



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

CAMILA SIQUEIRA SILVA

**Identificação e Caracterização da Expressão Gênica das
Proteínas Rad23 e Rad4, da Via de Reparo por Excisão
de Nucleotídeos, Durante o Ciclo Evolutivo de
*Schistosoma mansoni***

Uberlândia - MG
2006



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

CAMILA SIQUEIRA SILVA

**Identificação e Caracterização da Expressão Gênica das
Proteínas Rad23 e Rad4, da Via de Reparo por Excisão
de Nucleotídeos, Durante o Ciclo Evolutivo de
*Schistosoma mansoni***

Dissertação apresentada ao colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Prof.^a. Dr.^a. Julia Maria Costa-Cruz

Orientadora

Prof. Dr. Vanderlei Rodrigues

Co-Orientador

Uberlândia - MG
2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de
Catalogação e Classificação

S586i Silva, Camila Siqueira, 1979-
Identificação e caracterização da expressão gênica das proteínas Rad 23 e Rad4, da via de reparo por excisão de nucleotídeos, durante o ciclo evolutivo de *Schistosoma mansoni* / Camila Siqueira Silva. - Uberlândia, 2006.
83f. : il.
Orientador: Julia Maria Costa-Cruz.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.
1. Parasitologia - Teses. 2. *Schistosoma mansoni* - Teses. I. Costa-Cruz, Julia Maria. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU:576.8

Trabalho realizado no laboratório de Biologia Molecular de Parasitas, Departamento de Bioquímica e Imunologia, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, sob orientação do Prof. Dr. Vanderlei Rodrigues e da Prof^a Dr^a Julia Maria Costa-Cruz, e apoio financeiro da Fundação de Coordenação e Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), e da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

“..... É incrível a força que as coisas parecem ter quando elas precisam acontecer.....”

Em primeiro lugar e, sobretudo, dedico este trabalho à Deus, que me direcionou, me sustentou, e me proporcionou todas as oportunidades de crescimento e amadurecimento, colocando em meu caminho todas essas pessoas importantes nas minhas vitórias.

Aos meus amados, papai e mamãe, por todo amor, dedicação, sacrifícios, para que eu pudesse encontrar o caminho certo e chegar até aqui, e por constituírem verdadeiros instrumentos de Deus na minha vida.

Aos meus irmãos e cunhados, por estarem sempre presentes de forma tão especial em minha vida.

Às minhas queridas avós e madrinha Oneida, pelo apoio, por suas orações, e por fazerem parte tão importante e fundamental de minha existência.

À minha querida sogrinha, pelo incentivo, por suas orações, e por me tratar como filha.

Kleber,

Foram tantos os momentos de sufoco e dificuldade, e você esteve do meu lado em todos eles, me dando força, coragem, amor.

Meu amor, obrigada pela sua amizade, companheirismo, cumplicidade, respeito e compreensão. Sem dúvida foi Deus que te colocou na minha vida. Seu apoio e incentivo tiveram uma participação fundamental nas minhas conquistas e crescimento.

Agradecimentos

Dr^a. Julia Maria Costa-Cruz

À minha querida orientadora, pela confiança depositada em mim, pelas palavras animadoras que sempre me motivaram e não me deixaram desistir mesmo nos momentos mais difíceis, pelo exemplo de profissionalismo a ser seguido, pela amizade, carinho e dedicação.

Dr. Vanderlei Rodrigues

Ao meu querido co-orientador, por ter aberto portas de uma nova área de pesquisa para que pudesse conhecer e aprender a gostar, pela oportunidade de crescimento que me propiciou, por ser esta pessoa tão simples, serena e amiga a quem tanto respeito.

Dr. Olavo dos Santos Pereira Júnior

O que dizer de você? Professor que me ensinou tanto, sempre tão paciente, amigo, GUERREIRO e dedicado. Nem sei como te agradecer.

Amigos e Companheiros de Bancada do Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas – USP Ribeirão Preto

Elenice, Mara, Érika, Carla, Fernanda, Patrícia, Sérgio, Camila, Andressa, Lizandra, Cláudia.

Amigos e Companheiros dos Laboratórios de Imunologia e Parasitologia - UFU

Maria das Graças, Júnior, Maria do Rosário, Rosângela, Gleyce, Heliana, Solange, Ana Lúcia, Mariana.

Aos Amigos da Pós-Graduação

Pelos momentos de muita luta mas também de alegria que passamos juntos. Vou sentir saudades!

À Minha Grande Amiga Cinara

Não fosse pelo seu incentivo, eu não teria chegado até aqui.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS	III
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. <i>Schistosoma mansoni</i>	2
1.2. <i>Schistosoma mansoni</i> na Era Genômica.....	5
1.3. Via de Reparo por Excisão de Nucleotídeos	7
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. Objetivo Geral	16
2.2. Objetivos Específicos	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Obtenção dos Estágios Evolutivos de <i>Schistosoma mansoni</i>	18
3.1.1. Manutenção do Ciclo de Vida do Parasito no Laboratório	18
3.1.2. Obtenção de Vermes Adultos	19
3.1.3. Obtenção de Cercárias	19
3.1.4. Obtenção de Ovos.....	19
3.1.5. Obtenção de Esporocistos.....	20
3.1.6. Obtenção de Esquistossômulos	21
3.2. Tratamento <i>in vitro</i> de Vermes Adultos com Agentes que Danificam o DNA... 22	
3.3. Ensaio do Cometa.....	23
3.4. Extração de RNA Total	24
3.5. Idealização dos Oligonucleotídeos Iniciadores	26
3.6. Transcrição Reversa a partir do RNA Total (RT-PCR)	26
3.7. Amplificação dos cDNAs, Utilizando Oligoiniciadores Específicos para SmRad23 e SmRad4.....	28

3.8.	Análise Densitométrica – PCR Semiquantitativo.....	29
3.9.	Purificação dos Fragmentos Obtidos por Amplificação do cDNA	29
3.10.	Clonagem em Vetor de Sequenciamento.....	30
3.11.	Preparo de Bactérias Competentes	30
3.12.	Transformação Bacteriana.....	31
3.13.	Obtenção do DNA Plasmidial	31
3.14.	Sequenciamento da Amostras Obtidas	33
3.15.	Análise de Bioinformática.....	34
3.16.	Análise Estatística	35
4.	RESULTADOS	36
4.1.	Validação dos Oligoiniciadores.....	37
4.2.	Análise por RT-PCR da Expressão Gênica de SmRad23 e SmRad4 nos Diferentes Estágios Evolutivos do Ciclo de Vida de <i>S. mansoni</i>	37
4.3.	Alinhamento das Sequências Preditas de Aminoácidos com seus Ortólogos	41
4.4.	Grau de Identidade e Similaridade de SmRad23 e SmRad4 de <i>S. mansoni</i> com seus Ortólogos	48
4.5.	Ensaio do Cometa.....	49
4.6.	RT-PCR Semiquantitativo de SmRad23 e SmRad4 em Vermes Adultos de <i>S.</i> <i>mansoni</i>	51
5.	DISCUSSÃO.....	53
6.	CONCLUSÕES.....	62
7.	RESUMO	64
8.	SUMMARY	66
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*	68

ABREVIATURAS

CP	Complexo Proteolítico
CPDs	Cyclobutane Pyrimidine Dimmers
CTAB	Brometo de Hexadeciltrimetilamônio
DDB	Damaged-DNA Binding
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DnD	Tampão Denaturante (DMSO/DTT)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ERAD	Endoplasmic Reticulum – Associated Protein Degradation
ERCC1	Excision Repair Cross-Complementing 1
ESTs	Expressed Sequence Tags
GGR	Global Genomic Repair
GST	Glutathione S Transferase
HEPS	[N-(2 Hidroietil)piperazina-N-(2-Etano Ácido Sulfônico)]
hHR23	Homólogo humano de Rad23
Kb	Kilobase
KDa	Kilo Daltons = 1000 Daltons
LB	Luria-Bertani
LS	Lauril Sarcosina
MMS	Methylmethanesulphonate
NEF	Nucleotide Excision Repair Factor
NER	Nucleotide Excision Repair
ONSA	Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis
ORESTES	Open Reading Frame Expression Sequence Tag
ORF	Open Read Frame
pb	Pares de Bases
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
Pngl	Peptide N-glycanase (Deglycosylating enzyme)
POL	Polymerase
Rad	Radiation (grupo epistático de genes em leveduras)
RB4	Rad4 Binding
RFC	Replication Factor C

RP	Regulatory Particle
RPA	Replication Protein A
Rpn	Regulatory Particle Non-ATPase
Rpt	Regulatory Particle Triple A protein
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
SFB	Soro Fetal Bovino
Sm	<i>Schistosoma mansoni</i>
STET	Solução de Sacarose/Triton X/EDTA/Tris-HCl
TCR	Transcription-Coupled Repair
TE	Tampão de Eluição
TFB	Transformation Buffer
TFIIH	Transcription Factor II H
TMA	Tetramethylammonium
Tris	Tris[hidroximetil]aminometano
UBA	Ubiquitin Associated
UBL	Ubiquitin Like
UV	Ultravioleta
XGal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Beta-D-Galactopyranoside
XP	Xeroderma Pigmentoso
XPA-XPG	Xeroderma Pigmentoso do Grupo de Complementação A a G

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Schistosoma mansoni*

O gênero *Schistosoma* pertence ao reino Animalia, sub-reino Metazoa, filo Platyhelminthes, classe Trematoda, subclasse Digenea, família Schistosomatidae. As espécies de importância epidemiológica em medicina humana são: *Schistosoma haematobium* (Bilharz, 1852), *Schistosoma japonicum* (Katsurada, 1904), *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907), *Schistosoma intercalatum* (Fischer, 1934), e *Schistosoma mekongi* (Voge, Brickner & Bruce, 1978), sendo as três primeiras as que melhor se adaptaram ao parasitismo humano (BRINDLEY, 2005; MELO & COELHO, 2005).

S. japonicum, *S. mansoni*, *S. intercalatum* e *S. mekongi* causam manifestações intestinais com comprometimento hepático e conseqüente hipertensão portal. Enquanto *S. haematobium* acomete o trato urinário, ocasionando obstrução vesical, infecções bacterianas e câncer vesical (BLANCHARD, 2004).

A esquistossomose apresenta ampla distribuição geográfica, consistindo em uma das parasitoses humanas mais difundidas pelo mundo e a segunda doença tropical mais importante, após a malária. Além disso, esta helmintíase é endêmica em 76 países, ocorrendo na África, Leste do Mediterrâneo, América do Sul, Caribe, Filipinas e Sudeste Asiático. Estima-se que aproximadamente 200 milhões de indivíduos no mundo estejam infectados e 600 milhões expostos ao risco de infecção (ENGELS et al., 2002). O parasito *S. mansoni* é a única espécie presente no continente americano e, portanto, no Brasil (KATZ, 2003; COURA & AMARAL, 2004; MELO & COELHO, 2005).

O helminto *S. mansoni*, causador da Esquistossomose Mansônica, popularmente conhecida como "Barriga d'água", "Xistose" ou "Mal do Caramujo", encontrou no Brasil condições favoráveis à sua transmissão, constituindo atualmente, um importante problema de saúde pública, especialmente nas regiões nordeste e sudeste do país (KATZ, 2003; MELO & COELHO, 2005).

Na América do Sul, o Brasil representa a área endêmica mais importante, sendo estimado em 6 a 7 milhões o número de casos (MASSARA et al, 2004). Acredita-se que a introdução desta helmintíase no território brasileiro tenha ocorrido durante tráfico de escravos originários da África, tendo início, portanto, em Recife e Salvador (ARAÚJO, 1986; PARAENSE, 1986; COURA & AMARAL, 2004). A migração de nordestinos provenientes de áreas endêmicas contribuiu para a disseminação desta parasitose em áreas até então indenes, onde as precárias condições sanitárias favoreceram o contato de fezes de indivíduos infectados com hospedeiros intermediários susceptíveis (ARAÚJO, 1986; PARAENSE, 1986; AMARAL & PORTO, 1994).

No Brasil, a transmissão ocorre em uma ampla área endêmica desde o estado do Maranhão até o Espírito Santo e Minas Gerais, havendo focos isolados no Distrito Federal e nos estados do Pará, Piauí, Goiás, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, e Rio Grande do Sul (COURA & AMARAL, 2004).

No complexo ciclo de vida de *S. mansoni*, o homem atua como hospedeiro definitivo e moluscos do gênero *Biomphalaria* cumprem o papel de hospedeiros intermediários, constituindo, pois, um ciclo heteroxênico (**Figura 1**). No Brasil, os hospedeiros intermediários de maior interesse são: *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea*. Das espécies de maior importância epidemiológica, *B. glabrata* é a que se destaca (COURA & AMARAL, 2004; MELO & COELHO, 2005). Com isso, o estudo destes hospedeiros constitui um importante instrumento epidemiológico quando se tem como meta o controle da transmissão da doença.

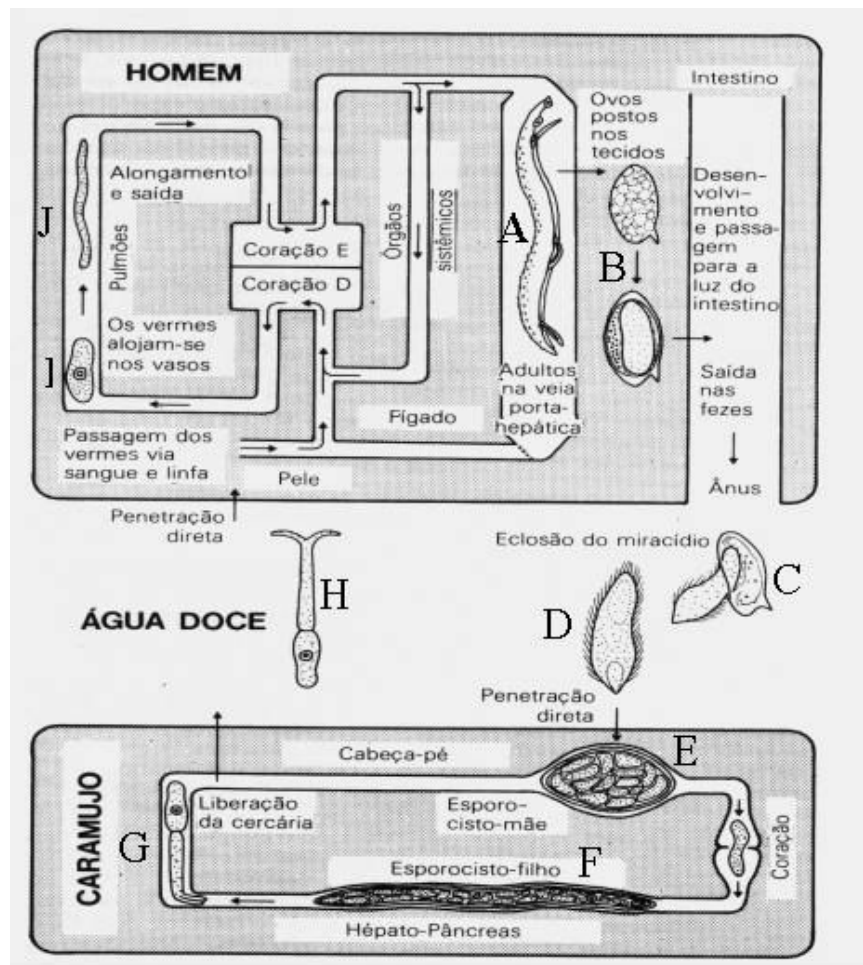


Figura 1. Ciclo de vida do parasito *Schistosoma mansoni*. Durante o desenvolvimento, o parasito sofre profundas modificações morfológicas e bioquímicas, passando por estágios aquáticos e no interior de seus hospedeiros invertebrados e vertebrados. **A.** vermes adultos, **B.** ovos, **C.** eclosão dos ovos, **D.** miracídeo, **E.** esporocisto mãe, **F.** esporocisto filho, **G.** cercária (liberação), **H.** cercária, **I.** esquistossômulo, **J.** esquistossômulo (cinco-sete dias) (Adaptado) (Wilson, 1980).

Os ovos são eliminados com as fezes humanas para o meio externo, onde eclodem e liberam os miracídeos, que nadam e penetram no hospedeiro intermediário, o caramujo, onde o miracídeo origina esporocistos de primeiro e segundo estágios e em seguida, estes últimos produzem cercárias. As cercárias infectantes deixam o caramujo, nadam e penetram ativamente na pele do hospedeiro humano, perdendo sua cauda bifurcada e dando origem ao esquistossômulo. Os esquistossômulos penetram vasos periféricos e são

levados passivamente pela corrente sanguínea ao coração e pulmões. Ao atingirem a grande circulação, se disseminam pelo organismo, e aqueles que alcançam o sistema porta-hepático, amadurecem e se diferenciam em vermes adultos, macho e fêmea. Durante acasalamento, os vermes adultos migram para os vasos mesentéricos, onde a fêmea faz a oviposição, liberando ovos imaturos nas vênulas mesentéricas. Alguns ovos permanecem na circulação, podendo atingir órgãos, como os pulmões, medula óssea, rim, baço, coração, e especialmente o fígado. Os demais se movem progressivamente até atingir o lúmen intestinal, sendo eliminados junto às fezes (WILSON, 1980).

Dentre os componentes de maior patogenicidade na esquistossomose, destacam-se os ovos, depositados em grandes quantidades nos capilares da submucosa do intestino ou presentes na circulação sanguínea (KATZ, 2003). Os ovos liberam antígenos solúveis, e por isso ao se fixarem em tecidos, como o fígado e intestino, desencadeiam uma reação inflamatória granulomatosa ao seu redor, podendo resultar em fibrose, hipertensão portal, varizes esofagianas ou retais, hemorragia e óbito. A fase inicial da formação do granuloma é caracterizada por uma grande migração de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos em torno da região de necrose causada pelo ovo. Com tempo esta área de necrose desaparece, havendo produção de colágeno e fibrosamento (COSTA-CRUZ et al., 1994; MELO & COELHO, 2005).

1.2. *Schistosoma mansoni* na Era Genômica

O parasito possui um genoma de aproximadamente $2,7 \times 10^8$ pb, contendo 34% de GC (SIMPSON et al., 1982; ELLIS & MORRINSON, 1995). Cerca de 40% do genoma é formado por seqüências repetitivas, sendo 4 a 8% altamente repetitivas e 30 a 35% moderadamente repetitivas. O restante, aproximadamente 60%, é caracterizado por cópias simples (CAPRON et al., 1992). Encontra-se bem documentado na literatura, a presença de

genes contendo introns com tamanhos variáveis de 28pb (DUVAUX-MIRET et al., 1991; ROCHE et al., 1994) a 3Kb, como é o caso da glutathione peroxidase e da glutathione S-transferase 28KDa (Sm28GST) (McNAIR et al., 1993; ROCHE et al., 1994).

A informação genética de *S. mansoni* está contida em oito pares de cromossomos, sete autossômicos e um par de cromossomos sexuais – macho homogamético ZZ e a fêmea heterogamética ZW (SHORT, 1989). Apesar do sexo deste parasito ser determinado pelos cromossomos, o completo desenvolvimento da fêmea sua maturação sexual e ovoposição são dependentes do contínuo pareamento com o verme macho (KUNS, 2001).

Foi publicado na revista “Nature Genetics”, o transcriptoma (banco de fragmentos de seqüências expressas mRNAs transcritos do genoma) de *S. japonicum* pelo grupo chinês (HU et al., 2003) e de *S. mansoni*, por uma equipe de pesquisadores brasileiros, da qual o Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas da USP-Ribeirão Preto, liderado pelo professor Dr. Vanderlei Rodrigues, fez parte (VERJOVSKI-ALMEIDA et al., 2003).

O projeto Brasileiro se beneficiou de um consórcio de seqüenciamento de nucleotídeos e análise (Rede ONSA) preexistente, composto por grupos envolvidos em vários projetos genoma (CAMARGO et al., 2001; BRENTANI et al., 2003). O grupo Chinês realizou o seqüenciamento de bibliotecas de DNA complementar - oligodT (cDNA) dos estágios de vermes adultos e ovos, do parasita *S. japonicum* (HU et al., 2003). O grupo Brasileiro utilizou o método de ORESTES, estabelecido dentro da rede ONSA (DIAS-NETO et al., 2000), para gerar a grande maioria das seqüências expressas (Expressed-Sequence Tags - ESTs) e analisadas. O método de ORESTES utilizou pequena quantidade de RNA mensageiro (mRNA), 15 a 40ng, para a construção de mini-bibliotecas, que permitiram a análise de diferentes estágios do ciclo evolutivo do parasita *S. mansoni*: vermes adultos machos e fêmeas, ovos, miracídeo, esporocisto, cercária e esquistossômulo de pulmão (VERJOVSKI-ALMEIDA et al., 2003). Este método é baseado em duas

reações consecutivas, a transcrição reversa do RNAm e a reação em cadeia da polimerase – PCR, realizadas com um conjunto de oligonucleotídeos iniciadores arbitrários, em baixa estringência, resultando, de uma forma estatisticamente determinada, a preferência pela amplificação de porções centrais dos genes (DIAS-NETO et al., 2000).

Com relação ao *S. mansoni*, foram obtidas aproximadamente 125.000 ESTs (Expressed-Sequence Tags) derivadas de seis diferentes estágios evolutivos. A partir de então, o transcriptoma deste helminto se tornou uma ferramenta valiosa em vários projetos, permitindo a identificação de uma série de genes com potencial para o desenvolvimento de drogas e vacinas, com o intuito de se estabelecer uma estratégia mais eficaz no controle da doença (VERJOVSKI-ALMEIDA et al., 2004).

A análise do transcriptoma de *S. mansoni* demonstrou uma variedade de mecanismos que o parasito utiliza para evasão do sistema imune, além de revelar genes com expressão aumentada durante a transição de cercária para esquistossômulo e vermes adultos, que podem ser essenciais para a sobrevivência do parasito no hospedeiro vertebrado, constituindo, portanto, possíveis alvos como potenciais candidatos a vacinas (VERJOVSKI-ALMEIDA et al., 2004).

1.3. Via de Reparo por Excisão de Nucleotídeos

O reparo do DNA é fundamental para a sobrevivência da célula mediante exposição a agentes lesivos ao DNA. Uma série de agentes exógenos e endógenos pode interagir com o DNA e gerar dano, interferindo em processos celulares essenciais, tais como a transcrição, replicação do DNA, e progressão do ciclo celular. Assim, a interrupção desses processos pode ocasionar morte celular. Paralelamente, a ineficiência do reparo de DNA pode desencadear mutações, levando ao envelhecimento celular, defeitos genéticos, e carcinogênese (SWEDER & MADURA, 2002).

Em eucariotos, o reparo por excisão de nucleotídeos (NER) consiste na principal via celular responsável pela proteção contra mutagênese, citotoxicidade e neoplasia, sendo conservada desde leveduras até seres humanos (HOEIJMAKERS, 1995). Este sistema de reparo atua na remoção de um amplo espectro de lesões na conformação da molécula de DNA, como aquelas induzidas por luz ultravioleta (dímeros de ciclobutano pirimidina e 6-4 pirimidina), e adutos químicos (cisplatina, hidrocarboneto aromático policíclico) (HUANG et al., 1992; WANG et al., 1993).

Pelo menos cinco passos podem ser destacados em NER: reconhecimento do dano, incisão da fita lesada em ambos os lados, excisão do oligonucleotídeo contendo a lesão, síntese de um novo DNA usando a fita não danificada como molde, e ligação do DNA (HUANG et al., 1992; HOEIJMAKERS, 1995). Existem duas sub-vias em NER, o reparo acoplado à transcrição (TCR) e o reparo genômico global (GGR). TCR atua especificamente no reparo de fitas transcritas enquanto GGR é responsável pelo reparo de regiões não-transcritas dentro de todo o DNA genômico (HUANG et al., 1992; MASUTANI et al., 1994; SWEDER & MADURA, 2002).

NER é formada por complexos protéicos denominados fatores de reparo por excisão de nucleotídeos (NEFs). NEF1, composto por Rad14 (XPA) e o complexo 5' endonuclease Rad1/Rad10 (XPF/EERCC1), se liga ao DNA lesado. NEF2, constituído por Rad23/Rad4 (hHR23/XPC) parece ser o fator de reconhecimento inicial mais importante no reparo de fitas não-transcritas. NEF3, composto por Rad2/TFIIH (XPG/TFIIH) atua no reconhecimento de dano em fitas transcritas. NEF4 (Rad7 e Rad16), assim como NEF1 e NEF2, atua preferencialmente no reparo de DNA não-transcrito (GUZDER et al. 1998; ARAÚJO & WOOD, 1999; PRAKASH & PRAKASH, 2000). Assim, no intuito de remover a lesão, uma série de eventos altamente coordenados atua em conjunto, como ilustrado na **Figura 2**.

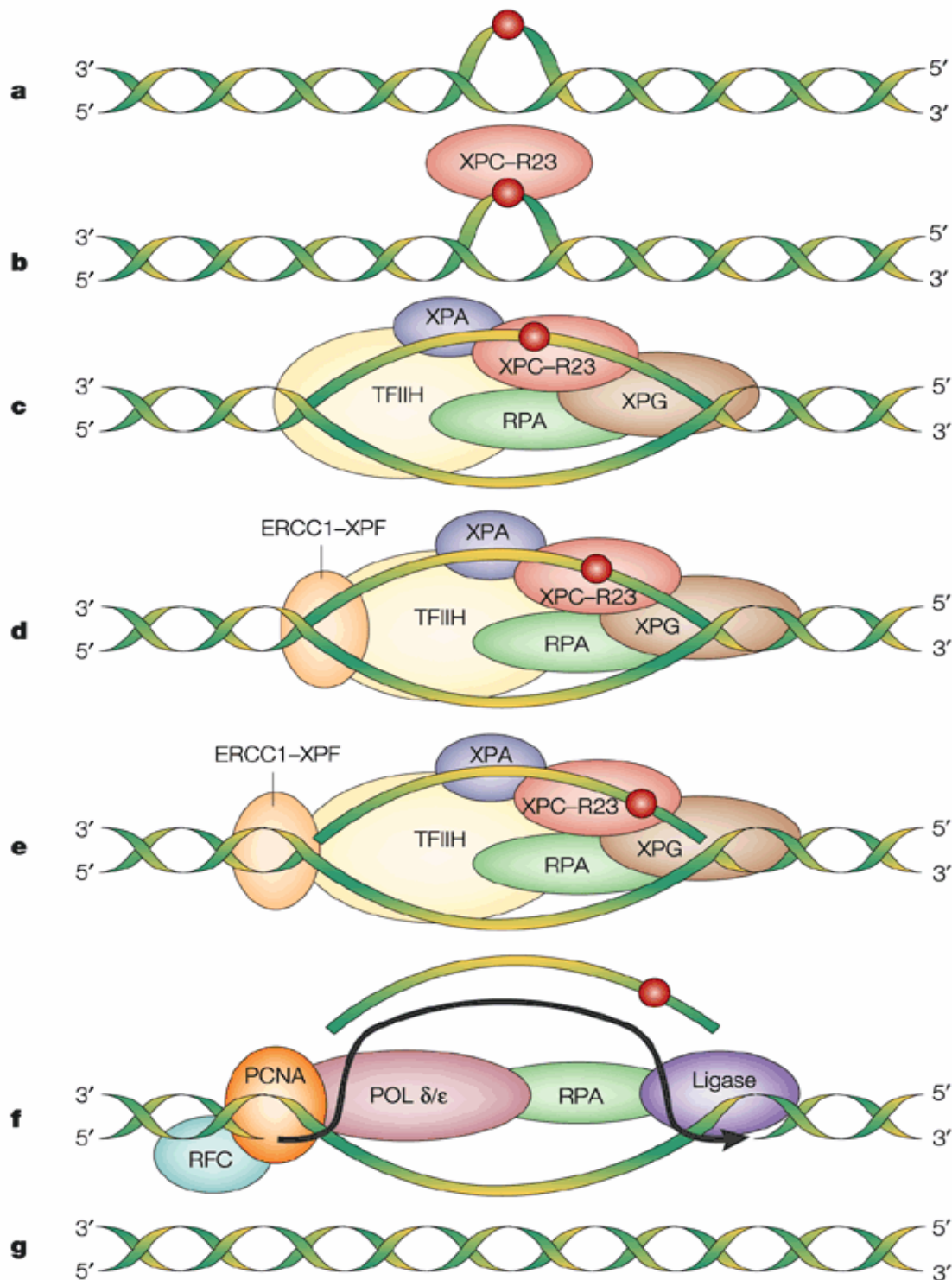


Figura 2. Eventos relacionados à via de reparo por excisão de nucleotídeos: **a.** DNA contendo a lesão; **b.** reconhecimento do dano; **c.** recrutamento de outras proteínas de reparo e abertura da fita dupla de DNA; **d.** montagem completa de todos os complexos protéicos de NER; **e.** incisão; **f.** excisão; **g.** síntese de um novo oligonucleotídeo e ligação. ERCC1, excision repair cross-complementing 1; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; POL, polymerase; RFC, replication factor C; RPA, replication protein A; TFIIH, transcription factor IIH; XP, xeroderma pigmentosum (Adaptado) (Friedberg, 2001).

Inicialmente, o dano é reconhecido por XPC (Rad4), que se encontra estavelmente ligado à R23 (Rad23). Dessa forma, a ligação do complexo XPC-hHR23 é seguida pelo recrutamento de várias outras proteínas (XPA, RPA, TFIIH e XPG), dentre as quais, XPA e RPA facilitam o reconhecimento específico do dano. TFIIH constitui um fator de transcrição da RNA polimerase II que também atua em NER. NER também contém duas DNA helicases, XPB e XPD (Rad25 e Rad3), que abrem a fita dupla do DNA na proximidade do dano. Este local de desnaturação gera uma “bolha” no DNA, cujas extremidades contêm junções entre a fita simples e a fita dupla do DNA. Em seguida, a ligação subsequente de ERCC1–XPF conclui montagem do grande complexo multiprotéico em NER. Neste contexto, XPG e ERCC1–XPF são endonucleases que cortam a fita danificada nas junções 3’ e 5’, respectivamente. Esta incisão bimodal gera um fragmento de oligonucleotídeo (27-30 nucleotídeos) contendo a lesão, que em seguida sofre excisão, concomitantemente com a restauração potencial de 27-30 nucleotídeos pela síntese do reparo. O reparo requer DNA polimerases δ ou ϵ , assim como proteínas acessórias de replicação PCNA, RPA e RFC. A integridade da fita danificada é então restaurada pela DNA ligase. Em conjunto, estes eventos bioquímicos restituem o DNA danificado à sua configuração nativa (FRIEDBERG, 2001).

Os homólogos humanos para Rad23 e Rad4 de leveduras são hHR23 e XPC, respectivamente (MASUTANI et al., 1994). Em humanos, a deficiência de NER está associada com Xeroderma Pigmentoso (XP), uma doença autossômica recessiva e rara, caracterizada por fotosensibilidade cutânea extrema à luz UV, em que predomina alta incidência de neoplasias malignas de pele com aumento da incidência de câncer (FRIEDBERG et al., 1995). XP apresenta uma substancial heterogeneidade genética, exibindo sete grupos variantes (XPA a XPG), sendo que todas estas variantes parecem estar envolvidas na via NER. Entre os genes XP identificados, XPC constitui o principal

fator envolvido no reconhecimento de dano na sub-via de reparo do genômico global, onde forma juntamente com hHR23 o complexo NEF2 (MASUTANI et al., 1994).

O complexo NEF2 age no reconhecimento do dano e recrutamento de outras proteínas de reparo para o local da lesão (HUANG et al., 1992; SUGASAWA et al., 1998; SWEDER & MADURA, 2002). Na realidade, o papel mais importante de Rad23 em NER parece ser a estabilização de Rad4, impedindo sua degradação pelo proteassoma (LOMMEL et al., 2002; NG et al., 2003; ORTOLAN et al., 2004; XIE et al., 2004). Além disso, Rad23 parece exercer um efeito estimulatório sobre a ligação/reconhecimento do dano mediado por Rad4 (XIE et al., 2004).

De acordo com Xie et al. (2004), Rad23 constitui uma proteína acessória em NER. Em adição a sua participação no reparo, esta proteína exerce uma atividade bem definida no proteassoma 26S, no qual desempenha um papel cooperativo no reconhecimento e translocação de proteínas poliubiquitinadas para o core proteolítico – proteassoma 20S (CHEN & MADURA, 2002; SAEKI et al., 2002; LAMBERTSON et al., 2003; KIM et al., 2004). Dessa forma, Rad23 apresenta diferentes funções, estabelecendo uma ligação entre NER e a via proteassoma-ubiquitina (SCHAUBER et al., 1998; RUSSELL et al., 1999).

Rad23/hHR23 apresenta quatro domínios, o que a torna capaz de se ligar em seus respectivos alvos: um domínio semelhante a ubiquitina (UBL), dois domínios de ligação a ubiquitina (UBA), e um domínio ligante de Rad4 ou XPC (RB4 ou XPCB) (**Figura 3**). Os domínios UBL e UBA ligam Rad23 ao proteassoma e às proteínas poliubiquitinadas, respectivamente, enquanto RB4, situado entre UBA1 e UBA2, promove a ligação entre Rad23 e Rad4, e com isso a interação entre NER e proteassoma (MASUTANI et al., 1997; SCHAUBER et al., 1998; WALTERS et al., 2004; WOLF & HILT, 2004; MILLER & GORDON, 2005).



Figura 3. Domínios de Rad23.

O complexo proteolítico proteassoma 26S é formado por um centro catalítico denominado de proteassoma 20S (CP), e por dois complexos regulatórios que se acoplam às extremidades de CP, denominado de complexo regulatório 19S (RP).

O CP, com aproximadamente 700kDa, é formado por quatro anéis de sete subunidades cada, sendo os dois anéis externos são compostos de subunidades do tipo α , e os dois anéis internos compostos por subunidades do tipo β - $\alpha 7 \beta 7 \beta 7 \alpha 7$ (KOPP et al., 1993; SCHAUER et al., 1993). Todas as subunidades do tipo β do proteassoma 20S de *Thermoplasma acidophilum* são ativas, sendo que, apenas as subunidades $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$ do complexo 20S de eucariotos possuem atividade catalítica (CHEN & HOCHSTRASSER, 1996; HEINEMEYER et al., 1997). KOPP et al. (1997) estudando o proteassoma humano demonstraram que a subunidade $\beta 1$ está relacionada à atividade peptidil pós-glutamil hidrolase, a subunidade $\beta 2$ a atividade tripsina-símile, e a subunidade $\beta 5$ a atividade quimiotripsina-símile. Já o complexo regulatório 19S (RP) é composto de 17 subunidades com pesos entre 25 a 110kDa, totalizando uma massa de aproximadamente 900kDa, que pode ser dividido em dois subcomplexos denominados de base e tampa. A base é formada por duas subunidades não ATPásicas ou RPNs denominadas de Rpn1 e Rpn2, e seis subunidades ATPásicas ou Rpts, sendo que a tampa do complexo 19S é formada por oito subunidades não-ATPásicas (GLICKMAN et al., 1998; FERREL et al., 2000; WOLF & HILT, 2004).

Vários estudos genéticos e bioquímicos têm revelado a interação entre o complexo regulatório 19S com a proteína Rad23 via domínio UBL (SCHAUER et al., 1998; WALTERS et al., 2004; MILLER & GORDON, 2005), e esta interação parece ser crítica para a atividade ótima de NER bem como para a sua regulação (RUSSELL et al., 1999;

LOMMEL et al., 2000; GILLETTE et al., 2001). Embora este requerimento seja intrinsecamente dependente das ATPases do complexo 19S, ele é independente da proteólise pelo complexo 20S. Assim, tem sido sugerido que o envolvimento do complexo regulatório 19S em NER está relacionado à desmontagem e rearranjo dos complexos protéicos de NER por meio de uma atividade chaperona-símile (RUSSELL et al., 1999; GILLETTE et al., 2001).

A regulação de NER ainda não está bem estabelecida. Tem sido especulado que o dano no DNA resulta em níveis aumentados de proteínas de reparo específicas. Por outro lado, a conclusão eficiente do reparo de DNA pode ser acompanhada por uma degradação destas proteínas pelo proteassoma, a fim de restaurar os seus níveis basais (SWEDER & MADURA, 2002).

A expressão dos genes envolvidos no reparo do DNA é induzida após exposição ao dano, provavelmente com a finalidade de acelerar a remoção dos adutos no DNA (SWEDER & MADURA, 2002). Com isso, o tratamento de células com agentes lesivos ao DNA também resulta na indução de vários genes.

S. mansoni passa por inúmeras modificações em seu complexo ciclo de vida, estando exposto a uma série de agentes lesivos ao DNA presentes no meio ambiente e na própria resposta imune do hospedeiro, o que faz com que os mecanismos de reparo de DNA sejam fundamentais durante seu desenvolvimento (WILSON & LAWSON, 1980; EL-ANSARY, 2003). Desta forma, é provável que *S. mansoni* seja provido por eficientes mecanismos de reparo assim como ocorre em outros eucariotos, o que torna a investigação desses mecanismos objeto de suma importância para o entendimento de sua biologia.

Como mencionado anteriormente, o grupo de pesquisadores liderados por VERJOVSKI-ALMEIDA, realizou o seqüenciamento em grande escala de transcritos, nas diferentes fases evolutivas de *S. mansoni* (VERJOVSKI-ALMEIDA et al., 2003). Embora

a análise no banco de dados gerado pelo projeto (<http://verjo18.iq.usp.br/schito/>) tenha demonstrado a presença de genes de NER altamente similares aos de outros organismos não há relato de estudos sobre a expressão gênica de nenhuma proteína desta via de reparo neste parasito.

Isto vem motivando nosso grupo de pesquisa a investigar genes relacionados a diferentes vias de reparo, no intuito de ampliar os conhecimentos em relação a processos essenciais ao desenvolvimento do parasito. Desta forma, foi investigada, nesse trabalho, a expressão dos genes SmRad23 e SmRad4 que codificam para as proteínas do complexo NEF2 de *S.mansoni*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Analisar a expressão dos genes responsáveis por codificar as proteínas Rad23 e Rad4 da via de reparo de excisão de nucleotídeos (NER) no ciclo evolutivo do parasito *Schistosoma mansoni*, bem como verificar o nível de expressão destes genes na presença e ausência de lesão.

2.2. Objetivos Específicos

- Analisar a expressão dos genes SmRad23 e SmRad4 durante as diferentes fases evolutivas de *S. mansoni* (verme adulto, esporocisto, cercária, esquistossômulo e ovo).
- Análise de homologia dos genes SmRad23 e SmRad4 com ortólogos.
- Analisar o nível de expressão dos genes SmRad23 e SmRad4 em vermes adultos mediante exposição dos agentes causadores de dano no DNA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção dos Estágios Evolutivos de *Schistosoma mansoni*

3.1.1. Manutenção do Ciclo de Vida do Parasito no Laboratório

Neste trabalho foi utilizada a linhagem LE de *S. mansoni*, que é mantida rotineiramente no laboratório de Biologia Molecular de Parasitas do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (USP).

O ciclo biológico do parasito é mantido neste laboratório, por passagens seriadas em moluscos da espécie *B. glabrata* (hospedeiros intermediários) e camundongos da raça Swiss e BALB/c (hospedeiros definitivos) pesando entre 20-30 gramas.

Fezes de camundongos infectados com aproximadamente 200 cercárias foram coletadas após 45 a 48 dias de infecção, homogeneizadas em salina 1% e filtradas em gaze. Ao material filtrado, foi adicionado 200mL de solução salina 1%, sendo em seguida deixado em repouso por uma hora a 4°C para decantação. Após este período, cerca de 170 a 180mL da solução salina 1% foi desprezada, sendo novamente adicionada solução salina 1%. O material foi mantido a 4°C por uma hora. Este procedimento foi repetido (três a quatro vezes), até a obtenção de um sedimento limpo, rico em ovos do parasita. Este sedimento foi ressuspenso em água declorada e exposto à luz artificial (lâmpadas de 60W) por cerca de duas horas para eclosão dos ovos e liberação dos miracídeos (STANDEN, 1952). Cerca de 15 a 18 miracídeos recém-liberados foram capturados com pipeta “Pasteur” e utilizados para infectar moluscos do gênero *B. glabrata*. Esta infecção foi realizada por um período de duas a três horas em presença de luz artificial (lâmpadas de 60W), a temperatura aproximada de 28°C.

Os moluscos após 40 a 50 dias de infecção foram expostos a luz (lâmpadas de 60 W), durante duas horas para estimular a liberação de cercárias. Após a liberação, as

cercárias foram colocadas em tubos Falcon de 50mL, limpas e coletadas por centrifugação (centrífuga internacional/ 5 minutos / 1500g / 4°C). Em seguida, as cercárias foram utilizadas para infectar os camundongos (200 cercárias / roedor). A infecção foi realizada de forma percutânea, com auxílio de uma seringa de 1mL e agulha 0,8 mm.

3.1.2. Obtenção de Vermes Adultos

Os camundongos infectados, após 50 a 55 dias, foram sacrificados e a cavidade abdominal e torácica abertas. Os vermes adultos foram recuperados do sistema porta-hepático, segundo condições descritas por Smithers & Terry (1965). Após a coleta, os parasitas foram mantidos em meio RPMI (Cultilab) suplementado com 20 µM de tampão HEPS, pH 7,5. Alguns deles foram tratados como descreve o item 3.1.7, e os demais submetidos à extração de RNA ou estocados a -70°C até o momento do uso.

3.1.3. Obtenção de Cercárias

As cercárias foram obtidas como descrito na seção 3.1.1. Estas cercárias liberadas foram destinadas à infecção dos camundongos, extração de RNA ou transformação em esquistossômulos.

3.1.4. Obtenção de Ovos

Além dos ovos terem sido obtidos como descrito na seção 3.1.1, eles também foram provenientes de fígado de camundongos após 50 a 55 dias de infecção com o parasito *S. mansoni*.

Cerca de 15 a 20 fígados foram triturados em 150 mL de tampão de homogeneização (1,2g de Na₂HPO₄, 0,09g KH₂PO₄ em 200mL de água destilada) por um minuto em velocidade máxima (liqüidificador), sendo em seguida adicionada a solução

cerca de 100µg de tripsina. A solução foi mantida a 37°C por três horas. Durante esse período a solução foi agitada por quatro vezes. Após o período de incubação, o material foi passado por duas peneiras de malhas metálicas de 0,30 e 0,180 mm, respectivamente. Durante esta operação o material foi lavado com salina 1%. Este procedimento foi repetido (cerca de 5 a 6 vezes) até ser obtido um sedimento limpo, rico em ovos do parasita (ASHTON et al., 2001). Os ovos obtidos foram submetidos à extração de RNA ou estocados a -70°C até o momento do uso.

Aqueles ovos excretados nas fezes dos camundongos foram recolhidos por sedimentação espontânea (HOFFMANN et al., 1934) e expostos por aproximadamente duas horas à luz artificial, para a liberação de miracídeos (STANDEN, 1952). Os miracídeos foram utilizados para a infecção dos caramujos.

3.1.5. Obtenção de Esporocistos

A fase de esporocistos foi obtida do hepatopâncreas de moluscos *B. glabrata* após 45 a 48 dias de infecção com o parasito *S. mansoni*. Para este procedimento, somente os moluscos que liberaram primariamente quantidade satisfatória de cercárias foram utilizados.

Após a liberação de cercárias, como descrito na seção 3.1.1., dois ou três moluscos foram colocados separadamente em 3mL de água e submetidos a nova liberação por mais meia hora, sendo que de dez em dez minutos a água foi trocada. Uma alíquota da água foi sempre observada com o auxílio de microscópio de luz invertida (Leitz, Diavert), para se verificar a quantidade de cercárias ainda liberadas pelo *Biomphalaria*. Este procedimento foi adotado para garantir o mínimo de cercárias na preparação dos esporocistos.

Em seguida, os moluscos foram lavados em água corrente e mortos por esmagamento entre duas placas de Petri. Com o auxílio de duas pinças, os fragmentos da

casca foram retirados do corpo do molusco e a região do hepatopâncreas (porção terminal do corpo do parasito) separada. Em seguida, o hepatopâncreas foi rapidamente analisado em microscópio de luz invertida (Leitz, Diavert), para verificar a presença de esporocistos. Os hepatopâncreas que se mostraram positivos foram imediatamente submetidos à extração de RNA ou congelados a -70°C até o momento do uso. Como controle negativo sempre foi utilizado hepatopâncreas de caramujos não infectados pelo *S. mansoni*.

A utilização do hepatopâncreas mostrou ser um método bastante eficiente para a obtenção da fase evolutiva de esporocistos deste parasito, uma vez que a grande maioria dos esporocistos maduros se encontra nessa região do caramujo.

3.1.6. Obtenção de Esquistossômulos

As cercárias foram submetidas a um método de transformação mecânica em esquistossômulos *in vitro*, descrito por Harrop et al. (1999).

Após obtenção e limpeza como descritas no item 3.1.1, aproximadamente 150 a 200 mil cercárias, suspensas em 100mL de água autoclavada, foram colocadas em béquer de 250mL previamente mergulhado em gelo e deixadas por duas horas para decantar. Transcorrido este período, com auxílio de uma pipeta de 10mL e um pipetador automático, com cuidado, evitando ao máximo tocar no béquer, cerca de 90mL da água foram retirados. O restante da água contendo a suspensão de cercárias foi transferido para um tubo Falcon de 50mL e o volume completado com água autoclavada para 25mL. Em seguida, o material foi centrifugado por 3 minutos a 1500g a 4°C (centrífuga internacional) e o sobrenadante descartado. Esse procedimento foi repetido mais uma vez. Após as duas centrifugações consecutivas, as cercárias foram transferidas para um tubo falcon estéril de 15mL e foi adicionado 7mL de meio RPMI 1640, suplementado com 10% SFB, penicilina e estreptomicina (100 $\mu\text{g/mL}$). O tubo foi bem fechado, e as cercárias vigorosamente

agitadas em vortex (Tecnal TE 089) por quarenta e cinco segundos, ocorrendo assim, a perda da cauda por quebra mecânica. Em seguida, o material foi transferido para uma garrafa estéril de 50mL e o volume completado para 30mL com meio RPMI 1640, suplementado com 10% SFB, penicilina e estreptomicina (100µg/mL), (procedimento realizado em fluxo laminar). A suspensão (corpo cercariano e cauda) foi incubada por três horas em estufa de 5% CO₂. Após o período de incubação, os esquistossômulos (derivados dos corpos cercarianos) se encontravam sedimentados e a maioria das caudas se encontrava em suspensão. Com o auxílio de uma pipeta estéril de 10mL e um pipetador automático, cerca de 25mL do meio RPMI, onde se encontrava a grande maioria das caudas, foram retirados da garrafa. Os 5mL restantes, contendo os esquistossômulos, sofreram repetidas lavagens (seis a sete) com meio RPMI, com um intervalo de quatro minutos entre cada lavagem, para sedimentação dos esquistossômulos. Após cada sedimentação, uma alíquota de 15µL foi examinada em microscópio de luz invertida (Leitz, Diavert), para acompanhar o processo de separação esquistossômulo/cauda. Depois de retiradas as caudas, os esquistossômulos foram imediatamente recuperados por centrifugação (centrífuga 5417R-ependorff/ 1000g / 1 minuto / 4°C) e estocados a -70°C até o momento do uso.

3.2. Tratamento *in vitro* de Vermes Adultos com Agentes que Danificam o DNA

Como agentes causadores de dano no DNA foram utilizados Tetrametilamônio (TMA) e Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂). A colchicina foi usada como um controle do ciclo celular.

Após perfusão asséptica, os vermes adultos foram primeiramente mantidos em meio RPMI 1640, suplementado com 10% SFB, penicilina e estreptomicina (100µg/mL), durante 24 horas a 37°C, 5% CO₂. Em seguida, os parasitos foram divididos em quatro grupos (controle, colchicina, TMA, e H₂O₂), sendo cada qual tratado com seu respectivo

agente químico, e incubado por mais 24 horas sob as mesmas condições descritas anteriormente. Os agentes químicos foram utilizados nas seguintes concentrações: colchicina (50 μ M), TMA (0,06%), e H_2O_2 (50 μ M). Posteriormente, os parasitos foram recuperados e submetidos à extração de RNA.

3.3. Ensaio do Cometa

O ensaio do cometa consiste em uma eletroforese sob condições alcalinas utilizada com a finalidade de comprovar se houve lesão no DNA. Assim, nesta eletroforese, o dano é observado devido à velocidade de migração do DNA danificado ser maior do que a do DNA íntegro, quando submetidos ao campo elétrico. Dessa maneira, forma-se um rastro de DNA danificado semelhante a uma "cauda de cometa". Nas células não submetidas à lesão, não é observada a presença de rastros de DNA danificado e, dessa forma, o DNA se apresenta na forma do núcleo da célula. Este experimento foi desenvolvido conforme descrito por Singh et al. (1988), e será descrito a seguir.

As células do parasito foram embebidas em gel de agarose sobre lâminas de microscopia. Após a solidificação da agarose, as lâminas foram imersas em uma solução de lise (sarcosinato de sódio 1%, NaCl 2,5 mM, Na^2 -EDTA 100 mM, Tris 10 mM, pH 10, e Triton X100 1%) por uma hora, com a finalidade de romper as estruturas celulares. Em seguida, as lâminas foram removidas da solução de lise e colocadas na cuba de eletroforese contendo tampão alcalino (Na^2 -EDTA 1 mM e NaOH 300 mM). O ambiente alcalino é essencial para o desenovelamento do DNA e também para a degradação do RNA que poderia interferir no resultado do experimento. Após eletroforese, as lâminas foram lavadas com Tris 0,4M (pH 7,5) para remover o álcali e os detergentes, que poderiam interferir na coloração com o brometo de etídeo. Decorridos 5 minutos, as lâminas foram coradas, cobertas com lamínulas e visualizadas sob microscopia de fluorescência.

A migração do DNA foi determinada pela mensuração da diferença de migração entre o DNA íntegro (cabeça do cometa) e do DNA danificado (cauda do cometa) das células de cada grupo. Para que os resultados não fossem alterados pela variação do tamanho das células, o parâmetro analisado foi a razão entre o comprimento da cauda (eixo maior) e diâmetro da célula (eixo menor).

3.4. Extração de RNA Total

Foram utilizados como material de partida para a extração de RNA total, 100mg de vermes adultos (macho e fêmea), 150mg de hepatopâncreas (esporocistos), 120.000 cercárias, 100.000 esquistossômulos e 35mg de ovos. Todos estes materiais foram submetidos ao mesmo procedimento de extração.

As diferentes fases evolutivas do parasito *S. mansoni*, foram homogeneizadas em politron com 1,0 mL de Trizol LS (GIBCO-BRL), até completa solubilização. Em seguida, a mistura foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente para permitir a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas. Decorrido este intervalo de tempo, foi adicionado à mistura 200µL de clorofórmio (isento de álcool isoamílico ou qualquer outro aditivo), e as amostras foram agitadas em *vortex* (Tecnal TE 089) por 10 segundos e incubadas à temperatura ambiente durante 15 minutos. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 12000 x g por 15 minutos a 4°C (centrífuga 5417R-eppendorf). Após esta etapa de centrifugação, a mistura separou-se em uma fase inferior vermelha (fase fenol-clorofórmio), interfase e fase aquosa superior incolor. Neste processo, o DNA fica retido na interfase, as proteínas na fase orgânica, enquanto o RNA permanece exclusivamente na fase aquosa. A fase aquosa foi transferida para um tubo de poliestireno estéril (tipo eppendorf) e o RNA precipitado pela adição de 500µL de isopropanol/mL de Trizol utilizado na homogeneização inicial. Após a adição do isopropanol, o tubo foi

vagarosamente invertido por três vezes e incubado à temperatura ambiente por 15 minutos. O RNA foi então recuperado por centrifugação a 12000g por 8 minutos a 4°C (centrifuga 5417R-eppendorf). O sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com 1,0 mL de etanol 75% em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC), sendo em seguida centrifugado a 1000g por 5 minutos a 4°C. O precipitado final foi seco à vácuo, ressuspenso em 20 a 30 µL de água tratada com DEPC e estocado a -70°C até o momento do uso. Uma alíquota do material foi avaliada em gel de agarose-formaldeído a 1%, para verificar a qualidade do RNA. A **Figura 4** ilustra a extração de RNA total em diferentes fases evolutivas do parasito.

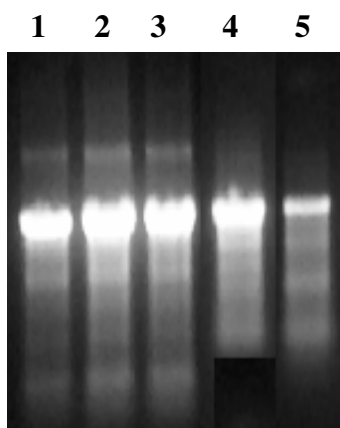


Figura 4. Análise em gel de agarose/formaldeído a 1%, do RNA total de ovos (1), vermes adultos (2), cercárias (3), esporocistos (4) e esquistossômulo (5).

As concentrações de RNA foram estimadas por medidas de absorbância a 260nm em espectrofotômetro. Uma unidade de absorbância a 260nm corresponde aproximadamente 40µg/mL de RNA. Para esta análise, o RNA total foi diluído na proporção de 1:250 (4µL da amostra em 996µL de água MILLI Q). O grau de pureza foi estimado pela relação entre as leituras a 260 e 280nm. As preparações foram consideradas boas quando o valor da razão $A=260/280$ estava entre o intervalo 1,8 a 2,2.

3.5. Idealização dos Oligonucleotídeos Iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores foram idealizados tendo como base, seqüências obtidas durante o projeto "Transcriptoma do *Schistosoma mansoni*" (VERJOVSKI-ALMEIDA et al, 2003), com o auxílio do programa *generunner*. Na **tabela 1** estão representados os genes que codificam para as proteínas de reparo em estudo, Rad23 e Rad4, bem como os oligoiniciadores utilizados nas reações de PCR. O gene codificando para α -tubulina foi utilizado como padrão interno nas reações de amplificação nas diferentes fases evolutivas do parasito.

Tabela 1. Seqüências de oligonucleotídeos iniciadores usados na amplificação por PCR.

Genes	Número de Acesso	Seqüências de Oligonucleotídeos Iniciadores (5' → 3')	Produto esperado (pb)
SmRad23	DQ311643	S*: AAGTTACCTTCAAAACACTG AS**: TAGCGCTCTCATTTGTTGAA	740
SmRad4	DQ311644	S: ACACGTTCTATTCGTTCTTC AS: ATCATCCATTGTACGTTCTC	601
α -tubulina	M80214	S: CGCTCGCGGTCATTATAC AS: ATCCAGAACCGGTACCAC	137

* S = *Sense*

**AS = *Antisense*

3.6. Transcrição Reversa a partir do RNA Total (RT-PCR)

Para a síntese do DNA complementar (cDNA) dos genes que supostamente codificam para as proteínas que atuam no reparo por excisão de nucleotídeo (NER), Rad23 e Rad4, nos diferentes estágios evolutivos do parasita *S. mansoni*, foi utilizada a técnica de RT-PCR. Neste procedimento, inicialmente foram sintetizadas as fitas simples de cDNA

(primeira fita) dos diferentes estágios evolutivos do parasita: vermes adultos, esquistossômulos, cercárias, ovos, esporocisto (caramujo positivo) utilizando o Kit *ThermoScript RT-PCR System* (INVITROGEN), como descrito.

Para a síntese da primeira fita foram feitas duas misturas reacionais, denominadas de Mix I e Mix II. Os componentes destas misturas estão relacionados abaixo.

Mix I -

COMPONENTES

Iniciador Oligo (dT)₂₀	50µM	2,0µL
RNA Total	3,0µg	4,0 a 8,0µL
dNTPs (mistura)	10mM	2,0µL
Água (livre RNase)	volume final para 12,0µL (quando necessário)	

Mix II -

COMPONENTES

Tampão 5x		4,0µL
DTT	0,1M	1,0µL
Inibidor de RNase	40 unidades/µL	1,0µL
Enzima - "ThermoScriptTM".	15 unidades/µL	1,0µL
Água (livre RNase)		1,0µL

O Mix I foi feito em tubo de poliestireno estéril de 200µL (tipo eppendorf). Essa mistura foi incubada por 5 minutos a 65°C, seguido de banho de gelo por 3 minutos. Em seguida, o Mix II (previamente preparado) foi adicionado ao Mix I, sendo a nova mistura transferida para termociclador (Mastercycler gradient - eppendorf) e incubada a 50°C por 60 minutos. Após este intervalo de tempo, a reação foi interrompida por incubação a 85°C por 5 minutos, seguida por um minuto de banho de gelo. Como passo seguinte, foi adicionada à amostra 2µL de RNase H, seguido de incubação por 20 minutos a 37°C.

Após este período as amostras foram imediatamente utilizadas ou estocadas a -20°C até o momento do uso.

A viabilidade do RNA de caramujos não-infectados (controle negativo) foi comprovada usando o gene Rpn1 específico (Nº de Acesso no GenBank: CV042523; www.ncbi.nlm.nih.gov).

3.7. Amplificação dos cDNAs, Utilizando Oligoiniciadores Específicos para SmRad23 e SmRad4

Para amplificação dos transcritos que supostamente codificam para as subunidades do complexo NEF2 (Rad23 e Rad4), foi adotado o seguinte procedimento. Em tubo *epENDORF* de 200µL foi adicionada a mistura de reação para um volume final de 50 µL, contendo: cDNA (300ng/2,0µL), tampão 10X (PCR), *Taq* DNA polimerase Platinum 5,0 U/µL (INVITROGEN), MgCl₂ 50mM, dNTPs 10mM, e oligoiniciador específico 10µM

Após a adição de todos os componentes reacionais, a amostra foi incubada em termociclador de acordo com a seguinte estratégia de amplificação: passo inicial de 94°C por três minutos, seguido de 40 ciclos (PCR Qualitativo) ou 30 ciclos (PCR Semiquantitativo) dimensionados em desnaturação a 94°C por um minuto; ligação dos oligonucleotídeos iniciadores por 1 minuto a 42 °C (SmRad23 e SmRad4) e 47 °C (α -tubulina), e 1 minuto a 72°C. Como última etapa, a reação foi mantida por um tempo adicional de seis minutos a 72°C, para extensão final. Após o término da reação, uma alíquota de 10µL de cada amostra foi analisada em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo (0,5µg/mL) em presença de luz ultravioleta (Transiluminador UVis-20 - Hoefer). O tamanho dos fragmentos foi verificado por comparação com padrão de peso

molecular de 100 pares de bases (INVITROGEN). Em seguida o gel foi fotografado com o auxílio do sistema de captura de imagem *Image Kodak Digital Science 1D*.

3.8. Análise Densitométrica – PCR Semiquantitativo

O PCR semiquantitativo foi realizado utilizando cDNA dos vermes adultos submetidos ao tratamento *in vitro*, com a finalidade de investigar possíveis diferenças nos níveis de expressão dos genes que codificam para as proteínas de reparo Rad23 e Rad4. Foi utilizado como padrão interno de expressão o gene que codifica para a proteína alfa-tubulina de *S. mansoni*.

Durante o período de padronização do experimento, um dos passos fundamentais para a correta utilização da técnica, foi determinar o número mínimo de ciclos capazes de gerar amplificações dos transcritos que pudessem ser visualizadas e quantificadas, sem atingir o ponto de saturação da reação de PCR. Desta forma, o número mínimo de ciclos foi estabelecido como 30. Para a análise densitométrica dos transcritos que codificam para as proteínas Rad23 e Rad4 do complexo NEF2 e para a proteína alfa tubulina (padrão interno), foi utilizado o programa *Image Kodak Digital Science 1D*.

3.9. Purificação dos Fragmentos Obtidos por Amplificação do cDNA

Alíquotas de 30 a 40µL das reações de amplificação foram aplicadas em gel de agarose 1,5%, seguidas de coloração com brometo de etídio (0,5µg/mL). Em seguida o gel foi exposto em luz ultravioleta (transiluminador Uvis-20), e um pequeno bloco de agarose (200 a 300µg) contendo o fragmento de interesse foi retirado, com o auxílio de um bisturi. Após este procedimento, o fragmento de interesse foi extraído do bloco de agarose com o auxílio do kit GFX PCR (Amersham) de acordo com o boletim técnico do fabricante, com

exceção da última etapa onde as amostras foram recuperadas em 25µL de tampão de extração.

3.10. Clonagem em Vetor de Seqüenciamento

Os fragmentos de cDNA devidamente purificados foram ligados em vetor de seqüenciamento TOPO-TA (INVITROGEN) ou pGEMT *easy* (Promega), de acordo com especificações dos fabricantes.

3.11. Preparo de Bactérias Competentes

As bactérias *Escherichia coli* das linhagens DH5α e TOP10F foram tornadas competentes pelo método descrito por Hanahan (1983). Uma cultura de DH5α ou TOP10F foi incubada durante 18 h a 37°C sob agitação rotatória de 200 rpm (New Brunswick Scientific) em 5mL de meio de cultura LB (bacto-triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L e NaCl 5g/L em pH 7,4). Após o período de incubação, em um tubo Falcon estéril de 50mL contendo 25mL de meio SOC (bacto-triptona 20g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 0,58g/L e KCl 0,2g/L em pH 7,4) suplementado com 250µL de solução de MgSO₄ 1M e 250µL de solução de MgCl₂ 1M foi adicionado uma alíquota de 250µL da bactéria previamente incubada. A seguir, o tubo Falcon foi deixado sob agitação a 200 rpm por duas horas a 37°C ou até que a densidade ótica a 600nm atingisse 0,4 a 0,6, sendo em seguida mantido em banho de gelo por 15 minutos. Posteriormente, as bactérias foram recuperadas por centrifugação a 1000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado com auxílio de pipetador automático em 10mL de tampão TFB (KCL 100mM, MnCl₂.4H₂O 45mM, CaCl₂ 2H₂O 10mM, Co(NH₃)₆Cl₃ 3mM e KOH 10mM, pH 6,2) permanecendo em repouso por 15 minutos. As bactérias foram novamente centrifugadas como acima e ressuspensas em 2,4mL de TFB. Foram

adicionados 84µL (3,5%) da solução de DnD (dithiothreitol 1M, dimetilsulfóxido 90% v/v e acetato de potássio 10mM, pH 7,5) no centro da suspensão das células e o tubo agitado por 20 segundos, permanecendo em seguida 10 minutos em banho de gelo. Outra alíquota de igual volume de DnD foi adicionada e o tubo incubado em gelo por mais 15 minutos. A suspensão bacteriana, assim tornada competente, foi fracionada em alíquotas de 200µL em tubos eppendorf e imediatamente utilizada.

3.12. Transformação Bacteriana

A uma alíquota de 200µL de células bacterianas competentes foi adicionado cerca de 5 a 8µL da reação de ligação. Esta mistura foi deixada em banho de gelo por 30 minutos, seguido de choque térmico (42°C por 90 segundos) e retorno ao gelo por mais 2 minutos. Em seguida, esta cultura foi transferida para um tubo Falcon estéril de 15 mL contendo 1mL de meio SOC (meio SOB suplementado com 2% de glicose 1M) e incubada por uma hora e meia a 37°C em agitação constante de 200 rpm. Após este intervalo, a suspensão bacteriana foi espalhada (alça de Drigalski) em meio LB-ágar, contendo ampicilina (100µg/mL) e X-GAL (20µL/mL), para que ocorresse a seleção das bactérias contendo plasmídeos com inserto (colônias brancas) e sem inserto (colônias azuis). As placas permaneceram 5 a 10 minutos em temperatura ambiente para absorção do líquido e, a seguir, foram incubadas a 37°C por 12 a 16 horas.

3.13. Obtenção do DNA Plasmidial

Uma colônia positiva (branca) foi inoculada em 5mL de LB/ampicilina (100µg/mL) e incubada a 37°C sob agitação constante de 200 rpm por 16 horas. Após a incubação, 1,5µL da suspensão bacteriana foi transferida para tubo eppendorf estéril e centrifugada a 12.000g por 1 minuto, e o sobrenadante foi desprezado. Este procedimento foi repetido

mais duas vezes. Portanto, a massa recuperada em cada eppendorf ao final desse processo foi equivalente a 4,5mL de suspensão bacteriana. Em seguida, as bactérias foram ressuspensas em 400µL de tampão STET (glicose 8%, triton X-100 0,1%, EDTA 50mM, Tris-HCl 50mM, pH 8,0). A esta suspensão foram adicionados 10µL de lisozima (50mg/mL). Os tubos foram agitados em vortex por 10 segundos, incubados 5 minutos a temperatura ambiente e deixados por 45 segundos a 95°C para inativar a lisozima. Após este período, os tubos foram centrifugados a 12.000g por 10 minutos e o “pellet” retirado com o auxílio de um pequeno bastão de madeira. Ao sobrenadante, foram adicionados 10µL uma solução de CTAB 5% (brometo de amônio de trimetil acetil). Os tubos foram invertidos por cinco vezes e centrifugados a 12.000g por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspenso em 600µL de NaCl 1,2M. Em seguida, o DNA plasmidial foi precipitado com a adição de 750µL de etanol 100%. A mistura foi vigorosamente agitada em vortex por 10 segundos e o DNA recuperado por centrifugação a 12.000g por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e o precipitado lavado com 800µL de etanol 70%. Após nova centrifugação a 12.000g por 5 minutos, o sobrenadante foi novamente removido e o precipitado seco a vácuo (*Speed-vac*). O precipitado seco foi ressuspenso em 25µL de TE (HCl 10mM pH 8,0 e EDTA 0,1mM). Uma alíquota da preparação plasmidial foi visualizada em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo (0,5µg/mL). Os plasmídeos assim obtidos foram estocados a -20°C até o momento do uso. A **Figura 5** representa um gel típico deste procedimento.

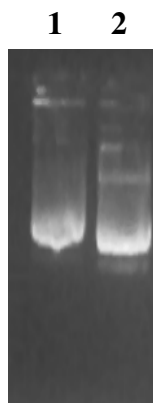


Figura 5. Gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo, mostrando os plasmídeos contendo os cDNAs das proteínas Rad23 (1) e Rad4 (2), da fase evolutiva de vermes adultos do parasito *S. mansoni*.

3.14. Sequenciamento da Amostras Obtidas

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o kit *Big-dye terminator versão 3* (Applied Biosystems). Em cada tubo de reação foram adicionados os componentes descritos a seguir.

COMPONENTES REACIONAIS - REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO -	
Tampão de sequenciamento	6,0µL
Big-dye	2,0µL
*Oligo iniciador M13 universal (S) ou Oligo iniciador M13 reverso (AS)	1,0µL
DNA plasmidial	3,0 a 4,0µL
Água (livre RNase)	volume final para 20,0µL

Os tubos contendo a mistura reacional foram colocados em termociclador (Mastercycler gradient - eppendorf) e submetidos a um programa de 40 ciclos subdividido em desnaturação a 95°C por 5 segundos, emparelhamento do oligoiniciador a 50°C por 20 segundos e extensão da cadeia a 65°C por 4 minutos. Ao final do procedimento, os produtos obtidos pela reação foram precipitados e posteriormente sequenciados.

Para cada tubo da reação anterior foram adicionados 100µL de isopropanol 75%. A mistura foi agitada em vortex por 15 segundos, mantida em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugada a 4.000g por 50 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e os tubos colocados abertos e virados para baixo durante 25 segundos (sobre papel toalha) para que as amostras pudessem ser parcialmente secas. Em seguida, 150µL de etanol 70% foi adicionado às amostras, os tubos foram centrifugados a 4.000g por 10 minutos e submetidos à secagem parcial como descrito acima. O procedimento com etanol 70% foi repetido mais uma vez. As amostras foram deixadas a 37°C por 30 minutos para que fossem totalmente secas. Em seguida as amostras foram preparadas para serem seqüenciadas.

As amostras a serem seqüenciadas foram misturadas com 10µL de formamida ultrapura (*HI-Dy – Applied Biosystems*) e aquecidas por 5 minutos a 95°C. Após a desnaturação as amostras foram deixadas em banho de gelo por 1 minuto e analisadas em seqüenciador automático ABI-3100 (*Applied Biosystems*).

3.15. Análise de Bioinformática

As seqüências obtidas para SmRad23 e SmRad4 foram submetidas à busca de homologia com seqüências de nucleotídeos (Blastn) e de aminoácidos (Blastx e Blastp) depositados no GenBank (National Center for Biotechnology Information, USA), com o auxílio do sistema BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, www.ncbi.nlm.nih.gov). As seqüências preditas de aminoácidos para SmRad23 e SmRad4 foram geradas por meio do programa “ORF finder” (www.ncbi.nlm.nih.gov). Também foi utilizado o algoritmo PFAM (www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/), para identificar os domínios conservados nas seqüências preditas de aminoácidos, o programa BLAST2 (www.ncbi.nlm.nih.gov) e

ClustalW (www.ebi.ac.uk) para auxiliar no alinhamento das seqüências de nucleotídeos e aminoácidos preditas .

3.16. Análise Estatística

Foi realizada análise de variância *one-way* seguida pela determinação da significância das diferenças entre os grupos (comparações múltiplas de *Newman-Keuls*). Para admitir diferenças estatisticamente significativas foi considerado $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Validação dos Oligoiniciadores

Com o objetivo inicial confirmar se os oligonucleotídeos iniciadores especificados na **Tabela 1** realmente iriam direcionar a amplificação dos genes codificando para as proteínas de reparo Rad23 e Rad4 em *S. mansoni*, foi realizado inicialmente, apenas as amplificações dos transcritos na fase evolutiva de vermes adultos. Todos esses fragmentos foram clonados e seqüenciados, conforme descrito nas seções 3.8 e 3.12.

O primeiro resultado da análise das seqüências, foi a constatação de que o tamanho dos fragmentos amplificados, estava de acordo com o tamanho esperado dos produtos, como descrito na **Tabela 1**. Em seguida, para verificar a identidade dos transcritos, suas seqüências foram submetidas a busca de homologia em banco de dados (www.ncbi.nlm.nih.gov), com o auxílio do algoritmo BLASTX. Essas análises demonstraram que os transcritos, realmente são ortólogos a genes que codificam para as proteínas de reparo Rad23 e Rad4 de outros organismos.

Como a análise de homologia dos transcritos amplificados do cDNA de vermes adultos confirmou que os oligonucleotídeos estavam realmente direcionando a amplificação dos genes SmRad23 e SmRad4 em *S. mansoni*, foi dado início aos experimentos relacionados a análise da expressão destes genes nas diferentes fases evolutivas do parasito *S. mansoni*.

4.2. Análise por RT-PCR da Expressão Gênica de SmRad23 e SmRad4 nos Diferentes Estágios Evolutivos do Ciclo de Vida de *S. mansoni*

Com a finalidade de verificar a expressão dos genes SmRad23 e SmRad4 durante o ciclo de vida de *S. mansoni*, foi realizada uma análise qualitativa com o auxílio da técnica de RT-PCR, utilizando RNA total extraído de vermes adultos (não-cultivados *in vitro*), esporocisto (hepatopâncreas de caramujo infectado), cercárias, esquistossômulos, ovos e

hepatopâncreas de caramujos não-infectados (controle negativo), conforme descrito no item 3.5. O gene da α -tubulina foi usado como controle interno das reações.

A análise da expressão revelou a presença de transcritos únicos para SmRad23 e SmRad4, com 740 e 601 pb, respectivamente, em vermes adultos, esporocistos, cercárias, esquistossômulos e ovos, ao passo que nenhum produto de PCR derivado do transcrito destes genes foi detectado em caramujos não infectados, conforme observado na **Figura 6**.

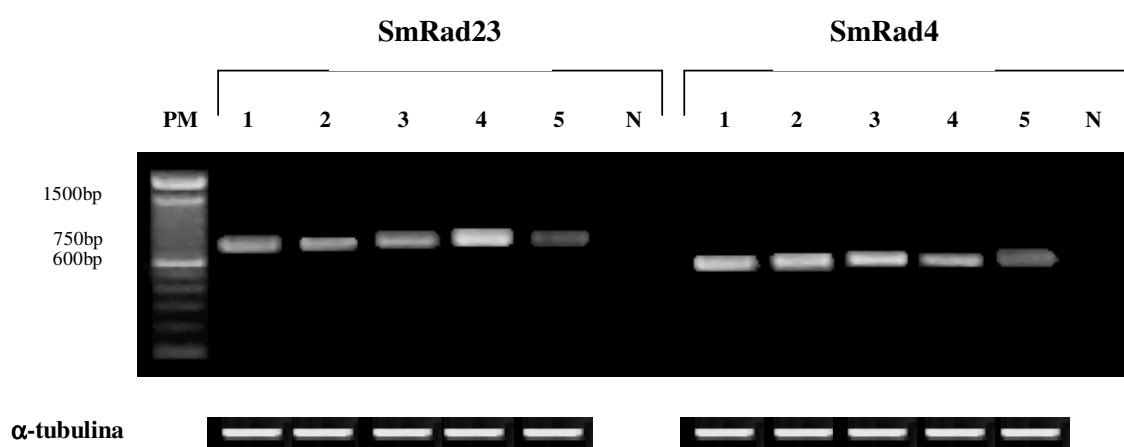


Figura 6. Expressão gênica de SmRad23 e SmRad4 em diferentes fases de vida de *S. mansoni*. Gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo. PM - padrão molecular de 100 pares de bases. 1-5 representa, respectivamente, vermes adultos não-cultivados, hepatopâncreas de caramujo infectado (esporocistos), cercárias, esquistossômulos, e ovos. N - hepatopâncreas de caramujo não infectado (controle negativo). O gene para α -tubulina foi usado como controle interno.

Esses fragmentos foram devidamente seqüenciados, e como mostra a **Figura 7**, a análise comparativa revelou que as seqüências codificando para SmRad23 são idênticas em todos os estágios de vida analisados (**Figura 7A**), assim como as seqüências codificando para SmRad4 (**Figura 7B**).

A

SmRad23Va	AAGTTACCTTCAAAACACTGATGCAACAGACGTTTGTCTTGACTTTCAAGAAGATGATC
SmRad23Ep	AAGTTACCTTCAAAACACTGATGCAACAGACGTTTGTCTTGACTTTCAAGAAGATGATC
SmRad23Ce	AAGTTACCTTCAAAACACTGATGCAACAGACGTTTGTCTTGACTTTCAAGAAGATGATC
SmRad23Eq	AAGTTACCTTCAAAACACTGATGCAACAGACGTTTGTCTTGACTTTCAAGAAGATGATC
SmRad23Ov	AAGTTACCTTCAAAACACTGATGCAACAGACGTTTGTCTTGACTTTCAAGAAGATGATC *****
SmRad23Va	TGATTGGCGACGTTAAGAAGAAAAATCGAAGCGAAATGGGGCAGCGAATTCGATGCAAGGA
SmRad23Ep	TGATTGGCGACGTTAAGAAGAAAAATCGAAGCGAAATGGGGCAGCGAATTCGATGCAAGGA
SmRad23Ce	TGATTGGCGACGTTAAGAAGAAAAATCGAAGCGAAATGGGGCAGCGAATTCGATGCAAGGA
SmRad23Eq	TGATTGGCGACGTTAAGAAGAAAAATCGAAGCGAAATGGGGCAGCGAATTCGATGCAAGGA
SmRad23Ov	TGATTGGCGACGTTAAGAAGAAAAATCGAAGCGAAATGGGGCAGCGAATTCGATGCAAGGA *****
SmRad23Va	CTCAGAACTAATACTACTCAGGCAAGGTGATGGAAGATAGTAAATCGCTAAAAGATTACA
SmRad23Ep	CTCAGAACTAATACTACTCAGGCAAGGTGATGGAAGATAGTAAATCGCTAAAAGATTACA
SmRad23Ce	CTCAGAACTAATACTACTCAGGCAAGGTGATGGAAGATAGTAAATCGCTAAAAGATTACA
SmRad23Eq	CTCAGAACTAATACTACTCAGGCAAGGTGATGGAAGATAGTAAATCGCTAAAAGATTACA
SmRad23Ov	CTCAGAACTAATACTACTCAGGCAAGGTGATGGAAGATAGTAAATCGCTAAAAGATTACA *****
SmRad23Va	AAGTGACAGAATCTGGTTTCGTCGTAGTAATGTCTGTTTCAAAGCCATCCAAAGATACAA
SmRad23Ep	AAGTGACAGAATCTGGTTTCGTCGTAGTAATGTCTGTTTCAAAGCCATCCAAAGATACAA
SmRad23Ce	AAGTGACAGAATCTGGTTTCGTCGTAGTAATGTCTGTTTCAAAGCCATCCAAAGATACAA
SmRad23Eq	AAGTGACAGAATCTGGTTTCGTCGTAGTAATGTCTGTTTCAAAGCCATCCAAAGATACAA
SmRad23Ov	AAGTGACAGAATCTGGTTTCGTCGTAGTAATGTCTGTTTCAAAGCCATCCAAAGATACAA *****
SmRad23Va	CGAAAGAAGCTAGTGCTTCAGTACAAAGTAATCCTACTGGTGAAACAAAGCCAACAACAG
SmRad23Ep	CGAAAGAAGCTAGTGCTTCAGTACAAAGTAATCCTACTGGTGAAACAAAGCCAACAACAG
SmRad23Ce	CGAAAGAAGCTAGTGCTTCAGTACAAAGTAATCCTACTGGTGAAACAAAGCCAACAACAG
SmRad23Eq	CGAAAGAAGCTAGTGCTTCAGTACAAAGTAATCCTACTGGTGAAACAAAGCCAACAACAG
SmRad23Ov	CGAAAGAAGCTAGTGCTTCAGTACAAAGTAATCCTACTGGTGAAACAAAGCCAACAACAG *****
SmRad23Va	ACAAAAAAGCCCCGTGACAGAAGCGAATGAAGCCCCGAGCAGTAAACCAGACGCCAATT
SmRad23Ep	ACAAAAAAGCCCCGTGACAGAAGCGAATGAAGCCCCGAGCAGTAAACCAGACGCCAATT
SmRad23Ce	ACAAAAAAGCCCCGTGACAGAAGCGAATGAAGCCCCGAGCAGTAAACCAGACGCCAATT
SmRad23Eq	ACAAAAAAGCCCCGTGACAGAAGCGAATGAAGCCCCGAGCAGTAAACCAGACGCCAATT
SmRad23Ov	ACAAAAAAGCCCCGTGACAGAAGCGAATGAAGCCCCGAGCAGTAAACCAGACGCCAATT *****
SmRad23Va	CCCAATCTAATTACCTACAGTTACAACAGCCCCATCTAGCGCAACCAGTACTTTGGGTT
SmRad23Ep	CCCAATCTAATTACCTACAGTTACAACAGCCCCATCTAGCGCAACCAGTACTTTGGGTT
SmRad23Ce	CCCAATCTAATTACCTACAGTTACAACAGCCCCATCTAGCGCAACCAGTACTTTGGGTT
SmRad23Eq	CCCAATCTAATTACCTACAGTTACAACAGCCCCATCTAGCGCAACCAGTACTTTGGGTT
SmRad23Ov	CCCAATCTAATTACCTACAGTTACAACAGCCCCATCTAGCGCAACCAGTACTTTGGGTT *****
SmRad23Va	TTGGAGAGAGTTCCTTAGTTACTGGAGAGAATTTTGAGCGGGTTGTAAAAGAACTAATGT
SmRad23Ep	TTGGAGAGAGTTCCTTAGTTACTGGAGAGAATTTTGAGCGGGTTGTAAAAGAACTAATGT
SmRad23Ce	TTGGAGAGAGTTCCTTAGTTACTGGAGAGAATTTTGAGCGGGTTGTAAAAGAACTAATGT
SmRad23Eq	TTGGAGAGAGTTCCTTAGTTACTGGAGAGAATTTTGAGCGGGTTGTAAAAGAACTAATGT
SmRad23Ov	TTGGAGAGAGTTCCTTAGTTACTGGAGAGAATTTTGAGCGGGTTGTAAAAGAACTAATGT *****
SmRad23Va	CCATGGGTTTTGAGAGATCATTGGTAATCCAAGCAATGCGAGCAGGCTTCAACAACCCCG
SmRad23Ep	CCATGGGTTTTGAGAGATCATTGGTAATCCAAGCAATGCGAGCAGGCTTCAACAACCCCG
SmRad23Ce	CCATGGGTTTTGAGAGATCATTGGTAATCCAAGCAATGCGAGCAGGCTTCAACAACCCCG
SmRad23Eq	CCATGGGTTTTGAGAGATCATTGGTAATCCAAGCAATGCGAGCAGGCTTCAACAACCCCG
SmRad23Ov	CCATGGGTTTTGAGAGATCATTGGTAATCCAAGCAATGCGAGCAGGCTTCAACAACCCCG *****

SmRad23Va ATAGAGCATTGTAATACCTTTTCATCAGGAAACATTCCGAATGTTGACATTGTTGACCAGT
 SmRad23Ep ATAGAGCATTGTAATACCTTTTCATCAGGAAACATTCCGAATGTTGACATTGTTGACCAGT
 SmRad23Ce ATAGAGCATTGTAATACCTTTTCATCAGGAAACATTCCGAATGTTGACATTGTTGACCAGT
 SmRad23Eq ATAGAGCATTGTAATACCTTTTCATCAGGAAACATTCCGAATGTTGACATTGTTGACCAGT
 SmRad23Ov ATAGAGCATTGTAATACCTTTTCATCAGGAAACATTCCGAATGTTGACATTGTTGACCAGT

SmRad23Va CACGGGAAAGGGAAGAGAGCGAAAGTGTATCTCCAGAAGGACCTGGGGATACTGACACCC
 SmRad23Ep CACGGGAAAGGGAAGAGAGCGAAAGTGTATCTCCAGAAGGACCTGGGGATACTGACACCC
 SmRad23Ce CACGGGAAAGGGAAGAGAGCGAAAGTGTATCTCCAGAAGGACCTGGGGATACTGACACCC
 SmRad23Eq CACGGGAAAGGGAAGAGAGCGAAAGTGTATCTCCAGAAGGACCTGGGGATACTGACACCC
 SmRad23Ov CACGGGAAAGGGAAGAGAGCGAAAGTGTATCTCCAGAAGGACCTGGGGATACTGACACCC

SmRad23Va CAGGCTCTGAGTCCCTTGGCTCAGAAGATCCGATCGCTGCACTCGCAAGTTTACCCAGT
 SmRad23Ep CAGGCTCTGAGTCCCTTGGCTCAGAAGATCCGATCGCTGCACTCGCAAGTTTACCCAGT
 SmRad23Ce CAGGCTCTGAGTCCCTTGGCTCAGAAGATCCGATCGCTGCACTCGCAAGTTTACCCAGT
 SmRad23Eq CAGGCTCTGAGTCCCTTGGCTCAGAAGATCCGATCGCTGCACTCGCAAGTTTACCCAGT
 SmRad23Ov CAGGCTCTGAGTCCCTTGGCTCAGAAGATCCGATCGCTGCACTCGCAAGTTTACCCAGT

SmRad23Va TTCAACAAATGAGAGCGCTA
 SmRad23Ep TTCAACAAATGAGAGCGCTA
 SmRad23Ce TTCAACAAATGAGAGCGCTA
 SmRad23Eq TTCAACAAATGAGAGCGCTA
 SmRad23Ov TTCAACAAATGAGAGCGCTA

B

SmRad4Va ACACGTTCTATTTCGTTCTTTCATGCTCTAATTTTGTGTCATTCAATTTGTTCTGTACGCCAT
 SmRad4Ep ACACGTTCTATTTCGTTCTTTCATGCTCTAATTTTGTGTCATTCAATTTGTTCTGTACGCCAT
 SmRad4Ce ACACGTTCTATTTCGTTCTTTCATGCTCTAATTTTGTGTCATTCAATTTGTTCTGTACGCCAT
 SmRad4Eq ACACGTTCTATTTCGTTCTTTCATGCTCTAATTTTGTGTCATTCAATTTGTTCTGTACGCCAT
 SmRad4Ov ACACGTTCTATTTCGTTCTTTCATGCTCTAATTTTGTGTCATTCAATTTGTTCTGTACGCCAT

SmRad4Va GCATCAATAAGAACTGGTACAGACTCTTTACAAACAACATAACCTTTTATATTTGGATGA
 SmRad4Ep GCATCAATAAGAACTGGTACAGACTCTTTACAAACAACATAACCTTTTATATTTGGATGA
 SmRad4Ce GCATCAATAAGAACTGGTACAGACTCTTTACAAACAACATAACCTTTTATATTTGGATGA
 SmRad4Eq GCATCAATAAGAACTGGTACAGACTCTTTACAAACAACATAACCTTTTATATTTGGATGA
 SmRad4Ov GCATCAATAAGAACTGGTACAGACTCTTTACAAACAACATAACCTTTTATATTTGGATGA

SmRad4Va GCCCAACCACTACCATGAAATGTCCAACCAACAACAGCTTCTGCACAATCAATTCCAAGT
 SmRad4Ep GCCCAACCACTACCATGAAATGTCCAACCAACAACAGCTTCTGCACAATCAATTCCAAGT
 SmRad4Ce GCCCAACCACTACCATGAAATGTCCAACCAACAACAGCTTCTGCACAATCAATTCCAAGT
 SmRad4Eq GCCCAACCACTACCATGAAATGTCCAACCAACAACAGCTTCTGCACAATCAATTCCAAGT
 SmRad4Ov GCCCAACCACTACCATGAAATGTCCAACCAACAACAGCTTCTGCACAATCAATTCCAAGT

SmRad4Va TTTCTAGCAATATACTGTATACCAGAAAGACATAAGTGTGCACAGCCTATGGGGAGCATG
 SmRad4Ep TTTCTAGCAATATACTGTATACCAGAAAGACATAAGTGTGCACAGCCTATGGGGAGCATG
 SmRad4Ce TTTCTAGCAATATACTGTATACCAGAAAGACATAAGTGTGCACAGCCTATGGGGAGCATG
 SmRad4Eq TTTCTAGCAATATACTGTATACCAGAAAGACATAAGTGTGCACAGCCTATGGGGAGCATG
 SmRad4Ov TTTCTAGCAATATACTGTATACCAGAAAGACATAAGTGTGCACAGCCTATGGGGAGCATG

SmRad4Va CAAGGTTTAAACAAGTCAACATTTCCATGTGCATTACGTGGGACAATACCATTTTCAGCT
 SmRad4Ep CAAGGTTTAAACAAGTCAACATTTCCATGTGCATTACGTGGGACAATACCATTTTCAGCT
 SmRad4Ce CAAGGTTTAAACAAGTCAACATTTCCATGTGCATTACGTGGGACAATACCATTTTCAGCT
 SmRad4Eq CAAGGTTTAAACAAGTCAACATTTCCATGTGCATTACGTGGGACAATACCATTTTCAGCT
 SmRad4Ov CAAGGTTTAAACAAGTCAACATTTCCATGTGCATTACGTGGGACAATACCATTTTCAGCT

SmRad4Va	TTCGGTGGTGCATACGGTTCCACTTGCCATGGACCGAATATTTCAACAGTTGGAGGTGTA
SmRad4Ep	TTCGGTGGTGCATACGGTTCCACTTGCCATGGACCGAATATTTCAACAGTTGGAGGTGTA
SmRad4Ce	TTCGGTGGTGCATACGGTTCCACTTGCCATGGACCGAATATTTCAACAGTTGGAGGTGTA
SmRad4Eq	TTCGGTGGTGCATACGGTTCCACTTGCCATGGACCGAATATTTCAACAGTTGGAGGTGTA
SmRad4Ov	TTCGGTGGTGCATACGGTTCCACTTGCCATGGACCGAATATTTCAACAGTTGGAGGTGTA

SmRad4Va	GAATCAGAACCTTGTAACAACCTTACGTTTCATTGATAAACGAGCTTTAACAACCTTTTGCA
SmRad4Ep	GAATCAGAACCTTGTAACAACCTTACGTTTCATTGATAAACGAGCTTTAACAACCTTTTGCA
SmRad4Ce	GAATCAGAACCTTGTAACAACCTTACGTTTCATTGATAAACGAGCTTTAACAACCTTTTGCA
SmRad4Eq	GAATCAGAACCTTGTAACAACCTTACGTTTCATTGATAAACGAGCTTTAACAACCTTTTGCA
SmRad4Ov	GAATCAGAACCTTGTAACAACCTTACGTTTCATTGATAAACGAGCTTTAACAACCTTTTGCA

SmRad4Va	GGTTTTTCATGAAGACGAACAGTCATACCTCTTTTAACCATGATTCTCTGGTATGACAAA
SmRad4Ep	GGTTTTTCATGAAGACGAACAGTCATACCTCTTTTAACCATGATTCTCTGGTATGACAAA
SmRad4Ce	GGTTTTTCATGAAGACGAACAGTCATACCTCTTTTAACCATGATTCTCTGGTATGACAAA
SmRad4Eq	GGTTTTTCATGAAGACGAACAGTCATACCTCTTTTAACCATGATTCTCTGGTATGACAAA
SmRad4Ov	GGTTTTTCATGAAGACGAACAGTCATACCTCTTTTAACCATGATTCTCTGGTATGACAAA

SmRad4Va	GATGAAGACAATCACGAGAATAAACCGGTTTCATTACGAAAATATCCCAAAGGGATTGAAT
SmRad4Ep	GATGAAGACAATCACGAGAATAAACCGGTTTCATTACGAAAATATCCCAAAGGGATTGAAT
SmRad4Ce	GATGAAGACAATCACGAGAATAAACCGGTTTCATTACGAAAATATCCCAAAGGGATTGAAT
SmRad4Eq	GATGAAGACAATCACGAGAATAAACCGGTTTCATTACGAAAATATCCCAAAGGGATTGAAT
SmRad4Ov	GATGAAGACAATCACGAGAATAAACCGGTTTCATTACGAAAATATCCCAAAGGGATTGAAT

SmRad4Va	CAGGTGGATAAATAACTTGAAATTTAAGTAAATGGCGTTGGAGAACGTACAATGGATGAT
SmRad4Ep	CAGGTGGATAAATAACTTGAAATTTAAGTAAATGGCGTTGGAGAACGTACAATGGATGAT
SmRad4Ce	CAGGTGGATAAATAACTTGAAATTTAAGTAAATGGCGTTGGAGAACGTACAATGGATGAT
SmRad4Eq	CAGGTGGATAAATAACTTGAAATTTAAGTAAATGGCGTTGGAGAACGTACAATGGATGAT
SmRad4Ov	CAGGTGGATAAATAACTTGAAATTTAAGTAAATGGCGTTGGAGAACGTACAATGGATGAT

Figura 7. Alinhamento entre os transcritos SmRad23 (A) e SmRad4 (B) nos diferentes estágios de vida de *S. mansoni*. Va-Verme adulto; Ep-Esporocisto; Ce-Cercária; Eq-Esquistossômulo; Ov-Ovos. O alinhamento foi realizado com o auxílio do programa CLUSTALW (www.ebi.ac.uk).

4.3. Alinhamento das Sequências Preditas de Aminoácidos com seus Ortólogos

As seqüências de aminoácidos preditas para Rad23 e Rad4 foram obtidas com o auxílio do programa ORF finder (www.ncbi.nlm.nih.gov), a partir das seqüências de nucleotídeos dos transcritos amplificados do cDNA de vermes adultos.

Como demonstrado na literatura, a seqüência de aminoácidos predita para SmRad23 também apresenta os domínios característicos: UBL, UBA1, UBA2 e RB4

(Figura 8A). Embora tenha sido utilizada a sequência incompleta para SmRad4, foi verificada a presença parcial de seu domínio característico (Figura 8B).

A

41	atgaaagttaaccttcaaaaacactgatgcacacagatgtttgtcttt
	M K V T F K T L M Q Q T F V L
86	gacttttcaagaa gatgatcttgattggcgacgttaagaagaaatc
	D F Q E D D L I G D V K K K I
131	gaagcgaatggggcagcgaattcgaatgaaggacacagaaacta
	E A K W G S E F D A R T Q K L
176	ataacttcaggc aaggtgatggaagata gtaaatcgttaaaagat
	I H S G K V M E D S K S L K D
221	tataaagtgcacagaattctgggttctgtcgtagttaattgtctgttca
	V K V T E S G F V V V M S V S
266	aagcctatccaaa gatataaacgaaagaagctagtgtttcagatcaa
	K P S K D T T K E A S A S V Q
311	agtaactctactcggcgaatacaaaagccacaaacagataaaa aaagc
	S N P T G E T K P T T D K K S
356	cccgctgacagaa gcaatgaagcccc gacagtaaaacacagacgc
	P V T E A N E A P S S K P D A
401	aattcccaatctaacctaacctacagttacaaacagccccatctagc
	N S Q S N L P T V T T A P S S
446	gcacacagtaactttgggttttggagagagttccttagttactgga
	A T S T L G F G E S S L V T G
491	gagaattttgagcgggttctgtaaaagaactaatgtccatgggtttt
	E N F E R V V K E L M S M G F
536	gagagatcattggtaatccaaagcaatgcagcagggcttcacaaac
	E R S L V I Q A M R A G F N M
581	cccgatagagcatttgaatacctttcctcagggaataattccgaat
	P D R A F E Y L S S G N I P N
626	gttgacattgttgaccagtcacggga aa gggaaagagagc ga aagt
	V D I V D Q S R E R E E S E S
671	gtatctccagaa ggaactcggggatctgacacccacaggctcttgag
	V S P E G P G D T D T P G S E
716	ccccctggctcagaagatccgacgcgtgcactcgcgaagtttacc
	S L G S E D P I A A L A S L P
761	cagtttcaacaaatgagagcgttagtcaaaacaaatccagagcta
	Q F Q Q M R A L V Q A N P E L
806	ctgcttcagctc atccagcaaatagggaatgataatgca gattta
	L P Q L I Q Q I G N D N A D L
851	tttaggctcattc aagaaaaatgaacaaagcctttctggaaattatt
	F R L I Q E N E Q A F L E F I
896	aataccccagtc actggtaactactcgarccggtagtcagcgtcaa
	N T P V T G T T R P G S Q R Q
941	actgtcttgacc atgactgctgaggaacgcgtgctgtggtcgt
	T V L T M T A E E R A A V D R
986	ctaaaaggcatta ggggtttcggagga gttgggttatccaa gatat
	L K A L G F P E E L V I Q A Y
1031	tatgcgtgcagagaaaaatgaggatgcagctgcgaatttcctgctt
	Y A C E K N E D A A A N F L L
1076	agtgaagttta gacgatgagatggcgtgga 1105
	S E S L D D E M V *



B

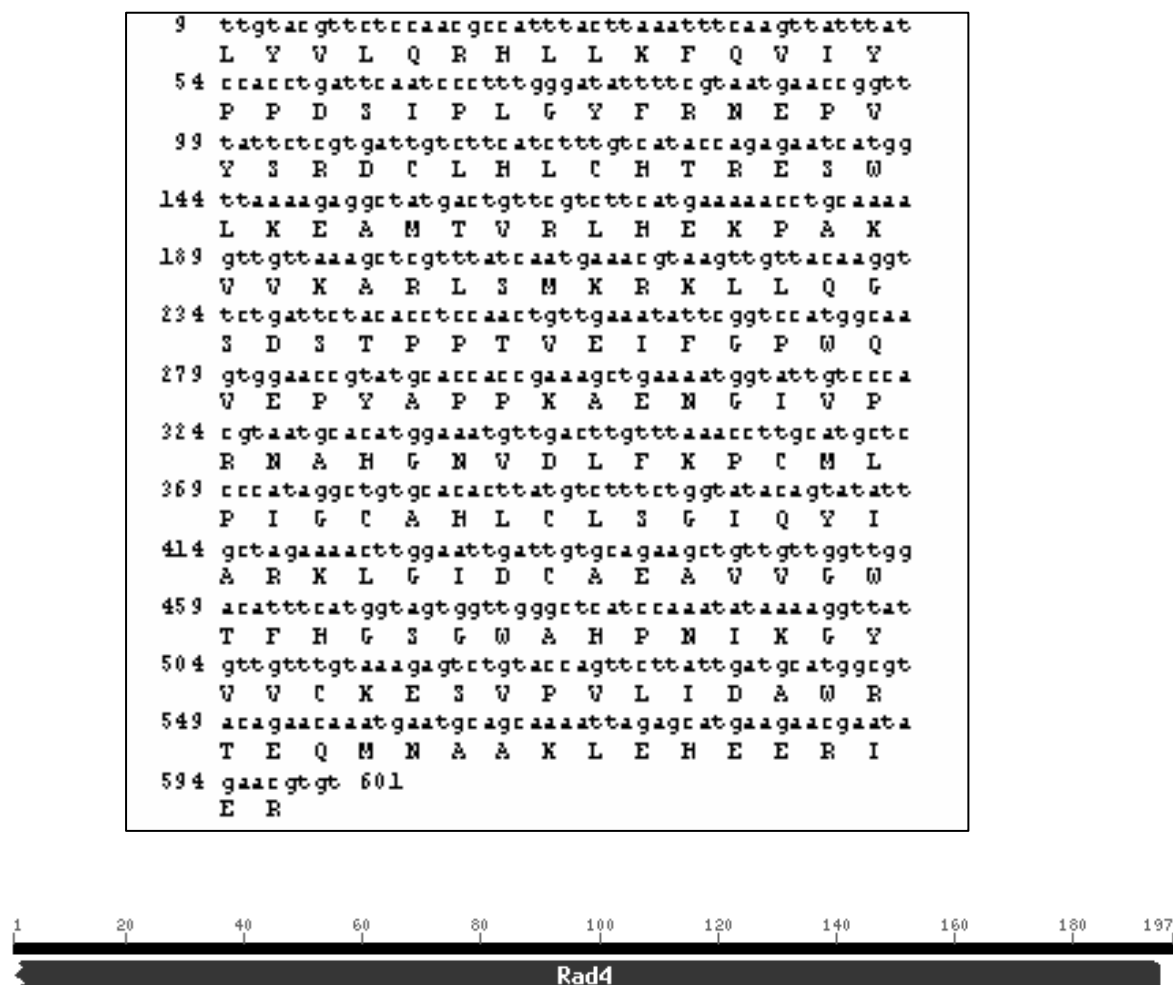


Figura 8. Sequências de nucleotídeos e aminoácidos obtidas dos transcritos amplificados (A) SmRad23 e (B) SmRad4, com seus respectivos domínios.

A análise das seqüências preditas de aminoácidos para SmRad23 revelou uma porcentagem de cobertura de aproximadamente 95% quando comparada com o tamanho médio de 380 aminoácidos da seqüência de Rad23 de outros organismos, o que pode ser observado na **Figura 9A**. Com relação a SmRad4, a seqüência predita de aminoácidos revelou uma porcentagem de cobertura de aproximadamente 20% (**Figura 9B**).

A

ScRad23	-----MQVTLKTLQ	9
HsRad23	-----MQVTLKTLQ	9
SmRad23	-----MKVTFKTLM	9
AtRad23	-----MKLTVKTLK	9
DmRad23	-----MIITIKNLQ	9
CeRad23	MTILAGLATKSVQIMCAFKTPSHFLFCFLPLILFFKMVFLFCSFINNQMMLSVTFRTLT	60
	: : * . . *	
ScRad23	QQTfKIDIDPEETVKALKEKIESEKGDAPFVAGQKLIYAGKILNDDTALKEYKIDEKNF	69
HsRad23	QQTfKIDIDPEETVKALKEKIESEKGDAPFVAGQKLIYAGKILNDDTALKEYKIDEKNF	69
SmRad23	QQTfVLDfQEDDLIGDVKKKIEAKWG-SEFDARTQKLIHSGVMEDSKSLKDYKVTESGF	68
AtRad23	GSHFEIRVLPsDTIMAVKKNIEDSQGKDNYPGQQLLIHNGKVLKDETSLVENKVTEEGF	69
DmRad23	QQTfTIEFAPEKTVLELKKKIFEERG-PEYVAEKQKLIYAGVILTDRTVGSYNVDEKKF	68
CeRad23	QVNFNLELNEDQTIAEVKALVASEKG-DDYAPELQKLIYNGKILDDSVKVGEGVFDSSKF	119
	* : . . . : * : . * : * ** : * : . . . *	
ScRad23	VVVMVTKPAVSTPAPATTQSSAPASTTAVTSSTTTTVAQAPTVPALAPTSTPASITPA	129
HsRad23	VVVMVTKPAVSTPAPATTQSSAPASTTAVTSSTTTTVAQAPTVPALAPTSTPASITPA	129
SmRad23	VVMS-----VSKPSKDTTKEASVQSNPTGETKPTDDK-----SPVTEA	110
AtRad23	LVVMLS-----KSKSGGSAGQASVQPVsATTSSSTKP-----AA	102
DmRad23	IVVMLT-----RDSSSSNRNQLSVKESNKLTSTDDSKQS-----MPCEEA	108
CeRad23	VVVMLS-----KRKVTEVAPSSSTVATAAEP-----VPV	147
	: *** : . . : . . .	
ScRad23	SATASSEPPAPASAAKQEKPAEKPAETPVATSPTATDSTSGDSSRSNLFEDATSALVTGQS	189
HsRad23	SATASSEPPAPASAAKQEKPAEKPAETPVATSPTATDSTSGDSSRSNLFEDATSALVTGQS	189
SmRad23	NEAPSSKPDANSQSNLP-----TVTTAPSSATSTLG-----FGESS--LVTGEN	152
AtRad23	PSTTQSSPVPASP-----IPAQEQPAAQTDTYG-----QAASLTVSGSS	141
DmRad23	NHTNSPSTNTEDSVLS-----RETRPLSSDELIGELAQASLQsRAESNLLMGDE	158
CeRad23	AAAPASNPAADVAP-----EAAAPAEAEALTD-----E	177
	: * . : . . .	
ScRad23	YENMVTEIMSMG---YEREQVIAALRASFNNDRAVEYLLMGIPGDRESQAVVDPPQAAS	246
HsRad23	YENMVTEIMSMG---YEREQVIAALRASFNNDRAVEYLLMGIPGDRESQAVVDPPQAAS	246
SmRad23	FERVVKELMSMG---FERSLVIQAMRAGFNNDRAFEYLSS---GNIPNVDIVD---QS	202
AtRad23	LEQMVQQIMEMGGGSWDKETVTRALRAAYNNPERAVDYLYSGIPQTAEVAVPVPEAQIAG	201
DmRad23	YNQTVLSMVEMG---YPREQVERAMAASYNNDRAVEYLINGIPAEEG-----TFYNRLN	210
CeRad23	QEENVLAITGMG---YDREQTIAALRAAFWNPDRAVEFLNG-----LP	218
	: . * : ** : . . * : * : * : * : * : *	
ScRad23	TGAPQSSAVAAAAAATT-----TATTTTTSSGG-HPLEFLRNQPQFQQMRQIIQQNPSLL	299
HsRad23	TGVPQSSAVAAAAAATT-----TATTTTTSSGG-HPLEFLRNQPQFQQMRQIIQQNPSLL	299
SmRad23	RERESESVSPEGPGD-----TDTPGSESLGSEDP IAALASLPQFQQMRALVQANPELL	256
AtRad23	SGAAPVAPASGGPNSSPLDLFPQETVAAAGSGDLGTLEFLRNNDQFQQLRTMVHSNPQIL	261
DmRad23	ESTNPSLIPSGPQPAS-----ATSAERSTESNSDPFEFLRSQPQFLQMRSLIYQNPHLL	264
CeRad23	DDAADQEPDLGP-----EQNIDNVEDGNDLNLMLANMPQLAEIRALIQQNPEML	268
	. . . : * . * : : * : * : *	
ScRad23	PALLQQIGRENPLLQQISQHQEHFIQMLNEPVQEAGGQGGGG-----	342
HsRad23	PALLQQIGRENPLLQQISQHQEHFIQMLNEPVQEAGGQGGGG-----	342
SmRad23	PQLIQQIGNDNADLFRLIQENEQAFLEFINTPVT-----	290
AtRad23	QPMLQELGKQNPQLRLIQENQAEFLQLVNEPYEGSDGEG-----	301
DmRad23	HAVLQQIGQTNPALLQLISENQDAFLNMLNQPIDRESESGATVPPVSNARIPSTLDNVDL	324
CeRad23	AAVLQQLAAVNPRLVQTIQNNQAFMDLLNGGAQGAGAAAG-----	309
	: * : . . * . * : * : : * : * : *	
ScRad23	-----GGGSGGIAEAGSGHMN-----YIQVTPQEKEAIERLKALGF	378
HsRad23	-----GGGSGGIAEAGSGHMN-----YIQVTPQEKEAIERLKALGF	378
SmRad23	-----GTTTPGSQRQT-----VLTMTAEERAADVRLKALGF	321
AtRad23	-----DMFDQPEQEMPH-----AINVTPAEQEAIRLEAMGF	333
DmRad23	FSPDLEVATSQRSAAAGTSAAHQSGSAADNEDLEQPLGVSTIRLNRQDKDAIERLKALGF	384
CeRad23	-----NAPERNTPRRH-----VIHLSPEEAAAIERIKAIVV	340
	. : . . : * : * : * : *	
ScRad23	--PEGLVIQAYFACEKNENLAANFLLQQNFDEDL--	410
HsRad23	--PEGLVIQAYFACEKNENLAANFLLQQNFDED--	409
SmRad23	--PEELVIQAYYACEKNEDAAANFLLSESLDDEM--	354
AtRad23	--DRALVIEAFLACDRNEELAANYLLENSGDFED--	365
DmRad23	--PEALVLQAYFACEKNEEQANFLLSSSFDD--	414
CeRad23	NAPEAVVVEAYFACDKNEEAANFIFSNLDEE--	372
	. : * : * : * : * : * : * : * : *	

B

SmRad4	-----	
DmRad4	MSDEEEDSVSEGFSASEDEWKPSKDVKGESSDDDDSDFDELQAEGGAAGSSGRSSAVAG	60
HsRad4	-----MARKRAAGGEPRGRELRS	18
CeRad4	---METRRSSRLQQTTSDLNAREEPQPSEPPVKRARGAKKNEAPSTAMPKTTKKST	57
AtRad4	-----MMTPFWDCLTVVFLVLMML	18
ScRad4	-----MKVKMLKETVILK	13
SmRad4	-----	
DmRad4	KRGDHKAPSGIKGSSVKKRKPTGQSLRSKLYNKYRPPPKTFPTSPSQQENTPRASGSKN	120
HsRad4	QKSKAKS-----KARREEEEDAFEDEKPPKKSLLSKVSQGRKR	58
CeRad4	KPSRKQGSPIEAELDEMGELENEEEAEIVVQKSKNGRKLVKIDENLRISAENGSKSSN	117
AtRad4	RFLLMKS-----RSESKNCRLAQASRVAVNKNVLDKSSAR-----	52
ScRad4	KNLNKWS-----WKRKKLSFLLKLVRKWKQLHDSPSLKLLRN-----	51
SmRad4	-----	
DmRad4	AKTPNESGARNQHDPADSSSESSVEDYLVNPADLDLHSTFFAGGQKEKSPAPQFDCNAGI	180
HsRad4	-----GCSHPGGSADGPAKKKVAKVTVK-----SEN	85
CeRad4	FLEENRMEIDEKPGNLAKKSSKNGSRVVKSEKSENLVQSVPKSTTNGSKVAI IEDDPEI	177
AtRad4	-----GSRGKKKQDDNCDSAKRDKG-----VNGKG	77
ScRad4	-----	
SmRad4	-----	
DmRad4	TNLSDSGSEDNNESSFEDKAGNAFDFRGLLENANSLERTRDALSKRNVATATPPRSQAATM	240
HsRad4	KVIKDEALSDGDDLRL-----DFPSDLKKAHHLKR-----	114
CeRad4	RAENGVKSSKSDEKPDFSAQNGSKLAQNAPNRI SRPRS-----	216
AtRad4	KQALDARLIDN-----	88
ScRad4	-----	
SmRad4	-----	
DmRad4	DVNALLALGENQNYQSVEVEEREQNRKKAGRGAPAAPPTLDEPSRLSKTKSTRIKRHTK	300
HsRad4	-----GATMNEDSNEEEESEENDWEEVEELSEPVLGDVRESTAFSRS-----	156
CeRad4	-----VTTAKKVSYVPSDDQLELSSSSSELESSEDEDTEIRPKTGSKI AKK-----	263
AtRad4	-----VLEDRGCGNVDDDEMNDSDWEDCPIPS-----	115
ScRad4	-----IISAFKVAVNLNKEENIEDYK-----	72
SmRad4	-----	
DmRad4	TRPVSTVVANAGDTDDSDFEVADADLSSDQDDGETPNI SGDL EIRVGLEGLRPTKEQKT	360
HsRad4	-----LLPVKPV EIEIETPEQAKTRERSEKI	182
CeRad4	-----REKSFKISESESSESPPDDESEASEASEDPSI	295
AtRad4	-----LDSTVDDNNVDDTREL	131
ScRad4	-----YAITDEKAL	81
SmRad4	-----	
DmRad4	QHELEMALKRRLNRDIKDRQILLHKVSLMCQIARSLKYNRLLESDSLMLQATLKLPSRN	420
HsRad4	KLEFETYLRAMKRFNKGVEDTHKVHLLCLLANGFYRNINCSQPD-LHAIGLSIIPARF	241
CeRad4	PGPSEPRKRRKIQRKSTLSSGGATTKDLHWPCKSKASIARKTGNPGSKNAAKKPAKSSLR	355
AtRad4	TIEFDDVDPDAKKQKNAYRATAEDKAALLSLLPSYLTQVSNLEKVTVDIAPLLRWVREN	191
ScRad4	DELMFMVLKDVPQAIQKMAPYKIVKGARTLPNGGNVSRVSSIVKSHAGSLILLNDITNT	141
SmRad4	-----	
DmRad4	AYPTERGTELKYLQSFVTWFKTSIKLLSPNLYSAQSPATKEAILEALLEQVKRKEARCKQ	480
HsRad4	TRVLPRDQVDTYYLSNLVKWFIGTFTVN-----AELSASEQDNLQTTLERRFAIYSARDDE	296
CeRad4	MAQKQK-PDQPWKKNLKDYEYETDRKLAKGERRMLEYRHHVAHAYVARGKIEEITYDEAYKLH	414
AtRad4	FSVSCSPSSEKSFRTSLAFALESRGTAEEAALAVALLRALKLTRFVSILDVASLKPG	251
ScRad4	ETAALVLHVSVELMPYLLSYRRILKELIKSIVGVWSTTRELQTQIASFAFLINTTKEFKK	201

SmRad4	-----	
DmRad4	DMIFIFIALARGMGHCLIVNLQPMPLRPAASDLPIKLRPDDKNKSQTVESERESSEDE	540
HsRad4	ELVHIFLLILRALQLLTRLVLSLQPIPLKSAT-----	AKGK 332
CeRad4	EMMKAYFAGRSLLDAAVLDPVEFEKSQKNVK-----	KSEK 450
AtRad4	ADRNESGQNRAMKHGIFRTSTLMVPKQQAIS-----	SYPK 288
ScRad4	SMLETTLKQRTSTFIKSCRKTNMRSMLP---IN-----	FQK 234
SmRad4	-----	
DmRad4	KPKKDKKAGKPAEKESKSTISKEAEKKNNAKAEAKPLSKSTTKGSETTKSGTVPKVKK	600
HsRad4	KPSKERLTADPGGSSETSSQVLEN-----	HTKPKTSKGTQEEFAGTCRPSAK 382
CeRad4	NDEKNTAGDSSSEDEWEEMEHFQPPIDDNIEVSIHDEGGGDDGEEVVKDWWAIYLRQ	510
AtRad4	KSSSHVKNKSPFEKPQLGNPLGSD-----	QVQDNAVNSSCEAGMSIKSDGTRRKGDV 340
ScRad4	NSAAELFGIDEVLGYQVG-----	FEYIRQLAIHLRNTMNATTKKSSKI 277
SmRad4	-----	
DmRad4	ELSLSSKLVEKSKHQKAHTSSKSDTSFDEKPSTSSSSKCLKEEYSELGLSKLLKPTLSS	660
HsRad4	GK-----	RNKGGRKKRSKPSSEDEGPGD----- 407
CeRad4	EINRKIREMWENTHKVHLLCFMAHLKFVVKIALDES-----	546
AtRad4	EFERQIAMALSATADNQSSQVNNTKKVR-----	369
ScRad4	NSAEAYKIVYNWQFCHSLDFWSRVLSFACQ-----	307
SmRad4	-----	
DmRad4	KLVLKSKNQSSFSSNKSDTSFEENPSTSSSSKSLKEETAKLSSSKLEDKKVASSAETTK	720
HsRad4	-----	KQEKATQRRPHGRERRVASRVSYPEE 433
CeRad4	-----	LVPSLMMSQLPNGYLKFIFGPVVPIDIMKNLV 578
AtRad4	-----	EITKISNSSSVSDQVISTAFGSK-- 392
ScRad4	-----	PEKENGSESPLRQLIYP----- 324
SmRad4	-----	
DmRad4	VQSSLLKRVTTQNISESQSGSKSKVAPVDTFSPVAGRTRRATVKPKTEEKPVVGSPVIP	780
HsRad4	SGS-----	DEAGSGSDFELSSGEASDPSD----- 457
CeRad4	KWFADAFRPLNGVSVASIEQDSLLEGHEARYPETRR-----	LTALVDA 622
AtRad4	-----	KVDSPLCWLEVY----- 404
ScRad4	-----	
SmRad4	-----	
DmRad4	KLMLSKVKQLNAKHSPTENASPANKHLQEQRNTRTRSRSKSPKVLISPSFLKKKSDGAD	840
HsRad4	-----	EDSEPGPPQQRKAPAPQRTKAGSKSASRTHRGSHRKDPSLPAA 500
CeRad4	KCFETDLDRATLLFCLLRGLELTTRLVNVNRAIPRWDKTQQKELQNELSKFRELSRSRS	682
AtRad4	-----	CNGENMDGKWVHVDVANGMIDAEQNIIEAAAAACKTVLRYVVA 447
ScRad4	-----	LVQVTLGVIIRLIPTPQFFPLRFYLIKSLIRLSQNSGVFIPIY 366
SmRad4	-----	
DmRad4	STSAPOKHQMAPETKARISPFLSEALPARQLRSRGQKASSLAIPQLDGGDDVPLPKKRP	900
HsRad4	SSSS-----	SSSKRGKKMCSDEGEKAE----- 521
CeRad4	TTPGEKSLEIQE-----	KSGEKSQKPAKKGQKSEK----- 712
AtRad4	AAGG-----	451
ScRad4	PLLS-----	370
SmRad4	-----	
DmRad4	KLEKLKNSQDSDEVFEPKPVKKAPVLPKSVQNLRKDRVMSTDDDEGGSRLNRKTDASDM	960
HsRad4	-----	KRSIAGIDQ 530
CeRad4	-----	KAACKVVVEERNY 725
AtRad4	-----	AKDVTRR 458
ScRad4	-----	EIL 373

SmRad4	-----	
DmRad4	WVEVWSDVEEQWICIDLFKGLKHCVDITIRKNATPGLAYVFAFQDDQSLKDVTARYCASWS	1020
HsRad4	WLEVFCEQEEKWVCVDCVHGVVGQPLTCYKYATKPMTYVVGIDSDGWVRDVTQRYDPVWM	590
CeRad4	WVEYWQPREKRWICVDPLHKSVDLEPLSIHEHSASPISYVFAIDNKQGICEVSQRYAMDCV	785
AtRad4	YCTKWHITISSKRVSVMWDMVLAPLVHLESGATH--DEDIALRNFNGLNPVSSRASSSSS	516
ScRad4	TSTAFTKAPKSPNLAAAFHFEHNKCTQAYLNTKIYQEGLEQFVDLLGDYFALYCKN--	431
SmRad4	-----LYV	3
DmRad4	TTVRKARVEKAWLDET--IAPYLGRRTKRDITEDDQLRRIHSDKPLPKSISEFKDHPLYV	1078
HsRad4	TVTRKCRVDAEWAAET--LRPYQSPFMDREKKEDLEFQAKHMDQPLPTAIGLYKNHPLYA	648
CeRad4	KQDFRRRTNPKWVAWTLFLPPFAANSERKKWEMMQMREDLVKRPLPTVMSEYKNHPLYA	845
AtRad4	SFG-----IRSALEDMELATRALTESLPTNQAYKSHIYA	552
ScRad4	-----IAFPELVTPVVISLRRYIKTSTNVKLNKRLST	463
	:	:
SmRad4	LQRHLLKFQVIYPP--DSIPLGYFRNEPVYSRDCLHLCHTRESWLKEAMTVRLHEKPAKV	61
DmRad4	LERHLLKFQGLYPP--DAPTLGFIRGEAVYSRDCVHLLHSREIWLKSARVVKLGEQPYKV	1136
HsRad4	LKRHLLKYEAIYPE--TAAILGYCRGEAVYSRDCVHTLHSRDTWLKKARVVRLGEVPYKM	706
CeRad4	LEKDLLKFEAIYPPPATQKPLGQIRGHNVYPRSTVFTLQGENNWLKLARSVKIGEKPYKI	905
AtRad4	IEKWLHKNQILHPK--GPVLGFCSGHPVYPRTCVQTLKTKERWLRLDGLQLKANEVPSKI	609
ScRad4	VVEKLNQNSTFIQEKRSDFEFGPTNKSEVSRLFNDVAWNKTPLGSYVAVQREVKEEKARL	523
	: . * : . : : * * : . . * ::	
SmRad4	VKARLSMKRKL-LQGSdstpPT----VEIFGPWQVEPYAPPKAENGIVPRNAHGNVDLFK	116
DmRad4	VKARPKWDR---LTRTVIKDQP----LEIFGYWQTQEYEPPTAENGIVPRNAYGNVELFK	1189
HsRad4	VKGFSNRARKARLAEPQLREEND---LGLFGYWQTEEYQPPVAVDGKVPNEFGNVYLF	763
CeRad4	VKARPDPRIP-----VEDREDKF---LDVYGYWQTEKYRRPPLKNGKIPHNEYGNVYMF	957
AtRad4	LKRNSKFVKVDFEDGDNNIKGGSSCMELYGKWQMEPLCLPPAVNGIVPKNERGQVDVWS	669
ScRad4	MRESMEEQDKERETEEAKLLNSLESDDDNEDVENVRRLTTQDILFCLEFNSIVYKCVNK	583
	:: . . : . : : *	
SmRad4	PCMLPIGCAHLCLSGIQYIARKLGIDCAEAVVGWTFHGSWAHPNLIKGYVVCKESVPVLI	176
DmRad4	DCMLPKKTVHLRLPGLMRICKKLNIDCANAVVGDFH-QGACHPMYDGFIVCEEFRDVT	1248
HsRad4	PSMMPIGCVQLNLPNLHRVARKLDDICVQAITGDFH-GGYSHPVTDGYIVCEEFKDVLL	822
CeRad4	ENMCPLDCTYLKLSGLVQISRLKGKQCIPAVVGWAFD-GGFTHPVIDGAIVLEKDAIDFI	1016
AtRad4	EKCLPPGTVHLRFPRIFAVAKRFGIDYAPAMVGFEYR-SGGATPIFEGIVVCTEFKDTIL	728
ScRad4	RKVFFKAYISLCSHVLTCESKLSLVSWIFLYFGRFMDRKHKVRSMDLIKSNVDKQGTKM	643
	* : :: : . .	
SmRad4	DAWRTEQMNAAKLEHEERIER-----	197
DmRad4	AAWEEDQQVQVLKEQEKEYETRVYGNWKKLIKGLLIRERLKKKYNF-----	1293
HsRad4	TAWENEQAVIERKEKEKKEKRALGNWKKLLAKGLLIRERLKRRYGPKSEAAAPHTDAGG--	880
CeRad4	NAWEKLESGRAEKEEKQERVEKIHENWKKLIKGMLRLAYVRKQFGHPAAEKPTKRQKIG--	1074
AtRad4	EAYAEQEKKKEEERRRNEAQAASRWYQLLSSILTRERLKNRYANNSNDVEAKSLEVNSE	788
ScRad4	KEVRFTVIKFSKSFNSLKVPEIDMIANITENFSTRYMISYCWKISSNLNLGAMFMDN--	701
	. :	
SmRad4	-----	
DmRad4	-----	
HsRad4	-----GLSSDEEEGTSSQAEAAARILAAASWPQNREDEEKQKLKGGPKTKREKKAASHL	934
CeRad4	-----GKTEEIEENEGGAGPPSSVDHITDNTEQITPMHGFSLDDFINKKK-----	1119
AtRad4	TVVKAKNVKAPEKQVAKRGEKSRVRKSRNEDESHEHVFLDEEETFDEETSVKTKRCKCG	848
ScRad4	-----NSWNNSFAYGIVILIFISALLQVVHQPL-----	730
SmRad4	-----	
DmRad4	-----	
HsRad4	FPFEKL--	940
CeRad4	-----	
AtRad4	FSVEVEQM	856
ScRad4	-----	

Figura 9. Alinhamento entre as seqüências de aminoácidos preditas de (A) *Schistosoma mansoni* - **DQ311643** (SmRad23) com seqüências de outros eucariotos: *Saccharomyces cerevisiae* - **AAV38509** (ScRad23), *Homo sapiens* - **AAH20973** (HsRad23), *Arabidopsis thaliana* - **AAL34277** (AtRad23), *Drosophila melanogaster* - **AAF59352** (DmRad23), *Caenorhabditis elegans* - **NP_496488** (CeRad23); e (B) *Schistosoma mansoni* - **DQ311644** (SmRad4) com seqüências de outros eucariotos: *Drosophila melanogaster* - **CAA82262** (DmRad4), *Homo sapiens* - **AAH16620** (HsRad4), *Caenorhabditis elegans* - **AAF36063** (CeRad4), *Arabidopsis thaliana* - **BAB10190** (AtRad4), *Saccharomyces cerevisiae* - **CAA39375** (ScRad4). O alinhamento foi realizado com o auxílio do programa CLUSTALW (www.ebi.ac.uk).

(*) aminoácidos idênticos; (:) aminoácidos altamente conservados; (.) aminoácidos parcialmente conservados.

4.4. Grau de Identidade e Similaridade de SmRad23 e SmRad4 de *S. mansoni* com seus Ortólogos

Nas **tabelas 2 e 3**, estão representados os resultados da análise em banco de dados (BLASTp), entre as seqüências de aminoácidos preditas para Rad23 e Rad4 de *S. mansoni*, com seus ortólogos em *Homo sapiens*, *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana*, *Caenorhabditis elegans* e *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabela 2. Grau de Identidade (GI) e Similaridade (GS) entre a SmRad23 de *S. mansoni*, com seus ortólogos em outros organismos. **Hs** - *Homo sapiens*; **Sc** - *Saccharomyces cerevisiae*; **At** - *Arabidopsis thaliana*; **Dm** - *Drosophila melanogaster*; **Ce** - *Caenorhabditis elegans*.

Organismo	Nº de Acesso	Grau de Identidade (GI) e grau de Similaridade (GS) com SmRad23		Valor de e-
		GI	GS	
Hs	<i>AAH20973</i>	36 %	52%	46
Sc	<i>AAV38509</i>	36%	52%	47
At	<i>AAL34277</i>	34%	52%	39
Dm	<i>AAF59352</i>	33%	48%	61
Ce	<i>NP_496488</i>	31%	51%	60

Tabela 3. Grau de Identidade (GI) e Similaridade (GS) entre a SmRad4 de *S. mansoni*, com seus ortólogos em outros organismos. *Hs* - *Homo sapiens*; *Sc* - *Saccharomyces cerevisiae*; *At* - *Arabidopsis thaliana*; *Dm* - *Drosophila melanogaster*; *Ce* - *Caenorhabditis elegans*.

Organismo	Nº de Acesso	Grau de Identidade (GI) e grau de Similaridade (GS) com SmRad4 *		Valor de e-
		GI	GS	
<i>Hs</i>	AAH16620	44 %	61%	60
<i>Sc</i>	CAA39375	24%	42%	12
<i>At</i>	BAB10190	36%	55%	18
<i>Dm</i>	CAA82262	51%	65%	65
<i>Ce</i>	AAF36063	38%	57%	48

*: % relativa

4.5. Ensaio do Cometa

Com a finalidade de verificar a presença de lesão no DNA dos vermes adultos expostos ao TMA e H₂O₂ foi realizado o ensaio do cometa. Assim, nesta eletroforese, as células expostas a agentes lesivos apresentam uma migração do DNA, formando um rastro, enquanto as células não submetidas à lesão permanecem com o DNA íntegro, como pode ser observado na **Figura 10**.

Foi observado um aumento significativo (P<0,05) no comprimento da migração do DNA nas células tratadas com TMA e H₂O₂ (**Figura 11**). Não houve nenhuma migração do DNA nas células controle (vermes adultos não-tratados e vermes adultos tratados com colchicina), sob condições eletroforéticas usadas. Concentrações dos agentes lesivos ao DNA maiores do que TMA 0,06% e H₂O₂ 50 µM, foram testadas, contudo elas não foram adotadas, apesar de causarem dano no DNA, visto que levaram à morte do parasito.

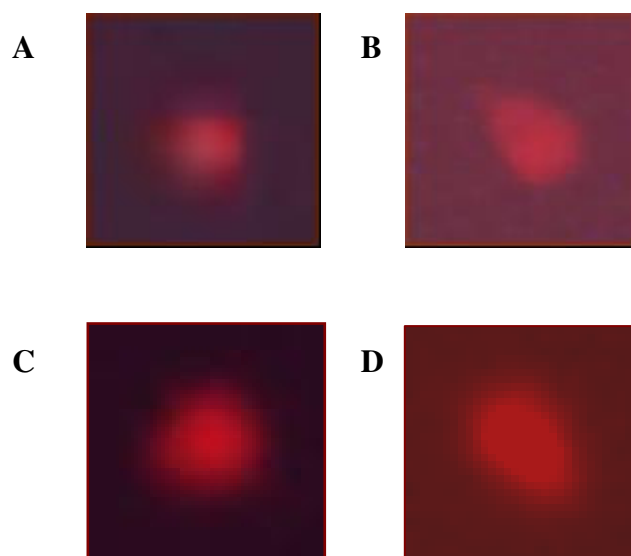


Figura 10. Fotomicrografia do DNA normal (grupo controle e grupo tratado com colchicina) representada respectivamente em (A) e (C), e do DNA lesado (grupo tratado com H_2O_2 e grupo tratado com TMA) demonstrada respectivamente em (B) e (D).

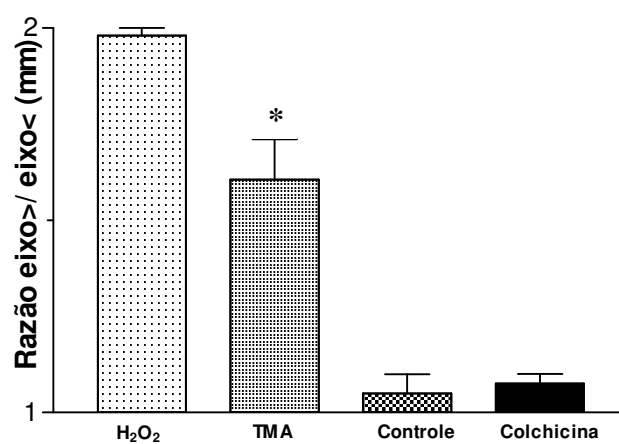


Figura 11. Análise do cometa mostrando os efeitos dos diferentes agentes químicos sobre a integridade do DNA em vermes adultos de *S. mansoni* (* $P < 0,05$).

4.6. RT-PCR Semiquantitativo de SmRad23 e SmRad4 em Vermes Adultos de *S. mansoni*

Com o propósito de avaliar o nível de expressão de SmRad23 e SmRad4 em *S. mansoni*, na presença e ausência de dano no DNA, foi realizada a técnica de RT-PCR semiquantitativo, tendo sido observada uma expressão diferencial destes genes como mostra a **Figura 12**.

A **Figura 12B** mostra uma elevada expressão de SmRad23 naqueles grupos cujo ciclo celular foi bloqueado, ou seja, naqueles tratados com TMA e colchicina ($P < 0,05$). Enquanto o nível de expressão deste mesmo transcrito no grupo tratado com H_2O_2 foi semelhante ao grupo controle. Não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa entre o grupo tratado com H_2O_2 e grupo controle, bem como entre o grupo tratado com TMA e o tratado com colchicina.

A **Figura 12C** mostra que a expressão de SmRad4 naqueles parasitos tratados com TMA e H_2O_2 foi significativamente maior ($P < 0,05$) do que o grupo tratado com colchicina e o controle, não havendo diferença significativa entre os grupos tratados com TMA e H_2O_2 .

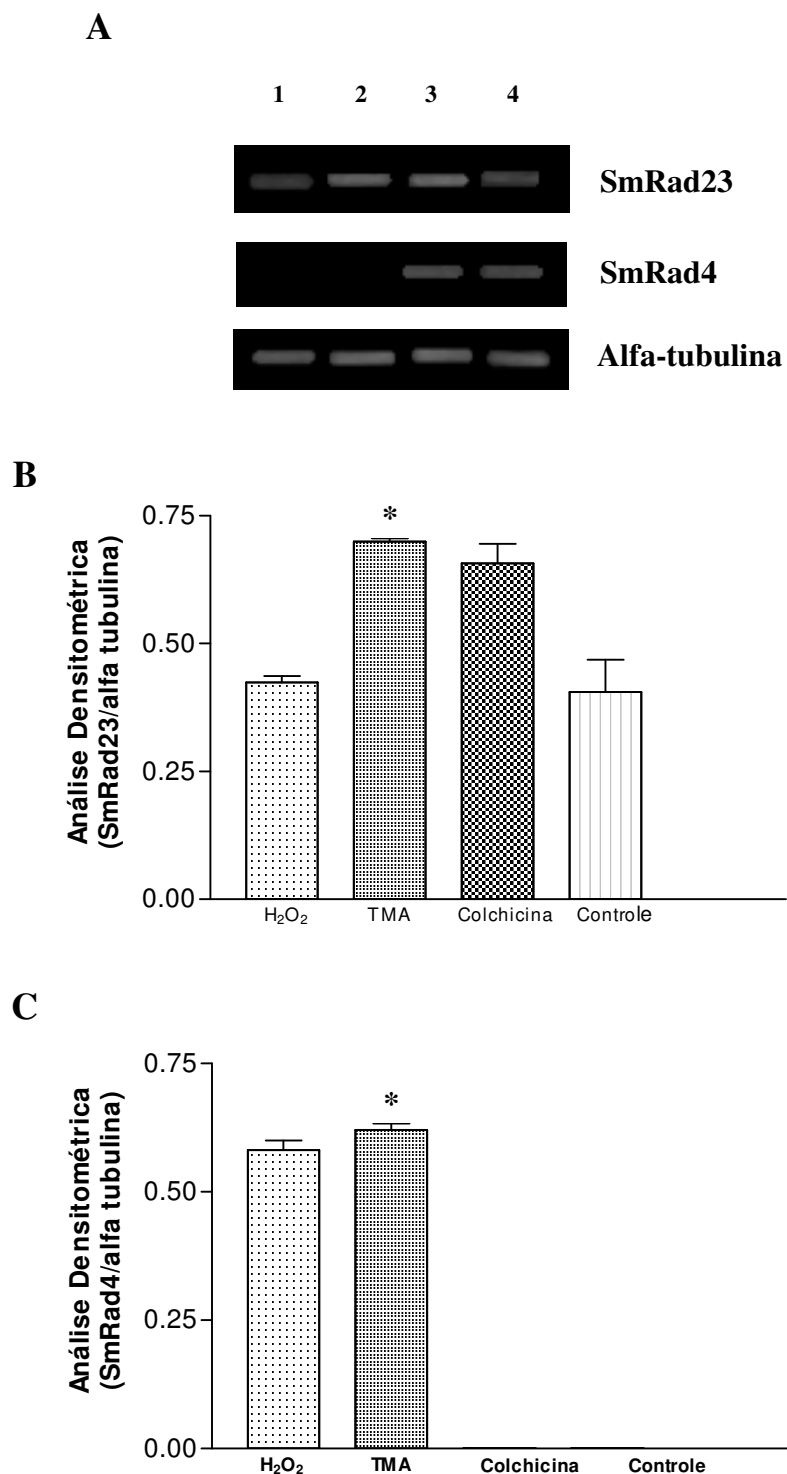


Figura 12. Expressão gênica de SmRad23 e SmRad4 em vermes adultos de *S. mansoni* tratados com agentes lesivos ao DNA. (A) 1-4 representa cultura de vermes adultos não-tratados, tratados com colchicina, TMA e H₂O₂, respectivamente, por 24h antes da extração de RNA total. Colchicina foi usada como controle do ciclo celular, não como agente lesivo ao DNA. (B) e (C) representam a análise densitométrica respectivamente para SmRad23 e SmRad4, tomando a α -tubulina como controle interno (* P<0,05).

5. DISCUSSÃO

Durante seu complexo ciclo de vida, *S. mansoni* sofre inúmeras modificações bioquímicas, as quais devem ser altamente coordenadas visando à adaptação ao meio. Tais adaptações dependem de uma série de alterações na expressão gênica, permitindo dessa forma o controle de uma variedade de processos celulares (WILSON & LAWSON, 1980; EL-ANSARY, 2003; WU et al., 2006). Assim, este parasito está exposto a uma série de agentes lesivos ao DNA presentes no meio ambiente e produzidos pela resposta imune do próprio hospedeiro, sendo provável que seja provido por eficientes mecanismos de reparo assim como ocorre em muitos outros organismos eucariotos.

Lesões no material genético constituem fatores limitantes para a conservação das espécies. Durante a evolução, diversos mecanismos foram desenvolvidos para que a informação contida nos genomas fosse preservada. A freqüente exposição a agentes lesivos pode, contudo, resultar em danos irreparáveis, comprometendo a sobrevivência das células. Neste contexto, o reparo por excisão de nucleotídeos (NER) consiste em um mecanismo vital para os eucariotos, permitindo a remoção de um amplo espectro de danos causados por agentes lesivos ao DNA, como aqueles induzidos por luz ultravioleta e adutos químicos (HUANG et al., 1992; WANG et al., 1993).

A atividade de NER é dependente de importantes complexos protéicos, dentre os quais se destaca NEF2, constituído por Rad23 e Rad4, cujo estudo é essencial para o entendimento da forma com que esses processos são controlados, uma vez que, conforme descrito na literatura, as proteínas Rad23 e Rad4 possuem papel fundamental no reconhecimento do dano e recrutamento de outras proteínas de reparo da via NER para o local da lesão (HUANG et al., 1992; SUGASAWA et al., 1998; SWEDER & MADURA, 2002).

Dados da literatura têm enfatizado a participação do complexo regulatório proteossoma 19S em NER, cuja interação é mediada via domínio UBL da proteína Rad23

(SCHAUBER et al., 1998; WALTERS et al., 2004; MILLER & GORDON, 2005), estando relacionado à desmontagem e rearranjo dos complexos protéicos de NER (RUSSELL et al., 1999; GILLETTE et al., 2001). Esta interação parece ser imprescindível para a atividade ótima desta via de reparo bem como para a sua regulação (RUSSELL et al., 1999; LOMMEL et al., 2000; GILLETTE et al., 2001).

Neste trabalho, foi avaliada a expressão gênica do complexo NEF2 – SmRad23 e SmRad4, durante o ciclo de vida de *S. mansoni*, assim como o nível de expressão destes genes na presença de agentes causadores de dano no DNA. Em conjunto, os resultados confirmam a expressão dessas duas proteínas nos diferentes estágios de desenvolvimento estudados do parasito, e mostram uma expressão diferencial destes genes mediante tratamento com os diferentes agentes químicos.

O complexo NEF2 tem sido extensivamente estudado em eucariotos, e seu papel enfatizado em NER (HUANG et al., 1992; SUGASAWA et al., 1998; SWEDER & MADURA, 2002). A proteína Rad23 consiste de quatro domínios: um UBL, dois UBA, e um RB4 (situado entre UBA1 e UBA2), o que permite sua interação tanto com NER quanto com o proteassoma. Já está bem estabelecido que os domínios UBL e UBA liguem a proteína Rad23 ao proteassoma e substratos poliubiquitinados, respectivamente, enquanto o domínio RB4 promove a interação entre Rad23 e Rad4 (MASUTANI et al., 1997; SCHAUBER et al., 1998; WALTERS et al., 2004; MILLER & GORDON, 2005).

O complexo formado pelas proteínas Rad23 e Rad4, NEF2, é indispensável para a atividade ótima de NER, sendo responsável pelo reconhecimento do dano e recrutamento de outras proteínas de reparo para os sítios de lesão do DNA (HUANG et al., 1992; SUGASAWA et al., 1998). Existem evidências crescentes de que Rad4, e seu ortólogo XPC, possam ser ubiquitinados e degradados pelo proteassoma 26S, atribuindo um papel na regulação negativa à proteólise mediada pela ubiquitina em NER (SWEDER &

MADURA, 2002). Contudo, relatos têm demonstrado que a principal função de Rad23 no reparo é a de estabilizar Rad4, protegendo-a da degradação pelo proteassoma 26S, sendo dessa forma, considerada apenas uma proteína acessória em NER (LOMMEL et al., 2002; NG et al., 2003; ORTOLAN et al., 2004; XIE et al., 2004).

Por outro lado, o papel de Rad23 no proteassoma está bem definido, consistindo de atuação no reconhecimento e translocação de substratos poliubiquitinados para o interior do proteassoma 20S (CHEN & MADURA, 2002; ELSASSER et al., 2004; KIM et al., 2004; SAEKI et al., 2002). De acordo com Sugawara et al. (1996) em estudo com células humanas, a fração de hHR23 ligada a XPC é pequena em comparação com a quantidade total de hHR23 na célula, sugerindo que a proteína apresenta outras funções em adição àquelas relacionadas a NER. Além disso, Kim et al. (2006) propuseram uma nova função não-relacionada ao reparo de DNA para o domínio XPCB (RB4) de Rad23, em que a interação entre Rad23 e Png1 (enzima deglicosilante) facilita não só o reconhecimento de substrato de Rad23 e/ou Png1, como também a direção de transferência de substratos ERAD deglicosilados para o proteassoma, processo este fundamental para a regulação do “turnover” de glicoproteínas.

Diante da importância de NEF2 na via de reparo por excisão de nucleotídeos, os resultados apresentados permitem inferir que a presença de SmRad23 e SmRad4, durante o complexo ciclo de vida de *S. mansoni*, indica que este parasito dispõe da via NER em todas as suas fases evolutivas analisadas, o que demonstra a importância deste complexo para a viabilidade do parasito e capacidade de adaptação ao meio, considerando sua freqüente exposição a uma série de agentes capazes de gerar dano em seu DNA.

Além disso, como demonstrado por Guerra-Sá et al. (2005), a via ubiquitina-proteassoma ATP-dependente é muito importante para o desenvolvimento de *S. mansoni*. Dessa forma, a identificação do transcrito codificando para Rad23 durante diferentes

estágios de vida deste parasito, indica um possível envolvimento dessa proteína também com o proteassoma 26S, auxiliando possivelmente o processo de proteólise em *S. mansoni*, e promovendo a interação entre a via ubiquitina-proteassoma e NER.

Embora não esteja claro se NER é regulada pela degradação de proteína, existem várias correlações entre estas vias. Tem sido proposto que a regulação de NER pode ser realizada pelo controle da abundância de uma ou mais proteínas de reparo por meio de síntese ou degradação seletiva. Em concordância com esta conjuntura, parece que muitos dos genes de NER em leveduras são constitutivamente expressos, enquanto poucos são expressos em níveis elevados após lesão do DNA. Portanto, um eficiente reparo pode requerer apenas a expressão ou estabilização de uma ou poucas proteínas de NER. Assim, é provável que, uma vez concluído o reparo, e a maquinaria de NER não seja mais requerida, uma série de proteínas de reparo sejam degradadas para reduzir a atividade de NER, a fim de evitar inadvertidas incisões nas estruturas de DNA que são geradas nos eventos normais do reparo (SWEDER & MADURA, 2002).

As análises de RT-PCR qualitativo revelaram a presença de transcritos únicos para SmRad23 e SmRad4, em todos os estágios de desenvolvimento estudados do parasito. Adicionalmente, a análise de seqüenciamento demonstrou que os transcritos codificando para Rad23 são idênticos em todos os estágios. Resultados semelhantes foram observados para os transcritos referentes a Rad4. Desta forma, esses dados reforçam a importância da conservação do complexo NEF2 para a adaptação aos diferentes locais que o parasita percorre (hospedeiro vertebrado, hospedeiro invertebrado e meio ambiente) com a finalidade de manutenção e propagação do seu ciclo. Além disso, o grau de similaridade bem como o grau de identidade de SmRad23 e SmRad4 com seus respectivos ortólogos também demonstrou a conservação destas proteínas em *S. mansoni*.

Como foi utilizada a sequência completa para SmRad23, pôde ser demonstrada a presença dos domínios característicos desta proteína de outros organismos, o que também estaria permitindo sua ligação ao proteassoma 26S via domínio UBL, e com substratos poliubiquitinados via UBA, bem como a via de reparo NER com o auxílio do domínio RB4. O transcrito para Rad4 não foi completamente sequenciado no projeto transcriptoma de *S. mansoni*, contudo, apesar de sua sequência não estar completa, os oligonucleotídeos utilizados auxiliaram na amplificação parcial do domínio referente a Rad4. Portanto, a presença de todos esses domínios característicos das proteínas constituintes de NEF2, sugere a possível ligação das vias NER e proteassoma-ubiquitina durante o desenvolvimento do ciclo evolutivo de *S. mansoni*.

Embora tenha sido analisada a expressão gênica apenas do complexo NEF2, foi realizada uma análise “in silico” e constatados os demais complexos protéicos constituintes de NER no banco de dados do transcriptoma de *S. mansoni*, caracterizando desta forma a possível presença de todas as proteínas que compõem os demais complexos NEFs neste parasita, com exceção de Rad7/Rad16 (NEF4). Contudo, tem sido descrita na literatura a presença de NEF4 apenas em leveduras e alguns protozoários, desempenhando um papel na estabilização de Rad4, função esta também exercida por Rad23 (ARAÚJO & WOOD, 1999; COSTA et al., 2003; RAMSEY et al., 2004). Esses dados podem auxiliar na explicação de uma possível substituição da função de NEF4 em organismos eucariotos mais complexos tais como helmintos e mamíferos (NG et al., 2003; RAMSEY et al., 2004).

As proteínas NER são bem conservadas entre os eucariotos, porém algumas diferenças podem ser encontradas entre grupos filogenéticos mais distantemente relacionados (COSTA et al., 2003). O complexo XPC/hHR23 tem afinidade por uma variedade de lesões, contudo em alguns casos esta afinidade se mostra reduzida, como no

caso de danos gerados por dímeros de ciclobutano pirimidina (CPDs), que causam distorções na hélice do DNA muito discretas para serem reconhecidas por XPC/hHR23 (KUSUMOTO et al., 2001). Baseado nestes dados tem sido proposto que a proteína XPE (DDB), cuja deficiência em humanos pode causar manifestações clínicas de Xeroderma Pigmentoso, possa cooperar na detecção desta lesão, uma vez que apresenta grande afinidade por certos tipos de dano no DNA (TANG et al., 2000; KUSUMOTO et al., 2001). Esses relatos sugerem que XPE atue no reconhecimento primário dessas lesões, recrutando XPC para os locais contendo CPD, estimulando com isso o reparo destes danos (FITCH et al., 2003). Assim, o complexo Rad7/Rad16 de leveduras pode estar funcionalmente substituído em mamíferos por DDB (COSTA et al., 2003), bem como em outros eucariotos que não apresentam este complexo, como pôde ser observado em análise no banco de dados (GenBank). Com isso, embora não tenha sido identificado Rad7/Rad16 em *S. mansoni*, pôde ser verificada a presença de DDB (p127) na análise “in silico”.

A regulação de NER ainda não está bem elucidada, podendo ser executada por meio de mudanças na transcrição do RNA, tradução e degradação protéica, ou modificações pós-traducionais. A expressão de inúmeros genes envolvidos nesta via de reparo é induzida pelo dano no DNA, provavelmente com o objetivo de acelerar a remoção da lesão (SWEDER & MADURA, 2002). Diante desse quadro, foi estudada a ação de diferentes agentes químicos na expressão dos genes que codificam para as proteínas Rad23 e Rad4.

O ensaio do cometa confirmou a presença de lesão no DNA dos vermes adultos tratados com TMA e H₂O₂. Embora esses agentes gerem lesão no DNA, os seus mecanismos de ação são diferentes. Assim, o TMA é um agente alquilante que reage com múltiplos alvos na célula, ocasionando dano no DNA e conseqüentemente, bloqueio do ciclo celular na fase G1. Enquanto a H₂O₂ causa dano oxidativo no DNA sem bloquear o

ciclo celular. Vale ressaltar que a colchicina bloqueia o ciclo celular em metáfase sem causar lesão no material genético.

A ação de Rad23 também tem sido documentada no ciclo celular, apesar de não estar bem estabelecida (CLARKE et al., 2001; VAN LAAR et al., 2002; KATIYAR & LENNARZ, 2005). A lesão gerada pelo TMA bloqueia a replicação do DNA, impedindo a progressão do ciclo celular durante a fase S. Desta forma, em nossos resultados, a alta expressão de SmRad23 no grupo tratado com TMA enfatiza a idéia de que a proteína Rad23 em *S. mansoni* pode desempenhar um papel importante no controle do ciclo celular. Além disso, esses dados estão em concordância com Clarke et al. (2001), que demonstraram que ao ter sua expressão induzida por MMS (agente alquilante semelhante ao TMA), Rad23 desenvolve uma função no “checkpoint” do ciclo celular na fase S em *Saccharomyces cerevisiae*.

Em adição, o grupo incubado com colchicina também apresentou níveis aumentados de transcritos para SmRad23, em contraste da expressão de SmRad4, que não foi observada em nível significativo pelo RT-PCR semiquantitativo. Este fato reforça a hipótese de que um dos possíveis mecanismos de controle da transcrição para SmRad23 esteja relacionado à progressão do ciclo celular, uma vez que a colchicina, como vimos anteriormente bloqueia o ciclo celular. No grupo tratado com TMA, foi notada uma expressão aumentada em ambos, SmRad23 e SmRad4, os quais interagem entre si na formação de NEF2, necessário ao funcionamento de NER, como descrito na literatura (HUANG et al., 1992; SUGASAWA et al., 1998).

Embora seja provável que o dano oxidativo no DNA estimule a ação de NER, não foi observado um aumento da expressão de SmRad23 no grupo tratado com H₂O₂, o que pode estar relacionado ao mecanismo de lesão provocado por este agente químico, em que não há bloqueio do ciclo celular. Dessa forma, é possível que os níveis observados de

transcritos para SmRad23 neste grupo sejam o suficiente para estabilizar Rad4, que contrariamente, demonstrou um aumento significativo em sua expressão gênica, na presença de H₂O₂, sugerindo a importância dessa proteína para *S. mansoni* nessa condição de estresse.

Diante do que foi exposto acima, estudos adicionais devem ser realizados futuramente, com a finalidade de ampliar o conhecimento a respeito da via de reparo por excisão de nucleotídeos em *S. mansoni*, onde poderá ser analisada a expressão gênica dos demais complexos protéicos constituintes de NER, bem como a expressão protéica de seus componentes nas diferentes fases evolutivas de *S. mansoni*.

6. CONCLUSÕES

- A presença do complexo NEF2 - SmRad23 e SmRad4, em todos os estágios evolutivos de *S. mansoni* estudados, bem como sua expressão diferencial mediante exposição a agentes lesivos ao DNA, sugere que NER constitui uma importante via de reparo durante o complexo ciclo de vida deste parasito.
- A análise de homologia de SmRad23 e SmRad4 com seus respectivos ortólogos demonstra a conservação do complexo NEF2 em *S. mansoni*.
- O aumento da expressão de SmRad23 durante bloqueio do ciclo celular sugere a importância da proteína Rad23 com eventos relacionados ao controle do ciclo celular.

7. RESUMO

O DNA é freqüentemente danificado por agentes ambientais que levam à ativação de vários genes envolvidos em diferentes vias de reparo. A regulação do reparo do DNA é importante para a sobrevivência da célula mediante exposição a agentes causadores de dano. *Schistosoma mansoni* é um parasito que passa por várias modificações em seu complexo ciclo de vida, estando exposto a uma série de agentes lesivos ao DNA, tais como aqueles presentes no meio ambiente e na própria resposta imune do hospedeiro, e, portanto, assim como muitos outros organismos, é provável que seja provido de eficientes mecanismos de reparo. Recentemente, estudos têm demonstrado que a via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER) consiste em um mecanismo indispensável em eucariotos para a remoção de um amplo espectro de lesões no DNA. No presente estudo, foi analisada a expressão gênica do fator de reparo por excisão de nucleotídeos 2 (NER2) - SmRad23 e SmRad4, em diferentes estágios de desenvolvimento de *S. mansoni*, assim como o nível de expressão destes genes em vermes adultos tratados com agentes lesivos ao DNA. Em conjunto, os resultados confirmaram a expressão dessas duas proteínas em todos os estágios evolutivos estudados do parasito, e mostraram uma expressão diferencial destes genes mediante tratamento com os diferentes agentes químicos. Além disso, foi revelada a correlação destes genes com seus ortólogos em outros eucariotos. Portanto, a presença de SmRad23 e SmRad4, em todos os estágios de desenvolvimento de *S. mansoni*, bem como sua expressão diferencial mediante exposição a agentes lesivos ao DNA, sugere que NER constitui uma importante via de reparo durante o complexo ciclo de vida deste parasito.

8. SUMMARY

DNA is often damaged by environmental agents which lead to the up-regulation of several genes involved in different repair pathways. The regulation of DNA repair is important for cell survival following exposure to DNA-damaging agents. *Schistosoma mansoni* is a parasite that undergoes several modifications in its complex life cycle, being exposed to a subset of DNA-damaging agents, such as the environment and host immune response, and therefore, such as many other organisms, it is likely to be provided for efficient repair mechanisms. Recently, studies have shown that Nucleotide Excision Repair (NER) consists in an indispensable mechanism for removing a broad spectrum of DNA lesions. In the current study, it was analyzed the gene expression of Nucleotide Excision Repair Factor 2 (NEF2) - SmRad23 and SmRad4, in different developmental stages of *S. mansoni*, as well as the expression level of these genes in *S. mansoni* adult worms treated with DNA-damaging agents. Together, the results have confirmed the expression of these two proteins in all of the evolutive stages studied of the parasite, and shown a differential expression in front of the treatment with the different chemical agents. Furthermore, it was revealed the correlation of these genes with their orthologues in other eukaryotes. Therefore, the presence of SmRad23 and SmRad4 in all of the developmental stages of *S. mansoni*, as well as their differential expression following exposition to DNA-damaging agents, suggest that the NER is an important repair pathway during the complex life cycle of this parasite.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

* Referências Bibliográficas segundo normas da ABNT (NBR – 6023/2002; NBR – 10520/2002 e NBR – 14724/2002).

AMARAL, R.S.; PORTO, M.A.S. Evolução e situação atual da esquistossomose no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 27, Suppl. III, p. 73-90, 1994.

ARAÚJO, J.D. A pesquisa em esquistossomose no Brasil. In Modernos Conhecimentos sobre Esquistossomose Mansônica. **Biblioteca da Academia Mineira de Medicina**. v. 14, p. 9-18, 1986.

ARAÚJO, S.J.; WOOD, R.D. Protein complexes in nucleotide excision repair. **Mutation Research**. v. 435, n. 1, p. 23-33, 1999.

ASHTON, P.D.; HARROP, R.; SHAH, B.; WILSON, R.A. The schistosome egg: development and secretions. **Parasitology**. v. 122, n. 3, p. 329-338, 2001.

BLANCHARD, T.J. Schistosomiasis. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 2, p. 5-11, 2004.

BRENTANI, H.; CABALLERO, O.L.; CAMARGO, A.A.; SILVA, A.M.; SILVA, W.A.J.R.; DIAS NETO, E.; GRIVET, M.; GRUBER, A.; GUIMARAES, P.E.; HIDE, W.; ISELI, C.; JONGENEEL, C.V.; KELSO, J.; NAGAI, M.A.; OJOPI, E.P.; OSORIO, E.C.; REIS, E.M.; RIGGINS, G.J.; SIMPSON, A.J.; SOUZA, S.; STEVENSON, B.J.; STRAUSBERG, R.L.; TAJARA, E.H.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. The generation and utilization of a cancer-oriented representation of the human transcriptome by using expressed sequence tags. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 23, p. 13418-13423, 2003.

BRINDLEY, P.J. The molecular biology of schistosomes. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 11, p. 533-536, 2005.

CAMARGO, A.A.; SAMAIA, H.P.; DIAS-NETO, E.; SIMAO, D.F.; MIGOTTO, I.A.; BRIONES, M.R.; COSTA, F.F.; NAGAI, M.A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. The contribution of 700.000 ORF sequences tags to the definition of the human Transcriptome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 21, p. 12103-12108, 2001.

CAPRON, A.; DESSAINT, J.P.; CAPRON, M.; PIERCE, R.J. Vaccine strategies against schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, Suppl. 5, p. 1-9, 1992.

CHEN, L.; MADURA, K. Rad23 promotes the targeting of proteolytic substrates to the proteasome. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, n. 13, p. 4902-4913, 2002.

CHEN, P.; HOCHSTRASSER, M. Autocatalytic subunit processing couples active site formation in the 20S proteasome to completion of assembly. **Cell**, v. 86, n. 6, p. 961-972, 1996.

CLARKE, D.J.; MONDESERT, G.; SEGAL, M.; BERTOLAET, B.L.; JENSEN, S.; WOLFF, M.; HENZE, M.; REED, S.I. Dosage suppressors of pds1 implicate ubiquitin-associated domains in checkpoint control. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, n. 6, p. 1997-2007, 2001.

COSTA, R.M.A.; CHIGANÇAS, V.; GALHARDO, R.S.; CARVALHO, H.; MENCK, C.F.M. The eucaryotic nucleotide excision repair pathway. **Biochimie**, v. 85, n. 11, p. 1083-1099, 2003.

COSTA-CRUZ, J.M.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; FERREIRA, A.W.; CAMARGO, M.E.; BRITO, T.; SILVA, L.C. *Schistosoma mansoni* circulating polysaccharide and protein antigens recognized by sheep antisera in patients with different clinical forms of schistosomiasis before and after treatment. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 36, n. 4, p. 321-325, 1994.

COURA, J.R.; AMARAL, R.S. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 99, Supl. I, p. 13-19, 2004.

DIAS-NETO, E.; CORREA, R.G.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; BRIONES, M.R.; NAGAI, M.A.; DA SILVA, W. JR.; ZAGO, M.A.; BORDIN, S.; COSTA, F.F.; GOLDMAN, G.H.; CARVALHO, A.F.; MATSUKUMA, A.; BAIA, G.S.; SIMPSON, D.H.; BRUNSTEIN, A.; DE OLIVEIRA, P.S.; BUCHER, P.; JONGENEEL, C.V.; O'HARE, M.J.; SOARES, F.; BRENTANI, R.R.; REIS, L.F.; DE SOUZA, S.J.; SIMPSON, A.J. Shotgun sequencing of the human transcriptome with ORF expressed sequence tags. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 7, p. 3491-3496, 2000.

DUVAX-MIRET, O; BARATTE, B.; DISSOUS, C.; CAPRON, A. Molecular cloning and sequencing of the α -tubulin gene from *Schistosoma mansoni*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 49, n. 2, p. 337-340, 1991.

EL-ANSARY, A. Biochemical and immunological adaptation in schistosome parasitism. **Comparative Biochemistry and Physiology. Biochemistry and Molecular Biology**, v. 136, n. 2, p. 227-243, 2003.

ELLIS, J.T.; MORRISON, D.A. *Schistosoma mansoni*: patterns of codon usage and bias. **Parasitology**, v. 110, n. 1, p. 53-60, 1995.

ELSASSER, S.; CHANDLER-MILITELLO, D.; MULLER, B.; HANNA, J.; FINLEY, D. Rad23 and Rpn10 serve as alternative ubiquitin receptors for the proteasome. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 26, p. 26817-26822, 2004.

ENGELS, D.; CHITSULO, L.; MONTRESOR, A.; SAVIOLI, L. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. **Acta Tropica**, v. 82, n. 2, p. 139-146, 2002.

FERREL, K.; WILKINSON, C.R.M.; DUBIEL, W.; GORDON, C. Regulatory subunit interactions of the proteasome, a complex problem. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 25, n. 2, p.83-88, 2000.

FITCH, M.E.; NAKAJIMA, S.; YASUI, A.; FORD, J.M. In vivo recruitment of XPC to UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers by the DDB2 gene product. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 47, p. 46906-46910, 2003.

FRIEDBERG, E.C. How nucleotide excision repair protects against cancer. **Nature Cancer Reviews**, v. 1, n. 1, p. 22-33, 2001.

FRIEDBERG, E.C.; WALKER, G.C.; SIEDE, W. Hereditary diseases characterized by defective DNA repair. In: **DNA repair and mutagenesis**, Washington, DC: ASM Press, pp. 634-661, 1995.

GILLETTE, T.G.; HUANG, W.; RUSSEL, S.J.; REED, S.H.; JOHNSTON, S.A.; FRIEDBERG, E.C. The 19S complex of the proteasome regulates nucleotide excision repair in yeast. **Genes and Development**, v. 15, n. 12, p. 1528-1539, 2001.

GLICKMAN, M.H.; RUBIN, D.M.; COUX, O.; WEFES, I.; PFEIFER, G.; CJEKA, Z.; BAUMEISTER, W.; FRIED, V.A.; FINLEY, D. A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. **Cell**, v. 94, n. 5, p.615-623, 1998.

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.

GUZDER, S.N.; SUNG, P.; PRAKASH, L.; PRAKASH, S. Affinity of yeast nucleotide excision repair factor 2, consisting of the Rad4 and Rad23 proteins, for ultraviolet damaged DNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 47, p. 31541-31546, 1998.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plamids. **Journal of Molecular Biology**, v. 166, n. 4, p. 557-580, 1983.

HARROP, R.; COULSON, P.S.; WILSON, R.A. Characterization, cloning and immunogenicity of antigens released by lung-stage larvae of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, v. 118, n. 6, p. 583-594, 1999.

HEINEMEYER, W.; FISCHER, M.; KRIMMER, T.; STACHON, U.; WOLF, D.H. The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 40, p. 25200-25209, 1997.

HOEIJMAKERS, J.H. Nucleotide excision repair: molecular and clinical implications. In: VOS, J.M.H. **DNA repair mechanisms: impact on human diseases and cancer**. Germany: Springer-Verlag, pp. 125-150, 1995.

HOFFMANN, W.A.; PONS, J.A.; JANER, J.L. The sedimentation concentration method in schistosomiasis mansoni. **The Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine**, v. 9, p. 283-291, 1934.

HU, W.; YAN, Q.; SHEN, D.K.; LIU, F.; ZHU, Z.D.; SONG, H.D.; XU, X.R.; WANG, Z.J.; RONG, Y.P.; ZENG, L.C.; WU, J.; ZHANG, X.; WANG, J.J.; XU, X.N.; WANG,

S.Y.; FU, G.; ZHANG, X.L.; WANG, Z.Q.; BRINDLEY, P.J.; MCMANUS, D.P.; XUE, C.L.; FENG, Z.; CHEN, Z.; HAN, Z.G. Evolutionary and biomedical implications of a *Schistosoma japonicum* complementary DNA resource. **Nature Genetics**, v. 35, n. 2, p. 139-147, 2003.

HUANG, J.C.; SVOBODA, D.L.; REARDON, J.T.; SANCAR, A. Human nucleotide excision nuclease removes thymine dimers from DNA by incising the 22nd phosphodiester bond 5' and the 6th phosphodiester bond 3' to the photodimer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 8, p. 3664-3668, 1992.

KATYAR, S.; LENNARZ, W.J. Studies on the intracellular localization of hHR23B. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 337, n. 4, p. 1296-1300, 2005.

KATZ, N. Esquistossomose. In. CIMERMAN, S.; CIMERMAN, B. **Medicina Tropical**. São Paulo: Atheneu, p. 175-183, 2003.

KIM, I.; AHN, J.; LIU, C.; TANABE, K.; APODACA, J.; SUZUKI, T.; RAO, H. The Png1–Rad23 complex regulates glycoprotein turnover. **Journal of Cell Biology**, v. 172, n. 2, p. 211-219, 2006.

KIM, I.; MI, K.; RAO, H. Multiple interactions of rad23 suggest a mechanism for ubiquitylated substrate delivery important in proteolysis. **Molecular Biology of the Cell**, v. 15, n. 7, p. 3357-3365, 2004.

KOPP, F.; DAHLMANN, B.; HENDIL, K.B. Evidence indicating that the human proteasome is a complex dimmer. **Journal of Molecular Biology**, v. 229, n. 1, p. 14-19, 1993.

KOPP, F.; HENDIL, K.B.; DAHLMANN, B.; KRISTENSEN, P.; SOBEK, A.; UERKVITZ, W. Subunit arrangement in the human 20S proteasome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 7, p. 2939-2944, 1997.

KUNS, W. *Schistosoma* male-female interaction: induction of germ-cell differentiation. **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 5, p. 227-231, 2001.

KUSUMOTO, R.; MASUTANI, C.; SUGASAWA, K.; IWAI, S.; ARAKI, M.; UCHIDA, A.; MIZUKOSHI, T.; HANAOKA, F. Diversity of the damage recognition step in the global genomic nucleotide excision repair in vitro. **Mutation Research**, v. 485, n. 3, p. 219-227, 2001.

LAMBERTSON, D.; CHEN, L.; MADURA, K. Investigating the importance of proteasome-interaction for Rad23 function. **Current Genetics**, v. 42, n. 4, p. 199-208, 2003.

LOMMEL, L.; CHEN, L.; MADURA, K.; SWEDER, K. The 26S proteasome negatively regulates the level of overall genomic nucleotide excision repair. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 24, p. 4839-4845, 2000.

LOMMEL, L.; ORTOLAN, T.; CHEN, L.; MADURA, K.; SWEDER, K.S. Proteolysis of a nucleotide excision repair protein by the 26 S proteasome. **Current Genetics**, v. 42, n. 1, p. 9-20, 2002.

MASSARA, C.L.; PEIXOTO, S.V.; BARROS, H.D.A.S.; ENK, M.J.; CARVALHO, S.; SCHALL, V. Factors associated with schistosomiasis mansoni in a population from the municipality of Jaboticatubas, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 1, p. 127-134, 2004.

MASUTANI, C.; ARAKI, M.; SUGASAWA, K.; VAN DER SPEK, P.J.; YAMADA, A.; UCHIDA, A.; MAEKAWA, T.; BOOTSMA, D.; HOEIJMAKERS, J.H.; HANAOKA, F. Identification and characterization of XPC-binding domain of hHR23B. **Molecular and Cellular Biology**, v. 17, n. 12, p. 6915-6923, 1997.

MASUTANI, C.; SUGASAWA, K.; YANIGASAWA, J.; SONIYAMA, T.; UI, M.; ENOMOTO, T.; TAKIO, K.; TANAKA, K.; VAN DER SPEK, P.J.; BOOTSMA, D.; HOEIJMAKERS, J.H.J.; HANAOKA, F. Purification and cloning of a nucleotide excision repair complex involving the xeroderma pigmentosum group C protein and a human homologue of yeast RAD23. **EMBO Journal**, v. 13, n. 8, p. 1831-1843, 1994.

MCNAIR, A.T. DISSOUS, C.; DUVAUX-MIRET, O.; CAPRON, A. Cloning and characterization of the gene encoding the 28-KDa glutathione S-transferase of *Schistosoma mansoni*. **Gene**, v. 124, n. 2, p. 245-249, 1993.

MELO, A.L.; COELHO, P.M.Z. *Schistosoma mansoni* e a Doença. In. NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 11 ed, São Paulo: Atheneu, p. 193-212, 2005.

MILLER, J.; GORDON, C. The regulation of proteasome degradation by multi-ubiquitin chain binding proteins. **FEBS Letters**, v. 579, n. 15, p. 3224-3230, 2005.

NG, J.M.; VERMEULEN, W.; VAN DER HORST, G.T.; BERGINK, S.; SUGASAWA, K.; VRIELING, H.; HOEIJMAKERS, J.H. A novel regulation mechanism of DNA repair by damage-induced and RAD23-dependent stabilization of xeroderma pigmentosum group C protein. **Genes and Development**, v. 17, n. 13, p. 1630-1645, 2003.

ORTOLAN, T.; CHEN, L.; TONGAONKAR, P.; MADURA, K. Rad23 stabilizes Rad4 from degradation by the Ub/proteasome pathway. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 22, p. 6490-6500, 2004.

PARAENSE, W.L. Distribuição dos caramujos no Brasil. Modernos conhecimentos sobre Esquistossomose Mansônica no Brasil. **Biblioteca da Academia Mineira de Medicina**, v. 14, p. 117-128, 1986.

PICKART, C.M. Ubiquitin in chains. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 25, n. 11, p. 544-548, 2000.

PRAKASH, S.; PRAKASH, L. Nucleotide excision repair in yeast. **Mutation Research**, v. 451, n. 1-2, p. 13-24, 2000.

RAMSEY, K.L.; SMITH, J.J.; DASGUPTA, A.; MAQANI, N.; GRANT, P.; AUBLE, D.T. The NEF4 complex regulates Rad4 levels and utilizes Snf2/Swi2-related ATPase activity for nucleotide excision repair. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 14, p. 6362-6378, 2004.

ROCHE, C.; WILLIAMS, D.L.; KHALIFE, J.; LEPRESLE, T.; CAPRON, A.; PIERCE, R.J. Cloning e characterization of the gene encoding *S. mansoni* glutathione peroxidase. **Gene**, v. 138, n. 1-2, p. 149-154, 1994.

RUSSEL, S.J.; REED, S.H.; HUANG, W.; FRIEDBERG, E.C.; JOHNSTON, S.A. The 19S regulatory complex of the proteasome functions independently of proteolysis in nucleotide excision repair. **Molecular Cell**, v. 3, n. 6, p. 687-695, 1999.

SAEKI, Y.; SAITOH, A.; TOH-E, A.; YOKOSAWA, H. Ubiquitin-like proteins and Rpn10 play cooperative roles in ubiquitin-dependent proteolysis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 293, n. 3, p. 986-992, 2002.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.74, n. 12, p.5463-5467, 1977.

SCHAUBER, C.; CHEN, L.; TONGAONKAR, P.; VEGA, I.; LAMBERTSON, D.; POTTS, W.; MADURA, K. Rad23 links DNA repair to the ubiquitin/proteasome pathway. **Nature**, v. 391, n. 6668, p. 715-718, 1998.

SCHAUER, T.M.; NESPER, M.; KEHL, M.; LOTTSPEICH, F.; MULLER-TAUBENBERGER, A.; GERISCH, G.; BAUMEISTER, W. Proteasomes from *Dictyostelium discoideum*: characterization of structure and function. **Journal of Structural Biology**, v. 111, n. 2, p. 135-147, 1993.

SHORT, R.B. Conventional Giemsa-stained and C-banded chromosomes of seven strains of *Schistosoma mansoni*. **Journal of Parasitology**, v. 75, n. 6, p. 920-926, 1989.

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

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individuals cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.

SMITHERS, S.R.; TERRY, R.J. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. **Parasitology**. v. 55, n. 4, p. 695-700, 1965.

STANDEN, O.D. Experimental infection of *Australorbis glabratus* with *Schistosoma mansoni*. I. Individual and mass infection of snails, and the relationship of infection to temperature and season. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**. v. 46, n. 1, p. 48-53, 1952.

SUGASAWA, K.; MASUTANI, C.; UCHIDA, A.; MAEKAWA, T.; VAN DER SPEK, P.J.; BOOTSMA, D.; HOEIJMAKERS, J.H.; HANAOKA, F. HHR23B, a human Rad23 homolog, stimulates XPC protein in nucleotide excision repair in vitro. **Molecular and Cellular Biology**, v. 16, n. 9, p. 4852-4861, 1996.

SUGASAWA, K.; NG, J.M.; MASUTANI, C.; IWAI, S.; VAN DER SPEK, P.J.; EKER, A.P.; HANAOKA, F.; BOOTSMA, D.; HOEIJMAKERS, J.H. Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. **Molecular Cell**, v. 2, n. 2, p. 223-232, 1998.

SWEDER, K.S.; MADURA, K. Regulation of repair by the 26S proteasome. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 94-105, 2002.

TANG, J.Y.; HWANG, B.J.; FORD, J.M.; HANAWALT, P.C.; CHU, G. Xeroderma pigmentosum p48 gene enhances global genomic repair and suppresses UV-induced mutagenesis. **Molecular Cell**, v. 5, n. 4, p. 737-744, 2000.

VAN LAAR, T.; VAN DER EB, A.J.; TERLETH, C. A role for Rad23 proteins in 26S proteasome-depedent protein degradation? **Mutation Research**, v. 499, n. 1, p. 53-61, 2002.

VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; DEMARCO, R.; MARTINS, E.A.; GUIMARÃES, P.E.; OJOPI, E.P.; PAQUOLA, A.C.; PIAZZA, J.P.; NISHIYAMA JR., M.Y.; KITAJIMA, J.P.; ADAMSON, R.E.; ASHTON, P.D.; BONALDO, M.F.; COULSON, P.S.; DILLON, G.P.; FARIAS, L.P.; GREGORIO, S.P.; HO, P.L.; LEITE, R.A.; MALAQUIAS, L.C.;

MARQUES, R.C.; MIYASATO, P.A.; NASCIMENTO, A.L.; OHLWEILER, F.P.; REIS, E.M.; RIBEIRO, M.A.; SA, R.G.; STUKART, G.C.; SOARES, M.B.; GARGIONI, C.; KAWANO, T.; RODRIGUES, V.; MADEIRA, A.M.; WILSON, R.A.; MENCK, C.F.; SETUBAL, J.C.; LEITE, L.C.; DIAS-NETO, E. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. **Nature Genetics**, v. 35, n. 2, p. 148-157, 2003.

VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; LEITE, L.C.; DIAS-NETO, E.; MENCK, C.F.; WILSON, R.A. *Schistosome* transcriptome: insights and perspectives for functional genomics. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 7, p. 304-308, 2004.

WALTERS, K.J.; GOH, A.M.; WANG, Q.; WAGNER, G.; HOWLEY, P.M. Ubiquitin family proteins and their relationship to the proteasome: a structural perspective. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1695, n. 1-3, p. 73-87, 2004.

WANG, Z.; WU, X.; FRIEDBERG, E.C. Nucleotide-excision repair of DNA in cell-free extracts of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 11, p. 4907-4911, 1993.

WILSON, R.A. **Introdução à Parasitologia**. Tradução: Cláudio Santos Ferreira e Annete Silva Foronda. São Paulo: EPU; Ed. da Universidade de São Paulo, 1980.

WILSON, R.A.; LAWSON, J.R. An examination of the skin phase of schistosomose migration using hamster cheek pouch preparation. **Parasitology**, v. 80, n. 2, p. 257-266, 1980.

WOLF, D.H.; HILT, W. The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1695, n. 1-3, p. 19-31, 2004.

WU, W.; NILES, E.G.; EL-SAYED, N.; BERRIMAN, M.; LOVERDE, P.T. *Schistosoma mansoni* (Platyhelminthes, Trematoda) nuclear receptors: Sixteen new members and a novel subfamily. **Gene**, v. 366, n. 2, p. 303-315, 2006.

XIE, Z.; LIU, S.; ZHANG, Y.; WANG, Z. Roles of Rad23 protein in yeast nucleotide excision repair. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 20, p. 5981–5990, 2004.