

## CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS SUBUNIDADES ALFA2 E ALFA5 DO COMPLEXO PROTEOLÍTICO PROTEASSOMA 20S DE *Biomphalaria glabrata*

**Renato Graciano de Paula, Leonardo Alvarez Junger, Henrique Oliveira Frank, Janiele Marinato, Rafaela Guerra Neves, Fabiano Costa Santiliano, Mariana Drummond Costa Ignacchiti, Olavo dos Santos Pereira Júnior**

Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias, UFES. Alto Universitário s/nº Alegre, ES – 29.500-000, olavouspjr@uol.com.br

**Resumo-** Apesar de todos os avanços no conhecimento da biologia dos hospedeiros intermediários para o parasito *Schistosoma mansoni*, muitos aspectos da interação parasito-hospedeiro ainda estão por ser elucidados. O complexo proteolítico proteassoma 26S apresenta diversas funções em processos biológicos e a sua caracterização molecular pode contribuir para o entendimento dessa interação. Assim, esse trabalho teve como objetivo, avaliar a expressão das subunidades Bgalfa2 e Bgalfa5 deste complexo proteico bem como sua homologia com sequências ortólogas. Análises de bioinformática permitiram a identificação de 56 sequências homólogas a BgAlfa2 e 58 homólogas a BgAlfa5, destacando-se uma similaridade variável entre as sequências. A análise de expressão permitiu a amplificação de transcritos de aproximadamente 400 para as duas sequências. Esses tamanhos estão de acordo com o esperado, uma vez que os oligonucleotídeos iniciadores idealizados direcionam a amplificação para produtos com esses pesos moleculares. A análise de expressão revelou a presença de apenas um transcrito para cada uma das subunidades.

**Palavras-chave:** *Biomphalaria glabrata*; proteassoma 20S; esquistossomose.

**Área do Conhecimento:** Ciências Biológicas

### Introdução

Os moluscos hospedeiros intermediários do parasito *S. mansoni* pertencem à Classe Gastropoda, Suclasse Pulmonata, Ordem Basommatophora, Família Planorbidae (CARVALHO et al., 2005). No Brasil, dez espécies e uma subespécie de *Biomphalaria* podem ser encontradas, sendo algumas vastamente distribuídas e outras limitadas a regiões específicas (CALDEIRA et al., 2009). De acordo com Paraense (1973), duas espécies, *Biomphalaria amazonica* e *Biomphalaria peregrina*, podem ser experimentalmente infectadas com larvas de *S. mansoni*. Em contrapartida, somente *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* podem ser encontradas naturalmente infectadas (TELES, 2005).

Em células eucarióticas, o turnover de proteínas intracelulares é mediado principalmente pelo sistema ubiquitina-proteassoma (GOLDBERG et al., 1997). Após ubiquitinação, as proteínas são desdobradas e degradadas pelo proteassoma 26S, um grande complexo proteico de múltiplas subunidades localizado nos compartimentos citosólico e nuclear (GUERRA-SÁ et al., 2005). Esta via proteolítica controla uma ampla gama de funções celulares, incluindo a progressão do ciclo celular, transcrição de genes estágio-específicos,

processamento de antígenos, regulação da secreção de proteínas de forma compartimentada e controle de qualidade da proteína (GLICKMAN; RAVEH, 2005).

O desenvolvimento de *S. mansoni* no hospedeiro vertebrado requer várias alterações coordenadas de sua morfologia corpórea, existindo evidências de que durante a esquistossomose experimental, inibidores de proteassoma foram capazes de reduzir o número de esquistossômulos na fase pulmonar, reduzir a carga parasitária e, conseqüentemente, diminuir a produção de ovos em camundongos infectados (GUERRA-SÁ et al., 2005). O conhecimento biológico e molecular do hospedeiro intermediário pode contribuir para o entendimento de muitos aspectos da relação parasito-hospedeiro. Sendo assim, a caracterização molecular deste importante complexo proteico pode contribuir para o entendimento de aspectos importantes dessa interação.

### Metodologia

#### Análises de Bioinformática

Foram realizadas análises *in silico* através da base de dados de EST (*Expressed Sequence Tags*) do NCBI (*National Center for Biotechnology*

Information) disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> com o objetivo de encontrar sequências homólogas à sequências já depositadas neste banco de dados e que codificam para as subunidades *BgAlfa2* e *BgAlfa5* do complexo proteolítico proteassoma 20S de *Biomphalaria glabrata*. As sequências codificantes para as subunidades *BgAlfa2* (469pb) e *BgAlfa5* (706pb) encontram-se depositadas nesta mesma base de dados com os números de acesso, 47550324 e 158073759, respectivamente.

Após a localização destas sequências a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, foi utilizada para realizar o estudo de homologia com outras sequências, empregando como base a sequência predita de aminoácidos. Em seguida realizou-se a tabulação das sequências identificadas como homólogas levando em consideração os seguintes critérios: valor-E, porcentagem de identidade, porcentagem de positividade, porcentagem de cobertura, tamanho da sequência e organismo pertencente.

As sequências foram então alinhadas através do programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/>) e as análises moleculares e filogenéticas foram realizadas utilizando o programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) versão 4 ([www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net)), no qual árvores filogenéticas foram confeccionadas, com o auxílio do Método de Máxima Parcimônia (MP) para inferências evolutivas acerca das subunidades protéicas *BgAlfa2* e *BgAlfa5*.

### Extração de RNA total

Para extração de RNA total foram utilizados caramujos do gênero *Biomphalaria* sp. coletados no município de Guaçuí na região Sul do estado do Espírito Santo. Foram utilizadas 100mg de hepatopâncreas de caramujos homogeneizadas através do método do TRIZOLRLS, de acordo com o boletim técnico do fabricante (INVITROGEN).

O material previamente congelado foi transferido para um gral de porcelana e macerado na presença de nitrogênio líquido até a formação de um pó bem fino. Este pó foi então transferido para tubos de microcentrífuga (1,5 mL) contendo 500 µl de TRIZOL, sendo as amostras em seguida homogeneizadas por 15 segundos em Politrón e incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente.

Em seguida adicionou-se 200 µl de clorofórmio. As amostras foram homogeneizadas em vórtex e incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos, seguido por um passo de centrifugação à 10000rpm/4°C por 10 minutos. Logo após, a fase aquosa foi transferida para outro tubo de microcentrífuga, acrescido de 250 µl

de isopropanol. A mistura foi invertida cuidadosamente por três vezes, permanecendo em gelo por 15 minutos.

Em seguida, o material foi centrifugado por 10 minutos a 10000 g/4°C. O sobrenadante foi desprezado e o RNA lavado com 1 mL de etanol 70% para a precipitação, a mistura foi centrifugada a 10000 g/4°C. Por fim, o RNA foi ressuspenso em 20µl de H<sub>2</sub>O DEPC e armazenado a -30°C, até o momento do uso.

### RT-PCR

Para confecção do DNA complementar (cDNA) através de reações de RT-PCR, foi utilizado um iniciador OligoDT (20 nt) com auxílio do KIT RevertAid™ H-Minus - 1ST, de acordo com o boletim técnico do fabricante (FERMENTAS). Para um volume final de 20 µL, as reações de RT-PCR continham: 1 µL de *primer* oligoDT (0,5 µg/µl), 1µl de RNA total, 4µl de tampão de reação (5X), 1µl de inibidor de ribonuclease (20 u/µl), 2 µl de DNTP mix (10 mM), 1 µl de transcriptase reversa (200 u/µl) e 10 µl de H<sub>2</sub>O DEPEC. Para síntese da primeira fita de cDNA foram seguidos os seguintes passos de PCR: 70°C/5 minutos, 37°C/5 minutos, 42°C/1hora e 70°C/10 minutos. Após a síntese, as amostras foram guardadas a -30°C.

### PCR e análise de expressão das subunidades *BgAlfa2* e *BgAlfa5*

As reações de amplificação para um volume final de 50 µL, contendo: 2 µL de cDNA, 20pmols dos oligonucleotídeos iniciadores *BgAlfa2F* 5'-GCCTCACAATACTTTCTAAC'-3, *BgAlfa2R* 5'-CTGAGGGTGAAAGACGAC'-3, *BgAlfa5F* 5'-TAACTTCTTGTAATGCCTG-3' e *BgAlfa5R* 5'-AGGTCGTCTGTTTCAAGTAG-3', 1,5 mmols de MgCl<sub>2</sub>, 10 mmols de DNTPs, tampão de reação 10X, foram realizadas, conforme descrito abaixo: 40 ciclos de amplificação, composto de 94°C/1minuto, 52°C/1minuto, 72°C/1minuto. O resultado foi avaliado em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo (0,5 mg/mL). Como controle negativo foi utilizada a proteína ribossomal S19 (S19R 5'-ACGCCCTTGTGGTGTGATC-3' e S19F 5'-TGCTCGCCACTTGTACATTC-3').

### Resultados

Após pesquisa por sequências homólogas às subunidades *BgAlfa2* e *BgAlfa5* pertencentes ao complexo proteolítico proteassoma 20S de *B. glabrata*, foi possível identificar 56 sequências

homólogas à *BgAlfa2* e 58 homólogas à *BgAlfa5*. Para cada uma das 114 seqüências, valores de porcentagem de identidade (% ID.), porcentagem de positividade (% Pos.) e porcentagem de cobertura (% Cob.), foram analisados. Nota-se um variável grau de similaridade entre as seqüências, sendo algumas mais conservadas do que outras (Tabela 1).

<i>BgAlfa2</i>			<i>BgAlfa5</i>		
Mínimo			Mínimo		
% ID.	% Pos.	% Cob.	% ID.	% Pos.	% Cob.
59	77	57,41	64	79	63,04
Máximo			Máximo		
% ID.	% Pos.	% Cob.	% ID.	% Pos.	% Cob.
84	92	97,35	84	93	83,33

\*% ID.: Porcentagem de identidade; \*% Pos.: Porcentagem de positividade; \*% Cob.: porcentagem de cobertura.

Para confecção das árvores filogenéticas foram selecionadas 17 seqüências homólogas para *BgAlfa2* e 17 seqüências homólogas para *BgAlfa5* (Figuras 1 e 2).

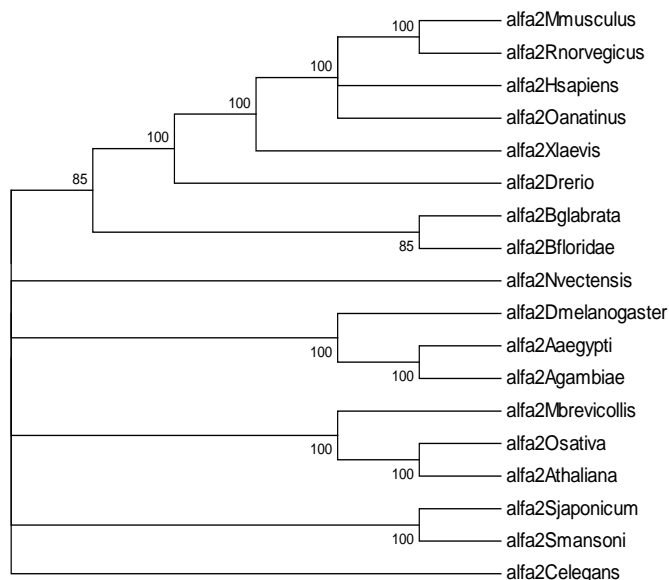


Figura 1. Relações evolutivas de 18 táxons referentes à subunidade *BgAlfa2*.

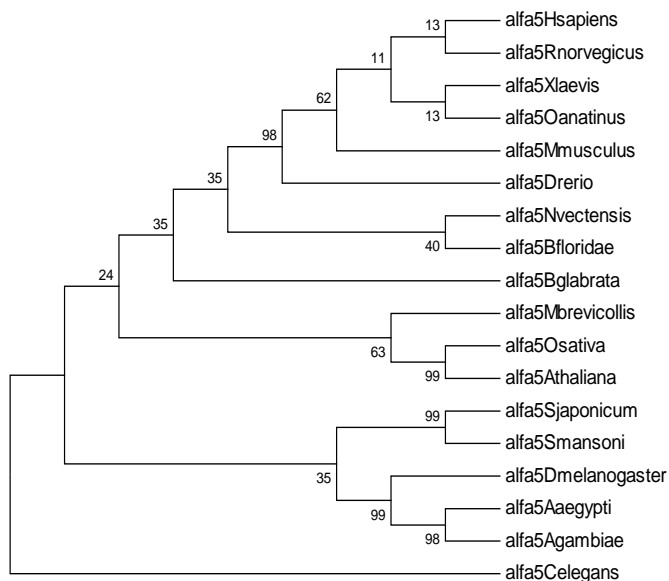


Figura 2. Relações evolutivas de 18 táxons referentes à subunidade *BgAlfa5*

A análise de expressão permitiu a amplificação de dois transcritos referentes as subunidades Alfa2 e Alfa5 de *B. glabrata* (Figura 3).

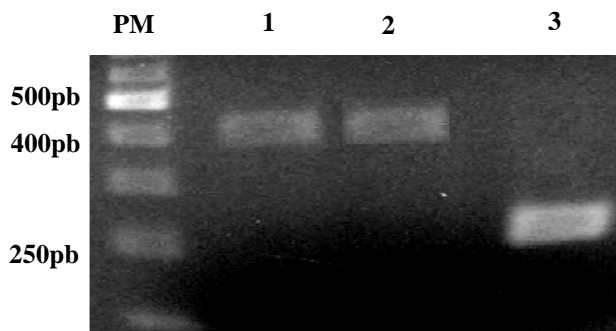


Figura 3. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo (0,5 mg/mL). Análise da expressão do transcrito codificando para a subunidade *BgAlfa2*(1) e *BgAlfa5* (2). Controle interno (proteína ribossômica S19). (PM) Peso molecular (100pb) (3)

### Discussão

Através do método de máxima parcimônia foi possível inferir a história evolutiva dos organismos, sendo a árvore de consenso *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) inferida a partir de 1000 repetições tomada para representar a evolução dos táxons analisados. Segundo Hall (2004), o método de máxima parcimônia é o mais preciso para construção de árvores filogenéticas a partir de seqüências de aminoácidos, visto que utiliza o modelo de mínima evolução (NAKHLEH et al., 2005), considerando para análise somente os

sítios altamente conservados entre os organismos, eliminando assim, possíveis redundâncias pelo fato de o código genético ser degenerado. Para esta análise foi utilizado o algoritmo Busca Exaustiva (Max-mini Branch-&-bound), em que todas as possibilidades de topologias são verificadas, sendo escolhida a mais representativa para explicar a relação evolutiva entre os organismos (FERNANDES-MATIOLI, 2001).

Assim, podemos demonstrar o grau de similaridade entre as sequências *BgAlfa2* e *BgAlfa5* pertencentes a organismos relacionados, como evidenciados pelo agrupamento demonstrado na topologia das árvores, a qual reúne estes organismos num mesmo *cluster*.

A análise de expressão permitiu a amplificação de dois transcritos referentes as subunidades Alfa2 e Alfa5 de *B. glabrata*. Esse tamanho está de acordo com o esperado (400pb), uma vez que os oligonucleotídeos iniciadores idealizados direcionam a amplificação para produtos com esse peso molecular, para os dois transcritos.

### Conclusão

Ferramentas de bioinformática foram eficazes na realização de estudos de homologia entre sequências codificantes para as subunidades *BgAlfa2* e *BgAlfa5* pertencentes ao complexo proteico proteossoma 20S de *Biomphalaria glabrata*, demonstrando ser uma ferramenta muito útil para o caracterização destes organismos.

As análises evolutivas permitiram uma melhor compreensão acerca da conservação entre diferentes sequências *BgAlfa2* e *BgAlfa5* pertencentes diferentes organismos ao longo da escala evolutiva.

Existe um alto grau de similaridade entre as sequências analisadas, sendo estas muito conservadas dentre todos os organismos analisados. Esse fato sugere que estas subunidades, desempenham funções essenciais para o desenvolvimento e sobrevivência destes organismos.

A análise de expressão permitiu a identificação de apenas um transcrito para a subunidade *BgAlfa2* e *BgAlfa5* pertencente à *B. glabrata*.

### Referências

CALDEIRA, R. L.; JANNOTTI-PASSOS, L. K.; CARVALHO, O. S. Molecular epidemiology of Brazilian *Biomphalaria*: A review of the identification of species and the detection of infected snails. **Acta Tropica**, Basel, v. 111, p. 1-6. 2009.

CARVALHO, O. S.; JANNOTTI-PASSOS, L. K.; MENDONÇA, C. L. F. G.; CARDOSO, P. C. M.; CALDEIRA, R. L. **Moluscos de importância médica no Brasil**. Série Esquistossomose nº. 7. Belo Horizonte, Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz, 2005. 52p.

FELSENSTEIN, J. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. **Evolution**, v. 39, n. 4, p. 783-791, Jul., 1985.

FERNANDES-MATIOLI, F. M. C. Noções de filogenética molecular. **Biológico**. São Paulo, v. 63, n. 1/2, p. 37-38, 2001.

GLICKMAN, M. H.; RAVEH, D. Proteasome plasticity. **FEBS Letters**, v. 579, p. 3214-3223, 2005.

GOLDBERG, A. L., AKOPIAN, T. N., KISSELEV, A. F., LEE, D. H., ROHRWILD, M. New insights into the mechanisms and importance of the proteasome in intracellular protein degradation. **Biological Chemistry**, v. 378, p. 131-140, 1997.

GUERRA-SÁ, R.; CASTRO-BORGES, W.; EVANGELISTA, E. A. B.; KETTELHUT, I. C.; RODRIGUES, V. *Schistosoma mansoni*: Functional proteasomes are required for development in the vertebrate host. **Experimental Parasitology**, v. 109, n. 4, p. 228-236, 2005.

TELES, H. M. S. Distribuição geográfica das espécies dos caramujos transmissores de *Schistosoma mansoni* no Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 38, n. 5, p. 426-432, set./out., 2005.