proteasome beta-subunit and a zinc finger protein in *Trypanosoma brucei brucei*. Gene, v.225, p.43-50, 2000.
- RAM D. et al. Iteration of the proteasome S5a/Rpn10 multiubiquitin-binding protein and the 8kDa calcium-binding protein of *Schistosoma mansoni*. Parasitology, v.127, p.337-347, 2003.
- RAMOS M.A. et al. The *Entamoeba histolytica* proteasome α -subunit gene. Molecular and Biochemical Parasitology, v.84, p.131-135, 1997.
- ROCK K. et al. Protein degradation and the generation of MHC class I presented peptides. Advances in Immunology, v.80, p.1-70, 2002.
- SANGER F. et al. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proceedings National Academy of Sciences, v.74, p.5463-5467, 1977.
- STANKIEWICZ M., HADÁS E. Immunomodulation of lambs following treatment with a proteasome preparation from infective larvae of *Trichostrongylus colubriformis*. Parasitology

- Research, v.86, p.422-426, 2000.
- TANAKA K. Proteasomes: Structure and Biology. Journal Biochemistry, v.123, p.195-204, 1998.
- VERJOVSKI-ALMEIDA S. et al. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. Nature Genetics, v.35, n.2, p.148-157, 2003.
- VOGES D. et al. The 26S proteasome: molecular machine designed for controlled proteolysis. Annual Reviews Biochemistry, v.68, p.1015-1068, 1999.
- WOLLENBERG K., SWAFFIELD JC. Evolution of proteasomal ATPases. Molecular Biological Evolution, v.18, n.6, p.962-974, 2001.
- ZAISS D., BELOTE J.M. Molecular cloning of the *Drosophila melanogaster* gene $\alpha 5_{dm}$ encoding a 20S proteasome α -type subunit. Gene, v.201, p.99-105, 1997.
- ZOU C-B. et al. Cloning and functional expression of Rpn1, a regulatory-particle non-ATPase subunit 1, of proteasome from *Trypanosoma cruzi*. Molecular Biochemical Parasitology, v.110, p.323-331, 2000.
- ZWICKL P. et al. An archaeobacterial ATPase, homologous to ATPases in the eucakaryotic 26S proteasome, activates protein breakdown by 20S proteasomes. Journal of Biological Chemistry, v.274, n.37, p.26008-26014, 1999.

Conclusões

É indiscutível a importância do proteassoma em diversos processos celulares, sobretudo na degradação de proteínas regulatórias do ciclo celular e na diferenciação, os quais tem sido verificado em diferentes organismos (parasitas e hospedeiros); bem como na produção de peptídeos antígenos para serem reconhecidos pelo sistema imunológico. Isto faz com que este complexo multienzimático seja extensivamente estudado, afim de inferir novas possibilidades terapêuticas através do uso de inibidores, além de promover um maior entendimento do ciclo biológico de agentes parasitários, sobretudo o complexo ciclo de vida de *Strongyloides* sp. e ainda promover o desenvolvimento de vacinas.

A partir das informações obtidas no presente trabalho, pode-se concluir que:

1. Os extratos brutos obtidos a partir dos dos estágios de larva filarioide e de fêmea partenogenética de *S. venezuelensis* possuem conjugados poli-ubiquitinados e bandas proteicas na faixa de 29 a 32 KDa característico do proteassoma 20S.
2. Os extratos brutos obtidos a partir dos dois estágios de desenvolvimento de *S. venezuelensis* possuem atividades proteolíticas de quimiotripsina e tripsina-símile, sendo maiores para o estágio de fêmea partenogenética em relação ao estágio de larva.
3. Os cDNAs obtidos a partir dos dois estágios de desenvolvimento apresentaram 100% de similaridade para as subunidades alfa6 e beta6 do proteassoma 20S e ATPase3 e S5a do complexo 19S do proteassoma 26S.
4. A busca de homologia revelou que a sequência predita apresenta grande similaridade com as sequências codificadoras para estas subunidades em vários organismos no banco de dados.
5. A análise filogenética das quatro subunidades revelou a evolução dos componentes do proteassoma, onde através da duplicação e da diversificação gênica tem-se a diferenciação estrutural do proteassoma de organismos mais simples até a organização dos organismos mais complexos.

6. A alta conservação das sequências do proteassoma 26S neste helminto em relação as sequências já descritas, permite inferir a grande similaridade na organização e nos mecanismos de reconhecimento e deslocamento do substrato alvo.

Diante destas considerações, a caracterização deste complexo proteolítico no nematódeo *S. venezuelensis*, ainda não permitiu afirmar definitivamente a sua função dentro do ciclo de vida deste parasita. No entanto, pode-se inferir a presença desta via proteolítica, a partir dos resultados obtidos dos ensaios enzimáticos utilizando inibidores específicos para o proteassoma, bem como pela presença dos conjugados ubiquitinados e de bandas específicas do proteassoma 20S nos extratos brutos deste nematódeo. Além disso, a caracterização molecular de algumas subunidades que compõe o proteassoma 26S e a sua similaridade com outros organismos depositados no banco de dados podem confirmar a conservação desta protease multicatalítica ao longo da evolução. Contudo, estes resultados iniciais certamente contribuirão para novos estudos, a fim de determinar a função da via proteassoma-ubiquitina neste helminto, e talvez promover um melhor entendimento da estrogiloidíase, a partir do estudo da biologia do seu agente causador.

No entanto, novos estudos serão necessários, para determinar a função do proteassoma 26S, na degradação seletiva de proteínas essenciais para a diferenciação entre os estágios de vida-livre para o parasitário, fato estes importantes para o direcionamento do complexo ciclo de vida deste parasita.

Referências Bibliográficas*

- ADAMS J. The proteasome: structure, function, and role in the cell. Cancer Treatment Reviews, v. 29, p. 3-9, 2003.
- AGUIAR R.C., WENDLAND B. Ubiquitin: not just for proteasomes anymore. Current Opinion in Cell Biology, v.15, p.184-190, 2003.
- ALMEIDA L.P., COSTA-CRUZ J.M. Incidência de enteroparasitas em habitantes do município de Araguari, Minas Gerais. Revista do Centro de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, v.4, n.1, p.9-17, 1988.
- ASHFORD et al. *Strongyloides fuelleborni kellyi*: infection and disease in Papua New Guinea. Parasitology Today, v.18, n.9, p.314-318, 1992.
- BAERMANN, G. Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum (Nematoden) – Larven in Erdproben. Mededeel mit. H. Geneesk. Batavia: Lab. Weltevreden. Feestbundel, p.41-47, 1917.
- BAUMEISTER W. et al. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. Cell, v.92, p.367-380, 1998.
- BELCASTRO A.N. et al. Exercise-induced muscle injury: a calpain hypothesis. Molecular and Cellular Biochemistry, v.179, p.135-145, 1998.
- BOCHTLER M. et al. The proteasome. Annual Reviews Biophysics Biomolecular Structural, v.28, p.295-317, 1999.
- BOUZAT J.L. et al. Phylogenomic analysis of the α proteasome gene family from early-diverging eukaryotes. Journal of Molecular Evolution, v. 51, p.532-543, 2000.
- CERTAD G. et al. Cloning and partial characterization of the proteasome S4 ATPase from *Plasmodium falciparum*. Experimental Parasitology, v.93, p.123-131, 1999.
- CHUNG C.H.A., BACK S.H. Deubiquitination enzymes: their diversity and emerging roles. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 266, p.633-640, 1999.
- CIECHANOVER A The ubiquitin-proteasome pathway. Cell, v.79, p.13-21, 1994.

- CIECHANOVER A., SCHWARTZ A. The ubiquitin- proteasome pathway: The complexity and myriad functions of proteins death. Proceedings National Academy Sciences, v.95, p.2727-2730, 1998.
- CONWAY D.J. et al. Serum IgG reactivity with 41-, 31-, and 28-kDa larval proteins of *Strongyloides stercoralis* in individuals with strongyloidiasis. Journal of Infectious Diseases, v.168, p.784-787, 1993.
- COSTA-CRUZ J.M. et al. Cryo-microtome sections of coproculture larvae of *Strongyloides stercoralis* and *Strongyloides ratti* as antigen for the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v.39, n.6, p.313-317, 1997.
- COSTA-CRUZ J.M. *Strongyloides stercoralis*. In: NEVES D.P. et al. Parasitologia Humana. 10 ed., São Paulo: Atheneu, p.247-256, 2000.
- DAVY A. et al. A protein-protein interaction map of the *Caenorhabditis elegans* 26S proteasome. European Molecular Biology Organization Reports, v.21, n.9, p.821-828, 2001.
- DIEGO J.L. et al. The ubiquitin-proteasome pathway plays an essencial role in proteolysis during *Trypanosoma cruzi* remodeling. Biochemistry, v.40, p.1053-1062, 2001.
- DeMARTINO G.N., SLAUGHTER C.A. The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. Journal Biological Chemistry, v.274, n.32, p.22123-22126, 1999.
- FERREIRA M. S. et al. Strongyloidiasis and infection due to human immunodeficiency vírus: 25 cases at a Brazilian teaching hospital, including seven cases of hyperinfection syndrome. Clinical Infectious Diseases, v.28, n.1, p.154-155, 1999.
- FERREL K. et al. Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem. Trends in Biochemical Sciences, v.25, p.83-88, 2000.
- FU H. et al. Structural and functional analysis of the six regulatory particle triple-A ATPase subunits from the *Arabidopsis* 26S. The Plant Journal, v.18, n.5, p.529-539, 1999.
- GALLEGO A.G. et al. A cDNA encoding a pepsinogen-like, aspartic protease from the human roundworm parasite *Strongyloides stercoralis*. Acta Tropica, v.71, p.17-26, 1998.
- GLICKMAN M.H., CIECHANOVER A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. Physiology Review, v.82, p.373-428, 2002.

- GROLL M., HUBER R. Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle. International Journal of Biochemistry, v.35, p.606-616, 2003.
- GROVE D.I. Human strongyloidiasis. Advances in Parasitology, v.38, p.251-309, 1996.
- HADÁS E., STANKIEWICZ M. Proteolytic enzymes of infective larvae and adults of *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus contortus*. Parasitology Research, v. 83, p.47-51, 1997.
- HARROP S.A. et al. Amplification and characterization of cysteine proteinase genes from nematodes. Tropical Medical Parasitology, v.46, p.119-122, 1995.
- HATAKEYAMA S., NAKAYAMA K.I. Ubiquitylation as a quality control system for intracellular proteins. Journal of Biochemistry, v.134, p.1-8, 2003.
- HERSHKO A. The ubiquitin pathway for protein degradation. Trends in Biochemical Sciences, v.21, p.445-449, 1996.
- HUA S-B. et al. Purification and characterization of proteasomes from *Trypanosoma brucei*. Molecular and Biochemical Parasitology, v.78, p.33-46, 1996.
- KLEMB A M., GOLDBERG D.E. Biological roles of proteases in parasitic protozoa. Annual Review of Biochemistry, v. 71, p.275-305, 2002.
- KOGA K. et al. A modified agar plate method for detection of *Strongyloides stercoralis*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v.45, n.4, p.518-521, 1991.
- LAM Y.A. et al. A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. Nature, v.416, p.763-765, 2002.
- LEE D.H., GOLDBERG A.L. Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. Trends in Cell Biology, v.8, p.397-403, 1998.
- LEVINE N.D. Nematode parasites of domestic animals and of man. 2. ed., Minneapolis: Burgess, 1979. 427p. Cap. 1: Introduction to the Nematoda, p.42-43.
- LIU L.X., WELLER P.F. Strongyloidiasis and other intestinal nematode infections. Infectious Disease Clinics of North America, v.37, n.3, p.655-682, 1993.
- LOWE J. et al. Crystal structure of the 20S proteasome from the Archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. Science, v.268, p.533-539, 1995.

- LUPAS A. et al. Proteasome sequences in eubacteria. Trends in Biochemical Sciences, v. 19, p.533-534, 1994.
- MACHADO E.R., COSTA-CRUZ J.M. *Strongyloides stercoralis* and other enteroparasites in children at Uberlândia city, state of Minas Gerais, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.93, n.2, p.161-164, 1998.
- MACHADO E.R. et al. Diagnosis of human strongyloidiasis using particulate antigen of two strains of *Strongyloides venezuelensis* in indirect immunofluorescence antibody test. Experimental Parasitology, v.99, n.1, p.52-55, 2001.
- MACHADO E.R. et al. *Strongyloides venezuelensis* alkaline extract for the diagnosis of human strongyloidiasis by enzyme-linked immunosorbent assay. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.98, n.6, p.849-851, 2003.
- MASSEY-jr H.C. et al. PCR amplification of putative *gpa-2* and *gpa-3* orthologs from the (A+T)-rich genome of *Strongyloides stercoralis*. International Journal for Parasitology, v.31, p.377-383, 2001.
- MAURIZI M.R., LI C-C.H. AAA proteins: in search of a common molecular basis. European Molecular Biology Organization Reports, v.2, n.11, p.980-985, 2001.
- MORAES R.G. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da strongiloidíase no Brasil. Revista do Serviço Especial de Saúde Pública, v.1, p.507-624, 1948.
- MYKLES D.L. Intracellular proteinases of invertebrates: calcium-dependent and proteasome / ubiquitin –dependent systems. International Review of Cytology, v. 184, p.157-289, 1998.
- NAUJOKAT C., HOFFMANN S. Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis. Laboratory Investigation, v.82, n.8, p.965-980, 2002.
- NEGRÃO-CORRÊA D. et al. Pulmonary function and parasite burden in rats infected with *Strongyloides venezuelensis* concomitant with induction of allergic airway inflammation. Infection and Immunity, v.71, n.5, p.2607-2614, 2003.
- NEVA, F.A. Biology and immunology of human strongyloidiasis. Journal of Infectious Diseases, v.153, n.3, p.397-406, 1986.

- PATEL S., LATTERICH M. The AAA team: related ATPases with diverse functions. Trends in Cell Biology, v.8, p.65-71, 1998.
- PAUGAM A. et al. Characterization and role of protozoan parasite proteasomes. Trends in Parasitology, v.19, n.2, p.55-59, 2003.
- PAULA F.M. et al. Parasitological and immunological diagnoses of strongyloidiasis in immunocompromised and non-immunocompromised children at Uberlândia, state of Minas Gerais, Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v.42, n.1, p.51-55, 2000.
- PICKART C.M. Ubiquitin in chains. Trends in Biochemical Sciences, v.25, p.544-548, 2000.
- PIRES M.L., DREYER G. Revendo a importância do *Strongyloides stercoralis*. Revista do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo, p.48, n.4, p.175-182, 1993.
- RAMACHANDRAN S. et al. Molecular differences between species of *Strongyloides* and comparison of selected isolates of *S. stercoralis* using a polymerase chain reaction-linked restriction fragment length polymorphism approach. American Journal Tropical Medicine and Hygiene, v.56, n.1, p.61-65, 1997.
- RAMACHANDRAN S. et al. Recombinant cDNA clones for immunodiagnosis of strongyloidiasis. Journal of Infectious Diseases, v.177, p.196-203, 1998.
- RAVI V. et al. Characterization of a recombinant immunodiagnostic antigen (NIE) from *Strongyloides stercoralis* L3-stage larvae. Molecular Biochemistry Parasitology, v.125, p.73-81, 2002.
- ROCK K. et al. Protein degradation and the generation of MHC class I presented peptides. Advances in Immunology, v.80, p.1-70, 2002.
- ROSSI C.L. et al. Avaliação de preparações antigênicas de *Strongyloides stercoralis* para o imunodiagnóstico da estrogiloidíase. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.26, n.2, p.83-87, 1993.
- RURPP A. et al. Proteasome function is dispensable under normal but not under heat shock conditions in *Thermoplasma acidophilum*. Federation of European Biochemical Societies

- Letters, v. 425, p. 87-90, 1998.
- SAEKI Y. et al. Ubiquitin-like proteins and Rpn10 play cooperative roles in ubiquitin-dependent proteolysis. Biochemical and Biophysical Research Communications, v.293, p.986-992, 2002.
- SATO Y. et al. Immunoblot analysis of antibodies in human strongyloidiasis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v.84, p.403-406, 1990.
- SATO Y. et al. Serodiagnosis of strongyloidiasis. The application and significance. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v.37, n.1, p.35-41, 1995.
- SCHAFFEL R. et al. The value of an immunoenzymatic test (Enzyme-linked immunosorbent assay) for the diagnosis of strongyloidiasis in patients immunosuppressed by hematologic malignancies. American Journal Tropical Medicine Hygiene, v.65, n.4, p.346-350, 2001.
- SHAW M.K. et al. Proteasome inhibitors block intracellular growth and replication of *Toxoplasma gondii*. Parasitology, v.121, p.35-47, 2000.
- SIDDIQUI A.A. et al. *Strongyloides stercoralis*: identification of antigens in natural human infections from endemic areas of the United States. Parasitology Research, v.83, p.655-658, 1997.
- SIDDIQUI A.A. et al. A cDNA encoding the highly immunodominant antigen of *Strongyloides stercoralis*: γ -subunit of isocitrate dehydrogenase (NAD⁺). Parasitology Research, v.86, p.279-283, 2000.
- SIDDIQUI A.A. et al. Isolation of cDNA encoding an IgG immunoreactive antigen (zinc finger protein) of *Strongyloides stercoralis*. Parasite, v.8, p.163-167, 2001.
- SIDDIQUI A.A., BERK S.L. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. Clinical Infectious Diseases, v.33, p.1040-1047, 2001.
- SILVA L.P. et al. Western blotting using *Strongyloides ratti* antigen for the detection of IgG antibodies as confirmatory test in human strongyloidiasis. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.98, n.5, p.687-91, 2003.
- SILVEIRA M.R. et al. Infection with *Strongyloides venezuelensis* induces transient airway

- eosinophilic inflammation, an increase in immunoglobulin E, and hyperresponsiveness in rats. Infection and Immunity, v.70, n.11, p.6263-6272, 2002.
- STANKIEWICZ M., HADÁS E. Immunomodulation of lambs following treatment with a proteasome preparation from infective larvae of *Trichostrongylus colubriformis*. Parasitology Research, v.86, p.422-426, 2000.
- TSUJI N. et al. Protein analysis of *Strongyloides venezuelensis* by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Journal Veterinary Medicine Science, v.55, n.5, p.881-3, 1993.
- TSUJI N. et al. Expression of a 70-kDa heat-shock-related protein during transformation from free-living infective larvae to the parasitic stage in *Strongyloides venezuelensis*. Parasitology Research, v.83, p.99-102, 1997.
- TSUJI N., FUJISAKI K. Development in vitro of free-living infective larvae to the parasitic stage of *Strongyloides venezuelensis* by temperature shift. Parasitology, v.109, p.643-648, 1994.
- VALE R.D. AAA proteins: lords of the ring. Journal of Cell Biology, v.150, n.1, p.13-19, 2000.
- VOGES D. et al. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. Annals Review of Biochemistry, v.68, p.1015-1068, 1999.
- WILKINSON K.D. Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes. FASEB Journal, v.11, n.13, p.1245-1256, 1997.
- WOLLENBERG K., SWAFFIELD J.C. Evolution of proteasomal ATPases. Molecular Biological Evolution, v.18, n.6, p.962-974, 2001.