



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA

**PARTE I – PROTEÍNA ARGININA N-
METILTRANSFERASE PRMT1 DE
SCHISTOSOMA MANSONI:**

**EVIDÊNCIAS DE SUA PARTICIPAÇÃO NA
SINALIZAÇÃO POR RECEPTORES NUCLEARES E
NO METABOLISMO DE RNA**

**PARTE II – LIMPETIN DE SCHISTOSOMA
MANSONI:**

**DEFININDO A NOVA FAMÍLIA DAS PROTEÍNAS
COM DOMÍNIOS LIM E PET DE INVERTEBRADOS.**

DANIEL RODRIGUES FURTADO

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
BIOLÓGICA, INSTITUTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA,
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO,
COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM QUÍMICA
BIOLÓGICA.

ORIENTADOR: **FRANKLIN DAVID RUMJANEK**

CO-ORIENTADOR: **MARCELO ROSADO FANTAPPIÉ**

RIO DE JANEIRO

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FURTADO, Daniel Rodrigues

Parte I – Proteína arginina *N*-metiltransferase PRMT1 de *Schistosoma mansoni*: Evidências de sua Participação na Sinalização por Receptores Nucleares e no Metabolismo de RNA. Parte II – LIMPETin de *Schistosoma mansoni*: Definindo a Nova Família das Proteínas com Domínios LIM e PET de Invertebrados/ Daniel Rodrigues Furtado. – Rio de Janeiro: UFRJ/ IBqM, 2006.

xv, 277 f.: il.; 31 cm.

Orientador: Franklin David Rumjanek

Co-orientador: Marcelo Rosado Fantappié

Tese (Doutorado) – UFRJ/ Instituto de Bioquímica Médica/ Programa de Pós-graduação em Química Biológica, 2006.

Referências Bibliográficas: f. 194-220.

1. Metilação. 2. Metiltransferase. 3. PRMT. 4. Receptor Nuclear. 5. Transporte de RNA. 6. Editoração de RNA. 7. Proteína com Domínios LIM. 8. Elemento Responsivo ao AMP cíclico (CRE). 9. *Schistosoma mansoni*. I. Rumjanek, Franklin David. II. Fantappié, Marcelo Rosado. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica, Programa de Pós-graduação em Química Biológica. IV. Título.

PARTE I – PROTEÍNA ARGININA *N*-METILTRANSFERASE PRMT1 DE *SCHISTOSOMA MANSONI*: EVIDÊNCIAS DE SUA PARTICIPAÇÃO NA SINALIZAÇÃO POR RECEPTORES NUCLEARES E NO METABOLISMO DE RNA. **PARTE II** – LIMPETIN DE *SCHISTOSOMA MANSONI*: DEFININDO A NOVA FAMÍLIA DAS PROTEÍNAS COM DOMÍNIOS LIM E PET DE INVERTEBRADOS

DANIEL RODRIGUES FURTADO

Orientador: Franklin David Rumjanek
Co-orientador: Marcelo Rosado Fantappié

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Química Biológica.

Aprovada em Junho de 2006 por:

DR. FRANKLIN DAVID RUMJANEK (Orientador)

Professor Titular do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

DR. JOÃO PAULO DE BIASO VIOLA, MD

Pesquisador Associado da Divisão de Biologia Celular do Instituto Nacional do Câncer – INCA

DR. MARCUS FERNANDES DE OLIVEIRA

Professor Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

DR. JOSÉ GARCIA RIBEIRO ABREU JR.

Professor Adjunto do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

DR. MARCOS HENRIQUE FERREIRA SORGINE (Revisor/Suplente)

Professor Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

DRA. ANDRÉA CARLA DE SOUZA GÓES (Suplente Externa)

Professora Adjunta do Departamento de Ensino de Ciências e Biologia do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade Estadual do Rio de Janeiro – UERJ

AGRADECIMENTOS

A meus pais, Evandro e Vanessa, pelo amor, carinho e dedicação com que me criaram; pela educação que souberam a mim proporcionar, com ternura e firmeza, tenha sido ela conscientemente, com atos e palavras, ou inconscientemente, pelo exemplo de retidão e clareza de caráter; pelo tempo que passaram comigo, sempre juntos em todos os momentos de alegria, de tristeza, de fartura e de necessidade; por terem sabido dizer não quando necessário e sim até quando não podiam dizê-lo; por terem me ensinado que a essencial na vida é a consciência de ter a consciência limpa; por terem me ensinado a ter respeito até por quem não merece tê-lo; por terem me ensinado a questionar, a ter senso crítico e a raciocinar, antes de perguntar; por terem acreditado que a boa educação e a cultura são o pilar da formação de um indivíduo, e por terem se desdobrado para me oferecer os dois, sempre; pela paciência e compreensão, no decorrer de todos esses anos, por outros tantos predicados que não caberiam nestas páginas...

A Mariana, por ter me acompanhado e apoiado em cada segundo deste último ano-e-meio; por ter me amado incondicionalmente; por ter sido a mais perfeita companheira e a mais linda e graciosa namorada; não há palavras capazes de expressar minha gratidão, minha paixão e meu amor. Eu prometo: sou só seu, meu amor...

A meus irmãos, Mateus e Miguel, que souberam suportar-me quando eu mesmo não me suportava;

A meus amigos – Rodrigo e Natália, Filipe, Antonio e Flávia, Guilherme, Leonardo, João Marcelo, Gustavo, Paulo, da UFRJ; Thiago e Ruth, João e Soninha, Machion e Roberta, Rafael e Juliana, Geraldo e Clarisse; a todos os outros amigos queridos que não figuram nesta página mas ocupam lugares cativos em meu coração;

Ao Prof. Franklin D. Rumjanek, pelo apoio, pela orientação, pelo exemplo de seu conhecimento abrangente da ciência e por ter sido o pivô de minha iniciação na ciência real;

Ao Prof. Marcelo R. Fantappiè, pela orientação, por ter me ensinado como me portar e me organizar em um laboratório e por ter proporcionado a mim a oportunidade de concluir o doutorado com dados concretos, pelo que serei eternamente grato;

Ao Me Francisco M. B. Oliveira, pelo companheirismo, dedicação e cooperação no laboratório, além de seu enorme coração;

Ao Prof. José João Mansure, pelo companheirismo, bom humor inesgotável, e por seu espírito de altruísmo infinito, que me servirá para sempre de exemplo;

Ao Prof. J. Garcia R. A. Jr., por ter me acolhido e auxiliado incontáveis vezes;

Ao Dr. A. J. Tempone, pelos inúmeros conselhos, bom humor e cooperação constante;

À Dra. Fabiana C. Morales, pela sua enorme cooperação nas primeiras etapas do doutorado;

A Marta, por sua dedicação e por ter me prestado socorro inúmeras vezes;

A toda a equipe do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de *Schistosoma mansoni*, pelas dicas, respostas e companheirismo.

RESUMO

FURTADO, Daniel Rodrigues. **Parte I** – Proteína arginina *N*-metiltransferase PRMT1 de *Schistosoma mansoni*: Evidências de sua Participação na Sinalização por Receptores Nucleares e no Metabolismo de RNA. **Parte II** – LIMPETin de *Schistosoma mansoni*: Definindo a Nova Família das Proteínas com Domínios LIM e PET de Invertebrados. Tese (Doutorado em Química Biológica) – Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

Parte I: A clonagem de um cDNA codificando uma proteína arginina *N*-metiltransferase de *Schistosoma mansoni* (SmPRMT1) é apresentada neste trabalho. A SmPRMT1 é altamente homóloga à PRMT1 de vertebrados. Ensaio de metilação *in vitro* demonstraram que a SmPRMT1 recombinante foi capaz de metilar a histona H4 especificamente. Duas proteínas de *S. mansoni* com provável envolvimento no metabolismo de RNA, a SMYB1 e a SmSM-D3, as quais apresentam vários motivos GAR, foram fortemente metiladas pela SmPRMT1. Ensaio de *pull-down* com GST demonstraram que a SMYB1 e a SmSM-D3 interagem fisicamente com a SmPRMT1. Em outro ensaio de *pull-down* com GST ficou sugerida a ocorrência de um complexo ternário incluindo a SmPRMT1, o receptor nuclear RXR de *S. mansoni* (SmRXR) e o co-ativador de receptores nucleares da família p160 SRC-1. Juntos, estes dados sugerem um mecanismo através do qual a SmPRMT1 exerce um papel no remodelamento da cromatina e no processamento e transporte de RNA.

Parte II: Os domínios LIM são seqüências protéicas modulares ricas em cisteínas que se caracterizam por sua estrutura em dedos-de-zinco encadeados, que funciona como uma interface para a ligação a proteínas. Estas estruturas estão presentes em muitas proteínas com papéis diversos na regulação da expressão gênica, na transdução de sinal, na adesão celular, na estrutura da célula e na motilidade celular. Uma proteína pode conter somente domínios LIM ou conter também domínios diversos, que podem acrescentar a ela funções complementares. Sua quantidade pode variar de um até quatro domínios e meio, como é o caso da família *four-and-a-half LIM domain proteins* (FHL). Neste trabalho, é apresentada a clonagem da SmLIMPETin, uma proteína com seis domínios LIM e um domínio PET. Através da reconstrução de filogenia entre a SmLIMPETin, seus homólogos em invertebrados e as FHLs, que somente estão presentes em vertebrados, foi possível estabelecer uma nova família de proteínas com domínios LIM: a família das proteínas com domínios LIM e PET de invertebrados (LIMPETin). Portanto, sugere-se aqui a hipótese de que as LIMPETins sejam os ancestrais das FHLs em invertebrados. O mRNA da SmLIMPETin é expresso em níveis significativamente menores em fêmeas adultas maduras, em comparação com machos adultos maduros e machos e fêmeas imaturos; além disso, a expressão de SmLIMPETin em esquistossômulos não pôde ser detectada por RT-PCR. A proteína SmLIMPETin está localizada no citoplasma dos parasitos e é encontrada de forma ubíqua em parasitos machos. A presença de um sinal de localização nuclear (NLS) no domínio PET da SmLIMPETin é discutida, assim como as prováveis funções da SmLIMPETin na biologia do *S. mansoni*.

Palavras-chave: 1. Metilação. 2. Metiltransferase. 3. PRMT. 4. Receptor Nuclear. 5. Transporte de RNA. 6. Editoração de RNA. 7. Proteína com Domínios LIM. 8. Elemento Responsivo ao AMP cíclico (CRE). 9. *Schistosoma mansoni*.

ABSTRACT

FURTADO, Daniel Rodrigues. **Part I** – Protein arginine *N*-methyltransferase PRMT1 from *Schistosoma mansoni*: Evidence for Roles in Nuclear Receptor Signaling and RNA Metabolism. **Part II** – LIMPETin from *Schistosoma mansoni*: Defining the Novel Invertebrate LIM and PET Domain Protein Family. Thesis (Doctorate in Biological Chemistry) – Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

Part I: The cloning of a cDNA encoding a protein arginine *N*-methyltransferase in *Schistosoma mansoni* (SmPRMT1) is hereby described. SmPRMT1 is highly homologous to the vertebrate PRMT1 enzyme. *In vitro* methylation assays showed that SmPRMT1 recombinant protein was able to specifically methylate histone H4. Two schistosome proteins likely to be involved in RNA metabolism, SMYB1 and SmSM-D3, display a high number of GAR motifs, and were strongly methylated by SmPRMT1. *In vitro* GST pull-down assays showed that SMYB1 and SmSM-D3 physically interact with SmPRMT1. Additional GST pull-down assays suggest the occurrence of a ternary complex including SmPRMT1, SmRXR1 nuclear receptor and the p160 family SRC-1 nuclear receptor coactivator. Together, these data suggest a mechanism in which SmPRMT1 plays a role in nuclear receptor-mediated chromatin remodeling and RNA transactions. **Part II:** LIM domains are modular cystein-rich protein sequences characterized by its tandem zinc-finger structure, which functions as an interface for protein binding. These structures are present in many proteins that have diverse cellular roles as regulators of gene expression, signal transduction, cell adhesion, cell structure and cell motility. A protein may have just LIM domains or may also have diverse domains, which might add complementary functions to it. They may be present from one up to four and a half domains, as for the four-and-a-half LIM domain protein family (FHL). The cloning of SmLIMPETin, a protein with six LIM domains and a PET domain is hereby described. By reconstruction of phylogeny between SmLIMPETin, its invertebrate homologues and the FHLs, it was possible to establish a novel LIM domain protein family: the invertebrate LIM and PET domain protein family (LIMPETin). Therefore, a hypothesis is suggested in which LIMPETins are the FHL ancestors in invertebrates. SmLIMPETin mRNA is expressed at significantly lower levels in mature adult females by comparison to mature adult males or immature males and females; besides, SmLIMPETin expression in schistosomules could not be detected by RT-PCR. The SmLIMPETin protein is localized in the cytoplasm and is ubiquitous in male parasites. The presence of a nuclear localization signal (NLS) inside SmLIMPETin's PET domain is discussed, as well as SmLIMPETin's putative functions in *S. mansoni* biology.

Keywords: 1. Methylation. 2. Methyltransferase. 3. PRMT. 4. Nuclear Receptor. 5. RNA Transport. 6. RNA Splicing. 7. LIM Domains Protein. 8. Cyclic AMP Responsive Element (CRE). 9. *Schistosoma mansoni*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Distribuição global da esquistossomose. _____	24
Figura 1.2	O status global do controle da esquistossomose. _____	28
Figura 1.3	Distribuição da esquistossomose no Brasil de acordo com a prevalência de infecção humana _____	30
Figura 1.4	(A) Prevalência da esquistossomose no Brasil, de 1977 a 2002. (B) Redução da morbidade/mortalidade por esquistossomose e diminuição da hospitalização por esquistossomose, de 1977 a 2002. __	31
Figura 1.5	Micrografia eletrônica de varredura de um casal de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> em cópula. _____	33
Figura 1.6	O ciclo de vida do <i>S. mansoni</i> . _____	34
Figura 1.7	(A) Ovo de <i>S. mansoni</i> . (B) Micrografia eletrônica de varredura de um miracídio de <i>S. mansoni</i> (acima) recém saído do ovo (abaixo à esquerda). _____	35
Figura 1.8	Um caramujo do gênero <i>Biomphalaria</i> , o hospedeiro intermediário e transmissor do <i>S. mansoni</i> . _____	36
Figura 1.9	Micrografia eletrônica de uma cercária de <i>S. mansoni</i> . _____	36
Figura 1.10	Micrografia eletrônica de um esquistossômulo de <i>S. mansoni</i> . _____	37
Figura 1.11	Um granuloma. Pode-se observar claramente no centro da foto um ovo rodeado, majoritariamente, por fibroblastos, em meio ao tecido hepático. _____	38
Figura 1.12	Indivíduo com hepatoesplenomegalia. _____	39
Figura 1.13	As etapas da transcrição catalisada pela RNA polimerase II. _____	57
Figura 1.14	Representação esquemática dos domínios dos receptores nucleares. _	61
Figura 1.15	Formas de oligomerização dos receptores nucleares e seus respectivos elementos responsivos a hormônio (HREs). _____	63
Figura 1.16	Estrutura da partícula central do nucleossomo determinada por análise das difrações de raios X de seus cristais, com resolução de 2.8 Å. _____	70
Figura 1.17	A Família das proteínas arginina metiltransferases (PRMTs). _____	76
Figura 1.18	Seqüência consenso e topologia dos domínios LIM. _____	84
Figura 1.19	Proteínas com domínios LIM. _____	86
Figura 3.1	Mapa do plasmídeo pGEX-4T-1-SmPRMT1 _____	102
Figura 4.1	Seqüência de nucleotídeos e seqüência deduzida de aminoácidos (fase +1) do clone SMFBE8. _____	116
Figura 4.2	Alinhamento da seqüência deduzida de aminoácidos do clone SMFBE08 com a seqüência parcial de aminoácidos da PRMT1 isoforma 1 humana (aa 112-352). _____	116
Figura 4.3	Arquivo do GenBank contendo a seqüência integral depositada da SmPRMT1. _____	119

Figura 4.4	Seqüência integral de nucleotídeos do mRNA e seqüência integral deduzida de aminoácidos da SmPRMT1. _____	119
Figura 4.5	Alinhamento da seqüência deduzida de aminoácido da SmPRMT1 com as seqüências de aminoácidos das PRMTs1 de 12 outras espécies. _____	123
Figura 4.6	Árvore filogenética sem raiz deduzida a partir do alinhamento de 7 famílias de PRMTs (PRMT1 – PRMT7). _____	123
Figura 4.7	Expressão do mRNA da SmPRMT1 em machos e fêmeas adultos maduros e imaturos determinada por RT-PCR semi-quantitativo. __	127
Figura 4.8	<i>Southern blot</i> da SmPRMT1 _____	129
Figura 4.9	Metilação <i>in vitro</i> da histona H4 pela SmPRMT1. _____	131
Figura 4.10	Esquema representando o modelo de interação entre co-ativadores primários (SRC-1), co-ativadores secundários (PRMT1) e receptores nucleares (NR). _____	132
Figura 4.11	Ensaio de interação <i>in vitro</i> entre a GST-SmPRMT1 e o ³⁵ S-SmRXR1. _____	133
Figura 4.12	Ensaio de interação <i>in vitro</i> entre a 6xhis-ΔNH ₂ -hSRC1 e o ³⁵ S-SmRXR1. _____	134
Figura 4.13	Ensaio de interação <i>in vitro</i> entre a GST-SmPRMT1 e a 6xhis-ΔNH ₂ -hSRC1. _____	135
Figura 4.14	Diagramas dos construtos da SMYB1 e da 6xhis-SmSM-D3 indicando seus domínios. _____	136
Figura 4.15	Ensaio de metilação das proteínas de ligação a RNA SMYB1 e SmSM-D3 pela SmPRMT1. _____	138
Figura 4.16	Ensaio de interação <i>in vitro</i> entre as proteínas de ligação a RNA SMYB1 e SmSM-D3 e a SmPRMT1. _____	140
Figura 5.1	EMSA utilizando oligonucleotídeos consenso CRE e do CRE mutante incubados com extrato nuclear de machos adultos de <i>S. mansoni</i> . _____	143
Figura 5.2	EMSA utilizando oligonucleotídeos consenso CRE e do CRE mutante incubados com extrato nuclear de fêmeas adultas de <i>S. mansoni</i> . _____	144
Figura 5.3	Seqüência de nucleotídeos e seqüência deduzida de aminoácidos (fase +3) do contig TC3466. _____	147
Figura 5.4	Alinhamento da seqüência deduzida de aminoácidos (fase +3) do contig TC3466 com a seqüência parcial de aminoácidos do ACT/FHL5 de camundongo (aa 1-206). _____	147
Figura 5.5	Arquivo do GenBank contendo a seqüência integral da SmLIMPETin. _____	149
Figura 5.6	Seqüência integral de nucleotídeos e seqüência integral deduzida de aminoácidos da SmLIMPETin. _____	151

Figura 5.7	Alinhamento da seqüência deduzida de aminoácido da SmLIMPETin com as seqüências deduzidas de aminoácidos das proteínas com domínios LIM e PET de 6 outras espécies de invertebrados. _____	154
Figura 5.8	Árvore filogenética sem raiz deduzida a partir do alinhamento de proteínas com domínios LIM e PET de invertebrados (LIMPETins) e proteínas das famílias <i>four-and-a-half LIM domains</i> FHL1, FHL2, FHL3 e FHL5/ACT. _____	156
Figura 5.9	Quantificação da expressão do mRNA da SmLIMPETin em machos e fêmeas imaturos e maduros por <i>northern blot</i> . _____	160
Figura 5.10	Expressão do mRNA da SmLIMPETin em machos e fêmeas adultos imaturos e maduros e em esquistossômulos estimada por RT-PCR semi-quantitativo. _____	160
Figura 5.11	<i>Southern blot</i> da SmLIMPETin _____	162
Figura 5.12	<i>Western blot</i> da SmLIMPETin. _____	165
Figura 5.13	Imunohistoquímica de seções de vermes machos adultos de <i>S. mansoni</i> com o anticorpo anti-GST-SmLIMPETin purificado. _____	165

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Espécies de esquistossomos que infectam o homem. _____	22
Tabela 1.2	Receptores nucleares recentemente identificados de <i>S. mansoni</i> _____	52
Tabela 1.3	As três RNA polimerases das células eucarióticas. _____	55
Tabela 1.4	Fatores gerais de transcrição da RNA Polimerase II de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . _____	56
Tabela 1.5	Subfamílias dos receptores nucleares de mamíferos. _____	64
Tabela 3.1	Seqüências dos <i>primers</i> utilizados neste trabalho. _____	112
Tabela 3.2	Descrição das proteínas recombinantes utilizadas neste trabalho. _____	114
Tabela 4.1	Tabela com valores de identidade e similaridade entre a PRMT1 de <i>S. mansoni</i> (SmPRMT1) e as PRMTs1 incluídas no alinhamento da Figura 4.5. _____	121
Tabela 5.1	Tabela de identidade e similaridade entre a LIMPETin de <i>Schistosoma mansoni</i> (SmLIMPETin) e as proteínas com domínios LIM e PET de invertebrados (LIMPETins) incluídas no alinhamento da Figura 5.7. _____	156

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μCi	microcurrie(s)
μg	micrograma(s)
μL	microlitro(s)
μM	micromol(es)/L ou micromolar
μm	micrômetro(s)
Å	angstrom(s)
aa	aminoácido(s)
AD	domínio de ativação (<i>activation domain</i>)
AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
BAC	cromossomo artificial de bactéria (<i>bacterial artificial chromosome</i>)
BSA	albumina sérica bovina (<i>bovine serum albumine</i>)
cap	Adição de uma 7'-metilguanossina ligada pelo carbono 5 de sua ribose ao carbono 5 da ribose do primeiro nucleotídeo do RNA, por uma ponte trifosfato
CBP	proteína de ligação à CREB (<i>CREB binding protein</i>)
cDNA	DNA complementar
CPI	complexo de pré-iniciação
CREB	proteína de ligação ao elemento responsivo a AMPc (<i>cAMP-responsive element binding protein</i>)
CREM	modulador do elemento responsivo a AMPc (<i>cAMP-responsive element modulator</i>)
DAPI	diidrocloreto de 4,6-diamidino-2-fenilindol
DBD	domínio de ligação ao DNA (<i>DNA binding domain</i>)
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DTT	1,4-ditiotreitol (reagente de Cleland)
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
EMSA	ensaio de deslocamento da mobilidade eletroforética (<i>electrophoretic mobility shift assays</i>)
EST	etiqueta de seqüência expressa (<i>expressed sequence tag</i>)
FGTs	fatores gerais de transcrição
g	grama
GAPDH	gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GAR	ricos em glicina e arginina (<i>glycine and arginine-rich</i>)
GST	glutathiona S-transferase
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico
hnRNA	RNA nuclear heterogêneo (<i>heterogeneous nuclear RNA</i>)
hnRNP	RNP nuclear heterogênea (<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein</i>)
IPTG	isopropil-tio- β -D-galactosídeo
K	Kelvin(s)

kDa	quilodalton(s)
KOAc	acetato de potássio
L	litro(s)
LBD	domínio de ligação ao ligante (<i>ligand-binding domain</i>)
M	mol(es)/L ou molar
MBP	proteína de ligação à maltose (<i>maltose binding protein</i>)
min.	minuto(s)
mL	mililitro(s)
mRNA	RNA mensageiro
NES	sinal de exportação nuclear (<i>nuclear export signal</i>)
NLS	sinal de localização nuclear (<i>nuclear localization signal</i>)
NR	receptor nuclear (<i>nuclear receptor</i>)
p/v	peso/volume
pb	pares de bases
PBS	solução salina tamponada por fosfato (<i>Phosphate-buffered saline</i>)
PCR	reação em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonila
poli-(dI-dC)	poli(desoxi-inosina/desoxi-citosina)
RNA	ácido ribonucléico (<i>ribonucleic acid</i>)
RNP	ribonucleoproteína (<i>ribonucleoprotein</i>)
RT-PCR	PCR após síntese de cDNA por transcriptase reversa
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
SmPRMT1	proteína arginina metiltransferase de <i>S. mansoni</i>
snRNP	partícula pequena de RNPs nucleares (<i>small nuclear ribonucleoprotein particle</i>)
SRC	co-ativador de receptor de esteróides (<i>steroid receptor coactivator</i>)
SSC	solução salina padrão com citrato (<i>standard saline citrate</i>)
TAE	tampão Tris acetato EDTA
TBE	tampão Tris borato EDTA
TBS	solução salina tamponada por Tris (<i>Tris-buffered saline</i>)
TE	tampão Tris EDTA
TIGR	<i>"The Institute for Genome Research"</i>
TPCK	Tosil-L-fenilalanina clorometil cetona
Tris	2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol
V	volt(s)
v	volume
WGS	seqüenciamento integral de genoma pelo método de <i>shotgun</i> (<i>whole genome shotgun sequencing</i>)
X	vez(es) concentrado(a)
X g	gravidade(s)

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	IV
RESUMO	V
ABSTRACT	VI
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XI
SUMÁRIO	XIII
1 INTRODUÇÃO	16
1.1 A ESQUISTOSSOMOSE	16
1.1.1 HISTÓRICO	16
1.1.2 FILOGENIA DOS AGENTES ETIOLÓGICOS	21
1.1.3 EPIDEMIOLOGIA E CONTROLE	23
1.1.3.1 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA	23
1.1.3.2 O ÔNUS GLOBAL DA ESQUISTOSSOMOSE	25
1.1.3.3 CONTROLE	27
1.1.3.4 A ESQUISTOSSOMOSE NO BRASIL	29
1.2 O <i>SCHISTOSOMA MANSONI</i>	32
1.2.1 O CICLO DE VIDA DO <i>S. MANSONI</i>	32
1.2.2 A PATOLOGIA DA ESQUISTOSSOMOSE	38
1.2.3 BIOQUÍMICA E METABOLISMO DO <i>S. MANSONI</i>	40
1.2.4 BIOLOGIA SEXUAL DO <i>S. MANSONI</i>	41
1.2.5 EFEITOS DOS HORMÔNIOS SOBRE O <i>S. MANSONI</i>	44
1.2.6 A IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS SEXO-ESPECÍFICAS E FATORES ENVOLVIDOS NA SUA EXPRESSÃO DIFERENCIAL	47
1.2.7 OS RECEPTORES NUCLEARES DE <i>S. MANSONI</i>	49
1.2.8 CO-REGULADORES DA EXPRESSÃO GÊNICA NO <i>S. MANSONI</i>	53
1.3 A REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL EM EUCARIOTOS	53
1.3.1 A MAQUINARIA BASAL DE TRANSCRIÇÃO	54
1.3.2 FATORES DE TRANSCRIÇÃO	58
1.3.2.1 OS ATIVADORES TRANSCRICIONAIS	58
1.3.3 OS RECEPTORES NUCLEARES	59
1.3.4 OS CO-REGULADORES	65
1.3.4.1 OS CO-ATIVADORES	65
1.3.5 A CROMATINA E AS HISTONAS	69
1.3.6 REMODELAMENTO DA CROMATINA	71
1.3.6.1 COMPLEXOS DE REMODELAMENTO DA CROMATINA DEPENDENTES DE ATP	71
1.3.6.2 MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS DAS HISTONAS	73
1.3.6.2.1 A ACETILAÇÃO E A DESACETILAÇÃO DE HISTONAS	73
1.3.6.2.2 A METILAÇÃO DE HISTONAS	74
1.4 AS PROTEÍNA ARGININA METILTRANSFERASES	75
1.4.1 AS PRMTs COMO CO-ATIVADORAS	78
1.4.2 INTERAÇÕES FUNCIONAIS ENTRE A ACETILAÇÃO DE HISTONAS E A METILAÇÃO DE HISTONAS EM RESÍDUOS DE ARGININA	80
1.4.3 AS PRMTs SÃO CO-ATIVADORAS DE DIVERSOS TIPOS DE ATIVADORES TRANSCRICIONAIS	81

1.4.4	AS PRMTs METILAM OUTROS SUBSTRATOS ALÉM DAS HISTONAS	81
1.4.5	AS PRMTs NO PROCESSAMENTO DE RNA	82
1.5	AS PROTEÍNAS COM DOMÍNIOS LIM	83
1.5.1	A SEQÜÊNCIA DO DOMÍNIO LIM	84
1.5.2	OS DOMÍNIOS LIM ESTÃO PRESENTES EM NÚMEROS VARIADOS EM PROTEÍNAS COM FUNÇÕES DIVERSAS	85
2	OBJETIVOS	87
2.1	PARTE I	87
2.2	PARTE II	88
3	MATERIAL E MÉTODOS	89
3.1	MANUTENÇÃO DO CICLO DE VIDA DO <i>S. MANSONI</i> E OBTENÇÃO DE VERMES ADULTOS POR PERFUSÃO	89
3.2	INFECÇÕES UNISSEXUAIS DE <i>S. MANSONI</i>	89
3.3	EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DE <i>S. MANSONI</i>	90
3.4	SÍNTESE DE cDNA	90
3.5	OBTENÇÃO DA SEQÜÊNCIA PARCIAL DA SMPRMT1	90
3.6	OBTENÇÃO DA SEQÜÊNCIA PARCIAL DA SMLIMPETIN	91
3.7	VARREDURA DA BIBLIOTECA DE cDNA DE <i>S. MANSONI</i> EM BUSCA DO CLONE COM A SEQÜÊNCIA COMPLETA DA SMPRMT1	91
3.8	VARREDURA DA BIBLIOTECA DE cDNA DE <i>S. MANSONI</i> EM BUSCA DO CLONE COM A SEQÜÊNCIA COMPLETA DA SMLIMPETIN	93
3.9	SEQÜENCIAMENTO	94
3.10	RT-PCR SEMI-QUANTITATIVO PARA A ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA SMPRMT1	94
3.11	NORTHERN BLOT PARA A ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA SMLIMPETIN	95
3.12	RT-PCR SEMI-QUANTITATIVO PARA A ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA SMLIMPETIN	96
3.13	EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE <i>S. MANSONI</i>	97
3.14	MARCAÇÃO RADIOATIVA DE SONDA	97
3.15	SOUTHERN BLOT DA SMPRMT1	98
3.16	SOUTHERN BLOT DA SMLIMPETIN	99
3.17	CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS CONTENDO PROTEÍNAS RECOMBINANTES	99
3.18	EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	104
3.19	PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	105
3.20	ENSAIOS DE METILAÇÃO <i>IN VITRO</i>	106
3.21	SÍNTESE DE PROTEÍNAS POR TRANSCRIÇÃO E TRADUÇÃO <i>IN VITRO</i>	107
3.22	ENSAIOS DE INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA <i>IN VITRO</i> (PULL-DOWN)	107
3.23	OBTENÇÃO DE EXTRATOS PROTÉICOS DE <i>S. MANSONI</i>	108
3.24	WESTERN BLOT	109
3.25	ENSAIO DE DESLOCAMENTO DE MOBILIDADE ELETROFORÉTICA (EMSA) DE PROTEÍNAS NUCLEARES DE <i>S. MANSONI</i> COM OS OLIGONUCLEOTÍDEOS CONSENSO E MUTANTE DO CRE	110
3.26	GERAÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-GST-SMLIMPETIN	111
3.27	IMUNOFLOUORESCÊNCIA DE CORTES DE VERMES MACHOS COM ANTICORPOS ANTI-GST-SMLIMPETIN	112
4	PARTE I: RESULTADOS	115
4.1	IDENTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA ARGININA N-METILTRANSFERASE 1 (PRMT1) DE <i>S. MANSONI</i>	115

4.1.1	AQUISIÇÃO DA SEQÜÊNCIA PARCIAL DA PRMT1 DE <i>S. MANSONI</i>	115
4.1.2	ISOLAMENTO DA SEQÜÊNCIA COMPLETA DA PRMT1 DE <i>S. MANSONI</i>	117
4.1.3	HOMOLOGIA DA SMPRMT1 COM PRMTS1 DE OUTRAS ESPÉCIES	120
4.2	O MRNA DA SMPRMT1 É EXPRESSO CONSTITUTIVAMENTE EM ESQUISTOSSOMOS ADULTOS	125
4.3	ANÁLISE DO GENE DA SMPRMT1 POR <i>SOUTHERN BLOT</i>	128
4.4	A SMPRMT1 METILA A HISTONA H4 ESPECIFICAMENTE	130
4.5	A SMPRMT1 INTERAGE FÍSICAMENTE COM O CO-ATIVADOR SRC-1	132
4.6	A SMPRMT1 METILA PROTEÍNAS LIGADORAS DE RNA	136
4.7	A SMPRMT1 INTERAGE FÍSICAMENTE COM PROTEÍNAS LIGADORAS DE RNA	139
5	PARTE II: RESULTADOS	141
5.1	O <i>S. MANSONI</i> CONTÉM NO NÚCLEO PROTEÍNAS CAPAZES DE INTERAGIR ESPECIFICAMENTE COM O CRE	141
5.2	IDENTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA COM DOMÍNIOS LIM E PET (LIMPETIN) DE <i>S. MANSONI</i>	145
5.2.1	AQUISIÇÃO DA SEQÜÊNCIA PARCIAL DA LIMPETIN DE <i>S. MANSONI</i>	145
5.2.2	ISOLAMENTO DA SEQÜÊNCIA COMPLETA DA LIMPETIN DE <i>S. MANSONI</i> (SMLIMPETIN)	148
5.2.3	HOMOLOGIA DA SMLIMPETIN COM LIMPETINS DE OUTROS INVERTEBRADOS E COM OUTROS MEMBROS DAS FAMÍLIAS DAS PROTEÍNAS COM DOMÍNIOS LIM	152
5.3	O MRNA DA SMLIMPETIN É EXPRESSO DIFERENCIALMENTE ENTRE OS DIFERENTES ESTÁGIOS DO PARASITO E ENTRE MACHOS E FÊMEAS ADULTOS	158
5.4	ANÁLISE DO GENE DA SMLIMPETIN POR <i>SOUTHERN BLOT</i>	161
5.5	LOCALIZAÇÃO DA SMLIMPETIN EM VERMES ADULTOS DE <i>S. MANSONI</i> POR IMUNOHISTOQUÍMICA	163
6	DISCUSSÃO	168
6.1	PARTE I – A SMPRMT1	168
6.2	PARTE II – A SMLIMPETIN	178
7	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	190
7.1	PARTE I – A SMPRMT1	190
7.2	PARTE II – A SMLIMPETIN	191
	REFERÊNCIAS	194
	APÊNDICE I – PROTOCOLO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA EM CORTES DE CRIOSTATO DE VERMES ADULTOS DE <i>SCHISTOSOMA MANSONI</i>	221
	ANEXO I – TRABALHO PUBLICADO EM PERIÓDICO DE CIRCULAÇÃO INTERNACIONAL	224
	ANEXO II – TRABALHO PUBLICADO EM PERIÓDICO DE CIRCULAÇÃO INTERNACIONAL	235
	ANEXO III – TRABALHO PUBLICADO EM PERIÓDICO DE CIRCULAÇÃO INTERNACIONAL	245
	ANEXO IV – TRABALHO PUBLICADO EM PERIÓDICO DE CIRCULAÇÃO INTERNACIONAL	256
	ANEXO V – TRABALHO PUBLICADO EM PERIÓDICO DE CIRCULAÇÃO INTERNACIONAL	267

1 INTRODUÇÃO

1.1 A ESQUISTOSSOMOSE

1.1.1 HISTÓRICO

O parasito causador da esquistossomose foi descrito pela primeira vez em 1851 pelo médico alemão Theodore Maximillian Bilharz, razão pela qual a doença é também denominada Bilharziose (BILHARZ, 1852, traduzido por KEAN, 1978). Bilharz fora ao Egito em 1850 como assistente de um ex-professor, Wilhelm Griesinger. Quando Griesinger retornou à Alemanha, dois anos depois, Bilharz ocupou seu cargo como diretor do Departamento de Medicina e tornou-se professor de Clínica Médica no hospital Kasr el Aini, na cidade do Cairo. Na ocasião de sua ida para o Egito, C. T. von Siebold, seu ex-professor de helmintologia, o havia aconselhado que concentrasse seus estudos em helmintos que infectam humanos, sugestão que ele prontamente acolheu (JORDAN, 2000).

Já na cidade do Cairo, ao realizar uma série de autópsias, Bilharz constatou a presença de parasitos trematódeos caracterizados por machos e fêmeas adultos de morfologia distinta, alojados nas veias mesentéricas e nas paredes da bexiga (BILHARZ, 1852, 1853). Por achar que havia identificado uma espécie única, a denominou *Distomum haematobium*. Mais tarde, criou-se o gênero *Bilharz*, em sua homenagem, mas ela foi por fim denominada *Schistosoma haematobium* (JORDAN, 2000).

Bilharz havia notado, entretanto, que os vermes-fêmeas da parede da bexiga continham uma abundância de ovos em comparação com aqueles das veias mesentéricas, e não há quase nenhuma dúvida de que ele estava comparando fêmeas de *Schistosoma haematobium* (*sensu strictu*) com fêmeas de *Schistosoma mansoni*, já que as primeiras alojam 10-50 ovos no útero, enquanto que as segundas alojam de 1 a 2 ovos (JORDAN, 2000).

Bilharz e Griesinger, eventualmente, associaram os ovos com espículas terminais encontrados na parede da bexiga e na urina com a hematúria, caracterizando assim o *S. haematobium* como agente etiológico da esquistossomose urinária (BILHARZ, 1853).

Bilharz ficou, no entanto, confuso com relação aos ovos com espícula lateral (de *S. mansoni*) que achou na parede intestinal e no conteúdo intestinal e assim, pelos próximos 50 anos, assumiu-se erroneamente que o *S. haematobium* era causador tanto da esquistossomose urinária quanto da esquistossomose intestinal, e que o formato do ovo dependia da localização anatômica do parasito no hospedeiro definitivo.

Somente em 1902, após o achado de ovos com espículas provenientes de infecções “puras” de esquistossomose intestinal, Sir Patrick Manson (1902) concluiu que havia duas espécies de *Schistosoma* em humanos, o que resumiu na seguinte afirmação: “Possivelmente há duas espécies de *Bilharzia*, uma delas com ovos dotados de espícula lateral e que os deposita somente no reto, e outra que se aloja na bexiga ou no reto, indiferentemente” (*apud* LEIPER, 1918). Subseqüentemente, Sambon (1907)

propôs, adequadamente, que se denominasse a espécie responsável pela esquistossomose intestinal como *Schistosoma mansoni*.

De fato, apesar de haver sugestões similares sobre a existência de espécies distintas, as idéias de Manson não foram universalmente aceitas. Somente em 1916 Leiper estabeleceu de forma definitiva a existência de *S. mansoni* como uma espécie separada (LEIPER, 1916).

Com relação ao ciclo do parasito, apesar de saber-se à época que outros parasitos da mesma família infectavam caramujos, a procura pelos estágios intermediários do *S. haematobium* levou um longo tempo. Vários parasitólogos renomados como Arthur Loos, Prospero Sonsino e Thomas Cobbold, todos trabalhando no fim do século 19, falharam ao tentar infectar caramujos (JORDAN, 2000), até que Robert Leiper, em 1915, (LEIPER, 1915) conseguiu demonstrar o ciclo completo, definindo o caramujo como hospedeiro intermediário.

No Japão, a primeira citação à dermatite cercariana foi feita em 1804, mas a primeira descrição médica da esquistossomose foi feita em 1847 pelo Dr. Yoshinao Fujii (*apud* ISHII, 2003), um médico do distrito de Katayama, em Hiroshima. Fujii descreveu uma doença em que homens, gado e cavalos eram afligidos por cansaço, inchaço abdominal e erupções severas nas pernas, mas não soube identificar a causa (FUJII, 1847).

Trinta anos após descrever a doença, Fujii solicitou reforço para pesquisar – “Eu estou escrevendo novamente para solicitar a assistência de cada especialista para encontrar a solução para este problema” (*apud* SASA, 1972). Seu apelo foi atendido e

em 1882 foi formado, pela prefeitura de Hiroshima, um comitê para compreender e combater a doença de Katayama.

Já em 1888, Tokuho Majima (1888) achou ovos do parasito em fígados cirróticos de pacientes mortos em virtude da doença de Katayama e, em 1904, Kawanashi (1904) observou ovos de parasitos nas fezes e no fígado de pacientes com a doença e constatou que eles eram muito semelhantes a ovos de um verme trematódeo de gato. No mesmo ano, Dr. Yoshida, do distrito de Katayama, pediu ao Prof. Fujinami da Universidade de Kyoto que fizesse uma autópsia, na qual eles encontraram o parasito adulto alojado na veia porta (*apud* ISHII, 2003). Concomitantemente, o Prof. Fujiro Katsurada achou um verme macho adulto em um gato, e como os ovos deste parasito continham embriões ciliados como os do miracídio de *S. haematobium*, ele o denominou *S. haematobium japonicum* (KATSURADA, 1904).

O *S. japonicum* foi achado independentemente por John Catto em 1905 (CATTO, 1905), em material autopsiado de um chinês, na Singapura, fato pelo qual ele ganhou o Prêmio Cragg da *London School of Tropical Medicine*, apesar de ter sido precedido por Katsurada na descoberta.

Em 1909, o Prof. Fujinami fez experimentos com vacas para demonstrar a rota de infecção pela derme, e o Sr. Matsuura infectou-se intencionalmente ao entrar em uma vala infestada, confirmando por definitivo esta hipótese (*apud* ISHII, 2003).

Já o desenvolvimento do *S. japonicum* no hospedeiro intermediário foi descrito por Keinosuke Miyairi e M. Susuki da Universidade de Kyushu, em 1913 (MIYAIRI, 1913, traduzido por WARREN, 1973). Eles acharam o caramujo em Saga e

demonstraram que o mesmo era capaz de produzir miracídios, isto 2 anos antes de Leiper descrever, independentemente, o ciclo do *S. haematobium* (LEIPER, 1915).

As duas outras espécies relevantes de esquistossomos, o *S. intercalatum* e o *S. mekongi*, foram descobertas ao longo do século 20.

A esquistossomose é, sem dúvida, uma doença que aflige o homem desde a antiguidade. Já se tentou, inclusive, provar que os egípcios tê-la-iam citado em papiros, e que haveria inclusive uma palavra, *aaa*, para designar a doença (ADAMSON, 1976; HOEPPLI, 1959, 1973 *apud* COX, 2002), assim como alguns hieróglifos que supostamente remeteriam à hematúria (EBBEL, 1937 *apud* COX, 2002). Esta suposição, entretanto, já foi descartada (NUNN, 2000), mas provas concretas da ocorrência da esquistossomose em tempos ancestrais vêm sendo recolhidas.

De fato, ovos calcificados foram encontrados em duas múmias (1250-1000 A.C.) por Ruffer, em 1910 (RUFFER, 1910 *apud* JORDAN, 2000). Novas técnicas assinalam evidências de sua ocorrência em uma múmia de 5000 A.C. (DEELDER, 1990). Além disso, foi encontrada uma alta prevalência da doença, da ordem de 65%, em múmias (550-350 A.C.) da área de Wade Halfa, na fronteira Egito-Sudão (MILLER, 1992). Por fim, a infecção por *S. haematobium* foi confirmada por ELISA em duas múmias, de 4000 e 3000 anos de idade (CONTIS, 1996).

A doença era provavelmente tão comum na Mesopotâmia e na Palestina quanto no Egito, já que caramujos da espécie *Bulinus truncatus*, o hospedeiro intermediário do *S. haematobium*, foram encontrados em tijolos de argila de 4000 A.C. (ADAMSON, 1976;

HULSE, 1971) e da idade do bronze (*circa* 1650 A.C.) (BIGGS, 1960 *apud* JORDAN, 2000).

Com relação à esquistossomose no oriente antigo pouco se sabe, mas na China foi encontrada uma múmia datada de *circa* 2100 A.C. que continha ovos de *S. japonicum* no reto e no fígado (LIU, 1978 *apud* JORDAN, 2000).

1.1.2 FILOGENIA DOS AGENTES ETIOLÓGICOS

Os agentes etiológicos da esquistossomose são os *Schistosoma* spp. *Schistosoma* significa corpo (*soma*) com fenda (*schisto*), o que é uma descrição clara da morfologia do verme macho deste gênero.

O gênero *Schistosoma* pertence ao filo *Platyhelminthes*, superclasse *Trematoda*, subclasse *Digenea*, superfamília *Schistosomatoidea* e família *Schistosomatidae*.

Este gênero é o que apresenta a maior diversidade com relação ao número de espécies reconhecidas, à distribuição geográfica e aos hospedeiros parasitados (ROLLINSON, 1987).

A família *Schistosomatidae*, entretanto, é composta por 85 espécies, as quais são organizadas em 13 gêneros. Todas são parasitas do sistema vascular de vertebrados e são dióicos, isto é, possuem machos e fêmeas morfológica e geneticamente distintos.

Destes 13 gêneros, 7 parasitam pássaros, 5 parasitam mamíferos e 1 parasita répteis.

Uma das principais características que diferenciam esta família é a expressiva diferença morfológica entre machos e fêmeas, descrita mais abaixo.

Espécie	Gênero do Caramujo	Distribuição Geográfica
<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>Biomphalaria</i>	África, Oriente Médio, Brasil
<i>Schistosoma haematobium</i>	<i>Bulinus</i>	África, Oriente Médio
<i>Schistosoma japonicum</i>	<i>Oncomelania</i>	Ásia (antes no Japão, agora predominantemente na China)
<i>Schistosoma intercalatum</i>	<i>Bulinus</i>	África Ocidental
<i>Schistosoma mekongi</i>	<i>Neotricula</i>	Ásia (somente no entorno do rio Mekong)

Tabela 1.1 Espécies de esquistossomos que infectam o homem.

Incluindo os gêneros de caramujos correspondentes e a distribuição geográfica.

A família *Schistosomatidae* pode ser dividida em 4 subfamílias: *Bilharziellinae*, *Gigantobilharziinae*, *Schistosomatinae* e *Griphobilharzinae*. Os membros da subfamília *Schistosomatinae* são parasitos de mamíferos e entre os mesmos encontramos o gênero *Schistosoma*, o único que tem o homem como hospedeiro definitivo.

Até 2003 eram conhecidas 20 espécies do gênero *Schistosoma* (ROLLINSON, 1997) dentre as quais, 5 parasitam o homem: o *S. mansoni*, o *S. haematobium*, o *S. japonicum*, o *S. intercalatum* e o *S. mekongi*. Recentemente, Morgan *et al.* (2003) descreveram uma nova linhagem, o que poderia aumentar o número de espécies para 21.

A classificação de cada espécie é baseada na morfologia dos ovos, na distribuição geográfica e no gênero dos hospedeiros intermediários, sendo todos estes caramujos. O hospedeiro intermediário e a distribuição geográfica de cada uma das espécies que parasitam o homem são apresentados na Tabela 1.1.

1.1.3 EPIDEMIOLOGIA E CONTROLE

1.1.3.1 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

A esquistossomose é, ainda hoje, uma das doenças parasitárias de maior incidência no mundo. Ela é endêmica em 76 países e territórios da África, Ásia e América Latina. Estima-se que 200 milhões de pessoas estejam infectadas, sendo que 120 milhões são portadores sintomáticos e, dentre estes, 20 milhões são doentes graves. Mais de 600 milhões de pessoas estão sob risco de infecção (CHITSULO, 2000; CHITSULO, 2004).

Dentre os indivíduos infectados, 85% vivem na África subsaariana, onde o *S. haematobium*, o *S. intercalatum* e o *S. mansoni* são endêmicos. O *S. haematobium* e o *S. mansoni* são encontrados também no Egito e na Península Arábica. Reportou-se a presença de *S. haematobium* na região do Magreb (Marrocos, Argélia, Tunísia e Mauritânia). O *S. mansoni* é endêmico no nordeste do Brasil além de estar presente também na Venezuela, no Suriname e no Caribe. O *S. japonicum* é endêmico na China e nas Filipinas, sendo também encontrado em Sulawesi, na Indonésia. O *S. mekongi* está presente no Camboja e no Laos (CHITSULO, 2004).

A Figura 1.1 mostra a distribuição global das espécies de esquistossomos e deve ser considerada somente como uma referência informativa, já que se encontra bastante desatualizada (DOUMENGE, 1987, p. 7). A Organização Mundial da Saúde (OMS), entretanto, tem um projeto em andamento com o intuito de atualizar este atlas.

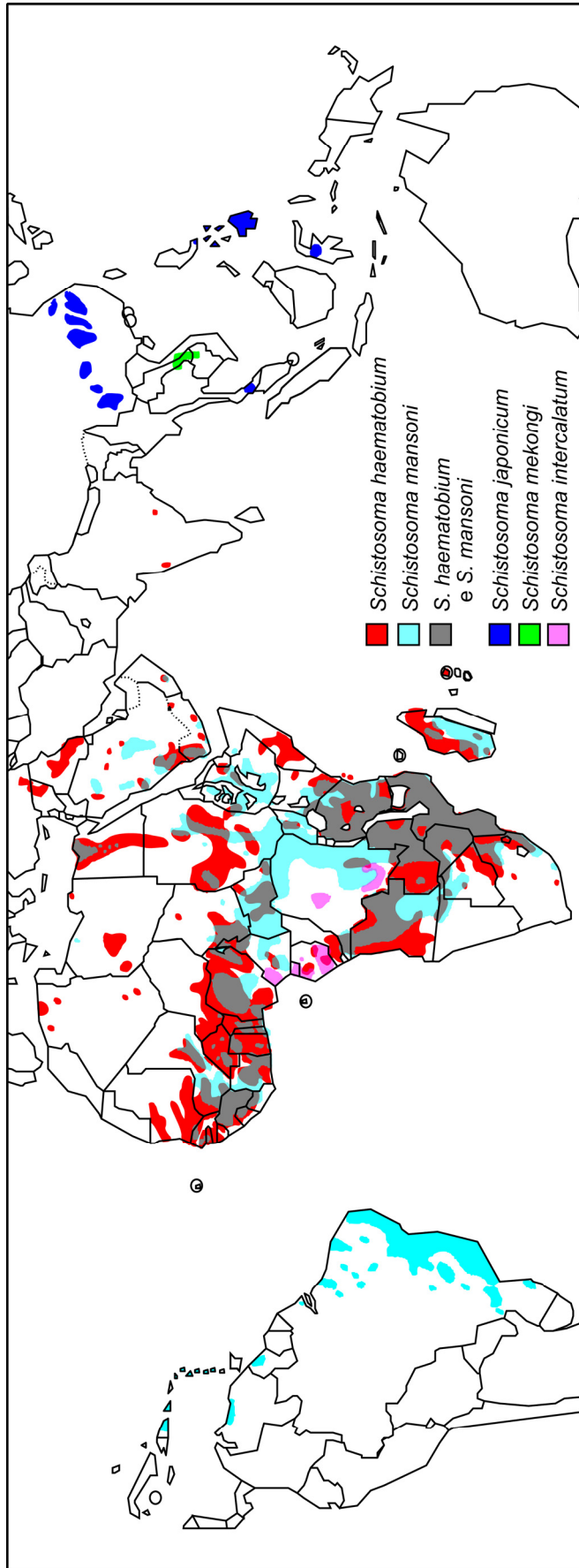


Figura 1.1 Distribuição global da esquistossomose.

Adaptado de: DOUMENGE, 1987.

1.1.3.2 O ÔNUS GLOBAL DA ESQUISTOSSOMOSE

Nas décadas de 80 e 90, programas de saúde nacionais e internacionais passaram a depender de análises de custo/benefício para efeito de alocação de recursos. Essa abordagem, entretanto, trouxe a necessidade de estimativas precisas dos dados de mortalidade e deficiências resultantes de cada doença, para que as mais importantes pudessem ser priorizadas. Para isso, foram desenvolvidas, pelo Plano “O Ônus Global das Doenças” (MURRAY, 1996b), estimativas de **ano de vida reajustado devido à incapacidade***, ou DALY, para várias doenças. As estimativas de DALY passaram a ser usadas para classificar os efeitos de diferentes doenças na saúde global. Entretanto, por não levar em conta seus sintomas, suas seqüelas e a sua natureza crônica, os valores de DALY por esquistossomose não se demonstraram confiáveis. De fato, os valores calculados variavam de 0,005 a 0,006, sendo assim similares àqueles de doenças como vitiligo facial (MURRAY, 1996a).

Além disso, um comitê de especialistas da OMS (WHO, 2002b, p. 4) concluiu que as mortes por esquistossomose poderiam chegar a 200.000/ano somente na África subsaariana, em contraste com as 15.000/ano em todo o mundo que haviam sido estimadas anteriormente (WHO, 2002a, p. 186). Estas discrepâncias indicam que a mortalidade pela esquistossomose no mundo está claramente subestimada. Levando em conta os dados estimados atuais, a esquistossomose só perderia para a malária em número de mortes por ano, dentre as doenças infecciosas. Estes estudos,

* Tradução livre do autor para: *disability-adjusted life-year*.

entretanto, apresentam grandes diferenças nas abordagens quantitativas e nas unidades de medida, além de falta de coesão dos dados publicados. Eles devem, portanto, ser interpretados com cautela. (MICHAUD, 2004).

Procurando estabelecer o ônus efetivo da doença, King *et al.* (2005) fizeram uma revisão detalhada da literatura com o objetivo de desenvolver uma estimativa real, baseada em evidências experimentais, da importância das incapacidades causadas pela esquistossomose crônica.

Seus resultados demonstraram uma associação significativa entre a infecção humana por esquistossomos e os sintomas de diarreia, dor e fadiga; além disso, evidenciaram que a infecção causa efetivamente déficit de hemoglobina, subnutrição e tolerância reduzida a exercícios.

Portanto, embora na maioria dos casos não seja potencialmente letal, a esquistossomose é uma doença de grande importância, de caráter crônico e recorrente, cujo efeito na saúde de indivíduos infectados é expressivo.

A mortalidade causada pela esquistossomose, por sua vez, está relacionada a estágios muito avançados da doença, os quais atingem uma pequena porcentagem dos doentes e necessitam de muitas décadas de infecção para se desenvolver. Como conseqüência disso, a fração do total de DALYs por esquistossomose decorrente de morte prematura é, provavelmente, muito pequena em comparação com a fração dos mesmos decorrente de anos perdidos por incapacidade (MICHAUD, 2004; MURRAY, 1996b). Entretanto, o real papel da mortalidade em virtude da esquistossomose é desconhecido (KING, 2005).

A estimativa das incapacidades causadas pela esquistossomose derivadas do estudo de King *et al.* (KING, 2005) foi entre 4 e 30 vezes maior do que os pesos de incapacidade idade-específicos atribuídos à esquistossomose no Plano “O Ônus Global das Doenças”, de 1996 (MURRAY, 1996b).

Este Plano separou causas específicas de doenças, como a infecção por helmintos, de suas morbidades, como a anemia e a subnutrição. Como resultado, as incapacidades geradas por infecções crônicas por helmintos perderam ênfase e atribuiu-se aos efeitos dos tratamentos de causas específicas de doenças um valor menor do que o necessário. Como consequência disso, houve uma diminuição considerável na prioridade do controle de parasitos helmintos.

Os resultados de King *et al.* (2005) mostram que a esquistossomose tem um ônus na saúde pública muito maior do que se pensava, principalmente em vista do grande número de indivíduos infectados (em torno de 200 milhões). Portanto, faz-se necessário que o tratamento global desta doença com quimioterapia, através de programas sérios e abrangentes, seja efetuado com mais intensidade do que atualmente.

1.1.3.3 CONTROLE

Embora a distribuição da esquistossomose tenha mudado nos últimos 50 anos e vários programas de controle tenham obtido sucesso, a estimativa do número de indivíduos infectados ou sob risco de infecção não foi reduzida. Onde o controle obteve sucesso, o número de pessoas infectadas ou sob risco de infecção é muito

pequeno. Nos países previamente endêmicos da Ásia e da América, esta é a situação (Figura 1.2). Por outro lado, na África subsaariana, onde a população aumentou mais de 70% nos últimos 30 anos, um grande número de pessoas está infectado ou sob risco de infecção (ENGELS, 2002).

O Brasil, a região do Magreb, o Oriente Médio, a China e as Filipinas, por exemplo, obtiveram sucesso no controle da morbidade utilizando como estratégia a quimioterapia (CHITSULO, 2004). A China atingiu um patamar muito bom de controle em 2000, chegando a um valor estimado de 695.000 casos, neste ano (ZHOU, 2005). Nos anos que se seguiram, entretanto, os dados disponíveis indicam que a esquistossomose está re-emergindo, já que o número de casos foi estimado, no fim de



Figura 1.2 O status global do controle da esquistossomose.

Adaptado de: ENGELS, 2002, p. 140.

2003, em aproximadamente 850.000 (ZHOU, 2005). Isto ocorreu, provavelmente, devido a múltiplos fatores, inclusive o aumento na difusão dos caramujos devido às inundações decorrentes da construção da represa das “Três Gargantas” (MINTER, 2005; ZHENG, 2002) e da redução dos esforços de controle desde o fim do “Projeto de Empréstimo do Banco Mundial”, em 2001 (ENGELS, 2005).

1.1.3.4 A ESQUISTOSSOMOSE NO BRASIL

No Brasil, o único agente etiológico da esquistossomose é o *S. mansoni*. Além disso, existem três caramujos que atuam como hospedeiros intermediários no país, o *Biomphalaria glabrata*, o *B. tenagophila* e o *B. straminea*. Há também dois potenciais hospedeiros intermediários, cuja infecção só foi descrita em laboratório, o *B. amazônica* e o *B. peregrina* (COURA, 2004).

A Figura 1.3 mostra a distribuição da esquistossomose no Brasil, com base em dados do Programa de Controle da Esquistossomose da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (PCE, 1995-2005). Atualmente, a transmissão de esquistossomose no Brasil ocorre numa área endêmica vasta, que vai do Maranhão ao Espírito Santo além de Minas Gerais. Há também 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. Além disso, há casos decorrentes da infecção em áreas endêmicas registrados em quase todo o território nacional, principalmente em estados considerados pontos de migração, como Rondônia.

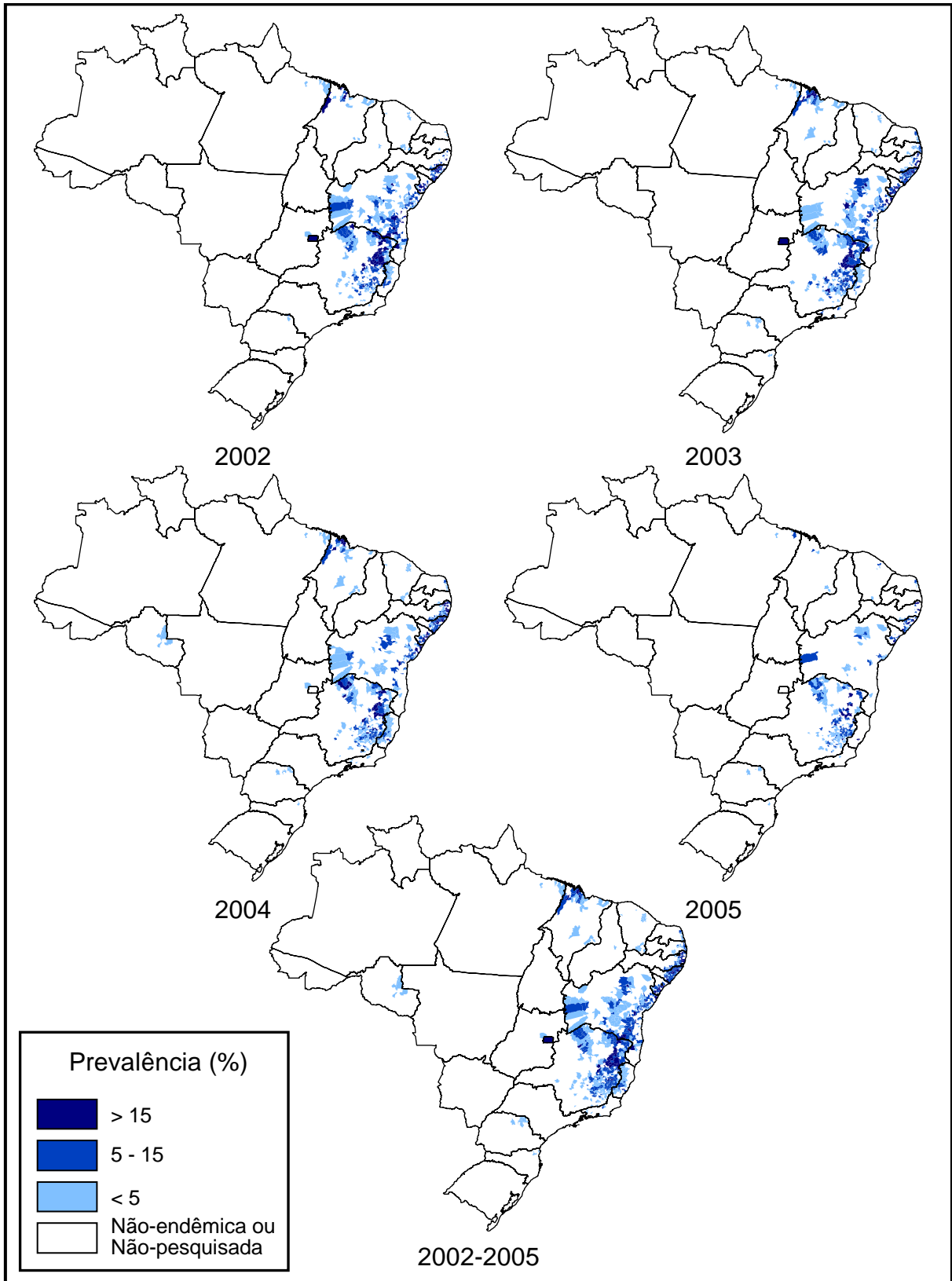


Figura 1.3 Distribuição da esquistossomose no Brasil de acordo com a prevalência de infecção humana

Com base em dados de: GT-Esquistossomose/PCE/SVS/MS (PCE, 1995-2005).

A prevalência da esquistossomose no Brasil apresentou um decréscimo significativo do final da década de 1970 a 2002, como pode ser observado na Figura 1.4A. Além disso, foi observado neste período um evidente decréscimo na morbidade e mortalidade decorrentes da esquistossomose, devido à implementação do Programa de Controle da Esquistossomose (PCE), pela Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, e do uso massivo e individual de oxamminiquine e de praziquantel. A taxa de hospitalização, em decorrência disso, também diminuiu. (Figura 1.4B).

O PCE teve um grande sucesso no controle da morbidade da doença e um sucesso relativo na redução da sua prevalência e dos focos isolados. Apesar disso, o Programa não foi capaz de reduzir a prevalência a menos de 5%, nem de interromper a transmissão. Além do mais, o aparecimento de novos focos em Santa Catarina, Distrito Federal, Goiás e Rio Grande do Sul não foi impedido.

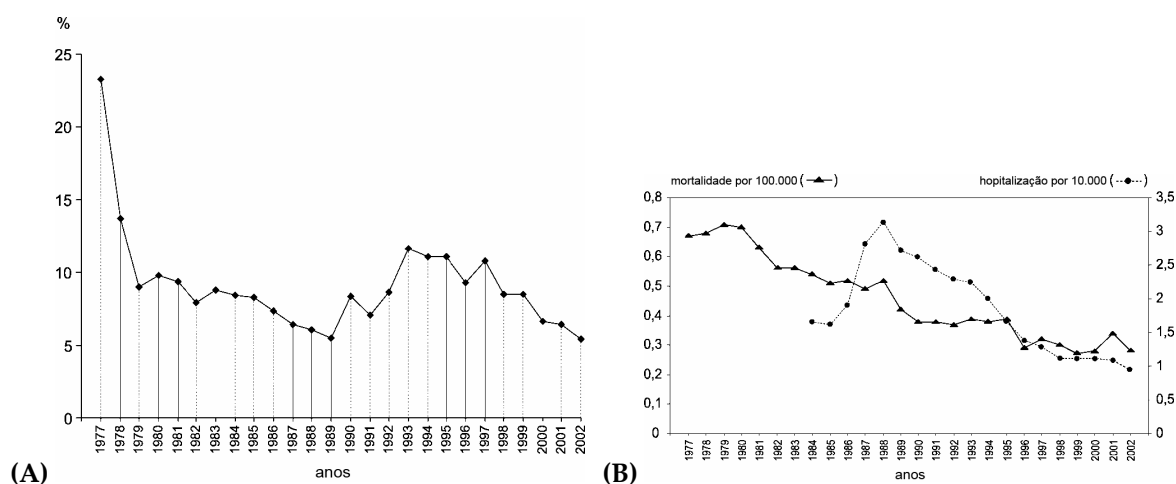


Figura 1.4 (A) Prevalência da esquistossomose no Brasil, de 1977 a 2002. (B) Redução da morbidade/mortalidade por esquistossomose e diminuição da hospitalização por esquistossomose, de 1977 a 2002.

Adaptado de: COURA, 2004.

Apesar de já existirem medicamentos efetivos no controle da infecção, tal como o praziquantel, um importante fator necessário ao seu controle na atual conjuntura é o saneamento básico, já que nas regiões carentes é difícil implantar um programa de distribuição do medicamento. Além disso, ocorre freqüentemente a reinfecção dos pacientes, mesmo depois do tratamento. Ainda não existe nenhuma vacina com eficiência comprovada contra o *S. mansoni*, apesar do sucesso recente em imunizações de camundongos com proteínas do isoladas do tegumento deste parasito (TRAN, 2006). Portanto, é necessário que se conheça a fundo o parasito, para que seja possível adquirir subsídios para desenvolver formas mais aplicáveis e efetivas de controle da infecção.

1.2 O *SCHISTOSOMA MANSONI*

Como o agente etiológico da esquistossomose no Brasil é o *S. mansoni*, e como o mesmo é o membro mais estudado do gênero *Schistosoma*, esta espécie foi escolhida há muito como nosso modelo de trabalho. Deste modo, as discussões subseqüentes desta obra concentrar-se-ão, mormente, no *S. mansoni*.

1.2.1 O CICLO DE VIDA DO *S. MANSONI*

O *S. mansoni* é um parasito trematódeo que passa a maior parte de sua vida nas veias mesentéricas do seu hospedeiro definitivo, em contato direto com o sangue. O *S. mansoni*, na sua forma adulta, que é encontrada no hospedeiro definitivo, vive em

pares, nos quais a fêmea se encontra inclusa no canal ginecóforo do macho (Figura 1.5).

O casal vive em cópula constante e a fêmea põe cerca de 300 ovos por dia, que são em grande parte eliminados nas fezes do hospedeiro. A maior parte dos mamíferos é suscetível à infecção por *S. mansoni*, mas o homem é o seu principal hospedeiro definitivo na natureza, assim como indispensável para a manutenção do ciclo do parasito na natureza.



Figura 1.5 Micrografia eletrônica de varredura de um casal de vermes adultos de *S. mansoni* em cópula.

Pode-se observar que o macho é bem maior do que a fêmea. Adaptado de: <http://www.biosci.ohio-state.edu/~parasite/schistosome_adults.html>. Acesso em: Mar., 2006.

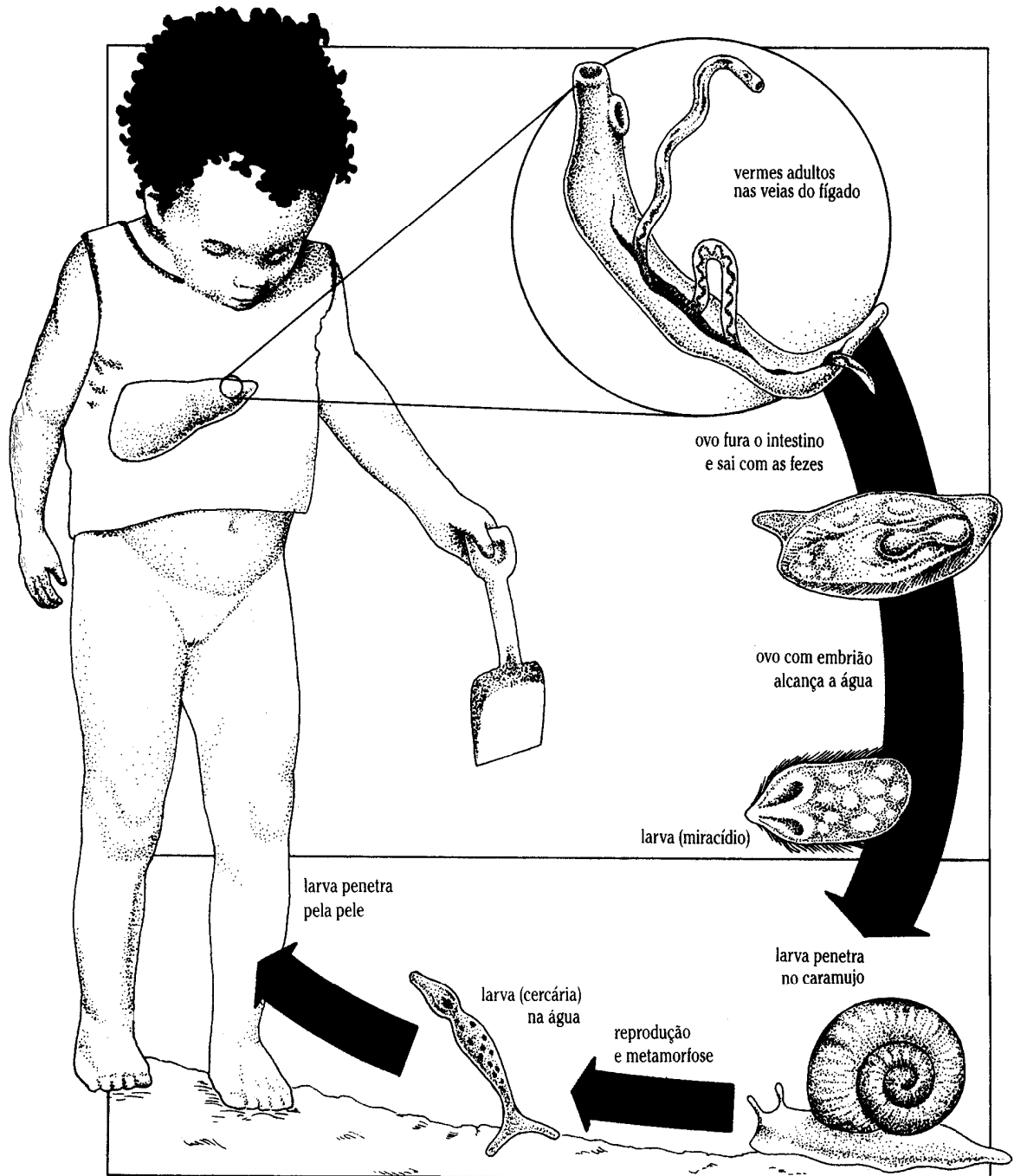


Figura 1.6 O ciclo de vida do *S. mansoni*.

Retirado de: LINHARES, 1995, p. 139.

O ciclo de vida do *S. mansoni* é composto por várias etapas e ocorre na seguinte seqüência (Figura 1.6): Primeiro, a fêmea adulta põe ovos (Figura 1.7A), que atingem a corrente sangüínea e se depositam em diversos órgãos, principalmente na parede dos intestinos, baço e fígado. Muitos destes ovos passam pelo lúmen do intestino e são excretados nas fezes do hospedeiro definitivo. Caso as fezes sejam depositadas na margem de um rio, lago ou açude, os ovos são dispersos na água. A baixa osmolaridade da água doce e queda de temperatura os tornam permeáveis à água, mas somente a incidência de luz induz a eclosão dos miracídios (Figura 1.7B). Os ovos rompem-se preferencialmente a 28° C, mas a eclosão é inibida em temperaturas abaixo de 4° C e superiores a 37° C.

Os miracídios são formas larvares ciliadas que têm capacidade de locomover-se por conta própria. Eles nadam por um período de até 22 h, sem se alimentar, até aproximarem-se do hospedeiro intermediário, por quimiotaxia. Este hospedeiro é, no Brasil, o caramujo da espécie *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* ou *B. straminea*

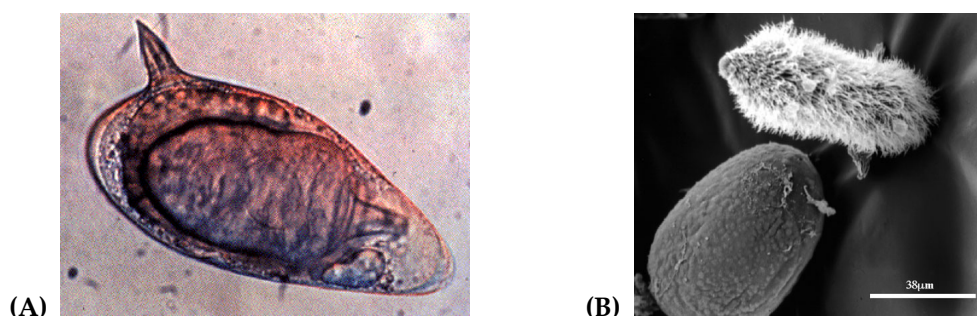


Figura 1.7 (A) Ovo de *S. mansoni*. (B) Micrografia eletrônica de varredura de um miracídio de *S. mansoni* (acima) recém saído do ovo (abaixo à esquerda).

Em (A) pode-se observar claramente o miracídio ainda dentro do ovo. Retirados de: (A) <<http://www.path.cam.ac.uk/~schisto/SchistoLife/S.mansoni.egg.html>>. Acesso em: Mar., 2006.; (B) <<http://www.path.cam.ac.uk/~schisto/SchistoLife/Miracidium.html>>. Acesso em: Mar., 2006.



Figura 1.8 Um caramujo do gênero *Biomphalaria*, o hospedeiro intermediário e transmissor do *S. mansoni*.

Foto: Laboratório de Helmintoses Intestinais / Fiocruz. Retirado de: <http://www.fiocruz.br/ccs/novidades/mai05/esquistossomose_ail.htm>. Acesso em: Mar., 2006.

(Figura 1.8). Os miracídios penetram sua pele ativamente, após o que dão origem a esporocistos primários. Cada esporocisto possui cerca de 50 – 100 células germinativas que, por sua vez, dão origem a 200 – 400 esporocistos secundários. Os esporocistos secundários migram pelos tecidos do caramujo e sofrem uma série de transformações até que se complete a sua metamorfose em cercárias, que são a outra forma larvar do *S. mansoni*. Nesta fase de reprodução assexuada, cada miracídio é capaz de produzir aproximadamente 3.000 cercárias, o que contribui para a amplificação da população de hospedeiros potencialmente infectada.

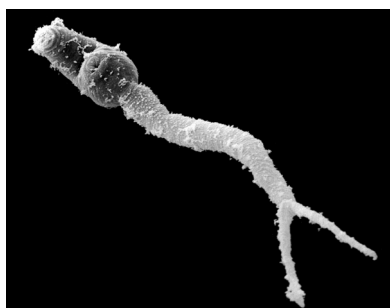


Figura 1.9 Micrografia eletrônica de uma cercária de *S. mansoni*.

Adaptado de: <<http://www.ulb.ac.be/sciences/biodic/ImPlatel0002.html>>. Acesso em: Mar., 2006.

20 – 30 dias após a infecção por miracídios, as cercárias (Figura 1.9) abandonam o caramujo. Esta eclosão é induzida pela luz do sol e coincide, usualmente, com o período em que os homens estão nos reservatórios infectados. Após eclodirem, as cercárias nadam de encontro ao hospedeiro definitivo. Ao entrarem em contato com a pele do hospedeiro, liberam enzimas proteolíticas que se encontram armazenadas em glândulas pré-acetabulares, as quais facilitam sua penetração. A penetração causa uma lesão na pele e a reação inflamatória a esta lesão é conhecida como dermatite cercariana ou “coceira de nadador”. Uma vez fora do molusco, as cercárias sobrevivem de 1 – 3 dias, mas seu poder de penetração se mantém efetivo somente por 6 a 8 horas, desaparecendo por completo após 24 horas.

Durante o processo de penetração, as cercárias liberam sua cauda, o que faz com que passem a ser chamadas de esquistossômulos (Figura 1.10). Após ter passado 2 a 3 dias penetrando a pele, os esquistossômulos penetram os vasos linfáticos ou sanguíneos e dirigem-se aos pulmões, onde permanecem por volta de oito dias. Em seguida, migram para o sistema porta-hepático, onde atingirão a forma adulta. Entre



Figura 1.10 Micrografia eletrônica de um esquistossômulo de *S. mansoni*.

Retirado de: <<http://www.path.cam.ac.uk/~schisto/SchistoLife/Schistosomule.html>>.
Acesso em: Mar., 2006.

o 23º e o 35º dia pós-infecção, ocorre o pareamento entre machos e fêmeas, a partir do qual passam a conviver em cópula constante. Uma vez pareados, os vermes migram para as veias mesentéricas. É importante frisar que a fêmea só atinge seu estado final de diferenciação quando está formando par com um macho. Ela muda suas características morfológicas e passa a estar preparada para pôr ovos, que são novamente despejados nas fezes do hospedeiro através dos vasos mesentéricos, fechando o ciclo.

1.2.2 A PATOLOGIA DA ESQUISTOSSOMOSE

Diariamente, uma fêmea madura de *S. mansoni* produz cerca de 300 ovos. Aproximadamente 50% deles não são excretados e alojam-se em diversos órgãos, principalmente na parede dos intestinos, no baço e no fígado do hospedeiro, causando uma reação imunológica que é típica da patologia associada à esquistossomose. Na fase crônica da doença, os ovos que ficam presos no fígado causam uma reação imunológica celular conhecida como granuloma (Figura 1.11),

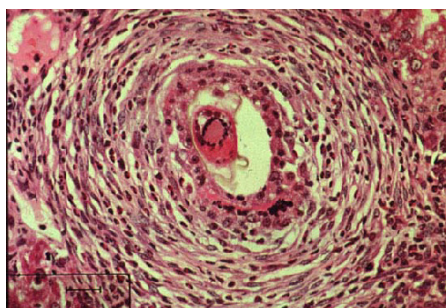


Figura 1.11 Um granuloma. Pode-se observar claramente no centro da foto um ovo rodeado, majoritariamente, por fibroblastos, em meio ao tecido hepático.

Retirado de: <<http://www.path.cam.ac.uk/~schisto/Background/Granuloma.html>>. Acesso em: Mar., 2006.



Figura 1.12 Indivíduo com hepatoesplenomegalia.

Retirado de: <<http://www.path.cam.ac.uk/~schisto/Background/Hep.Splen.Disease.html>>.
Acesso em: Mar., 2006.

que é caracterizada pela conseqüente formação de um tecido fibroso ao redor do sítio da inflamação. Os doentes crônicos nos quais ocorre uma obstrução por fibrose do sistema porta-hepático podem desenvolver, em decorrência disto, hepatoesplenomegalia (Figura 1.12), que é caracterizada por um pronunciado aumento no volume do fígado e do baço. O acúmulo progressivo de fibroses pode causar lesões vasculares por obstrução, hipertensão do sistema porta e ascite, que é o acúmulo de líquido no abdômen, razão pela qual a doença também é conhecida como “barriga d’água”. Além disso, pode até mesmo matar o hospedeiro em decorrência do sangramento de varizes gastro-esofágicas, originadas em decorrência desta hipertensão.

1.2.3 BIOQUÍMICA E METABOLISMO DO *S. MANSONI*

Um casal de vermes adultos de *S. mansoni* permanece em cópula por um longo período, em média de 6 a 10 anos (FULFORD, 1995). Uma infecção de espantosos 37 anos, entretanto, já foi descrita (CHABASSE, 1985).

É fácil conceber que esta estada duradoura envolva uma estreita relação parasito-hospedeiro, na qual os parasitos dependem inexoravelmente do aporte de nutrientes e moléculas essenciais provenientes do hospedeiro mamífero.

O mesmo não se pode dizer das formas de vida livre, os miracídeos e cercárias que, tendo um tempo de vida limitado, em que nadam na água doce em busca dos seus respectivos hospedeiros, são necessariamente auto-suficientes no que tange à sua demanda energética.

Machos e fêmeas adultos vivem na veia porta. Esta veia drena o sangue do estômago, do baço, do pâncreas e do intestino e é, portanto, rica em nutrientes. Este sangue, entretanto, já se encontra parcialmente desoxigenado e contribui com somente 50 a 55% do oxigênio que supre o fígado. Os parasitos, desta forma, estão em um ambiente rico em nutrientes mas relativamente pobre em oxigênio (RUMJANEK e FANTAPPIÉ, não publicado).

Com efeito, em um comportamento que parece provir de uma longa adaptação ao parasitismo, os vermes adultos evoluíram de forma a não utilizar o oxigênio em seu metabolismo energético, optando pela fermentação láctica, anaeróbica.

Entretanto, por produzir cerca de 300 ovos por dia, as fêmeas maduras requerem um aporte considerável de glicose para suprir sua demanda energética, já que o rendimento da glicólise é expressivamente menor que o da fosforilação oxidativa. De fato, há um intenso transporte de glicose proveniente do sangue, que pode atingir taxas diárias equivalentes a 15 – 25% do peso seco dos vermes (CAMACHO, 1995). Este transporte ocorre por difusão facilitada e é mediado por transportadores de glicose (JIANG, 1996; SKELLY, 1994; SKELLY, 1996).

1.2.4 BIOLOGIA SEXUAL DO *S. MANSONI*

Ao contrário de outros organismos da super-classe *Trematoda*, o *S. mansoni* é uma espécie dióica cujo sexo é determinado desde o ovo pela combinação do par de cromossomos sexuais Z e W (SHORT, 1983). Os indivíduos destinados a serem fêmeas contêm o par cromossômico heterogamético ZW e os indivíduos cujo destino é serem machos mantêm a combinação cromossômica homogamética ZZ. Seu genoma, cujo tamanho total é de aproximadamente 270 Mb (SIMPSON, 1982), é composto, além do par de cromossomos sexuais, pelos 7 pares de cromossomos autossômicos.

Apesar de o sexo do *S. mansoni* ser determinado desde o ovo, sua diferenciação sexual só é claramente perceptível nas formas adultas dos parasitos.

De fato, os machos e as fêmeas adultos do *S. mansoni* são notavelmente diferentes. O macho é maior (5 – 11 mm de comprimento) e mais musculoso (~1 mm de diâmetro), e suas ventosas oral e ventral têm um diâmetro maior do que as da fêmea. O

tegumento do macho é mais complexo, apresentando órgãos sensoriais e espinhos de actina em sua superfície, utilizados para favorecer sua locomoção pelos vasos sanguíneos do hospedeiro (HOCKLEY, 1973).

A fêmea, por sua vez, é mais alongada (8 – 14 mm de comprimento) e mais esguia (menos de 0,2 mm de diâmetro), e sua massa é, em geral, inferior a um quarto da massa do macho. Sua superfície externa é mais simples que a do macho, com espinhos e tubérculos em regiões bem localizadas.

O sistema digestivo não é morfologicamente diferente entre machos e fêmeas. A ventosa oral abre-se para um tubo digestivo, onde os parasitos ingerem as hemácias do hospedeiro, que são sua principal fonte de aminoácidos. Este tubo apresenta uma bifurcação na região da ventosa ventral para depois convergir em uma anastomose e terminar em um fundo cego. Como há ausência de um ânus no final do tubo digestivo, os parasitos devem, necessariamente, regurgitar suas excretas.

A fêmea, entretanto, ingere aproximadamente 10 vezes mais hemácias do que o macho: cerca de 330.000 hemácias por hora contra cerca de 39.000 hemácias por hora (LAWRENCE, 1973). Com efeito, a cor do corpo dos machos e das fêmeas é surpreendentemente diferente: as fêmeas possuem uma pigmentação marrom-escura, quase preta, enquanto que os machos exibem uma coloração marrom-clara, translúcida ao microscópio óptico. Esta diferença deve-se a uma produção consideravelmente maior de hemozoína pelas fêmeas, devido à sua maior ingestão de hemoglobina, e à conseqüente acumulação deste pigmento em seu intestino. De fato, Oliveira *et al.* (2000) demonstraram que o conteúdo total de heme e hemozoína é

muito maior nas fêmeas que nos machos, e que as fêmeas são mais eficazes em converter (detoxificar) heme em hemozoína.

O macho é responsável por abrigar a fêmea em um receptáculo especializado chamado canal ginecóforo (Figura 1.5), que é uma cavidade formada por um dobramento da porção mediana longitudinal de seu corpo. Machos e fêmeas entram em cópula em, ao menos, 23 dias após a penetração das cercárias no hospedeiro mamífero (EVELAND, 1989), tempo necessário para que atinjam um grau de maturidade mínimo para o acasalamento.

As fêmeas, entretanto, só atingem sua completa maturação sexual quando estão em cópula, (LOVERDE, 1991), além de dependerem do macho, também, para a manutenção da maturidade sexual (POPIEL, 1984; RIBEIRO-PAES, 1997). De fato, fêmeas provenientes de infecções unissexuais, ou seja, que nunca estiveram em contato com machos, têm glândulas de Mehlis com desenvolvimento incompleto, um ovário cuja estrutura não é tão organizada quanto em fêmeas provenientes de infecções mistas e células vitelínicas imaturas (ERASMUS, 1973; NEVES, 2005).

Além disso, sabe-se que fêmeas adultas pareadas com machos têm uma taxa de síntese de DNA maior que a de fêmeas “virgens”, e que fêmeas separadas dos seus pares diminuem progressivamente a síntese de DNA em comparação com aquelas que permanecem pareadas (DEN HOLLANDER, 1984, 1985).

O mecanismo exato através do qual os machos induzem as fêmeas à maturação sexual não é conhecido. Sabe-se, entretanto, que os sinais que levam à maturação da fêmea não dependem de que o macho tenha nem testículos intactos nem

espermatozoides viáveis de fecundação, já que machos tornados estéreis por raios X ou orquiectomia são capazes de estimular a ovogênese e maturação das fêmeas com a mesma eficiência de machos intactos (HOFFMANN, 2004; RIBEIRO-PAES, 1997).

Várias hipóteses sobre que espécie de fator poderia atuar neste mecanismo foram levantadas. Dentre eles poderiam ser citadas: o massageamento físico das fêmeas com o intuito de auxiliar sua alimentação e o aporte de nutrientes (GUPTA, 1987), a indução de cascatas de sinalização (SCHÜßLER, 1997) e a transferência de mensageiros bioquímicos, ou hormônios (DE MENDONÇA, 2000a). É possível, até mesmo, que todos estes fatores desempenhem um papel na maturação das fêmeas.

A hipótese hormonal, todavia, é a que encontra mais subsídios, como poderá ser comprovado a seguir.

1.2.5 EFEITOS DOS HORMÔNIOS SOBRE O *S. MANSONI*

Apesar de não ser capaz de sintetizar esteróis de novo (MEYER, 1970), o *S. mansoni* é capaz de modificar as moléculas de colesterol incorporadas, produzindo sinais similares a hormônios (BRIGGS, 1972; SILVEIRA, 1986). Durante seu desenvolvimento no hospedeiro vertebrado os parasitos utilizam estas moléculas em duas funções primordiais.

Primeiramente, como indutores da maturação da fêmea que, conforme foi citado no tópico anterior, é dependente do contato direto com o macho. Com efeito, foi descrito que extratos em éter e acetona de vermes machos adultos são capazes de estimular a vitelogênese em fêmeas, além de induzir um aumento significativo no seu

comprimento (SHAW, 1977). A observação de que os machos são capazes de transferir metabólitos produzidos a partir do colesterol que incorporam para as fêmeas, mas que as fêmeas não são capazes de transferir seus metabólitos para os machos corrobora a hipótese de que alguma substância semelhante a um hormônio, produzida pelos machos, estaria induzindo a maturação das fêmeas (SILVEIRA, 1986).

A segunda função destes metabólitos é a de sinalizadores bioquímicos para a localização dos parceiros sexuais. Como exemplo desta função, sabe-se que a atração mútua entre machos e fêmeas adultos, após seu encontro nos capilares do fígado, está ligada a estímulos químicos excretados/secretados por eles (EVELAND, 1986). De fato, a fração lipofílica de machos adultos é capaz de atrair fêmeas (HASEEB, 1991). Além disso, alguns outros produtos excretórios/secretórios, como o *n*-pentano e frações lipídicas solúveis em éter extraídas de fêmeas adultas têm atividade quimiotáctica *in vitro* para machos (GLOER, 1986), o que foi confirmado pela orientação *in vitro* de machos em direção a extratos de fêmeas (CHILDS, 1986).

Além das substâncias semelhantes a hormônios do próprio parasito, os hormônios produzidos pelo hospedeiro mamífero têm efeitos diversos sobre os parasitos *in vivo*.

O tratamento de camundongos ou hamsters com androgênios ou estrogênios, por exemplo, reduz a carga parasitária. Além disso, quando camundongos-fêmeas são expostos ao mesmo número de cercárias que camundongos machos, observa-se que a doença nos primeiros é mais severa, que ocorrem mais mortes e que mais parasitos são recuperados por perfusão. Mais ainda, camundongos-fêmeas tratados com

testosterona antes da infecção apresentam uma menor carga parasitária; já a castração de camundongos-machos têm um efeito reverso (DE MENDONÇA, 2000a).

O hormônio tireoidiano (TH) também tem efeito sobre o desenvolvimento dos parasitos. Em camundongos injetados com tiroxina ou tireoidectomizados e infectados com *S. mansoni*, o crescimento dos parasitos sofre alterações drásticas. Nos camundongos hipertireóidicos os vermes obtidos são menores que o normal e em camundongos hipotireóidicos os vermes são maiores, atingem a maturidade mais cedo e produzem mais ovos (DE MENDONÇA, 2000a).

Outros hormônios esteróides do hospedeiro, como os da adrenal, também desempenham um papel importante no início, no estabelecimento e na patogênese da esquistossomose. A forma circulante da dihidroepiandrosterona (DHEA), o sulfato de DHEA (DHEA-S), apresenta um efeito protetor na esquistossomose murina e é, na verdade, tão eficiente quanto os candidatos a vacina mais eficazes (FALLON, 1998). Além disso, o cortisol e a DHEA inibem a ovoposição pelo *S. mansoni* tanto *in vitro* quanto *in vivo*. *In vitro*, a DHEA apresenta fortes efeitos cercaricidas e esquistossomulicidas, além de diminuir a sobrevivência de vermes adultos em 100% (MORALES-MONTOR, 2001). Por fim, camundongos adrenalectomizados, quando infectados com *S. mansoni*, apresentaram taxas de mortalidade e número de vermes elevados, além de duas ou mais vezes o número de ovos no fígado do que camundongos-controle infectados (MORALES-MONTOR, 2004).

Apesar de todas as evidências sobre os efeitos de hormônios sobre o *S. mansoni* expostas acima, a demonstração de que estes efeitos envolvem a ligação de hormônios a proteínas do parasito ainda são limitados.

A ligação direta de hormônios a extratos de *S. mansoni*, entretanto, foi demonstrada para o estradiol (GIANNINI, 1995) e, surpreendentemente, a ligação foi aumentada pela presença de 20-hidroxiecdisona, apesar de a ligação de 20-hidroxiecdisona não ter sido demonstrada.

1.2.6 A IDENTIFICAÇÃO DE PROTÉINAS SEXO-ESPECÍFICAS E FATORES ENVOLVIDOS NA SUA EXPRESSÃO DIFERENCIAL

Com o advento das novas técnicas de biologia molecular, foram criados subsídios que permitiram o aprofundamento no estudo da biologia sexual do *S. mansoni* em um nível molecular. De posse destas novas ferramentas, o esforço dos grupos de pesquisa concentrou-se no sentido de isolar as proteínas envolvidas na maturação das fêmeas adultas do parasito que, como foi discutido no tópico 1.2.4, é totalmente dependente do seu contato com vermes machos adultos.

De fato, utilizando a técnica da hibridação subtrativa, na qual se constrói uma biblioteca de cDNA a partir do RNA excedente da hibridação entre duas populações, foram isolados cDNAs de proteínas majoritariamente expressas somente por fêmeas adultas sexualmente maduras. Como seria previsível, a maioria destes cDNAs codificava proteínas da casca do ovo.

Dentre estes cDNAs, o que codifica para uma proteína precursora da casca de ovo de 14 kDa chamou a atenção por estar abundantemente expresso, chegando a representar até 10 % do RNA total das fêmeas. Esta proteína foi denominada, respectivamente, F10 (RODRIGUES, 1989; SIMPSON, 1986; SIMPSON, 1987) e p14 (BOBEK, 1986; BOBEK, 1988).

Sua descoberta foi importante porque, a partir de sua seqüência de mRNA e da seqüência de seu promotor, várias descobertas que comprovaram o envolvimento de hormônios na biologia sexual do *S. mansoni* puderam ser feitas.

Rumjanek *et al.* (1989) demonstraram que extratos protéicos de macho são capazes de ligar-se especificamente a um oligonucleotídeo de 20 pb que contém um HRE (elemento responsivo a hormônios) presente na seqüência de mRNA da proteína F10/p14. LoVerde e Chen (1991) encontraram elementos de regulação conservados nas seqüências dos promotores de vários genes de proteínas da casca do ovo, inclusive no promotor do gene F10/p14. Em estudos subseqüentes, demonstrou-se que proteínas nucleares de machos e fêmeas ligam-se com padrões diferenciados a regiões promotoras do gene desta mesma proteína (ENGELENDER, 1993), e que este padrão de ligação pode ser modulado por hormônios esteróides (GIANNINI, 1995). Fantappiè *et al.* (1999) demonstraram também que diferentes complexos de proteínas nucleares de machos e fêmeas ligam-se a seqüências consenso no promotor do gene da proteína F10/p14, corroborando a concepção de que a expressão deste gene fêmea-específico é controlada por diferenças no agrupamento de proteínas que compõe o

complexo de transcrição, diferenças estas que são essencialmente a consequência de uma regulação mediada, provavelmente, pela presença de hormônios.

1.2.7 OS RECEPTORES NUCLEARES DE *S. MANSONI*

Apesar das evidências indiretas apresentadas no tópico anterior, até o fim da década de 1990 ainda não haviam sido encontradas provas irrefutáveis do envolvimento de hormônios na regulação da expressão gênica no *S. mansoni*. Este cenário modificou-se a partir do momento em que as seqüências de vários receptores nucleares deste parasito foram identificadas, e que se provou que estes receptores nucleares podem interagir *in vitro* e *in vivo* com HREs presentes nos promotores de genes expressos diferencialmente entre os sexos do *S. mansoni*, mormente do gene F10/p14.

Com efeito, em um estudo sobre a evolução dos receptores nucleares, Escrivá *et al.* (1997) identificaram, através de PCR com *primers* degenerados, a seqüência parcial de cDNA do DBD (Domínio de Ligação ao DNA) de 5 receptores nucleares de *S. mansoni*, a que denominaram: SmRXR, SmFTZ-F1, SmCOUP-TF e SmCOUP-TF II, e SmTR4, de acordo com sua respectiva homologia com DBDs de receptores nucleares conhecidos.

A partir destas seqüências parciais, a seqüência completa de um dos receptores de retinóis do *S. mansoni*, o SmRXR/SmRXR2 (DE MENDONÇA, 2000b; FREEBERN, 1999a) e de um homólogo do receptor nuclear *fushi tarazu factor 1*, o SmFTZ-F1 (DE MENDONÇA, 2002) foram isoladas. Freebern *et al.* (1999b) identificaram, também a partir de PCR com *primers* degenerados, outro receptor de retinóis, o SmRXR1.

O envolvimento do SmRXR1 e do SmRXR2 na regulação da expressão gênica foi comprovado *in vitro* através da demonstração, pelo ensaio de deslocamento da mobilidade eletroforética (EMSA), de sua capacidade de ligar-se a elementos *cis* do promotor do gene da proteína F10/p14 e *in vivo* através de ensaios de simples-híbrido em levedura. Nestes últimos, o SmRXR1 e o SmRXR2 foram capazes de transativar a expressão do gene repórter HIS3, cujo promotor havia sido fusionado a fragmentos do promotor do gene da proteína F10/p14 (FANTAPPIÉ, 2001; FREEBERN, 1999b).

Recentemente, Wu *et al.* (2006) identificaram 16 novos receptores nucleares de *S. mansoni*. Para tal, foram empregadas duas estratégias distintas: Primeira: desenhar *primers* degenerados baseados na seqüência do P-box dos DBDs de todos os principais grupos de receptores nucleares; Segunda: perscrutar todos os bancos de dados de DNA genômico de *S. mansoni*, incluindo seqüências das extremidades de BACs (cromossomos artificiais de bactéria) (LE PASLIER, 2000) (GenBank e TIGR) e os bancos de dados de WGS (TIGR e WTSI) (EL-SAYED, 2004; LOVERDE, 2004), à procura de seqüências que codificassem DBDs. A lista dos receptores nucleares encontrados está enumerada na Tabela 1.2.

A descrição da presença destes receptores previamente desconhecidos do *S. mansoni* traz luz a várias observações feitas previamente sobre a biologia sexual do parasito. A identificação dos homólogos ao receptor de hormônio tireoidiano do *S. mansoni* SmTR α e SmTR β , por exemplo, dá sustentação aos efeitos observados do hormônio tireoidiano sobre o crescimento dos parasitos. Como já foi discutido no tópico 1.2.5, em camundongos hipotireóidicos os vermes são maiores, atingem a maturidade mais

cedo e produzem mais ovos. De fato, Saule *et al.* (2002) demonstraram que camundongos infectados tratados com tiroxina (T4) apresentam um maior número de parasitos, e que estes parasitos são gigantes. Estes autores falharam, entretanto, ao não conseguirem isolar o efeito do hormônio sobre o parasito do seu efeito fisiológico sobre o hospedeiro. Saule *et al.* utilizaram camundongos nocaute para os receptores TR α e TR β , observando poucas diferenças com relação a camundongos selvagens; os autores, entretanto, não injetaram os camundongos nocaute com T4 e não puderam, por conseguinte, observar seu efeito isolado sobre a biologia dos parasitos. Certamente seria interessante realizar estes experimentos e tirar conclusões definitivas.

Outro gene cuja identificação por Wu *et al.* (2006) pode suscitar ponderações é o homólogo à proteína induzida por ecdisona 78 de *Drosophila* do *S. mansoni* SmE78. Alguns trabalhos (NIRDÉ, 1983; TORPIER, 1982) demonstraram a presença de ecdisona no *S. mansoni*, mas a síntese *de novo* deste hormônio pelos parasitos não foi efetivamente comprovada (BARKER, 1990). Conjugados polares da ecdisona, entretanto, foram detectados no parasito. Em insetos, sugere-se que estes conjugados representam formas de armazenamento inativas que se concentram nos ovos onde, após sua hidrólise enzimática para o hormônio livre, regulam aspectos do desenvolvimento durante a embriogênese. Neste sentido, a observação de que a imunorreatividade à ecdisona no *S. mansoni* se concentra no forro do ootipo, particularmente perto da entrada do duto vitelínico, é sugestiva de um paralelo deste mecanismo no parasito (BASCH, 1986). Outro papel possível deste hormônio seria na

localização do caramujo pelos miracídios do parasito (SHIFF, 1991). A descrição de um receptor de ecdisona de *S. mansoni* traz, portanto, nova força a estas observações.

Nome Completo	Abreviações	Em outros organismos			Subfamília
		<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Ciona intestinalis</i>	<i>Homo sapiens</i>	
Homólogo ao receptor de hormônio tireoidiano do <i>S. mansoni</i>	SmTR α , SmTR β	—	TR	TRa, TRb	I
Gene similar ao receptor de ácido retinóico do <i>S. mansoni</i>	SmRAR-like	—	—	—	
Homólogo à proteína induzida por ecdisona 78 de <i>Drosophila</i> do <i>S. mansoni</i>	SmE78	E78	—	—	
Homólogo ao receptor de hormônio 96 de <i>Drosophila</i> do <i>S. mansoni</i>	SmHR96 α , SmHR96 β	DHR96	NR1K1, NR1K2	VDR, PXR, CAR	
Homólogo ao fator nuclear de hepatócito 4 do <i>S. mansoni</i>	SmHNF4	HNF4	HNF4	HNF4a, HNF4b	
Homólogo ao gene <i>tailless</i> de <i>Drosophila</i> do <i>S. mansoni</i>	SmTLL	TLL	—	TLX	II
Homólogo do receptor nuclear específico de fotorreceptor do <i>S. mansoni</i>	SmPNR	PNR	—	PNR	
Homólogo ao gene <i>dissatisfaction</i> de <i>Drosophila</i> do <i>S. mansoni</i>	SmDSF	DSF	—	—	
Homólogo ao promotor a montante do fator de transcrição de ovalbumina de galinha do <i>S. mansoni</i>	SmCOUP-TFII	SVP	COUP-TF	COUP-TFa, COUP-TFb, EAR2	
NR4A5 do <i>S. mansoni</i>	SmNR4A5	DHR38	NR4A5	NGFIB, NURR1, NOR-1	
Homólogo do <i>fushi tarazu</i> -factor 1 do <i>S. mansoni</i>	SmFTZ-F1- α	FTZ-F1	NR5A6	SF1, LRH1	V
Receptor nuclear com 2 domínios de ligação ao DNA do <i>S. mansoni</i>	Sm2DBD α , Sm2DBD β , Sm2DBD γ	—	—	—	VII*

Tabela 1.2 Receptores nucleares recentemente identificados de *S. mansoni*

Adaptada de: WU, 2006, p. 305.

* Uma nova subfamília.

1.2.8 CO-REGULADORES DA EXPRESSÃO GÊNICA NO *S. MANSONI*

Todas as evidências experimentais expostas no tópico anterior estabelecem, por definitivo, o envolvimento de receptores nucleares na regulação da transcrição gênica em *S. mansoni*. A atuação dos receptores nucleares, entretanto, não se dá em um contexto solitário. Sua ativação e a coordenação de seu funcionamento em um nível molecular dependem de uma coleção de fatores acessórios. A identificação de um destes co-fatores, a proteína arginina metiltransferase 1 de *S. mansoni* (SmPRTM1), e o seu papel no mecanismo de transcrição e editoração do RNA são, fundamentalmente, o tema deste trabalho.

Para que seja possível compreender o intricado mecanismo da regulação transcricional em eucariotos e o papel dos co-reguladores neste mecanismo, será feita a seguir uma breve descrição dos seus componentes e etapas, assim como um apanhado das características e das atuações das famílias das proteínas em estudo no presente trabalho.

1.3 A REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL EM EUCARIOTOS

A diferença evolutiva fundamental dos eucariotos relativamente aos procariotos é o empacotamento de seu material genético em um núcleo. Esta segregação implicou na separação física entre transcrição e tradução. De fato, o controle da transcrição e da tradução nos eucariotos é, essencialmente, um processo muito mais complexo que nos procariotos. Este processo envolve, de forma resumida, a alteração da

organização física do DNA genômico, sinais bioquímicos intranucleares ou cascatas de sinalização, o recrutamento de fatores de transcrição basais e de cofatores primários e secundários, o processamento do hnRNA com adição do *cap* e da cauda poli-A, a editoração variável do hnRNA a mRNA pelos complexos de editoração, e o transporte do mRNA para o citoplasma, onde será finalmente traduzido.

Tal complexidade é o que garante a superioridade funcional dos eucariotos frente aos procariotos e o que possibilita a existência de organismos pluricelulares tão complexos e diversos quanto a orquídea, o golfinho e o ser humano.

Tentar discutir a fundo o conhecimento de todos estes processos seria muito pretensioso; portanto, tento resumir brevemente os componentes e processos da regulação transcricional dos eucariotos, enfatizando os componentes com os quais as proteínas estudadas neste trabalho interagem e os processos nos quais as mesmas têm participação.

1.3.1 A MAQUINARIA BASAL DE TRANSCRIÇÃO

Ao contrário das bactérias e dos arqueotos, que possuem somente 1 RNA polimerase, os eucariotos possuem 3 RNA polimerases, cada uma responsável por transcrever diferentes tipos de genes (Tabela 1.3). Estas enzimas compartilham 5 subunidades, e as outras subunidades que as compõem exibem forte similaridade com as enzimas de arqueotos. Apesar de serem compostas por muito mais subunidades que a RNA polimerase de bactérias, as subunidades que compõem a maior parte da RNA polimerase II (RNAP II) são homólogas às subunidades das outras RNA polimerases

Tipo de Polimerase	Genes Transcritos
RNA polimerase I	Genes do rRNA 5,8s, 18s e 28s
RNA polimerase II	Todos os genes que codificam proteínas, além dos genes de snoRNAs e alguns genes de snRNAs
RNA polimerase III	Genes dos tRNAs, genes do rRNA 5s, alguns genes de snRNAs e genes de outros RNAs pequenos

Tabela 1.3 As três RNA polimerases das células eucarióticas.

Adaptado de: ALBERTS, 2002, p. 310.

de eucariotos, o que sugere que todas estas enzimas tenham a mesma estrutura e mecanismo básicos.

A RNAP II catalisa a síntese de mRNA mas, ao contrário da RNA polimerase de bactérias, cuja subunidade σ é o único polipeptídeo necessário para promover a transcrição *in vitro*, a RNAPII é incapaz de iniciar a transcrição mediada por promotores ou responder a proteínas regulatórias na ausência de fatores adicionais. Estes fatores adicionais são chamados de fatores gerais de transcrição (FGTs) e estão envolvidos no reconhecimento de seqüências promotoras pela RNAP II, na resposta a fatores regulatórios, na separação das duas fitas de DNA para permitir a iniciação da transcrição e na liberação da RNAP II do promotor para que entre no modo de alongamento, assim que a transcrição houver se iniciado. A Tabela 1.4 lista as funções dos FGTs da RNAP II de *Saccharomyces cerevisiae*, um dos modelos mais utilizados no estudo da transcrição em eucariotos.

A transcrição pela RNAP II começa tipicamente com a ligação de fatores regulatórios gene-específicos próximo ao sítio de iniciação da transcrição. Estes fatores podem agir indiretamente na maquinaria basal de transcrição através do recrutamento de

Fator	Nº de Sub-unidades		Função
TFIIA	3		Estabiliza a ligação da TBP e do TFIID ao DNA. Bloqueia inibidores da transcrição. Regulação gênica positiva e negativa.
TFIIB	1		Liga-se à TBP, à Pol II e ao DNA promotor. Ajuda a estabelecer o sítio de iniciação da transcrição.
TFIID	TBP	1	Liga-se ao elemento promotor TATA e deforma o DNA promotor. Plataforma para a montagem do TFIIB, do TFIIA e dos TAFs.
	TAFs	14	Ligam-se aos elementos promotores INR e DPE. Alvo de fatores de regulação.
Mediador	24		Liga-se cooperativamente à Pol II. Atividade de cinase e acetiltransferase. Estimula a transcrição basal e mediada por ativadores. Alvo de fatores de regulação.
TFIIF*	3		Liga-se à Pol II e está envolvido no recrutamento da Pol II ao CPI e na formação do complexo aberto.
TFIIE	2		Liga-se a promotores próximos ao sítio de iniciação da transcrição. Pode auxiliar a abrir ou estabilizar a bolha de transcrição no complexo aberto.
TFIIH	10		Tem funções na transcrição e no reparo do DNA. Tem atividade de cinase e duas atividades de helicase. Essencial para a formação do complexo aberto.

* *S. cerevisiae* tem uma subunidade não-essencial extra em comparação com outros organismos estudados.

Tabela 1.4 Fatores gerais de transcrição da RNA Polimerase II de *Saccharomyces cerevisiae*.

Incluindo o complexo mediador. Adaptado de: HAHN, 2004, p. 395.

co-fatores que modificam a estrutura da cromatina ou diretamente, através de sua interação com os componentes da mesma.

Na forma mais simples de ativação, tanto os mecanismos diretos quanto os indiretos resultam no recrutamento da maquinaria basal de transcrição para um promotor mínimo, que é a seqüência de DNA mais simples capaz de especificar a transcrição basal ou não-regulada. Este promotor mínimo serve para posicionar a RNAP II em um estado chamado de complexo de pré-iniciação (CPI), que é análogo ao estado fechado da RNA polimerase de bactérias. Neste estado, a RNAP II e os FGTs estão todos ligados ao promotor, porém não estão em uma conformação ativa propícia à iniciação da transcrição. Logo em seguida, ocorre uma mudança conformacional significativa, na qual o DNA que cinge o sítio de iniciação da transcrição abre-se por uma extensão de 11-15 pb e a fita molde do promotor é posicionada dentro da fenda do sítio ativo da RNAP II para formar o complexo aberto. A iniciação da transcrição

começa com a síntese das primeiras ligações fosfodiéster do RNA. Em muitos organismos, vários RNAs de pequena extensão (3-10 pb), chamados de produtos abortivos, são sintetizados antes da RNAP II iniciar a síntese produtiva de RNAs.

Depois de sintetizar cerca de 30 bases de RNA, a RNAP II desfaz seus contatos com o promotor mínimo e com o resto da maquinaria basal de transcrição e entra no estágio de alongamento da transcrição. Após a iniciação da transcrição, muitos dos fatores permanecem no promotor formando uma estrutura chamada de complexo de arcabouço[†]. Acredita-se que este complexo marque os genes que já foram transcritos e que permita que a etapa de recrutamento, tipicamente lenta, seja transposta, nos ciclos de transcrição seguintes.

A Figura 1.13 contém um esquema das etapas da transcrição catalisada pela RNAP II.

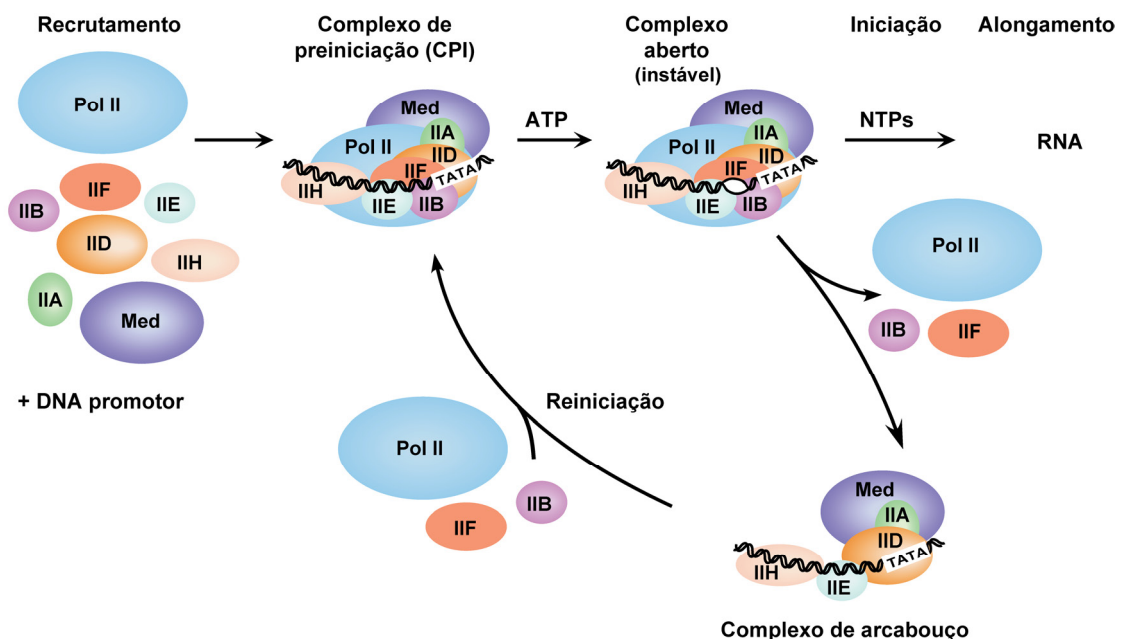


Figura 1.13 As etapas da transcrição catalisada pela RNA polimerase II.

Os fatores gerais de transcrição aqui representados estão descritos na Tabela 1.1. Adaptado de: HAHN, 2004, p. 395.

[†] Tradução livre do autor para o termo em inglês: *scaffold complex*.

1.3.2 FATORES DE TRANSCRIÇÃO

1.3.2.1 OS ATIVADORES TRANSCRICIONAIS

A composição e o funcionamento da maquinaria basal de transcrição de eucariotos, descritos no tópico anterior (1.3.1), são de uma complexidade considerável. Se o panorama de todas as etapas da transcrição e de todos os fatores que a influenciam for considerado, entretanto, tornam-se relativamente triviais.

A ativação *in vivo* da transcrição de um gene em eucariotos, envolve, em um primeiro momento, a ligação de proteínas (fatores de transcrição) que têm como função ativar a transcrição e, por este motivo, são denominadas ativadores transcrpcionais. Estas proteínas contêm, ao menos, duas regiões ou domínios em sua estrutura: o domínio de ligação ao DNA (DBD) e o domínio responsável por transmitir o sinal à maquinaria basal de transcrição ou a outros ativadores ou co-ativadores, chamado de domínio de ativação (AD).

A utilização de um ou outro ativador na transcrição de um gene depende da presença na região promotora deste gene, da seqüência regulatória de DNA à qual ele se liga. De fato, como a região promotora de múltiplos genes pode conter uma mesma seqüência regulatória, um único ativador pode ser usado para ativar a transcrição de diferentes genes, em um mesmo genoma. Da mesma forma, diferentes ativadores podem ligar-se às suas respectivas seqüências regulatórias na região promotora de um único gene, o que confere aos ativadores um potencial combinatório praticamente ilimitado de ativação da expressão gênica.

No momento de sua ligação com as seqüências-alvo da região promotora de um gene, os ativadores trazem consigo ou recrutam proteínas chamadas co-ativadores, as quais se encarregam de remodelar a região da cromatina necessária ao processo de transcrição deste gene, além de promover, direta ou indiretamente, o subsequente recrutamento da maquinaria basal de transcrição, responsável pelo processo de síntese do mRNA *per se*.

Existe um considerável número de co-ativadores, tanto daqueles que interagem diretamente com os ativadores transcricionais, denominados co-ativadores primários, quanto daqueles que agem indiretamente por associação com os co-ativadores primários, denominados co-ativadores secundários.

A SmPRMT1, um dos temas deste trabalho, é um co-ativador secundário. Para entender-se o contexto de seu funcionamento, entretanto, é necessário conhecer os ativadores em cujo processo de ativação da transcrição a SmPRMT1 está envolvida. Estes ativadores são da família dos receptores nucleares, proteínas de grande relevância na biologia do nosso modelo de estudo, o *S. mansoni*.

1.3.3 OS RECEPTORES NUCLEARES

Os receptores nucleares são membros de uma grande superfamília de ativadores da transcrição induzidos por ligantes de alta afinidade. Eles são responsáveis por controlar um considerável número de processos celulares e fisiológicos essenciais dos organismos multicelulares tais como o desenvolvimento embrionário, o metabolismo e a diferenciação celulares, a homeostase de lipídios e glicose e a reprodução. Estas

proteínas são responsáveis pela resposta transcricional aos hormônios esteróides sexuais (progestinas, estrogênios e androgênios), aos esteróides da adrenal (glucocorticóides e mineralocorticóides), à vitamina D3, ao hormônio tireoideano, ao ácido retinóico (9-*cis* e todo-*trans*) e a uma variedade de outros ligantes metabólicos. Os ligantes naturais de muitos dos membros desta superfamília, entretanto, ainda não foram descobertos. Estes membros são chamados, deste modo, de receptores órfãos.

Devido à multiplicidade de ações em que estão envolvidos, defeitos no funcionamento dos receptores nucleares, normalmente mutações, são potencialmente danosos ao organismo. De fato, a perda do controle das vias de sinalização por receptores nucleares está associada ao desenvolvimento de doenças relacionadas com o sistema endócrino tais como o câncer de próstata (HEINLEIN, 2004), o câncer de ovário (MODUGNO, 2004), a diabetes (BLASCHKE, 2006) e a obesidade (TSUCHIDA, 2005).

Apesar de estarem envolvidos em processos regulatórios tão diversos, a superfamília dos receptores nucleares tem uma estrutura terciária conservada. O domínio N-terminal A/B é altamente variável em termos de tamanho e seqüência e contém um domínio de ativação independente de ligante (AF-1). A região mais conservada é o domínio de ligação ao DNA (DBD), que contém dois motivos de dedo-de-zinco (*zinc finger*), os quais conferem uma alta especificidade no reconhecimento das seqüências regulatórias de DNA de seus genes-alvo. O domínio D é uma região pouco conservada entre os membros da superfamília e que funciona como uma dobradiça

(*hinge*) entre os domínios C e E. Este último contém o domínio de ligação ao ligante (LBD), o qual está envolvido na ativação transcricional dos genes alvo através da ligação com ligante e da sua interação molecular com os co-ativadores. O domínio E contém também um domínio de ativação dependente do ligante (AF-2), que está envolvido de forma crucial com a interação com co-reguladores da transcrição. A Figura 1.14 exhibe uma representação esquemática dos domínios dos receptores nucleares.

A reconstrução filogenética da superfamília dos receptores (LAUDET, 1997) levou à sua divisão em 6 subfamílias, que foram classificadas de acordo com a homologia entre seus DBDs e LBDs conservados – nomenclatura esta que veio a ser oficialmente adotada pelo Nuclear Receptors Nomenclature Comitee (1999). A Tabela 1.5 lista as subfamílias dos receptores nucleares de mamíferos, seus respectivos subtipos, seus ligantes, seus elementos responsivos e seu nível de oligomerização.

A primeira subfamília é formada pelos receptores de hormônios tireoideano (TRs), de ácido retinóico (RARs), de vitamina D (VDRs), pelos receptores ativados pelo proliferador do peroxissomo (PPARs) e por diversos receptores órfãos. A segunda

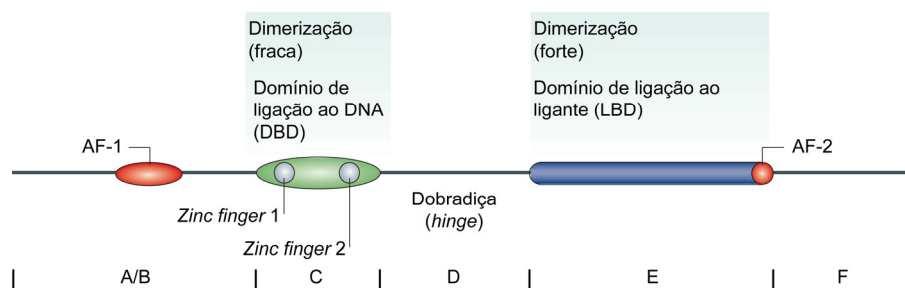


Figura 1.14 Representação esquemática dos domínios dos receptores nucleares.

Adaptado de: KING-JONES, 2005, p. 312.

subfamília contém os receptores X de retinóides (RXRs), além dos receptores do fator de transcrição do promotor a montante da ovalbumina de galinha (COUP-TFs), do fator nuclear do hepatócito 4 (HNF4), do receptor dos testículos (TR2) e de receptores envolvidos no desenvolvimento do olho (TLX e PNR). Os RXRs ligam-se ao ácido 9-*cis*-retinóico e têm um papel muito relevante na sinalização por receptores nucleares, pois são parceiros de diferentes receptores que se ligam como heterodímeros às seqüências de reconhecimento do DNA (MANGELSDORF, 1995). A terceira subfamília é formada pelos receptores de hormônios esteróides (GR, AR, PR e ER) e por receptores órfãos altamente correlacionados chamados de receptores relacionados ao estrogênio (ERRs). A quarta, a quinta e a sexta subfamílias contêm, respectivamente, os receptores órfãos NGFI-B, SF-1/FTZ-F1 e GCNF.

Os receptores nucleares regulam a transcrição através de sua ligação a seqüências específicas de DNA presentes nas regiões regulatórias de seus genes-alvo chamadas de elementos responsivos a hormônios (HREs). Estes elementos são derivações da seqüência canônica [A/G]GGTCA e estão normalmente situados na porção 5', à montante do sítio de início da transcrição. Os receptores nucleares ligam-se aos HREs na forma de homodímeros ou heterodímeros, mas alguns podem também ligar-se eficientemente ao HRE na forma de monômeros. O padrão de oligomerização dos receptores é refletido na arquitetura de seus respectivos HREs, o que significa que a seqüência canônica (hemissítio) pode estar duplicada como um palíndromo (Pal), no caso dos receptores de esteróides, como uma repetição direta (DR), no caso de receptores que formam heterodímeros com o receptor órfão RXR ou de receptores

órfãos que funcionam como homodímeros. Alguns receptores que formam heterodímeros com o RXR, como o TR, o RAR e o VDR (ver Tabela 1.5), podem ligar-se também a palíndromos invertidos (IPs). Por fim, há os receptores monoméricos, que se ligam somente a um hemissítio (H). A Figura 1.15 ilustra os tipos de HRE e exemplos dos receptores que utilizam cada tipo.

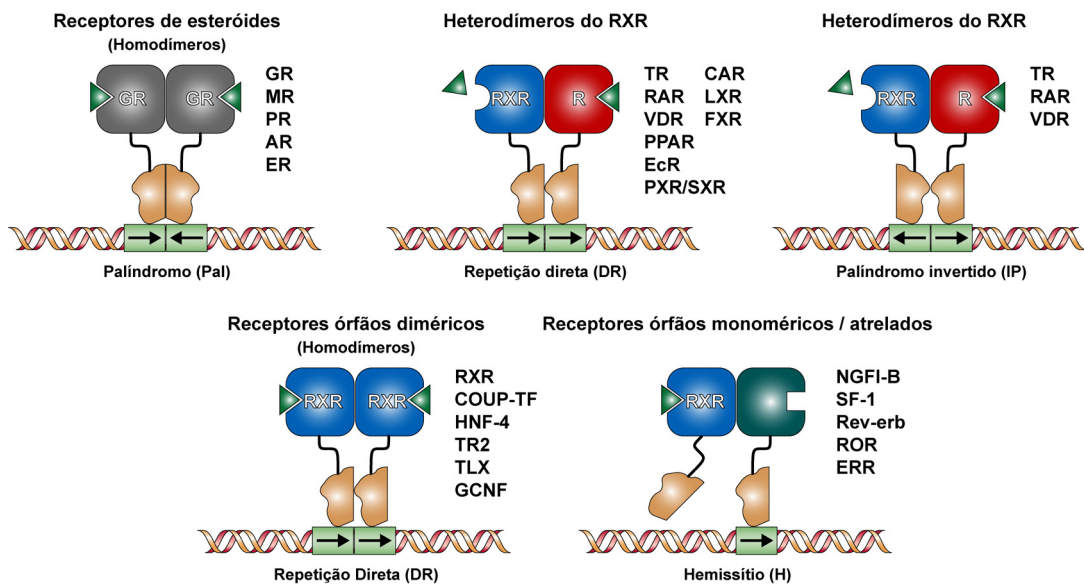


Figura 1.15 Formas de oligomerização dos receptores nucleares e seus respectivos elementos responsivos a hormônio (HREs).

O triângulo verde representa o ligante e as setas o sentido do hemissítio consenso. Adaptado de: OLEFSKY, 2001, p. 36864.

Sub-família	Receptor	Subtipos	Denominação	Ligante(s)	Response Element(s)	Oligomeroização	
I	TR	α, β	Receptor de hormônio tireoideano	Hormônio tireoideano (T_3)	Pal, DR-4, IP	H	
	RAR	α, β, γ	Receptor de ácido retinóico	Ácido todo- <i>trans</i> -retinóico	DR-2, DR-5, Pal, IP	H	
	VDR		Receptor de vitamina D	1-25(OH) $_2$ vitamina D3	DR-3, IP-9	H	
	PPAR	α, β, γ	Receptor ativado pelo proliferador do peroxisomo	Benzotrieno B4; Wy 14.643; Eicosanóides; tiazolidinedionas (TZDS); 15-desoxi-12,41-prostaglandina J2; ácidos graxos poliinsaturados	DR-1	H	
	PXR		Receptor X de pregnanos	Pregnanos; esteróides C21	DR-3	H	
	CAR / MB67	α, β	Receptor constitutivo de androstano	Androstanos; 1,4-bis[2-(3,5-dicloropiridiloxi)]benzeno	DR-5	H	
	LXR	α, β	Receptor X do fígado	Oxisteróis	DR-4	H	
	FXR		Receptor X de farnesóides	Ácidos biliares	DR-4, IR-1	H	
	RevErb	α, β	ErbA reverso	Desconhecido	DR-2, Hemissítio	M, D	
	RZR / ROR	α, β, γ	Receptor Z de retinóides / órfão relacionado ao ácido retinóico	Desconhecido	Hemissítio	M	
	UR		Receptor ubíquo	Desconhecido	DR-4	H	
	II	RXR	α, β, γ	Receptor X de retinóides	Ácido 9- <i>cis</i> -retinóico	Pal, DR-1	D
		COUP-TF	α, β, γ	Receptor do fator de transcrição do promotor a montante da ovalbumina de galinha	Desconhecido	Pal, DR-5	D, H
HNF-4		α, β, γ	Fator nuclear do hepatócito 4	Tioésteres graxos de acil-CoA	DR-1, DR-2	D	
TLX			Receptor relacionado ao Tailles	Desconhecido	DR-1, Hemissítio	M, D	
PNR			Receptor nuclear específico de fotorreceptores	Desconhecido	DR-1, Hemissítio	M, D	
TR2		α, β	Receptor dos testículos	Desconhecido	DR-1 a DR5	D, H	
III	GR		Receptor de glucocorticóides	Glucocorticóides	Pal	D	
	AR		Receptor de androgênios	Androgênios	Pal	D	
	PR		Receptor de progesterona	Progestinas	Pal	D	
	ER	α, β	Receptor de estrogênio	Estradiol	Pal	D	
	ERR	α, β, γ	Receptor relacionado ao estrogênio	Desconhecido	Pal, Hemissítio	M, D	
IV	NGFI-B	α, β, γ	Clone B induzido por NGF	Desconhecido	Pal, DR-5	M, D, H	
V	SF-1 / FTZ-F1	α, β	Fator esteroideogênico 1 / Factor Fushi Tarazu 1	Oxisteróis	Hemissítio	M	
VI	GCNF		Factor nuclear de células germinativas	Desconhecido	DR-0	D	
0	SHP		Pequeno parceiro heterodimérico	Desconhecido		H	
	DAX-1		Reversão de sexo sensível à dosagem	Desconhecido			

M, monômero; D, homodímero; H, heterodímero; NGF, *nerve growth factor*; DR, repetição direta; Pal, palíndromo; IP, palíndromo invertido.

Tabela 1.5 Subfamílias dos receptores nucleares de mamíferos.

Adaptado de: ARANDA, 2001, p. 1272.

1.3.4 OS CO-REGULADORES

A capacidade dos ativadores transcricionais, em especial dos receptores nucleares, de alternar sua atividade da repressão para a ativação em resposta a estímulos celulares ocorre em função de sua interação com um grupo extenso e diverso de fatores celulares – os co-reguladores. Os co-reguladores não se ligam diretamente ao DNA, mas são recrutados aos promotores pelos receptores nucleares. Dependendo de sua forma de ação sobre o resultado da transcrição mediada pelos receptores nucleares, eles podem ser classificados como co-ativadores, no caso de levarem ao aumento da intensidade da transcrição ou como co-repressores, no caso de levarem à diminuição ou à supressão da transcrição.

1.3.4.1 OS CO-ATIVADORES

Os primeiros co-ativadores da expressão mediada por receptores nucleares foram isolados através da técnica do duplo-híbrido em levedura, utilizando como isca o LBD de receptores nucleares fusionado ao DBD do fator de transcrição de leveduras Gal4.

O primeiro co-ativador autêntico a ser isolado foi o co-ativador de receptores esteróides 1 ou SRC-1/NCoA-1 (KAMEI, 1996; OÑATE, 1995). O SRC-1/NCoA-1, em associação com o SRC-2/NCoA-2/GRIP-1/TIF2 (HONG, 1997; VOEGEL, 1996) e com o SRC-3/NCoA-3/p/CIP/ACTR/RAC3/TRAM1/AIB1 (ANZICK, 1997; CHEN, 1997; LI,

1997; TAKESHITA, 1997; TORCHIA, 1997) formam a família SRC/p160/NcoA de co-ativadores da transcrição.

Estruturalmente, todos os 3 SRC (SRC-1, SRC-2 e SRC-3) contêm um domínio chamado basic helix-loop-helix-Per/ARNT/Sim (bhlh/PAS) em seus N-terminais, que são também sua região mais conservada. Em drosófilas, onde foi primeiramente identificado, este domínio está envolvido na ligação ao DNA e na mediação de interações proteína-proteína. No caso dos SRCs este domínio medeia sua interação com a miogenina, com o MEF-2 C e com a família dos fatores de melhoramento transcricional (TEFs). Além disso, a capacidade dos SRCs de co-ativar juntamente com outros fatores de transcrição tais como o fator nuclear κ B (NF- κ B), a proteína ativadora AP-1, os transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STATs), a p53 e o E2F1, sugere que os SRCs são componentes importantes de várias vias de ativação da transcrição (WU, 2005).

A região central dos SRCs, chamada de domínio de interação com receptores (RID), contém três motivos conservados chamados de motivos LXXLL (onde L é leucina e X qualquer aminoácido), que são responsáveis pela sua interação dependente de ligante com o domínio AF-2 dos receptores nucleares (HEERY, 1997; LI, 1998; OÑATE, 1998; VOEGEL, 1998). Estes motivos são também conhecidos como NR *boxes*. A isoforma SRC-1a do SRC-1 contém um NR *box* adicional no final de sua cauda N-terminal. De fato, motivos LXXLL distintos e também o contexto de sua localização apresentam afinidades de ligação diferenciadas para receptores nucleares distintos, o que sugere que receptores nucleares têm preferência por um motivo

LXXLL específico em um dado co-ativador ou por um dos co-ativadores da família SRC, especificamente. A mutação independente de qualquer um dos três motivos, entretanto, não abole por completo a interação dos SRCs com os receptores nucleares, o que sugere que mais de um motivo LXXLL está envolvido na ligação de alta afinidade dos SRCs aos receptores nucleares (LEO, 2000).

Na região C-terminal dos SRCs há dois domínios que exibem atividade intrínseca de ativação da transcrição, os domínios de ativação 1 (AD1) e 2 (AD2) (OÑATE, 1998; VOEGEL, 1996). Os SRCs interagem com a proteína co-integradora CBP ou com sua proteína correlata p300 através do domínio de ativação 1 (AD1), mas não são capazes de interagir diretamente com os receptores nucleares através deste domínio. A CBP e a p300 têm atividade de histona acetiltransferase (HAT) e sua ligação ao AD1, juntamente com seus parceiros de interação, os co-ativadores p/CAF (fator associado à p300/CBP) e GCN5 (*general control nonrepressed 5*), é crítica para a ativação da transcrição mediada pelos SRCs, devido ao remodelamento da cromatina decorrente da acetilação das histonas (CHEN, 1997; GOODMAN, 2000; LI, 2000; VOEGEL, 1998). O AD1 também contém três motivos LXXLL/LXXLL-like. De fato a mutação de um ou mais destes motivos prejudica a interação dos SRCs com a CBP/p300 e também sua função intrínseca de ativação.

O domínio C-terminal de ativação AD2, por sua vez, permite a ligação das SRCs à proteína arginina metiltransferase 1 (PRMT1) (LIN, 1996) e à proteína arginina metiltransferase associada a co-ativadores (CARM1) (CHEN, 1999). Estas proteínas são capazes de metilar resíduos de arginina, inclusive de caudas de histonas. Sua

interação com as SRCs através do AD2, e a interação das SRCs com os receptores nucleares resulta em um aumento sinérgico da transativação mediada por estes ativadores transcrpcionais (KOH, 2001), o que as caracteriza como co-ativadores secundários, já que são dependentes das SRCs para atuarem como co-ativadores.

As regiões C-terminais da SRC-1 e da SRC-3 têm atividade de histona acetiltransferase (HAT) (CHEN, 1997; SPENCER, 1997), o que poderia suscitar a hipótese de sua participação direta no remodelamento da cromatina durante o processo da iniciação da transcrição mediada por receptores nucleares. A atividade HAT da SRC-1 e da SRC-3 é, entretanto, muito mais fraca do que a observada na CBP, na p300 e no p/CAF. Ademais, a inativação específica do sítio com atividade HAT da SRC-1 por mutação sítio-dirigida não afetou significativamente sua função como co-ativador (LIU, 2001), o que sugere que a atividade HAT intrínseca do SRC-1 e do SRC-3 sejam dispensáveis para a iniciação da transcrição mediada por receptores nucleares.

Este tipo de ativação da transcrição, de fato, é fundamentalmente dependente do remodelamento da cromatina, mediado por histona acetiltransferases (HATs), lisina metiltransferases, arginina metiltransferases e de complexos de remodelamento da cromatina dependentes de ATP. Sabe-se que, para que haja o início da transcrição, o DNA tem de ser mantido em um estado menos empacotado, acessível ao complexo de transcrição.

Desta forma, nos próximos tópicos, serão abordados a estrutura da cromatina e o papel do remodelamento da cromatina na ativação da transcrição.

1.3.5 A CROMATINA E AS HISTONAS

O empacotamento do material genético é uma das principais características que diferenciam os eucariotos dos procariotos. Enquanto nos procariotos ele se encontra relativamente desorganizado no citoplasma, nos eucariotos ele está complexado com proteínas em uma estrutura denominada cromatina e isolado em um núcleo protegido por uma bicamada lipídica. Esta estrutura apresenta duas formas majoritárias, a heterocromatina, mais densamente empacotada, e a eucromatina, menos densamente empacotada.

O empacotamento do DNA dos eucariotos é possível graças aos nucleossomos, que são um complexo entre as histonas, proteínas com carga predominantemente positiva, e a dupla fita de DNA, que é negativamente carregada. Cada partícula central do nucleossomo é composta por um octâmero protéico que, por sua vez, é formado por dois conjuntos das quatro histonas, as histonas H2A, H2B, H3 e H4. As oito histonas estão organizadas como um tetrâmero central de composição (H4-H3)-(H3'-H4'), que é flanqueado em cada lado por um dímero de (H2A-H2B). A composição final desta estrutura é (H2A-H2B)-(H4-H3)-(H3'-H4')-(H2B'-H2A') (Figura 1.16). Em volta de cada um destes octâmeros, que se assemelham em sua forma a contas, a dupla fita de DNA superenovelado, composta por 147 pares de nucleotídeos perfaz, exatamente, 1,65 volta (WOOD, 2005). A interface entre o DNA e o octâmero de histonas é extensiva – o complexo é estabilizado por cerca de 140 ligações de hidrogênio, além de numerosas interações hidrofóbicas e eletrostáticas.

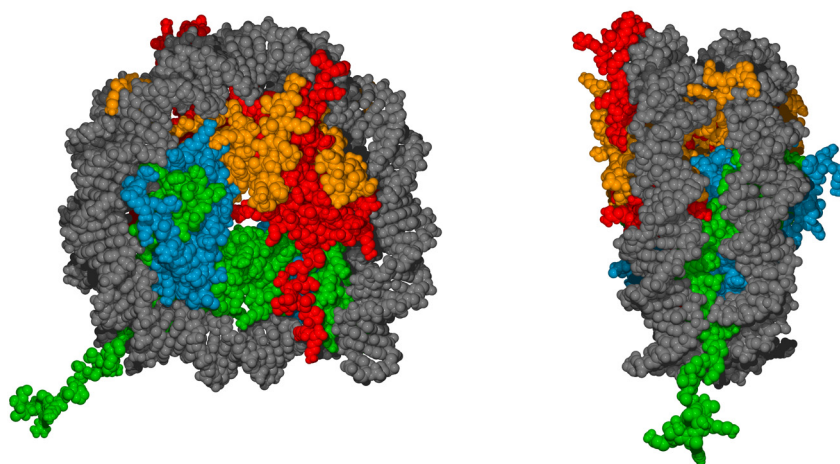


Figura 1.16 Estrutura da partícula central do nucleossomo determinada por análise das difrações de raios X de seus cristais, com resolução de 2.8 Å.

A imagem renderizada corresponde à estrutura 1AOI (LUGER, 1997) do [PDB](#). Histonas H2A: vermelho; histonas H2B: laranja; histonas H3: verde; histonas H4: azul; oligonucleotídeo: cinza. As caudas das histonas foram omitidas para facilitar a cristalização do complexo. Representação dos átomos por seus raios de van der Waals.

Além das histonas H2A, H2B, H3 e H4, o nucleossomo conta com a participação da histona H1, as histonas de ligação, cuja principal função imagina-se ser estabilizar a compactação dos nucleossomos. Apesar de sua ausência não ser letal para eucariotos unicelulares a curto prazo, a histona H1 é essencial pelo menos para mamíferos, já que foi demonstrado que o nocaute simultâneo dos subtipos H1c, H1d e H1e em camundongos é letal (FAN, 2003).

A análise de células-tronco embrionárias (ES) obtidas a partir destes camundongos demonstrou que a depleção da histona H1 causa também reduções locais na compactação da cromatina e uma redução da metilação do DNA nas regiões de controle de alguns genes regulados por *imprinting* genético, o que resultou em aumento ou diminuição significativos da expressão de seus mRNAs. Ficou demonstrado, além disso, que a variação da estequiometria entre as partículas

centrais do nucleossomo e a histona H1 é proporcional à distância de repetição do nucleossomo (NRL[‡]), ou seja, quanto maior é a concentração de histonas H1, maior é a distância em pares de bases entre os nucleossomos (FAN, 2005).

1.3.6 REMODELAMENTO DA CROMATINA

O empacotamento do DNA genômico em cromatina dificulta o acesso dos ativadores transcricionais, co-reguladores e da maquinaria basal de transcrição. Em consequência disso, a diminuição da intensidade deste empacotamento é essencial para permitir a expressão gênica.

Com efeito, o estado basal de repressão imposto pelo empacotamento do DNA pode ser atenuado através do aumento da acessibilidade ao DNA, ou restabelecido através da reorganização e reempacotamento do DNA. A estes processos dá-se o nome de remodelamento da cromatina. Existem duas classes essenciais de complexos protéicos envolvidos nestes processos: os complexos de remodelamento dependentes de ATP, capazes de afetar a posição ou a estabilidade dos nucleossomos e as enzimas que catalisam as modificações pós-traducionais das histonas (co-ativadores ou co-repressores da transcrição).

1.3.6.1 COMPLEXOS DE REMODELAMENTO DA CROMATINA DEPENDENTES DE ATP

Estes componentes consistem em grandes complexos compostos por múltiplas subunidades protéicas que utilizam energia obtida a partir da hidrólise do ATP para

[‡] Em inglês: *nucleosome repeat length*.

desorganizar a estrutura dos nucleossomos e aumentar a acessibilidade ao DNA sem a utilização de modificações covalentes.

Todos os eucariotos contêm pelo menos 5 famílias de remodeladores da cromatina dependentes de ATP: a família SWI/SNF, a família ISWI, a família NURD/Mi-2/CHD, a família INO80 e a família SWR1 (SAHA, 2006). Além disso, parentes da família RAD54, capaz de alterar a estrutura do nucleossomo *in vitro*, também podem encaixar-se nesta função (ALEXEEV, 2003; JASKELIOFF, 2003). Todas estas famílias compartilham um mesmo domínio catalítico em suas respectivas ATPases que é similar àquele presente em DNA translocases, o que indica que a translocação pode ser o mecanismo utilizado por todas os complexos remodeladores. De fato, vários deles têm atividade de translocação do DNA (SAHA, 2006). Apesar desta semelhança, entretanto, essas famílias diferem no caráter de suas atividades de remodelamento e em seus papéis biológicos.

Além deste domínio catalítico de ATPase conservado, as unidades catalíticas dos remodeladores SWI/SNF e ISWI contêm domínios exclusivos próximos aos seus C-terminais e auxiliam também a direcionar os complexos para seus alvos e/ou a regulá-los. As ATPases do remodelador SWI/SNF, por exemplo, contêm um bromodomínio próximo a seu C-terminal, que consiste em um domínio capaz de ligar-se a caudas de histonas modificadas por acetilação.

1.3.6.2 MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS DAS HISTONAS

Além da parte da seqüência protéica que compõe as estruturas terciária e quaternária do octâmero protéico, as quatro histonas (H2A, H2B, H3 e H4) possuem longas caudas N-terminais, que são domínios acessíveis e desestruturados que se estendem para fora da partícula central do nucleossomo. Diversos resíduos presentes nas caudas das histonas H3 e H4 e nas caudas e porções C-terminais das histonas H2A, H2B e H1 são suscetíveis a uma variedade de modificações pós-transcricionais: a acetilação de resíduos de lisina; a fosforilação de resíduos de serina e treonina; a metilação de resíduos de arginina e de lisina; a ubiquitinação em resíduos de lisina; a sumoilação de resíduos de lisina; a glicosilação; a ADP ribosilação; a carbonilação e a biotilação. De todas estas modificações, somente as três primeiras foram estudadas de forma extensiva (MARGUERON, 2005).

1.3.6.2.1 A ACETILAÇÃO E A DESACETILAÇÃO DE HISTONAS

A acetilação e a desacetilação das caudas de histonas têm sido amplamente estudadas. O padrão geral destas modificações implica a acetilação na ativação da transcrição e a desacetilação na repressão da transcrição, apesar de haver exceções (NUSINZON, 2005).

As histona acetiltransferases (HATs) são enzimas capazes de ativar a transcrição através da acetilação de resíduos de lisina nas caudas das histonas H3 e H4. A maior parte das HATs está organizada em grandes complexos com múltiplas subunidades, que não são capazes de ligar-se diretamente ao DNA, sendo, ao invés, recrutadas por

fatores de transcrição (UTLEY, 1998). Por atuarem promovendo a transcrição de maneira acessória, as HATs são classificadas como co-ativadores.

Os complexos SAGA (de levedura)/ PCAF/Gcn5 (de humanos) e NuA4/ Tip60 (de humanos) são os complexos de HATs com influência na transcrição mais bem estudados (BERGER, 2002).

Assim como a fosforilação, a acetilação de histonas pode ser revertida. Este é o papel das histona deacetilases (HDACs). As HDACs dividem-se em três classes (I, II e III) e atuam como co-repressores da transcrição, através da remoção de resíduos de acetila, antagonizando a ação das HATs (NUSINZON, 2005).

1.3.6.2.2 A METILAÇÃO DE HISTONAS

Há dois tipos de metilação de histonas: a metilação em resíduos de lisina e a metilação em resíduos de arginina, ambas executadas por proteínas denominadas genericamente histona metiltransferases (HMTs). Há muitos sítios de metilação em lisinas e argininas nas histonas, os quais apresentam uma variedade de papéis importantes, muitas vezes essenciais, na regulação da estrutura da cromatina e na regulação da transcrição gênica. A metilação de alguns sítios como, por exemplo, a lisina 4 da histona H3 (H3K4), a arginina 17 da histona H3 (H3R17) e a arginina 3 da histona H4 (H4R3), tem sido associada à ativação da transcrição. Em contraposição a estas observações, a metilação da lisina 9 da histona H3 (H3K9) tem sido correlacionada ao silenciamento gênico (STALLCUP, 2001; ZHANG, 2001).

Como um dos temas principais deste trabalho é a caracterização de uma HMT que metila a H4R3, a proteína arginina metiltransferase 1 de *S. mansoni* (SmPRMT1), concentrar-nos-emos a seguir na descrição das atividades e dos papéis destas proteínas.

1.4 AS PROTEÍNA ARGININA METILTRANSFERASES

As proteína arginina metiltransferases (PRMTs) são uma família de proteínas capazes de transferir o grupamento metila da S-adenosil-L-metionina (SAM/AdoMet) para os nitrogênios do grupamento guanidina da cadeia lateral da arginina. Dependendo do número de metilas transferidas e da sua posição na guanidina, forma-se um dos três tipos de metil-arginina: ω - N^G -monometilarginina (MMA), no caso de somente 1 metila ser transferida; ω - N^G, N^G -dimetilarginina simétrica (sDMA), no caso de 1 metila ser transferida para cada um dos nitrogênios e ω - N^G, N^G -dimetilarginina assimétrica (ADMA), no caso de as 2 metilas serem transferidas para o mesmo nitrogênio (Figura 1.17B).

Todas as proteínas da família das PRMTs são capazes de catalisar a formação de MMA. No entanto, apresentam especificidade quanto à catálise subsequente de sDMA ou ADMA, motivo pelo qual foram divididas em duas subfamílias: as PRMTs do tipo I (PRMT1, PRMT3, PRMT4/CARM1, PRMT6 e PRMT8) catalisam a formação de MMA e de ADMA; as PRMTs do tipo II (PRMT5/JBP1 e PRMT7) catalisam a formação de MMA e de sDMA (Figura 1.17B). As PRMTs são, provavelmente, comuns a todos os eucariotos, já que pelo menos um dos representantes da família já

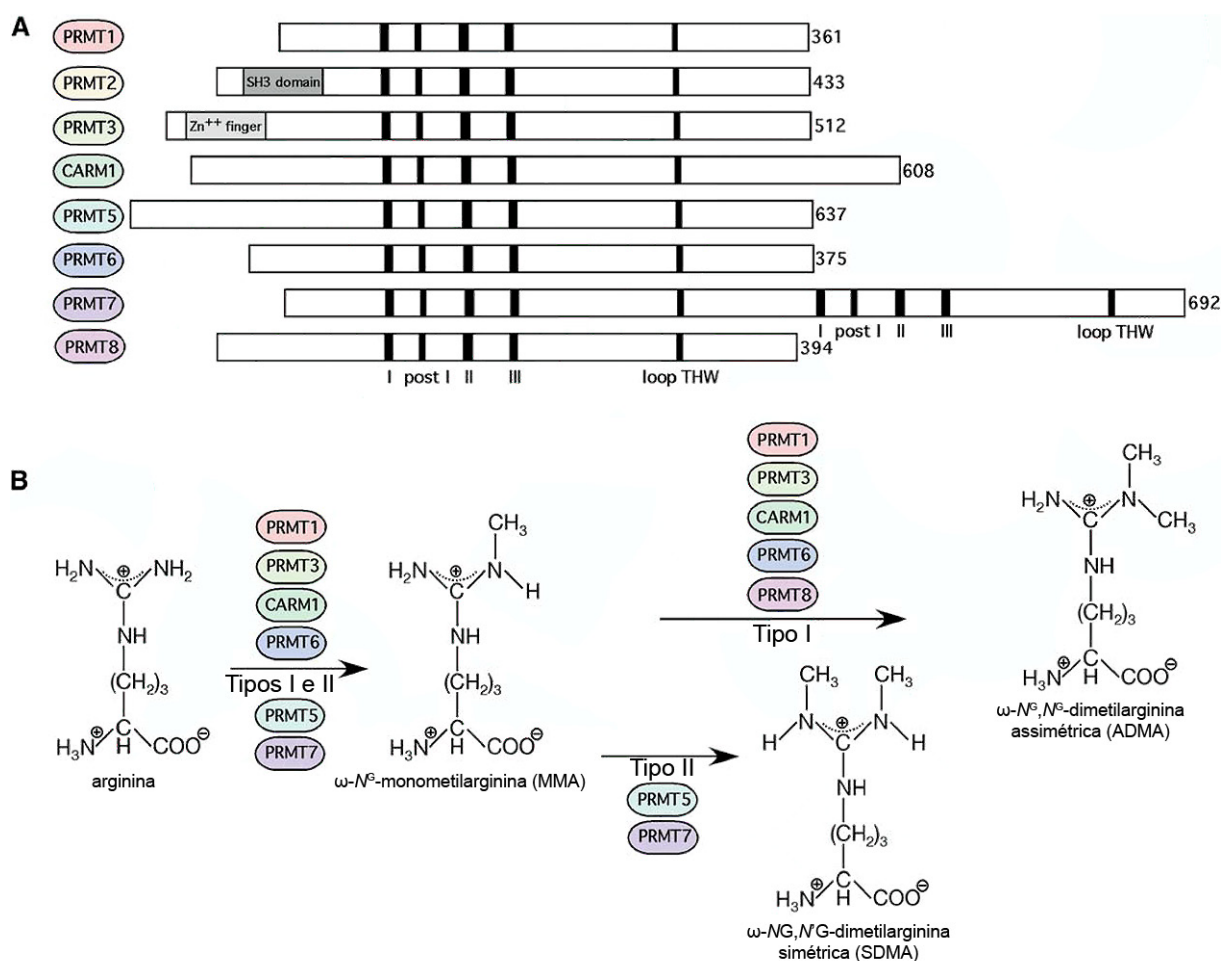


Figura 1.17 A Família das proteínas arginina metiltransferases (PRMTs).

(A) As oito PRMTs de mamíferos, com seus devidos domínios identificados. (B) Os tipos de metilação da arginina e as PRMTs que catalisam suas respectivas formações. Adaptado de: BEDFORD, 2005, p. 264

foi identificado em fungos, plantas superiores, invertebrados e vertebrados (ZHANG, 2003).

A descoberta da atividade de proteína arginina metiltransferase (PAIK, 1967, 1968) precedeu a descoberta da seqüência de cDNA da Hmt1/Rmt1 de levedura (GARY, 1996; HENRY, 1996) e do seu homólogo em mamíferos PRMT1 (LIN, 1996) por praticamente três décadas. A PRMT1 foi descoberta através de sua interação, por duplo-híbrido em levedura, com as proteínas TIS21 e BTG1, que são proteínas cedo-

imediatas[§] de resposta a mitógenos, e classificada de acordo com sua homologia à Hmt1/Rmt1 de levedura (LIN, 1996). A PRMT2, cuja atividade de proteína arginina metiltransferase ainda não foi detectada, foi identificada em bancos de dados de ESTs por sua homologia com a PRMT1 (KATSANIS, 1997; SCOTT, 1998). A PRMT3 foi descoberta devido à sua interação com a PRMT1, detectada por duplo-híbrido em levedura (TANG, 1998). A PRMT4/CARM1 (arginina metiltransferase 1 associada a co-ativador) foi identificada por sua interação com o co-ativador SRC-2/NCoA-2/GRIP-1/TIF2, também por duplo-híbrido em levedura (CHEN, 1999). A PRMT5/JBP1 (proteína de ligação à Janus cinase Jak2) foi descoberta devido à sua interação com a Janus cinase Jak2 (POLLACK, 1999; RHO, 2001). A PRMT6 foi identificada através da procura por novas PRMTs nos bancos de dados de ESTs (FRANKEL, 2002). A PRMT7 foi identificada em uma varredura genética na qual eram procurados elementos supressores que conferissem resistência a um inibidor da topoisomerase II (GROS, 2003) sendo posteriormente qualificada como capaz de promover a formação de MMA (MIRANDA, 2004b) e de sDMA (LEE, 2005a), o que a classifica, juntamente com a PRMT5, como uma PRMT do tipo II. Por fim, o último membro da família, a PRMT8, cujo mRNA é expresso exclusivamente no cérebro, foi descoberta através da procura por novas PRMTs nos bancos de dados de ESTs humanas (LEE, 2005b). A Figura 1.17A mostra um alinhamento esquemático das seqüências primárias das PRMTs, com as posições relativas de seus domínios.

[§] Em inglês: *Immediate-early proteins*.

1.4.1 AS PRMTs COMO CO-ATIVADORAS

A metilação de histonas, tal qual a acetilação de histonas, é um processo dinâmico que está envolvido em uma diversidade de processos biológicos tais como a regulação transcricional, o remodelamento da cromatina, a mitose e a montagem da heterocromatina (DILLON, 2004; KHAN, 2005; SARMENTO, 2004).

O envolvimento das PRMTs na ativação da transcrição foi identificado originalmente no contexto da ativação da transcrição por receptores nucleares. Em uma varredura por duplo-híbrido em levedura à procura de proteínas que interagissem com o co-ativador da família p160 SRC-2/NCoA-2/GRIP-1/TIF2, foi identificada uma proteína nunca antes descrita com homologia a PRMTs, e demonstrou-se que esta proteína era capaz de metilar a histona H3 *in vitro* (CHEN, 1999). Esta proteína (PRMT4) foi denominada, à época, arginina metiltransferase associada a co-ativador (CARM1). Neste estudo demonstrou-se que a PRMT4/CARM1 era capaz de co-ativar a transcrição mediada por receptores nucleares devido, pelo menos parcialmente, à metilação de histonas, o que representou o primeiro relato do seu envolvimento na ativação transcricional. O recrutamento da PRMT4/CARM1 ao promotor ocorre em resposta à estimulação hormonal e resulta na metilação sítio-específica da arginina 2 (H3R2) (SCHURTER, 2001), da arginina 17 (H3R17) e/ou da arginina 26 (H3R26) da histona H3 (MA, 2001a; SCHURTER, 2001). Tanto a atividade de metiltransferase quanto a associação com co-ativadores da família p160 são essenciais para a função de co-ativador de receptores nucleares da PRMT4/CARM1 (CHEN, 2000; LEE, 2002).

Além disso, em ensaios de imunoprecipitação de cromatina (ChIP *assays*), tanto a PRMT4/CARM1 quanto a metilação da H3R17 encontraram-se associadas aos promotores induzíveis por hormônios de genes-repórter integrados de maneira estável no genoma e de genes endógenos, de uma maneira dependente de hormônio (BAUER, 2002; MA, 2001a). Portanto, o recrutamento da PRMT4/CARM1 e a conseqüente metilação da histona H3 são partes integrais do processo de ativação transcricional.

Chen *et al.* (1999), no trabalho em que descrevem a PRMT4/CARM1, observaram também que a PRMT1 metila preferencialmente a histona H4 *in vitro*. Esta metilação dá-se especificamente na arginina 3 (H4R3), tanto *in vitro* quanto *in vivo* (CHEN, 1999; STRAHL, 2001; WANG, 2001). A PRMT1 também interage com co-ativadores da família p160 e é capaz de aumentar o nível da transcrição mediada por receptores nucleares em ensaios de transativação, de uma maneira dependente de sua atividade de metiltransferase (KOH, 2001; WANG, 2001). Ensaios de ChIP mostraram também que a PRMT1 é recrutada para um promotor ativado por estrogênio (MÉTIVIER, 2003).

A PRMT4/CARM1 coopera com a PRMT1 e a CBP/p300 na ativação da transcrição mediada por receptores nucleares (KOH, 2001; LEE, 2002). De fato, é consenso que a PRMT1, a PRMT4/CARM1 e a CBP/p300 dependem da presença de co-ativadores primários da família p160 para sua função como co-ativadores da transcrição mediada por receptores nucleares (STALLCUP, 2003). Ao contrário da PRMT4/CARM1, a PRMT1 e a CBP/p300 são capazes de associar-se diretamente a

receptores nucleares. Entretanto, como suas funções como co-ativadores dependem de sua ligação com as proteínas da família p160, elas são consideradas, assim como a PRMT4/CARM1, co-ativadores secundários (WYSOCKA, 2006).

1.4.2 INTERAÇÕES FUNCIONAIS ENTRE A ACETILAÇÃO DE HISTONAS E A METILAÇÃO DE HISTONAS EM RESÍDUOS DE ARGININA

O fato de que a metilação das histonas em argininas ocorre na cauda N-terminal, em sítios próximos e, em alguns casos, vizinhos aos utilizados na metilação e acetilação de lisinas e na fosforilação de serinas, é uma sugestão forte de que devem ocorrer intercorrelações funcionais entre estas modificações (FISCHLE, 2003; RICE, 2001; STRAHL, 1999; STRAHL, 2000). De fato, existem relatos de vários co-ativadores com atividade de modificação de histonas capazes de cooperar de forma sinérgica em ensaios de transativação de genes-repórter por transfecção transiente. A PRMT4/CARM1 coopera com a PRMT1 (KOH, 2001); a PRMT4/CARM1 (mas não a PRMT1, a PRMT2 ou a PRMT3) coopera com a CBP/p300 e com o p/CAF (LEE, 2002). Em alguns casos, um tipo de modificação covalente em uma histona facilita a ocorrência de outro tipo de modificação. Por exemplo, está descrito que a metilação da H4R3 pela PRMT1 estimula a acetilação subsequente da histona H4 pela CBP/p300 (WANG, 2001) e a acetilação de nucleossomos na transcrição *in vitro* dependente de p53 (AN, 2004). Da mesma forma, a acetilação prévia por CBP/p300 aumenta a ligação e a atividade enzimática da PRMT4/CARM1 a peptídeos

correspondentes à cauda da histona H3 (DAUJAT, 2002) e a moldes reconstituídos de cromatina (AN, 2004).

A metilação específica de histonas em resíduos de arginina faz parte, portanto, do processo de ativação transcricional e ocorre de forma cooperativa com outras modificações covalentes.

1.4.3 AS PRMTs SÃO CO-ATIVADORAS DE DIVERSOS TIPOS DE ATIVADORES TRANSCRICIONAIS

Apesar de a maior parte do conhecimento adquirido sobre a participação das PRMTs na ativação da transcrição ter vindo de experimentos envolvendo receptores nucleares, sabe-se que a PRMT1 e a PRMT4/CARM1 são recrutadas para promotores por diversos fatores de transcrição, entre eles o YY1 (REZAI-ZADEH, 2003), o LEF-1/TCF-4 (KOH, 2002), a p53 (AN, 2004) e o NF- κ B (COVIC, 2005). Portanto, as PRMTs estão envolvidas no remodelamento de cromatina e na regulação transcricional por uma grande variedade de fatores de transcrição.

1.4.4 AS PRMTs METILAM OUTROS SUBSTRATOS ALÉM DAS HISTONAS

Tal como as histona acetiltransferases (HATs), as PRMTs também estão envolvidas na metilação de muitos outros substratos diversos às histonas. Por exemplo: PRMT4/CARM1 metila a proteína co-ativadora CBP/p300 (CHEVILLARD-BRIET, 2002; XU, 2001); a PRMT1 e a PRMT5 metilam o fator de alongamento SPT5 (KWAK, 2003) e a PRMT6 metila o fator de alongamento Tat, de HIV (BOULANGER, 2005); a PRMT5 metila a fosfatase de FCP1 RNAPII (AMENTE, 2005); A proteína Y-box

RBP16 de *Trypanosoma brucei* é metilada por PRMTs do Tipo I (PELLETIER, 2001); a PRMT4/CARM1 metila a proteína estabilizadora de mRNAs HuR (LI, 2002); a HMT1/RMT1 (PRMT1 de *Saccharomyces cerevisiae*) metila hnRNPs para promover o empacotamento das partículas de mRNPs (XU, 2004a; YU, 2004); a PRMT5 metila as proteínas do editorassomo** SmD1 e SmD3 (MIRANDA, 2004a).

A metilação de resíduos de arginina pelas PRMTs, portanto, regula a iniciação e o alongamento da transcrição e está envolvida com a exportação e o empacotamento das mRNPs.

1.4.5 AS PRMTs NO PROCESSAMENTO DE RNA

As proteínas de ligação ao RNA (RBPs^{††}) realizam diversas tarefas para garantir o processamento e o dobramento adequado, assim como a estabilização e a localização correta dos RNAs e a tradução do mRNA. As RBPs são alvos majoritários das PRMTs porque a maioria das hnRNPs (A1, A2, K, R e U) contém motivos ricos em glicina e arginina (GAR^{‡‡}). De fato, sabe-se que várias RBPs são metiladas em resíduos de arginina (HERRMANN, 2004; LIU, 1995). Como várias RBPs, incluindo a Sam68 (CÔTÉ, 2003) não se localizam corretamente quando estão hipometiladas, foi proposto que a metilação de RBPs em resíduos de arginina pode servir como um sinal para a maturação (LUKONG, 2004; SMITH, 2004).

** Tradução livre do autor para o termo em inglês: *spliceosome*.

†† Em inglês: *RNA-binding proteins*.

‡‡ Em inglês: *glycine and arginine-rich*.

O editorassomo é um complexo nuclear que catalisa a editoração do hnRNA de eucariotos. Cada partícula pequena de ribonucleoproteínas nucleares (snRNP^{§§}) do editorassomo é composta de pequenos RNAs nucleares (snRNAs^{***}; U1, U2, U4/U6 e U5) ligados a um conjunto único de proteínas assim como a um conjunto compartilhado de sete proteínas Sm (B/B', D1, D2, D3, E, F e G) (LEHMEIER, 1994; MIRANDA, 2004a). Estas sete proteínas Sm têm um papel fundamental na biogênese das SnRNPs. As proteínas Sm B, B', D1 e D3 contêm motivos GAR e considera-se que metilação de certos resíduos de arginina destes motivos seja a mediadora da sua montagem em snRNPs (BRAHMS, 2001; FRIESEN, 2001).

1.5 AS PROTEÍNAS COM DOMÍNIOS LIM

Os domínios LIM são compostos por seqüências protéicas modulares ricas em cisteínas que se caracterizam por sua estrutura em dedos-de-zinco encadeados. Estas estruturas funcionam como interfaces para a ligação a outras proteínas. LIM é um acrônimo cunhado por Freyd *et al.* (1990) que inclui as iniciais das três primeiras proteínas em que este domínio foi descrito: LIN-11 (FREYD, 1990), Isl1 (KARLSSON, 1990) e MEC-3 (WAY, 1988), respectivamente.

A seqüência consenso de aminoácidos do domínio LIM está presente em uma ampla variedade de proteínas de eucariotos, com diversas funções biológicas. Esta seqüência consenso contém características conservadas que facilitam a formação de uma estrutura central estável. As variações em torno da seqüência consenso

^{§§} Em inglês: *small nuclear ribonucleoprotein particle*.

^{***} Em inglês: *small nuclear RNAs*

conferem aos domínios LIM a capacidade de ligar-se com alta afinidade a diversos parceiros protéicos. De fato, as funções biológicas dos domínios LIM são possíveis graças às ligações, em particular, de cada domínio LIM a seus alvos específicos (KADRMAS, 2004).

1.5.1 A SEQÜÊNCIA DO DOMÍNIO LIM

Cada domínio LIM é composto por, aproximadamente, 55 aminoácidos com 8 resíduos altamente conservados, localizados em intervalos definidos, sendo que a maioria destes resíduos conservados é de cisteínas e histidinas. Canonicamente, a seqüência consenso dos domínios LIM foi definida como $CX_2CX_{16-23}HX_2CX_2CX_2CX_{16-}$

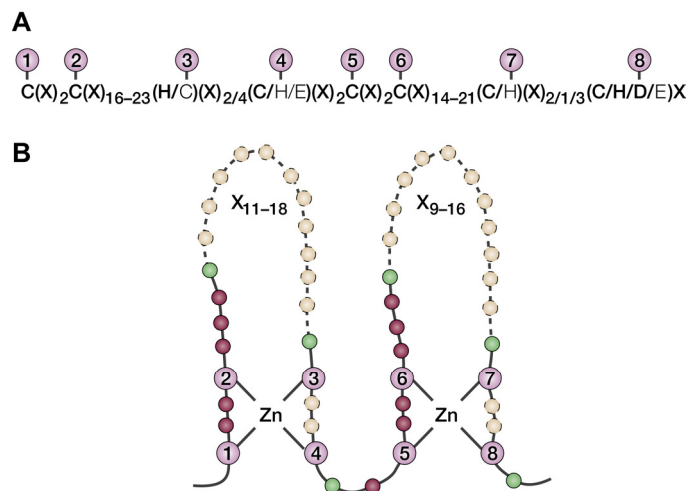


Figura 1.18 Seqüência consenso e topologia dos domínios LIM.

(A) O espaçamento e a identidade dos oito resíduos (1-8) envolvidos na formação dos dedos-de-zinco são baseados na análise de 135 seqüências de domínios LIM humanas. Os padrões pouco freqüentes são representados pelas letras que não estão em negrito. X denota qualquer aminoácido. (B) Topologia dos dedos-de-zinco. Os círculos em rosa indicam os resíduos de ligação ao Zn^{2+} . Os resíduos apolares pouco conservados são representados por círculos verdes. Os resíduos não-conservados são representados por círculos magenta. Os círculos amarelos vazados indicam os números variados de resíduos (X) que são possíveis dentro da seqüência consenso. Retirado de: KADRMAS, 2004, p. 921.

${}_{21}CX_2(C/H/D)$, na qual X denota qualquer aminoácido (SCHMEICHEL, 1994). A análise de todas as seqüências humanas, entretanto, resultou em uma seqüência consenso um pouco menos estrita (Figura 1.18A). A organização dos resíduos de cisteína ou histidina resulta na formação de dois dedos-de-zinco (*zinc fingers*) nos quais o primeiro átomo de Zn^{2+} é coordenado pelos resíduos 1 a 4 e o segundo átomo de Zn^{2+} é coordenado pelos resíduos 5 a 8, formando uma estrutura com topologia encadeada (Figura 1.18B).

1.5.2 OS DOMÍNIOS LIM ESTÃO PRESENTES EM NÚMEROS VARIADOS EM PROTEÍNAS COM FUNÇÕES DIVERSAS

O domínio LIM é encontrado em quase todos os organismos eucarióticos. No genoma humano, há aproximadamente 135 seqüências que codificam domínios LIM, dispostas dentro de 58 genes. As proteínas LIM de vertebrados possuem de 1 a 5 domínios LIM. Invertebrados como a *Drosophila melanogaster* e o *Caenorhabditis elegans* possuem aproximadamente o mesmo número de famílias que os vertebrados, com um número total de membros reduzido, devido à menor variabilidade dentro de cada família. Apesar de os genomas de organismos tais como leveduras e plantas codificarem poucas proteínas com domínios LIM, todos os eucariotos cujo genoma tenha sido extensivamente caracterizado possuem proteínas com domínios LIM, ao passo que nenhum dos procariotos cujo genoma tenha sido extensivamente caracterizado as possui (KADRMAS, 2004). As proteínas com domínios LIM e as famílias já caracterizadas estão ilustradas na Figura 1.19.

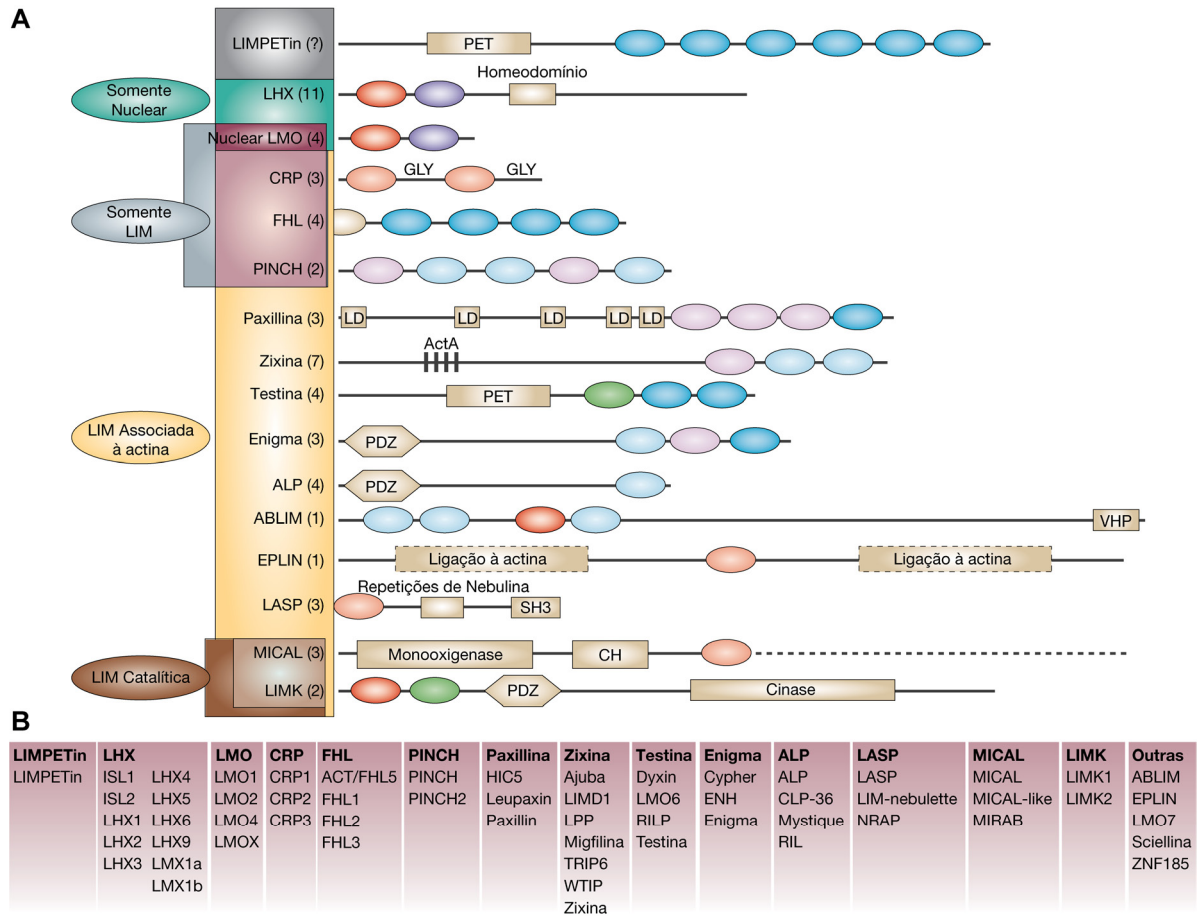


Figura 1.19 Proteínas com domínios LIM.

(A) O número dos membros de cada família está indicado entre parênteses. Os domínios LIM estão indicados como formas ovais, coloridas de acordo com a homologia de suas seqüências. Outros domínios estão indicados por caixas com texto. Domínios cujos limites não foram definidos estão representados por caixas hachuradas. (B) Lista das famílias conhecidas de proteínas com domínios LIM. Em negrito, o nome das famílias, com seus membros indicados logo abaixo. Adaptado de: KADRMAS, 2004, p. 922.

As proteínas com domínios LIM podem conter exclusivamente domínios LIM ou também domínios diversos, tais como homeodomínios, domínios catalíticos, domínios de ligação ao citoesqueleto ou outros domínios de ligação a proteínas como o PET, SH3, LD ou PDZ. Os domínios LIM podem estar localizados internamente ou próximos às extremidades N ou C-terminais da proteína. Estas características deixam bem clara a natureza modular dos domínios LIM.

2 OBJETIVOS

2.1 PARTE I

- Isolar o cDNA do homólogo em *S. mansoni* da proteína arginina metiltransferase (PRMT1), uma proteína com capacidade de metilar histonas e modular a ativação da transcrição por receptores nucleares.
- Expressar a proteína arginina metiltransferase 1 de *S. mansoni* (SmPRMT1) recombinante em *Escherichia coli*.
- Determinar se havia diferenças na expressão do mRNA da SmPRMT1 entre os sexos e entre os diferentes estágios do parasito.
- Testar a atividade da SmPRMT1 como histona metiltransferase *in vitro*.
- Testar a possível interação *in vitro*, direta ou indireta, da SmPRMT1 com receptores nucleares previamente descritos de *S. mansoni*.
- Testar a atividade *in vitro* da SmPRMT1 como metiltransferase de proteínas ligadoras de RNA previamente descritas de *S. mansoni*, possivelmente envolvidas com a editoração e o processamento do mRNA.

2.2 PARTE II

- Determinar se o *S. mansoni* possuía proteínas capazes de ligar-se ao elemento responsivo ao AMP cíclico (CRE), através de ensaios de deslocamento da mobilidade eletroforética (EMSA) com extratos nucleares do parasito.
- Identificar o homólogo em *S. mansoni* do ativador do CREM no testículo (ACT), uma proteína com domínios LIM envolvida na diferenciação dos espermatozóides em mamíferos e, portanto, um potencial alvo terapêutico em *S. mansoni*.
- Confirmar por análise filogenética a identidade da proteína isolada na biblioteca de cDNA de *S. mansoni* como proteína com domínios LIM e PET de *S. mansoni* (SmLIMPETin), um parálogo do ACT pertencente a uma nova subfamília de proteínas com domínios LIM de invertebrados.
- Determinar se havia diferenças na expressão do mRNA da SmLIMPETin entre os sexos e entre os diferentes estágios do parasito.
- Expressar a SmLIMPETin recombinante em *Escherichia coli*.
- Produzir um anticorpo imuno específico contra a SmLIMPETin.
- Determinar a localização da SmLIMPETin no *S. mansoni* por imunohistoquímica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MANUTENÇÃO DO CICLO DE VIDA DO *S. MANSONI* E OBTENÇÃO DE VERMES ADULTOS POR PERFUSÃO

Os parasitos são mantidos em nosso laboratório através da infecção do hospedeiros intermediários, gastrópodes da espécie *Biomphalaria glabrata*, e dos hospedeiros definitivos, camundongos da estirpe BALB/c ou hamsters dourados. As cercárias liberadas pelos caramujos são injetadas subcutaneamente nos roedores. Após 45 dias, os vermes já adultos são recuperadas pela perfusão do sistema porta-hepático das cobaias (RAMALHO-PINTO, 1974). Os ovos são extraídos das fezes e do fígado dos roedores e expostos a condições ideais de luminosidade e osmolaridade para a liberação dos miracídeos, que são a forma infectante dos caramujos, fechando assim o ciclo do esquistossomo.

3.2 INFECÇÕES UNISSEXUAIS DE *S. MANSONI*

Infecções unissexuais são aquelas em que o hospedeiro definitivo possui uma população de parasitos do mesmo sexo. Como o sexo do *S. mansoni* é determinado de forma heterogamética (macho ZZ e fêmea ZW), os parasitos, ao eclodirem dos ovos como miracídeos, já possuem sexo determinado. Desta maneira, os caramujos são infectados com um único miracídeo e este, ao reproduzir-se assexuadamente, gera uma população clonal de cercárias. Estas cercárias, todas do mesmo sexo, são utilizadas na infecção dos hamsters ou camundongos. Após o período de

desenvolvimento dos parasitos, estes são recuperados, através da perfusão do sistema porta-hepático dos roedores.

3.3 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DE *S. MANSONI*

O RNA total de *S. mansoni* era extraído utilizando-se o reagente Trizol, da Invitrogen, de acordo com as recomendações do fabricante, e ressuspensão em H₂O Milli-Q estéril, sendo posteriormente dosado em um espectrofotômetro modelo Ultrospec 3000, da Pharmacia Biotech, no modo Nucleic/RNA (λ : 260 nm).

3.4 SÍNTESE DE CDNA

O cDNA de *S. mansoni* era sintetizado a partir de 3 μ g do RNA total utilizando-se a enzima SuperScript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase, da Invitrogen, e oligo dT, de acordo com as instruções do fabricante. Reações controle sem a adição da enzima transcriptase reversa também eram preparadas.

3.5 OBTENÇÃO DA SEQÜÊNCIA PARCIAL DA SMPRMT1

O homólogo de PRMT1 do *S. mansoni* (SmPRMT1) foi identificado através de uma busca no banco de dados TIGR *S. mansoni* Gene Index (SmGI) (MERRICK, 2003). Utilizando-se uma seqüência de nucleotídeos da PRMT1 de camundongo (n^o de aquisição⁺⁺⁺ do GenBank NP_062804), foi efetuado um BLASTN (ALTSCHUL, 1990)

⁺⁺⁺ Em inglês: *accession number*

contra este banco de dados, através do qual foi identificada a seqüência do clone de nome SMFBE08 (Figura 4.1), de 663 pb.

3.6 OBTENÇÃO DA SEQÜÊNCIA PARCIAL DA SMLIMPETIN

Utilizando-se uma seqüência de nucleotídeos da proteína ACT de camundongo (nº de aquisição^{##} do GenBank NP_067293), foi efetuado um BLASTN (ALTSCHUL, 1990) contra o banco de dados TIGR *S. mansoni* Gene Index (SmGI) (MERRICK, 2003), através do qual foi identificada a seqüência do clone de nome TC3466 (Figura 5.3), de 631 pb.

3.7 VARREDURA DA BIBLIOTECA DE CDNA DE *S. MANSONI* EM BUSCA DO CLONE COM A SEQÜÊNCIA COMPLETA DA SMPRMT1

A partir da seqüência do clone SMFBE08 foi desenhado o par de *primers* SmPRMT1-EST-F e SmPRMT1-EST-R (Tabela 3.1), com os quais foi feita uma PCR utilizando-se como molde cDNA preparado a partir do mRNA de vermes adultos de *S. mansoni*. Este *amplicon* de 455 pb foi marcado radioativamente através da inclusão de 1 µCi de [α -³²P]-dATP em cada reação de PCR. A reação de PCR contendo o *amplicon* radioativo foi utilizada como sonda na varredura de uma biblioteca de cDNA de *S. mansoni* preparada com o kit Uni-ZAP (Vetor Lambda ZAP II e ZAP-cDNA Synthesis Kit, da Stratagene), gentilmente cedida pelo Dr. Phillip T. LoVerde.

O procedimento experimental foi levado a cabo de acordo com as instruções do fabricante sendo que, de forma a obter clones isolados e diminuir a probabilidade do

^{##} Em inglês: *accession number*

aparecimento de falsos positivos, foram realizadas 3 varreduras seguidas utilizando-se os clones positivos da primeira varredura para a realização da segunda e os clones positivos da segunda para a realização da terceira varredura, sucessivamente.

Primeiramente a biblioteca foi titulada, para que fosse escolhida a quantidade de fagos infectantes com a densidade ideal. Os passos da titulação e das três varreduras foram os mesmos: as bactérias foram infectadas com os fagos e depois plaqueadas. As placas foram incubadas por cerca de 10 horas a 37° C e as placas de lise foram transferidas por contato (3 min.) para membranas de nylon (Hybond-N⁺, Amersham). No momento da transferência as membranas foram marcadas através de sua perfuração assimétrica em três pontos (aproximadamente às “12 h”, “2 h” e “6 h”) com uma seringa contendo tinta nanquim, de forma a permitir a futura identificação nas placas de petri originais do local exato das placas de lise positivas. As membranas contendo as placas de lise foram tratadas de acordo com as recomendações do fabricante e a pré-hibridação e hibridação foram realizadas como descrito no item 3.15.

As lavagens das membranas foram realizadas da seguinte maneira: 1 vez por 5 min. e uma vez por 15 min. à temperatura ambiente em uma solução de SSC 2X e SDS a 0,1% e, posteriormente, 2 vezes por 15 min. a 50° C em uma solução de SSC 0,1X e SDS a 0,1%. Na varredura terciária foi feita uma lavagem adicional de 1 vez a 55°C por 30 minutos em SSC 0,1X e SDS 0,1%. Em seguida, as membranas foram expostas a filmes de raios X (Kodak) por 2 dias a -70° C e os filmes revelados após este período. As perfurações das membranas foram reproduzidas nos filmes de raios X e

os mesmos foram alinhados com as placas de petri correspondentes, permitindo a identificação das placas de lise positivas. As mesmas foram marcadas e recuperadas das placas de petri com um bisturi previamente esterilizado na chama e transferidas para microtubos de 1,5 mL contendo 1 mL de tampão SM no caso das varreduras primária e secundária e 500 μ L de tampão SM no caso da varredura terciária. Os clones foram armazenados a 4° C até o momento de sua utilização.

Após a varredura terciária foram isolados vários clones. Seu tamanho foi determinado por PCR utilizando-se os *primers* que flanqueiam os clones (T3 e T7). Posteriormente foi realizada a excisão do fagemídeo pBluescript KS⁻ contendo o clone de maior extensão (~1500 pb) utilizando-se o Rapid Excision Kit, da Stratagene, de acordo com as instruções do fabricante.

3.8 VARREDURA DA BIBLIOTECA DE CDNA DE *S. MANSONI* EM BUSCA DO CLONE COM A SEQÜÊNCIA COMPLETA DA SMLIMPETIN

A partir da seqüência do clone TC3566 foi desenhado o par de *primers* SmLIMPETin1-EST-F e SmLIMPETin1-EST-R (Tabela 3.1), com os quais foi feita uma PCR utilizando-se como molde cDNA preparado a partir do mRNA de vermes adultos de *S. mansoni*. Este *amplicon* de 520 pb foi marcado radioativamente com [α -³²P]-dCTP (Amersham) de acordo com o protocolo do tópico 3.14. A sonda radioativa foi utilizada na varredura de uma biblioteca de cDNA de *S. mansoni* preparada com o kit Uni-ZAP (Vetor Lambda ZAP II e ZAP-cDNA Synthesis Kit, da Stratagene),

gentilmente cedida pelo Dr. Phillip T. LoVerde. As próximas etapas deste procedimento foram idênticas às do tópico precedente (3.7).

3.9 SEQÜENCIAMENTO

Todos os clones foram seqüenciados pela Macrogen Inc., Coréia do Sul (MACROGEN). Antes de serem enviados para seqüenciamento, os clones em plasmídeo ou fagemídeo eram purificados com o kit Wizard SV minipreps, da Promega, de acordo com as instruções do fabricante, e eluídos em H₂O Milli-Q estéril.

3.10 RT-PCR SEMI-QUANTITATIVO PARA A ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA SMPRTM1

Machos e fêmeas adultos foram separados mecanicamente e utilizados para a extração de RNA, assim como machos e fêmeas provenientes de infecções unissexuais e esquistossômulos. Foi feita a síntese de cDNA dessas amostras. Reações controle sem a adição da enzima transcriptase reversa também foram preparadas. A reação de PCR foi realizada da maneira convencional utilizando os *primers* SmPRMT1-EST-F e SmPRMT1-EST-R, que amplificam um fragmento de 455 pb. Ao experimento foram também incluídos um controle negativo da reação, em que H₂O estéril foi adicionada no lugar do cDNA para todas as combinações de *primers* e um controle constitutivo, em que foi utilizado o par de *primers* GAPDH-F e GAPDH-R, que amplifica um fragmento de 795 pb do cDNA da SmGAPDH (nº de aquisição do GenBank [M92359](#)). A todas as reações foi incluído 1 µCi de [α -³²P]-

dATP, para marcar radioativamente os *amplicons*. A reação foi feita em 100 μ L e alíquotas de 20 μ L foram retiradas das reações nos ciclos 15, 25 e 35.

Após a amplificação, as amostras foram fracionadas em gel de agarose a 1,5% em TAE. Em seguida, o DNA foi transferido durante a noite em tampão SSC 20X para uma membrana de nylon modelo Hybond-N⁺, da Amersham. O DNA foi fixado à membrana por 2 horas a 80° C. A membrana foi então exposta por pelo menos 1 h a uma tela sensível à radiação beta do Storm 860 (Molecular Dynamics). Após esta exposição, a tela foi lida neste instrumento utilizando-se o *Storage Phosphor mode*, laser vermelho ($\lambda = 635$ nm) / 390 BP, na resolução de 200 pontos por cm. O arquivo resultante foi analisado no programa ImageQuant versão 5.2 (Molecular Dynamics), no qual seu contraste e ganho foram ajustados.

As seqüências de todos os *primers* utilizados neste trabalho estão descritas na Tabela 3.1.

3.11 NORTHERN BLOT PARA A ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA SMLIMPETIN

20 μ g do RNA total de vermes adultos foram fracionados em gel de agarose a 1% contendo Formamida a 12% por 6 horas a 30 V. O RNA foi transferido durante a noite para uma membrana de nylon modelo Hybond-N⁺, da Amersham, em tampão SSC 10X. Após a transferência, o RNA foi fixado por 2 horas a 80° C. A membrana foi pré-hibridada por pelo menos 2 horas a 42° C na solução de hibridação (SSC 5X, 50% de Formamida deionizada, Dextran Sulfato a 10%, SDS a 1%, solução de Denhardt

10X). Após este período, foi acrescentada a sonda, que consistia no *amplicon* da seqüência parcial de cDNA da SmLIMPETin marcado com [α - 32 P]-dCTP (ver tópico 3.14), previamente desnaturado por 5 min. a 100° C (banho-maria) e 3 min. no gelo e a membrana foi incubada a 42° C durante a noite. Em seqüência à hibridação, a membrana foi lavada 1 vez por 5 min. e uma vez por 15 min. à temperatura ambiente em uma solução de SSC 2X e SDS a 0,1% e, posteriormente, 1 vez por 15 min. a 55° C em uma solução de SSC 0,1X e SDS a 0,1%. Por fim, a membrana foi exposta a um filme de raios X (Kodak) por 2 dias a -70° C, o qual foi revelado após este período.

3.12 RT-PCR SEMI-QUANTITATIVO PARA A ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA SMLIMPETIN

Machos e fêmeas adultos foram separados mecanicamente e utilizados para a extração de RNA, assim como machos e fêmeas provenientes de infecções unissexuais e esquistossômulos. Foi feita a síntese de cDNA dessas amostras. Reações controle sem a adição da enzima transcriptase reversa também foram preparadas. A reação de PCR foi realizada da maneira convencional utilizando os *primers* SmLIMPETin-EST-F e SmLIMPETin-EST-R, que amplificam um fragmento de 520 pb. Ao experimento foram também incluídos um controle negativo da reação, em que H₂O estéril foi adicionada no lugar do cDNA para todas as combinações de *primers* e um controle constitutivo, em que foi utilizado o par *primers* GAPDH-F e GAPDH-2R, que amplificam um fragmento de 320 pb do cDNA da SmGAPDH (nº de aquisição do GenBank [M92359](#)). A reação foi feita em 20 μ L e, após testes de

titulação, foi determinado o ciclo 30 como ideal para o término das reações. Após a amplificação, as amostras foram fracionadas em gel de agarose a 1,5% em TAE com brometo de etídeo. Em seguida, o gel foi fotografado com um sistema polaróide.

3.13 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE *S. MANSONI*

Vermes adultos eram macerados em Tampão de Extração (Tris-HCl pH 8,0 100mM; EDTA 50 mM; NaCl 150 mM; SDS a 2% e proteinase K a 100 µg/mL) em um homogeneizador do tipo Potter e incubados a 56° C por 2 horas. O DNA era extraído seqüencialmente com 1 volume de fenol tamponado, 1 volume de fenol-clorofórmio e 1 volume de clorofórmio. A fase aquosa era posteriormente submetida à precipitação com 2,5 volumes de etanol absoluto e KOAc 4M pH 5,2 a 1:10 por 30 min. a -70° C. Em seguida, era centrifugada a 14.400 X g por 15 min. a 4°, o que ocasionava a formação de um pélete. O mesmo era lavado 1 vez com etanol 70% e recentrifugado a 14.400 X g por 5 min. a 4°. Após descarte do sobrenadante, era exposto ao ar até a completa evaporação do etanol, ressuspenso em H₂O Milli-Q estéril e incubado no banho-maria a 37° C até sua completa dissolução. Por fim, era dosado em um espectrofotômetro modelo Ultrospec 3000, da Pharmacia Biotech, no modo *Nucleic/DNA* (λ : 260 nm).

3.14 MARCAÇÃO RADIOATIVA DE SONDA

A marcação radioativa era realizada utilizando-se o Kit Ready-to-Go da Amersham e 5µCi de [α -³²P]-dCTP (Amersham), em um volume final de 50 µL, de acordo com as

instruções do fabricante. Posteriormente à marcação radioativa, o volume era elevado para 100 µL com TE pH 8,0 e o fragmento marcado era purificado através de passagem pela coluna de gel-filtração HyperSpin HR400 (Amersham), também de acordo com as instruções do fabricante. O *flow-through*, isento de nucleotídeos livres, era utilizado imediatamente nas hibridações ou armazenado a -20° C. Todos as precauções e cuidados relativos à manipulação de material radioativo eram tomados.

3.15 SOUTHERN BLOT DA SMPRMT1

As amostras de DNA (10 µg) foram digeridas com *EcoRI*, *HindIII*, *EcoRV*, *PstI* e *BamHI* (Promega) durante a noite a 37° C. A eficiência da digestão foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 0,8% em TAE. As amostras foram então fracionadas em gel de agarose a 0,8% em TAE, sendo esta corrida realizada em um período de 6 horas a 30 V para uma melhor separação dos fragmentos de DNA. O gel foi imerso por 20 min. em uma solução de depurinação (HCl 0,125 M), em seguida por 30 min. em uma solução de desnaturação (NaCl a 9%, NaOH a 2%) e finalmente por 30 min. em uma solução de neutralização (NaCl a 9%, Tris base a 6%, pH ajustado a 7,5). Após o tratamento do gel, a transferência do DNA foi realizada durante a noite em tampão SSC 20X para uma membrana de nylon modelo Hybond-N⁺, da Amersham. O DNA foi fixado à membrana por 2 horas a 80° C. A membrana foi então pré-hibridada, por pelo menos 2 h, em uma solução de pré-hibridação (caseína a 1% p/v; gelatina a 3% p/v; Tween 20 a 0,05%; NaCl 0.5 M e Tris-HCl pH 7.5 0.1M). Em seguida, a membrana foi incubada a 42° C durante a noite com a solução de

hibridação (SSC 5X, 50% de Formamida deionizada, Dextran Sulfato a 10%, SDS a 1%, solução de Denhardt 10X) contendo a sonda, que consistia no *amplicon* da seqüência completa de cDNA da SmPRMT1 marcado com [α - 32 P]-dCTP (ver tópico 3.14), previamente desnaturado por 5 min. a 100° C (banho-maria) e 3 min. no gelo. Em seqüência à hibridação, a membrana foi lavada 1 vez por 5 min. e uma vez por 15 min. à temperatura ambiente em uma solução de SSC 2X e SDS a 0.1% e, posteriormente, 1 vez por 15 min. a 55° C em uma solução de SSC 0,1X e SDS a 0,1%. Por fim, a membrana foi exposta a um filme de raios X (Kodak) por 2 dias a -70° C, o qual foi revelado após este período.

3.16 SOUTHERN BLOT DA SMLIMPETIN

As amostras de DNA (10 μ g) foram digeridas com *Bam*HI, *Bgl*III, *Eco*RI, *Hae*III, *Hind*III, e *Hinc*II (BRL, atual Invitrogen) durante a noite a 37° C. A seqüência deste procedimento é idêntica à do tópico anterior (3.15).

3.17 CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS CONTENDO PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Para efetuar a clonagem das proteínas recombinantes em seus plasmídeos de expressão em *Escherichia. coli*, foram desenhados *primers* específicos contendo adaptadores para enzimas de restrição em ambas as extremidades. Todas as reações de PCR realizadas para amplificar os fragmentos foram realizadas com a PFU DNA Polimerase da Biotools, seguindo o protocolo do fabricante, e com as adaptações necessárias a uma amplificação específica e com alto rendimento, o que consistia em

ajustes nas concentrações do MgCl₂, dos *primers*, da enzima, e no número de ciclos da PCR.

A seqüência completa da SmPRMT1 foi amplificada utilizando-se como molde cDNA preparado a partir de mRNA extraído de vermes adultos de *S. mansoni*. Foram utilizados na reação os *primers* SmPRMT1-BamHI e SmPRMT1-XhoI, o que gerou um *amplicon* de 1092 pb. O produto de cinco reações foi aplicado em uma coluna de sílica do GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit, da Amersham, processado de acordo com as instruções do fabricante, e eluído em 50 µL de H₂O Milli-Q estéril. Após dosagem espectrofotométrica a 260 nm, foi unido à proporção adequada do plasmídeo pGEM T-easy (Promega) em um microtubo, ao qual foi adicionada ligase (promega), seu tampão e a quantidade adequada de H₂O Milli-Q. A reação foi incubada durante a noite a 14° C, precipitada com etanol como descrito no tópico 3.13 e ressuspensa em 4 µL. Estes 4 µL foram incorporados gentilmente a um microtubo de 200 µL contendo 20 µL de *E. coli* eletrocompetentes da cepa BL21-DE3 previamente preparadas e armazenadas a -70° C. O conteúdo do tubo foi transferido para uma cubeta de eletroporação com diâmetro de abertura de 1 mm, a qual foi mantida no gelo até o momento da eletroporação. A eletroporação foi executada utilizando-se os parâmetros padronizados para *E. coli* (2,5 kV, 25 µF e 200 ohm), em um eletroporador modelo Gene Pulser II, da Bio-Rad. A constante de tempo de eletroporação informada pelo aparelho variou sempre de 4,5 a 5 ms. Imediatamente após à eletroporação, foi adicionado à cubeta 1 mL de meio SOC pré aquecido a 37° C e o conteúdo foi transferido para um tubo Falcon de 15 mL. Este tubo foi incubado a

37° C por 1 h em agitação suave, após o que foi plaqueado em alíquotas de 50 µL e 200 µL sobre placas de petri com LB-ágar contendo IPTG 320 mM; Xgal a 64 µg/mL e ampicilina a 50 µg/mL. As placas foram incubadas a 37° C durante a noite e as colônias brancas (azuis são negativas) foram testadas por PCR de colônia com os mesmos *primers* utilizados na amplificação inicial. 3 das colônias positivas foram repicadas em tubos falcon de 50 mL contendo 15 mL de LB com kanamicina a 50 µg/mL, e incubadas durante a noite a 37° C em um *shaker* sob agitação rápida. No dia seguinte, 750 µL de cada uma delas foram acrescidos de 250 µL de glicerol estéril e transferidos para criotubos de 2 mL, que foram identificados e armazenados a -70° C. 10 mL de cada amostra foram centrifugados e processados com o kit Wizard SV minipreps, da Promega, de acordo com as instruções do fabricante, sendo os plasmídeos purificados eluídos em 100 µL de H₂O milli-Q estéril e armazenados a -20° C. Uma alíquota do eluato foi digerida por 1 h a 37° C com *Bam*HI e *Xho*I (Promega), utilizando-se o tampão adequado, em duas reações de 20µL. Após este período, as reações foram reunidas em um só microtubo e precipitadas com 2,5 volumes de etanol absoluto e KOAc 4M pH 5,2 a 1:10 por 30 min. a -70° C. Em seguida, foram centrifugadas a 14.400 X g por 15 min. a 4° C, o que ocasionou a formação de um pélete. O mesmo foi lavado 1 vez com etanol 70% e recentrifugado a 14.400 X g por 5 min. a 4°. Após descarte do sobrenadante, foi exposto ao ar até a completa evaporação do etanol e ressuspenso em H₂O Milli-Q estéril. Parte deste eluato foi acrescida a um microtubo contendo o plasmídeo pGEX-4T1 previamente digerido com as mesmas enzimas e precipitado utilizando-se o mesmo protocolo e

ligase, tendo sido processado para ligação e eletroporação como descrito acima. As colônias foram testadas da mesma maneira, com a diferença de que o pGEX-4T1 não permite a seleção por colônias brancas/azuis, portanto as placas de LB-agar só continham o antibiótico, no caso a ampicilina a 100 µg/mL. As colônias positivas foram crescidas e armazenadas como descrito acima. A Figura 3.1 expõe o mapa do plasmídeo contendo o gene da SmPRMT1 fusionado à GST.

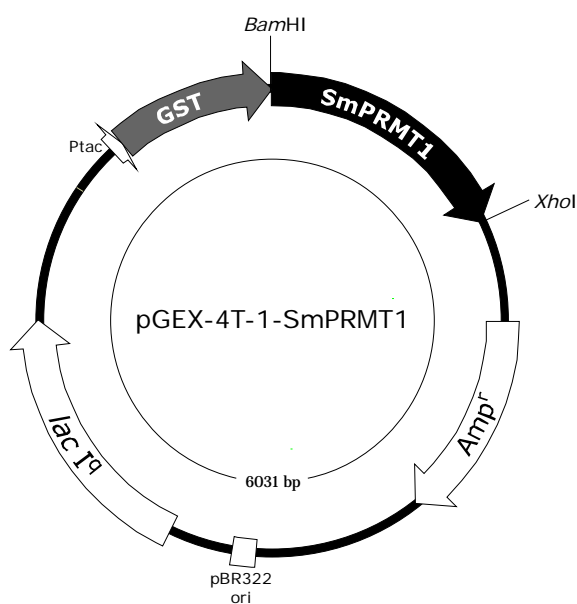


Figura 3.1 Mapa do plasmídeo pGEX-4T-1-SmPRMT1

O gene da SmPRMT1 está representado em preto e o gene da GST em cinza.

A clonagem do cDNA da SmRXR1 utilizado para a transcrição e tradução *in vitro* está descrita em detalhes por Freebern *et al.* (1999b).

O cDNA com a seqüência completa da SRC-1 humana (nº de aquisição do GenBank U90661) clonado no plasmídeo pCR3.1 (Stratagene) foi uma doação generosa do laboratório do Dr. Bert W. O'Malley. Este plasmídeo foi utilizado como molde para uma PCR em que foram utilizados os *primers* hSRC1-BamHI-F e hSRC1-PstI-R, gerando um fragmento de 1620 pb, correspondente a um fragmento menor do cDNA que não contém a região N-terminal (Δ NH₂-SRC1, deleção dos aminoácidos 1-906). Este fragmento, entretanto, contém tanto o domínio de interação com receptor quanto o domínio de interação com metiltransferases. O produto da reação foi processado de forma similar à descrita para a SmPRMT1, com exceção da utilização da enzima *PstI* no lugar da *XhoI* e de que o plasmídeo utilizado para a subclonagem foi o pQE 80L, da Qiagen.

A seqüência completa da SmSM-D3 foi amplificada utilizando-se como molde cDNA preparado a partir de mRNA extraído de vermes adultos de *S. mansoni*. Foram utilizados na reação os *primers* SmSM-D3-BamHI e SmSM-D3-HindIII, o que gerou um *amplicon* de 405 pb. O produto da reação foi processado de forma similar à descrita para a SmPRMT1, com exceção da utilização da enzima *HindIII* no lugar da *XhoI* e de que o plasmídeo utilizado para a subclonagem foi o pQE 80L, da Qiagen. A seqüência da SmSM-D3 foi depositada no GenBank sob o nº de aquisição [DQ086815](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/DQ086815).

A clonagem do cDNA da SMYB1 utilizado para a transcrição e tradução *in vitro* e a construção dos plasmídeos com as proteínas de fusão MPB-SMYB1 está esmiuçada por Valadão *et al.* (2002).

A seqüência parcial da SmLIMPETin foi amplificada utilizando-se como molde cDNA preparado a partir de mRNA extraído de vermes adultos de *S. mansoni*. Foram utilizados na reação os *primers* SmLIMPETin-*EcoRI* e SmLIMPETin-*XhoI*, o que gerou um *amplicon* de 639 pb. O produto da reação foi processado de forma similar à descrita para a SmPRMT1, com exceção da utilização da enzima *EcoRI* no lugar da *BamHI*.

Alíquotas de todos os clones foram enviadas para o seqüenciamento em ambos os sentidos, de forma a confirmar sua integridade (tópico 3.9).

3.18 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

O pré-inóculo em meio LB com o antibiótico adequado contendo as bactérias recombinantes era incubado durante a noite a 37° C em um volume de 50 mL e repicado pela manhã para um volume de 500 mL de LB com antibiótico em erlenmeyers de 2 L. Os erlenmeyers eram agitados a 37° C a 250 RPM durante aproximadamente 3 h até que o meio inoculado atingisse a O.D. de 1,0 (λ : 600 nm). A indução do promotor era feita acrescentando-se IPTG a uma concentração final de 500 μ M. O inóculo induzido era mantido sob agitação constante (225 RPM) a 30° C por 5 horas, em um *shaker* refrigerado a ar.

Após a indução, as bactérias eram precipitadas por centrifugação a 7.700 X g por 15 min. a 4° C em garrafas de 250 mL, em uma supercentrífuga refrigerada modelo Super T 21, da Sorvall. O pélete contendo as bactérias com a proteína recombinante era guardado a -70° C durante a noite ou até o processamento.

3.19 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Os péletes eram ressuspensos em um tampão contendo Na₂HPO₃ 100 mM e NaCl 500 mM. A amostra era sonicada 10 vezes durante 20 s na potência mínima para o rompimento da parede das bactérias. Em seguida, a amostra era centrifugada a 10.000 X g por 20 min. a 4° C e o sobrenadante solúvel recuperado. A purificação das proteínas recombinantes era feita por colunas de afinidade, sendo utilizadas a Glutathiona sepharose (Amersham) para as proteínas de fusão com GST e as colunas de níquel ProBond (Amersham) ou Hislink (Promega) para as proteínas com cauda de histidina.

As proteínas recombinantes purificadas eram fracionadas em SDS-PAGE a 12% e coradas por Coomassie Blue R-250. Todos os protocolos utilizados na purificação das proteínas recombinantes seguiram as especificações dos fabricantes das colunas, sendo efetuadas sempre a 4° C e na presença de inibidores de proteinase (usualmente, PMSF a 1 mM; TPCK a 150 µg/mL e benzamidina a 0,5 mM).

A descrição das proteínas recombinantes utilizadas neste trabalho, a nomenclatura utilizada ao longo do texto para referir-se a elas e os plasmídeos e sítios de restrição utilizados na clonagem estão descritos na Tabela 3.2.

3.20 ENSAIOS DE METILAÇÃO *IN VITRO*

Os ensaios de metilação *in vitro* eram realizados através da incubação de 1 µg das proteínas recombinantes MBP-SMYB1, MBP-CSD, MBP-tail, 6xhis-SmSM-D3 ou 0,2 µg dos peptídeos de N-terminal de histona (H3: ARTKQTARKSTGGKAPRKC; H4: SGRGKGGKGLGKGGAKRNRA) e 0,2 µg de um peptídeo utilizado como controle negativo (LIM: GGVTYKGNPWHKECFTCTCSKQLA), com 1 µg de GST ou GST-SmPRMT1 na presença de S-adenosil-L-[*metil*-³H]metionina (³H-SAM/³H-AdoMet) 7 µM em 30 µl de PBS 1X por 60 min. a 37° C.

As reações eram interrompidas pela adição de tampão de amostra com SDS, fervidas em banho-maria por 3 min. e fracionadas em um gel de SDS-PAGE a 15%, em uma cuba de eletroforese submarina modelo Mini-protean II, da Bio-Rad. Os géis eram então corados com Coomassie Blue R-250, descorados e fixados com solução de descoloração (metanol a 50%; HOAc a 10%) pelo tempo necessário. Em seguida, eram lavados 5X por 2 min. em H₂O destilada e submetidos à fluorografia, através da imersão por 1 h em uma solução de ácido salicílico 1 M. Posteriormente, eram imersos por 5 min. em uma solução de HOAc a 7%, glicerol a 10% e metanol a 7%, para evitar que o gel rachasse mediante secagem. Depois de secos em um sistema SpeedVac (Heto), eram expostos por pelo menos uma semana (15 dias, no caso do gel contendo os peptídeos) a um filme de raios X (Kodak), a -70° C. Em seguida, os filmes eram revelados.

3.21 SÍNTESE DE PROTEÍNAS POR TRANSCRIÇÃO E TRADUÇÃO *IN VITRO*

A síntese de proteínas por este método foi realizada utilizando-se o kit TNT Quick Couple Transcription/Translation System, da Promega, de acordo com as instruções do fabricante e utilizando [³⁵S]-metionina como substrato radioativo.

3.22 ENSAIOS DE INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA *IN VITRO* (*PULL-DOWN*)

1 µg das proteínas recombinantes purificadas (GST, GST-PRMT1, 6xhis-ΔNH₂-hSRC1, 6xhis-SmSM-D3) era incubado por pelo menos 2 h a 4° C em um microtubo de 1,5 mL contendo a resina glutationa sepharose (Amersham), no caso das proteínas fusionadas a GST ou com a resina ProBond (Amersham), no caso das proteínas com cauda de histidina, em PBS. Para manter as amostras em movimento era utilizada uma gangorra. A resina com a proteína já ligada era então lavada por três vezes com o tampão de *pull-down* (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5; NaCl 100 mM; glicerol a 10% e Nonidet P-40 a 0,15%). As reações de interação eram iniciadas através da adição de 5 µL das reações provenientes do sistema TNT, em 1 mL (volume final) de tampão de *pull-down*, e incubadas durante a noite a 4° C. A resina era então lavada por 3 vezes com o mesmo tampão e fervida em tampão de amostra com SDS. Em seguida, as amostras eram separadas por SDS-PAGE a 12% em uma cuba de eletroforese submarina modelo Mini-protean II, da Bio-Rad. Os géis eram então corados com Coomassie Blue R-250 e descorados com solução de descoloração (metanol a 50% e

HOAc a 10%). Posteriormente, eram imersos por 5 min. em uma solução de HOAc a 7%, glicerol a 10% e metanol a 7%, para evitar que o gel rachasse mediante secagem. Depois de secos em um sistema SpeedVac (Heto), eram expostos por pelo menos 1 h a uma tela sensível à radiação beta do Storm 860 (Molecular Dynamics). Após esta exposição, as telas eram lidas neste instrumento utilizando-se o *Storage Phosphor mode*, laser vermelho (λ : 635 nm) / 390 BP, à resolução de 200 pontos por cm. O arquivo resultante era analisado no programa ImageQuant versão 5.2 (Molecular Dynamics), no qual seu contraste e ganho eram ajustados. Logo em seguida os géis eram re-expostos a um filme de raios X (Kodak) por 1 semana a -70° C, sendo depois revelados – isto com o intuito de manter uma cópia do experimento em filme.

3.23 OBTENÇÃO DE EXTRATOS PROTÉICOS DE *S. MANSONI*

Os extratos totais protéicos eram obtidos após a maceração dos vermes (o equivalente a 500 μ L em volume) em um homogeneizador do tipo Potter, utilizando-se como tampão PBS 1X acrescido de inibidores de proteinase (usualmente, PMSF a 1 mM; TPCK a 150 μ g/mL e benzamidina a 0,5 mM), a 0° C. O macerado era centrifugado a 500 X g por 10 min. a 4° C. O sobrenadante protéico era recuperado, aliquotado e dosado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando-se o substrato Protein Assay Dye Reagent Concentrate, da Bio-Rad, de acordo com as instruções do fabricante. BSA purificada (Merk) diluída adequadamente, era utilizada como padrão de massa.

3.24 WESTERN BLOT

Todos os *western blots* realizados neste trabalho eram realizados da seguinte maneira: as amostras protéicas eram submetidas a um SDS PAGE a 12% em uma cuba de eletroforese submarina modelo Mini-protean II, da Bio-Rad. As proteínas do gel eram transferidas por 1 hora a 100 V para uma membrana de PVDF modelo Immobilon-P, da Millipore, pré ativada de acordo com as instruções do fabricante. A transferência era realizada em tampão Tris-base 24 mM; glicina 192 mM e metanol a 20%, a 4° C, em uma cuba de transferência submarina modelo Mini-protean II, da Bio-Rad. A membrana era bloqueada com uma solução de TBS 1X, Tween 20 a 0,05% e 5% p/v de leite em pó desnatado Molico® por 1h à temperatura ambiente e incubada com os anticorpos diluídos na proporção adequada a 4° C durante a noite. Em seguida era lavada 2 vezes por 15 min. e 1 vez por 5 min. em uma solução de TBS 1X e Tween 20 a 0,05% e incubada com os anticorpos secundários diluídos 1:10.000 por 1 h à temperatura ambiente. Em seqüência, era novamente lavada 2 vezes por 15 min. e 1 vez por 5 min. em uma solução de TBS 1X e Tween 20 a 0,05%. Por fim, a membrana era revelada por quimioluminescência utilizando-se o kit ECL da Amersham, de acordo com as intruções do fabricante.

3.25 ENSAIO DE DESLOCAMENTO DE MOBILIDADE ELETROFORÉTICA (EMSA) DE PROTEÍNAS NUCLEARES DE *S. MANSONI* COM OS OLIGONUCLEOTÍDEOS CONSENSO E MUTANTE DO CRE

Extratos enriquecidos em núcleo de *S. mansoni* eram preparados através da homogeneização a 4° C de aproximadamente 500 µL de vermes adultos em uma solução de sacarose 0,25 mM e Tris-Cl 5 mM pH 7.4 contendo inibidores de protease (usualmente, PMSF a 1 mM; TPCK a 150 µg/mL e benzamidina a 0,5 mM). O homogenato era centrifugado a 300 X g por 5 min a 4° C e o sobrenadante era transferido para novos tubos e recentrifugado a 1000 X g por 10 min. a 4° C. Em seguida, o sobrenadante era descartado e o pélete (P2) era ressuspensão na mesma solução (CUNHA, 1988). O extrato era então dosado pelo mesmo método descrito no tópico 3.23 e armazenado a -20° C até o momento do uso. Os oligonucleotídeos CRE consenso (5'-AGAGATTGCCTGACGTCAGAGAGCTAG-3') e seu oligonucleotídeo complementar, CRE mutante (5'-AGAGATTGCCTGTGGTCAGAGAGCTAG-3') e seu oligonucleotídeo complementar (BERHANE, 2001), eram diluídos (seus respectivos pares) a 10 µM cada em Tris-Cl 10 mM pH 7,5, MgCl₂ 10 mM e NaCl 50 mM, em 50 µL. Em seguida, eram aquecidos a 95° C por 5 min. na máquina de PCR (PTC-100, MJ Research), que era desligada em seguida, fazendo com que resfriassem lentamente até atingirem a temperatura ambiente, por 1 h. A reação de marcação com a enzima T4 polinucleotídeo cinase (T4 PNK, Promega) era preparada da seguinte forma:

- | | |
|--|-----------------|
| • Tampão 10X | 5 µL |
| • Oligonucleotídeo dupla-fita anelado (CREc ou CREm) | 1 µL |
| • [γ - ³² P]-dATP | p/ 50 µCi final |
| • T4 PNK | 2 µL |
| • H ₂ O | Q.S.P. 50 µL |

As reações eram incubadas por 1 h a 37° C e purificadas em colunas G-50 (SAMBROOK, 2001).

Os ensaios eram realizados através da incubação de 0,5 – 1,0 ng (10 X 10⁴ CPM) do respectivo par de oligonucleotídeos marcado, com 5 µg das amostras de extrato enriquecido em núcleo, em 20 µL do tampão de ligação (HEPES 13 mM pH 7,9; glicerol a 13%; KCl 5 mM; MgCl₂ 5 mM; DTT 1 mM; EDTA 1 mM e 1 µg de poli-(dI-dC), como competidor inespecífico) por 20 min. a 30° C. Os experimentos envolvendo competição eram realizados através da adição do excesso molar (40 X ou 400 X) do respectivo par de oligonucleotídeos não-marcado, em adição ao par marcado (BERHANE, 2001; MARGANA, 2000).

Em seguida, as amostras eram fracionadas em géis de poliacrilamida a 12 % em 0,5 X TBE por 1h e 30 min. – 2h, a 4° C. Os géis eram posteriormente secos em um sistema SpeedVac (Heto) e expostos por, pelo menos, 24 h a um filme de raios X (Kodak), a -70° C. Findo este período, os filmes eram revelados.

3.26 GERAÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-GST-SmLIMPETIN

O soro anti-SmLIMPETin foi obtido através da imunização de coelhos-fêmeas com 300µg da GST-SmLIMPETin, por injeção subcutânea desta proteína previamente

purificada e emulsionada com adjuvante de Freund completo (Gibco-BRL). A inoculação foi repetida utilizando-se 100 µg das proteínas recombinantes emulsificadas com adjuvante de Freund incompleto (Gibco-BRL) em 30 e 60 dias após a primeira inoculação. Foi retirado sangue dos coelhos-fêmeas 90 dias após a primeira inoculação. O soro foi purificado em uma coluna de proteína A-Sepharose (Pharmacia) de acordo com as instruções do fabricante, tendo sido as IgGs eluídas em glicina pH 3,0 e imediatamente neutralizadas para pH 7,0 através da adição do volume adequado de Tris-CL pH 9,0. Posteriormente, as IgGs foram incubadas com 5 µg de GST purificada ligada a GSH-Sepharose por 2h a 4° C, para que os anticorpos anti-GST ficassem seqüestrados, deixando as IgGs enriquecidas em anticorpos anti-SmLIMPETin. As IgGs específicas contra a GST-SmLIMPETin resultantes deste procedimento foram armazenada a 4° C até o uso.

3.27 IMUNOFLUORESCÊNCIA DE CORTES DE VERMES MACHOS COM ANTICORPOS ANTI-GST-SMLIMPETIN

O protocolo da imunofluorescência está descrito no Apêndice I.

Tabela 3.1 Seqüências dos *primers* utilizados neste trabalho.

(Folha seguinte) Também estão indicados a sua posição relativa na seqüência correspondente e o tamanho do *amplicon* amplificado pelo respectivo par. Os nucleotídeos sublinhados correspondem às seqüências de sítios de restrição.

<i>Primer</i>	Seqüência	Pos. na seq. de cDNA (nt)	Tamanho do amplicon (pb)
SmPRMT1-EST-F	5'-GGTGGGACAGCGGTGACGGC-3'	673 – 692	455
SmPRMT1-EST-R	5'-CGACGAAAGTTCTCCCTCG-3'	1109 – 1127	
SmPRMT1- <i>Bam</i> HI-F	5'-GGATCCATGAACGGGAAAAGTGG-3'	81 – 97	1092
SmPRMT1- <i>Xho</i> I-R	5'-CTCGACTCAGGCATACGATA-3'	1146 – 1160	
GAPDH-R	5'-TGGTGTGGGACGGGAAAG-3'	1032 – 1051	795
GAPDH-F	5'-GCTTGTGCCATCAGCGAAGTCA-3'	257 – 278	320
GAPDH-2R	5'-ATTGAGCCCGTCTTATCCCAC-3'	554 – 576	
SmSM-D3- <i>Bam</i> HI-F	5'-GGATCCCTCAGTTGGCATCCCTATCAAAG-3'	4 – 25	405
SmSM-D3- <i>Hind</i> III-R	5'-AAGCTTTCAAAACCCGTCGGTAGTCTT-3'	372 – 393	
hSRC1- <i>Bam</i> HI-F	5'-GGATCCAGTGTATTAGCTCACAATTAGATGAG-3'	2920 – 2946	1620
hSRC1- <i>Pst</i> I-R	5'-CTGCAGTATTACAGTCAGTAGCTGCTGAAGGA-3'	4502 – 4527	
SmLIMPETin-EST-F	5'-ATTTTGCATGTCATAGTTGTGATGT-3'	881 – 905	520
SmLIMPETin-EST-R	5'-TTGTATGTAACCTCCACCACGACGTA-3'	1376 – 1400	
SmLIMPETin- <i>Eco</i> RI	5'-GAATTCGAACAAGAACATCATACTGG-3'	859 – 878	639
SmLIMPETin- <i>Xho</i> I	5'-CTCGAGTTCATCTTTAGATGTG-3'	1470 – 1485	

Nomenclatura utilizada no texto	Descrição da proteína	Plasmídeo	Sítios de clonagem
GST-SmPRMT1	Seqüência integral da SmPRMT1 fusionada à GST	pGEX-4T-1	<i>Bam</i> HI / <i>Xho</i> I
³⁵ S-SmRXR1	Seqüência integral da SmRXR1 transcrita e traduzida <i>in vitro</i> e marcada com [³⁵ S]-metionina	pCITE-4a	<i>Nco</i> I / <i>Xho</i> I
6xhis-ΔNH ₂ -hSRC1	Seqüência N-terminal da SRC-1 humana fusionada a uma cauda de 6 histidinas	pQE-80L	<i>Bam</i> HI / <i>Pst</i> I
SMYB1- <i>full</i>	Seqüência integral da SmYB1 fusionada à MBP	pMAL-c2	<i>Eco</i> RI / <i>Pst</i> I
SMYB1-CSD	Seqüência do <i>cold shock domain</i> (CSD) da SmYB1 fusionada à MBP	pMAL-c2	<i>Eco</i> RI / <i>Pst</i> I
SMYB1- <i>tail</i>	Seqüência do cauda N-terminal (<i>tail</i>) da SmYB1 fusionada à MBP	pMAL-c2	<i>Eco</i> RI / <i>Pst</i> I
³⁵ S-SMYB1	Seqüência integral da SMYB1 transcrita e traduzida <i>in vitro</i> e marcada com [³⁵ S]-metionina	pCITE-4a	<i>Eco</i> RI / <i>Pst</i> I
6xhis-SmSM-D3	Seqüência parcial da SmSM-D3 fusionada a uma cauda de 6 histidinas	pQE-80L	<i>Bam</i> HI / <i>Hind</i> III
³⁵ S-SmSM-D3	Seqüência parcial da SmSM-D3 transcrita e traduzida <i>in vitro</i> e marcada com [³⁵ S]-metionina	pET-32a	<i>Bam</i> HI / <i>Hind</i> III
GST-SmLIMPETin	Seqüência parcial da SmLIMPETin fusionada à GST	pGEX-4T-1	<i>Eco</i> RI / <i>Xho</i> I

Tabela 3.2 Descrição das proteínas recombinantes utilizadas neste trabalho.

Estão também apresentados a nomenclatura correspondente, os plasmídeos nos quais os cDNAs foram clonados e os respectivos sítios de clonagem.

4 PARTE I: RESULTADOS

4.1 IDENTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA ARGININA *N*-METILTRANSFERASE 1 (PRMT1) DE *S. MANSONI*

4.1.1 AQUISIÇÃO DA SEQÜÊNCIA PARCIAL DA PRMT1 DE *S. MANSONI*

Considerando nosso interesse em isolar co-ativadores de receptores nucleares de *S. mansoni*, os bancos de dados de ESTs disponíveis à época foram escrutados à procura de seqüências características dessas proteínas. Em particular chamou-nos a atenção a seqüência do clone [SMFBE08](#) (Figura 4.1), disponível no TIGR *S. mansoni* Gene Index (SmGI) (MERRICK, 2003). Este clone de 663 pb apresentou uma alta homologia com proteínas da família das proteína arginina metiltransferases, em particular com a proteína arginina metiltransferase 1, ou PRMT1.

Este considerável grau de similaridade (62,2%) e de identidade (48,4%) pôde ser corroborado através do alinhamento de seqüência deduzida de aminoácidos (fase +1) deste clone com a seqüência de aminoácidos da PRMT1 humana isoforma 1 (Figura 4.2), utilizando-se o programa ClustalX (THOMPSON, 1997).

Levando-se em conta estes dados, foi concluído que este clone representava a seqüência parcial da PRMT1 de *S. mansoni*.

```

1 | M A D Y A K L E I N P H * R E Q K L E L H R G G G R S R T S | 29
1 | ATGGCTGACTACGCCAAGCTCGAAATTAACCTCACTAAAGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGCCCTCTAGAAGTAGT | 90

30 | G S P G L Q E F G T S G G I I M P D R A T L Y V C A I E D R | 59
91 | GGATCCCCCGGCTGCAGGAATTCGGCACGAGTGGTGGCATAATTATGCTGATCGTGCAACTCTGTATGTTTGTGCTATCGAAGATAGA | 180

60 | Q Y K D E K I N W W D S V Y G F D M S C I R K V A L T E P L | 89
181 | CAGTACAAAGATGAAAAATTAATTGGTGGGACAGCGTGTACGGCTTCGACATGAGTTGTATAAGGAAAGTTGCACCTACAGAACCTTTG | 270

90 | V D V V D P N Q V V T N C C L V K E V D M Y T I T V P E L T | 119
271 | GTTGATGTTGTTGATCCTAACCCAGGTTGTGACTAATTGCTGTTTAGTCAAGGAAGTGGACATGTACACTATCACAGTCCCCGAGTTAACA | 360

120 | F S A P F T L T C K R N D Y I Q A L V T F F N I D F T S C H | 149
361 | TTCAGTGCACCATTACACTTACCTGCAAAAGAAATGATTATATTCAAGCCTTGGTTACGTTTTTCAATATAGACTTCACTTCTTGCCAT | 450

150 | K P T G F S T G P D E R R Y T H W K Q T V F Y L D N G D D D | 179
451 | AAACCTACAGGATTTTCAACAGGTCCTGATGAGCGCCGTACACACATTGGAACAAACAGTTTTTTATCTTGATAATGGCGATGACGAC | 540

180 | C L T V K K G E Q I N G V M S I K P N E R N N R D L D I N I | 209
541 | TGTCTAACTGTCAAGAAAGGAGAACAAATTAATGGTGTGATGCTATTAAACCGAATGAACGAAATAACCGTGATCTTGATATCAACATC | 630

210 | K V E F E G E L S S I | 220
631 | AAAGTAGAATTCGAGGGAGAACTTTCGTCGATA | 663

```

Figura 4.1 Sequência de nucleotídeos e sequência deduzida de aminoácidos (fase +1) do clone SMFBE8.

Os números laterais correspondem à posição do nucleotídeo ou aminoácido adjacentes nas respectivas seqüências.

```

SMFBE08      1 | M A D Y A K L E I N P H * R E Q K L E L H R G -----G G R S R T S G S P G L | 34
PRMT1 humana 112 | M A D Y A V K I V K A N K L D H V V T I I K G K V E E V E L P V E K V D I I S E W M G Y C L F Y E S M L N T V L Y A R | 171

SMFBE08      35 | Q E F G T S G G I I M P D R A T L Y V C A I E D R Q Y K D E K I N W W D S V Y G F D M S C I R K V A L T E P L V D V V D | 94
PRMT1 humana 172 | D K W L A P D G L I F P D R A T L Y V T A I E D R Q Y K D Y K I H W W E N V Y G F D M S C I K D V A I K E P L V D V V D | 231

SMFBE08      95 | P N Q V V T N C C L V K E V D M Y T I T V P E L T F S A P F T L T C K R N D Y I Q A L V T F F N I D F T S C H K P T G F | 154
PRMT1 humana 232 | P K Q L V T N A C L I K E V D I Y T V K V E D L T F T S P F C L Q V K R N D Y V H A L V A Y F N I E F T R C H K R T G F | 291

SMFBE08      155 | S T G P D E R R Y T H W K Q T V F Y L D N G D D D C L T V K K G E Q I N G V M S I K P N E R N N R D L D I N I K V E F E | 214
PRMT1 humana 292 | S T S P E S P - Y T H W K Q T V F Y M E -----D Y L T V K T G E E I F G T I G M R P N A K N N R D L D F T I D L D F K | 346

SMFBE08      215 | G E L S S I | 220
PRMT1 humana 347 | G Q L C E L | 352

```

Figura 4.2 Alinhamento da sequência deduzida de aminoácidos do clone SMFBE08 com a seqüência parcial de aminoácidos da PRMT1 isoforma 1 humana (aa 112-352).

Os aminoácidos realçados em preto são idênticos e os realçados em cinza são similares. Os números laterais correspondem à posição dos aminoácidos adjacentes nas respectivas seqüências. O grau de similaridade entre as seqüências é de 62,2% e o grau de identidade é de 48,4%.

4.1.2 ISOLAMENTO DA SEQÜÊNCIA COMPLETA DA PRMT1 DE *S. MANSONI*

Tendo confirmado que a seqüência primária do clone SMFBE08 correspondia de fato a uma PRMT1, desenhamos um par de *primers* capazes de associarem-se às extremidades deste clone e o amplificamos por RT-PCR, utilizando cDNA de *S. mansoni* como molde.

Este *amplicon* foi utilizado como sonda para a varredura de uma biblioteca de cDNA de *S. mansoni* clonada no vetor Lambda-Zap II (Stratagene) e preparada a partir de mRNA de vermes machos e fêmeas adultos. Como resultado desta varredura, foram isolados vários clones e o maior deles, com aproximadamente 1500 pb, foi escolhido. O fagemídio correspondente a este clone foi excisado do bacteriófago utilizando-se o Rapid Excision Kit, da Stratagene, e inteiramente seqüenciado.

A seqüência completa da PRMT1 de *S. mansoni* foi depositada no GenBank sob o nº de aquisição [DQ068274](#) (Figura 4.3). Esta seqüência tem, descontada a cauda poliA, 1397 pb. Sua região 5' não-traduzida (5'UTR) tem 80 pb, sua Fase Aberta de Leitura (ORF) possui 1080 pb, codificando 359 aminoácidos, e sua região 3' não-traduzida (3'UTR) possui 237 bp. A Figura 4.4 ilustra estas características, além de destacar os domínios característicos de PRMTs – os motivos I, Post-I, II, III e *Loop* THW, além dos resíduos de glutamato conservados do *Loop* “duplo E” – todos presentes na seqüência deduzida de aminoácidos SmPRMT1.

LOCUS DQ068274 1397 bp mRNA Linear INV 14-JUN-2005
 DEFINITION Schistosoma mansoni protein arginine N-methyltransferase 1 (PRMT1)
 mRNA, complete cds.
 ACCESSION DQ068274
 VERSION DQ068274.1 GI:67107104
 KEYWORDS .
 SOURCE Schistosoma mansoni
 ORGANISM Schistosoma mansoni
 Eukaryota; Metazoa; Platyhelminthes; Trematoda; Digenea;
 Strigeidida; Schistosomatoidea; Schistosomatidae; Schistosoma.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1397)
 AUTHORS Mansure,J.J., Furtado,D.R., de Oliveira,F.M., Rumjanek,F.D.,
 Franco,G.R. and Fantappie,M.R.
 TITLE Cloning of an Arginine Methyltransferase PRMT1 Homolog from
 Schistosoma mansoni: Evidence for Roles in Nuclear Receptor
 Signaling and RNA Metabolism
 JOURNAL Biochem Biophys Res Commun. 335 (4) 1163-1172 (2005)
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1397)
 AUTHORS Mansure,J.J., Furtado,D.R., de Oliveira,F.M., Rumjanek,F.D.,
 Franco,G.R. and Fantappie,M.R.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (19-MAY-2005) Instituto de Bioquimica Medica,
 Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciencias da
 Saude, Ilha do Fundao, Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil
 FEATURES
 source 1..1397
 /organism="Schistosoma mansoni"
 /mol_type="mRNA"
 /strain="LE"
 /db_xref="taxon:6183"
 gene 1..1397
 /gene="PRMT1"
 /note="synonyms: HRMT1L2, HCP1, ANM1; SmPRMT1"
 5'UTR 1..80
 /gene="PRMT1"
 CDS 81..1160
 /gene="PRMT1"
 /codon_start=1
 /product="protein arginine N-methyltransferase 1"
 /protein_id="AAY67834.1"
 /db_xref="GI:67107105"
 /translation="MNGKSGAGDKNQCSPTSCESTTESSDMTSKDYFDSYAHFGIH
 EEMLKDEIRTLTYRSALIHKNHLVRDKVVLVDVGCGTAILCLFAIKAGAKHAIGIDCSN
 IIDRAMEVVRANNMADRITLIKGVVEEVELPPEYPKVDIVISEWMGYCLFYESMLNTV
 IYARDKWLAPGGIIMPDRATLYVCAIEDRQYKDEKINWWSVYGFDMSCIRKVALTEP
 LVDVVDPNQVVTNCCLVKEVDMYITVPELTF SAPFTLTCKRNDYIQALVTFNFIDFT
 SCHKPTGFSTGPDERRYTHWKQTVFYLDNGDDCLTVKKGEQINGVMSIKPNERNRD
 LDINIKVEFEGELSSIDTTFNYRMR"
 3'UTR 1161..1397
 /gene="PRMT1"
 polyA_signal 1375..1380
 /gene="PRMT1"
 polyA_site 1397
 /gene="PRMT1"
 ORIGIN
 1 actgataacg gcgcgtaacc aatagtaggt cgtcgcgcgt ggttgtcctg ttagtccttt
 61 gtcggtcgtt tcgtctcact atgaacggga aaagtggggc cgtgataaaa aatcagtggt
 121 ctccctagtag atcatgtgag tctaccactg aatcgtcaga tatgacctca aaggattact
 181 attttgactc atacgcgcat ttcggaattc atgaggaat gctaaaggat gaaattagaa
 241 cactcaccta ccgcagtgct ttaattcaca acaaacacct tgtaagagat aaggtagtgc
 301 ttgatgtagg ttgtggaacc gccatcctct gttgtttgc aattaaagcc ggggccaagc
 361 atgctattgg aattgactgt tctaacatta tcgaccgggc aatggaagtc gtccgagcta
 421 acaatatggc ggaccgtatc actctgatca aaggaaaagt agaagaggtg gaactacctc
 481 cagaataccc caaggttgac atagtcatca gtgaatggat gggttactgt ctttttacg
 541 agtcaatggt gaactactgt atttatgcta gagacaaatg gttggcactt ggtggcataa
 601 ttatgcctga tcgtgcaact ctgtatggtt gtgctatcga agatagacag tacaagatg
 661 aaaaaattaa ttggtgggac agcgtgtacg gcttcgacat gaggtagtata aggaaagtgt
 721 cacttacaga accttgggt gatgtgttg atcctaacca ggttgtgact aattgctgtt
 781 ttgtcaagga agtggacatg tacactatca cagtccccga gttaacattc agtgcaccat
 841 ttacacttac ctgcaaaaga aatgattata ttcaagcctt ggttacgttt tcaatatag
 901 acttcacttc ttgccataaa cctacaggat ttcaacagg tctctgatgag cgcgctaca
 961 cacattggaa acaaacagtt ttttatcttg ataattggca tgacgactgt ctaactgtca
 1021 agaaaggaga acaaatatgt ggtgtgatgt ctattaaacc gaatgaacga aataaccgtg
 1081 atcttgatat caacatcaaa gtagaattcg agggagaact ttcgtcgatc gacacaacgt
 1141 ttaactatcg tatgcgctga tttgtcgctc acgatcgttt gaattggatc gcaatcaaga
 1201 cttttaagag atctaacttc aaaaactttg ccttcaatgt acaatcttgc tctgaacagc
 1261 atttaattat gttttaatcc gctagattta tcagggcatt ttcttcgctc ttatgaattc
 1321 gttcccctgt gtgtgtatta ttccgtctta cattgttttt atggtggatt ttccaataaa
 1381 atagataaat gaccttc

//

Figura 4.3 Arquivo do GenBank contendo a seqüência integral depositada da SmPRMT1. (Folha anterior).

1	ACTGATAACGGCGCGTAACCAATAGTAGGTCGTCGCGCGTGGTTGTCTCTGTTAGTCCTTTGTCGGTCGTTTCGTCTCACT	M N G	3
1		<u>ATGAACGGG</u>	89
4	K S G A G D K N Q C S P S T S C E S T T E S S D M T S K D Y		33
90	<u>AAAAGTGGGGCCGGTGATAAAAATCAGTGTTCCTCTAGTACATCATGTGAGTCTACCCTGAAATCGTCAGATATGACCTCAAAGGATTAC</u>		179
34	Y F D S Y A H F G I H E E M L K D E I R T L T Y R S A L I H		63
180	<u>TATTTGACTCATACGCGCATTTCGGAATTCATGAGGAATGCTAAAGGATGAAATTAGAACACTCACCTACCGCAGTGCTTTAATTCAC</u>		269
64	N K H L V R D K V	<u>I</u> V L D V G C G T A	93
270	<u>AACAAACACCTTGTAAGAGATAAGGTAGTGTGATGTAGGTTGTGGAACCGCCATCCTCTGTTTGTTCGAATTAAGCCGGGGCCAAAG</u>		359
94	H	<u>Post-I</u> A I G I D	123
360	<u>CATGCTATTGGAATTGACTGTTCTAACATTATCGACCGGGCAATGGAAGTCGTCGGAGCTAACAAATATGGCGGACCGTATCACTCTGATC</u>		449
124	K G K V E E V E L P P E Y	<u>II</u> P K V D I V I S	153
450	<u>AAAGGAAAAGTAGAAGAGGTGGAACCTACCTCCAGAATACCCAAAGGTTGACATAGTCATCAGTGAATGGATGGGTTACTGTCTTTTTTAC</u>	†	539
154	E S M L N T V I Y A R D	<u>III</u> K W L A P G G I I M P	183
540	<u>GAGTCAATGTTGAATACTGTTATTTATGCTAGAGACAAATGGTTGGCAGCTGGTGCATAAATTATGCCTGATCGTCAACTCTGTATGTT</u>	†	629
184	C A I E D R Q Y K D E K I N W W D S V Y G F D M S C I R K V		213
630	<u>TGTGCTATCGAAGATAGACAGTACAAAGATGAAAAAATAATTGGTGGGACAGCGTGTACGGCTTCGACATGAGTTGTATAAGGAAAGTT</u>		719
214	A L T E P L V D V V D P N Q V V T N C C L V K E V D M Y T I		243
720	<u>GCACTTACAGAACCCTTTGGTTGATGTTGTTGATCCTAACCCAGGTTGTGACTAATTGCTGTTTGTAGTCAAGGAAAGTGGACATGTACACTATC</u>		809
244	T V P E L T F S A P F T L T C K R N D Y I Q A L V T F F N I		273
810	<u>ACAGTCCCGAGTTAACATTTCAGTGCACCATTTACACTTACCTGCAAAAAGAAATGATTATTTCAAGCCTTGGTTACGTTTTTCAATATA</u>		899
274	D F T S C H K P T G F S T G P D E R R Y	<u>Loop THW</u> T H W K Q	303
900	<u>GACTTCACTTCTTGCCATAAACCTACAGGATTTTCAACAGGTCCTGATGAGCGCCGCTACACACATTGGAAAACAAACAGTTTTTTATCTI</u>		989
304	D N G D D D C L T V K K G E Q I N G V M S I K P N E R N N R		333
990	<u>GATAATGGCGATGACGACTGTCTAACTGCAAGAAAGGAGAACAATAATGGTGTGATGTCATTAACCGAATGAACGAAATAACCGT</u>		1079
334	D L D I N I K V E F E G E L S S I D T T F N Y R M R *		359
1080	<u>GATCTTGATATCAACATCAAAGTAGAATTCGAGGGAGAACITTCGTCGATCGACACAACGTTTAACTATCGTATGCGCTGA</u> TTTGTCTCGCT		1169
1170	CACGATCGTTTGAATTGGATCGCAATCAAGACTTTTAAAGAGATCTAACTTCAAATCTTTGCCTTCAATGTACAATCTTGTCTGAACAG		1259
1260	CATTTAATTATGTTTTAATCCGCTAGATTTATCAGGGCATTTCCTTCGCTCTTATGAATTCGTTCCCTGTGTGTATTATCCGCTCT		1349
1350	ACATTGTTTTATGGTGGATTTTCC ATAAAA ATAGATAAATGACCTTC		1397

Figura 4.4 Seqüência integral de nucleotídeos do mRNA e seqüência integral deduzida de aminoácidos da SmPRMT1.

Os números laterais correspondem à posição na seqüência do nucleotídeo adjacente ou aminoácido adjacente. A fase aberta de leitura está sublinhada e os códons de início e de terminação, duplamente sublinhados. Os aminoácidos estão centralizados sobre seus respectivos códons, assim como o asterisco, indicativo do códon de terminação. A 5'UTR e a 3'UTR estão em cinza. O sinal de poli-adenilação está em negrito. Os motivos com sete folhas- β de assinatura da PRMT1, assim como o *Loop THW*, conservado nas PRMTs, estão indicados por caixas (ver Figura 1.17). Os resíduos de glutamato conservados do *Loop "duplo E"* estão indicados por cruzes.

4.1.3 HOMOLOGIA DA SmPRMT1 COM PRMTs1 DE OUTRAS ESPÉCIES

Estando com a sequência completa de mRNA da SmPRMT1 em mãos, era necessário confirmar sua classificação como uma PRMT1.

Para isso, foi calculado o alinhamento da sequência primária deduzida de aminoácidos da SmPRMT1 (nº. de aquisição do GenBank [AAAY67834](#)) com PRMTs1 de doze outras espécies, empregando-se o programa AlignX, da suíte de aplicativos Vector NTI Advance 10 (Invitrogen). Este programa utiliza o algoritmo ClustalW (MYERS, 1988).

A Figura 4.5 mostra que a SmPRMT1 apresenta um alto grau de homologia com as PRMTs1 de outras espécies. O maior grau de identidade (68,7%) ocorreu entre a SmPRMT1 e a PRMT1 de Zebrafish e de *Xenopus tropicalis*. O maior grau de similaridade (80,6%) ocorreu entre a SmPRMT1 e a PRMT1 de *X. tropicalis*.

Na Tabela 4.1 estão listadas as percentagens de similaridade e de identidade entre a SmPRMT1 e as PRMTs1 incluídas no alinhamento da Figura 4.5.

Para esmiuçar ainda mais a filogenia da SmPRMT1, foi construída uma árvore filogenética com membros de sete das oito famílias de PRMTs, a partir de um alinhamento múltiplo também construído com o programa AlignX. Para calcular a reconstrução de filogenia foi utilizado o programa MEGA 3.1 (KUMAR, 2004). Utilizou-se o método de *neighbor-joining* e os gaps foram tratados como deleções completas. A matriz PAM de Dayhoff (DAYHOFF, 1978) foi utilizada como modelo de substituição.

A Figura 4.6 mostra que a SmPRMT1 está claramente agrupada com os outros membros do grupo das PRMTs1.

<i>S. mansoni</i>		
	Identidade	Similaridade
Levedura (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	49,0	65,7
<i>Caenorhabditis briggsae</i>	60,4	76,7
<i>Caenorhabditis elegans</i>	57,4	71,3
<i>Dictyostelium discoideum</i>	55,3	68,8
<i>Drosophila melanogaster</i>	64,6	75,8
Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	68,7	80,2
<i>Xenopus laevis</i>	64,3	76,6
<i>Xenopus tropicalis</i>	68,7	80,6
Camundongo (<i>Mus musculus</i>)	64,3	76,9
Rato (<i>Rattus norvegicus</i>)	64,3	77,4
Vaca (<i>Bos taurus</i>)	64,6	77,4
Humano (<i>Homo sapiens</i>)	64,8	76,6

Tabela 4.1 Tabela com valores de identidade e similaridade entre a PRMT1 de *S. mansoni* (SmPRMT1) e as PRMTs1 incluídas no alinhamento da Figura 4.5.

Valores em percentagem, considerando somente o alinhamento do 1º ao último resíduo em consenso. Calculada com o algoritmo ClustalW (THOMPSON, 1997), utilizando-se alinhamentos pareados. Os valores de identidade e similaridade mais altos encontram-se em negrito.

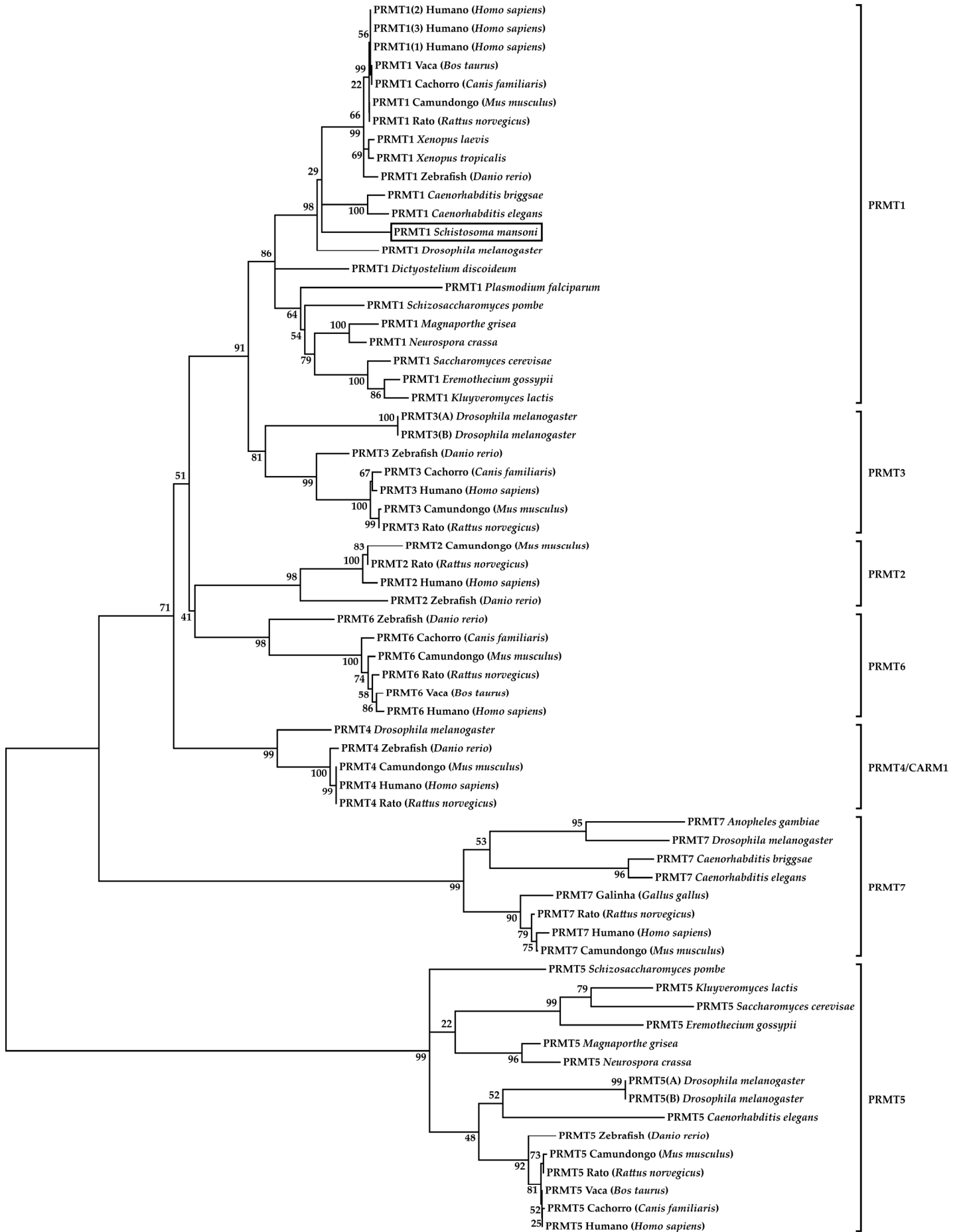
1	<i>S. mansoni</i>	140	160	180	200	220	240	260	108
1	<i>Levedura</i>	140	160	180	200	220	240	260	108
1	<i>C. briggsae</i>	140	160	180	200	220	240	260	97
1	<i>C. elegans</i>	140	160	180	200	220	240	260	98
1	<i>D. discoideum</i>	140	160	180	200	220	240	260	101
1	<i>D. melanogaster</i>	140	160	180	200	220	240	260	97
1	Zebra fish	140	160	180	200	220	240	260	130
1	<i>X. laevis</i>	140	160	180	200	220	240	260	97
1	<i>X. tropicalis</i>	140	160	180	200	220	240	260	125
1	Camundongo	140	160	180	200	220	240	260	99
1	Rato	140	160	180	200	220	240	260	127
1	Vaca	140	160	180	200	220	240	260	109
1	Humano	140	160	180	200	220	240	260	109
1		140	160	180	200	220	240	260	117
109	<i>S. mansoni</i>	280	300	320	340	360	380	400	237
98	<i>Levedura</i>	280	300	320	340	360	380	400	224
99	<i>C. briggsae</i>	280	300	320	340	360	380	400	228
102	<i>C. elegans</i>	280	300	320	340	360	380	400	231
98	<i>D. discoideum</i>	280	300	320	340	360	380	400	224
131	<i>D. melanogaster</i>	280	300	320	340	360	380	400	259
98	Zebra fish	280	300	320	340	360	380	400	224
126	<i>X. laevis</i>	280	300	320	340	360	380	400	224
100	<i>X. tropicalis</i>	280	300	320	340	360	380	400	226
128	Camundongo	280	300	320	340	360	380	400	254
110	Rato	280	300	320	340	360	380	400	236
110	Vaca	280	300	320	340	360	380	400	236
118	Humano	280	300	320	340	360	380	400	244
238	<i>S. mansoni</i>	420	440	460	480	500	520	540	359
225	<i>Levedura</i>	420	440	460	480	500	520	540	348
229	<i>C. briggsae</i>	420	440	460	480	500	520	540	345
232	<i>C. elegans</i>	420	440	460	480	500	520	540	348
225	<i>D. discoideum</i>	420	440	460	480	500	520	540	341
260	<i>D. melanogaster</i>	420	440	460	480	500	520	540	376
225	Zebra fish	420	440	460	480	500	520	540	341
235	<i>X. laevis</i>	420	440	460	480	500	520	540	369
227	<i>X. tropicalis</i>	420	440	460	480	500	520	540	343
255	Camundongo	420	440	460	480	500	520	540	371
227	Rato	420	440	460	480	500	520	540	353
237	Vaca	420	440	460	480	500	520	540	353
237	Humano	420	440	460	480	500	520	540	361

Figura 4.5 Alinhamento da seqüência deduzida de aminoácido da SmPRMT1 com as seqüências de aminoácidos das PRMTs1 de 12 outras espécies.

(Folha anterior) A SmPRMT1 (*S. mansoni*, nº de aquisição do GenBank [AAAY67834](#)) foi alinhada com a PRMT1 de: *Saccharomyces cerevisiae* (Levedura, nº de aquisição do GenBank [NP_009590](#)), *Caenorhabditis briggsae* (*C. briggsae*, nº de aquisição do GenBank [CAE67422](#)), *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*, nº de aquisição do GenBank [NP_507909](#)), *Dictyostelium discoideum* (*D. discoideum*, nº de aquisição do GenBank [XP_635288](#)), *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*, nº de aquisição do GenBank [NP_650017](#)), *Danio rerio* (Zebrafish, nº de aquisição do GenBank [NP_956944](#)), *Xenopus laevis* (*X. laevis*, nº de aquisição do GenBank [BAC53990](#)), *Xenopus tropicalis* (*X. tropicalis*, nº de aquisição do GenBank [AAH74614](#)), *Mus musculus* (Camundongo, nº de aquisição do GenBank [NP_062804](#)), *Rattus norvegicus* (Rato, nº de aquisição do GenBank [NP_077339](#)), *Bos taurus* (Vaca, nº de aquisição do GenBank [NP_001015624](#)) e *Homo sapiens* (Humano, nº de aquisição do GenBank [NP_001527](#)) utilizando-se o algoritmo de alinhamento múltiplo ClustalW (THOMPSON, 1997). Os resíduos 100% idênticos estão realçados em preto, os 80% idênticos em cinza escuro e os 60% idênticos em cinza claro.

Figura 4.6 Árvore filogenética sem raiz deduzida a partir do alinhamento de 7 famílias de PRMTs (PRMT1 – PRMT7).

(Folha seguinte). A árvore sem raiz foi criada utilizando-se o método de *neighbor-joining*. Os números presentes nas ramificações denotam a porcentagem das 1000 réplicas de *bootstrap*. A PRMT1 de *S. mansoni* (SmPRMT1) está destacada por uma caixa.



4.2 O mRNA DA SMPRMT1 É EXPRESSO CONSTITUTIVAMENTE EM ESQUISTOSSOMOS ADULTOS

Como já foi discutido na introdução, esquistossomos são helmintos que têm como característica particular o fato de apresentarem um dimorfismo sexual bem definido. Além disso, as fêmeas dependem do contato com um verme macho para serem capazes de atingir sua maturidade sexual.

Tomando em conta estas características, era essencial investigar o nível de expressão do mRNA da SmPRMT1 em machos e fêmeas provenientes de infecções unissexuais – os quais, portanto, não haviam atingido sua maturidade sexual; e em machos e fêmeas provenientes de infecções mistas – os quais, por sua vez, por terem vivido em cópula constante no hospedeiro definitivo, haviam atingido evidentemente sua maturidade sexual.

Como ferramenta para comparar os níveis de expressão do mRNA entre estes indivíduos foi utilizada a técnica da RT-PCR semi-quantitativo radioativo, utilizando-se os *primers* específicos SmPRMT1-EST-F e SmPRMT1-EST-R e os *primers* constitutivos GAPDH-F e GAPDH-R (Tabela 3.1).

A Figura 4.7 mostra que o mRNA da SmPRMT1 está presente em quantidades equivalentes tanto em machos e fêmeas provenientes de infecções unissexuais quanto em machos e fêmeas provenientes de infecções mistas.

Este resultado sugere que a SmPRMT1 tem um papel central no metabolismo do *S. mansoni*, por estar constitutivamente expressa nos dois sexos deste organismo.

De fato, se houver alguma diferença na atividade de metiltransferase entre os sexos e/ou entre os estágios de desenvolvimento e maturação sexual dos parasitos, é bem provável que estas diferenças sejam provenientes da modulação transiente da atividade da SmPRMT1, ou de eventos pós-transcricionais. Variações na expressão do mRNA, por conseguinte, não seriam necessárias para promover estas diferenças.

Empregando este raciocínio, não era esperado que houvesse diferenças em outros estágios do parasito, o que, somado às dificuldades técnicas inerentes à obtenção de RNA total destes outros estágios, levou a que estes estágios não fossem testados.

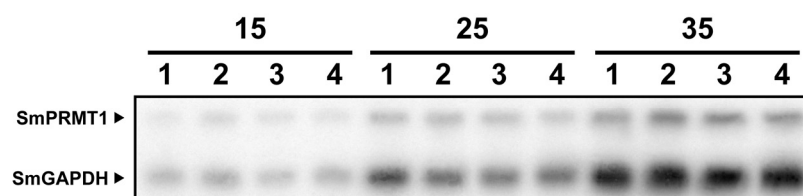


Figura 4.7 Expressão do mRNA da SmPRMT1 em machos e fêmeas adultos maduros e imaturos determinada por RT-PCR semi-quantitativo.

As pistas 1 e 2 correspondem, respectivamente, a machos adultos maduros e fêmeas adultas maduras mecanicamente separados. As pistas 3 e 4 correspondem, respectivamente, a machos adultos imaturos e fêmeas adultas imaturas recuperados de infecções unissexuais (descritos no tópico 3.2). Os números acima de cada série correspondem ao ciclo da PCR no qual as amostras foram retiradas. A linha superior corresponde aos *amplicons* da SmPRMT1; a inferior, aos *amplicons* da SmGAPDH, o controle constitutivo. Os detalhes da técnica encontram-se descritos no tópico 3.10.

4.3 ANÁLISE DO GENE DA SmPRMT1 POR SOUTHERN BLOT

Para delinear o perfil genômico da SmPRMT1, foi realizada uma hibridação por *southern blot*, utilizando-se como sonda um *amplicon* de RT-PCR derivado da seqüência completa de *mRNA* da SmPRMT1.

A Figura 4.8 exibe um padrão de bandas que permite diferentes interpretações. Pode-se sugerir, por exemplo, que o gene da SmPRMT1 tem múltiplas cópias no genoma.

O fato de haver oito membros atualmente descritos na família das PRMTs, pode explicar esta grande quantidade de bandas, se for considerado que o *S. mansoni* deve possuir em seu genoma outros membros desta família. Se presentes, estes membros podem haver hibridado com a sonda da SmPRMT1 com menos afinidade, o que poderia explicar a menor intensidade das bandas na auto-radiografia.

De fato, o dendrograma da Figura 4.6 mostra que existe uma grande proximidade filogenética entre os membros do grupo da PRMT1 e membros de outros grupos de PRMTs, o que apóia a hipótese de hibridação cruzada.

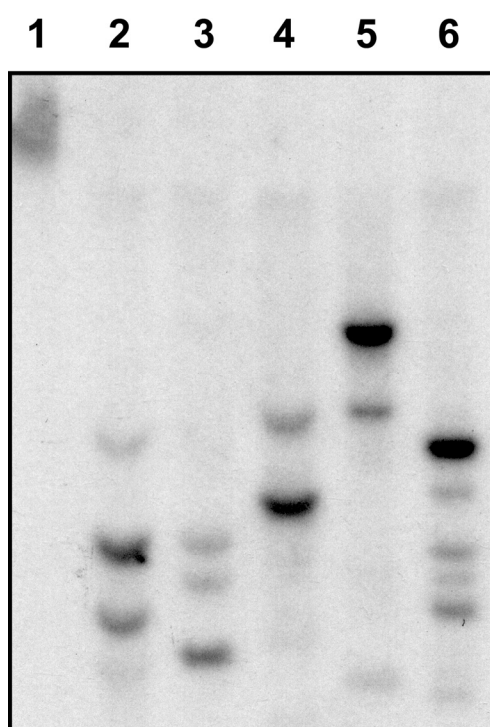


Figura 4.8 *Southern blot da SmPRMT1*

1 – DNA não digerido. 2 – *EcoRI*. 3 – *HindIII*. 4 – *EcoRV*. 5 – *PstI*. 6 – *BamHI*. Todas as amostras continham 10 μg de DNA. A membrana foi hibridada com ^{32}P -SmPRMT1, conforme descrito no t3.15.

4.4 A SmPRMT1 METILA A HISTONA H4 ESPECIFICAMENTE

As proteínas do grupo da PRMT1 são metiltransferases canônicas para a histona H4, transferindo o grupamento metila da *S*-adenosil-L-metionina (SAM/AdoMet) para a arginina 3 da histona H4 (STRAHL, 2001; WANG, 2001). Esta atividade, responsável por seu papel de moduladoras da expressão gênica, é de extrema importância para o fluxo do mecanismo de ativação transcricional.

Por este motivo, era fundamental que fosse comprovado que a SmPRMT1 apresenta atividade de histona metiltransferase.

Para tal, a SmPRMT1 foi, primeiramente, subclonada em um vetor de expressão em *Escherichia coli*, o pGEX-4T-1, utilizando os sítios para as enzimas *Bam*HI e *Xho*I. O mapa deste plasmídeo está representado na Figura 3.1.

O pGEX-4T-1-SmPRMT1 foi inserido por transformação em bactérias eletrocompetentes *E. coli* cepa BL21-DE3, as quais foram induzidas por 5 horas a 30° C com IPTG a 0,5 mM, lisadas e processadas. O extrato processado foi passado em uma coluna de glutationa Sepharose® (Amersham Biosciences) e, após ligação e lavagens, a GST-SmPRMT1 purificada foi eluída.

O mesmo procedimento foi repetido para o pGEX-4T-1 sem inserto, o que permitiu que a GST purificada fosse obtida.

Ambas as proteínas foram incubadas com cada um dos seguintes peptídeos sintéticos: o n-terminal da histona H3, o n-terminal da histona H4 e parte do 5º domínio LIM da LIMPETin de *S. mansoni* (Figura 5.6, aa 451-475), que foi utilizado

como um controle negativo, por não conter argininas. Como substrato para a reação, foi utilizada a *S*-adenosil-L-[*metil*- ^3H] metionina ($^3\text{H-SAM}/^3\text{H-AdoMet}$).

O resultado deste experimento pode ser observado na Figura 4.9. Claramente, somente o n-terminal da histona H4 foi metilado, o que demonstra a atividade de metiltransferase da GST-SmPRMT1 e mais – que sua atividade de histona metiltransferase é específica para histona H4.

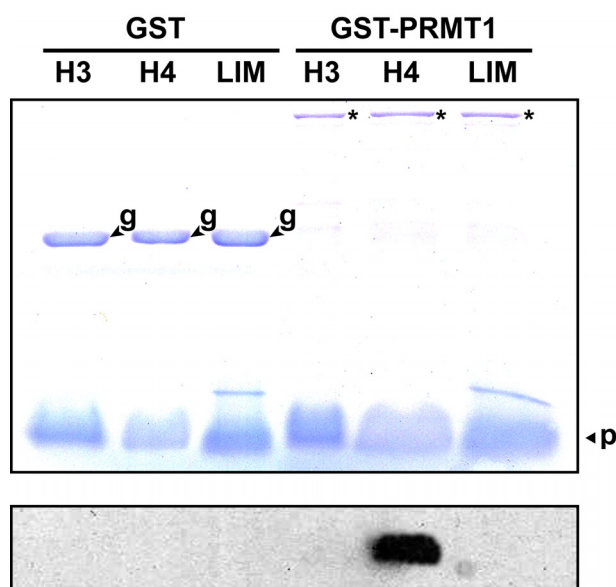


Figura 4.9 Metilação *in vitro* da histona H4 pela SmPRMT1.

Os ensaios de metilação foram realizados utilizando-se 0,2 μg dos peptídeos sintéticos baseados nas regiões N-terminal da histona H4 e da histona H3, além de um peptídeo controle sem arginina (LIM), como substratos para a metilação. A GST e GST-SmPRMT1 foram incubadas com os substratos e $^3\text{H-SAM}/^3\text{H-AdoMet}$. As pistas 1, 2 e 3 contêm, respectivamente, GST incubada com o peptídeo n-terminal da histona H3, com o peptídeo n-terminal da histona H4 e com o peptídeo correspondente a parte do 5º domínio LIM da SmLIMPETin (Figura 5.6, aa 451-475). As pistas 4, 5 e 6 contêm, respectivamente, SmPRMT1 incubada com o peptídeo n-terminal da histona H3, com o peptídeo n-terminal da histona H4 e com o peptídeo correspondente a parte do 5º domínio LIM da SmLIMPETin. A figura inferior mostra que somente a histona H4 foi metilada pela SmPRMT1. A GST-SmPRMT1(*), a GST (g) e os peptídeos (p) estão indicados no gel corado por Coomassie Blue R-250. Detalhes do procedimento experimental estão descritos no tópico 3.20.

4.5 A SMPRMT1 INTERAGE FISICAMENTE COM O CO-ATIVADOR SRC-1

Os co-ativadores secundários, tais como as proteínas da família da PRMT1 e a PRMT4/CARM1, estão envolvidos com o processo de ativação transcricional mediada por receptores nucleares. Estas proteínas, entretanto, não são capazes de interagir diretamente com os receptores nucleares, necessitando da intermediação de co-ativadores primários. Elas interagem, mais especificamente, com o domínio AD2 dos co-ativadores da família p160 (LEE, 2002).

Um exemplo de co-ativador primário pertencente a esta família é o SRC-1. A Figura 4.10 exemplifica o modo de interação usual e bem estabelecido através do qual o complexo entre co-ativadores primários, secundários e receptores nucleares é montado no núcleo, tanto de vertebrados como de invertebrados.

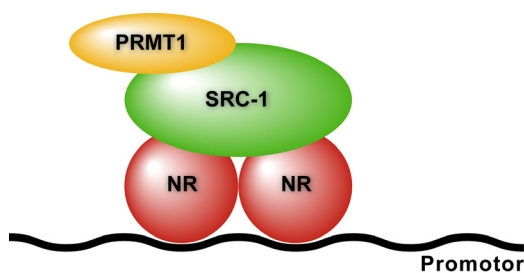


Figura 4.10 Esquema representando o modelo de interação entre co-ativadores primários (SRC-1), co-ativadores secundários (PRMT1) e receptores nucleares (NR).

Repare-se a organização em dímeros dos receptores nucleares.

Para montar um quadro mais completo do papel da SmPRMT1 na ativação da transcrição mediada por receptores nucleares foram realizados experimentos de *pull-down in vitro*, os quais demonstraram que a SmPRMT1 é capaz de associar-se indiretamente com receptores nucleares, através de sua interação com a SRC-1. Como modelo de receptor nuclear, foi escolhido o SmRXR1, um receptor de ácido retinóico de *S. mansoni* (DE MENDONÇA, 2000b; FANTAPPIÉ, 2001; FREEBERN, 1999b).

O resultado da Figura 4.11A demonstra que a SmPRMT1 não interage diretamente com a SmRXR1 já que, ao incubarem-se a GST-SmPRMT1 imobilizada em microesferas de glutationa-Sepharose com a ^{35}S -SmRXR1, não foi observada nenhuma ligação (pista 3). A GST sozinha imobilizada em microesferas de glutationa-Sepharose também não interagiu com a ^{35}S -SmRXR1. O esquema da Figura 4.11B ilustra esta situação.

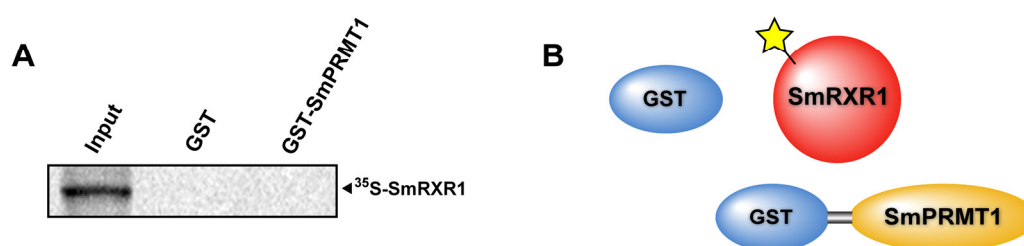


Figura 4.11 Ensaio de interação *in vitro* entre a GST-SmPRMT1 e o ^{35}S -SmRXR1.

(A) O ^{35}S -SmRXR1 foi incubado com GST (pista 2) ou GST-SmPRMT1 (pista 3) imobilizados em uma resina de glutationa-sepharose. Pode-se observar que não ocorreu interação entre as proteínas. A pista 1 (Input) representa 20% do total de ^{35}S -SmRXR1 incubado inicialmente em cada um dos ensaios. (B) Esquema ilustrando o resultado observado no experimento. A estrela amarela indica a marcação por [^{35}S]-metionina.

A SmRXR1, entretanto, foi capaz de interagir com a SRC-1 humana (que contém o motivo LXXLL) já que, quando a 6xhis- Δ NH₂-hSRC1 foi imobilizada em microesferas de Ni²⁺-agarose e incubada com a ³⁵S-SmRXR, foi detectada ligação entre as duas (Figura 4.12A). A interação inespecífica da ³⁵S-SmRXR com as microesferas de Ni²⁺-agarose, praticamente inexistente, pode ser observada na pista 2. A Figura 4.12B ilustra a interação entre a ³⁵S-SmRXR1 e a 6xhis- Δ NH₂-hSRC1.

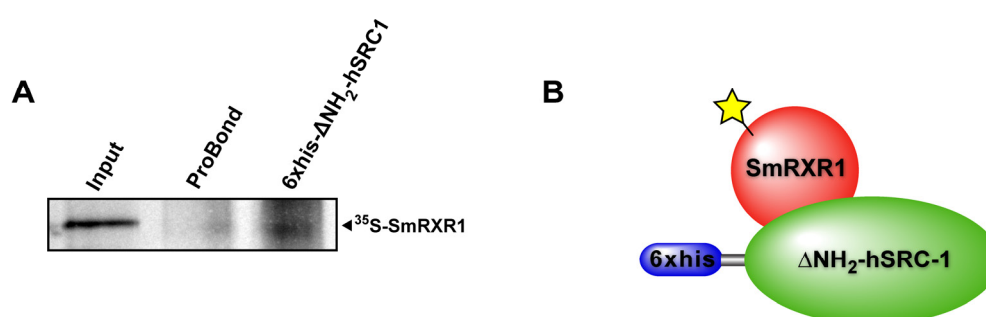


Figura 4.12 Ensaio de interação *in vitro* entre a 6xhis- Δ NH₂-hSRC1 e o ³⁵S-SmRXR1.

(A) O ³⁵S-SmRXR1 foi incubado somente com a resina de Ni²⁺ ProBond (pista 2) ou com a 6xhis- Δ NH₂-hSRC1 (pista 3) imobilizada nesta resina. As proteínas ligadas à resina foram analisadas por SDS-PAGE e auto-radiografia. A pista 1 (Input) representa 20% do total de ³⁵S-SmRXR1 incubado inicialmente em cada um dos ensaios. (B) Esquema ilustrando o resultado observado no experimento. A estrela amarela indica a marcação por [³⁵S]-metionina.

Por fim, a SmPRMT1 é capaz de interagir diretamente com a SRC-1 humana (que contém domínio de ligação à PRMT1 AD2) visto que, quando a GST-SmPRMT1 foi imobilizada em microesferas de glutathiona-Sepharose e incubada com a 6xhis- Δ NH₂-hSRC1, a interação entre elas pôde ser claramente detectada através de *immuno blot* com um anticorpo monoclonal anti-poli-histidina (Figura 4.13A, pista 2). A ausência de interação entre a GST sozinha imobilizada em microesferas de glutathiona-Sepharose e incubada com a 6xhis- Δ NH₂-hSRC1 pode ser concluída pela ausência de sinal na pista 1 da Figura 4.13A.

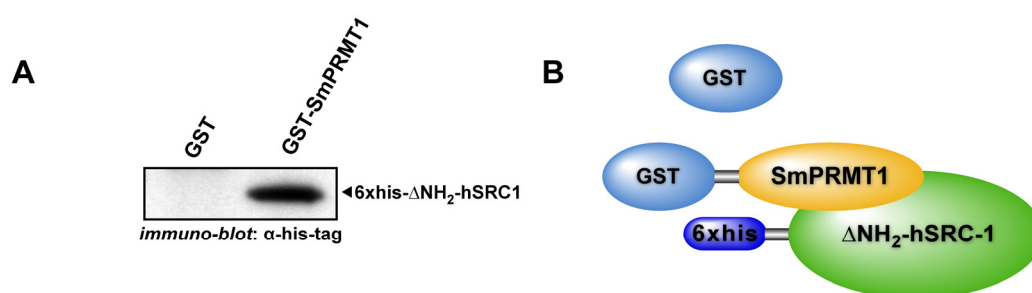


Figura 4.13 Ensaio de interação *in vitro* entre a GST-SmPRMT1 e a 6xhis- Δ NH₂-hSRC1.

(A) O 6xhis- Δ NH₂-hSRC1 foi incubada com GST (pista 1) ou GST-SmPRMT1 (pista 2) imobilizados em uma resina de glutathiona-sepharose. As proteínas ligadas à resina foram analisadas por *immuno-blot* utilizando-se um anticorpo monoclonal anti-histidina. (B) Esquema ilustrando o resultado observado no experimento.

4.6 A SMPRMT1 METILA PROTEÍNAS LIGADORAS DE RNA

Além da sua atividade como histona arginina metiltransferase específica para a histona H4, a PRMT1 é também capaz de metilar substratos diversos da mesma, tais como as proteínas de ligação a RNA, cujas argininas passíveis de metilação encontram-se em domínios específicos denominados *boxes* RGG que, por sua vez, são sempre formados por motivos ricos em glicina e arginina (motivos GAR^{sss}). Portanto, visando a ampliar mais ainda a caracterização do leque de atuação da SmPRMT1, foi examinada a sua capacidade de metilar duas proteínas de ligação a RNA de *S. mansoni* previamente caracterizadas. Foram elas: a SMYB1 (FRANCO, 1997; VALADÃO, 2002), que contém 9 motivos GAR, dos quais 4 contêm tripeptídeos RGG, e a suposta SmSM-D3 (FRANCO *et al.*, não-publicado), que contém 9 motivos GAR. Estas proteínas foram escolhidas porque são representativas das proteínas de

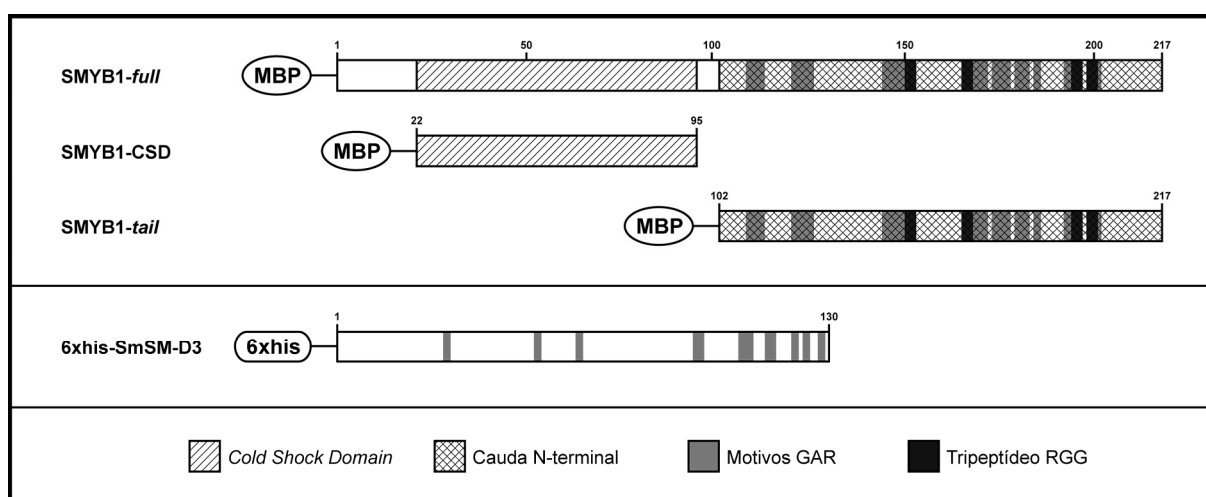


Figura 4.14 Diagramas dos construtos da SMYB1 e da 6xhis-SmSM-D3 indicando seus domínios.

Os diagramas estão em escala (0,5 mm/aminoácido), com exceção das proteínas de fusão e do polipeptídeo de fusão (MBP e 6xhis, respectivamente). Os números indicam a posição do aminoácido na seqüência protéica.

^{sss} Em inglês: *glycine and arginine-rich motifs*.

ligação a RNA do *S. mansoni*. A Figura 4.14 contém diagramas descritivos dos construtos da SMYB1 e da 6xhis-SmSM-D3 com indicações das posições relativas dos seus respectivos motivos.

O resultado da Figura 4.15A mostra que a SMYB1-*full* é fortemente metilada pela SmPRMT1 (pista 2). De forma a confirmar que a metilação da SMYB1 era devida à presença dos motivos GAR, duas outras construções da SMYB1 recombinante foram testadas: a SMYB1-CSD, que compreende somente o *cold shock domain* (CSD) desta proteína e a SMYB1-*tail*, que compreende somente a sua cauda C-terminal (*tail*) (ver diagramas na Figura 4.14).

É possível perceber claramente que a SMYB1-CSD, que não contém nenhum motivo GAR, não foi metilada pela SmPRMT1 (pista 3). Já a SMYB1-*tail*, em cuja seqüência encontram-se todos os 9 motivos GAR (Figura 4.14), foi metilada pela GST-SmPRMT1 (pista 4). A SMYB1-*full* incubada somente com a GST não é metilada, o que demonstra que a metilação é realizada pela somente SmPRMT1 (pista 1).

Ademais, a 6xhis-SmSM-D3, outra proteína de ligação a RNA, também foi fortemente metilada pela SmPRMT1, o que pode ser observado com clareza na pista 2 da Figura 4.15B.

Por fim, a 6xhis-SmSM-D3 incubada somente com a GST não foi metilada, o que demonstra que a metilação é realizada pela SmPRMT1 (pista 1 da Figura 4.15B).

As bandas não-assinaladas nos géis corados com Coomassie Blue são produtos copurificados com as proteínas de interesse e que não interferem em sua atividade.

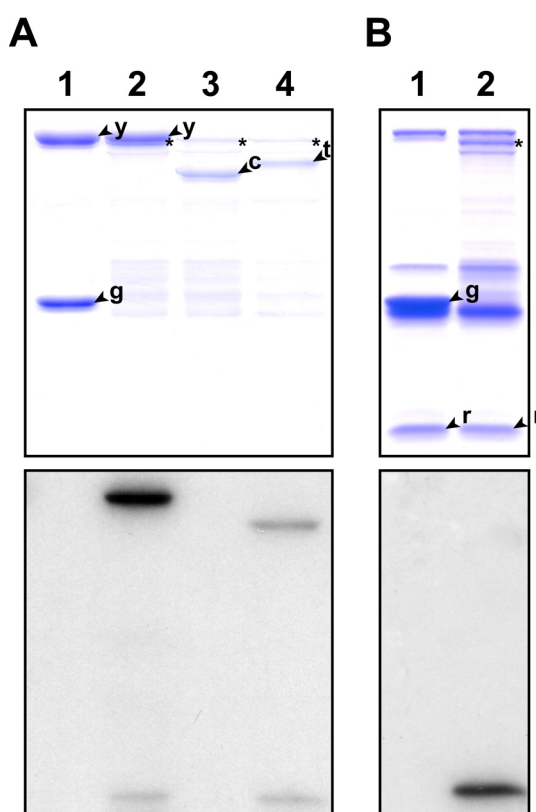


Figura 4.15 Ensaio de metilação das proteínas de ligação a RNA SMYB1 e SmSM-D3 pela SmPRMT1.

Os ensaios foram realizados com 1 μ g das proteínas utilizadas como substrato além de 1 μ g de GST-SmPRMT1 ou da proteína controle GST, incubados com ^3H -SAM. (A) 1 – SMYB1-*full* (y) e GST (g). 2 – SMYB1-*full* (y) e GST-SmPRMT1 (*). 3 – SMYB1-CSD (c) e GST-SmPRMT1 (*). 4 – SMYB1-*tail* (t) e GST-SmPRMT1 (*). (B) 1 – 6xhis-SmSM-D3 (r) e GST (g). 2 – 6xhis-SmSM-D3 (r) e GST-SmPRMT1 (*). Os painéis inferiores mostram a auto-radiografia das proteínas metiladas pela GST-SmPRMT1.

4.7 A SMPRMT1 INTERAGE FISICAMENTE COM PROTEÍNAS LIGADORAS DE RNA

Como foi demonstrado que a SMYB1 e a SmSM-D3 são metiladas pela SmPRMT1, restava saber se estas proteínas poderiam interagir fisicamente com a SmPRMT1.

Para comprovar esta hipótese, utilizamos ensaios de *pull-down*.

A Figura 4.16 mostra que, quando a GST-SmPRMT1 imobilizada em microesferas de glutationa-Sepharose foi incubada tanto com a ³⁵S-SMYB1 (A, pista 3) quanto com a ³⁵S-SmSM-D3 (B, pista 3), foi observada ligação. Já quando somente a GST imobilizada em microesferas de glutationa-Sepharose foi incubada com a ³⁵S-SMYB1 (A, pista 2) e com a ³⁵S-SmSM-D3 (B, pista 2), não ocorreu ligação. Estes resultados indicam que ocorreu interação entre a SmPRMT1 e SMYB1 e também entre a SmPRMT1 e a SmSM-D3 e que estas interações são específicas.

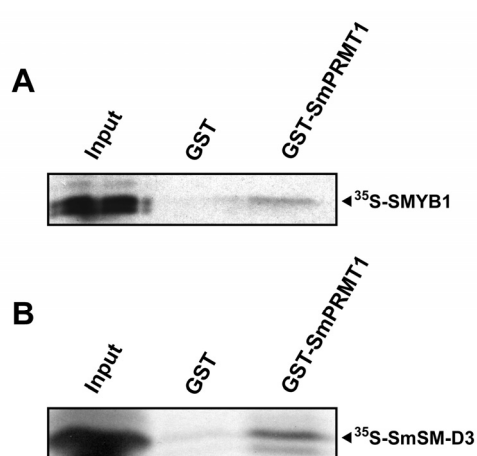


Figura 4.16 Ensaio de interação *in vitro* entre as proteínas de ligação a RNA SMYB1 e SmSM-D3 e a SmPRMT1.

A ^{35}S -SMYB1 (A) e a ^{35}S -SmSM-D3 (B) foram incubadas com GST (pista 2) ou com a GST-SmPRMT1 (pista 3) imobilizadas em um resina de glutationa-sepharose. As proteínas ligadas à resina foram analisadas por SDS-PAGE e auto-radiografia. A pista 1 (Input) representa 20% do total de proteína marcada incubado inicialmente em cada um dos ensaios.

5 PARTE II: RESULTADOS

5.1 O *S. MANSONI* CONTÉM NO NÚCLEO PROTEÍNAS CAPAZES DE INTERAGIR ESPECIFICAMENTE COM O CRE

O elemento responsivo a AMP cíclico (CRE****) é uma seqüência promotora de DNA à qual se ligam proteínas que respondem à cascata de ativação celular induzida por AMP cíclico (AMPc).

Para avaliar se existem proteínas do *S. mansoni* capazes de utilizar este mecanismo de regulação da transcrição gênica, resolveu-se testar a interação de proteínas nucleares do *S. mansoni* com um oligonucleotídeo composto pela seqüência consenso do CRE (cCRE) ou seu correspondente contendo mutações (mCRE), através do uso do EMSA.

As seqüências destes oligonucleotídeos encontram-se descritas no item 3.25.

As auto-radiografias da Figura 5.1 e da Figura 5.2 demonstram a existência de proteínas capazes de ligar-se com especificidade ao oligonucleotídeo consenso do CRE (cCRE). Na pista 3, pode-se observar o deslocamento da migração do ³²P-cCRE no gel devido à ligação de proteínas nucleares presentes no extrato. Na pista 4, entretanto, o deslocamento observado é mínimo, já que estas proteínas não foram capazes de reconhecer o oligonucleotídeo mutado (³²P-mCRE). As pistas 5 e 6 demonstram a especificidade da ligação das proteínas ao oligonucleotídeo consenso (³²P-cCRE), já que o deslocamento de sua migração no gel é abolido pela adição de 40X (pista 5) ou 400X (pista 6) a quantidade molar do mesmo oligonucleotídeo não-marcado com [γ -³²P]-dATP. Observe-se que o excesso molar de 40X do cCRE não-

**** Do inglês: cAMP Responsive Element

marcado com [γ - ^{32}P]-dATP (pista 5) já foi capaz de abolir praticamente a totalidade do deslocamento da migração do oligonucleotídeo ^{32}P -cCRE. As pistas 7 e 8 apoiam ainda mais a observação sobre a especificidade da ligação, já que a adição de 40X (pista 7) ou 400X (pista 8) a quantidade molar do oligonucleotídeo mutado (mCRE) não-marcado com [γ - ^{32}P]-dATP não foi capaz de abolir o deslocamento da migração do oligonucleotídeo consenso (^{32}P -cCRE). A pista 9 confirma o caráter protéico dos fatores que se ligam ao ^{32}P -cCRE, já que a incubação deste oligonucleotídeo com extrato nuclear previamente fervido por 3 minutos leva a abolição por completo do deslocamento de sua migração no gel.

É interessante notar a diferença na intensidade do deslocamento entre os extratos enriquecidos em núcleo de machos adultos e de fêmeas adultos incubados com o oligonucleotídeo consenso ^{32}P -cCRE. Esta diferença pode indicar uma menor concentração de proteínas com capacidade de ligação ao CRE nas fêmeas adultas ou uma menor afinidade das mesmas por esta seqüência.

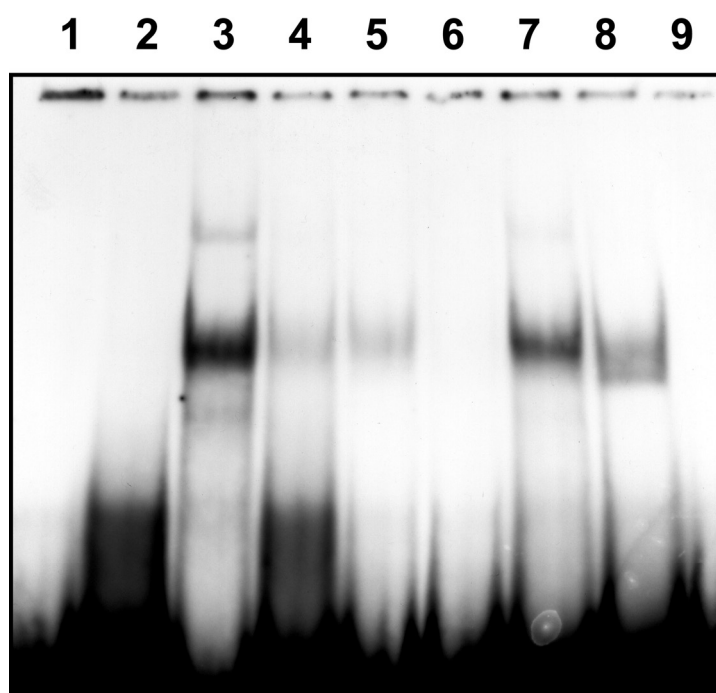


Figura 5.1 EMSA utilizando oligonucleotídeos consenso CRE e do CRE mutante incubados com extrato nuclear de machos adultos de *S. mansoni*.

1 – ^{32}P -cCRE. 2 – ^{32}P -mCRE. 3 – ^{32}P -cCRE + extrato nuclear de machos adultos. 4 – ^{32}P -mCRE + extrato nuclear de machos adultos. 5 – ^{32}P -cCRE + extrato nuclear de machos adultos + cCRE não-marcado (40X). 6 – ^{32}P -cCRE + extrato nuclear de machos adultos + cCRE não-marcado (400X). 7 – ^{32}P -cCRE + extrato nuclear de machos adultos + mCRE não-marcado (40X). 8 – ^{32}P -cCRE + extrato nuclear de machos adultos + mCRE não-marcado (400X). 9 – ^{32}P -cCRE + extrato nuclear previamente fervido de machos adultos.

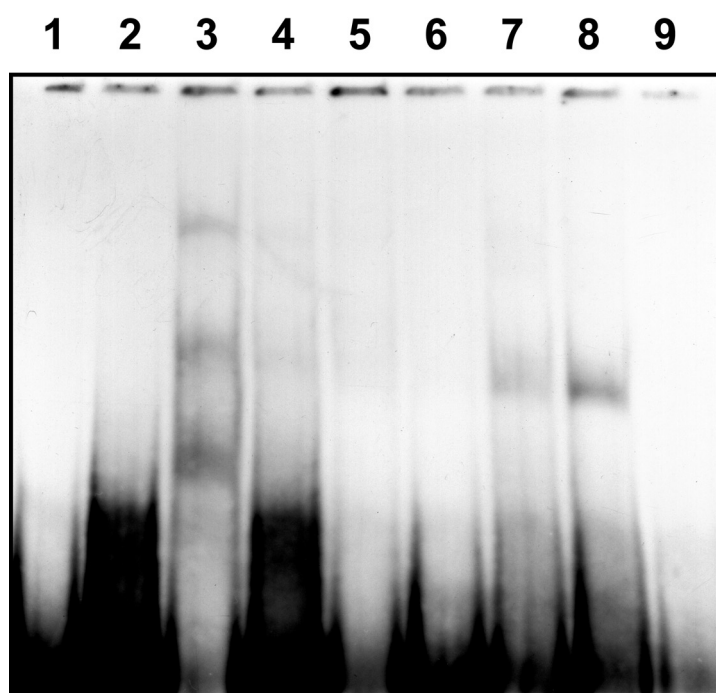


Figura 5.2 EMSA utilizando oligonucleotídeos consenso CRE e do CRE mutante incubados com extrato nuclear de fêmeas adultas de *S. mansoni*.

1 – ^{32}P -cCRE. 2 – ^{32}P -mCRE. 3 – ^{32}P -cCRE + extrato nuclear de fêmeas adultas. 4 – ^{32}P -mCRE + extrato nuclear de fêmeas adultas. 5 – ^{32}P -cCRE + extrato nuclear de fêmeas adultas + cCRE não-marcado (40X). 6 – ^{32}P -cCRE + extrato nuclear de fêmeas adultas + cCRE não-marcado (400X). 7 – ^{32}P -cCRE + extrato nuclear de fêmeas adultas + mCRE não-marcado (40X). 8 – ^{32}P -cCRE + extrato nuclear de fêmeas adultas + mCRE não-marcado (400X). 9 – ^{32}P -cCRE + extrato nuclear previamente fervido de fêmeas adultas.

5.2 IDENTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA COM DOMÍNIOS LIM E PET (LIMPETIN) DE *S. MANSONI*

5.2.1 AQUISIÇÃO DA SEQÜÊNCIA PARCIAL DA LIMPETIN DE *S. MANSONI*

Na busca de fatores envolvidos nas diferenças sexuais entre machos e fêmeas adultos de *S. mansoni*, resolvemos investigar se o *S. mansoni* poderia possuir o homólogo da proteína ACT/FHL5 (ativador do CREM⁺⁺⁺ no testículo) de mamíferos. Esta proteína está presente exclusivamente no testículo de mamíferos e é capaz de estimular a ativação transcricional mediada por CREM em células de levedura e mamífero sem a necessidade da presença da proteína co-ativadora CBP^{###} (FIMIA, 1999). A presença de um homólogo de ACT/FHL5 em *S. mansoni* poderia, portanto, trazer informações moleculares sobre a espermatogênese neste parasito.

O primeiro passo foi procurar, nos bancos de dados com seqüências de *S. mansoni* disponíveis à época, por seqüências homólogas ao ACT/FHL5. Através de um TBLASTN contra o banco de dados do TIGR *S. mansoni* Gene Index (SmGI) (MERRICK, 2003) utilizando-se a seqüência protéica do ACT/FHL5 murino (nº de aquisição do GenBank [NM_067293](#)) como seqüência de busca, foi identificado o contig TC3466, cuja seqüência de nucleotídeos e a seqüência deduzida de aminoácidos (fase +3) estão descritas na Figura 5.3. A seqüência protéica da fase +3 deste contig de 631 pb apresentou uma considerável homologia com uma porção da seqüência protéica do ACT/FHL5 de camundongo.

⁺⁺⁺ Acrônimo para: modulador do elemento responsivo a AMPc.

^{###} Acrônimo para: proteína de ligação à CREB.

Este considerável grau de similaridade (61,2%) e de identidade (45,5%) pôde ser corroborado através do alinhamento de seqüência deduzida de aminoácidos (fase +3) deste contig com a seqüência de aminoácidos do ACT/FHL5 murino (Figura 5.4), utilizando-se o programa ClustalX (THOMPSON, 1997).

Levando em conta estes dados, foi concluído nesta ocasião que este clone representava a seqüência parcial do ACT/FHL5 de *S. mansoni*. Esta conclusão seria contestada após a obtenção da seqüência completa da proteína, descrita a seguir, e a partir da qual foi possível concluir que esta seqüência codificava uma nova proteína, denominada “proteína com domínios LIM e PET de invertebrados de *S. mansoni*” (SmLIMPETin).

```

1 | E Q E H H T G H F A C H S C D V S L T G Q R Y I L R D D E | 29
1 | G G G A A C A A G A A C A T C A T A C T G G T C A T T T T G C A T G T C A T A G T T G T A T C A T T A A C A G G A C A A C G T T A T A T T A C G T G A T G A A | 89
30 | P H C L A C Y E A K F A N T C E Q C K E K I G C D S K D L S | 59
90 | C C A C A T T G T T T A G C T T G T T A T G A A G C A A G T T T G C T A A T A C A T G T G A A C A A T G T A A G A A A A A A T T G G T T G T G A T T C A A A G A T C T T T C A | 179
60 | F K E R H W H E K C F K C S A C T T S L A D R P F A T K E E | 89
180 | T T T A A G A A A G A C A T T G G C A T G A G A A A T G T T T T A A A T G T T C T G T A C T A C T T C A T T A G C T G A T C G A C C A T T T G C T A C A A A A G A A G A A | 269
90 | Q L Y C S D C Y D E R F A A R C D G C Q G V F K A G M R K Y | 99
270 | C A A T T A T A T T G T T C T G A T T G T T A T G A T G A A C G T T T T G C T G C A A G A T G T G A T G G T T G T C A A G G T G A T T C A A A G C T G G A A T G C G T A A A T A T | 359
120 | E Y R G Q Q W H E E C F L L C V E C K Q P I G A K S F I P R E | 149
360 | G A A T A T C G T G G A C A A C A A T G G C A T G A A G A A T G T T T T A T G T T G A A T G T A A A C A C C A A T T G G T G C A A A A A G T T T A T T C C A C G T G A A | 449
150 | N Q V V C V P C Y E A K Y A Q R C T K C S E V I R R G G V T | 179
450 | A A T C A A G T T G A T G T A C C A T G T T A T G A A G C G A A A T A T G C T C A A C G T T G T A C G A A A T G T T C A G A A G T T A T A C G T C G T G G T G G A G T T A C A | 539
180 | Y K G N P W H K E C F T C T S C S K Q L A G L K F T S K D E | 209
540 | T A C A A A G G A A A T C C A T G G C A T A A A G A A T G T T C A C T T G T A C T A G T T G T T C T A A A C A A T T A G C C G G T T T A A A A T T C A C A T C T A A A G A T G A A | 629
630 | C A | 631

```

Figura 5.3 Sequência de nucleotídeos e sequência deduzida de aminoácidos (fase +3) do contig TC3466.

Os números laterais correspondem à posição do nucleotídeo ou aminoácido adjacentes nas respectivas seqüências.

```

ACT murino 1 | ---MTSSQFDGQYCTSSSLIGKKYVYLKDDNLYCISCYDRIFSNYCEQCKEPTESDSKDLCY | 57
TC3466(+3) 1 | EQEHHTGHFAACHSCDVS LTGRYILRDDEPHCLACYEAKFANTCEQCKEKIGCD SKDLSF | 60
80 |
ACT murino 58 | KNRHWHEGCFRCNKCHHSLVEKPFVAKDDRLLCTDCYSNECSSKGFHCKRTIMPGRKME | 117
TC3466(+3) 61 | KERHWHEKCFKCSACTTSLADRPFATKEEQLYCSDCYDERFAARCDGCGGVFKAGMRKYE | 120
140 |
ACT murino 118 | FKGNYWHETCFVCEHCRQPIGTKPLISKESGNYCVPCFEKEFAHYCNFCCKVITSGGITF | 177
TC3466(+3) 121 | YRGQQWHEECFLCVECKQPIGAKSFIPIRENQVV CVPCYEAKYAQRCTKCEVIRRGVITY | 180
200 |
ACT murino 178 | RDQIWHKECFLCSGCRKELYEEAFMSKDD | 206
TC3466(+3) 181 | KGNPWHKECFTCTSCSKQLAGLKF TSKDE | 209

```

Figura 5.4 Alinhamento da sequência deduzida de aminoácidos (fase +3) do contig TC3466 com a sequência parcial de aminoácidos do ACT/FHL5 de camundongo (aa 1-206).

Os aminoácidos realçados em preto são idênticos e os realçados em cinza são similares. Os números laterais correspondem à posição dos aminoácidos adjacentes nas respectivas seqüências. O grau similaridade entre as seqüências é de 61,2% e o grau de identidade é de 45,5%.

5.2.2 ISOLAMENTO DA SEQÜÊNCIA COMPLETA DA LIMPETIN DE *S. MANSONI* (SMLIMPETIN)

Com o intuito de isolar a seqüência completa do provável ACT/FHL5 de *S. mansoni*, foi desenhado um par de *primers* capazes de associarem-se às extremidades do contig TC3466, com os quais foi possível amplificar este fragmento utilizando cDNA de *S. mansoni* como molde.

Este *amplicon* foi utilizado como sonda para a varredura de uma biblioteca de cDNA de *S. mansoni* clonada no vetor Lambda-Zap II (Stratagene) e preparada a partir de mRNA de vermes machos e fêmeas adultos. Como resultado desta varredura, foram isolados vários clones positivos, dentre os quais foram escolhidos 2: um de aproximadamente 950 pb (clone 17) e outro de aproximadamente 1900 pb (clone 9). Seus respectivos fagemídeos foram excisados dos bacteriófagos utilizando-se o Rapid Excision Kit, da Stratagene, e inteiramente seqüenciados.

A seqüência completa da LIMPETin de *S. mansoni* foi preparada para ser depositada no GenBank (Figura 5.5). Esta seqüência tem, descontada a cauda poli-A, 1728 pb. Sua região 5' não-traduzida (5'UTR) tem 32 pb, sua Fase Aberta de Leitura (ORF) possui 1671 pb, codificando 556 aminoácidos, e sua região 3' não-traduzida (3'UTR) possui 24 bp.

A seqüência deduzida de aminoácidos da SmLIMPETin possui 6 prováveis domínios LIM, além de um provável domínio PET na porção N-terminal. Seu segundo domínio LIM (rosa) é homólogo ao ½ domínio LIM das proteínas *four-and-a-half LIM*

domains (FHLs) e seus domínios LIM 3 (azul claro), 4 (verde), 5 (roxo) e 6 (azul escuro), são homólogos aos domínios 1, 2, 3 e 4 das FHLs, respectivamente. Seu domínio LIM 1 (amarelo) encontra homologia somente entre as LIMPETins. A Figura 5.6 ilustra estas características.

Figura 5.5 Arquivo do GenBank contendo a seqüência integral da SmLIMPETin.
(Folha seguinte)

LOCUS SmLIMPETin 1728 bp mRNA Linear INV 12-JUN-2006
DEFINITION Schistosoma mansoni LIM and PET domains (LIMPETin) protein mRNA,
complete CDS.

ACCESSION
VERSION
KEYWORDS
SOURCE Schistosoma mansoni
ORGANISM Schistosoma mansoni
Eukaryota; Metazoa; Platyhelminthes; Trematoda; Digenea;
Strigeidida; Schistosomatoidea; Schistosomatidae; Schistosoma.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1728)
AUTHORS Furtado,D.R., Fantappie,M.R. and Rumjanek,F.D.
TITLE The LIMPETin protein: Defining a New Family of LIM and PET Domain
Proteins of Invertebrates
JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1728)
AUTHORS Furtado,D.R., Fantappie,M.R. and Rumjanek,F.D.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (12-JUN-2006) Instituto de Bioquimica Medica,
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciencias da
Saude, Ilha do Fundao, Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil

FEATURES
Location/Qualifiers
source 1..1728
/organism="Schistosoma mansoni"
/mol_type="mRNA"
/strain="LE"
gene 1..1728
/gene="SmLIMPETin"
3'UTR 1..33
/gene="SmLIMPETin"
CDS 34..1704
/gene="SmLIMPETin"
/codon_start=1
/product="Schistosoma mansoni LIM and PET domains
(LIMPETin)"
/translation="MAYDQDQNKPKLKCQSKCSGFMKHSWRMICTQCHCAYEHDIDY
YYTNQSI LDEL DYNQSI LLYQEYMNAQN LAKQYGLNWLPIGVKQTEVDFLNSLPNEE
LPRGEVADYIRRQLRKLQIP LQDCNPAVTIEELWNHSDSNPNLELREANRFKNFR
NSHDLGIGLVEHMNEKDGQPCTNCSNTIHFDFECIRIKPEHSLTEISNVSTSNHTPA
WHLNCFRCTTCNEYLVDIYAWFNKQLYCLRHYGQSI RPRCVTCDHLIFSEEYTRAME
QEHHTGHFACHSCDVSLTGQRYILRDDEPHCLACYEAKFANTCEQCKEKIGCDSKDL S
FKERHWHEKCFKCSACTTSLADRP FATKEEQLYCSDCYDERFAARCDGCGQGVFKAGMR
KYEYRGGQWHEECFLCVECKQPIGAKSFI PRENQVVCVPCYEAKYAQRCTKCSEVIRR
GGVTYKGNPWHKECFCTCTSCSKQLAGLKF TSKDEQPYCADCYGELFAKKCTKCTKPI T
GFGGCKFISFEDRHHWSECF LCGKCNLNVLVGRGFLTSDDMIMCSECGR"

5'UTR 1705..1728
/gene="SmLIMPETin"
polyA_site 1728
/gene="SmLIMPETin"

BASE COUNT 599 a 239 c 309 g 581 t
ORIGIN
1 tttttaccat acagtaatca aaacttttac ataatggctt atgatcaaga tcaaaataaa
61 ccatgtttaa aatgtcaatc aaaatgtttc ggtttcatga aacattcatg gagaatgatc
121 tgtacccaat gtcattgtgc atattatgaa catgatattg attattatta cactaatcaa
181 tcaatattag atgaattaga ttataatcaa tcaatattat tatatcaaga atatatgaat
241 gcacaaaatt tggctaaaca atatggatta aattggttac cgattgggtg caaacaaa
301 gaagtggatt tatttctcaa tagtcttcca aatgaagaat taccacgtgg tgaagttgct
361 gattatatta gacgtcaacg tcttagaaaa caaataccat tacaagattg taatccagct
421 gtaaccattg aagaattatg gaatcattca aaagattcaa atcctaactt agaaaatgaa
481 ttacgtgaag cgaatcgttt taaaaathtt cgtaatctc atgatttggg tattggtttg
541 gtggaacata tgaatgagaa ggatggacag ccatgtacaa atgtttcgaa tacaatccat
601 tttgatgaat tttgtataag aatataacca gaacattctt taacagaaga aatttccaac
661 gtgtcaacat caaatcatac tccagcttgg catttgaatt gttttcgatg cacaacatgt
721 aatgaatatt tagttgatta tataatgctt tggttcaata agcaacttta ttgtttacga
781 cattatggtc aatcaatacg tccagcttgt gtaacctgtg atcatcttat ttctcagaa
841 gaatatacta gagctatgga acaagaacat cactactggtc attttgcattg tcatagttgt
901 gatgtatcat taacaggaca acgttatata ttacgtgatg atgaaccaca ttgtttagct
961 tgttatgaag caaagtgttc taatacatgt gaacaatgta aagaaaaaat tggttgtgat
1021 tcaaaaagat tttcatttaa agaaagacat tggcatgaga aatgttttaa atgttctgtc
1081 tgtactactt cattagctga tgcaccattt gctacaaaag aagaacaatt atattgttct
1141 gattgttatg atgaacgttt tgcgtgcaaga tgtgatggtt gccaaggtgt attcaaagct
1201 ggaatgctga aatatgaata tgcgtggacaa caatggcatg aagaatgttt tttatgtgtt
1261 gaatgtaaac aaccaattgg tgcaaaaagt tttattccac gtgaaaaatca agttgtatgt
1321 gtaccatggt atgaagcgaa atatgctcaa cgttgtagca aatgttcaga agttatacgt
1381 cgtggtggag ttacatacaa aggaatcca tggcataaag aatgtttcac ttgtactagt
1441 tgttctaacc aattagccgg tttaaaattc acatctaag atgaacaacc ttattgtgct
1501 gattgttatg gtgaattatt tgcataaaaa tgcacaaaat gtaccaaacc aattacggga
1561 tttggtggtt gtaaatctat ttcattcgaa gatcgtcatt gccattcaga atgttttcta
1621 tttggaaaaa gtaattctaa tctggttggg agaggttttc ttactagtga tgatagatt
1681 atgtgttctg aatgtggtcg ttaactttga caagcacaat cagtatac

//

1	TTTTACCATACAGTAATCAAAACTTTTACATAA	M A Y D Q D Q N K P C L K C Q S K C S	19
1	<u>ATGGCTTATGATCAAGATCAAAATAAACCATGTTTAAATGTCAATCAAAATGTTCC</u>		89
20	G F M K H S W R M I C T Q C H C A Y Y E H D I D Y Y Y T N Q		49
90	<u>GGTTTCATGAAACATTCATGGAGAATGATCTGTACCCAATGTCATTGTGCATATTATGAACATGATATTGATTATTATTACACTAATCAA</u>		179
50	S I L D E L D Y N Q S I L L Y Q E Y M N A Q N	L A K Q Y G L	79
180	<u>TCAATATTAGATGAATTAGATTATAATCAATCAATATTATTATATCAAGAATATATGAATGCACAAAATTTGGCTAAACAATATGGATTA</u>		269
80	N W L P I G V K Q T E V D L F L N S L P N E E L P R G E V A		109
270	<u>AATTGGTTACCGATTGGTCAAAACAACAGAAGTGGATTTATTTCTCAATAGTCTTCCAAATGAAGAATTACCACGTGGTGAAGTTGCT</u>		359
110	D Y I R R Q R L R K Q I P L Q D C N P A V T I E E L W N H S		139
360	<u>GATTATATTAGACGTCAACGCTTAGAAAACAATACCATTACAAGATTGTAATCCAGCTGAACCAATTGAAGAATTATGGAATCATTCA</u>		449
140	K D S N P N L E N E L R E A N R F K N F R N S H D L G I G L		169
450	<u>AAAGATTCAAATCCTAACCTAGAAAATGAATTACGTTGAGCGAATCGTTTTAAAAATTTTCGTAATTTCTCATGATTGGGTATTGGTTTG</u>		539
170	V E H M N E K D G Q P C T N C S N T I H F D E F C I R I K P		199
540	<u>GTGGAACATATGAATGAGAAGGATGGACAGCCATGTACAAATTTGTCGAATACAATCCATTTTIGATGAATTTTGAAGAATTAACCAA</u>		629
200	E H S L T E E I S N V S T S N H T P A W H L N C F R C T T T C		229
630	<u>GAACATTTCTTAAACAGAAGAAATTTCCAACGTTGTCAAATCAAAATCATACTCCAGCTTGGCATTGTAATTTGTTTCGATGCACAAATG</u>		719
230	N E Y L V D Y I Y A W F N K Q L Y C L R H Y G Q S I R P R C		259
720	<u>AATGAATATTTAGTTGATTATATATATGCTTGGTTCAATAAGCAACTTTATTGTTTACGACATTATGGTCAATCAATACGTCACGTTGT</u>		809
260	V T C D H L I F S E E Y T R A M E Q E H H T G H F A C H S C		289
810	<u>GTAACCTGTGATCATCTTATTTTCTCAGAAGAAATATACTAGAGCTATGGAACAAGAACATCATACTGGTCATTTTGCATGTCATAGTTGT</u>		899
290	D V S L T T G Q R Y I L R D D E P H C L A C Y E A K F A N T C		319
900	<u>GATGATCATTAACAGGACAACGTTATATATTACGTTGATGATGAACCACATTGTTTAGCTTGTATGAAGCAAAGTTTGTCTAATACATGT</u>		989
320	E Q C K E K I G C D S K D L S F K E R H W H E K C F K C S S A		349
990	<u>GAACAATGTAAGAAAAAATTTGGTTGTGATTCAAAAGATCTTTTCATTTAAAGAAAAGACATTGGCATGAGAATGTTTTAAATGTTCTGCT</u>		1079
350	C T T S L A D R P F A T K E E Q L Y C S D C Y D E R F A A R		379
1080	<u>TGTACTACTTTCATTAGCTGATCGACCATTTGCTACAAAAGAAGAACAATTTATTTGTTCTGATTGTTATGATGAACGTTTGTGCAAGA</u>		1169
380	C D G C Q G V F K A G M R K Y E Y R G Q Q W H E E C F L C V		409
1170	<u>TGTGATGGTTGTCAAGGTGATTCAAAAGCTGGAATCGTAAATATGAATATCGTGGACAACAATGGCATGAAGAATGTTTTTATGTGT</u>		1259
410	E C K Q P I G A K S F I P R E N Q V V C V P C Y E A K Y A Q		439
1260	<u>GAATGTAACAACCAATTTGGTGCAAAAAGTTTTATTCACGTTGAAAATCAAGTTGTATGTGTACCATGTTATGAAGCGAAATATGCTCAA</u>		1349
440	R C T K C S E V I R R G G V T Y K G N P W H K E C F T C T S		469
1350	<u>CGTTGTACGAAATGTTCAAGATTATACGTCGTGGTGGAGTTACATACAAAGGAAATCCATGGCATAAAGAATGTTTCACTTGTACTAGT</u>		1439
470	C S K Q L A G L K F T S K A D E A Q P Y C A D C Y G E L F A K K		499
1440	<u>TGTTCTAAACAATTAGCCGGTTTAAATTCATCTAAAGTGAACAACCTTATTGTGCTGATTGTTATGGTGAATTAATTTGCTAATAAAA</u>		1529
500	C T K C T K P I T G F G G C K F I S F E D R H W H S E C F L		529
1530	<u>TGCACAAAATGTACCAAACCAATTACGGGATTTGGTGGTTGTAATTCATTTTCATTCGAAGATCGTCATTGGCATTGAGAAATGTTTCTA</u>		1619
530	C G K C N S N L V G R G F L T S D D M I M C S E C	G R *	556
1620	<u>TGTGAAAATGTAATCTAATCTGGTTGGTAGAGTTTTCTACTAGTATGATGATTATGTTCTGAATGTGGCTGTTAACTTTTGA</u>		1709
1710	CAAGCACAAATCAGTATAC		1727

Figura 5.6 Sequência integral de nucleotídeos e sequência integral deduzida de aminoácidos da SmLIMPETin.

Os números laterais correspondem à posição do nucleotídeo ou aminoácido adjacentes nas respectivas seqüências. A fase aberta de leitura está sublinhada e os códon de início e de terminação, duplamente sublinhados. Os aminoácidos estão centralizados sobre seus respectivos códons, assim como o asterisco, indicativo do códon de terminação. A 5'UTR e a 3'UTR estão em cinza. O provável domínio PET está indicado em preto. Os prováveis domínios LIM estão indicados por cores. Os aminoácidos componentes à seqüência consenso dos domínios LIM estão indicados por pontos. O provável sinal para localização nuclear (NLS) está em vermelho.

5.2.3 HOMOLOGIA DA SmLIMPETin COM LIMPETins DE OUTROS INVERTEBRADOS E COM OUTROS MEMBROS DAS FAMÍLIAS DAS PROTEÍNAS COM DOMÍNIOS LIM

Estando com a seqüência completa de mRNA do provável ACT de *S. mansoni* já disponível, era necessário determinar se esta proteína era verdadeiramente uma ACT ou se seria classificada como uma outra proteína da superfamília das proteínas com domínios LIM.

Para isso, foi calculado o alinhamento da seqüência primária deduzida de aminoácidos da SmLIMPETin com proteínas com domínios LIM e PET de outras espécies, empregando-se o programa AlignX, da suíte de aplicativos Vector NTI Advance 10 (Invitrogen). Este programa utiliza o algoritmo ClustalW (MYERS, 1988). A Figura 5.7 mostra que a SmLIMPETin apresenta um alto grau de homologia com as proteínas com domínios LIM e PET de invertebrados. As maiores percentagens de identidade (45,2%) e similaridade (56,8%) ocorreram entre a SmLIMPETin e a proteína com domínios LIM e PET de invertebrados de *Tribolium castaneum*, isoforma B (nº de aquisição do GenBank [XP_966685](#)).

Na Tabela 5.1 estão listadas as percentagens de similaridade e de identidade entre a SmLIMPETin e as LIMPETins incluídas no alinhamento da Figura 5.7.

Para esmiuçar ainda mais a filogenia da SmLIMPETin, foi construída uma árvore filogenética para demonstrar as distâncias filogenéticas entre as prováveis proteínas com domínios LIM e PET de invertebrados (LIMPETins) e os membros das famílias de proteínas *four-and-a-half LIM domains* (FHL) FHL1, FHL2, FHL3 e FHL5/ACT, a

partir de um alinhamento múltiplo também construído com o programa AlignX. Para garantir a confiabilidade do alinhamento, as áreas ambíguas foram retiradas, motivo pelo qual as isoformas a, c e f da LIMPETin de *Caenorhabditis elegans*, as isoformas B/G e D/H da LIMPETin de *Drosophila melanogaster* e as isoformas B e D da LIMPETin de *Tribolium castaneum* ficaram reduzidas a seus respectivos trechos idênticos. Estes 3 organismos ficaram representados, portanto, por apenas 1 seqüência cada.

Para calcular a reconstrução de filogenia foi utilizado o programa MEGA 3.1 (KUMAR, 2004). Utilizou-se o método de *neighbor-joining* e os gaps foram tratados como deleções completas. A matriz PAM de Dayhoff (DAYHOFF, 1978) foi utilizada como modelo de substituição.

A Figura 5.8 mostra que a SmLIMPETin ficou agrupada com as proteínas com domínios LIM e PET de invertebrados (LIMPETins) de Abelha (*Apis mellifera*, nº de aquisição do GenBank [XP_393694](#)), *Caenorhabditis elegans*, (a: [CAI46552](#), c: [CAI46550](#) e f: [CAI46551](#)), *Drosophila melanogaster* (B/G: [NP_648930/NP_996110](#) e D/H: [NP_730212/NP_996109](#)), *Drosophila pseudoobscura* ([EAL30316](#)), *Strongylocentrotus purpuratus* ([XP_784011](#)) e *Tribolium castaneum* (B: [XP_966685](#) e D: [XP_976021](#)). Devido ao alto valor de *bootstrap* observado na divisão do ramo das LIMPETins (99%), separando-as das FHLs, pode-se inferir que estas proteínas compõem uma nova família, nunca antes descrita na literatura.

Figura 5.7 Alinhamento da seqüência deduzida de aminoácido da SmLIMPETin com as seqüências deduzidas de aminoácidos das proteínas com domínios LIM e PET de 6 outras espécies de invertebrados.

(Folha seguinte). A SmLIMPETin (*Schistosoma mansoni*, Figura 5.5 e Figura 5.6) foi alinhada com as prováveis proteínas com domínios LIM e PET (LIMPETins) de: Abelha (*Apis mellifera*, nº de aquisição do GenBank [XP_393694](#)), *Drosophila pseudoobscura* (nº de aquisição do GenBank [EAL30316](#)), *Drosophila melanogaster* (nºs de aquisição do GenBank; B/G: [NP_648930/NP_996110](#) e D/H: [NP_730212/ NP_996109](#)), *Caenorhabditis elegans*, (nºs de aquisição do GenBank; a: [CAI46552](#), c: [CAI46550](#) e f: [CAI46551](#)), *Strongylocentrotus purpuratus* (nº de aquisição do GenBank [XP_784011](#)) e *Tribolium castaneum* (nºs de aquisição do GenBank; B: [XP_966685](#) e D: [XP_976021](#)) utilizando-se o algoritmo de alinhamento múltiplo ClustalW (THOMPSON, 1997). Os números laterais correspondem à posição dos aminoácidos adjacentes nas respectivas seqüências. Os resíduos 100% idênticos estão realçados em preto, os 80% idênticos em cinza escuro e os 60% idênticos em cinza claro.

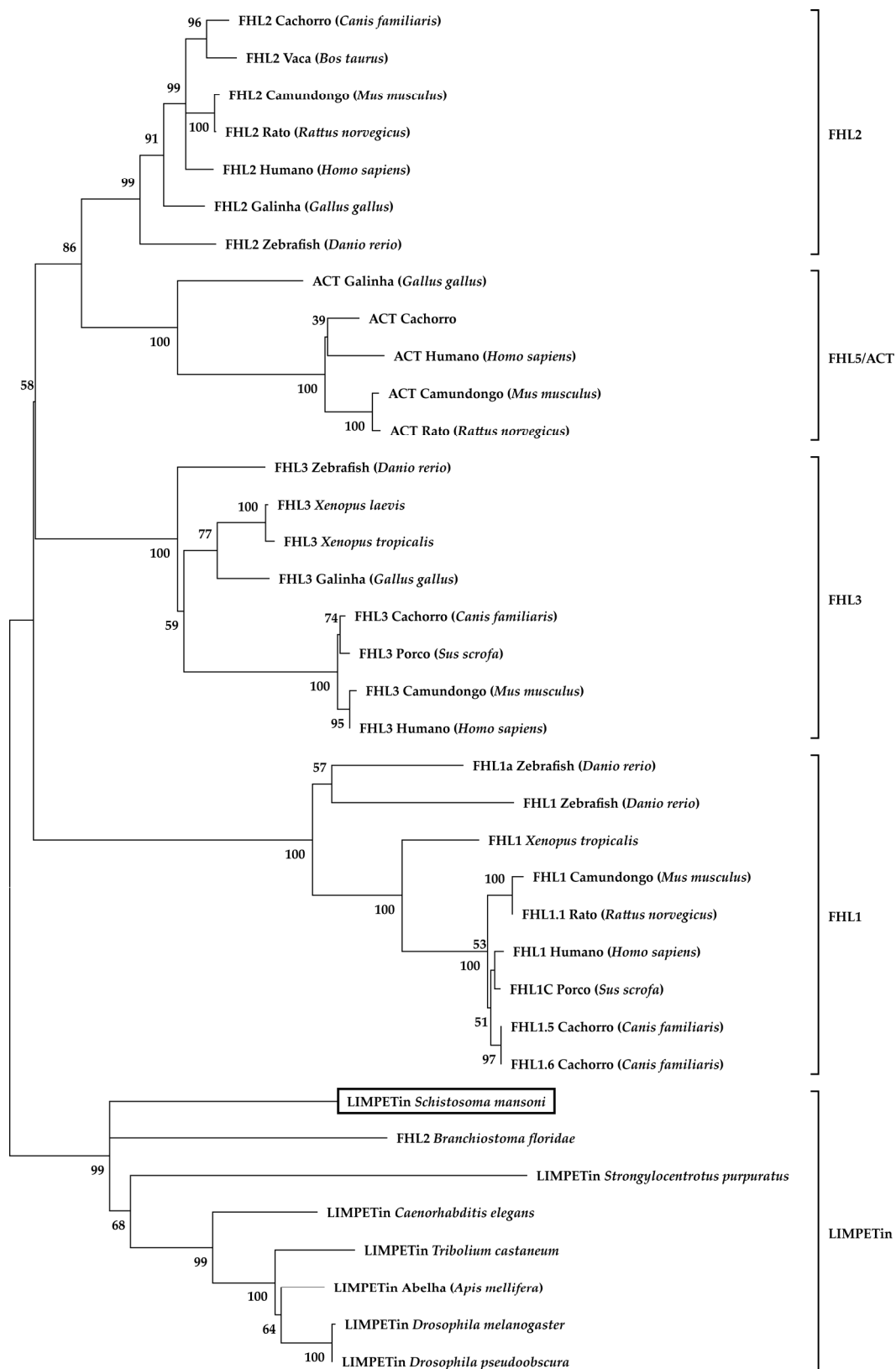
	<i>S. mansoni</i>	
	Identidade	Similaridade
Abelha (<i>Apis mellifera</i>)	42,4	54,2
<i>Drosophila pseudoobscura</i>	43,5	55,2
<i>Drosophila melanogaster</i> (B/G)	43,5	55,2
<i>Drosophila melanogaster</i> (D/H)	40,8	52,9
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	38,0	50,5
<i>Caenorhabditis elegans</i> (a)	39,9	50,9
<i>Caenorhabditis elegans</i> (c)	39,1	50,0
<i>Caenorhabditis elegans</i> (f)	42,9	55,0
<i>Tribolium castaneum</i> (B)	45,2	56,8
<i>Tribolium castaneum</i> (D)	42,8	54,7

Tabela 5.1 Tabela de identidade e similaridade entre a LIMPETin de *Schistosoma mansoni* (SmLIMPETin) e as proteínas com domínios LIM e PET de invertebrados (LIMPETins) incluídas no alinhamento da Figura 5.7.

Valores em percentagem, considerando-se somente o alinhamento do 1º ao último resíduo em consenso. Calculada com o algoritmo ClustalW (THOMPSON, 1997), utilizando-se alinhamentos pareados. Os valores de identidade e similaridade mais altos encontram-se em negrito.

Figura 5.8 Árvore filogenética sem raiz deduzida a partir do alinhamento de proteínas com domínios LIM e PET de invertebrados (LIMPETins) e proteínas das famílias *four-and-a-half LIM domains* FHL1, FHL2, FHL3 e FHL5/ACT.

(Folha seguinte). A árvore sem raiz foi criada utilizando-se o método de *neighbor-joining*. Os números presentes nas ramificações denotam a porcentagem das 1000 réplicas de *bootstrap*. A LIMPETin de *S. mansoni* (SmLIMPETin) está destacada por uma caixa.



5.3 O MRNA DA SMLIMPETIN É EXPRESSO DIFERENCIALMENTE ENTRE OS DIFERENTES ESTÁGIOS DO PARASITO E ENTRE MACHOS E FÊMEAS ADULTOS

Como foi extensivamente discutido na introdução, a diferenciação sexual entre vermes adultos de *S. mansoni* é uma característica marcante da biologia deste parasito. A dependência do contato com o macho para a completação do desenvolvimento sexual da fêmea é também uma característica importante, cujos mecanismos moleculares têm sido estudados com cada vez mais frequência. De fato, genes com expressão diferencial entre machos e fêmeas adultos e também entre diferentes estágios do parasito suscitam um interesse crescente, por serem alvos em potencial para o desenvolvimento de novas estratégias de combate à esquistossomose.

Desta forma, era fundamental investigar se a SmLIMPETin tinha sua expressão regulada ao longo de diferentes estágios e, ainda, se havia diferenças de expressão entre os sexos, nos parasitos adultos.

Com este intuito, foram realizados experimentos utilizando-se duas técnicas capazes de medir a expressão de mRNA: o *northern blot* e a PCR semi-quantitativa.

A Figura 5.9 mostra o resultado de um *northern blot* em que um *amplicon* da seqüência parcial de cDNA da SmLIMPETin marcado com [α -³²P]-dCTP foi utilizado como sonda. Nesta experiência, a mesma membrana foi reibridada, após a retirada da sonda da SmLIMPETin, com outra sonda constituída do *amplicon* da seqüência parcial da SmGAPDH marcado com [α -³²P]-dCTP. Este consiste em um gene

expresso em níveis semelhantes em todos os estágios e em ambos os sexos do parasito e é, portanto, um controle constitutivo. Pode-se observar claramente que a SmLIMPETin é significativamente menos expressa em fêmeas adultas sexualmente maduras (pista 4) em comparação com machos adultos sexualmente maduros (pista 3), e relativamente menos expressa em fêmeas adultas sexualmente imaturas (pista 2) em comparação com machos adultos sexualmente imaturos (pista 1).

A RT-PCR semi-quantitativa da Figura 5.10 corrobora as conclusões da experiência da Figura 5.9 e examina também a expressão do mRNA da SmLIMPETin no esquistossômulo, que é o estágio em que o parasito penetra ativamente a pele do hospedeiro mamífero, logo após perder sua cauda. É neste estágio que se iniciam as modificações moleculares e bioquímicas que culminarão na diferenciação dos parasitos em vermes adultos. Espera-se, portanto, que no caminho rumo à diferenciação em vermes adultos, certa população de genes comece a ser expressa e outra população de genes deixe de ser expressa, ou tenha sua expressão modulada de alguma maneira. A SmLIMPETin, com efeito, deve pertencer à primeira população, já que sua expressão em esquistossômulos não pôde ser detectada por RT-PCR (pista 5-L).

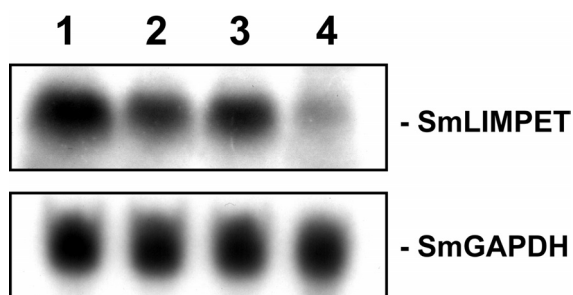


Figura 5.9 Quantificação da expressão do mRNA da SmLIMPETin em machos e fêmeas imaturos e maduros por *northern blot*.

1 – Vermes-machos adultos imaturos. 2 – Vermes-fêmeas adultos imaturos. 3 – Vermes-machos adultos maduros. 4 – Vermes-fêmeas adultos maduros.

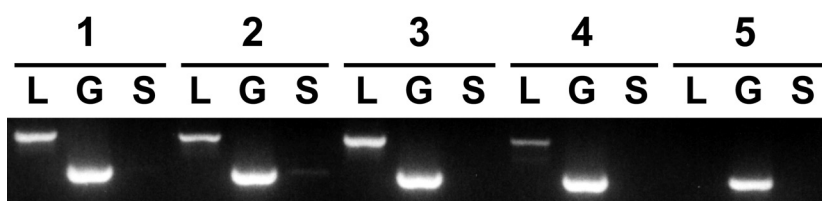


Figura 5.10 Expressão do mRNA da SmLIMPETin em machos e fêmeas adultos imaturos e maduros e em esquistossômulos estimada por RT-PCR semi-quantitativo.

L: SmLIMPETin. G: SmGAPDH. S: Reação utilizando como molde uma reação de síntese de cDNA em que não foi adicionada transcriptase reversa (sem RT). 1 – Vermes-machos adultos imaturos. 2 – Vermes-fêmeas adultos imaturos. 3 – Vermes-machos adultos maduros. 4 – Vermes-fêmeas adultos maduros. 5 – Esquistossômulos.

5.4 ANÁLISE DO GENE DA SMLIMPETIN POR SOUTHERN BLOT

De modo a determinar o perfil genômico da SmLIMPETin, efetuou-se uma hibridação por *southern blot*, utilizando-se como sonda um *amplicon* de RT-PCR derivado da seqüência parcial da SmLIMPETin.

A Figura 5.11 exhibe um padrão de bandas de tamanhos variados, com poucas bandas para cada digestão. Podem-se perceber bandas com intensidades diferentes em algumas das pistas. O mRNA da SmLIMPETin apresenta um sítio de restrição interno para a *Bgl*III (pista 2) e três sítios de restrição internos para a *Hinc*II (pista 6), e estas são as duas únicas enzimas cuja digestão apresenta mais de uma banda de alto peso com alta intensidade, o que é uma confirmação de digestão interna. A presença de íntrons no gene da SmLIMPETin, entretanto, não pode ser descartada, o que suscita a possibilidade de haver sítios de restrição dentro dos íntrons.

A presença de bandas com menor intensidade poderia ser explicada por hibridação cruzada da sonda de SmLIMPETin com outros membros da família das proteínas com domínios LIM, que podem estar presentes no genoma do *S. mansoni*. De fato, no banco de dados do transcriptoma do *S. mansoni* (VERJOVSKI-ALMEIDA, 2003) há pelo menos um contig, além do contig referente à SmLIMPETin, que tem uma ORF codificando uma proteína com domínios LIM (dado não-demonstrado).

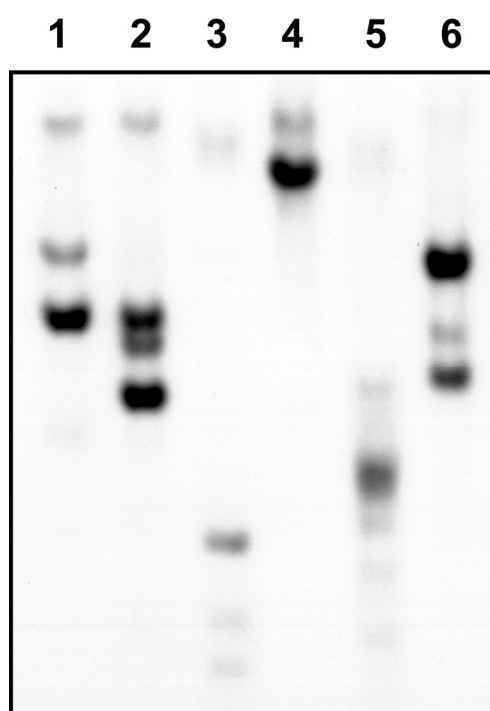


Figura 5.11 *Southern blot* da SmLIMPETin

1 – *Bam*HI. 2 – *Bgl*III. 3 – *Eco*RI. 4 – *Hae*III. 5 – *Hind*III. 6 – *Hinc*II. Todas as amostras continham 10 µg de DNA. A membrana foi hibridada com ³²P-SmLIMPETin, conforme descrito no tópico 3.16.

5.5 LOCALIZAÇÃO DA SMLIMPETIN EM VERMES ADULTOS DE *S. MANSONI* POR IMUNOHISTOQUÍMICA

Devido ao desconhecimento da função da proteína SmLIMPETin na biologia do *S. mansoni*, a determinação da sua localização no parasito era de extrema importância.

Com este intuito, resolvemos produzir anticorpos contra a SmLIMPETin recombinante em coelhos-fêmeas.

Para tal, a seqüência parcial da proteína GST-SmLIMPETin foi expressa em *E. coli* e purificada em uma coluna GSH-Sepharose, tendo sido utilizada para imunizar coelhas. Após 3 meses de incubação (vide tópico 3.26), o sangue dos animais foi recolhido, o soro foi separado e as IgGs totais foram purificadas em uma coluna de proteína A-Sepharose. Em seguida, as IgGs totais foram incubadas com excesso de GST para retirar os anticorpos anti-GST. Como consequência, obtivemos como eluato um anticorpo policlonal anti-SmLIMPETin não-reativo contra GST.

A Figura 5.12 mostra um *western blot* de extratos de *S. mansoni* incubado com este anticorpo. A banda majoritária co-migrou com a banda de 76 kDa do padrão de peso molecular, um valor próximo embora superior à massa estimada da proteína SmLIMPETin, que é de 64,75 kDa. Este valor acima do esperado pode ser explicado pela provável presença de modificações pós-traducionais, tais como fosforilação ou glicosilação ou simplesmente pelo comportamento da proteína mediante o fracionamento do extrato no gel de SDS-PAGE. É interessante observar que o sinal da banda correspondente ao extrato de fêmeas adultas é mais fraco, o que está de

acordo com os resultados apresentados na Figura 5.9 e Figura 5.10, nas quais ficou demonstrado que o mRNA da SmLIMPETins de fêmeas adultas maduras é menos expresso.

Para determinar a localização da SmLIMPETin foi feita uma imunohistoquímica de cortes de parasitos machos adultos seccionados no criostato, utilizando-se o anticorpo anti-GST-SmLIMPETin imuno específico descrito acima e um anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado ao corante fluorescente Cy3.

Pode-se observar na Figura 5.13 que a SmLIMPETin está presente de forma ubíqua nos tecidos do parasito, e que, aparentemente, não se encontra dentro do núcleo, mas somente no citoplasma. É importante notar que a marcação verde observada nos cortes é devida à fluorescência inespecífica dos parasitos, causada pela hemozoína (OLIVEIRA, 2000). Devido a uma ineficiência ou falta de ajuste dos filtros do microscópio, não foi possível eliminá-la diretamente. Entretanto, a partir da sobreposição da imagem de fluorescência inespecífica obtida pela passagem no filtro para Cy5 (imagem em verde) com a imagem da fluorescência específica (imagem em vermelho), foi possível fazer com que seja identificada: qualquer coloração verde ou amarelada da imagem mesclada corresponde à fluorescência inespecífica.

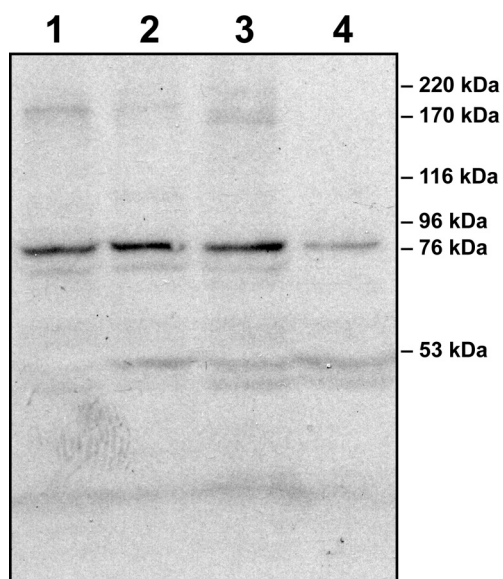
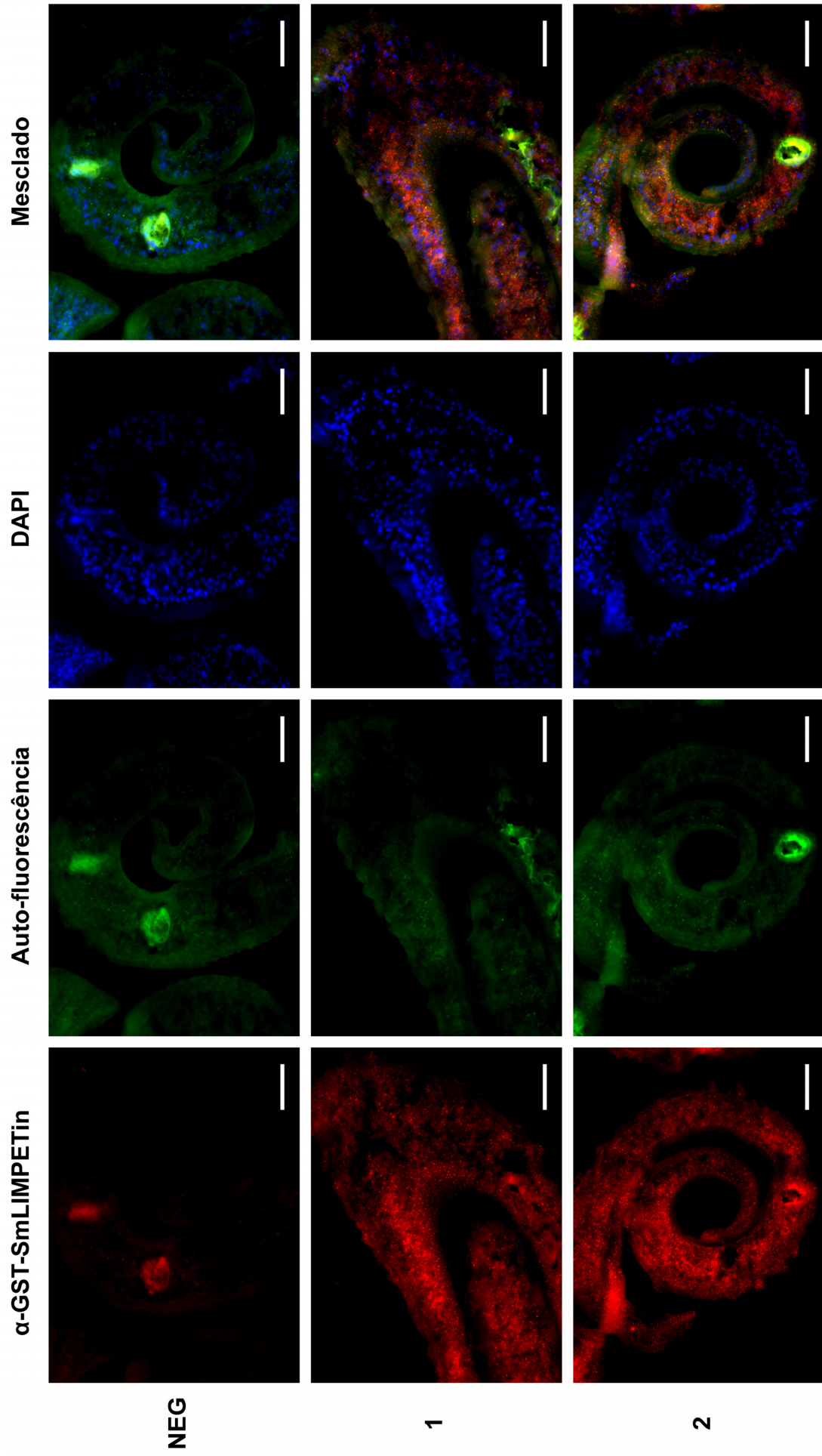


Figura 5.12 *Western blot* da SmLIMPETin.

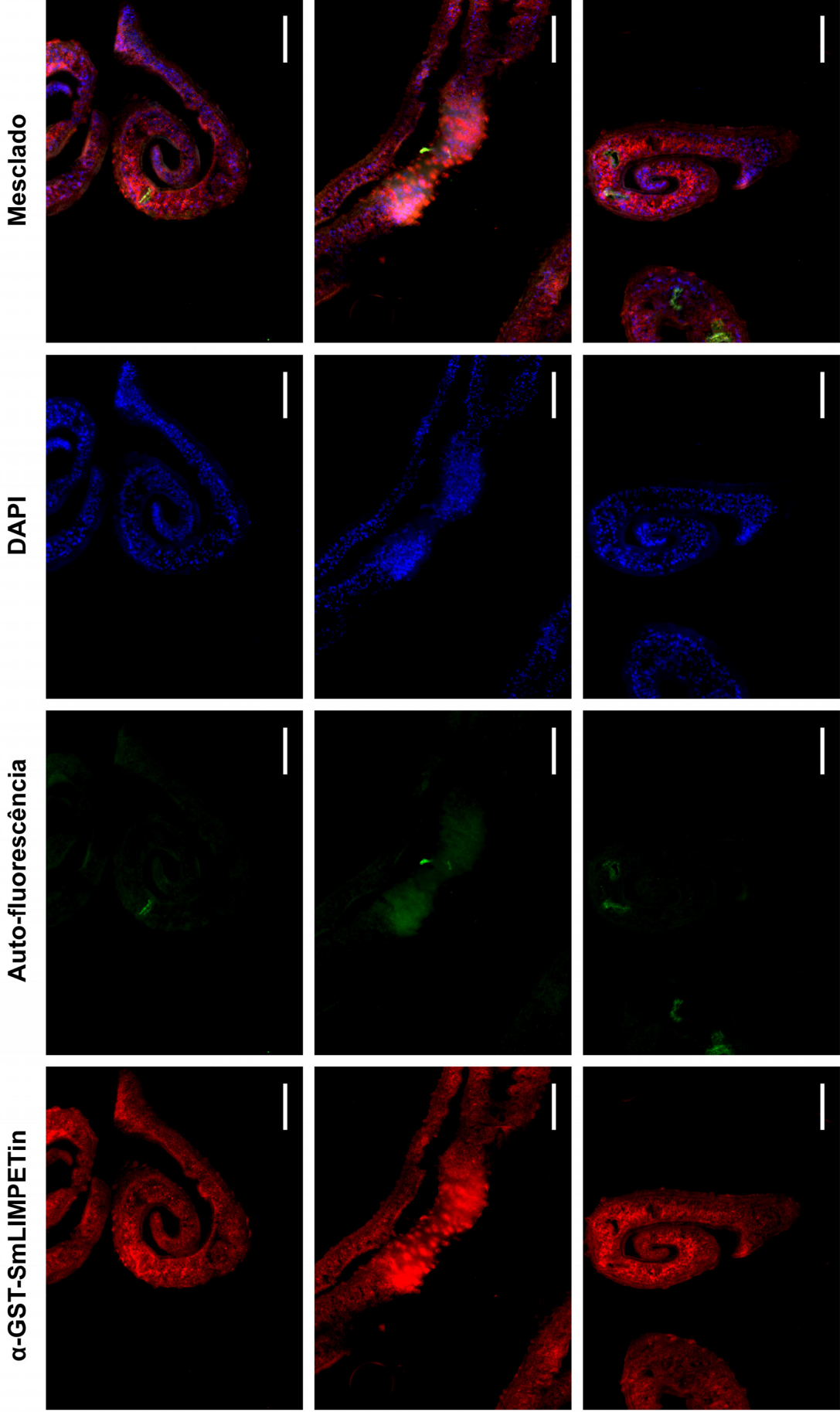
O extrato total de parasitos foi separado em um gel de poliacrilamida a 12% e transferido para uma membrana de PVDF. A membrana foi incubada com o anticorpo anti-GST-SmLIMPETin purificado diluído 1:50. 1 – Vermes-machos adultos imaturos. 2 – Vermes-fêmeas adultos imaturos. 3 – Vermes-machos adultos maduros. 4 – Vermes-fêmeas adultos maduros. Os valores à direita indicam as posições de migração das bandas dos padrões de peso molecular.

Figura 5.13 Imunohistoquímica de seções de vermes machos adultos de *S. mansoni* com o anticorpo anti-GST-SmLIMPETin purificado.

(Próximas duas folhas). NEG – Controle negativo sem o anticorpo primário. NEG, 1 e 2 – Objetiva de 40 X. 3, 4 e 5 – Objetiva de 20 X.



barra: 200 μ m



barra: 400 μ m

6 DISCUSSÃO

A discussão a seguir está dividida em duas partes. Na Parte I considera-se principalmente a identificação e caracterização de uma proteína relacionada à regulação nos níveis transcricional e pós-transcricional da expressão gênica de *S. mansoni*. A Parte II concentra-se na identificação e caracterização de um fator do *S. mansoni* cuja estrutura é peculiar e que, provavelmente, está envolvido no processo de diferenciação e desenvolvimento deste parasito.

6.1 PARTE I – A SMPRMT1

Como pôde ser apreciado no tópico 1.2.1, o ciclo de vida do *S. mansoni* é extremamente complexo. Para completá-lo com sucesso, o parasito tem que passar por etapas em dois hospedeiros. No hospedeiro intermediário, invertebrado, ele diferencia-se em esporocistos, que se multiplicam por divisão clonal. Já no hospedeiro definitivo, que no caso relevante à doença é o homem, o parasito diferencia-se em vermes adultos, bem mais complexos morfológica e funcionalmente (Figura 1.5). Além disso, entre estas fases, o parasito passa por dois estágios de vida livre: o miracídio, que nada à procura de um caramujo para infectar assim que sai do ovo, e a cercária, que é liberada pelo caramujo e nada à procura de um hospedeiro humano, penetrando ativamente em sua pele. Como é possível perceber ao comparar-se a Figura 1.7B com a Figura 1.9, os dois últimos possuem fenótipos consideravelmente distintos.

Toda essa complexidade implica em uma necessidade constante de adaptações, visto que o parasito é exposto às mais diversas condições ambientais no curso do seu ciclo de vida. Há de supor-se evidentemente que, para ser capaz de diferenciar-se em fenótipos tão distintos, o *S. mansoni* faça uso de mecanismos intrincados de regulação.

Com efeito, como seria uma espécie capaz de manter estados tão distintos ao ponto de exibir, ao longo de seus estágios, diferenças com relação à morfologia, aos tipos celulares, ao metabolismo, à adoção de vida livre ou vida parasitária e à multiplicação por reprodução assexuada ou reprodução sexuada?

Certamente, o *S. mansoni* alterna estes estágios complexos, nos quais suas células assumem características de diferenciação particulares, através da regulação de seu genoma.

Que componentes de suas células, portanto, estariam envolvidos neste processo regulatório? Como o parasito consegue ativar e reprimir os genes necessários à diferenciação de cada tipo celular e, mais ainda, coordenar os tipos celulares, a quantidade e o posicionamento das células que compõem cada estágio? Como ocorre o disparo, a transdução do sinal e a interpretação das informações que indicam que um estágio deve começar a diferenciar-se até tornar-se o estágio subsequente? Que moléculas, endógenas e exógenas, podem funcionar como estímulos ou sinalizadores para estes eventos?

Como é possível supor pela complexidade e número destas questões, muitos fatores devem, necessariamente, estar envolvidos na regulação do genoma do *S. mansoni*.

Não obstante, o panorama atual do conhecimento acerca deles é relativamente

limitado. Há algumas áreas, entretanto, onde vários avanços foram alcançados, como é o caso do estudo dos receptores nucleares de *S. mansoni*.

Um esforço significativo foi investido no intuito de identificar receptores nucleares de *S. mansoni* (tópico 1.2.7). Isto ocorreu porque, como pode ser verificado no tópico 1.2.5, o *S. mansoni* responde a diversos hormônios do hospedeiro, assim como a substâncias endógenas do próprio parasito, que têm efeitos variados na sua biologia, fisiologia e expressão gênica.

Muito ainda falta, entretanto, para que os mecanismos que regulam a expressão gênica neste parasito sejam elucidados. A falta de informação sobre promotores e fatores de transcrição como um todo, contribui deveras para este panorama.

O papel dos co-ativadores como mediadores da transcrição por receptores nucleares em vertebrados já é, atualmente, bem definido. Em eucariotos inferiores, incluindo o *S. mansoni*, entretanto, há poucas evidências sobre sua participação no controle da expressão gênica.

Visando contribuir para esta área do conhecimento, portanto, o grupo do Dr. Franklin D. Rumjanek e do Dr. Marcelo R. Fantappié vem trabalhando no sentido de identificar e caracterizar, funcional e estruturalmente, proteínas que possam ter um papel relevante na regulação transcricional por receptores nucleares de hormônios em *S. mansoni*.

Este grupo, de fato, já clonou e caracterizou alguns co-repressores e co-ativadores de receptores nucleares de *S. mansoni*, tais como a proteína SmSINA (FANTAPPIÉ, 2003), que está envolvida na ubiquitinação dos receptores nucleares SmRXR1 e

SmRXR2, com a conseqüente repressão da transcrição, e a proteína SmGCN5, uma lisina acetiltransferase que é capaz de monoacetilar as histonas H2A e H3 especificamente, contribuindo para a ativação da transcrição gênica (MACIEL, 2004). Outras proteínas co-reguladoras, tais como a *high mobility group B 1* (HMGB1), também estão sendo investigadas (dados não-publicados). Além disso, a recente indentificação de um provável receptor nuclear de ácido todo-trans-retinóico (RAR) de *S. mansoni* (VERJOVSKI-ALMEIDA e FANTAPPIÉ; dados não-publicados) adiciona um membro ao rol de receptores nucleares de *S. mansoni*. O RAR é um dos parceiros heterodiméricos canônico dos RXRs e, portanto, vai permitir a realização de diversos ensaios envolvendo o provável SmRAR, o SmRXR1, o SmRXR2 e os co-reguladores de *S. mansoni*, além de outros possíveis parceiros heterodiméricos do SmRXR recentemente identificados (WU, 2006).

Atualmente, a noção de que a regulação da transcrição gênica envolve uma plêiade de fatores trabalhando em várias etapas subseqüentes é plenamente estudada e aceita. De fato, a ativação da transcrição de um único gene de um eucarioto por receptores nucleares segue um número mínimo de etapas. Estas incluem, minimamente, a ligação de um hormônio ao seu receptor e a interação fraca inicial deste receptor com seu HRE alvo; o recrutamento de fatores de transcrição dependentes de ATP, como o complexo SWI/SNF; o remodelamento da cromatina que resulta, devido ao afrouxamento do DNA, no recrutamento subseqüente de outros fatores como os mediadores, fatores de alongamento, histona acetiltransferases (HATs) e histona metiltransferases (HMTs); e o recrutamento e

ativação da maquinaria basal de transcrição da RNA polimerase II. Todo este ciclo é repetido enquanto houver ligante para o receptor nuclear. Quando este, eventualmente, tem sua concentração diminuída, outros fatores – tais como componentes do proteassomo, proteínas de choque térmico (HSPs) e histona deacetilases (HDACs) – são recrutados para remover os fatores de ativação e retornar o DNA ao seu estado inicial de repressão da transcrição gênica (FOWLER, 2004).

A família das proteína arginina metiltransferases (PRMTs) compõe a grande família das histona metiltransferases (HMTs), juntamente com as histona lisina metiltransferases. Juntas, estas proteínas contribuem para o ciclo de ativação da transcrição gênica através de vários processos, inclusive, da metilação de histonas em resíduos de arginina.

Devido à importância das PRMTs no contexto da regulação da transcrição e ao número limitado de co-reguladores conhecidos de *S. mansoni*, a identificação de um cDNA parcial com homologia a PRMTs nos bancos de dados com ESTs deste parasito (Figura 4.1) foi uma descoberta importante. Apesar da considerável homologia desta seqüência parcial com a PRMT1 humana (Figura 4.2), sua identidade definitiva só foi confirmada após o alinhamento da seqüência integral deduzida de aminoácidos da PRMT1 de *S. mansoni* (SmPRMT1, Figura 4.4) com as seqüências completas de aminoácidos das PRMTs1 de várias outras espécies (Figura 4.5).

Mais do que isso, a árvore filogenética inferida a partir do alinhamento múltiplo da SmPRMT1 com PRMTs de 7 famílias (PRMT1 a PRMT7), permitiu que a classificação desta proteína como uma PRMT1 fosse inequívoca. O mais importante a observar na

Figura 4.6 é o agrupamento da SmPRMT1 no mesmo ramo das PRMTs1, o que não deixa dúvidas quanto à sua classificação e, portanto, sugere fortemente sua especificidade quanto ao substrato e com quais proteínas a SmPRMT1 deve interagir. A família PRMT8 não foi incluída na reconstrução de filogenia por apresentar inconsistências nas seqüências atualmente disponíveis nos bancos de dados.

A PRMT1 de mamíferos é uma proteína ubíqua, ou seja, é expressa em praticamente todos os tecidos. Em humanos, é capaz de atingir especificidade tecidual através de editoração alternativa, já que seu mRNA está presente em 3 isoformas cuja proporção é diferenciada, dependendo do tecido onde são expressas (SCORILAS, 2000). Já em camundongo, apesar de estar presente em 2 isoformas, elas são expressas de forma uniforme em todos os tecidos (PAWLAK, 2000). O mRNA da SmPRMT1 só está presente em uma isoforma (dados não-mostrados) e, devido à ubiquidade característica desta proteína em todos os organismos já testados, não esperávamos encontrar diferenças na expressão de seu mRNA entre os sexos dos parasitos adultos ou entre as fases do parasito. De fato, como pode ser observado no resultado apresentado na Figura 4.7, aparte de serem sexualmente maduros ou imaturos, a expressão do mRNA da SmPRMT1 nos parasitos é equivalente, independente do seu sexo.

Como foi discutido no tópico 1.4, há em mamíferos 8 proteínas da família das PRMTs (PRMT1-PRMT8). Nem todos os organismos, entretanto, possuem todos os membros desta família. A mosca da fruta *Drosophila melanogaster*, por exemplo, expressa a PRMT1, a PRMT3, a PRMT4/CARM1 e a PRMT7. Já o nematódeo de vida livre

Caenorhabditis elegans expressa a PRMT1, a PRMT5, a PRMT7 e a PRMT8. No entanto, somente a PRMT1 e a PRMT5 são expressas em todos os eucariotos estudados (TRIEVEL, 2004). Examinando a Figura 4.8, pode-se perceber que, além das bandas fortes presentes no *southern blot* com a sonda da PRMT1, existem outras bandas mais fracas. Se o *S. mansoni*, assim como a maioria dos eucariotos em que as PRMTs foram estudadas, expressar também uma PRMT5, é provável que as bandas mais fracas representem uma hibridação fraca deste gene com sonda da SmPRMT1. Como apoio a esta hipótese, deve-se observar que a identidade entre as seqüências de aminoácidos da PRMT1 e da PRMT5 é de, aproximadamente, 34% (LEE, 2005a).

Co-ativadores primários, tais como as proteínas da família p160, ligam-se diretamente aos receptores nucleares. Co-ativadores secundários são recrutados para o promotor por contato com um ativador primário e somente são capazes de aumentar ou promover um aumento de função dos receptores nucleares quando estão associados aos co-ativadores primários.

Os co-ativadores secundários PRMT1 e PRMT4/CARM1 fazem parte do complexo de co-ativação da transcrição por receptores nucleares em associação com os co-ativadores primários da família p160. Nós isolamos o cDNA parcial de um membro da família p160 que apresenta homologia com o co-ativador SRC-3/NCoA-3/p/CIP/ACTR/RAC3/TRAM1/AIB1 no *S. mansoni* (dados não-publicados). Entretanto, como não havíamos conseguido clonar a seqüência integral desta proteína quando da execução deste trabalho, optamos por utilizar a proteína SRC-1/NCoA-1 humana como modelo de co-ativador primário.

É consenso que a ativação da transcrição mediada por receptores nucleares é totalmente dependente da presença de co-ativadores da família p160. Koh *et al.* (2001) demonstraram que a PRMT1 pode ligar-se diretamente a receptores nucleares através de ensaios de *pull-down* com GST. Esta ligação, entretanto, mostrou-se insuficiente para que ocorresse o aumento da transcrição gênica mediada por receptores nucleares na ausência de um co-ativador primário.

Neste sentido, a observação de que a SmPRMT1 é capaz de interagir *in vitro* com a SRC-1 humana (Figura 4.13) está de acordo com o seu comportamento canônico. Além disso, a SRC-1 foi capaz de interagir com o receptor nuclear de *S. mansoni* SmRXR1 (Figura 4.12). A SmPRMT1, entretanto, não foi capaz de interagir diretamente com o SmRXR1 (Figura 4.11). A soma destes três experimentos de *pull-down* indica que, pelo menos neste caso, a formação de um complexo ternário é indispensável para a atividade da SmPRMT1 como co-ativadora. A participação da SmPRMT1 neste complexo indica que esta proteína deve estar envolvida na ativação *in vivo* mediada pelo receptor nuclear SmRXR1 em promotores de genes responsivos a hormônios do *S. mansoni*. De fato, como já foi discutido no tópico 1.3.3, o SmRXR1 é capaz de ligar-se *in vitro* ao promotor de um deste genes, o F10/p14, e de transativar a transcrição mediada por seu promotor, *in vivo* (FANTAPPIÉ, 2001; FREEBERN, 1999b).

Além disso, pode-se especular que a SmPRMT1 deve cooperar com outros co-ativadores do *S. mansoni*, como a SmGCN5 (MACIEL, 2004) e as recentemente

descritas SmCBP1 e SmCBP2 (BERTIN, 2006), em função de dados preliminares de nosso laboratório (dados não-publicados).

Apesar de metilarem histonas especificamente, como foi demonstrado para a SmPRMT1 na Figura 4.9, as PRMTs são também capazes de metilar uma grande quantidade de outras proteínas envolvidas tanto na regulação da transcrição gênica quanto em outras atividades celulares, como o processamento de RNA, a transdução de sinal e o reparo de DNA. Sabe-se também que a metilação de argininas regula interações proteína-proteína e transdução de sinal (BEDFORD, 2005). Uma característica comum a muitas destas proteínas é a presença de um motivo de ligação a RNA rico em argininas denominado motivo rico em glicinas e argininas (motivo GAR^{ssss}). Os motivos GAR são normalmente encontrados em conjunção com domínios RNP (KIM, 1997) e têm-se demonstrado que sua presença aumenta a afinidade das proteínas que o contêm ao RNA (ARAYA, 2005). Além disso, os motivos GAR são alvos de metilação pelas PRMTs.

Deste modo, decidimos testar a capacidade da SmPRMT1 de metilar e de interagir com duas proteínas de ligação a RNA de *S. mansoni*, a proteína de ligação ao Y-box SMYB1, previamente caracterizada (FRANCO, 1997; VALADÃO, 2002), e a provável SmSM-D3, através de seus motivos GAR.

A Figura 4.15 mostra incontestavelmente que tanto a SMYB1 quanto a SmSM-D3 são metiladas pela SmPRMT1, provavelmente em seus motivos GAR. A suposição de que a metilação ocorre nos motivos GAR é amparada pelo fato de que o construto

^{ssss} Em inglês: *glycine and arginine-rich motifs*

SMYB1-CSD, que não contém este domínio, não é metilado pela SmPRMT1 (Figura 4.15A, pista 3).

Nos ensaios de *pull-down* da Figura 4.16, ficou demonstrado que a SmPRMT1 interage fisicamente tanto com SMYB1 quanto com a SmSM-D3. Como é sabido que interações proteína-proteína são mediadas por motivos GAR e que a metilação modula estas interações, é lógico concluir que as interações entre a SmPRMT1 e a SMYB1 e entre a SmPRMT1 e a SmSM-D3 estejam ocorrendo através deste domínio. De fato, outros ensaios de *pull-down* demonstraram que a SmSM-D3 é capaz de interagir com a SMYB1-full e a SMYB1-tail, mas interage de forma muito fraca com a SMYB1-CSD (FRANCO; resultados não-publicados).

A metilação das proteínas centrais do editorassomo* SmD1/D2, SmD3 e B/B' tem sido implicada como um mecanismo fundamental na biogênese das snRNPs (MIRANDA, 2004a). Devido à conservação da seqüência de aminoácidos da proteína de *S. mansoni* SmSM-D3 com relação aos seus homólogos (a identidade entre a SmSM-D3 e as SmD3 de vários organismos é de cerca de 70%; dados não-demonstrados), foi possível prever que a SmSM-D3 deve ter conservado sua função. Entretanto, é preciso observar que a metilação das proteínas do editorassomo SmD1/D2, SmD3 e B/B' foi descrita somente para a proteína arginina metiltransferase do tipo II PRMT5, que catalisa a formação de ω -N^G,N'^G-dimetilarginina simétrica (MIRANDA, 2004a). A metilação da SmSM-D3 pela proteína arginina metiltransferase do tipo I SmPRMT1 deve possuir funções alternativas. Deste modo, é interessante citar que uma proteína

* Tradução livre do autor para o termo em inglês *spliceosome*.

é interessante citar que uma proteína de ligação à partícula U5 snRNP foi identificada como sendo um co-ativador para o receptor de androgênio (ZHAO, 2002).

O significado bioquímico da metilação da SMYB1 não é conhecido, atualmente, mas vários papéis podem ser propostos. Espera-se, por exemplo, que a introdução de um grupamento metila ao nitrogênio da guanidina da arginina seja responsável por enfraquecer as ligações de hidrogênio entre as proteínas e o RNA. Como foi demonstrado que a SMYB1 é uma proteína de ligação ao RNA com possíveis atuações na transcrição e no tráfico intracelular de proteínas (VALADÃO, 2002), a metilação da SMYB1 pela SmPRMT1 pode ter um efeito direto sobre estes mecanismos.

6.2 PARTE II – A SMLIMPETIN

Como foi explorado no tópico 1.2.4, o *S. mansoni* é uma espécie dióica, cuja diferenciação sexual só é claramente perceptível nas formas adultas. A diferenciação sexual das fêmeas adultas é totalmente dependente da presença dos machos e um casal de parasitos adultos pode viver em cópula constante por muitos anos. A fêmea libera cerca de 300 ovos por dia e como cerca de 50% deles não é excretada, acabam por alojar-se na parede dos intestinos, no baço e no fígado do hospedeiro definitivo, onde levam à formação de infiltrados de células que, eventualmente, evoluem a granulomas, obstruindo a passagem de sangue. O acúmulo de granulomas leva a uma condição grave em que podem ocorrer lesões vasculares por obstrução,

hipertensão do sistema porta e ascite, podendo evoluir até mesmo para o óbito (tópico 1.2.2). Deste modo, a comunidade científica de pesquisa sobre a esquistossomose tem procurado isolar genes que possam estar envolvidos com todas as etapas necessárias à ovoposição, já que o ovo, e não a presença dos parasitos adultos *per se*, é o causador da doença.

Com este intuito, resolvemos investigar se o *S. mansoni* possuía um gene encontrado em mamíferos cuja expressão é exclusiva em células germinativas masculinas, já que sua presença no parasito poderia significar um alvo de terapias visando a interrupção da fertilização e, por consequência, da ovoposição.

Este gene, o ativador do CREM no testículo (ACT), é um co-ativador do elemento responsivo a AMP cíclico (CREM). O CREM (FOULKES, 1992) é um componente essencial de um complexo de transcrição que inclui o fator de transcrição IIA (TFIIA; DE CESARE, 2003) e o ACT (FIMIA, 1999). O ACT é expresso especificamente em espermátides haplóides arredondadas e alongadas (FIMIA, 1999). A localização subcelular do ACT é regulada pela proteína motora cinesina KIF17b, que se co-localiza com o ACT nas espermátides haplóides e medeia o transporte de ACT do núcleo para o citoplasma durante o alongamento das espermátides (MACHO, 2002). O perfil de expressão do ACT sobrepõe-se integralmente com o do CREM, e a realocação do ACT para o citoplasma, mediada pelo KIF17b, está correlacionada com o término da transcrição dos genes regulados pelo CREM (FIMIA, 1999; MACHO, 2002).

A isoforma CREM τ é altamente expressa em células germinativas masculinas (FOULKES, 1992) e ativa a expressão de muitos dos genes pós-meióticos tais como aqueles que codificam protaminas e proteínas de transição (SASSONE-CORSI, 1998). Muitos genes pós-meióticos contêm elementos responsivos a AMP cíclico (CREs) em seus promotores e as células germinativas de camundongos nocauteados no gene que codifica para a CREM τ têm seu desenvolvimento bloqueado no primeiro estágio da espermiogênese (BLENDY, 1996; NANTEL, 1996).

O CREM, assim como a proteína de ligação ao elemento responsivo a AMP cíclico (CREB), medeiam a ativação de genes responsivos a AMP cíclico através de sua ligação como dímeros a uma seqüência de DNA presente na região promotora destes genes denominada elemento responsivo a AMP cíclico (CRE), cuja seqüência canônica consiste no palíndromo TGACGTCA (MONTMINY, 1986).

Em células somáticas, a fosforilação da CREM no resíduo de serina 117 (DE GROOT, 1993) e da CREB no resíduo de serina 133 (GONZALEZ, 1989) é indispensável para que elas promovam a ativação da transcrição induzida pelo AMP cíclico. Mediante a fosforilação, ocorre o recrutamento da proteína co-reguladora CBP/p300 (ARIAS, 1994; CHRIVIA, 1993) que, por sua vez, acetila histonas e recruta co-ativadores, o que leva ao remodelamento da cromatina e ao recrutamento e ativação da maquinaria basal de transcrição, culminando na transcrição do mRNA alvo.

Já em células germinativas, onde seu mRNA é expresso em altos níveis, a CREM τ se associa ao seu co-ativador ACT e ao fator geral de transcrição TFIIA (DE CESARE, 2003), ativando a transcrição do gene alvo de uma maneira independente da sua

fosforilação no resíduo de serina 117 e do recrutamento subsequente da CBP (FIMIA, 1999; PALERMO, 2001).

A presença de proteínas no extrato nuclear do *S. mansoni* capazes de ligar-se especificamente ao oligonucleotídeo com a seqüência consenso do CRE, tanto em machos adultos (Figura 5.1) quanto em fêmeas adultas (Figura 5.2), é um indicativo de que o parasito possui uma, ou algumas proteínas, que desempenham papéis semelhantes ao CREM ou à CREB. Obviamente, devido ao caráter genérico deste experimento, não é possível afirmar que proteínas são essas. Entretanto, já que o objetivo do trabalho era isolar o homólogo do ACT no *S. mansoni* e como sua ação é dependente da ligação do CREM à seqüência promotora CRE, a indicação de que existem uma ou mais proteínas com funcionalidade semelhante a ela neste parasito constitui um dado relevante.

O ACT, também conhecido como FHL5, pertence a uma família de proteínas que contêm exclusivamente domínios LIM, à qual pertencem também a *four-and-a-half LIM domains 1* (FHL1), a FHL2, a FHL3 e a FHL4. O padrão de expressão das FHLs é tecido-específico, com a FHL1/SLIM1 sendo quase ubíqua, enquanto que a FHL2/DRAL/SLIM3 é expressa predominantemente no coração, a FHL3/SLIM2 em músculo esquelético e a FHL4 nos testículos (CHAN, 1998; CHU, 2000; FIMIA, 2000; LEE, 1998; MORGAN, 1999a; MORGAN, 1999b).

A presença de uma EST (Figura 5.3) com homologia ao FHL5/ACT murino (Figura 5.4) no banco de dados de ESTs de *S. mansoni* permitiu que a seqüência completa de cDNA equivalente a esta EST fosse isolada (Figura 5.6). Quando a seqüência

deduzida de aminoácidos foi submetida a um alinhamento local (BLASTP) contra o banco de dados de seqüências de proteínas não-redundante (nr) do GenBank, entretanto, ela apresentou um grau de homologia considerável com outras proteínas da família do FHL5/ACT, principalmente com a FHL2/DRAL/SLIM3, além de apresentar um grau menos expressivo de homologia com outras proteínas com domínios LIM, que possuem também um domínio PET, como a Testina e a LMCD1 (dados não-demonstrados).

As proteínas com maior grau de homologia com a seqüência isolada de *S. mansoni*, entretanto, eram proteínas de invertebrados não-classificadas, que tinham em comum o fato de possuírem 5 domínios LIM e um domínio PET mais próximo ao N-terminal. A Figura 5.7 exhibe o alinhamento da proteína com domínios LIM e PET de *S. mansoni* com proteínas com domínios LIM e PET de outros 6 invertebrados.

A Figura 5.8 demonstra a reconstrução da filogenia entre as LIMPETins e as FHLs, seus homólogos em vertebrados, e demonstra claramente que a proteína com domínios LIM e PET de *S. mansoni* e as proteínas com domínios LIM e PET dos outros invertebrados analisados se agrupam em uma ramificação da árvore filogenética. Considerando-se a expressiva separação entre os ramos e o alto valor de *bootstrap* (99%, 1000 replicatas) na divisão desta ramificação, é possível inferir que estas proteínas compõem uma nova família. Devido à presença dos 6 domínios LIM e do domínio PET e ao fato de que somente são encontradas no genoma de invertebrados, denominamos esta família: “proteína com domínios LIM e PET de

invertebrados” (LIMPETin). A proteína com domínios LIM e PET de *S. mansoni* denomina-se, portanto, SmLIMPETin.

O domínio PET consiste em uma seqüência conservada de aminoácidos encontrada primeiramente nas proteínas Prickle e Espinas de *Drosophila* (GUBB, 1999) e na proteína Testina de camundongo (DIVECHA, 1995), cujas iniciais foram usadas para cunhar o acrônimo que o denomina (KADRMAS, 2004). Acredita-se que sua função envolva interações proteína-proteína; esta hipótese, entretanto, ainda não foi comprovada. Este domínio é encontrado sempre no N-terminal de proteínas que também contêm domínios LIM (vide o nº de aquisição do Pfam [PF06297](#)) e foi identificado somente em proteínas de metazoários, até o momento (vide o nº de aquisição do InterPro [IPR010442](#)).

Interessantemente, a proteína FHL2/DRAL/SLIM3 de *Branchiostoma floridae*, denominada *AmphiDRAL* (SCHUBERT, 1998), agrupou-se com as LIMPETins, apesar de sua seqüência de aminoácidos corresponder somente à parte C-terminal das seqüências deduzidas de aminoácidos das LIMPETins; ou seja, mesmo com menos aminoácidos para serem comparados pelo algoritmo de reconstrução de filogenia, esta proteína agrupou-se com as LIMPETins. Portanto, Schubert *et al.* (1998) certamente por falta de disponibilidade de seqüências para comparação, à época, classificaram esta proteína erradamente como uma FHL2/DRAL/SLIM3. Entretanto, como sua seqüência é pouco extensa em comparação com as outras LIMPETins, não apresentando o domínio PET na porção N-terminal, há duas possibilidades a serem consideradas: ou a seqüência está incompleta, ou esta proteína realmente não possui

este domínio. Se o segundo caso for verdadeiro, pode ser considerada a hipótese de que as LIMPETins são precursoras das proteínas da família *four-and-a-half LIM domains*, que são encontradas somente em vertebrados. Nesta hipótese, haveria ocorrido a perda da porção N-terminal, onde está localizado o provável domínio PET, durante a evolução. Neste caso, a LIMPETin de *B. floridae*, que é um anfioxo, poderia representar um primeiro passo neste sentido, já que os cefalocordados são os invertebrados mais próximos aos vertebrados na escala evolutiva. Estas suposições encontram suporte no fato de que a porção N-terminal das LIMPETins apresenta uma baixa percentagem global de homologia (Figura 5.7), o que indica que as mutações acumuladas durante a diferenciação dos taxa não ocasionou perdas de função significativas. A eventual perda desta porção poderia ocorrer, destarte, de uma forma menos danosa à função destas proteínas, o que não seria possível nas porções mais conservadas.

A procura por mRNAs diferencialmente expressos entre os estágios e, principalmente, entre os sexos dos vermes adultos *S. mansoni* é um objetivo dos pesquisadores que estudam este parasito desde o advento das técnicas de biologia molecular. Isto porque qualquer proteína que possa influenciar a diferenciação do parasito de um estágio a outro ou a maturação sexual das fêmeas adultas é um potencial alvo terapêutico para a esquistossomose. Observando a Figura 5.9 fica claro que as fêmeas adultas sexualmente maduras de *S. mansoni* apresentam uma expressão sensivelmente menos intensa do mRNA da SmLIMPETin relativamente às fêmeas imaturas e aos machos maduros e imaturos. Mais do que isso, a Figura 5.10,

além de corroborar estes dados, demonstra que a expressão do mRNA da SmLIMPETin pelos esquistossômulos é indetectável por RT-PCR. Portanto, se os esquistossômulos não expressam SmLIMPETin, é muito provável que esta proteína esteja envolvida como um co-ativador com algum ativador da transcrição importante na diferenciação do parasito ou como uma proteína associada ao músculo, como é o caso da FHL3, por exemplo (CHU, 2000). A segunda hipótese baseia-se nos dados apresentados na Figura 5.13. A SmLIMPETin aparenta ser ubíqua, sendo expressa em praticamente todo o corpo do parasito. Além disso, aparenta ser predominantemente citoplasmática, já que não é possível observar sobreposição do sinal do anticorpo anti-SmLIMPETin (coloração vermelha) com a do corante específico para núcleo DAPI (coloração azul). Infelizmente, a imunohistoquímica só pôde ser realizada com vermes machos adultos, devido à alta emissão de fluorescência inespecífica pelas fêmeas adultas, o que ocorre pelo excesso de hemozoína em seus tubos digestivos (OLIVEIRA, 2000).

A SmLIMPETin apresenta, no entanto, um provável sinal de localização nuclear (NLS) em sua seqüência deduzida de aminoácidos (Figura 5.6, em vermelho). Isto pode indicar que, mediante um sinal específico, a SmLIMPETin seja translocada para o núcleo, para desempenhar algum papel de regulação da expressão gênica, provavelmente como um co-ativador, assim como um de seus parentes em vertebrados, a FHL2/DRAL/SLIM3 (MORLON, 2003). Os autores deste trabalho concluem, através de experimentos de inibição da exportação nuclear ativa, que a FHL2 é, pelo menos em parte, exportada do núcleo pelo sistema exportina/CRM1. No

caso da SmLIMPETin, ocorreria a importação nuclear mediada por importina (XU, 2004b), já que o sinal presente nesta proteína é um provável NLS e não um sinal de exportação nuclear (NES). Interessantemente, o provável NLS da SmLIMPETin está localizado aproximadamente no centro de seu domínio PET (Figura 5.6, em vermelho sobre preto), o que pode ter algum significado funcional, já que especula-se que o domínio PET esteja envolvido em interações proteína-proteína (GUBB, 1999). Além disso, após submissão de todas as LIMPETins estudadas neste trabalho ao software [PredictNLS](#) (COKOL, 2000), concluiu-se que somente a SmLIMPETin possui este provável NLS, o que é realmente intrigante.

Em um estudo sobre as interações proteína-proteína (interactoma*) da mosca da fruta *Drosophila melanogaster* por duplo-híbrido em levedura (GIOT, 2003), foi demonstrado que a LIMPETin B/G de *D. melanogaster* (n^{os} de aquisição do GenBank [NP_648930/NP_996110](#)) interage com várias proteínas, dentre elas, com a string locus (stg) que é o homólogo em *D. melanogaster* da proteína CDC25B (uma interação forte, de acordo com o autor). Curiosamente, a CDC25B2 humana é capaz de interagir com a FHL3 humana (MILS, 2003), o que apóia fortemente a hipótese de que a stg/CDC25B de *D. melanogaster* interaja *in vivo* com a LIMPETin B/G deste inseto através de seus domínios LIM.

As proteínas CDC25 (CDC25A, B e C) pertencem a uma família de fosfatases com dupla especificidade que estão envolvidas no controle do progresso do ciclo celular através da remoção dos fosfatos da treonina 14 e da tirosina 15 das cinases

* Tradução livre do autor para o termo em inglês: *interactome*.

dependentes de ciclina (CDKs). As CDKs, em consequência disto, passam a promover a progressão do ciclo celular. A CDC25A e a CDC25B são superexpressas em diversos tumores, o que se imagina ser uma consequência direta de sua atuação no ciclo celular (NGAN, 2003). Principalmente a CDC25B é encontrada superexpressa, e Ma *et al.* (MA, 2001b) demonstraram que seu papel como oncogene está diretamente ligado à sua função como co-ativadora de receptores nucleares de esteróides, na qual age de forma sinérgica com a CBP/p300 e a P/CAF (CHUA, 2004). O *S. mansoni* possui uma EST semelhante à stg (SmAE [605270.1](#)) no banco de dados de seu transcriptoma (VERJOVSKI-ALMEIDA, 2003). A interação da SmLIMPETin com um provável homólogo de CDC25B em *S. mansoni*, poderia estar, portanto, influenciando a expressão gênica mediada por receptores nucleares.

Uma interação adicional da LIMPETin de *D. melanogaster* foi detectada em outro projeto de interactoma, realizado pela empresa [Hybrigenics](#) (FORMSTECHEER, 2005). Neste trabalho foi demonstrada sua interação com a proteína Dishevelled (dsh) isoforma A. A proteína Dishevelled é um componente essencial das vias de sinalização da Wingless de *Drosophila*/Wnt de mamíferos, participando de todas as três vias: a canônica, a não canônica (envolvida com a determinação da polaridade das células planares) e a dependente de Ca²⁺. A proteína Wnt liga-se ao receptor de membrana Frizzled (Fz) e a seus co-receptores *lipoprotein-related receptor proteins* (LRPs), dentre os quais se incluem o Arrow de *Drosophila* e as LRP5 e 6 de vertebrados. Mediante a ligação de Wnt a esses receptores, ocorre a transdução do sinal para a Dishevelled, que havia sido translocada do núcleo para o citoplasma

(ITOH, 2005). Dishevelled, por sua vez, passa adiante o sinal de maneiras diferentes, dependendo da via utilizada. Na via canônica, Dishevelled bloqueia a fosforilação da proteína β -catenina, o que leva ao embargo de sua degradação pelo proteassomo e a seu conseqüente acúmulo no citoplasma. Desta forma, a β -catenina passa a ser translocada para o núcleo, onde se complexa com os membros da família LEF/TCF de fatores de transcrição, induzindo assim a ativação da transcrição de seus genes alvo (WALLINGFORD, 2005).

O *S. mansoni* possui ESTs semelhantes à Wnt (SmAE [603042.1](#)), à Dishevelled (SmAE [609594.1](#) e SmAE [612216.1](#)) e à β -catenina (SmAE [600257.1](#) e SmAE [607405.1](#)) no banco de dados de seu transcriptoma (VERJOVSKI-ALMEIDA, 2003). Além disso, é bem descrito que o *S. mansoni* tem homólogos de RAS (KAMPKOTTER, 1999; OSMAN, 1999), que são transdutores de sinal dos receptores do tipo tirosina cinases (RTKs) e de SMADS (BEALL, 2000; OSMAN, 2001, 2004), que são transdutores de sinal da via do *transforming growth factor*- β (TGF- β). Mais ainda, recentemente foram descritas moléculas semelhantes ao TGF- β em *Schistosoma japonicum*, parasito do mesmo gênero do *S. mansoni* (HIRATA, 2005).

Ora, se o *S. mansoni* utiliza duas vias canônicas como as do TGF- β e das RTKs, é razoável prever que ele possa utilizar também pelo menos uma das vias do Wnt. A interação da SmLIMPETin com a provável Dishevelled de *S. mansoni* poderia ter, neste caso, um papel importante na modulação desta via.

Não se pode ignorar, também, que a SmLIMPETin é uma proteína muito homóloga às proteínas da família FHL na porção C-terminal que contém os 6 domínios LIM

(Figura 5.6). FHL2, FHL3 e FHL5/ACT são capazes de atuar como co-ativadores na ativação da transcrição dependente de CBP mediada por CREB (FIMIA, 2000). A possível atividade de SmLIMPETin como um co-ativador associado a CREB e CBP/p300 em *S. mansoni* deve, portanto, ser considerada. Recentemente, demonstramos a presença de duas isoformas funcionais da CBP/p300 em *S. mansoni*, a SmCBP1 e a SmCBP2 (BERTIN, 2006). Quanto à CREB, não há nenhum relato da presença de um homólogo seu em *S. mansoni*, a não ser por uma EST ([SmAE703403.1](#)), com baixa percentagem de homologia. A Figura 5.1 e a Figura 5.2, entretanto, mostram claramente a presença de proteínas capazes de ligar-se ao CRE no núcleo de *S. mansoni*. Estes dados sugerem que seu papel como co-ativadora na ativação da transcrição dependente de CBP mediada por um fator de transcrição semelhante à CREB em *S. mansoni* é uma possibilidade que deve ser explorada.

7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

7.1 PARTE I – A SmPRMT1

A caracterização da SmPRMT1 permitiu que fossem abordados vários aspectos da biologia molecular do *S. mansoni*. Em primeiro lugar, ficou comprovada a presença de uma histona metiltransferase em esquistossomos, uma classe de enzimas que não havia sido descrita em parasitos. A SmPRMT provou ter atividade catalítica *in vitro*, já que foi capaz de metilar a histona H4, seu substrato canônico. Mediante experimentos de *pull-down* com proteínas fusionadas a GST e 6xhis, provou-se que a SmPRMT1 é capaz de interagir *in vitro* de forma indireta com um receptor nuclear de *S. mansoni*, o SmRXR1, o que apóia seu papel como co-ativadora secundária da transcrição mediada por receptores nucleares em *S. mansoni*. Ademais, sua forte atividade de arginina metiltransferase sobre os domínios GAR das proteínas de ligação ao RNA SMYB1 e Sm-SMD3 e sua interação com estas proteínas, demonstrada por *pull-down* com proteínas fusionadas a GST, comprovam seu papel no processamento e, provavelmente, no transporte de RNA no *S. mansoni*.

Qual seria, entretanto, o papel global da SmPRMT1 na biologia do *S. mansoni*? Que novas interações podem ser estabelecidas e que novas implicações elas poderiam trazer? Como foi discutido no tópico 1.2.7, além dos receptores já descritos de *S. mansoni*, vários novos receptores foram recentemente descritos por Wu *et al.* (WU, 2006). A funcionalidade destes receptores está ainda começando a ser testada, mas já representa uma janela de possibilidades para novas atuações da SmPRMT1 na

ativação da transcrição por receptores nucleares. Sua interação com cada um destes receptores pode ser testada, além de sua atividade *in vivo* em ensaios de transativação, já bem estabelecidos para receptores nucleares de *S. mansoni* (BERTIN, 2004; BERTIN, 2005).

Outro experimento cuja realização seria informativa é o ensaio de interação entre a SmPRMT1 e as recentemente isoladas SmCBP1 e SmCBP2 (BERTIN, 2006). Canonicamente, a CBP/p300 faz parte do complexo de ativação que inclui pelo menos, os receptores nucleares, os co-ativadores da família p160 e a PRMT1 ou PRMT4/CARM1 (KOH, 2001). Por fim, como já foi dito na Parte I da discussão, isolamos um clone em *S. mansoni* equivalente ao co-ativador SRC-3/NCoA-3/p/CIP/ACTR/RAC3/TRAM1/AIB1 (dados não publicados). Evidentemente, incluí-lo nos experimentos de interação entre a SmCBP1/SmCBP2 e a SmPRMT1 e em ensaios de transativação envolvendo estes componentes e um receptor nuclear de *S. mansoni* representariam ensaios *in vitro* e *in vivo* ideais para caracterizar este complexo com proteínas nativas de *S. mansoni*, o que seria fundamental para o estudo do mecanismo de funcionamento da transcrição mediada por receptores nucleares neste parasito.

7.2 PARTE II – A SMLIMPETIN

O isolamento do mRNA da SmLIMPETin chamou-nos a atenção para uma família de proteínas sobre a qual pouco foi estudado. Através da reconstrução da filogenia entre a SmLIMPETin, seus homólogos em invertebrados e as famílias de FHLs de

vertebrados, pudemos constatar que as proteínas de invertebrados, SmLIMPETin inclusive, se agrupavam em uma nova família, nunca antes descrita na literatura, que denominamos “proteína com domínios LIM e PET de invertebrados”, ou LIMPETin.

Além disso, o mRNA da SmLIMPETin se destaca por ser menos expresso em fêmeas adultas do que em machos adultos de *S. mansoni*, além de não ter sido detectado em esquistossômulos por RT-PCR, o que implica que a proteína SmLIMPETin pode estar envolvida com os mecanismos de maturação sexual das fêmeas, por vias ainda não identificadas.

Muitas perspectivas estão abertas. A expressão de SmLIMPETin em linhagens celulares seria importante para testar a funcionalidade do seu provável NLS mediante estímulos externos, tais como o soro do hospedeiro definitivo e a proteína Wnt. Afinal, como foi discutido, o *S. mansoni* tem em seu banco de dados do transcriptoma vários componentes das vias de sinalização da Wnt e o homólogo da SmLIMPETin interage com Dishevelled, em *Drosophila*. É provável, portanto, que esta sinalização seja responsável por induzir a translocação da SmLIMPETin para o núcleo.

A interação do homólogo da SmLIMPETin com a stg (CDC25B) em *Drosophila* é um dado relevante e, mediante o isolamento do cDNA do homólogo de stg/CDC25B em *S. mansoni*, sua interação com SmLIMPETin deve ser testada. Interessantemente, tanto a CDC25B de vertebrados (CHUA, 2004) quanto um dos homólogos de SmLIMPET em vertebrados, a FHL2/DRAL/SLIM3 (MÜLLER, 2000), atuam como co-ativadores de receptores nucleares. Mais ainda, a FHL2, a CBP/p300 e a β -catenina de

vertebrados são capazes de aumentar sinergicamente a atividade da transcrição mediada por receptores nucleares em vertebrados (MÜLLER, 2000). Há, portanto, a possibilidade de que um provável homólogo de stg/CDC24B de *S. mansoni*, um provável homólogo de β -catenina de *S. mansoni* ou a SmLIMPETin atuem como co-ativadores de receptores nucleares neste parasito. Mais ainda, devido à interação descrita entre seus homólogos em *Drosophila*, há a possibilidade de que atuem em conjunto, de forma sinérgica. Testar esta função em ensaios de potencialização da transativação mediada por receptores nucleares de *S. mansoni* em linhagens celulares seria promissor, portanto.

Por fim, deveria ser feito um esforço no intuito de isolar o homólogo de CREB ou de CREM em *S. mansoni*. Sua provável interação com SmLIMPETin pode significar a existência de uma via de ativação da transcrição inexplorada em *S. mansoni*, com implicações no desenvolvimento e na diferenciação do parasito. Além disso, a modulação desta via poderia ser mais um alvo terapêutico contra a esquistossomose.

REFERÊNCIAS

- ADAMSON, P. B. Schistosomiasis in antiquity. **Med. Hist.**, v. 20, n. 2, p. 176-188, Apr, 1976.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**. 4th ed. New York: Garland Science, 2002. 1616 p.
- ALEXEEV, A.; MAZIN, A.; KOWALCZYKOWSKI, S. C. Rad54 protein possesses chromatin-remodeling activity stimulated by the Rad51-ssDNA nucleoprotein filament. **Nat. Struct. Biol.**, v. 10, n. 3, p. 182-186, Mar., 2003.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MEYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic Local Alignment Search Tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, n. 3, p. 403-410, Oct. 5, 1990.
- AMENTE, S.; NAPOLITANO, G.; LICCIARDO, P.; MONTI, M.; PUCCI, P.; LANIA, L.; MAJELLO, B. Identification of proteins interacting with the RNAPII FCP1 phosphatase: FCP1 forms a complex with arginine methyltransferase PRMT5 and it is a substrate for PRMT5-mediated methylation. **FEBS Lett.**, v. 579, n. 3, p. 683-689, Jan. 31, 2005.
- AN, W.; KIM, J.; ROEDER, R. G. Ordered Cooperative Functions of PRMT1, p300, and CARM1 in Transcriptional Activation by p53. **Cell**, v. 117, n. 6, p. 735-748, Jun. 11, 2004.
- ANZICK, S. L.; KONONEN, J.; WALKER, R. L.; AZORSA, D. O.; TANNER, M. M.; GUAN, X.-Y.; SAUTER, G.; KALLIONIEMI, O.-P.; TRENT, J. M.; MELTZER, P. S. AIB1, a Steroid Receptor Coactivator Amplified in Breast and Ovarian Cancer. **Science**, v. 277, n. 5328, p. 965-968, Aug. 15, 1997.
- ARANDA, A.; PASCUAL, A. Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. **Physiol. Rev.**, v. 81, n. 3, p. 1269-1304, Jul. 1st, 2001.
- ARAYA, N.; HIRAGA, H.; KAKO, K.; ARAO, Y.; KATO, S.; FUKAMIZU, A. Transcriptional down-regulation through nuclear exclusion of EWS methylated by PRMT1. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 329, n. 2, p. 653-660, Apr. 8, 2005.
- ARIAS, J.; ALBERTS, A. S.; BRINDLE, P.; CLARET, F. X.; SMEAL, T.; KARIN, M.; FERAMISCO, J.; MONTMINY, M. Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor. **Nature**, v. 370, n. 6486, p. 226-229, Jul. 21, 1994.
- BARKER, G. C.; REES, H. H. Ecdysteroids in nematodes. **Parasitol. Today**, v. 6, n. 12, p. 384-387, Dec., 1990.

BASCH, P. F. Immunocytochemical localization of ecdysteroids in the life history stages of *Schistosoma mansoni*. **Comp. Biochem. Physiol. A**, v. 83, n. 1, p. 199-202, 1986.

BAUER, U. M.; DAUJAT, S.; NIELSEN, S. J.; NIGHTINGALE, K.; KOUZARIDES, T. Methylation at arginine 17 of histone H3 is linked to gene activation. **EMBO Rep.**, v. 3, n. 1, p. 39-44, Jan., 2002.

BEALL, M. J.; MCGONIGLE, S.; PEARCE, E. J. Functional conservation of *Schistosoma mansoni* Smads in TGF- β signaling. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 111, n. 1, p. 131-142, Nov., 2000.

BEDFORD, M. T.; RICHARD, S. Arginine Methylation: An Emerging Regulator of Protein Function. **Mol. Cell**, v. 18, n. 3, p. 263-272, Apr. 29, 2005.

BERGER, S. L. Histone modifications in transcriptional regulation. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 12, n. 2, p. 142-148, Apr., 2002.

BERHANE, K.; BOGGARAM, V. Identification of a novel DNA regulatory element in the rabbit surfactant protein B (SP-B) promoter that is a target for ATF/CREB and AP-1 transcription factors. **Gene**, v. 268, n. 1-2, p. 141-151, May 2, 2001.

BERTIN, B.; SASORITH, S.; CABY, S.; OGER, F.; CORNETTE, J.; WURTZ, J.-M.; PIERCE, R. J. Unique functional properties of a member of the Fushi Tarazu-Factor 1 family from *Schistosoma mansoni*. **Biochem. J.**, v. 382 (pt. 1), p. 337-351, Aug. 15, 2004.

BERTIN, B.; CABY, S.; OGER, F.; SASORITH, S.; WURTZ, J.-M.; PIERCE, R. J. The monomeric orphan nuclear receptor *Schistosoma mansoni* Ftz-F1 dimerizes specifically and functionally with the schistosome RXR homologue, SmRXR1. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 327, n. 4, p. 1072-1082, Feb. 25, 2005.

BERTIN, B.; OGER, F.; CORNETTE, J.; CABY, S.; NOËL, C.; CAPRON, M.; FANTAPPIÉ, M. R.; RUMJANEK, F. D.; PIERCE, R. J. *Schistosoma mansoni* CBP/p300 has a conserved domain structure and interacts functionally with the nuclear receptor SmFtz-F1. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 146, n. 2, p. 180-191, Apr., 2006.

BIGGS, H. E. J. Mollusca from pre-historic Jericho. **J. Conchol.**, v. 24, p. 379-387, 1960.

BILHARZ, T. Ein Beitrag zur Helminthographis Humana. **Zeitschrift für Wissenschaftliche Zoologie**, v. 4, p. 53-76, 1852. Tradução para o inglês por KEAN, B. H.; MOTT, K. E. *et al.* 1978. Chap. 25, p. 473-479. *loc. cit.*

_____. Fernere Mitteilungen über *Distomum haematobium*. **Zeitschrift für Wissenschaftliche Zoologie**, v. 4, p. 454-455, 1853. Tradução para o inglês por KEAN, B. H.; MOTT, K. E. *et al.* 1978. Chap. 25, p. 479-481. *loc. cit.*

BLASCHKE, F.; TAKATA, Y.; CAGLAYAN, E.; LAW, R. E.; HSUEH, W. A. Obesity, Peroxisome Proliferator-Activated Receptor, and Atherosclerosis in Type 2 Diabetes. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 26, n. 1, p. 28-40, Jan. 1st, 2006.

BLENDY, J. A.; KAESTNER, K. H.; WEINBAUER, G. F.; NIESCHLAG, E.; SCHUTZ, G. Severe impairment of spermatogenesis in mice lacking the CREM gene. **Nature**, v. 380, n. 6570, p. 162-165, Mar. 14, 1996.

BOBEK, L.; REKOSH, D. M.; KEULEN, H. V.; LOVERDE, P. T. Characterization of a Female-Specific cDNA Derived from a Developmentally Regulated mRNA in the Human Blood Fluke *Schistosoma mansoni*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 83, n. 15, p. 5544-5548, Aug. 1st, 1986.

BOBEK, L. A.; REKOSH, D. M.; LOVERDE, P. T. Small Gene Family Encoding an Eggshell (Chorion) Protein of the Human Parasite *Schistosoma mansoni*. **Mol. Cell. Biol.**, v. 8, n. 8, p. 3008-3016, Aug. 1st, 1988.

BOULANGER, M.-C.; LIANG, C.; RUSSELL, R. S.; LIN, R.; BEDFORD, M. T.; WAINBERG, M. A.; RICHARD, S. Methylation of Tat by PRMT6 Regulates Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gene Expression. **J. Virol.**, v. 79, n. 1, p. 124-131, Jan. 1st, 2005.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, May 7, 1976.

BRAHMS, H.; MEHEUS, L.; DE BRABANDERE, V.; FISCHER, U.; LÜHRMANN, R. Symmetrical dimethylation of arginine residues in spliceosomal Sm protein B/B' and the Sm-like protein LSm4, and their interaction with the SMN protein. **RNA**, v. 7, n. 11, p. 1531-1542, Nov. 1st, 2001.

BRIGGS, M. H. Metabolism of steroid hormones by schistosomes. **Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Lipids Lipid Metab.**, v. 280, n. 3, p. 481-485, Nov. 30, 1972.

CAMACHO, M.; AGNEW, A. Glucose uptake rates by *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, and *S. bovis* adults using a flow *in vitro* culture system. **J. Parasitol.**, v. 81, n. 4, p. 637-640, Aug., 1995.

CATTO, J. *Schistosoma cattoi*: a new blood fluke of man. **Br. Med. J.**, v. i, p. 11-13, 1905.

CHABASSE, D.; BERTRAND, G.; LEROUX, J. P.; GAUTHEY, N.; HOCQUET, P. Bilharziose a *Schistosoma mansoni* évolutive découverte 37 ans après l'infestation. **Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales**, v. 78, n. 5, p. 643-647, 1985.

CHAN, K. K.; WING TSUI, S. K.; LEE, S. M. Y.; LUK, S. C. W.; LIEW, C. C.; FUNG, K. P.; WAYE, M. M. Y.; LEE, C. Y. Molecular cloning and characterization of FHL2, a novel LIM domain protein preferentially expressed in human heart. **Gene**, v. 210, n. 2, p. 345-350, Apr. 14, 1998.

CHEN, D.; MA, H.; HONG, H.; KOH, S. S.; HUANG, S.-M.; SCHURTER, B. T.; ASWAD, D. W.; STALLCUP, M. R. Regulation of Transcription by a Protein Methyltransferase. **Science**, v. 284, n. 5423, p. 2174-2177, Jun. 25, 1999.

CHEN, D.; HUANG, S.-M.; STALLCUP, M. R. Synergistic, p160 Coactivator-dependent Enhancement of Estrogen Receptor Function by CARM1 and p300. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 52, p. 40810-40816, Dec. 29, 2000.

CHEN, H.; LIN, R. J.; SCHILTZ, R. L.; CHAKRAVARTI, D.; NASH, A.; NAGY, L.; PRIVALSKY, M. L.; NAKATANI, Y.; EVANS, R. M. Nuclear Receptor Coactivator ACTR Is a Novel Histone Acetyltransferase and Forms a Multimeric Activation Complex with P/CAF and CBP/p300. **Cell**, v. 90, n. 3, p. 569-580, Aug. 8, 1997.

CHEVILLARD-BRIET, M.; TROUCHE, D.; VANDEL, L. Control of CBP co-activating activity by arginine methylation. **EMBO J.**, v. 21, n. 20, p. 5457-5466, Oct., 2002.

CHILDS, J. E.; SHIRAZIAN, D.; GLOER, J. B.; SCHILLER, E. L. *In vitro* orientation of male *Schistosoma mansoni* to extracts derived from female schistosomes. **J. Chem. Ecol.**, v. 12, n. 8, p. 1729-1738, Aug, 1986.

CHITSULO, L.; ENGELS, D.; MONTRESOR, A.; SAVIOLI, L. The global status of schistosomiasis and its control. **Acta Trop.**, v. 77, n. 1, p. 41-51, Oct. 23, 2000.

CHITSULO, L.; LOVERDE, P.; ENGELS, D. Focus: Schistosomiasis. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, n. 1, p. 12-13, Jan., 2004.

CHRIVIA, J. C.; KWOK, R. P.; LAMB, N.; HAGIWARA, M.; MONTMINY, M. R.; GOODMAN, R. H. Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. **Nature**, v. 365, n. 6449, p. 855-859, Oct. 28, 1993.

CHU, P.-H.; RUIZ-LOZANO, P.; ZHOU, Q.; CAI, C.; CHEN, J. Expression patterns of FHL/SLIM family members suggest important functional roles in skeletal muscle and cardiovascular system. **Mech. Dev.**, v. 95, n. 1-2, p. 259-265, Jul., 2000.

CHUA, S. S.; MA, Z.; NGAN, E.; TSAI, S. Y.; GERALD, L. Cdc25B as a Steroid Receptor Coactivator. **Vitam. Horm.**, v. 68, p. 231-256, 2004.

COKOL, M.; NAIR, R.; ROST, B. Finding nuclear localization signals. **EMBO Rep.**, v. 1, n. 5, p. 411-425, Nov., 2000.

CONTIS, G.; DAVID, A. R. The epidemiology of Bilharzia in Ancient Egypt: 5000 years of schistosomiasis. **Parasitol. Today**, v. 12, n. 7, p. 253-255, 1996.

CÔTÉ, J.; BOISVERT, F.-M.; BOULANGER, M.-C.; BEDFORD, M. T.; RICHARD, S. Sam68 RNA Binding Protein Is an *In Vivo* Substrate for Protein Arginine N-Methyltransferase 1. **Mol. Biol. Cell**, v. 14, n. 1, p. 274-287, Jan. 1st, 2003.

COURA, J. R.; AMARAL, R. S. Epidemiological and Control Aspects of Schistosomiasis in Brazilian Endemic Areas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, Suppl. 1, p. 13-19, 2004.

COVIC, M.; HASSA, P. O.; SACCANI, S.; BUERKI, C.; MEIER, N. I.; LOMBARDI, C.; IMHOF, R.; BEDFORD, M. T.; NATOLI, G.; HOTTIGER, M. O. Arginine methyltransferase CARM1 is a promoter-specific regulator of NF- κ B-dependent gene expression. **EMBO J.**, v. 24, n. 1, p. 85-96, Jan. 12, 2005.

COX, F. E. G. History of Human Parasitology. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, n. 4, p. 595-612, Oct. 1st, 2002.

CUNHA, V. M. N.; DE SOUZA, W.; NOËL, F. A Ca²⁺-stimulated, Mg²⁺-dependent ATPase activity in subcellular fractions from *Schistosoma mansoni*. **FEBS Lett.**, v. 241, n. 1-2, p. 65-68, Dec. 5, 1988.

DAUJAT, S.; BAUER, U.-M.; SHAH, V.; TURNER, B.; BERGER, S.; KOUZARIDES, T. Crosstalk between CARM1 Methylation and CBP Acetylation on Histone H3. **Curr. Biol.**, v. 12, n. 24, p. 2090-2097, Dec. 23, 2002.

DAYHOFF, M. O.; SCHWARTZ, R. M.; ORCUTT, B. C. A model of evolutionary change in proteins. In: DAYHOFF, M. O. (Ed.). **Atlas of Protein Sequence and Structure**. Washington, D. C.: National Biomedical Research Foundation, 1978. v. 5, p. 345-352.

DE CESARE, D.; FIMIA, G. M.; BRANCORSINI, S.; PARVINEN, M.; SASSONE-CORSI, P. Transcriptional Control in Male Germ Cells: General Factor TFIIA Participates in CREM-Dependent Gene Activation. **Mol. Endocrinol.**, v. 17, n. 12, p. 2554-2565, Dec. 1st, 2003.

DE GROOT, R. P.; DEN HERTOOG, J.; VANDENHEEDE, J. R.; GORIS, J.; SASSONE-CORSI, P. Multiple and cooperative phosphorylation events regulate the CREM activator function. **EMBO J.**, v. 12, n. 10, p. 3903-3911, Oct., 1993.

DE MENDONÇA, R. L.; ESCRIVÁ, H.; BOUTON, D.; LAUDET, V.; PIERCE, R. J. Hormones and nuclear receptors in schistosome development. **Parasitol. Today**, v. 16, n. 6, p. 233-240, Jun., 2000a.

DE MENDONÇA, R. L.; ESCRIVÁ, H.; BOUTON, D.; ZELUS, D.; VANACKER, J.-M.; BONNELYE, E.; CORNETTE, J.; PIERCE, R. J.; LAUDET, V. Structural and functional divergence of a nuclear receptor of the RXR family from the trematode parasite *Schistosoma mansoni*. **Eur. J. Biochem.**, v. 267, n. 11, p. 3208-3219, Jun. 1st, 2000b.

DE MENDONÇA, R. L.; BOUTON, D.; BERTIN, B.; ESCRIVÁ, H.; NOËL, C.; VANACKER, J.-M.; CORNETTE, J.; LAUDET, V.; PIERCE, R. J. A functionally conserved member of the FTZ-F1 nuclear receptor family from *Schistosoma mansoni*. **Eur. J. Biochem.**, v. 269, n. 22, p. 5700-5711, Nov. 15, 2002.

DEELDER, A. M.; MILLER, R. L.; DE JONGE, N.; KRIJGER, F. W. Detection of schistosome antigen in mummies. **Lancet**, v. 335, n. 8691, p. 724-725, Mar. 24, 1990.

DEN HOLLANDER, J. E.; ERASMUS, D. A. *Schistosoma mansoni*: DNA synthesis in males and females from mixed and single-sex infections. **Parasitology**, v. 88, n. 3, p. 463-476, Jun., 1984.

_____. *Schistosoma mansoni*: male stimulation and DNA synthesis by the female. **Parasitology**, v. 91, n. 3, p. 449-457, Dec., 1985.

DILLON, N. Heterochromatin structure and function. **Biol. Cell**, v. 96, n. 8, p. 631-637, Oct., 2004.

DIVECHA, N.; CHARLESTON, B. Cloning and characterisation of two new cDNAs encoding murine triple LIM domains. **Gene**, v. 156, n. 2, p. 283-286, Apr. 24, 1995.

DOUMENGE, J. P.; MOTT, K. E.; CHEUNG, C.; VILLENAVE, D.; CHAPUIS, O.; PERRIN, M. F.; REAUD-THOMAS, G. **Atlas of the Global Distribution of Schistosomiasis**. Bordeaux: Presses Universitaires de Bordeaux, 1987. 391 p.

EBBEL, B. **The Papyrus Ebers**. London: Oxford University Press, 1937.

EL-SAYED, N. M. A.; BARTHOLOMEU, D.; IVENS, A.; JOHNSTON, D. A.; LOVERDE, P. T. Advances in schistosome genomics. **Trends Parasitol.**, v. 20, n. 4, p. 154-157, Apr., 2004.

ENGELENDER, S.; GIANNINI, A. L.; RUMJANEK, F. D. Protein interactions with a gender-specific gene of *Schistosoma mansoni*: characterization by DNase I footprinting, band shift and UV cross-linking. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 124, n. 2, p. 159-168, Jul. 21, 1993.

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

ENGELS, D.; LI-YING, W.; PALMER, K. L. Control of schistosomiasis in China. **Acta Trop.**, v. 96, n. 2-3, p. 67-68, Nov.-Dec., 2005.

ERASMUS, D. A. A comparative study of the reproductive system of mature, immature and "unisexual" female *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, v. 67, n. 2, p. 165-183, Oct., 1973.

ESCRIVÁ, H.; SAFI, R.; HÄNNI, C.; LANGLOIS, M.-C.; SAUMITOU-LAPRADE, P.; STEHELIN, D.; CAPRON, A.; PIERCE, R.; LAUDET, V. Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 94, n. 13, p. 6803-6808, Jun. 24, 1997.

EVELAND, L. K.; HASEEB, M. A. Schistosome behavior *in vitro*. **J. Chem. Ecol.**, v. 12, n. 8, p. 1687-1698, Aug, 1986.

_____. *Schistosoma mansoni*: onset of chemoattraction in developing worms. **Experientia**, v. 45, n. 3, p. 309-310, Mar 15, 1989.

FALLON, P. G.; RICHARDSON, E. J.; JONES, F. M.; DUNNE, D. W. Dehydroepiandrosterone Sulfate Treatment of Mice Modulates Infection with *Schistosoma mansoni*. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 5, n. 2, p. 251-253, Mar. 1st, 1998.

FAN, Y.; NIKITINA, T.; MORIN-KENSICKI, E. M.; ZHAO, J.; MAGNUSON, T. R.; WOODCOCK, C. L.; SKOULTCHI, A. I. H1 Linker Histones Are Essential for Mouse Development and Affect Nucleosome Spacing In Vivo. **Mol. Cell. Biol.**, v. 23, n. 13, p. 4559-4572, Jul. 1st, 2003.

FAN, Y.; NIKITINA, T.; ZHAO, J.; FLEURY, T. J.; BHATTACHARYYA, R.; BOUHASSIRA, E. E.; STEIN, A.; WOODCOCK, C. L.; SKOULTCHI, A. I. Histone H1 Depletion in Mammals Alters Global Chromatin Structure but Causes Specific Changes in Gene Regulation. **Cell**, v. 123, n. 7, p. 1199-1212, Dec. 29, 2005.

FANTAPPIÉ, M. R.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; CARIDE, E. C.; GERALDO, E. A. S.; AGNEW, A.; RUMJANEK, F. D. Comparison between site-specific DNA binding proteins of male and female *Schistosoma mansoni*. **Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.**, v. 124, n. 1, p. 33-40, Sep., 1999.

FANTAPPIÉ, M. R.; FREEBERN, W. J.; OSMAN, A.; LADUCA, J.; NILES, E. G.; LOVERDE, P. T. Evaluation of *Schistosoma mansoni* retinoid X receptor (SmRXR1 and SmRXR2) activity and tissue distribution. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 115, n. 1, p. 87-99, Jun., 2001.

FANTAPPIÉ, M. R.; OSMAN, A.; ERICSSON, C.; NILES, E. G.; LOVERDE, P. T. Cloning of *Schistosoma mansoni* Seven in Absentia (SmSINA)+ homologue cDNA, a gene involved in ubiquitination of SmRXR1 and SmRXR2. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 131, n. 1, p. 45-54, Sep., 2003.

FIMIA, G. M.; CESARE, D. D.; SASSONE-CORSI, P. CBP-independent activation of CREM and CREB by the LIM-only protein ACT. **Nature**, v. 398, n. 6723, p. 165-169, Mar. 11, 1999.

FIMIA, G. M.; DE CESARE, D.; SASSONE-CORSI, P. A Family of LIM-Only Transcriptional Coactivators: Tissue-Specific Expression and Selective Activation of CREB and CREM. **Mol. Cell. Biol.**, v. 20, n. 22, p. 8613-8622, Nov. 15, 2000.

FISCHLE, W.; WANG, Y.; ALLIS, C. D. Histone and chromatin cross-talk. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 15, n. 2, p. 172-183, Apr., 2003.

FORMSTECHE, E.; ARESTA, S.; COLLURA, V.; HAMBURGER, A.; MEIL, A.; TREHIN, A.; REVERDY, C.; BETIN, V.; MAIRE, S.; BRUN, C.; JACQ, B. *et al.* Protein interaction mapping: A *Drosophila* case study. **Genome Res.**, v. 15, n. 3, p. 376-384, Mar. 1st, 2005.

FOULKES, N. S.; MELLSTROM, B.; BENUSIGLIO, E.; SASSONE-CORSI, P. Developmental switch of CREM function during spermatogenesis: from antagonist to activator. **Nature**, v. 355, n. 6355, p. 80-84, Jan. 2, 1992.

FOWLER, A. M.; ALARID, E. T. Dynamic control of nuclear receptor transcription. **Sci. STKE**, v. 2004, n. 256, p. pe51, Oct. 26, 2004.

FRANCO, G. R.; GARRATT, R. C.; TANAKA, M.; SIMPSON, A. J. G.; PENA, S. D. J. Characterization of a *Schistosoma mansoni* gene encoding a homologue of the Y-box binding protein. **Gene**, v. 198, n. 1-2, p. 5-16, Oct. 1st, 1997.

FRANKEL, A.; YADAV, N.; LEE, J.; BRANSCOMBE, T. L.; CLARKE, S.; BEDFORD, M. T. The Novel Human Protein Arginine N-Methyltransferase PRMT6 Is a Nuclear Enzyme Displaying Unique Substrate Specificity. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 5, p. 3537-3543, Feb. 1st, 2002.

FREEBERN, W. J.; NILES, E. G.; LOVERDE, P. T. RXR-2, a member of the retinoid x receptor family in *Schistosoma mansoni*. **Gene**, v. 233, n. 1-2, p. 33-38, Jun. 11, 1999a.

FREEBERN, W. J.; OSMAN, A.; NILES, E. G.; CHRISTEN, L.; LOVERDE, P. T. Identification of a cDNA Encoding a Retinoid X Receptor Homologue from *Schistosoma mansoni*. EVIDENCE FOR A ROLE IN FEMALE-SPECIFIC GENE EXPRESSION. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 8, p. 4577-4585, Feb. 19, 1999b.

FREYD, G.; KIM, S. K.; HORVITZ, H. R. Novel cysteine-rich motif and homeodomain in the product of the *Caenorhabditis elegans* cell lineage gene *lin-11*. **Nature**, v. 344, n. 6269, p. 876-879, Apr. 26, 1990.

FRIESEN, W. J.; MASSENET, S.; PAUSHKIN, S.; WYCE, A.; DREYFUSS, G. SMN, the product of the spinal muscular atrophy gene, binds preferentially to dimethylarginine-containing protein targets. **Mol. Cell**, v. 7, n. 5, p. 1111-1117, May, 2001.

FUJII, Y. An account of a journey to Katayama. (Em Japonês). **Chugai Iji Shimpo**, v. 691, p. 55-56, 1847. (Republicado em 1909). Tradução para o inglês por KEAN, B. H.; MOTT, K. E. *et al.* 1978. Chap. 26, p. 513-514. *loc. cit.*

FULFORD, A. J.; BUTTERWORTH, A. E.; OUMA, J. H.; STURROCK, R. F. A statistical approach to schistosome population dynamics and estimation of the life-span of *Schistosoma mansoni* in man. **Parasitology**, v. 110, n. 3, p. 307-316, Apr., 1995.

GARY, J. D.; LIN, W.-J.; YANG, M. C.; HERSCHMAN, H. R.; CLARKE, S. The Predominant Protein-arginine Methyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 21, p. 12585-12594, May 24, 1996.

GIANNINI, A. L.; CARIDE, E. C.; BRAGA, V. M.; RUMJANEK, F. D. F-10 nuclear binding proteins of *Schistosoma mansoni*: structural and functional features. **Parasitology**, v. 110, n. 2, p. 155-161, Feb, 1995.

GIOT, L.; BADER, J. S.; BROUWER, C.; CHAUDHURI, A.; KUANG, B.; LI, Y.; HAO, Y. L.; OOL, C. E.; GODWIN, B.; VITOLS, E.; VIJAYADAMODAR, G. *et al.* A Protein Interaction Map of *Drosophila melanogaster*. **Science**, v. 302, n. 5651, p. 1727-1736, Dec. 5, 2003.

GLOER, J. B.; MEINWALD, J.; SHIRAZIAN, D.; CHILDS, J. E.; SCHILLER, E. L. Extraction of intersexual chemoattractants from *Schistosoma mansoni*. **J. Chem. Ecol.**, v. 12, n. 8, p. 1725-1728, Aug., 1986.

GONZALEZ, G. A.; MONTMINY, M. R. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. **Cell**, v. 59, n. 4, p. 675-680, Nov. 17, 1989.

GOODMAN, R. H.; SMOLIK, S. CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. **Genes Dev.**, v. 14, n. 13, p. 1553-1577, Jul. 1st, 2000.

GROS, L.; DELAPORTE, C.; FREY, S.; DECESSE, J.; DE SAINT-VINCENT, B. R.; CAVAREC, L.; DUBART, A.; GUDKOV, A. V.; JACQUEMIN-SABLON, A. Identification of New Drug Sensitivity Genes Using Genetic Suppressor Elements: Protein Arginine *N*-Methyltransferase Mediates Cell Sensitivity to DNA-damaging Agents. **Cancer Res.**, v. 63, n. 1, p. 164-171, Jan. 1st, 2003.

GUBB, D.; GREEN, C.; HUEN, D.; COULSON, D.; JOHNSON, G.; TREE, D.; COLLIER, S.; ROOTE, J. The balance between isoforms of the Prickle LIM domain protein is critical for planar polarity in *Drosophila* imaginal discs. **Genes Dev.**, v. 13, n. 17, p. 2315-2327, Sep. 1st, 1999.

GUPTA, B. C.; BASCH, P. F. The role of *Schistosoma mansoni* males in feeding and development of female worms. **J. Parasitol.**, v. 73, n. 3, p. 481-486, Jun, 1987.

HAHN, S. Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, v. 11, n. 5, p. 394-403, May, 2004.

HASEEB, M. A.; EVELAND, L. K. *Schistosoma mansoni*: a chemoattractive factor released by males and its receptor in females. **Experientia**, v. 47, n. 9, p. 970-974, Sep 15, 1991.

HEERY, D. M.; KALKHOVEN, E.; HOARE, S.; PARKER, M. G. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. **Nature**, v. 387, n. 6634, p. 733-736, Jun. 12, 1997.

HEINLEIN, C. A.; CHANG, C. Androgen Receptor in Prostate Cancer. **Endocr. Rev.**, v. 25, n. 2, p. 276-308, Apr. 1st, 2004.

HENRY, M. F.; SILVER, P. A. A novel methyltransferase (Hmt1p) modifies poly(A)⁺-RNA-binding proteins. **Mol. Cell. Biol.**, v. 16, n. 7, p. 3668-3678, Jul. 1st, 1996.

HERRMANN, F.; BOSSERT, M.; SCHWANDER, A.; AKGUN, E.; FACKELMAYER, F. O. Arginine Methylation of Scaffold Attachment Factor A by Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein Particle-associated PRMT1. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 47, p. 48774-48779, Nov. 19, 2004.

HIRATA, M.; HIRATA, K.; HARA, T.; KAWABUCHI, M.; FUKUMA, T. Expression of TGF- β -like molecules in the life cycle of *Schistosoma japonicum*. **Parasitol. Res.**, v. 95, n. 6, p. 367-373, Apr., 2005.

HOCKLEY, D. J. Ultrastructure of the tegument of *Schistosoma*. **Adv. Parasitol.**, v. 11, n. 0, p. 233-305, 1973.

HOEPPLI, R. **Parasites and parasitic infections in early science and medicine**. Singapore: University of Malaya Press, 1959.

_____. Morphological changes in human schistosomiasis and certain analogies in ancient Egyptian sculpture. **Acta Trop.**, v. 30, n. 1, p. 1-11, 1973.

HOFFMANN, K. F. An historical and genomic view of schistosome conjugal biology with emphasis on sex-specific gene expression. **Parasitology**, v. 128, p. S11-S22, 2004.

HONG, H.; KOHLI, K.; GARABEDIAN, M. J.; STALLCUP, M. R. GRIP1, a transcriptional coactivator for the AF-2 transactivation domain of steroid, thyroid, retinoid, and vitamin D receptors. **Mol. Cell. Biol.**, v. 17, n. 5, p. 2735-2744, May 1st, 1997.

HULSE, E. V. Joshua's curse and the abandonment of ancient Jericho: schistosomiasis as a possible medical explanation. **Med. Hist.**, v. 15, n. 4, p. 376-386, Oct., 1971.

ISHII, A.; TSUJI, M.; TADA, I. History of Katayama disease: schistosomiasis japonica in Katayama district, Hiroshima, Japan. **Parasitol. Int.**, v. 52, n. 4, p. 313-319, Dec., 2003.

ITOH, K.; BROTT, B. K.; BAE, G.-U.; RATCLIFFE, M. J.; SOKOL, S. Y. Nuclear localization is required for Dishevelled function in Wnt/ β -catenin signaling. **J Biol**, v. 4, n. 1, p. 3, 2005.

JASKELIOFF, M.; VAN KOMEN, S.; KREBS, J. E.; SUNG, P.; PETERSON, C. L. Rad54p Is a Chromatin Remodeling Enzyme Required for Heteroduplex DNA Joint Formation with Chromatin. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 11, p. 9212-9218, Mar. 14, 2003.

JIANG, J.; SKELLY, P. J.; SHOEMAKER, C. B.; CAULFIELD, J. P. *Schistosoma mansoni*: The Glucose Transport Protein SGTP4 Is Present in Tegumental Multilamellar Bodies, Discoid Bodies, and the Surface Lipid Bilayers. **Exp. Parasitol.**, v. 82, n. 2, p. 201-210, Mar., 1996.

JORDAN, P. From Katayama to the Dakhla Oasis: the beginning of epidemiology and control of bilharzia. **Acta Trop.**, v. 77, n. 1, p. 9-40, Oct. 23, 2000.

KADRMAS, J. L.; BECKERLE, M. C. THE LIM DOMAIN: FROM THE CYTOSKELETON TO THE NUCLEUS. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 5, n. 11, p. 920-931, Nov., 2004.

KAMEI, Y.; XU, L.; HEINZEL, T.; TORCHIA, J.; KUROKAWA, R.; GLOSS, B.; LIN, S.-C.; HEYMAN, R. A.; ROSE, D. W.; GLASS, C. K.; ROSENFELD, M. G. A CBP Integrator Complex Mediates Transcriptional Activation and AP-1 Inhibition by Nuclear Receptors. **Cell**, v. 85, n. 3, p. 403-414, May 3, 1996.

KAMPKOTTER, A.; RIDGERS, I.; JOHNSTON, D. A.; ROLLINSON, D.; KUNZ, W.; GREVELDING, C. G. *Schistosoma mansoni*: Cloning and Characterization of the Ras Homologue. **Exp. Parasitol.**, v. 91, n. 3, p. 280-283, Mar., 1999.

KARLSSON, O.; THOR, S.; NORBERG, T.; OHLSSON, H.; EDLUND, T. Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain. **Nature**, v. 344, n. 6269, p. 879-882, Apr. 26, 1990.

KATSANIS, N.; YASPO, M.-L.; FISHER, E. M. C. Identification and mapping of a novel human gene, HRMT1L1, homologous to the rat protein arginine N-methyltransferase 1 (PRMT1) gene. **Mamm. Genome**, v. 8, n. 7, p. 526-529, Jul., 1997.

KATSURADA, F. The etiology of a parasitic disease. **Iji Shimbun**, v. 669, p. 1325-1332, 1904. Tradução para o inglês por KEAN, B. H.; MOTT, K. E. *et al.* 1978. Chap. 26, p. 518-521. *loc. cit.*

KAWANISHI, K. A report on a study of the "Katayama Disease" in Higo-no-kuni. (Em Japonês). **Tokyo Igakkai Zasshi**, v. 18, p. 31-48, 1904. Tradução para o inglês por KEAN, B. H.; MOTT, K. E. *et al.* 1978. Chap. 26, p. 527-529. *loc. cit.*

KEAN, B. H.; MOTT, K. E.; RUSSELL, A. J. **Tropical Medicine and Parasitology: Classic Investigations**. Ithaca: Cornell University Press, v. 2, 1978. 677 p.

KHAN, A. U.; KRISHNAMURTHY, S. Histone modifications as key regulators of transcription. **Front. Biosci.**, v. 10, p. 866-872, Jan. 1st, 2005.

KIM, S.; MERRILL, B. M.; RAJPUROHIT, R.; KUMAR, A.; STONE, K. L.; PAPOV, V. V.; SCHNEIDERS, J. M.; SZER, W.; WILSON, S. H.; PAIK, W. K.; WILLIAMS, K. R. Identification of N^G-Methylarginine Residues in Human Heterogeneous RNP Protein A1: Phe/Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Gly-Gly/Phe Is a Preferred Recognition Motif. **Biochemistry**, v. 36, n. 17, p. 5185-5192, Apr. 29, 1997.

KING-JONES, K.; THUMMEL, C. S. NUCLEAR RECEPTORS – A PERSPECTIVE FROM *DROSOPHILA*. **Nat. Rev. Genet.**, v. 6, n. 4, p. 311-323, Apr., 2005.

KING, C. H.; DICKMAN, K.; TISCH, D. J. Reassessment of the cost of chronic helminthic infection: a meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis. **Lancet**, v. 365, n. 9470, p. 1561-1569, Apr. 30-May 6, 2005.

KOH, S. S.; CHEN, D.; LEE, Y.-H.; STALLCUP, M. R. Synergistic Enhancement of Nuclear Receptor Function by p160 Coactivators and Two Coactivators with Protein Methyltransferase Activities. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 2, p. 1089-1098, Jan. 5, 2001.

KOH, S. S.; LI, H.; LEE, Y.-H.; WIDELITZ, R. B.; CHUONG, C.-M.; STALLCUP, M. R. Synergistic Coactivator Function by Coactivator-associated Arginine Methyltransferase (CARM) 1 and β -Catenin with Two Different Classes of DNA-binding Transcriptional Activators. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 29, p. 26031-26035, Jul. 19, 2002.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Brief. Bioinform.**, v. 5, n. 2, p. 150-163, Jun. 1st, 2004.

KWAK, Y. T.; GUO, J.; PRAJAPATI, S.; PARK, K.-J.; SURABHI, R. M.; MILLER, B.; GEHRIG, P.; GAYNOR, R. B. Methylation of SPT5 Regulates Its Interaction with RNA Polymerase II and Transcriptional Elongation Properties. **Mol. Cell**, v. 11, n. 4, p. 1055-1066, Apr., 2003.

LAUDET, V. Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. **J. Mol. Endocrinol.**, v. 19, n. 3, p. 207-226, Dec. 1st, 1997.

LAWRENCE, J. D. The ingestion of red blood cells by *Schistosoma mansoni*. **J. Parasitol.**, v. 59, n. 1, p. 60-63, Feb, 1973.

LE PASLIER, M.-C.; PIERCE, R. J.; MERLIN, F.; HIRAI, H.; WU, W.; WILLIAMS, D. L.; JOHNSTON, D.; LOVERDE, P. T.; LE PASLIER, D. Construction and Characterization of a *Schistosoma mansoni* Bacterial Artificial Chromosome Library. **Genomics**, v. 65, n. 2, p. 87-94, Apr. 15, 2000.

LEE, J.-H.; COOK, J. R.; YANG, Z.-H.; MIROCHNITCHENKO, O.; GUNDERSON, S. I.; FELIX, A. M.; HERTH, N.; HOFFMANN, R.; PESTKA, S. PRMT7, a New Protein Arginine Methyltransferase That Synthesizes Symmetric Dimethylarginine. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 5, p. 3656-3664, Feb. 4, 2005a.

LEE, J.; SAYEGH, J.; DANIEL, J.; CLARKE, S.; BEDFORD, M. T. PRMT8, a New Membrane-bound Tissue-specific Member of the Protein Arginine Methyltransferase Family. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 38, p. 32890-32896, Sep. 23, 2005b.

LEE, S. M. Y.; TSUI, S. K. W.; CHAN, K. K.; GARCIA-BARCELO, M.; WAYE, M. M. Y.; FUNG, K. P.; LIEW, C. C.; LEE, C. Y. Chromosomal mapping, tissue distribution and cDNA sequence of Four-and-a-half LIM domain protein 1 (FHL1). **Gene**, v. 216, n. 1, p. 163-170, Aug. 17, 1998.

LEE, Y.-H.; KOH, S. S.; ZHANG, X.; CHENG, X.; STALLCUP, M. R. Synergy among Nuclear Receptor Coactivators: Selective Requirement for Protein Methyltransferase and Acetyltransferase Activities. **Mol. Cell. Biol.**, v. 22, n. 11, p. 3621-3632, Jun. 1st, 2002.

LEHMEIER, T.; RAKER, V.; HERMANN, H.; LUHRMANN, R. cDNA Cloning of the Sm Proteins D2 and D3 from Human Small Nuclear Ribonucleoproteins: Evidence for a Direct D1-D2 Interaction. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 91, n. 25, p. 12317-12321, Dec. 6, 1994.

LEIPER, R. T. Report on the results of the bilharzia mission to Egypt, 1915, Part I. Transmission. **J. R. Army Med. Corps**, v. 25, p. 1-48, 1915.

_____. On the relation between the terminal spined and lateral-spined eggs of bilharzia. **Br. Med. J.**, v. i, p. 411, 1916.

_____. Report on the results of the bilharzia mission to Egypt, 1915, Part V. Adults and ova. **J. R. Army Med. Corps**, v. 30, p. 235-253, 1918.

LEO, C.; CHEN, J. D. The SRC family of nuclear receptor coactivators. **Gene**, v. 245, n. 1, p. 1-11, Mar. 7, 2000.

LI, H.; GOMES, P. J.; CHEN, J. D. RAC3, a steroid/nuclear receptor-associated coactivator that is related to SRC-1 and TIF2. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 94, n. 16, p. 8479-8484, Aug. 5, 1997.

LI, H.; CHEN, J. D. The Receptor-associated Coactivator 3 Activates Transcription through CREB-binding Protein Recruitment and Autoregulation. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 10, p. 5948-5954, Mar. 6, 1998.

LI, H.; PARK, S.; KILBURN, B.; JELINEK, M. A.; HENSCHEN-EDMAN, A.; ASWAD, D. W.; STALLCUP, M. R.; LAIRD-OFFRINGA, I. A. Lipopolysaccharide-induced Methylation of HuR, an mRNA-stabilizing Protein, by CARM1. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 47, p. 44623-44630, Nov. 15, 2002.

LI, J.; O'MALLEY, B. W.; WONG, J. p300 Requires Its Histone Acetyltransferase Activity and SRC-1 Interaction Domain To Facilitate Thyroid Hormone Receptor Activation in Chromatin. **Mol. Cell. Biol.**, v. 20, n. 6, p. 2031-2042, Mar. 15, 2000.

LIN, W.-J.; GARY, J. D.; YANG, M. C.; CLARKE, S.; HERSCHMAN, H. R. The Mammalian Immediate-early TIS21 Protein and the Leukemia-associated BTG1 Protein Interact with a Protein-arginine N-Methyltransferase. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 25, p. 15034-15044, Jun. 21, 1996.

LINHARES, S.; GEWANDSZNAJDER, F. **Biologia Hoje**. 6^a ed. - Seres Vivos. São Paulo: Ática, v. 2, 1995.

LIU, Q.; DREYFUSS, G. *In vivo* and *in vitro* arginine methylation of RNA-binding proteins. **Mol. Cell. Biol.**, v. 15, n. 5, p. 2800-2808, May, 1995.

LIU, Y. (Ed.). **The Han Tombs of Mawangdui Changsha**. China: Human People's Publishing House, p. 1-47, 1978.

LIU, Z.; WONG, J.; TSAI, S. Y.; TSAI, M.-J.; O'MALLEY, B. W. Sequential recruitment of steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) and p300 enhances progesterone receptor-dependent initiation and reinitiation of transcription from chromatin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 98, n. 22, p. 12426-12431, Oct. 23, 2001.

LOVERDE, P. T.; CHEN, L. Schistosome female reproductive development. **Parasitol. Today**, v. 7, n. 11, p. 303-308, Nov., 1991.

LOVERDE, P. T.; HIRAI, H.; MERRICK, J. M.; LEE, N. H.; EL-SAYED, N. *Schistosoma mansoni* genome project: an update. **Parasitol. Int.**, v. 53, n. 2, p. 183-192, Jun., 2004.

LUGER, K.; MADER, A. W.; RICHMOND, R. K.; SARGENT, D. F.; RICHMOND, T. J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. **Nature**, v. 389, n. 6648, p. 251-260, Sep. 18, 1997.

LUKONG, K. E.; RICHARD, S. Arginine methylation signals mRNA export. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, v. 11, n. 10, p. 914-915, Oct., 2004.

MA, H.; BAUMANN, C. T.; LI, H.; STRAHL, B. D.; RICE, R.; JELINEK, M. A.; ASWAD, D. W.; ALLIS, C. D.; HAGER, G. L.; STALLCUP, M. R. Hormone-dependent, CARM1-directed, arginine-specific methylation of histone H3 on a steroid-regulated promoter. **Curr. Biol.**, v. 11, n. 24, p. 1981-1985, Dec. 11, 2001a.

MA, Z.-Q.; LIU, Z.; NGAN, E. S. W.; TSAI, S. Y. Cdc25B Functions as a Novel Coactivator for the Steroid Receptors. **Mol. Cell. Biol.**, v. 21, n. 23, p. 8056-8067, Dec. 1st, 2001b.

MACHO, B.; BRANCORSINI, S.; FIMIA, G. M.; SETOU, M.; HIROKAWA, N.; SASSONE-CORSI, P. CREM-Dependent Transcription in Male Germ Cells Controlled by a Kinesin. **Science**, v. 298, n. 5602, p. 2388-2390, Dec. 20, 2002.

MACIEL, R. D. M.; SILVA DUTRA, D. L. D.; RUMJANEK, F. D.; JULIANO, L.; JULIANO, M. A.; FANTAPPIÉ, M. R. *Schistosoma mansoni* histone acetyltransferase GCN5: linking histone acetylation to gene activation. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 133, n. 1, p. 131-135, Jan., 2004.

MACROGEN. 2005. Disponível em: <<http://www.macrogen.com>>. Acesso em: fev., 2006.

MAJIMA, T. A strange case of liver cirrhosis caused by parasitic ova. (Em Japonês). **Tokyo Igakkai Zasshi**, v. 2, p. 898-901, 1888. Tradução para o inglês por KEAN, B. H.; MOTT, K. E. *et al.* 1978. *loc. cit.*

MANGELSDORF, D. J.; EVANS, R. M. The RXR heterodimers and orphan receptors. **Cell**, v. 83, n. 6, p. 841-850, Dec. 15, 1995.

MANSON, P. Report of a case of Bilharzia from West Indies. **J. Trop. Med. Hyg.**, v. 5, p. 38-385, 1902.

MARGANA, R.; BERHANE, K.; ALAM, M. N.; BOGGARAM, V. Identification of functional TTF-1 and Sp1/Sp3 sites in the upstream promoter region of rabbit SP-B gene. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, v. 278, n. 3, p. L477-L484, Mar. 1st, 2000.

MARGUERON, R.; TROJER, P.; REINBERG, D. The key to development: interpreting the histone code? **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 15, n. 2, p. 163-176, Apr., 2005.

MERRICK, J. M.; OSMAN, A.; TSAI, J.; QUACKENBUSH, J.; LOVERDE, P. T.; LEE, N. H. The *Schistosoma mansoni* gene index: gene discovery and biology by reconstruction and analysis of expressed gene sequences. **J. Parasitol.**, v. 89, n. 2, p. 261-269, Apr., 2003.

MÉTIVIER, R.; PENOT, G.; HÜBNER, M. R.; REID, G.; BRAND, H.; KOS, M.; GANNON, F. Estrogen Receptor- α Directs Ordered, Cyclical, and Combinatorial Recruitment of Cofactors on a Natural Target Promoter. **Cell**, v. 115, n. 6, p. 751-763, Dec. 12, 2003.

MEYER, F.; MEYER, H.; BUEDING, E. Lipid metabolism in the parasitic and free-living flatworms, *Schistosoma mansoni* and *Dugesia dorotocephala*. **Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Lipids Lipid Metab.**, v. 210, n. 2, p. 257-266, Jul. 14, 1970.

MICHAUD, C. M.; GORDON, W. S.; REICH, M. R. **The Global Burden of Disease Due to Schistosomiasis**. Schistosomiasis Research Program Working Paper Series, v. 14, n. 1. Cambridge: Harvard Center for Population and Development Studies, Harvard School of Public Health, Jan., 2004. 49 p.

MILLER, R. L.; ARMELAGOS, G. J.; IKRAM, S.; DE JONGE, N.; KRIJGER, F. W.; DEELDER, A. M. Palaeoepidemiology of *Schistosoma* infection in mummies. **Br. Med. J.**, v. 304, n. 6826, p. 555-556, Feb 29, 1992.

MILS, V.; YUEN LEE, S. M.; JOLY, W.; HANG, E. W. C.; BALDIN, V.; WAYE, M. M. Y.; DUCOMMUN, B.; TSUI, S. K. W. LIM-only protein FHL3 interacts with CDC25B2 phosphatase. **Exp. Cell Res.**, v. 285, n. 1, p. 99-106, Apr. 15, 2003.

MINTER, A. Breeding snail fever. Three Gorges Dam boosts parasitic infections. **Sci. Am.**, v. 293, n. 1, p. 21-22, Jul, 2005.

MIRANDA, T. B.; KHUSIAL, P.; COOK, J. R.; LEE, J.-H.; GUNDERSON, S. I.; PESTKA, S.; ZIEVE, G. W.; CLARKE, S. Spliceosome Sm proteins D1, D3, and B/B' are asymmetrically dimethylated at arginine residues in the nucleus. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 323, n. 2, p. 382-387, Oct. 15, 2004a.

MIRANDA, T. B.; MIRANDA, M.; FRANKEL, A.; CLARKE, S. PRMT7 Is a Member of the Protein Arginine Methyltransferase Family with a Distinct Substrate Specificity. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 22, p. 22902-22907, May 28, 2004b.

MIYAIRI, K.; SUSUKI, M. On the development of *Schistosoma japonicum*. (Em Japonês). **Tokyo Iji Shinshi**, v. 1836, p. 1-5, 1913. Tradução para o inglês por WARREN, K. S. 1973. p. 25-26. *loc. cit.*

MODUGNO, F. Ovarian Cancer and Polymorphisms in the Androgen and Progesterone Receptor Genes: A HuGE Review. **Am. J. Epidemiol.**, v. 159, n. 4, p. 319-335, Feb. 15, 2004.

MONTMINY, M. R.; SEVARINO, K. A.; WAGNER, J. A.; MANDEL, G.; GOODMAN, R. H. Identification of a Cyclic-AMP-Responsive Element within the Rat Somatostatin Gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 83, n. 18, p. 6682-6686, Sep. 15, 1986.

MORALES-MONTOR, J.; MOHAMED, F.; GHALEB, A. M.; BAIG, S.; HALLAL-CALLEROS, C.; DAMIAN, R. T. *In vitro* effects of hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) hormones on *Schistosoma mansoni*. **J. Parasitol.**, v. 87, n. 5, p. 1132-1139, Oct, 2001.

MORALES-MONTOR, J.; MOHAMED, F.; DAMIAN, R. T. *Schistosoma mansoni*: the effect of adrenalectomy on the murine model. **Microbes Infect.**, v. 6, n. 5, p. 475-480, Apr., 2004.

MORGAN, J. A. T.; DEJONG, R. J.; KAZIBWE, F.; MKOJI, G. M.; LOKER, E. S. A newly-identified lineage of *Schistosoma*. **Int. J. Parasitol.**, v. 33, n. 9, p. 977-985, Aug., 2003.

MORGAN, M. J.; MADGWICK, A. J. The LIM Proteins FHL1 and FHL3 Are Expressed Differently in Skeletal Muscle. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 255, n. 2, p. 245-250, Feb. 16, 1999a.

MORGAN, M. J.; MADGWICK, A. J. A. The Fourth Member of the FHL Family of LIM Proteins Is Expressed Exclusively in the Testis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 255, n. 2, p. 251-255, Feb. 16, 1999b.

MORLON, A.; SASSONE-CORSI, P. The LIM-only protein FHL2 is a serum-inducible transcriptional coactivator of AP-1. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 100, n. 7, p. 3977-3982, Apr. 1st, 2003.

MÜLLER, J. M.; ISELE, U.; METZGER, E.; REMPEL, A.; MOSER, M.; PSCHERER, A.; BREYER, T.; HOLUBARSCH, C.; BUETTNER, R.; SCHÜLE, R. FHL2, a novel tissue-specific coactivator of the androgen receptor. **EMBO J.**, v. 19, n. 3, p. 359-369, Feb. 1st, 2000.

MURRAY, C. L. J. Rethinking DALYs. In: MURRAY, C. L. J.; LOPEZ, A. D. (Ed.). **The Global Burden of Disease: a comprehensive assessment of mortality and disability from diseases, injuries, and risk factors in 1990 and projected to 2020**. Cambridge: Harvard School of Public Health, 1996a. p. 1-98.

MURRAY, C. L. J.; LOPEZ, A. D. (Ed.). **The Global Burden of Disease: a comprehensive assessment of mortality and disability from diseases, injuries, and risk factors in 1990 and projected to 2020**. Cambridge: Harvard School of Public Health, 1996b.

MYERS, E. W.; MILLER, W. Optimal alignments in linear space. **Comput. Appl. Biosci.**, v. 4, n. 1, p. 11-17, Mar, 1988.

NANTEL, F.; MONACO, L.; FOULKES, N. S.; MASQUILIER, D.; LEMEURE, M.; HENRIKSEN, K.; DIERICH, A.; PARVINEN, M.; SASSONE-CORSI, P. Spermogenesis deficiency and germ-cell apoptosis in CREM-mutant mice. **Nature**, v. 380, n. 6570, p. 159-162, Mar. 14, 1996.

NEVES, R. H.; DE LAMARE BIOLCHINI, C.; MACHADO-SILVA, J. R.; CARVALHO, J. J.; BRANQUINHO, T. B.; LENZI, H. L.; HULSTIJN, M.; GOMES, D. C. A new description of the reproductive system of *Schistosoma mansoni* (Trematoda: Schistosomatidae) analyzed by confocal laser scanning microscopy. **Parasitol. Res.**, v. 95, n. 1, p. 43-49, Jan., 2005.

NGAN, E. S. W.; HASHIMOTO, Y.; MA, Z.-Q.; TSAI, M.-J.; TSAI, S. Y. Overexpression of Cdc25B, an androgen receptor coactivator, in prostate cancer. **Oncogene**, v. 22, n. 5, p. 734-749, Feb. 6, 2003.

NIRDÉ, P.; TORPIER, G.; DE REGGI, M. L.; CAPRON, A. Ecdysone and 20 hydroxyecdysone: new hormones for the human parasite *Schistosoma mansoni*. **FEBS Lett.**, v. 151, n. 2, p. 223-227, Jan. 24, 1983.

NUCLEAR RECEPTORS NOMENCLATURE COMMITTEE. A Unified Nomenclature System for the Nuclear Receptor Superfamily. **Cell**, v. 97, n. 2, p. 161-163, Apr. 16, 1999.

NUNN, J. F.; TAPP, E. Tropical diseases in Ancient Egypt. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 94, n. 2, p. 147-153, Mar.-Apr., 2000.

NUSINZON, I.; HORVATH, C. M. Histone Deacetylases as Transcriptional Activators? Role Reversal in Inducible Gene Regulation. **Sci. STKE**, v. 2005, n. 296, p. re11, Aug. 9, 2005.

OLEFSKY, J. M. Nuclear receptor minireview series. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 40, p. 36863-36864, Oct. 5, 2001.

OLIVEIRA, M. F.; D'ÁVILA, J. C. P.; TORRES, C. R.; OLIVEIRA, P. L.; TEMPONE, A. J.; RUMJANEK, F. D.; BRAGA, C. M. S.; SILVA, J. R.; DANSA-PETRETSKI, M.; OLIVEIRA, M. A.; DE SOUZA, W. *et al.* Haemozoin in *Schistosoma mansoni*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 111, n. 1, p. 217-221, Nov, 2000.

OÑATE, S. A.; TSAI, S. Y.; TSAI, M.-J.; O'MALLEY, B. W. Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. **Science**, v. 270, n. 5240, p. 1354-1357, Nov. 24, 1995.

OÑATE, S. A.; BOONYARATANAKORNKIT, V.; SPENCER, T. E.; TSAI, S. Y.; TSAI, M.-J.; EDWARDS, D. P.; O'MALLEY, B. W. The Steroid Receptor Coactivator-1 Contains Multiple Receptor Interacting and Activation Domains That Cooperatively Enhance the Activation Function 1 (AF1) and AF2 Domains of Steroid Receptors. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 20, p. 12101-12108, May 15, 1998.

OSMAN, A.; G. NILES, E.; T. LOVERDE, P. Characterization of the Ras homologue of *Schistosoma mansoni*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 100, n. 1, p. 27-41, May 15, 1999.

OSMAN, A.; NILES, E. G.; LOVERDE, P. T. Identification and Characterization of a Smad2 Homologue from *Schistosoma mansoni*, a Transforming Growth Factor- β Signal Transducer. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 13, p. 10072-10082, Mar. 30, 2001.

_____. Expression of Functional *Schistosoma mansoni* Smad4: ROLE IN ERK-MEDIATED TRANSFORMING GROWTH FACTOR β (TGF- β) DOWN-REGULATION. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 8, p. 6474-6486, Feb. 20, 2004.

PAIK, W. K.; KIM, S. Enzymatic methylation of protein fractions from calf thymus nuclei. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 29, n. 1, p. 14-20, Oct. 11, 1967.

_____. Protein Methylase I. PURIFICATION AND PROPERTIES OF THE ENZYME. **J. Biol. Chem.**, v. 243, n. 9, p. 2108-2114, May 10, 1968.

PALERMO, I.; LITRICO, L.; EMMANUELE, G.; GIUFFRIDA, V.; SASSONE-CORSI, P.; DE CESARE, D.; MARIA FIMIA, G.; D'AGATA, R.; CALOGERO, A. E.; TRAVALI, S. Cloning and Expression of Activator of CREM in Testis in Human Testicular Tissue. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 283, n. 2, p. 406-411, May 4, 2001.

PAWLAK, M. R.; SCHERER, C. A.; CHEN, J.; ROSHON, M. J.; RULEY, H. E. Arginine N-Methyltransferase 1 Is Required for Early Postimplantation Mouse Development, but Cells Deficient in the Enzyme Are Viable. **Mol. Cell. Biol.**, v. 20, n. 13, p. 4859-4869, Jul. 1st, 2000.

PCE. **TabNet Win32 2.4**. Programa de Controle da Esquistossomose. DATASUS, Ministério da Saúde, 1995-2005. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinan/pce/cnv/pce.def>>. Acesso em: Fev., 2005.

PELLETIER, M.; XU, Y.; WANG, X.; ZAHARIEV, S.; PONGOR, S.; ALETTA, J. M.; READ, L. K. Arginine methylation of a mitochondrial guide RNA binding protein from *Trypanosoma brucei*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 118, n. 1, p. 49-59, Nov., 2001.

POLLACK, B. P.; KOTENKO, S. V.; HE, W.; IZOTOVA, L. S.; BARNOSKI, B. L.; PESTKA, S. The Human Homologue of the Yeast Proteins Skb1 and Hsl7p Interacts with Jak Kinases and Contains Protein Methyltransferase Activity. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 44, p. 31531-31542, Oct. 29, 1999.

POPIEL, I.; BASCH, P. F. Reproductive development of female *Schistosoma mansoni* (Digenea: Schistosomatidae) following bisexual pairing of worms and worm segments. **J. Exp. Zool.**, v. 232, n. 1, p. 141-150, Oct., 1984.

RAMALHO-PINTO, F. J.; GAZZINELLI, G.; HOWELLS, R. E.; MOTA-SANTOS, T. A.; FIGUEIREDO, E. A.; PELLEGRINO, J. *Schistosoma mansoni*: Defined system for stepwise transformation of cercaria to schistosomule in vitro. **Exp. Parasitol.**, v. 36, n. 3, p. 360-372, Dec., 1974.

REZAI-ZADEH, N.; ZHANG, X.; NAMOUR, F.; FEJER, G.; WEN, Y.-D.; YAO, Y.-L.; GYORY, I.; WRIGHT, K.; SETO, E. Targeted recruitment of a histone H4-specific methyltransferase by the transcription factor YY1. **Genes Dev.**, v. 17, n. 8, p. 1019-1029, Apr. 15, 2003.

RHO, J.; CHOI, S.; SEONG, Y. R.; CHO, W.-K.; KIM, S. H.; IM, D.-S. PRMT5, Which Forms Distinct Homo-oligomers, Is a Member of the Protein-arginine Methyltransferase Family. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 14, p. 11393-11401, Apr. 6, 2001.

RIBEIRO-PAES, J. T.; RODRIGUES, V. Sex determination and female reproductive development in the genus *Schistosoma*: a review. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 39, n. 6, p. 337-344, Nov./Dec., 1997.

RICE, J. C.; ALLIS, C. D. Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 13, n. 3, p. 263-273, Jun., 2001.

RODRIGUES, V.; CHAUDHRI, M.; KNIGHT, M.; MEADOWS, H.; CHAMBERS, A. E.; TAYLOR, W. R.; KELLY, C.; SIMPSON, A. J. G. Predicted structure of a major *Schistosoma mansoni* eggshell protein. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 32, n. 1, p. 7-13, Jan. 1st, 1989.

ROLLINSON, D.; SOUTHGATE, V. R. The genus *Schistosoma*: a taxonomic appraisal. In: ROLLINSON, D.; SIMPSON, A. J. G. (Ed.). **The Biology of Schistosomes. From Genes to Latrines**. London: Academic Press, 1987. p. 1-49.

ROLLINSON, D.; KAUKAS, A.; JOHNSTON, D. A.; SIMPSON, A. J. G.; TANAKA, M. Some molecular insights into Schistosome evolution. **Int. J. Parasitol.**, v. 27, n. 1, p. 11-28, Jan., 1997.

RUFFER, M. A. Note on the presence of *Bilharzia Haematobia* in Egyptian mummies of the twentieth dynasty (1250-11 B.C.). **Br. Med. J.**, v. i, n. 16, 1910.

RUMJANEK, F. D.; BRAGA, V. M. M.; KELLY, C. DNA binding proteins of *Schistosoma mansoni* recognizing a hexanucleotide motif occurring in genes regulated by steroids. **Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.**, v. 94, n. 4, p. 807-812, 1989.

SAHA, A.; WITTMAYER, J.; CAIRNS, B. R. Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 7, n. 6, p. 437-447, Jun., 2006.

SAMBON, L. W. New or little known African entozoa. **J. Trop. Med.**, v. 10, p. 117, 1907.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001.

SARMENTO, O. F.; DIGILIO, L. C.; WANG, Y.; PERLIN, J.; HERR, J. C.; ALLIS, C. D.; COONROD, S. A. Dynamic alterations of specific histone modifications during early murine development. **J. Cell Sci.**, v. 117, n. 19, p. 4449-4459, Sep. 1st, 2004.

SASA, M. A historical view of early Japanese contributions to the knowledge of *Schistosomiasis japonica*. In: YOKOGAWA, M. (Ed.). **Researches in filariasis and schistosomiasis**. Baltimore: University Park Press, 1972. v. 2, p. 235-261.

SASSONE-CORSI, P. CREM: a master-switch governing male germ cells differentiation and apoptosis. **Semin. Cell Dev. Biol.**, v. 9, n. 4, p. 475-482, Aug., 1998.

SAULE, P.; ADRIAENSSENS, E.; DELACRE, M.; CHASSANDE, O.; BOSSU, M.; AURIAULT, C.; WOLOWCZUK, I. Early variations of host thyroxine and interleukin-7 favor *Schistosoma mansoni* development. **J. Parasitol.**, v. 88, n. 5, p. 849-855, Oct, 2002.

SCHMEICHEL, K. L.; BECKERLE, M. C. The LIM domain is a modular protein-binding interface. **Cell**, v. 79, n. 2, p. 211-219, Oct. 21, 1994.

SCHUBERT, M.; HOLLAND, N. D.; HOLLAND, L. Z. Amphioxus *AmphiDRAL* encoding a LIM-domain protein: expression in the epidermis but not in the presumptive neuroectoderm. **Mech. Dev.**, v. 76, n. 1-2, p. 203-205, Aug., 1998.

SCHURTER, B. T.; KOH, S. S.; CHEN, D.; BUNICK, G. J.; HARP, J. M.; HANSON, B. L.; HENSCHEN-EDMAN, A.; MACKAY, D. R.; STALLCUP, M. R.; ASWAD, D. W. Methylation of Histone H3 by Coactivator-Associated Arginine Methyltransferase 1. **Biochemistry**, v. 40, n. 19, p. 5747-5756, May 15, 2001.

SCHÜßLER, P.; GREVELDING, C. G.; KUNZ, W. Identification of Ras, MAP kinases, and a GAP protein in *Schistosoma mansoni* by immunoblotting and their putative involvement in male-female interaction. **Parasitology**, v. 115, n. 6, p. 629-634, Dec., 1997.

SCORILAS, A.; BLACK, M. H.; TALIERI, M.; DIAMANDIS, E. P. Genomic Organization, Physical Mapping, and Expression Analysis of the Human Protein Arginine Methyltransferase 1 Gene. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 278, n. 2, p. 349-359, Nov. 19, 2000.

SCOTT, H. S.; ANTONARAKIS, S. E.; LALIOTI, M. D.; ROSSIER, C.; SILVER, P. A.; HENRY, M. F. Identification and Characterization of Two Putative Human Arginine Methyltransferases (HRMT1L1 and HRMT1L2). **Genomics**, v. 48, n. 3, p. 330-340, Mar. 15, 1998.

SHAW, J. R.; MARSHALL, I.; ERASMUS, D. A. *Schistosoma mansoni*: *In vitro* stimulation of vitelline cell development by extracts of male worms. **Exp. Parasitol.**, v. 42, n. 1, p. 14-20, Jun., 1977.

SHIFF, C. J.; DOSSAJI, S. F. Ecdysteroids as regulators of host and parasite interactions: a study of interrelationships between *Schistosoma mansoni* and the host snail, *Biomphalaria glabrata*. **Trop. Med. Parasitol.**, v. 42, n. 1, p. 11-16, Mar, 1991.

SHORT, R. B. Presidential address. Sex and the single schistosome. **J. Parasitol.**, v. 69, n. 1, p. 3-22, Feb, 1983.

SILVEIRA, A. M.; FRICHE, A. A.; RUMJANEK, F. D. Transfer of [¹⁴C] cholesterol and its metabolites between adult male and female worms of *Schistosoma mansoni*. **Comp. Biochem. Physiol. B**, v. 85, n. 4, p. 851-857, 1986.

SIMPSON, A. J. G.; SHER, A.; MCCUTCHAN, T. F. The genome of *Schistosoma mansoni*: Isolation of DNA, its size, bases and repetitive sequences. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 6, n. 2, p. 125-137, Aug., 1982.

SIMPSON, A. J. G.; KNIGHT, M. Cloning of a major developmentally regulated gene expressed in mature females of *Schistosoma mansoni*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 18, n. 1, p. 25-35, Jan., 1986.

SIMPSON, A. J. G.; CHAUDRI, M.; KNIGHT, M.; KELLY, C.; RUMJANEK, F. D.; MARTIN, S.; SMITHERS, S. R. Characterisation of the structure and expression of the gene encoding a major female specific polypeptide of *Schistosoma mansoni*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 22, n. 2-3, p. 169-176, Jan. 15, 1987.

SKELLY, P. J.; KIM, J. W.; CUNNINGHAM, J.; SHOEMAKER, C. B. Cloning, characterization, and functional expression of cDNAs encoding glucose transporter proteins from the human parasite *Schistosoma mansoni*. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 6, p. 4247-4253, Feb. 11, 1994.

SKELLY, P. J.; SHOEMAKER, C. B. Rapid appearance and asymmetric distribution of glucose transporter SGTP4 at the apical surface of intramammalian-stage *Schistosoma mansoni*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 93, n. 8, p. 3642-3646, Apr. 16, 1996.

SMITH, W. A.; SCHURTER, B. T.; WONG-STAAAL, F.; DAVID, M. Arginine Methylation of RNA Helicase A Determines Its Subcellular Localization. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 22, p. 22795-22798, May 28, 2004.

SPENCER, T. E.; JENSTER, G.; BURCIN, M. M.; ALLIS, C. D.; ZHOU, J.; MIZZEN, C. A.; MCKENNA, N. J.; OÑATE, S. A.; TSAI, S. Y.; TSAI, M.-J.; O'MALLEY, B. W. Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. **Nature**, v. 389, n. 6647, p. 194-198, Sep. 11, 1997.

STALLCUP, M. R. Role of protein methylation in chromatin remodeling and transcriptional regulation. **Oncogene**, v. 20, n. 24, p. 3014-3020, May 28, 2001.

STALLCUP, M. R.; KIM, J. H.; TEYSSIER, C.; LEE, Y.-H.; MA, H.; CHEN, D. The roles of protein-protein interactions and protein methylation in transcriptional activation by nuclear receptors and their coactivators. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.**, v. 85, n. 2-5, p. 139-145, Jun., 2003.

STRAHL, B. D.; OHBA, R.; COOK, R. G.; ALLIS, C. D. Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in *Tetrahymena*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 96, n. 26, p. 14967-14972, Dec. 21, 1999.

STRAHL, B. D.; ALLIS, C. D. The language of covalent histone modifications. **Nature**, v. 403, n. 6765, p. 41-45, Jan. 6, 2000.

STRAHL, B. D.; BRIGGS, S. D.; BRAME, C. J.; CALDWELL, J. A.; KOH, S. S.; MA, H.; COOK, R. G.; SHABANOWITZ, J.; HUNT, D. F.; STALLCUP, M. R.; ALLIS, C. D. Methylation of histone H4 at arginine 3 occurs in vivo and is mediated by the nuclear receptor coactivator PRMT1. **Curr. Biol.**, v. 11, n. 12, p. 996-1000, Jun. 26, 2001.

TAKESHITA, A.; CARDONA, G. R.; KOIBUCHI, N.; SUEN, C.-S.; CHIN, W. W. TRAM-1, A Novel 160-kDa Thyroid Hormone Receptor Activator Molecule, Exhibits Distinct Properties from Steroid Receptor Coactivator-1. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 44, p. 27629-27634, Oct. 31, 1997.

TANG, J.; GARY, J. D.; CLARKE, S.; HERSCHMAN, H. R. PRMT 3, a Type I Protein Arginine N-Methyltransferase That Differs from PRMT1 in Its Oligomerization, Subcellular Localization, Substrate Specificity, and Regulation. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 27, p. 16935-16945, Jul. 3, 1998.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, n. 24, p. 4876-4882, Dec. 15, 1997.

TORCHIA, J.; ROSE, D. W.; INOSTROZA, J.; KAMEI, Y.; WESTIN, S.; GLASS, C. K.; ROSENFELD, M. G. The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. **Nature**, v. 387, n. 6634, p. 677-684, Jun. 12, 1997.

TORPIER, G.; HIRN, M.; NIRDÉ, P.; DE REGGI, M. L.; CAPRON, A. Detection of ecdysteroids in the human trematode, *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, v. 84, n. 1, p. 123-130, Feb., 1982.

TRAN, M. H.; PEARSON, M. S.; BETHONY, J. M.; SMYTH, D. J.; JONES, M. K.; DUKE, M.; DON, T. A.; MCMANUS, D. P.; CORREA-OLIVEIRA, R.; LOUKAS, A. Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis. **Nat. Med.**, v. 12, n. 7, p. 835-840, Jul., 2006.

TRIEVEL, R. C. Structure and function of histone methyltransferases. **Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.**, v. 14, n. 3, p. 147-169, 2004.

TSUCHIDA, A.; YAMAUCHI, T.; KADOWAKI, T. Nuclear receptors as targets for drug development: molecular mechanisms for regulation of obesity and insulin resistance by peroxisome proliferator-activated receptor gamma, CREB-binding protein, and adiponectin. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 97, n. 2, p. 164-170, Feb., 2005.

UTLEY, R. T.; IKEDA, K.; GRANT, P. A.; COTE, J.; STEGER, D. J.; EBERHARTER, A.; JOHN, S.; WORKMAN, J. L. Transcriptional activators direct histone acetyltransferase complexes to nucleosomes. **Nature**, v. 394, n. 6692, p. 498-502, Jul. 30, 1998.

VALADÃO, A. F.; FANTAPPIÉ, M. R.; LOVERDE, P. T.; PENA, S. D.; RUMJANEK, F. D.; FRANCO, G. R. Y-box binding protein from *Schistosoma mansoni*: interaction with DNA and RNA. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 125, n. 1-2, p. 47-57, Nov.-Dec., 2002.

VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; DEMARCO, R.; MARTINS, E. A. L.; GUIMARAES, P. E. M.; OJOPI, E. P. B.; PAQUOLA, A. C. M.; PIAZZA, J. P.; NISHIYAMA, M. Y.; KITAJIMA, J. P.; ADAMSON, R. E.; ASHTON, P. D. *et al.* Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. **Nat. Genet.**, v. 35, n. 2, p. 148-157, Oct., 2003.

VOEGEL, J. J.; HEINE, M. J. S.; ZECHEL, C.; CHAMBON, P.; GRONEMEYER, H. TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. **EMBO J.**, v. 15, n. 14, p. 3667-3675, Jul. 15, 1996.

VOEGEL, J. J.; HEINE, M. J. S.; TINI, M.; VIVAT, V.; CHAMBON, P.; GRONEMEYER, H. The coactivator TIF2 contains three nuclear receptor-binding motifs and mediates transactivation through CBP binding-dependent and -independent pathways. **EMBO J.**, v. 17, n. 2, p. 507-519, Jan. 15, 1998.

WALLINGFORD, J. B.; HABAS, R. The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. **Development**, v. 132, n. 20, p. 4421-4436, Oct. 15, 2005.

WANG, H.; HUANG, Z.-Q.; XIA, L.; FENG, Q.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; STRAHL, B. D.; BRIGGS, S. D.; ALLIS, C. D.; WONG, J.; TEMPST, P.; ZHANG, Y. Methylation of Histone H4 at Arginine 3 Facilitating Transcriptional Activation by Nuclear Hormone Receptor. **Science**, v. 293, n. 5531, p. 853-857, Aug. 3, 2001.

WARREN, K. S. **Schistosomiasis: The Evolution of a Medical Literature: Selected Abstracts and Citations, 1852-1972.** Cambridge: The MIT Press, 1973. 1307 p.

WAY, J. C.; CHALFIE, M. *mec-3*, a homeobox-containing gene that specifies differentiation of the touch receptor neurons in *C. elegans*. **Cell**, v. 54, n. 1, p. 5-16, Jul. 1st, 1988.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **The world health report 2002: Reducing risks, promoting healthy life**. Geneva: World Health Organization, 2002a. 250 p.

_____. (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: report of a WHO expert committee. **WHO Technical Report Series**, n. 912. Geneva: World Health Organization, 2002b. 65 p.

WOOD, C. M.; NICHOLSON, J. M.; LAMBERT, S. J.; CHANTALAT, L.; REYNOLDS, C. D.; BALDWIN, J. P. High-resolution structure of the native histone octamer. **Acta Crystallograph. Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun.**, v. 61 (pt. 6), p. 541-545, Jun. 1st, 2005.

WU, R.-C.; SMITH, C. L.; O'MALLEY, B. W. Transcriptional Regulation by Steroid Receptor Coactivator Phosphorylation. **Endocr. Rev.**, v. 26, n. 3, p. 393-399, May 1st, 2005.

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, Feb. 1st, 2006.

WYSOCKA, J.; ALLIS, C. D.; COONROD, S. Histone arginine methylation and its dynamic regulation. **Front. Biosci.**, v. 11, p. 344-355, Jan. 1st, 2006.

XU, C.; HENRY, M. F. Nuclear Export of hnRNP Hrp1p and Nuclear Export of hnRNP Npl3p Are Linked and Influenced by the Methylation State of Npl3p. **Mol. Cell. Biol.**, v. 24, n. 24, p. 10742-10756, Dec. 15, 2004a.

XU, L.; MASSAGUÉ, J. NUCLEOCYTOPLASMIC SHUTTLLING OF SIGNAL TRANSDUCERS. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 5, n. 3, p. 209-219, Mar., 2004b.

XU, W.; CHEN, H.; DU, K.; ASAHARA, H.; TINI, M.; EMERSON, B. M.; MONTMINY, M.; EVANS, R. M. A Transcriptional Switch Mediated by Cofactor Methylation. **Science**, v. 294, n. 5551, p. 2507-2511, Dec. 21, 2001.

YU, M. C.; BACHAND, F.; MCBRIDE, A. E.; KOMILI, S.; CASOLARI, J. M.; SILVER, P. A. Arginine methyltransferase affects interactions and recruitment of mRNA processing and export factors. **Genes Dev.**, v. 18, n. 16, p. 2024-2035, Aug. 15, 2004.

ZHANG, X.; CHENG, X. Structure of the Predominant Protein Arginine Methyltransferase PRMT1 and Analysis of Its Binding to Substrate Peptides. **Structure (Camb.)**, v. 11, n. 5, p. 509-520, May, 2003.

ZHANG, Y.; REINBERG, D. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. **Genes Dev.**, v. 15, n. 18, p. 2343-2360, Sep. 15, 2001.

ZHAO, Y.; GOTO, K.; SAITOH, M.; YANASE, T.; NOMURA, M.; OKABE, T.; TAKAYANAGI, R.; NAWATA, H. Activation Function-1 Domain of Androgen Receptor Contributes to the Interaction between Subnuclear Splicing Factor Compartment and Nuclear Receptor Compartment. IDENTIFICATION OF THE p102 U5 SMALL NUCLEAR RIBONUCLEOPROTEIN PARTICLE-BINDING PROTEIN AS A COACTIVATOR FOR THE RECEPTOR. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 33, p. 30031-30039, Aug. 9, 2002.

ZHENG, J.; GU, X.-G.; XU, Y.-L.; GE, J.-H.; YANG, X.-X.; HE, C.-H.; TANG, C.; CAI, K.-P.; JIANG, Q.-W.; LIANG, Y.-S.; WANG, T.-P. *et al.* Relationship between the transmission of *Schistosomiasis japonica* and the construction of the Three Gorge Reservoir. **Acta Trop.**, v. 82, n. 2, p. 147-156, May, 2002.

ZHOU, X.-N.; WANG, L.-Y.; CHEN, M.-G.; WU, X.-H.; JIANG, Q.-W.; CHEN, X.-Y.; ZHENG, J.; JURG, U. The public health significance and control of schistosomiasis in China--then and now. **Acta Trop.**, v. 96, n. 2-3, p. 97-105, Nov.-Dec., 2005.

APÊNDICE I – PROTOCOLO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA EM CORTES DE CRIOSTATO DE VERMES ADULTOS DE *SCHISTOSOMA MANSONI*

MÉTODO

A Fixação e Corte das Seções

1. Lavar os vermes perfundidos 6X em PBS 1X em um tubo cônico de 15 mL.
2. Fixar em PFA overnight a 4° C.
3. Incubar, sucessivamente, em soluções de 10%, 20% e 30% sacarose em PBS 1X, aguardando a estabilização em cada solução.
4. Orientar as amostras em OCT e congelar os blocos em N₂ líquido, deixando-os a -20° C no criostato.
5. Cortar seções de 10 µm, transferindo-as uma a uma para lâminas tratadas com TESPA*
6. Secar as lâminas por 30 min. à temperatura ambiente.
7. Fixar em PFA por 5 min.
8. Lavar 2 vezes por 5 min. com PBS.
9. Desidratar passando sucessivamente em soluções de etanol a 30%, 60%, 85%, 95% e 100% (2 vezes) por 2 min. em cada e secar na bancada.
10. Guardar a -20° C até a próxima etapa.

B Pré-tratamento das Criosseções

1. Incubar em acetona gelada (4° C) por 5 min. e secar na bancada.
2. Fixar em PFA por 20 min. à temperatura ambiente.
3. Lavar 3 vezes por 5 min. com PBS.
4. Incubar por 5 min. à temperatura ambiente na solução de proteinase K fresca. (200 mL).
5. Lavar 3 vezes por 5 min. com PBS.
6. Desidratar passando sucessivamente em soluções de etanol a 30%, 60%, 85%, 95% e 2 vezes em etanol 100%, por 2 min. em cada e secar na bancada.
7. Marcar as bordas das lâminas com caneta para membranas ou caneta PAP e secar por 5 min. Seguir com o protocolo de imunofluorescência (C) no mesmo dia.

C Imunofluorescência

1. Lavar 3 vezes por 5 min. com PBS.
2. Incubar as lâminas por 1 h à temperatura ambiente com soro normal de cabra (NGS) a 5% diluído 1:50 em PBS-Triton a 0,05%.
3. Incubar com o anticorpo diluído em PBS-Triton. Deixar durante a noite em câmara úmida a 4° C. (não esquecer do controle negativo sem anticorpo primário).
4. Lavar 3 vezes por 5 min. com PBS.
5. Incubar as lâminas por 1 h à temperatura ambiente com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho fluorescente (CY3) diluído 1:5000 em PBS-Triton.
6. Lavar 3 vezes por 5 min. com PBS.
7. Incubar com a solução de DAPI por 1 min.
8. Lavar 2 vezes por 5 min. com PBS.
9. Montar em n-propil-galacto.
10. Observar ao microscópio de fluorescência a 532 nm (CY3).

REAGENTES

- PBS
- PFA (paraformaldeído a 4% em PBS)
 - 2 g de paraformaldeído
 - 10 mL de PBS 5XAdicionar ~30 mL de H₂O destilada, aquecer de 55-65° C e resfriar no gelo. Avolumar para 50 mL com H₂O destilada.
- Sacarose a 10%, 20% e 30% em PBS
- Tissue-Tek OCT
- Etanol 100% e a 30%, 60%, 85% e 95% em H₂O.
- Acetona P.A. (a 4° C)
- PBS-Triton a 0,05%
 - 10 mL de PBS
 - 50 µL de Triton x-100
- NGS a 5% em PBS-triton
 - 10 mL de PBS-triton a 0,05%
 - 500 µL do estoque de NGS (*Normal Goat Serum*)

- Anticorpo secundário anti-IgG de coelho marcado com CY3.

*

Lâminas tratadas com TESP (3-aminopropiltrietoxisilano) (Sigma, A3648)

- Método de Preparação:
 1. Colocar as lâminas em um *rack*.
 2. Submergir por 30 seg. em HCl a 10%, etanol a 70%.
 3. Lavar 1 vez em H₂O destilada.
 4. Submergir por 60 seg. em etanol a 95%.
 5. Secar na estufa a 70-80°C por 20-40 min. e deixar esfriar.
 6. Submergir as lâminas em TESP a 2% em acetona por 30 seg.
 7. Lavar 2 vezes em acetona.
 8. Lavar 1 vez em H₂O destilada.
 9. Secar a 37-42° C por várias horas. Guardá-las protegidas do ar à temperatura ambiente. Se bem acondicionadas podem ser usadas por meses.

ANEXO I – TRABALHO PUBLICADO EM PERIÓDICO DE CIRCULAÇÃO INTERNACIONAL

MANSURE, J. J.; FURTADO, D. R.; BASTOS DE OLIVEIRA, F. M.; RUMJANEK, F. D.; FRANCO, G. R.; FANTAPPIÉ, M. R. Cloning of a protein arginine methyltransferase PRMT1 homologue from *Schistosoma mansoni*: Evidence for roles in nuclear receptor signaling and RNA metabolism. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 335, n. 4, p. 1163-1172, Oct. 7, 2005.

Cloning of a protein arginine methyltransferase PRMT1 homologue from *Schistosoma mansoni*: Evidence for roles in nuclear receptor signaling and RNA metabolism ^{☆,☆☆}

José João Mansure ^{a,1}, Daniel Rodrigues Furtado ^{a,1},
Francisco Meirelles Bastos de Oliveira ^a, Franklin David Rumjanek ^a,
Glória Regina Franco ^b, Marcelo Rosado Fantappié ^{a,*}

^a Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro 21941-590, Brazil

^b Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 30161-970, Brazil

Received 21 July 2005

Available online 11 August 2005

Abstract

The most studied arginine methyltransferase is the type I enzyme, which catalyzes the transfer of an *S*-adenosyl-L-methionine to a broad spectrum of substrates, including histones, RNA-transporting proteins, and nuclear hormone receptor coactivators. We cloned a cDNA encoding a protein arginine methyltransferase in *Schistosoma mansoni* (SmPRMT1). SmPRMT1 is highly homologous to the vertebrate PRMT1 enzyme. In vitro methylation assays showed that SmPRMT1 recombinant protein was able to specifically methylate histone H4. Two schistosome proteins likely to be involved in RNA metabolism, SMYB1 and SmSmD3, that display a number of RGG motifs, were strongly methylated by SmPRMT1. In vitro GST pull-down assays showed that SMYB1 and SmSmD3 physically interacted with SmPRMT1. Additional GST pull-down assay suggested the occurrence of a ternary complex including SmPRMT1, SmRXR1 nuclear receptor, and the p160 (SRC-1) nuclear receptor coactivator. Together, these data suggest a mechanism by which SmPRMT1 plays a role in nuclear receptor-mediated chromatin remodeling and RNA transactions. © 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Methylation; Methyltransferase; Gene regulation by nuclear receptors; RNA transport; RNA splicing

Schistosoma mansoni is the main causative agent of schistosomiasis, a debilitating disease that still affects millions of people worldwide [1]. Besides its medical importance, this parasite constitutes an important mod-

el to study sexual differentiation and development, gene regulation, and host–parasite interplay. As part of an effort to understand the molecular aspects of sexual development in *S. mansoni*, we have been focusing our studies on the mechanisms of gene expression in the parasite.

Transcriptional regulation in eukaryotes encompasses multiple processes including chromatin reorganization, processing of pre-mRNA transcripts, and export of the mRNA into the cytoplasm and translation.

Activation of transcription at the promoter of a gene involves the binding of transcriptional activator proteins to specific DNA sequences in the promoter. The DNA-bound transcriptional activator protein either brings with it or subsequently recruits several complexes of

[☆] Note: Nucleotide sequence data reported in this paper are available under GenBank Accession No. [DQ068274](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/lookup?term=DQ068274).

^{☆☆} Abbreviations: snRNP, small nuclear ribonucleoprotein; SmSmD3, *S. mansoni* spliceosome Sm protein D3; PRMT1, protein arginine methyltransferase 1; SRC-1, steroid receptor coactivator-1; GST, glutathione *S*-transferase; MBP, maltose-binding protein; SmRXR1, *S. mansoni* retinoid X receptor 1.

* Corresponding author. Fax: +55 21 25612936.

E-mail address: fantappie@bioqmed.ufrj.br (M.R. Fantappié).

¹ These two authors contributed equally to this work.

coactivator proteins, which locally remodel the chromatin structure in the promoter region, and favor the recruitment and activation of RNA polymerase II and its associated basal transcription machinery [2].

The nuclear hormone receptors, which include the receptors for steroid and thyroid hormones, retinoic acid and vitamin D, are one family of hormone-regulated transcriptional activators for which there has been rapid progress in defining the coactivators which mediate transcriptional activation [3]. Transcription activation by nuclear receptors is mediated by nuclear receptor coactivators. One coactivator complex, which plays a central role in mediating transcriptional activation, includes at least one of the three 160-kDa proteins commonly referred to as p160 coactivators (SRC-1, GRIP1/TIF2, and pCIP/RAC3/ACTR/AIB1/TRAM1). The p160 coactivators bind directly and in a ligand-dependent manner to the C-terminal AF2 activation domain of the nuclear receptors through the LXXLL (where L is leucine and X is any amino acid) motifs located in the central part of the p160 polypeptide chain. The C-terminal region of the p160 coactivators can also interact with the N-terminal AF-1 activation domains of some nuclear receptors [4–6]. The p160 coactivators contribute to transcriptional activation by conveying other associated coactivator proteins to the promoter. The p160 coactivator complex includes either of the two related proteins p300 and CBP, which bind to the AD1 activation domain of p160 coactivators [3,7,8], and function as coactivators for nuclear receptors. CBP and p300, as well as their interacting partners, the p/CAF or GCN5 coactivators [9], contribute to chromatin remodeling by acetylating histones [10]. CBP, p300, and GCN5 can also bind directly to basal transcription factors and may thereby help to assemble the transcription initiation complex [11].

The activation domain AD2, located at the C terminus of p160 coactivators, binds CARM1 and PRMT1, which belong to a family of previously identified arginine-specific protein methyltransferases (PRMTs) [12]. CARM1 and PRMT1 bind to AD2 and act as secondary coactivators for nuclear receptors, through their effect on nuclear receptor function, this being totally dependent upon the presence of a primary coactivator in the form of a p160 coactivator [12].

Histone methylation, like histone acetylation, is a dynamic process involved in a diversity of biological processes including transcriptional regulation, chromatin condensation, mitosis, and heterochromatin assembly [13–15]. In a recent set of experiments, CARM1 and PRMT1 were shown to interact with p160 family members and enhance the activity of a variety of nuclear receptors in mammalian cell-based reporter gene assays [16,17]. Both CARM1 and PRMT1 can methylate histones in vitro [16] and in vivo [17]. Interestingly, CARM1 and PRMT1 exhibit different methyltransferase specificities;

CARM1 primarily methylates arginines 17 and 26 of histone H3 [16], whereas PRMT1 methylates arginine 3 of histone H4 [16]. Importantly, cooperative functional interactions between histone acetyltransferases and histone methyltransferases have been observed during stimulation of nuclear receptor activity [16].

Like histone acetyltransferases (HATs), histone methyltransferases have also been shown to methylate non-histone substrates (e.g., p300/CBP, STAT1, RNA-Pol II FCP1 phosphatase, hnRNP, HuR mRNA-stabilizing protein, RBP16 mitochondrial Y-box protein, and spliceosomal Sm proteins) [18–22].

Arginine methyltransferases were initially identified biochemically in mammalian cell lysates by their ability to transfer a radiolabeled methyl group from *S*-adenosyl-L-methionine (SAM) to histones. Protein arginine methyltransferases have been identified and cloned in many eukaryotes. In addition, the number of potential substrates for these enzymes has grown, as genome sequencing projects have revealed several proteins containing the RGG (arginine, glycine, and glycine) motif common to substrates for arginine methylation, many of which are RNA-binding proteins [23]. Indeed, the two schistosome proteins, the SmSmD3 (unpublished) and the Y-box-binding protein SMYB1 [24], used in this work as substrates for SmPRMT1, contain several RGG motifs.

The spliceosome is a nuclear complex that catalyzes the splicing of pre-mRNA in eukaryotes. Each spliceosome small nuclear ribonucleoprotein (snRNP) is made up of snRNAs (U1, U2, U4/U6, and U5) bound to a unique set of proteins as well as a shared set of seven Sm proteins (B/B', D1, D2, D3, E, F, and G) [25,26]. The seven Sm proteins have a key role in snRNP biogenesis. The Sm proteins D1, D3, and B/B' contain a C-terminal rich in arginine and glycine residues that is conserved in most eukaryotes. Both Sm D1 and D3 contain RG dipeptide repeats [26]. Other known RNA-binding proteins (hnRNP, fibrillarin, nucleolin, and Y-box-binding proteins) have also been shown to contain methylated arginine residues [26–28].

It has been shown that the protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5/JBP1), a type II methyltransferase, in complex with pICln and two novel factors, can catalyze the methylation of Sm proteins [26,29,30]. There is also evidence to suggest that the symmetrical dimethylation of arginine residues by PRMT5 in these Sm proteins is important for regulating the snRNP proteins [29,30].

In this paper, we report the cloning and biochemical characterization of *S. mansoni* protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1). This is the first protein methyltransferase described in parasites. In vitro methylation assays and in vitro protein interaction experiments suggested the involvement of SmPRMT1 in nuclear receptor-mediated gene activation and RNA editing and

transport. Based on these results, the putative biological roles of SmPRMT1 are discussed.

Materials and methods

Cloning of SmPRMT1. Our strategy to clone nuclear receptor coactivators is based on three approaches: (1) the design of degenerate oligonucleotides based on the conserved regions of the target proteins; (2) yeast two-hybrid screening using the SmRXR1 as bait; (3) search for the schistosome EST databases. The *S. mansoni* PRMT1 homologue (SmPRMT1) was identified (clone name SMFBE08) by searching the TIGR *S. mansoni* Gene Index (SmGI) [31]. The 663 bp SmPRMT1 EST clone was RT-PCR-amplified using adult worm cDNA and the following pair of primers: 5'-GGTGGGACAGCG TGTACGGC-3' (nt 673–692 of the full-length cDNA) and 5'-CGAC GAAAGTTCTCCCTCG-3' (nt 1109–1127 of the full-length cDNA). The 455 bp amplicon was used as a probe to screen a *S. mansoni* adult worm lambda-Zap II cDNA library. The full-length SmPRMT1 cDNA contains an open-reading frame of 1080 bp, which encodes a protein with an estimated molecular mass of 41 kDa.

Genomic Southern blot and RT-PCR analysis. Ten micrograms of digested genomic DNA was separated on a 0.8% agarose gel and transferred to Hybond N⁺ nylon membrane (GE Healthcare Biosciences, former Amersham Biosciences). The hybridization was performed with the SmPRMT1 full-length cDNA as probe and the membrane washes were carried out under high stringency conditions.

Total RNA from *S. mansoni* adult worms was isolated using Trizol Reagent (Invitrogen). *S. mansoni* cDNA was synthesized using the SuperScript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen) and an oligo(dT) primer. RT-PCR was carried out using the following pair of primers for SmPRMT1: forward; 5'-GGTGGGACAGCGTGTAC GGC-3' and reverse; 5'-CGACGAAAGTTCTCCCTCG-3', and for SmGAPDH: forward; 5'-GCTTGTGCCATCAGCGAAG TC-3' and reverse; 5'-TGGTGTGGGACGCGGAAAG-3'. The PCR mix contained 1 μCi [α -³²P]dATP. The gel was transferred to Hybond N⁺ nylon membrane, which was exposed to X-ray film (Kodak).

Plasmid construction and fusion proteins. PCR was used to generate constructs expressing fusion proteins. All reactions were carried out with a proofreading *Taq* DNA polymerase (Biotools B&M Labs, S.A.). Full-length GST-SmPRMT1 was cloned into pGEX-4T1 (GE Healthcare Biosciences, former Amersham Biosciences) at *Bam*HI and *Xho*I sites. Full-length His-tag-SmSmD3 was cloned into pQE 80L (Qiagen) at *Bam*HI and *Hind*III sites. The human full-length SRC-1 cDNA (GenBank Accession No. U90661) cloned in pCR3.1 (Stratagene) was obtained from the laboratory of Dr. O'Malley. The SRC-1 full-length cDNA was used as template to generate a smaller fragment of the cDNA that lacks the N-terminal region (Δ NH₂-hSRC1, deletion from aa 1–906) containing both, the nuclear receptor interacting domain and the methyltransferase interacting domain. The His-tag- Δ NH₂-hSRC1 was cloned into pQE 80L (Qiagen) at *Bam*HI and *Pst*I sites. It is worth mentioning that the human SRC-1 protein was used in this work because no p160 coactivator full length cDNA have yet been cloned in *S. mansoni*. The sequence of SmSmD3 cDNA (Dr. G.R. Franco's lab.) was deposited under GenBank Accession No. DQ086815. All clones were verified by sequencing in both directions (Macrogen, Korea). The SMYB1 and SmRXR1 cDNAs used for in vitro transcription and translation, as well as MBP-SMYB1 fusion proteins, are described elsewhere [32,33].

In vitro methylation assays. Methylation assays were performed by incubating 1 μg MBP-SMYB1, MBP-CSD, MBP-tail, His-tag-SmSmD3 or 0.2 μg of the NH₂-histone peptides (H3: ARTKQTARK STGGKAPRKC; H4: SGRGKGGKGLGKGGAKRNR) and 0.2 μg of a negative control peptide (ACT: GGVTYKGNPWKHE CFTCTSCSKQLA) with 1 μg GST or GST-SmPRMT1 in the presence of 7 μM *S*-adenosyl-L-[methyl-³H]methionine (³H]SAM) in 30 μl

of 1× phosphate-buffered saline (PBS) for 60 min at 37 °C. Reactions were stopped by addition of SDS loading buffer and analyzed by 15% SDS-PAGE. The gels were stained with Coomassie blue, fixed, and submitted to fluorography. The gels were dried and exposed to X-ray film at -70 °C (the gel containing the peptides was exposed for 15 days). The autoradiographs were overlaid with the Coomassie-stained gel to identify the methylated protein species.

Protein-protein interaction in vitro. In order to measure the physical interaction of ³⁵S-labeled proteins (³⁵S-SMYB1, ³⁵S-SmRXR1, and ³⁵S-SmSmD3) synthesized in vitro using the TNT Quick Couple Transcription/Translation System (Promega) to GST or His-tag proteins (GST, GST-PRMT1, His-tag- Δ NH₂-hSRC1, and His-tag-SmSmD3) pull-down assays were performed. Fusion proteins were affixed to either glutathione-Sepharose (GE Healthcare Biosciences, former Amersham Biosciences) or nickel pro-bond beads (Invitrogen) and binding reactions were carried out by adding 5 μl of the translation reaction to fusion protein-coupled beads. The reactions were incubated in a pull-down buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 10% glycerol, and 0.15% Nonidet P-40) overnight at 4 °C. The beads were washed three times with pull-down buffer, the samples were boiled in SDS loading buffer and analyzed in SDS-PAGE. The gels were stained, dried, and exposed to X-ray film.

Results

Identification of a protein arginine methyltransferase PRMT1 in *S. mansoni*

Following our strategy to identify nuclear receptor coactivators in *S. mansoni*, and given the importance of protein methylation in gene regulation and RNA metabolism, we set out to identify proteins displaying methylase activities. The *S. mansoni* Gene Index database, available on TIGR [31] allowed us to retrieve an EST clone showing high homology with a protein arginine methyltransferase I, PRMT1. After RT-PCR amplification and cDNA library screening, we isolated the full-length cDNA encoding the *S. mansoni* PRMT1 (SmPRMT1) homologue. Comparison of SmPRMT1 with PRMT1 from several species (Fig. 1) revealed that the highest degree of similarity was obtained with *Bos taurus* (cow) and *Rattus norvegicus* (rat) PRMT1 (76.4%), followed by the *Danio rerio* (zebrafish) enzyme (75.8%). The 41-kDa SmPRMT1 protein contained the putative *S*-adenosyl methionine-binding domain (Fig. 1, amino acids 105–130), which included the region to which the p160 coactivators bind [12].

The SmPRMT1 gene is constitutively transcribed in adult schistosomes

Schistosomes are the only helminths that display a marked sexual dimorphism. Moreover, sexual development in female schistosome worms is to a large extent dependent on constant pairing of female with male parasites [34]. Therefore, we investigated the mRNA levels of SmPRMT1 in sexual immature females (females from unisexual infections that had never been paired with male worms) and mature bisexual worms (paired males

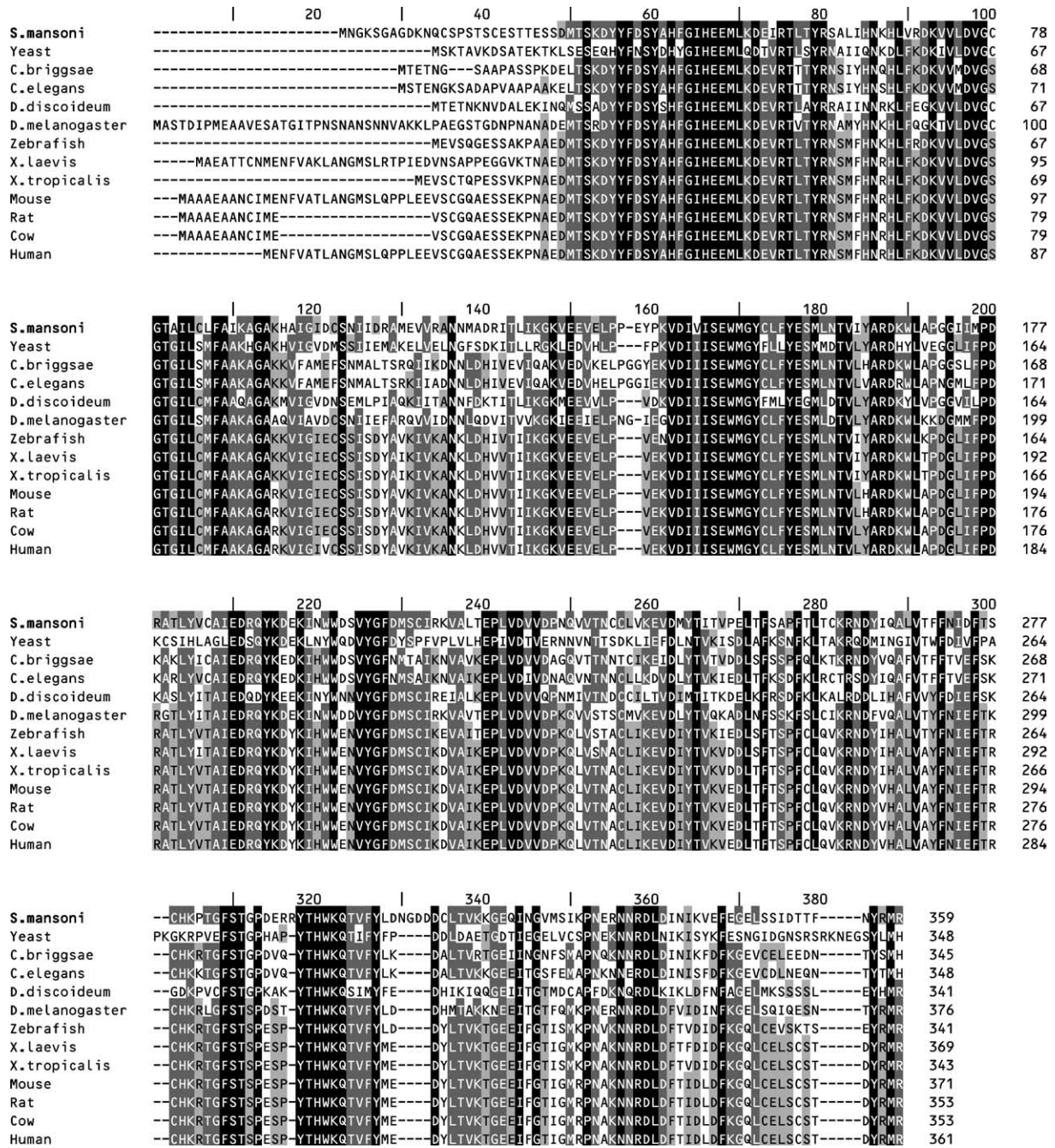


Fig. 1. Schistosome PRMT1 is highly homologous to other PRMT1 enzymes. SmPRMT1 (*S. mansoni*, GenBank Accession No. AAY67834) was aligned with PRMT1 from *Saccharomyces cerevisiae* (Yeast, GenBank Accession No. NP_009590), *Caenorhabditis briggsae* (*C. briggsae*, GenBank Accession No. CAE67422), *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*, GenBank Accession No. NP_507909), *Dictyostelium discoideum* (*D. discoideum*, GenBank Accession No. XP_635288), *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*, GenBank Accession No. NP_0560017), *Danio rerio* (Zebrafish, GenBank Accession No. NP_956944), *Xenopus laevis* (*X. laevis*, GenBank Accession No. BAC53990), *Xenopus tropicalis* (*X. tropicalis*, GenBank Accession No. AAH74614), *Mus musculus* (Mouse, GenBank Accession No. NP_062804), *Rattus norvegicus* (Rat, GenBank Accession No. NP_077339), *Bos taurus* (Cow, GenBank Accession No. NP_001015624), and *Homo sapiens* (Human, GenBank Accession No. NP_001527) by means of the ClustalW multiple alignment algorithm. 100% identical residues are shaded in black, 80% identical in dark gray, and 60% identical in light gray.

and females). Our data showed that SmPRMT1 mRNA is equally present in either unisexual or bisexual male and female worms (Fig. 2A). This result is not surprising because if there is a difference in protein-arginine meth-

yltransferase activity between sex and/or developmental stages of the parasites, such differences are likely to result from transient modulation of SmPRMT1 activity, rather than alterations in SmPRMT1 gene expression.

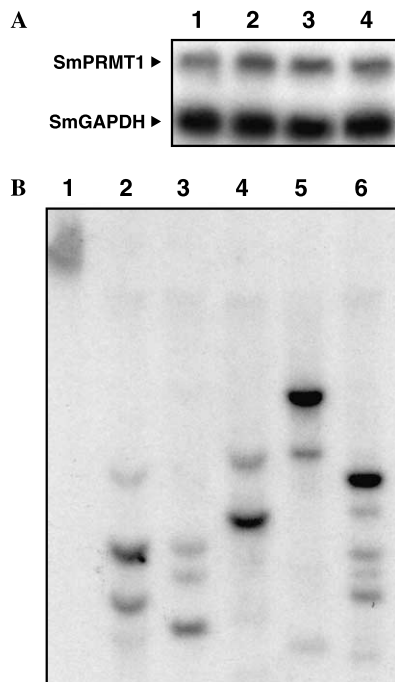


Fig. 2. SmPRMT1 gene is constitutively expressed in adult schistosomes and represents one member of the PRMT gene family. (A) RNA was isolated from sexually mature and sexually immature adult worms and analyzed by RT-PCR. Lanes 1 and 2, mature adult male and female worms from bisexual infection that were mechanically separated; lanes 3 and 4, immature male and female worms from unisexual infection (infections with single male or female cercariae). SmPRMT1 as well as SmGAPDH control transcripts are shown. (B) Ten micrograms of adult worm genomic DNA, undigested (lane 1) or digested with *EcoRI* (lane 2), *HindIII* (lane 3), *EcoRV* (lane 4), *PstI* (lane 5), and *BamHI* (lane 6) was transferred to a nylon membrane and hybridized with ^{32}P -labeled full-length PRMT1 cDNA.

Southern blot analysis of SmPRMT1 gene

In order to estimate the number of gene copies likely to encode SmPRMT1, we performed a Southern blot analysis. Hybridization of *S. mansoni* genomic DNA with the full-length SmPRMT1 cDNA generated a banding pattern which suggested the presence of a multiple copy gene (Fig. 2B). Other interpretations are possible, however; the presence of several bands is also consistent with the occurrence of DNA species bearing sequence homology to SmPRMT1. Indeed, the PRMT family includes seven members. Thus, the multiple band patterns could have resulted from cross-hybridization of the probe with other variants belonging to the same family. Indeed, comparison of the nucleotide sequences of SmPRMT1 with PRMT family members displayed a high degree of homology (data not shown).

SmPRMT1 methylates histone H4 and physically interacts with the SRC-1 coactivator

The identification of the protein arginine methyltransferase PRMT1 in *S. mansoni* was of particular

interest, as PRMT1 enzymes from other organisms have been demonstrated to modulate gene expression. PRMT1 enzymes have been shown to specifically methylate histone H4 [17]. We showed that the recombinant GST-SmPRMT1 was able to methylate a peptide containing the N-terminal sequence of histone H4 (Fig. 3, lane 5). The specificity of SmPRMT1 was confirmed since it did not methylate a peptide containing the N-terminal sequence of histone H3 (Fig. 3, lane 4) or an irrelevant peptide (Fig. 3, lane 6). Control reactions containing only the GST moiety and the substrate peptides were not methylated (Fig. 3, lanes 1–3).

There is considerable evidence showing that secondary coactivators, such as PRMT1, cooperate in contributing to the process of transcriptional activation by nuclear receptors. However, PRMT1 proteins do not interact directly with the nuclear receptors. Instead, PRMT1 associates with the AD2 domain of the p160 coactivators. One example is the SRC-1 coactivator. The scheme shown in Fig. 4A represents a well-established picture on how this complex is assembled in the nucleus of several invertebrates and vertebrates. Thus, we performed in vitro pull-down assays to test for a similar binding activity of the schistosome protein, SmPRMT1. When GST-SmPRMT1 fusion protein was affixed to glutathione-Sepharose beads and incubated with ^{35}S -labeled SmRXR1, no binding was observed (Fig. 4B, lane 3; for clarification, the lack of physical interaction is illustrated in B'). However, when His-tag- ΔNH_2 -hSRC1 (which contains the LXXLL motif) was affixed to nickel pro-bond beads and incubated with ^{35}S -labeled SmRXR1, the interaction

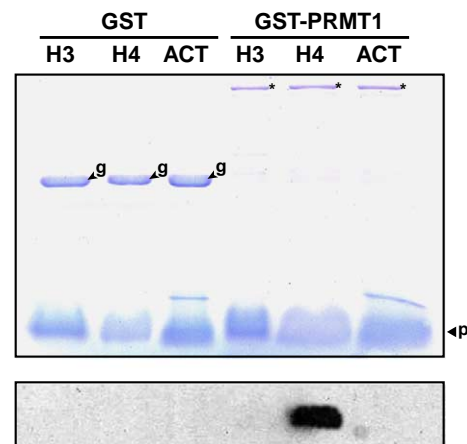


Fig. 3. In vitro methylation of histone H4 by SmPRMT1. Methylation assays were performed using 0.3 μg of synthetic peptides based on the N-terminal region of histone H3 or H4, as well as an irrelevant peptide (ACT) as methylation substrates, and either 1 μg GST or GST-SmPRMT1 in 1 \times PBS including [^3H]SAM. Lanes 1–3 are GST alone incubated with histone H3, histone H4, and ACT peptide, respectively. Lanes 4–6 are the recombinant GST-SmPRMT1 incubated with histone H3, histone H4, and ACT peptide, respectively. The figure shows that only histone H4 was methylated by SmPRMT1 (bottom panel). Recombinant GST-SmPRMT1 (*), GST (g), and peptides (p) are indicated on the Coomassie blue-stained gel.

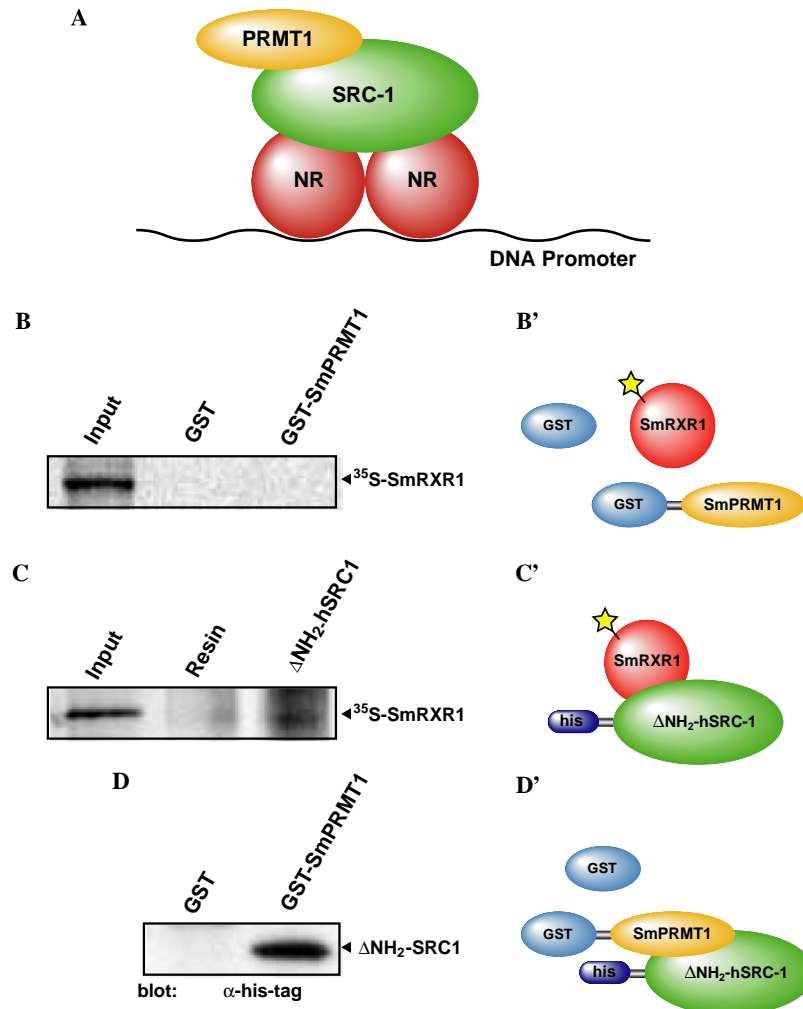


Fig. 4. In vitro interactions of SmPRMT1, SRC-1, and SmRXR1. In vitro pull-down assays were carried out to determine protein interactions. (A) The scheme represents the established model of interaction among nuclear receptors, the SRC-1 primary coactivator, and the PRMT1 secondary coactivator. The experimental results obtained with the pull-down assays are depicted by the schemes on the right (B', C', and D'). The ^{35}S -labeling of SmRXR1 is represented by the yellow star. (B) GST alone (lane 2) or GST-SmPRMT1 (lane 3) bound to glutathione-Sepharose beads was incubated with ^{35}S -SmRXR1. No interaction was observed between SmPRMT1 and ^{35}S -SmRXR1 (lane 3). (C) ^{35}S -SmRXR1 synthesized in vitro was incubated with nickel pro-bond beads (lane 2) or His-tag- ΔNH_2 -hSRC1 bound to the beads (lane 3). Bound proteins were analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. The input represents 20% of the labeled protein initially incubated with the beads (B and C, lanes 1). (D) GST or GST-SmPRMT1 bound to glutathione-Sepharose beads was incubated with His-tag- ΔNH_2 -hSRC1, separated on a SDS-PAGE, and Western blot was performed. The interaction between GST-SmPRMT1 and His-tag- ΔNH_2 -hSRC1 was analyzed by developing the Western blot with an anti-His monoclonal antibody (Clontech). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this paper.)

was observed (Fig. 4C, lane 3; the physical interaction is illustrated in C'). In addition, when the GST-SmPRMT1 fusion protein was incubated with His-tag- ΔNH_2 -hSRC1 (which contains the AD2-PRMT1 binding domain), a clear complex was detected (Fig. 4D, lane 2; the physical interaction between both coactivators is illustrated in D'). The lack of physical interaction between His-tag- ΔNH_2 -hSRC1 and GST is also illustrated in D'.

SmPRMT1 methylates and physically interacts with RNA-binding proteins

Besides the ability of PRMT1 to methylate histone H4, PRMT1 can also methylate non-histone substrates,

such as RNA-binding proteins. Methylation in these proteins can occur at RGG motifs. Thus, we tested the ability of SmPRMT1 to methylate two schistosome RNA-binding proteins, the previously characterized SMYB1 protein [24], which contains 20 RGG motifs, and a putative SmSmD3 (G.R. Franco et al., unpublished), which contains seven RG/GRG motifs. Our data showed that SMYB1 was strongly methylated by SmPRMT1 (Fig. 5A, lane 2). In order to confirm that methylation of SMYB1 was due to the presence of RGG motifs, we tested two other constructs of SMYB1 protein; the cold shock domain (CSD) and the C-terminal domain (tail) [24]. Our data clearly showed that the CSD domain, which is devoid of RGG motifs, was not

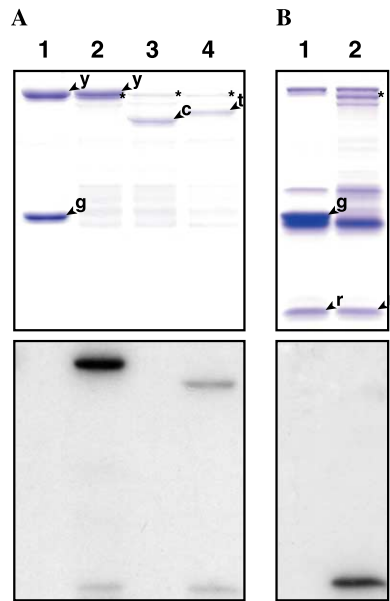


Fig. 5. Schistosome RNA-binding proteins SMYB1 and SmSmD3 are methylation substrates for SmPRMT1. Methylation assays were performed using 1 μ g of substrate proteins and 1 μ g GST-SmPRMT1 in 1 \times PBS including [3 H]SAM. (A) GST was incubated with full-length SMYB1 protein (lane 1); recombinant GST-SmPRMT1 was incubated with: full-length protein SMYB1 (lane 2), the cold shock domain (CSD) of SMYB1 (lane 3), and the C-terminus (tail) of SMYB1 (lane 4). Recombinant GST-SmPRMT1 (*), GST (g), full protein SMYB1 (y), CSD (c), and tail (t) are indicated on the Coomassie blue gel. (B) GST was incubated with His-tag-SmSmD3 (lane 1); GST-SmPRMT1 was incubated with His-tag-SmSmD3 (lane 2). Recombinant GST-SmPRMT1 (*), GST (g), and His-tag-SmSmD3 (r) are indicated on the Coomassie blue gel. In (B), the extra bands that appeared on the Coomassie blue gel are probably bacterial contaminants that co-purified with His-tag-SmSmD3 protein. The bottom panels in (A) and (B) show the autoradiography of the methylated proteins.

methylated by SmPRMT1 (Fig. 5A, lane 3). In contrast, the C-terminal tail domain, containing 20 RGG motifs, was methylated by SmPRMT1 (Fig. 5A, lane 4). In addition, we showed that SmSmD3 protein was also a methylation substrate for SmPRMT1 (Fig. 6B, lane 2). It is worth pointing out that SMYB1, which contained more RGG motifs than SmSmD3, displayed the strongest methylation pattern (compare lanes 2 of Figs. 5A and B).

Because SMYB1 and SmSmD3 were methylated by SmPRMT1, we employed GST pull-down assays to test the physical association between SmPRMT1 and both schistosome RNA-binding proteins. The GST-SmPRMT1 fusion protein was able to specifically interact with 35 S-labeled SMYB1 (Fig. 6A, lane 3). Interaction of GST-SmPRMT1 fusion protein was also observed with 35 S-labeled SmSmD3 (Fig. 6B, lane 3). The control binding reactions with GST alone revealed only background signals (Figs. 6A and B, lanes 2).

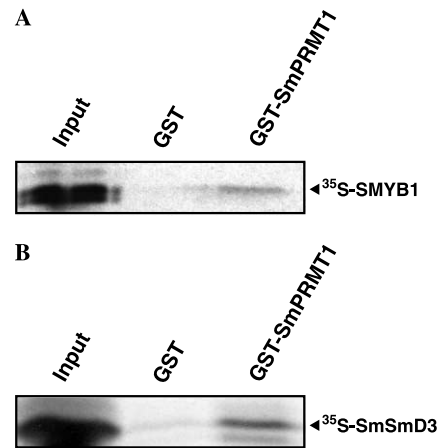


Fig. 6. In vitro interaction of SmPRMT1 to SMYB1 and SmSmD3. In vitro GST pull-down assays were carried out to determine the interactions between SmPRMT1 and the two schistosome RNA-binding proteins. 35 S-SMYB1 (A) and 35 S-SmSmD3 (B) synthesized in vitro were incubated with GST alone (lanes 2) or GST-SmPRMT1 bound to the beads (lanes 3). Bound proteins were analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. The input represents 20% of the labeled proteins initially incubated with the beads (A and B, lanes 1).

Discussion

A detailed description of the mechanisms of gene regulation in *S. mansoni* is still lacking. Part of this limitation is due to the lack of information on promoters and transcription factors in general.

This situation can be illustrated by the development of *S. mansoni* eggs. The fact that this stage of the life cycle plays a critical role in the pathology and dissemination of schistosomiasis should stimulate research at the level of gene expression, since the precise understanding of oogenesis might suggest new strategies of control. In this respect, one of the few promoters of *S. mansoni* that has been targeted for investigation is the promoter of the F-10 (also known as *p14*) eggshell-precursor gene. A putative nuclear receptor response element (DR5) has been identified in the upstream region of the F-10 gene [33], and as a consequence of that, two retinoid X receptors (SmRXR1 and SmRXR2) have been cloned and characterized in *S. mansoni* [35,36]. Besides SmRXRs, a *S. mansoni* homologue of the nuclear receptor Fushi Tarazu-Factor 1 (SmFtz-F1) has been cloned and characterized [37,38].

The role of coactivators as mediators of nuclear receptor transcription in vertebrates is well established. However, in lower eukaryotes, including schistosomes, it is not known how these factors participate in the control of gene expression. In this context, our laboratory has focused on the structural and functional characterization of transcriptional regulation by hormone nuclear receptors in *S. mansoni*. We have successfully cloned and characterized a number of nuclear receptor coactivators and corepressors in *S. mansoni* ([39,40, and unpublished

data). In addition, and more to the point, we have recently cloned the putative retinoic acid receptor (RAR) in *S. mansoni* (S. Verjovski-Almeida and M.R. Fantappiè, unpublished data). The retinoic acid receptor is the canonical heterodimer partner of retinoid X receptors (RXRs). Because in other systems these factors have been described as integral parts of the transcription machinery, we have been able, by association, to steadily build a model applicable to *S. mansoni*.

There is strong evidence for the participation of multiple complexes of coactivator proteins in chromatin remodeling and in the recruitment and activation of RNA polymerase II by nuclear receptors. The histone acetyltransferases, p300/CBP and GCN5, for example, contribute to chromatin remodeling by histone acetylation. In this respect, we have recently demonstrated the ability of schistosome GCN5 coactivator to specifically acetylate histone H3-K14 [40] and to physically interact in vitro, with SmRXR1 via its LXXLL motifs (unpublished data). In addition, we have shown that the schistosome p300/CBP specifically acetylated histone H3 (unpublished data).

The PRMT family of arginine-specific protein methyltransferases, which are the subject of this article, also contribute to chromatin remodeling through histone methylation. Indeed, we showed in this work that schistosome PRMT1 was able to specifically methylate histone H4, but not histone H3.

Interestingly, cooperative functional interactions between histone methyltransferases and histone acetyltransferases have been observed during stimulation of nuclear receptor activity. This interplay can be illustrated by the methylation of H4-R3 by human PRMT1 which was shown to increase acetylation of H4-K8 and K12 by p300 [16]. In contrast, preacetylation of H4 reduced subsequent H4-R3 methylation by PRMT1 [16].

Primary coactivators (i.e., the p160 coactivators) are those factors that bind directly to nuclear receptors. Secondary coactivators are recruited to the promoter through contact with an upstream coactivator and can only enhance nuclear receptor function in cooperation with that upstream coactivator.

Currently, the CARM1 and PRMT1 secondary coactivators have been shown to be part of the p160 coactivator complex and mediate transcription activation by nuclear receptor. We recently isolated the partial cDNA of a p160 family member (the SRC-3 coactivator) in *S. mansoni* (unpublished data). However, to this date we have not been able to clone the portion of the schistosome SRC-3 gene that contains both, the PRMT1 and the nuclear receptor-binding domains. For this reason, in this work we used the human SRC-1 as the primary coactivator.

It is well established that the effect on nuclear receptor function is totally dependent upon the presence of the p160 primary coactivator. It has been recently

demonstrated that PRMT1 can bind directly to steroid receptors in GST pull-down assays [41], although this binding was shown to be insufficient for the functional enhancement of nuclear receptors by PRMT1 [41].

In the present work, we clearly demonstrated, in vitro, that SmPRMT1 was able to interact with human SRC-1 protein. In addition, the human SRC-1 protein interacted with the schistosome nuclear receptor SmRXR1. On the other hand, SmRXR1 was not able to interact directly with SmPRMT1. The results obtained with these individual pull-down assays suggest that a ternary complex might be occurring. This finding, led us to speculate that, at the target promoter in the parasite nucleus (for example, the F-10 promoter), SmPRMT1 might be a key component in a signal transduction pathway transmitting an activating signal from the enhancer element-bound nuclear receptor to the transcription machinery. Considering previously published, and unpublished, data from our group, we can also speculate that *S. mansoni* coactivators p300/CBP and GCN5 may be integral part of this signal transduction pathway. This is currently being investigated in our laboratory.

Although arginine methylation has been shown to regulate protein–protein interaction and signal transduction, very few proteins until now have been shown to be arginine methylated, in vitro. A well-known arginine-rich RNA-binding domain is the RGG domain. The RGG motifs are normally found in conjunction with RNP domains [42] and have been shown to increase the affinity of a protein to RNA [43]. A characteristic feature of the RGG motif is the methylation of arginine residues by PRMTs.

Hence, we decided to test two RNA-binding proteins from *S. mansoni*; the previously characterized Y-box-binding protein, SMYB1, and a putative SmSmD3, both displaying a number of RGG motifs. Our results showed that SmPRMT1 directly methylated SMYB1 and SmSmD3 proteins, most likely through their RGG motifs. This idea was supported by the results showing that the CSD construct of SMYB1, which does not contain any RGG motif, was not methylated by SmPRMT1. This hypothesis was also substantiated by the fact that SmSmD3, which contains fewer RGGs than SMYB1, was proportionally less methylated.

Our pull-down assays showed that SmPRMT1 physically interacted with SMYB1 and SmSmD3. Since it is known that the RGG motifs mediate protein–protein interactions and that methylation can modulate these associations, it is reasonable to think that the interactions between SmPRMT1, SMYB1, and SmSmD3 may be occurring via their RGG motifs. Indeed, pull-down assays showed that SmSmD3 interacted with full-length SMYB1 and its C-terminal tail, but very weakly via the CSD (G.R. Franco and personal communication).

Arginine methylation of spliceosome Sm D1/D2, D3, and B/B' core proteins has been shown to play a key role in snRNP biogenesis [25]. Giving the amino acid sequence conservation of these proteins (the amino acid identity between the SmSmD3 from *S. mansoni* and from several organisms is around 70%; data not shown), we could predict that the schistosome SmSmD3 may have conserved functions. However, one should keep in mind that methylation of spliceosome Sm D1/D2, D3, and B/B' proteins has been reported only for type II methyltransferase PRMT5 [25]. Therefore, methylation of schistosome SmSmD3 by SmPRMT1 might have different functions. In this regard, it is worth mentioning that a U5 snRNP particle-binding protein has been recently identified as a coactivator for androgen receptor [44].

The biochemical significance of SMYB1 methylation is currently unknown, but several possible roles can be envisaged. For example, introduction of a methyl group to the guanidine nitrogen of arginine is expected to weaken the hydrogen bonding between the proteins and RNA. Since it has been demonstrated that SMYB1 is a RNA-binding protein [32], with possible roles in transcription and intracellular protein trafficking, methylation of SMYB1 by SmPRMT1 might have a direct effect on these cellular processes.

In keeping with the flurry of research in the field of schistosome nuclear receptor signal transduction during the last five years, triggered by the cloning of SmRXR1 and SmRXR2, we anticipate that the identification of nuclear receptor coactivators will lead to many more exciting discoveries centered around chromatin remodeling and target gene expression in the parasite. In fact, we predict that acetylation and methylation of non-histone substrates may prove to be as significant in the regulation of gene expression as histone acetylation and methylation. Only time will tell.

Acknowledgments

This research was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq-PROFIX No. 540002/01-1, UNDP/World bank/World Health Organization/TDR to M.R.F. We thank Dr. B.W. O'Malley from the Baylor College of Medicine, Texas, for kindly providing the human SRC-1 cDNA plasmid. We are indebted to Dr. Luiz Juliano Neto from Escola Paulista de Medicina for the synthesis of histone peptides. The technical assistance of Maria Marta Freire is acknowledged.

References

[1] D. Engels, L. Chitsulo, A. Montresor, L. Savioli, The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research, *Acta Trop.* 82 (2002) 139–146.

[2] R.J. Sims III, S.S. Mandal, D. Reinberg, Recent highlights of RNA-polymerase-II-mediated transcription, *Curr. Opin. Cell Biol.* 16 (2004) 263–271.

[3] C.-C. Tsai, J.D. Fondell, Nuclear receptor recruitment of histone-modifying enzymes to target gene promoters, *Vitam. Horm.* 68 (2004) 93–122.

[4] M.R. Stallcup, J.H. Kim, C. Teyssier, Y.-H. Lee, H. Ma, D. Chen, The roles of protein-protein interactions and protein methylation in transcriptional activation by nuclear receptors and their coactivators, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 85 (2003) 139–145.

[5] H. Ma, H. Hong, S.-M. Huang, R.A. Irvine, P. Webb, P.J. Kushner, G.A. Coetzee, M.R. Stallcup, Multiple signal input and output domains of the 160-kilodalton nuclear receptor coactivator proteins, *Mol. Cell. Biol.* 19 (1999) 6164–6173.

[6] S.A. Onate, V. Boonyaratanakornkit, T.E. Spencer, S.Y. Tsai, M.-J. Tsai, D.P. Edwards, B.W. O'Malley, The steroid receptor coactivator-1 contains multiple receptor interacting and activation domains that cooperatively enhance the activation function 1 (AF1) and AF2 domains of steroid receptors, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 12101–12108.

[7] H. Chen, R.J. Lin, R.L. Schiltz, D. Chakravarti, A. Nash, L. Nagy, M.L. Privalsky, Y. Nakatani, R.M. Evans, Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300, *Cell* 90 (1997) 569–580.

[8] H. Chen, R.J. Lin, W. Xie, D. Wilpitz, R.M. Evans, Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase, *Cell* 98 (1999) 675–686.

[9] R.H. Goodman, S. Smolik, CBP/p300 in cell growth, transformation, and development, *Genes Dev.* 14 (2000) 1553–1577.

[10] A.L. Jacob, J. Lund, P. Martinez, L. Hedin, Acetylation of steroidogenic factor 1 protein regulates its transcriptional activity and recruits the coactivator GCN5, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 37659–37664.

[11] Y. Shang, X. Hu, J. DiRenzo, M.A. Lazar, M. Brown, Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription, *Cell* 103 (2000) 843–852.

[12] C. Teyssier, D. Chen, M.R. Stallcup, Requirement for multiple domains of the protein arginine methyltransferase CARM1 in its transcriptional coactivator function, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 46066–46072.

[13] A.U. Khan, S. Krishnamurthy, Histone modifications as key regulators of transcription, *Front. Biosci.* 10 (2005) 866–872.

[14] N. Dillon, Heterochromatin structure and function, *Biol. Cell* 96 (2004) 631–637.

[15] O.F. Sarmento, L.C. Digilio, Y. Wang, J. Perlin, J.C. Herr, C.D. Allis, S.A. Coonrod, Dynamic alterations of specific histone modifications during early murine development, *J. Cell Sci.* 117 (2004) 4449–4459.

[16] W.L. Kraus, J. Wong, Nuclear receptor-dependent transcription with chromatin. Is it all about enzymes? *Eur. J. Biochem.* 269 (2002) 2275–2283.

[17] H. Wang, Z.-Q. Huang, L. Xia, Q. Feng, H. Erdjument-Bromage, B.D. Strahl, S.D. Briggs, C.D. Allis, J. Wong, P. Tempst, Y. Zhang, Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor, *Science* 293 (2001) 853–857.

[18] W. Komyod, U.-M. Bauer, P.C. Heinrich, S. Haan, I. Behrmann, Are STATS arginine-methylated? *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 21700–21705.

[19] M. Chevillard-Briet, D. Trouche, L. Vandel, Control of CBP coactivating activity by arginine methylation, *EMBO J.* 21 (2002) 5457–5466.

[20] S. Amente, G. Napolitano, P. Licciardo, M. Monti, P. Pucci, L. Lania, B. Majello, Identification of proteins interacting with the RNAPII FCPI phosphatase: FCPI forms a complex with arginine

- methyltransferase PRMT5 and it is a substrate for PRMT5-mediated methylation, FEBS Lett. 579 (2005) 683–689.
- [21] H. Li, S. Park, B. Kilburn, M.A. Jelinek, A. Henschen-Edman, D.W. Aswad, M.R. Stallcup, I.A. Laird-Offringa, Lipopolysaccharide-induced methylation of HuR, an mRNA-stabilizing protein, by CARM1, J. Biol. Chem. 277 (2002) 44623–44630.
- [22] M.L. Hayman, L.K. Read, *Trypanosoma brucei* RBP16 is a mitochondrial Y-box family protein with guide RNA binding activity, J. Biol. Chem. 274 (1999) 12067–12074.
- [23] S. Kim, G.H. Park, W.K. Paik, Recent advances in protein methylation: enzymatic methylation of nucleic acid binding proteins, Amino Acids 15 (1998) 291–306.
- [24] G.R. Franco, R.C. Garratt, M. Tanaka, A.J.G. Simpson, S.D.J. Pena, Characterization of a *Schistosoma mansoni* gene encoding a homologue of the Y-box binding protein, Gene 198 (1997) 5–16.
- [25] T.B. Miranda, P. Khusial, J.R. Cook, J.-H. Lee, S.I. Gunderson, S. Pestka, G.W. Zieve, S. Clarke, Spliceosome Sm proteins D1, D3, and B/B' are asymmetrically dimethylated at arginine residues in the nucleus, Biochem. Biophys. Res. Commun. 323 (2004) 382–387.
- [26] T. Lehmeier, V. Raker, H. Hermann, R. Luhrmann, cDNA cloning of the Sm proteins D2 and D3 from human small nuclear ribonucleoproteins: evidence for a direct D1–D2 interaction, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994) 12317–12321.
- [27] F. Herrmann, M. Bossert, A. Schwander, E. Akgun, F.O. Fackelmayer, Arginine methylation of scaffold attachment factor A by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particle-associated PRMT1, J. Biol. Chem. 279 (2004) 48774–48779.
- [28] J. Najbauer, B.A. Johnson, A.L. Young, D.W. Aswad, Peptides with sequences similar to glycine, arginine-rich motifs in proteins interacting with RNA are efficiently recognized by methyltransferase(s) modifying arginine in numerous proteins, J. Biol. Chem. 268 (1993) 10501–10509.
- [29] W.J. Friesen, S. Paushkin, A. Wyce, S. Massenet, G.S. Pesiridis, G. Van Duyne, J. Rappsilber, M. Mann, G. Dreyfuss, The methylosome, a 20S complex containing JBP1 and pICln, produces dimethylarginine-modified Sm proteins, Mol. Cell. Biol. 21 (2001) 8289–8300.
- [30] G. Meister, C. Eggert, D. Buhler, H. Brahm, C. Kambach, U. Fischer, Methylation of Sm proteins by a complex containing PRMT5 and the putative U snRNP assembly factor pICln, Curr. Biol. 11 (2001) 1990–1994.
- [31] J.M. Merrick, A. Osman, J. Tsai, J. Quackenbush, P.T. LoVerde, N.H. Lee, The *Schistosoma mansoni* gene index: gene discovery and biology by reconstruction and analysis of expressed gene sequences, J. Parasitol. 89 (2003) 261–269.
- [32] A.F. Valadao, M.R. Fantappie, P.T. LoVerde, S.D. Pena, F.D. Rumjanek, G.R. Franco, Y-box binding protein from *Schistosoma mansoni*: interaction with DNA and RNA, Mol. Biochem. Parasitol. 125 (2002) 47–57.
- [33] W.J. Freebern, A. Osman, E.G. Niles, L. Christen, P.T. LoVerde, Identification of a cDNA encoding a retinoid X receptor homologue from *Schistosoma mansoni*. Evidence for a role in female-specific gene expression, J. Biol. Chem. 274 (1999) 4577–4585.
- [34] P.T. LoVerde, L. Chen, Schistosome female reproductive development, Parasitol. Today 7 (1991) 303–308.
- [35] M.R. Fantappie, W.J. Freebern, A. Osman, J. LaDuca, E.G. Niles, P.T. LoVerde, Evaluation of *Schistosoma mansoni* retinoid X receptor (*SmRXR1* and *SmRXR2*) activity and tissue distribution, Mol. Biochem. Parasitol. 115 (2001) 87–99.
- [36] W.J. Freebern, E.G. Niles, P.T. LoVerde, RXR-2, a member of the retinoid x receptor family in *Schistosoma mansoni*, Gene 233 (1999) 33–38.
- [37] R.L. de Mendonca, D. Bouton, B. Bertin, H. Escriva, C. Noel, J.-M. Vanacker, J. Cornette, V. Laudet, R.J. Pierce, A functionally conserved member of the FTZ-F1 nuclear receptor family from *Schistosoma mansoni*, Eur. J. Biochem. 269 (2002) 5700–5711.
- [38] B. Bertin, S. Sasorith, S. Caby, F. Oger, J. Cornette, J.M. Wurtz, R.J. Pierce, Unique functional properties of a member of the Fushi Tarazu-Factor 1 family from *Schistosoma mansoni*, Biochem. J. 382 (2004) 337–351.
- [39] M.R. Fantappie, A. Osman, C. Ericsson, E.G. Niles, P.T. LoVerde, Cloning of *Schistosoma mansoni Seven in Absentia* (*SmSINA*)⁺ homologue cDNA, a gene involved in ubiquitination of *SmRXR1* and *SmRXR2*, Mol. Biochem. Parasitol. 131 (2003) 45–54.
- [40] R.d.M. Maciel, D.L.d. Silva Dutra, F.D. Rumjanek, L. Juliano, M.A. Juliano, M.R. Fantappie, *Schistosoma mansoni* histone acetyltransferase GCN5: linking histone acetylation to gene activation, Mol. Biochem. Parasitol. 133 (2004) 131–135.
- [41] S.S. Koh, D. Chen, Y.-H. Lee, M.R. Stallcup, Synergistic enhancement of nuclear receptor function by p160 coactivators and two coactivators with protein methyltransferase activities, J. Biol. Chem. 276 (2001) 1089–1098.
- [42] S. Kim, B.M. Merrill, R. Rajpurohit, A. Kumar, K.L. Stone, V.V. Papov, J.M. Schneiders, W. Szer, S.H. Wilson, W.K. Paik, K.R. Williams, Identification of N^G-methylarginine residues in human heterogeneous RNP protein A1: Phe/Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Gly-Gly/Phe is a preferred recognition motif, Biochemistry (Mosc.) 36 (1997) 5185–5192.
- [43] N. Araya, H. Hiraga, K. Kako, Y. Arao, S. Kato, A. Fukamizu, Transcriptional down-regulation through nuclear exclusion of EWS methylated by PRMT1, Biochem. Biophys. Res. Commun. 329 (2005) 653–660.
- [44] Y. Zhao, K. Goto, M. Saitoh, T. Yanase, M. Nomura, T. Okabe, R. Takayanagi, H. Nawata, Activation function-1 domain of androgen receptor contributes to the interaction between subnuclear splicing factor compartment and nuclear receptor compartment. Identification of the p102 U5 small nuclear ribonucleoprotein particle-binding protein as a coactivator for the receptor, J. Biol. Chem. 277 (2002) 30031–30039.

ANEXO II – TRABALHO PUBLICADO EM PERIÓDICO DE CIRCULAÇÃO INTERNACIONAL

MORALES, F. C.; FURTADO, D. R.; RUMJANEK, F. D. The N-terminus moiety of the cystatin SmCys from *Schistosoma mansoni* regulates its inhibitory activity *in vitro* and *in vivo*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 134, n. 1, p. 65-73, Mar., 2004.

The N-terminus moiety of the cystatin SmCys from *Schistosoma mansoni* regulates its inhibitory activity in vitro and in vivo[☆]

Fabiana Carvalho Morales, Daniel Rodrigues Furtado, Franklin David Rumjanek*

Departamento de Bioquímica Médica, ICB/CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, CEP 21941-590, Rio de Janeiro, Brazil

Received 3 September 2003; received in revised form 13 October 2003; accepted 30 October 2003

Abstract

The complete sequence of SmCys, a cystatin expressed by *Schistosoma mansoni*, was obtained. Constructs of SmCys consisting of deletions of 10 and 20 amino acid residues from the N-terminal of the full length recombinant protein, were cloned in the pQE-30 vector, expressed in *Escherichia coli* and assayed for inhibitory activity against papain. Kinetic analysis showed that SmCys –10 and SmCys –20 had K_i values of 0.7391 and 4.9154, respectively, as compared to 0.0647, displayed by the full length recombinant. Protease inhibition by SmCys was also observed in vivo. When the recombinant products were incubated during 7 days with live schistosomula in the presence of red blood cells, only the full length product could completely inhibit the formation of haemozoin, a dark pigment formed as a by-product of haemoglobin digestion. The sequence data of the recombinant SmCys proteins were used for the construction of molecular models, which were then subjected to molecular dynamics for 2 ns. In comparison to the full length, the models corresponding to the truncated constructs, showed a distinctive change on the surface charge distribution. This parameter was more pronounced in SmCys –20, which also displayed a significant displacement of the inhibitory domain, a result which could explain the kinetic data in terms of the loss of attachment sites. These changes correlated well with the progressive lack of inhibition observed for the recombinant deletion constructs, in vitro and in vivo. © 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: N-terminus; Cystatin; Cysteine-protease inhibitor; K_i ; *Schistosoma mansoni*; Molecular modelling

1. Introduction

Adult *Schistosoma mansoni* live in mesenteric veins of its mammalian host where they ingest large quantities of red blood cells (RBC) as their main source of amino acids. Adult female worms ingest up to 330,000 RBC per hour, while male parasites ingest only 40,000 [1], the difference probably reflecting the much higher energy demand associated with egg production.

The end product of haemoglobin (Hb) ingestion is haemozoin [2], a dark pigment which can be easily detected under the naked eye, and which accumulates within the parasite's gut. As a consequence of the higher RBC intake by female worms, haemozoin is more abundant in the gut of female schistosomes. Because schistosomes do not have a complete digestive system, haemozoin is continually regurgitated by the parasites through the oral cavity.

In recent years proteases involved in Hb degradation have been reported [3–6]. These proteolytic enzymes that have been generally referred to as hemoglobinases, constitute the family of aspartyl and cysteine proteases [7]. However, to this date it is not known what factors affect the differential intake of RBC, as well as digestion of haemoglobin by male and female schistosomes, respectively.

In general, cysteine proteases of parasitic organisms play key roles in virulence, invasion, evasion from the immune system of the hosts, and activation of other zymogen proteins. In view of their roles in the parasite's physiology and also their unique structures, these enzymes have become targets for chemotherapy and vaccination. In this context, in vitro experiments carried out by Wasilewski et al. [8] have shown that cysteine-proteases inhibitors were able to block schistosome Hb degradation and as a consequence, arrest the development of the worms, including inhibition of egg production.

It is generally believed that the endogenous protease inhibitors belong to the super family of cystatins. The cystatin super family comprises natural inhibitors of cysteine proteases that share some fundamental features, the most prominent being thermostability [9–11]. Cystatins are divided in

[☆] Note: The nucleotide sequence data reported in this paper have been deposited in GenBank under accession number AY334553.

* Corresponding author. Tel.: +55-21-2562-6759; fax: +55-21-2570-8647.

E-mail address: franklin@bioqmed.ufrj.br (F.D. Rumjanek).

three major families: the stefins with no disulphide bridges and displaying a mean molecular weight of 11 kDa, the cystatins with two disulphide bridges and molecular weight of approximately 14 kDa and kininogens, which are glycoproteins with a relatively high molecular weight ranging from 60 to 120 kDa [12].

Besides their occurrence in mammalian and plants, cystatins have also been detected in several different species of parasites, such as *Brugia malayi* [13], *Onchocerca volvulus* [14] and *Haemonchus contortus* [15]. The overall consensus regarding the functional aspects of the cystatins is that they act similarly to zymogens, regulating proteases mainly as inhibitors within the cytoplasm prior to the release of the active form of the enzymes. However, as yet there is no hypothesis for the precise function of these proteins. In the case of intracellular parasites the physiological role of cystatins is particularly intriguing. An example is chagasin [16]. Although this is the best characterised parasite cysteine-proteinase inhibitor from the structural point of view, it still remains to be elucidated in the context of cell economy.

In eggs of *S. mansoni* a cDNA sharing sequence features with a mammalian cystatin B has been reported [17]. Although no biochemical data for the *S. mansoni* cystatin homologue were presented, the authors speculated about a putative role for the parasite's protease inhibitor, i.e. that of a regulator of egg proteases. There is no information, however, on the occurrence of cystatins in other stages of the life-cycle of *S. mansoni*.

Prompted by these findings and taking into consideration the vital role that proteolytic degradation has in the schistosome haemoglobin digestion, we proposed to extend these preliminary observations by investigating the occurrence of homologues of cystatins in adult stages of *S. mansoni*. To that end an adult worm cDNA library was screened with a probe synthesised with primers based on the sequence reported for the egg cystatin cDNA [17]. The results revealed the presence of SmCys, a cystatin whose sequence differed partially from the previously described egg cDNA. Furthermore, we were able to show that besides inhibiting protease activity in vitro, recombinant SmCys was also capable of affecting the formation of haemozoin in live schistosomula. The results presented in this study not only uncover a new level of regulation of amino acid incorporation by schistosomes, but also suggest that the structure of SmCys may serve as a starting point for the development of specific inhibitors acting on an important nutritional pathway of the parasites.

2. Materials and methods

2.1. Parasites

Adult worms of *S. mansoni* were obtained by perfusion of Syrian hamsters infected 6 weeks previously with approximately 400 cercariae, as described by Smithers and Terry

[18]. For experiments using male and female worms separately, the worm pairs were physically teased apart with a Pasteur pipette. Homogenates were prepared as described before [19]. The worms were either used immediately or stored at -70°C . Schistosomula were obtained from mechanically transformed cercariae according to the method of Ramalho-Pinto et al. [20]. Male and female schistosomes from single sex infections were obtained by infecting the snails with a single miracidium. Sex selection was performed after infection and perfusion of the hamsters.

2.2. Screening of *S. mansoni* cDNA library

The probe used to screen adult *S. mansoni* cDNA libraries consisted of a PCR amplification product using the primers SmCys forward: 5'-CTTTACGCCTTTATCTTGCACTCAT-3' and SmCys reverse: 5'-TTTCAGAAATATTCACACGC-ATCAC-3', based on the cDNA sequence of the *S. mansoni* egg cystatin [17]. The probe was labelled with [α - ^{32}P] dCTP (Amersham Biosciences: specific activity 220 TBq/mmol), using the random primer method (Ready-to-Go Labelling Beads, Amersham Biosciences), according to the manufacturer's instructions. The labelled probe was separated from the unincorporated nucleotide by gel filtration chromatography using the S-400 HR microspin columns (Amersham Biosciences). The cDNA library constructed in the lambda-ZAP vector (Stratagene) was a kind gift from Dr. Phil LoVerde (State University of New York at Buffalo). The conditions used for the sequential washes were essentially the same as previously described [21].

2.3. DNA sequencing and sequence alignment

DNA was sequenced using the DYEnamic ET Terminator Cycle Sequence kit (Amersham Biosciences) in an ABI 377 automatic DNA sequencer. Homology searches were carried out using the NCBI's (National Center for Biotechnology Information) BLAST network service and the GenBank databases. Alignments were performed and identity levels calculated by means of the ClustalX software [22]. The sequences included were the following: SmCys, *Homo sapiens* stefin A, *H. sapiens* stefin B, *Acanthocheilonema viteae* cystatin; *B. malayi* cystatin 1, *B. malayi* cystatin 2, *H. contortus* cystatin-1; *O. volvulus* cystatin, *Caenorhabditis elegans* cystatin C and *C. elegans* cystatin D (GenBank accession nos. AAQ16180, NP_005204, NP_000091, AAA-87228, AAC47623, AAB69857, AAB95324, AAD51087, CAC33822 and CAC33821, respectively). Alignments were formatted with Genedoc [23].

2.4. Recombinant SmCys and SmCys deletion constructs

PCR products using cDNA from adult schistosomes were produced using the primers described above. The PCR products were inserted into the pQE-30 vector (Qiagen) between the *Bam*H1 and the *Kpn*I sites and expressed in BL-21 cells

according to the manufacturer's recommendations. Proteins were purified by affinity chromatography using the ProBond purification system (Invitrogen). For the expression of the deletion mutants, primers were used that delimited amplification at sites 30 and 60 nucleotides downstream from the beginning of the ORF. These products were cloned, expressed and purified as above. The primer sequences were:

SmCys-full F (5'-CGGGATCCATGCCTTTATGCTGCGGTGGAA-3'),
 SmCys-full R (5'-GGGGTACCTCAGAAATATTCCAA-CGCATC-3'),
 SmCys -10 (5'-CGGGATCCCCTAGAGAACCGTCTG-CAGAG-3'),
 SmCys -20 (5'-CGGGATCCAAACTTAAGACTCTGT-TAGAA-3').

2.5. Enzyme inhibition assay

The concentration of SmCys was determined by titration with papain essentially as described by Monteiro et al. [16]. The substrate for the inhibition assays was CBZ-Phe-Arg-AMC, which was used in 10 μ M concentrations. Substrate hydrolysis was monitored in a Hitachi F4500 fluorimeter at 380 nm excitation and 440 nm emission wavelengths. Steady-state velocities before and after addition of inhibitors were obtained by linear regression of the substrate hydrolysis curves. Apparent K_i values were calculated according to Henderson [24].

2.6. In vivo inhibition assay

Live schistosomula were incubated in RPMI-1640 medium containing 50 μ l of human red blood cells during 7 days containing 10 μ g of SmCys full length, its truncated constructs, or E-64. Schistosomula were chosen for these experiments because, being at the larval stage, their gut is not completely formed, that is, there is no oral aperture. In this way the haemozoin formed within the gut does not diffuse to the medium as it would if the experiments had been carried out with the adult stages. The medium was changed daily with the fresh additions of the inhibitors. At the end of the incubation period the parasites were inspected under a low magnification microscope for the presence of the dark pigment haemozoin. In the same experiment, the parasites were labelled with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). With this reagent, only the viable organisms display a purple colour [25].

2.7. Molecular modelling and molecular dynamics

The deduced amino acid sequence of SmCys was folded onto the superimposed structures of human stefin B (ExpDB code: 1stfI) and human stefin A (ExpDB codes: 1dvc, 1dvd, 1cyu, 1cyv, 1gd3A and 1gd4A) ac-

cording to the optimal alignment (see above), using the Swiss-PdbViewer v. 3.7 (<http://www.expasy.org/spdbv/>) [26] and the project was therefore submitted in optimise mode to the SWISS-MODEL automated modelling server (<http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html>) [26,27]. The 10 and 20 amino acids deletion constructs of SmCys were generated by excluding the correspondent amino acids of the resultant SmCys calculated structure on Swiss-PdbViewer.

All the following in silico procedures were performed with the GROMACS (<http://www.gromacs.org>) software package [28,29]. In brief, the wild type, -10 and -20 SmCys structures were placed on water boxes and submitted to energy minimisation steps using the steepest descent and conjugate gradients algorithms. After that, the structures were subjected to an initial molecular dynamics simulation for 100 ps with position restraints on the protein atoms, so that the water molecules on the box could fill the empty spaces and the system could reach a more stable energetic state. Subsequently, the systems were subjected to 2 ns of molecular dynamics with no restraints. The simulations were run at 300 K and 1 atm, using the GROMOS96 force field, and the temperature and pressure were kept constant by means of the Berendsen algorithms for temperature and pressure. The LINCS method was applied to constrain covalent bond lengths.

Model resultants from the molecular dynamics were validated with the PROCHECK suite [30]. For SmCys wild type, 97.7% of the residues were in favourable regions of the Ramachandran Plot, as well as 96.3% for SmCys -10 and 98.6% for SmCys -20.

For display, the three models resultants were aligned with the Best Fit command of Swiss-PdbViewer, which takes into account the alignment of the primary sequences. Van der Waals surfaces and coulombic electrostatic potentials (-2 to $+2$ kT/e) were calculated with Swiss-PdbViewer and the resulting images were rendered with the POV-Ray v. 3.5 software (<http://www.povray.org/>).

3. Results

Screening of adult *S. mansoni* cDNA library with the egg cystatin probe yielded several positive clones. Those displaying the higher masses were then sequenced.

Fig. 1 shows the alignment of SmCys deduced amino acid sequence with that of cystatins from human and several other species of helminthes.

The sequence of SmCys, with a predicted molecular mass of 11 kDa was confirmed as belonging to the stefin group. SmCys exhibited the consensus motif QVVAG (amino acid residues 49–53), which agrees very well with the inhibition domain QVVXV, present in all cystatins. SmCys displayed two glycine residues at positions 6 and 7. Typically cystatins display only one residue of glycine present in the N-terminal portion. On the other hand, com-

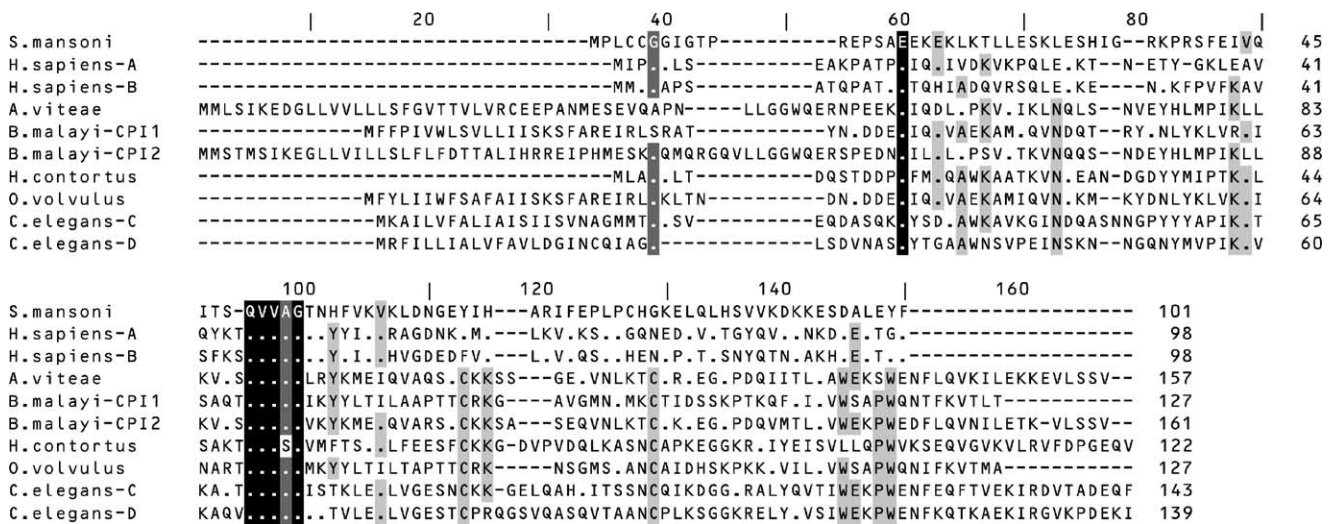


Fig. 1. Multiple sequence alignment between SmCys (*S. mansoni*) including human and various helminths cysteine proteases. *H. sapiens-A*—*Homo sapiens* stefin A; *H. sapiens-B*—*Homo sapiens* stefin B; *A. viteae*—*Acanthocheilonema viteae* cystatin; *B. malayi-CPI1*—*Brugia malayi* cystatin 1; *B. malayi-CPI2*—*Brugia malayi* cystatin 2; *H. contortus*—*Haemonchus contortus* cystatin-1; *O. volvulus*—*Onchocerca volvulus* cystatin; *C. elegans-C*—*Caenorhabditis elegans* cystatin C; *C. elegans-D*—*Caenorhabditis elegans* cystatin D. Residues shaded in black, dark grey and light grey are indicative of 100, 80 and 60% identity between sequences, respectively. Residues represented by a dot are identical to the equivalent residues of the reference sequence, SmCys.

parison between SmCys and other helminth sequences showed that SmCys lacked the N-terminal secretory peptide signal. Interestingly, SmCys also lacked the PW residues that are usually present in all helminth species and in human cystatins C and D. SmCys was shown to have the highest homology with human cystatins A and B (29.7 and 32.7% identity, respectively), followed by *B. malayi* cysteine-protease inhibitor 2 (12.4% identity).

RT-PCR experiments using primers deduced from the SmCys full length cDNA sequence showed that SmCys is expressed by adult male and female schistosomes. No significant differences were found in the expression of SmCys between mature male and female parasites, as well as between immature stages (results not shown).

In order to correlate the structure of SmCys to inhibitory activity, the full-length SmCys and two constructs having deletions corresponding to -10 and -20 amino acids from the N-terminal end of the protein were cloned in the pQE-30 vector. The map of the SmCys gene and its deletion mutants is shown diagrammatically in Fig. 2. Deletions were prepared from the N-terminal end because this structural do-

main has been described as being important for inhibitory activity of cystatins from other species [30].

The western blot results in the inset of Fig. 3 show the relative differences in molecular mass of the recombinant proteins expressed in *E. coli*.

The deletion constructs were also detected by silver staining on SDS-PAGE, yielding a pattern identical to that obtained with the western blot (results not shown). Besides confirming the molecular mass of the individual recombinant proteins, these results were also informative in that they demonstrated that the specific antibodies purified from the antiserum raised against the GST-SmCys fusion protein are indeed specific for the SmCys epitopes, since these recombinant proteins were not fused with GST.

We next tested the recombinant SmCys proteins for inhibitory activity in the fluorimetric papain assay. The results are shown in Fig. 3.

The plot of concentration of SmCys, or its N-terminal truncated analogues, versus the velocity of hydrolysis of the Z-Phe-Arg-MCA substrate by papain, shows clearly that the full-length recombinant protein is able to efficiently inhibit

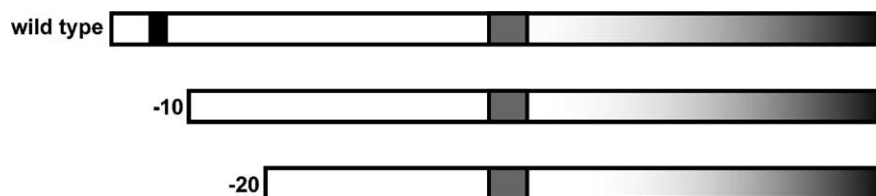


Fig. 2. Diagram of the SmCys wild type, -10 and -20 constructs. Primary sequences are in scale. Truncated constructs progressively lack N-terminal portions. Glycine residues 6 and 7 are represented by a black box. The inhibition domain, QVVAG is represented by a grey box. The two glycine residues are missing on the two truncated constructs SmCys -10 and -20 close to the N-terminal regions.

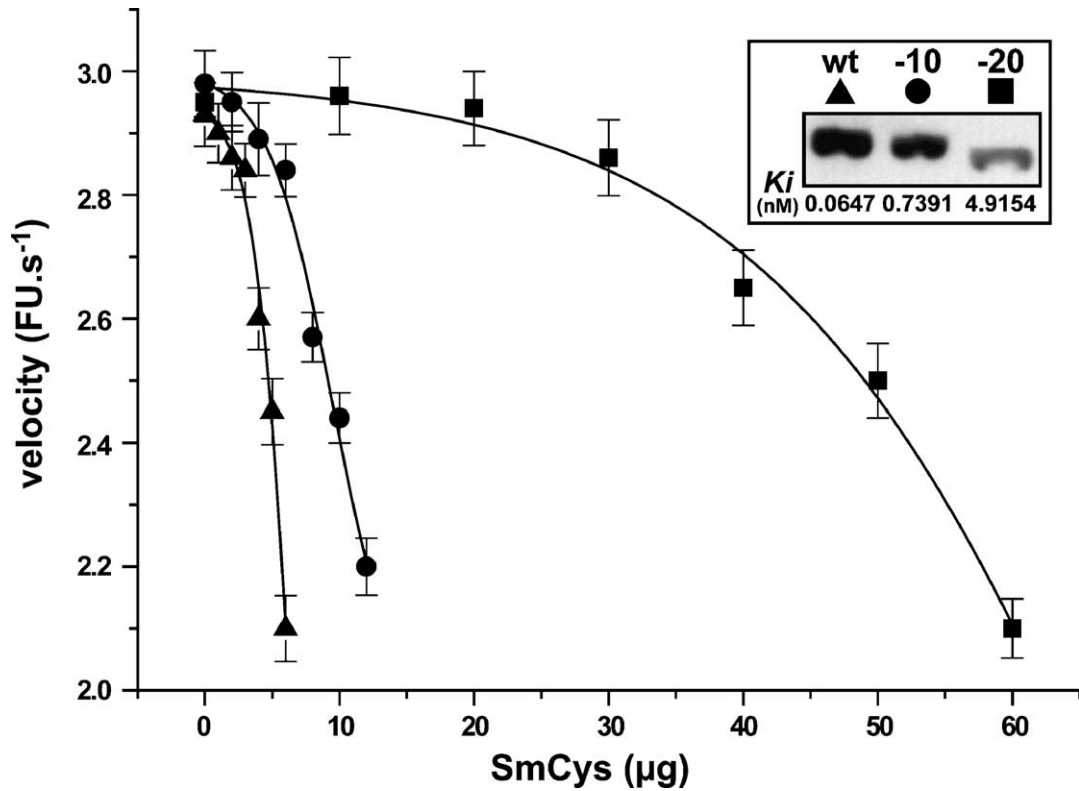


Fig. 3. Plots of the inhibition curves of papain by recombinant SmCys wild type (▲), -10 (●) and -20 (■). Abscissa: protein mass in micrograms (µg). Ordinate: arbitrary fluorescence units per second (FU/s). The inset shows a Western blot of the SmCys wild type (wt), SmCys -10 (-10) and SmCys -20 (-20) and their calculated K_i values in nM.

papain hydrolysis in a reproducible manner. In contrast, SmCys -10 and SmCys -20, respectively, show a progressive reduction in the inhibitory activity. These results were quantified by calculating the K_i of each plot. The K_i values are shown in the inset of Fig. 3, under each of the bands

of the constructs. It can be seen that whereas full-length SmCys exhibited a K_i of 0.0647 nM, SmCys -20 had a K_i almost 70-fold higher. It is interesting to note that deletion of 10 amino acid residues reduces, but does not completely abolish, the inhibitory activity of SmCys. These

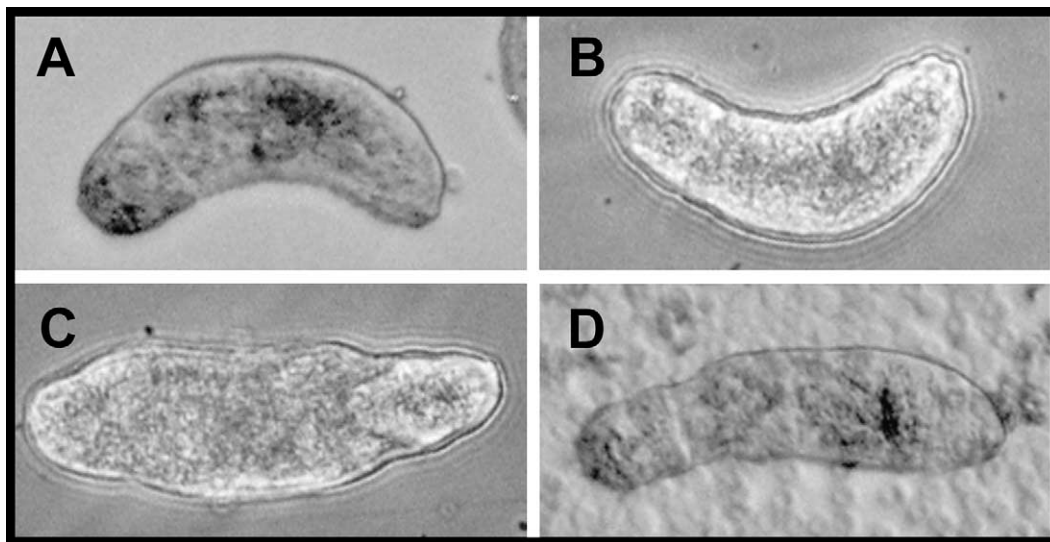


Fig. 4. Schistosomula were incubated with daily changes of 10 µg of SmCys wild type, -10 and -20 purified recombinant proteins during 7 days. (A) Negative control, no protein added; (B) SmCys wild type; (C) SmCys -10; (D) SmCys -20.

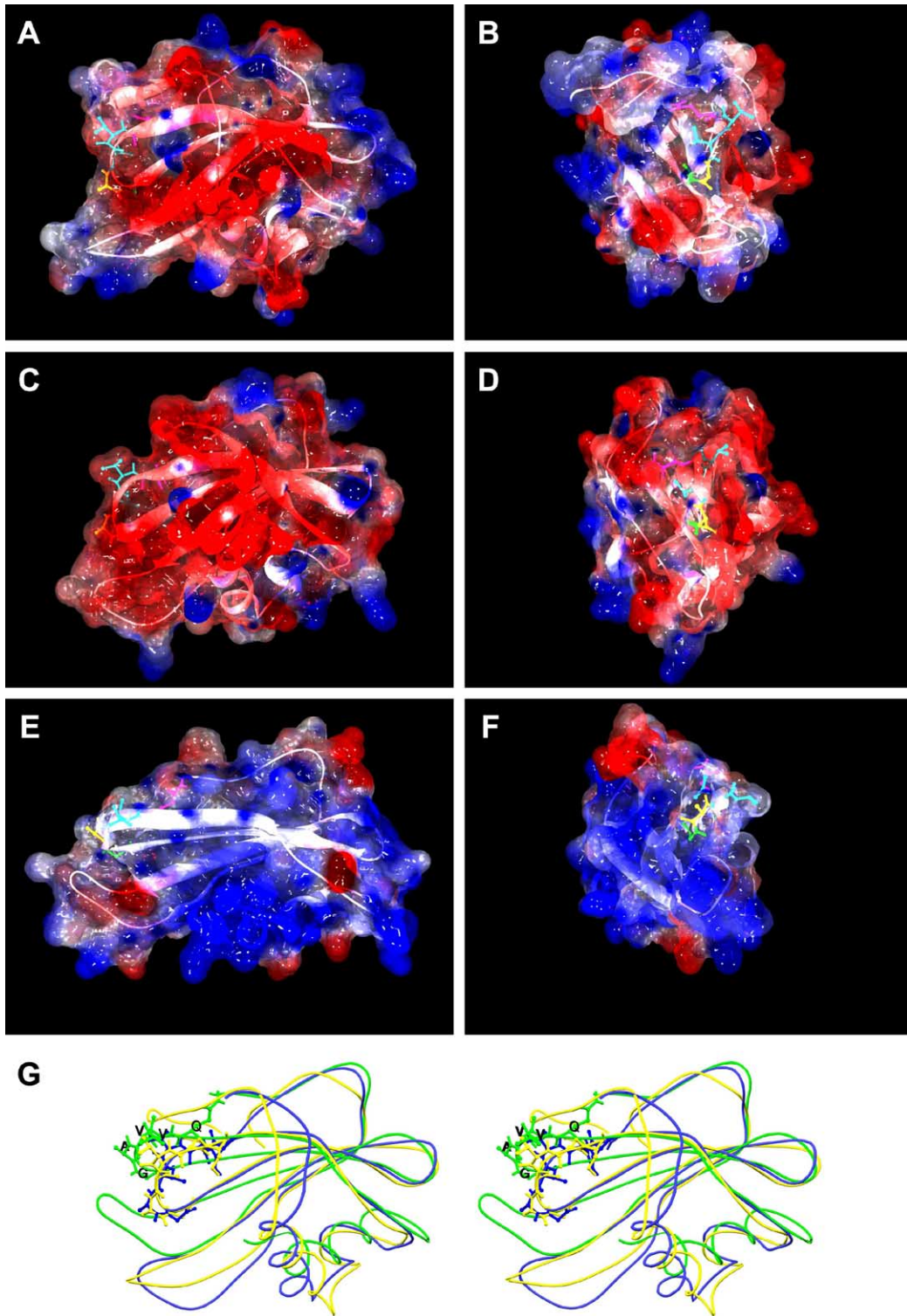


Fig. 5. SmCys wild type, -10 and -20 were aligned in Swiss-PdbViewer. (A–F) The molecular surface of the protein models coloured according to their coulombic electrostatic charges. Surfaces were made transparent in order to show the peptide backbone, depicted as grey ribbons. Positive charges are shown in blue, negative charges in red and neutral charges in white. The amino acids of the inhibition domain (QVVAG) are shown in stick view: glutamine—pink; valines—cyan; alanine—yellow; glycine—green. (A, B) SmCys wild type; (C, D) SmCys -10; (E, F) SmCys -20. Figures on the left column show a front view of the proteins, with the alpha-helix in front of the beta-sheets. Pictures on the right column show the same picture, with the proteins rotated approximately 90° counter-clockwise over the Y-axis. (G) Stereo view of the aligned backbones of SmCys wild type (yellow), SmCys -10 (blue) and SmCys -20 (green). Amino acids of the inhibitory domain are shown in stick view. The viewing angle and the tridimensional orientation of the molecules are exactly the same as in (A), (C) and (E).

results confirmed other reports describing that the integrity of the N-terminal moiety is important for the inhibitory activity of cystatins [35].

Functional studies of SmCys and the deletion constructs were also carried out *in vivo*. To that end, live schistosomula were incubated in medium containing RBC and the full-length protein along with the truncated analogues. The objective was to correlate the inhibitory activity of the cystatins and the occurrence in the gut of the parasites, of the haemoglobin metabolite haemozoin. In these experiments it was assumed that haemozoin would only be formed through proteolysis of haemoglobin. The results are shown in Fig. 4.

Haemozoin could only be detected in schistosomula incubated with 1 µg of SmCys –20 (Fig. 4D) and in the untreated control group (Fig. 4A). Schistosomula incubated with either SmCys full-length (Fig. 4B), or with SmCys –10 (Fig. 4C) were devoid of haemozoin.

In order to check whether the parasites incubated with SmCys full-length and SmCys –10 did not degrade haemoglobin as a result of toxic effects exerted by the latter, the parasites used in the experiment above were also incubated with MTT, to test for viability. This test is based on the fact that only the viable organisms are able to selectively incorporate the tetrazolium salt and subsequently reduce it in the mitochondria, producing a bluish colour. Upon treatment with MTT the inner contour of the schistosomula was stained in blue and blue granules interspersed throughout the bodies could be seen (results not shown). Taken together the results in Fig. 4 reproduce the stoichiometry of the inhibition observed in Fig. 3.

Finally, in order to highlight the effects of the deletions on the molecule of SmCys, molecular models were constructed by homology based on the protein sequence data and subjected to molecular dynamics for 2 ns. The results are shown in Fig. 5A–G.

Fig. 5A–F show the Van der Waals surfaces of the models of SmCys, coloured according to their coulombic electrostatic potentials. In these pictures, positive charges are depicted in blue, negative charges in red and neutral charges are shown in white. Surfaces were made transparent in order to show the peptide backbone, depicted as grey ribbons.

Although in Fig. 5C and D, representing SmCys –10, there are discrete changes in charge distribution, it can be seen that negative charges are still predominant around the putative inhibitory domain of the cystatin. In contrast, the SmCys –20 construct, shows the complete loss of the N-terminal domain, and as a result of the molecular rearrangement after the molecular dynamics, there was a radical shift in overall charges from negative to positive, which in turn, influenced the character of the inhibition domain moiety.

Fig. 5G shows a stereo representation of the three SmCys constructs, after superimposition by the best fit command of Swiss-PdbViewer software. The inhibitory domain of SmCys –20, which is depicted in green, is displaced in comparison to the correspondent in SmCys wild type and

SmCys –10. In addition, the fourth loop of SmCys –20 is notably displaced towards its inhibitory domain (on the left, below the inhibitory domain).

Together, the results observed in Fig. 5 explain the reduced inhibitory activity of the SmCys constructs, in special SmCys –20, by considering the significant overall changes produced by the deletions, thus corroborating the data in Figs. 3 and 4.

4. Discussion

Cystatins are widespread in mammals, but cystatin-like molecules are also present in parasites [13–15]. The present study describes the sequence and the inhibitory properties of SmCys, an adult *S. mansoni* cystatin. Besides exhibiting heat stability, SmCys sequence was shown to contain the typical motifs which characterise it as a stefin of the family 1. SmCys contained the inhibition domain QVVXV and two glycine residues at positions 6 and 7, of which one is characteristically present in the N-terminal portion of cystatins. This glycine is also highly conserved and, lacking a side-chain, in a manner analogous to other cystatins, it probably acts as a hinge, thus allowing the N-terminal portion to interact favourably with the sub-sites S4, S3 and S2 of the cysteine proteases through its two hairpin loops. Interestingly, SmCys did not display a secretory signal peptide, which suggests that this cystatin may also have a role in cellular regulation. Indeed, several intracellular roles for cystatins have been reported. Specifically in parasitic nematodes, cystatins have been proposed to have immunomodulatory activities [31]. Because many cysteine proteinases are involved in a number of cell cycle processes including the regulation of apoptosis, it follows that their cognate inhibitors assume a major role. Therefore, it is conceivable that in schistosomes, besides its direct role on the degradation of hemoglobin, SmCys may act intracellularly, as a general regulator.

Although an *S. mansoni* cystatin present in a cDNA library from eggs has been reported previously [17], its deduced amino acid sequence did not display full homology with SmCys. Comparison between the two full-length sequences, led to the conclusion that the main differences between the two cystatins resided in the 5' region, where up to position 67 of the egg cystatin sequence, only four identical amino acid residues could be detected (results not shown). However, rather than invoking authentic polymorphism or allele differences between the two genes, the discrepancy appears to be due to an A insertion in the DNA sequence of the egg cystatin. This resulted in frameshifting which in turn produced an isoleucine at position 67 in the deduced protein sequence of the egg cystatin. In contrast SmCys has a valine in position 58. As a consequence, the whole frame upstream of the isoleucine residue of the egg cystatin would necessarily be mismatched. Thus, it is reasonable to assume that the previously published sequence is incorrect.

SmCys was found to be equally expressed by male and female mature and immature worms (results not shown). At first, by considering that the role of SmCys would be restricted to that of regulating haemoglobin degradation, it was expected that adult male worms, which ingest far less red cells than females, would express more SmCys than female parasites. However, the rather similar level of expression of SmCys observed speaks against this hypothesis. On the other hand, by assuming that SmCys has in fact a more general role as an intracellular regulator, one could imagine that the expression of this cystatin would be constant and ubiquitous in the schistosomes tissues.

A general role as intracellular modulators notwithstanding, we could demonstrate that recombinant SmCys efficiently inhibited papain activity in vitro. The results in Fig. 3 reveal a K_i for the full length construct of only 0.067 nM, a value which is well within the range calculated for other cystatins. For comparative purposes, K_i values reported for soya, bovine and human cystatins were 2.1 pM, 10^{-11} M and 2.4–190 pM, respectively [32–34]. It is important to mention, however, that the K_i values in the literature may refer to the interaction of cystatins with a variety of serine, carboxyl or thiol proteases.

It was interesting to note that the truncated constructs of SmCys gradually lost their inhibitory activity as a function of deletion of short stretches of the N-terminal moiety. Although SmCys –10 retained most of its ability to inhibit papain activity ($K_i = 0.73$ nM), SmCys –20 activity was greatly diminished ($K_i = 4.91$ nM). Canonically, amino acids 6–8 are known to interact with the cysteine protease sub-sites, but this portion does not seem to be essential for the binding of the remaining cystatin molecule. It is postulated that the chain consisting of the first 10 amino acids creates the first attachment site onto the enzyme molecule. Subsequently, anchoring of amino acids 6–8 then contributes to position the hairpin loop containing the inhibition domain QVVXG directly over the sites S1, S1', S2' and S3' of the cysteine protease. Presumably, in the case of SmCys –10 construct, binding still occurred, but less tightly so, due to the loss of binding of the cystatin to sub-sites S4, S3 and S2 of the enzyme. The slight distortion induced by the loss of this attachment site would then cause the almost 10-fold decrease of K_i observed for SmCys –10. In contrast, deletion of 20 amino acid residues as in SmCys –20 appeared to be sufficient to weaken the interaction between the QV-VAG and to expose the active site of papain. At any rate, the interpretation above is corroborated by inspection of the 3D homology models of SmCys constructs after been subjected to molecular dynamics, shown in Fig. 5. It became clear that one of the main effects of the deletion of the N-terminal domain was to bring about a replacement of net charges at the inhibitory domain of the SmCys deleted constructs. This is more noticeable in SmCys –20, where there was a major shift in charges from negative to positive. Furthermore, in the SmCys –20 model, there was also a displacement of the inhibition domain from its original position, and the

fourth loop was displaced toward this domain Fig. 5F and G). Such rearrangement would virtually revert the binding of SmCys and is, therefore, compatible with the kinetic data shown in Fig. 3. Nevertheless, structure–function studies are not without exceptions. For instance, amino terminally truncated forms of salivary cystatin S and cystatin SN were shown to have higher inhibition constants for ficin and lower ones for cathepsin C (dipeptidyl peptidase I), as compared to their respective full-sized form [35].

Besides the in vitro experiments, we demonstrated that full length SmCys was able to inhibit the formation of haemozoin by live schistosomula, thus suggesting a possible role of the cystatin in the gut of the schistosomula. However, no K_i values were derived from these in vivo experiments because much higher concentrations of SmCys were required so as to establish a suitable concentration gradient between the exterior and interior of the organisms. Furthermore and more importantly, we did not know which parasite proteases were involved as the actual targets for SmCys. In order to find out more details about the role of cysteine proteases and the associated cystatins on the degradation of haemoglobin in schistosomes, it would be important to resort to immunohistochemistry. In addition, it would be interesting to study the effect of SmCys on other cysteine proteases. In this context, *S. mansoni* cathepsin L1 [36] would be a particularly interesting target since this enzyme has been implicated in the degradation of haemoglobin. Furthermore, the recombinant form of cathepsin L1 is available. These experiments are currently under way.

Acknowledgements

The authors wish to acknowledge the financial support by CNPq, CNPq-PRONEX, FUJB (through SONDA-UFRJ) and FAPERJ. The excellent technical assistance of Maria Marta Freire is also acknowledged.

References

- [1] Lawrence JD. The ingestion of red blood cells by *Schistosoma mansoni*. J Parasitol 1973;59:60–3.
- [2] Oliveira MF, d'Avila JCP, Torres CR, et al. Haemozoin in *Schistosoma mansoni*. Mol Biochem Parasitol 2000;111:217–21.
- [3] Baig S, Damian RT, Peterson DS. A novel cathepsin B active site is shared by helminth bloodfeeders. Exp Parasitol 2002;101:83–9.
- [4] Skelly PJ, Shoemaker CB. *Schistosoma mansoni* proteases Sm31 (cathepsin B) and Sm32 (legumain) are expressed in the cecum and protonephridia of cercariae. J Parasitol 2001;87:1218–21.
- [5] Bogitsh BJ, Dalton JP, Brady CP, Brindley PJ. Gut-associated immunolocalization of the *Schistosoma mansoni* cysteine proteases, SmCL1 and SmCL2. J Parasitol 2001;87:237–41.
- [6] Brindley PJ, Kalinna BH, Dalton JP, et al. Proteolytic degradation of host hemoglobin by schistosomes. Mol Biochem Parasitol 1997;89:1–9.

- [7] Barrett AJ. Classification of peptidases. *Meth Enzymol* 1994;244:1–15.
- [8] Wasilewski MM, Lim KC, Phillips J, McKerrow JH. Cysteine protease inhibitors block schistosome hemoglobin degradation in vitro and decrease worm burden and egg production in vivo. *Mol Biochem Parasitol* 1996;81:179–89.
- [9] Turk V, Bode W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett* 1991;285:213–9.
- [10] Barrett AJ. Cystatin, the egg white inhibitor of cysteine proteinases. *Meth Enzymol* 1981;80:771–8.
- [11] Abrahamson M. Cystatins. *Meth Enzymol* 1994;244:685–700.
- [12] Barrett AJ, Fritz H, Grubb A, et al. Nomenclature and classification of proteins homologous with cysteine-proteinase inhibitor chicken cystatin. *Biochem J* 1986;236:312–22.
- [13] Manoury B, Gregory WF, Maizels RM, Watts C. Bm-CPI-2, a cystatin homolog secreted by the filarial parasite *Brugia malayi*, inhibits class II MHC-restricted antigen processing. *Curr Biol* 2001;11:447–51.
- [14] Schierack P, Lucius R, Sonnemberg B, Schilling K, Hartmann S. Parasite-specific immunomodulatory functions of filarial cystatin. *Infect Immun* 2003;71:2422–9.
- [15] Newlands GF, Skuce PJ, Knox DP, Smith WD. Cloning and expression of cystatin, a potent cysteine protease inhibitor from the gut of *Haemonchus contortus*. *Parasitology* 2001;122:371–8.
- [16] Monteiro ACS, Abrahamson M, Lima APCA, Vannier-Santos MA, Scharfstein J. Identification, characterization and localization of chagasin, a tight-binding cysteine protease inhibitor in *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Sci* 2001;114:3933–42.
- [17] Cao M, Chao H, Doughty BL. A cDNA from *Schistosoma mansoni* eggs sharing sequence features of mammalian cystatin. *Mol Biochem Parasitol* 1993;57:175–6.
- [18] Smithers SR, Terry RJ. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of adult worms. *Parasitology* 1965;55:695–700.
- [19] Tempone AJ, Afonso AO, Nascimento D, Rumjanek FD. Dolichol phosphate is a rate-limiting factor in mannosyl transferase activity of adult male worms of *Schistosoma mansoni*. *Mol Cell Biochem* 1999;198:187–91.
- [20] Ramalho-Pinto FJ, Gazzinelli G, Howells RE, Mota-Santos TA, Figueiredo EA, Pellegrino J. *Schistosoma mansoni*: a defined medium for stepwise transformation of cercariae to schistosomula in vitro. *Exp Parasitol* 1974;36:360–72.
- [21] Fantappiè MR, Galina A, de Mendonça RL, et al. Molecular characterisation of a NADH ubiquinone oxidoreductase subunit 5 from *Schistosoma mansoni* and inhibition of mitochondrial respiratory chain function by testosterone. *Mol Cell Biochem* 1999;202:149–58.
- [22] Nicholas KB, Nicholas HB, Deerfield DWII. GeneDoc: Analysis and visualization of genetic variation. *Embnet. News* 1997;4.2. [<http://www.hgmp.mrc.ac.uk/embnet.news/vol4.2/>]
- [23] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997;25:4876–82.
- [24] Henderson PJF. A linear equation that describes the steady-state kinetics of enzymes and subcellular particles interacting very tightly bound inhibitors. *Biochem J* 1972;127:321–33.
- [25] Conley JC, Rees MJ, O'Dowd AB. The application of biochemical criteria to the assessment of macrofilarial viability. *Trop Med Parasitol* 1988;(Suppl 4):456–9.
- [26] Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 1997;18:2714–23.
- [27] Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res* 2003;31:3381–5.
- [28] Berendsen HJC, Vanderspoel D, Vandrunen R. GROMACS—a message-passing parallel molecular-dynamics implementation. *Comput Phys Commun* 1995;91:43–56.
- [29] Lindahl E, Hess B, van der Spoel D. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. *J Mol Model* 2001;7:306–17.
- [30] Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Cryst* 1993;26:283–91.
- [31] Vray B, Hartmann S, Hoebeke J. Immunomodulatory properties of cystatins. *Mol Cell Life Sci* 2002;59:1503–12.
- [32] Koiwa H, D'Urzo MP, Assfalg-Machleidt I, et al. Phage display selection of hairpin loop soyacystatin variants that mediate high affinity inhibition of a cysteine proteinase. *Plant J* 2001;27:383–91.
- [33] Olsson SL, Ek B, Bjork I. The affinity and kinetics of inhibition of cysteine proteinases by intact recombinant bovine cystatin C. *Biochim Biophys Acta* 1999;1432:73–81.
- [34] Mason RW, Sol-Church K, Abrahamson M. Amino acid substitutions in the N-terminal segment of cystatin C create selective protein inhibitors of lysosomal cysteine proteinases. *Biochem J* 1998;330:833–8.
- [35] Isemura S, Saitoh E. Inhibitory activities of partially degraded salivary cystatins. *Int J Biochem* 1994;26:825–31.
- [36] Brady CP, Dowd AJ, Brindley PJ, Ryan T, Day SR, Dalton JP. Recombinant expression and localization of *Schistosoma mansoni* cathepsin L1 support its role in the degradation of host hemoglobin. *Infect Immun* 1999;67:368–74.

ANEXO III – TRABALHO PUBLICADO EM PERIÓDICO DE CIRCULAÇÃO INTERNACIONAL

KLUMB, C. E.; FURTADO, D. R.; MAGALHAES DE RESENDE, L. M.; CARRICO, M. K.; COELHO, A. M.; MEIS, E.; MAIA, R. C.; RUMJANEK, F. D. DNA sequence profile of TP53 gene mutations in childhood B-cell non-Hodgkin's lymphomas: prognostic implications. **Eur. J. Haematol.**, v. 71, n. 2, p. 81-90, Aug., 2003.

DNA sequence profile of *TP53* gene mutations in childhood B-cell non-Hodgkin's lymphomas: prognostic implications

Klumb CE, Furtado DR, de Resende LMM, Carriço MK, Coelho AM, de Meis E, Maia RC, Rumjanek FD. DNA sequence profile of *TP53* gene mutations in childhood B-cell non-Hodgkin's lymphomas: prognostic implications.

Eur J Haematol 2003; 71: 81–90. © Blackwell Munksgaard 2003.

Abstract: *Objectives:* The *TP53* gene encodes a nuclear protein implicated in the regulation of the cell cycle, DNA repair, and apoptosis. *TP53* mutations and other alterations have been described in numerous types of tumors, and some of these have been associated with poor prognosis. The aim of this study was to characterize *TP53* mutations in childhood B non-Hodgkin's lymphoma, their correlation with clinical prognostic factors and response to therapy. *Patients and methods:* Samples from 49 children with B non-Hodgkin's lymphoma were examined for *TP53* alterations by single-strand conformation polymorphism analysis (SSCP) of exons 5–9, direct sequencing and by p53 immunohistochemistry. *Results:* Mutations of *TP53* were detected in 11 of 49 (22.5%) patients and more specifically in 20% of Burkitt's lymphoma. The sequence analysis showed missense mutations in 10 cases and an insertion mutation in one case. Mutations of the transition type occurred more frequently than transversions (seven of 11). Analysis of the spectrum of single-nucleotide substitutions showed a 30% frequency of transition mutations in CpG dinucleotide sequences. The overall frequency of p53 immunostaining positivity was 36% (15 of 41). There was a very good agreement between protein expression and the presence of *TP53* mutation ($P = 0.0005$). No significant correlation was found regarding age, gender, clinical stage and LDH level and *TP53* mutations. Comparison of EFS curves using the log-rank test were also not significant. However, the analysis of the effects of mutations on the core p53 structure identified biological and biochemical mutants with phenotypes probably related to different response to chemotherapy. *Conclusions:* Our data suggest that some types of mutants can alter the protein distinctly and may be associated with a more aggressive phenotype. In addition, the impact of *TP53* mutations on response to therapy may also be influenced by disruption of other genes.

Claudete Esteves Klumb^{1,4}, Daniel Rodrigues Furtado², Lídia Maria Magalhães de Resende³, Maria Kadma Carriço⁴, Arthur Moellman Coelho⁴, Ernesto de Meis⁴, Raquel Ciuvalschi Maia^{1,4}, Franklin David Rumjanek²

¹Laboratório de Hematologia Celular e Molecular, Hospital do Câncer/Instituto Nacional de Câncer, ²Departamento de Bioquímica Médica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, ³Divisão de Patologia, Hospital do Câncer/Instituto Nacional de Câncer and ⁴Serviço de Hematologia, Hospital do Câncer/Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil

Key words: childhood B non-Hodgkin's lymphoma; *TP53* mutation; p53; SSCP; immunohistochemistry

Correspondence: Claudete Esteves Klumb, Serviço de Hematologia, Instituto Nacional do Câncer, Praça da Cruz Vermelha, 23/70 andar Rio de Janeiro, Brazil
CEP: 20230-130
Fax: + 55-21-2509 2004
e-mail: cklumb@easyline.com.br

Accepted for publication 29 April 2003

The *TP53* tumor suppressor gene encodes a phosphoprotein expressed in very low levels in the nucleus of normal cells (1). This protein functions as a tetrameric transcription factor involved in the control cell cycle progression, DNA integrity and survival in cells exposed to DNA-damaging agents (2, 3). Abnormalities of the *TP53* tumor gene are

the most frequent molecular events in human neoplasias. Mutations in the *TP53* are associated with more than 50% of human cancers (4), and 90% of these affect p53-DNA interactions, resulting in a partial or complete loss of transactivation functions. Mutations in one allele assert a dominant-negative effect over the remaining wild-type allele,

resulting in genetic instability, loss of heterozygosity, and altered function of p53 (5). Some mutant p53 protein may also have oncogenic effects (6, 7). Moreover, mutants might interfere with p53-independent apoptosis. This dysfunction could be a predictive factor for the selection of patients who fail to respond to specific therapies.

In contrast to many other tumor suppressor genes, in which the inactivation is caused by deletion or frameshift mutations, most of the mutations in the *TP53* gene are missense mutations and differ in the nature and position. The identification of several types of mutants has prompted the observation that not all mutants are functionally equivalent and may have phenotypic biologic differences. Thus, the nature and position of the mutations in *TP53* gene may also influence the response of individual patients to cytotoxic therapy (8).

Pediatric lymphomas are the third most common neoplasm in children and adolescents (9, 10). Unlike lymphomas in adults, childhood B non-Hodgkin's lymphomas (B-NHL) are diffuse, aggressive neoplasms with a tendency to widespread dissemination. An event-free survival at 5 years of 70–90% have been achieved in advanced stage of B-NHL with intensive short-duration protocols (11–12). Despite dramatic improvements in the treatment of childhood B-NHL, approximately 30% percent of patients either do not achieve a complete remission, or develop recurrent disease. The identification of clinical and biologic features that are predictive of treatment failure may help in the development of more effective therapeutic strategies.

Some reports in the literature have indicated a relationship between *TP53* status and prognosis especially in non-small-cell lung cancer, breast cancer and NHL (13–17). In hematologic malignancies, *TP53* mutations have been reported with a frequency ranged from 5% to 50% (18). Among all types of lymphoid neoplasia, the higher frequency of *TP53* mutations was described in Burkitt's lymphoma (BL) and in B-cell acute lymphoblastic leukemia (LLA-L3 type), a leukemia counterpart of BL (19, 20). The relevance of these alterations in BL are controversial (21–23). Furthermore, there is a paucity of data in the literature about the role of *TP53* mutations in the pathogenesis or the development of resistance to therapy in childhood NHL, including BL, the most common histologic subtype among children.

In order to characterize these molecular abnormalities as well as their clinical significance, in this study we have analyzed the possible correlation between mutations in *TP53*, p53 expression, clinical findings, response to chemotherapy and survival in a large series of children with B-NHL.

Patients and methods

Patient's characteristics

We analyzed 49 children with B non-Hodgkin's lymphoma (B-NHL) who were admitted to our institution for diagnosis and treatment between 1991 and 2002. Data on 12 of these 49 patients were published previously (24). Informed consent was provided according to the Declaration of Helsinki. Diagnosis of B-NHL was based on morphologic criteria defined by the Real classification and on the presence of surface immunoglobulin and/or B-cell markers (25). Initial staging included a patient history, physical examination, standard blood tests including lactate dehydrogenase (LDH; normal range, 300 to 600 U/L); computer tomography of abdomen and pelvis and bone marrow aspiration and biopsy. The disease stage was determined according to the St Jude staging system (stages I–IV) (26). Patients with an extensive tumor mass and bone marrow (BM) involvement were classified as having stage IV BL, even if BM involvement was greater than 30%. The presence of neoplastic cells in the cerebrospinal fluid and the clinical sign of central nervous system (CNS) involvement defined CNS disease.

Treatment

The patients were stratified by risk factors (stage and LDH level) and treated with BFM (Berlin–Frankfurt–Münster) based protocol, which consisted of fractionated cyclophosphamide, a tailored methotrexate dose, doxorubicin, vincristine, low to high dose of cytarabine, etoposide, prednisone, and CNS treatment with intrathecal chemotherapy.

Immunohistochemical analysis

Immunohistochemistry (IHC) was performed in paraffin-embedded tissue sections with monoclonal antibodies that included the DO7 antibody (DAKO, Carpinteria, CA, USA) which recognizes an epitope at the N-terminus of human p53 protein and reacts with both wild-type and mutant proteins and the MIB-1 antibody against the Ki-67 nuclear proliferation antigen (DAKO). Sections of 3 μ m were cut from each block and were placed on poly-L-lysine coated glass slides and dried. The first section was stained with hematoxylin–eosin for a histologic review. This procedure ensured that all samples contained a viable amount of tumor. Deparaffinized and rehydrated sections were submitted to antigen-retrieval treatment in a pressure cooker in 0.01 M sodium citrate buffer pH 6.0 for 2 min. Endogenous peroxidase activity was

inhibited by incubation with a 3% hydrogen peroxide. The sections were subsequently washed in phosphate-buffered saline, and incubated with primary antibody (DO-7, 1 : 200; MIB-1, 1 : 50) at 4°C overnight. After incubation, immunodetection was performed with biotinylated anti-mouse immunoglobulins, followed by peroxidase-labeled streptavidin (LSAB-2; DAKO) and diaminobenzidine chromogen (DAKO) as substrate. The slides were counterstained with Harris hematoxylin. As a negative control, sections that had not been incubated with primary antibody were used. As a positive control, sections from a case of breast carcinoma showing p53 overexpression were used. The expression was scored semiquantitatively by two observers, by analysis of 10–20 higher power fields under 40× magnification in an optical microscope. The results were scored as negative (–) if no staining was observed in any cell or when <5% cells were positive, positive (+) if 5% to 25% cells were positive, (++) if 25 to 50% cells were positive, and (++++) if greater than 50% cells were positive.

In addition, B-cell lineage was identified with a panel of monoclonal antibodies directed against lymphoid-associated antigens: leukocyte common antigen (LCA, CD45); B-lineage antibodies L26 (CD20); T-lineage antibodies UCHL-1 (CD45RO) and CD3 (DAKO).

DNA samples

DNA was extracted from bone marrow, lymph nodes or extra-nodal tumors obtained at diagnosis. Fresh samples were used whenever available. From most patients, DNA was obtained from archived paraffin-embedded tumor tissue sections.

DNA extraction

In paraffin-embedded tissues, depending on the size of tissue, one to three sections of 10 µm were sliced and transferred to 1.5 mL microfuge tube. To avoid cross-contamination of samples, for each block, the microtome blade, tweezers, and cutting area were cleaned with xylene and 70% ethanol. In order to remove the paraffin, the tissues were extracted three times with 1 mL of xylene and washed with 0.5 mL of 100% ethanol. Tissues were pelleted by centrifugation for 10 min at 12 000 × g in microfuge and the residual ethanol removed, and the tissues were dried at room temperature. Depending on the size of sample, 190–380 µL of lysis buffer [50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), pH 8.0; 0.5% Tween 20] and proteinase K (final concentration 200 µg/mL, Life Technologies Inc., Gibco-

BRL, São Paulo, Brazil) were added. The mixtures were incubated at 45°C overnight, followed by heating at 95°C. The samples were centrifuged for 5 min at 3000 × g to remove any residual paraffin or tissue. An aliquot (1 µL) of supernatant was used for subsequent amplification (27). In fresh material, DNA was extracted using the DNAzol kit according to the protocol provided by the manufacturer. For each amplification 100 ng of DNA were used.

PCR SSCP analysis

The oligonucleotide primers used for polymerase chain reaction (PCR) amplifications were synthesized by GIBCO-BRL. The nucleotide sequences of the primers were: 5F 5'-CAGTACTCCCCTGCCCTCAA-3', 5R 5'-CACCATCGCTATCTGAGCAG-3'; 6F 5'-CACTGATTGCTCTTAGGTCT-3', 6R 5'-AGTTGCAAACCAGACCTCAG-3'; 7F 5'-CTAGGTTGGCTCTGACTGTA-3', 7R 5'-TGACCTGGAGTCTTCCAGTG-3'; 8F 5'-CTTCTCTTTTCTATCCTGA-3', 8R 5'-TCTTGTCCTGCTTGCT-3'; 8/9F 5'-AGTGGTAATCTACTGGGACG-3', 8/9R 5'-TCTCCATCCAGTGGTTTCTT-3'. The five fragments were amplified separately. Sizes of the PCR products were 190 bp for exon 5, 144 bp for exon 6, 118 bp for exon 7, 180 bp for exon 8, and 289 bp for exon 8/9.

Genomic DNA was subjected to PCR in a 45 µL solution (exon 6 and 8, 25 µL) containing 25 pmol of each primer, 0.2 mM of the dNTP mix, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5–3.0 mmol/L MgCl₂, 1 U Taq polymerase (GIBCO-BRL) in a PC-100 programmable thermocycler (M.J. Research Inc., Waltham, MA, USA) under the following conditions: denaturation (1 min at 94°C), annealing (1 min at 55–60°C) and extension (2 min at 72°C) for 35 cycles followed by a terminal extension for 7 min at 72°C. PCR products (2–4 µL) were then diluted 1 : 1(v/v) in a loading buffer containing formamide, 10 mM EDTA pH 8.0, 0.1% bromophenol blue, 0.1% xylene cyanol. Samples were heated at 95°C for 5 min, chilled on ice, and immediately loaded onto two gel systems to maximize the potential for observing mobility shifts. The gels consisted of a 8% or 10% polyacrylamide/0.5X trizma base-borate-EDTA buffer (TBE) (pH 8.3), with or without the addition of glycerol and a Pharmacia PhastSystem (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Running conditions were at 40–60 V for 14–19 h at room temperature and 600 V at 15°C for 1.40 h, respectively. The gels was then stained with silver nitrate and air-dried (28). DNA samples from three patients with *TP53* mutations previously identified (24) and control DNA from healthy blood donors were included.

To confirm that our samples are free from contamination or some other artifacts, all experiments were repeated using another section cut from the same block of paraffin containing the embedded tissue (29).

Direct sequencing

Tumor samples with this showed an abnormal single-strand conformation polymorphism analysis (SSCP) pattern were amplified for sequencing. The PCR product was purified with GFX™ PCR DNA purification kit (Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ, USA) and sequenced by the dideoxy chain-termination method (30), using the Sequenase kit (USB, Cleveland, OH USA). The products were then electrophoresed on a 6% polyacrylamide gel containing 7 M urea. In all cases in which mutation were found the DNA was re-sequenced a second time using templates obtained from a separate amplification reaction to ensure reproducibility (29). The mutation was further confirmed by sequencing the complementary strand in each case. In one sample, direct sequencing analysis gave an ambiguous sequence ladder, probably due to the presence of deletion or insertion in one of the alleles. To characterize this alteration, the PCR product from the amplification of genomic DNA was cloned into a pBluescript vector (Stratagene, Jolla, CA, USA). At least eight clones were sequenced to identify the abnormality. The sequencing were performed in the ABI 373 DNA Sequencer using the DYEnamic ET termination cycle sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech).

Statistical analysis

The associations of *TP53* mutations with clinical characteristics were analyzed by the chi-square and Fisher's test. Comparisons were made between p53 expression and *TP53* mutation, p53 expression and missense mutation. For analysis of treatment results and survival, the following were excluded: two patients who died early before any treatment, three patients who received different type of treatment, and one patient for non-adherence to treatment. We evaluated event-free survival (EFS) as the time from remission to relapse, death or date of last follow-up. Patients who did not demonstrate initial control (complete response) were treated as failure at time zero.

To estimate overall EFS the Kaplan–Meier method was used and comparison was made using the log-rank test (SSPS Inc., Chicago, IL, USA version 6.0). A *P*-value of less 0.05 was considered to indicate statistical significance.

Results

The initial data of the 49 children grouped according to the presence or absence of *TP53* mutations are shown in Table 1. The median age was 6 year (range: 1 to 15), and there were 14 females and 35 males (male/female ratio 2.5 : 1). Forty patients had BL, seven diffuse large-cell lymphoma (DLCL) and two Burkitt-like lymphoma (BLL). According to the St Jude staging system (26), 24% of patients had stage I/II and 76% stage III/IV disease. Abdomen was the most frequent site of disease compromising 80% of patients, followed by head and neck (20%), BM (12%) and CNS involvement (8%). Other less-frequent sites for the disease such as bone and peripheral lymphnodes outside the neck and orbital involvement were found in seven cases. Median LDH level was 869 U/L. The values ranged from 179 to 7013. In this series B-NHL associated to HIV infection was diagnosed only in four patients (Table 1).

PCR-SSCP and sequencing

All childhood B-NHL were screened for mutations in exons 5–9 by SSCP analysis. Abnormal mobility shifts were detected in 13 of 49 patients. Some cases are shown in Fig. 1. They were more frequent in BL subtype. The sequencing of abnormal SSCP

Table 1. Correlation between clinical characteristics and *TP53* status in 49 children with B non-Hodgkin's lymphoma

Characteristic	Patients with <i>TP53</i> mutation	Patients with wild-type <i>TP53</i>	<i>P</i> value
Patients	11	38	
Mean age (Years)	(6)	(5)	
Gender – <i>n</i> (%)			NS
Male	9 (82)	26 (68)	
Female	2 (18)	12 (32)	
Histologic diagnosis, <i>n</i> (%)			
Burkitt's	9 (22)	31 (78)	
Diffuse large B cell	2 (28)	5 (72)	
Burkitt-like	0	2	
Clinical stage, <i>n</i> (%)			NS
I/II	3 (27)	9 (24)	
III/IV	8 (73)	29 (76)	
Site ^a , <i>n</i> (%)			
Abdomen	9 (82)	30 (79)	
Head and neck	2 (18)	8 (21)	
BM	–	6 (16)	
CNS	–	4 (10)	
Lactate dehydrogenase level, <i>n</i>			NS
Normal	4	13	
Increased	6	25	
HIV status			
Positive	–	4	
Negative	11	34	

BM, bone marrow; CNS, central nervous system; NS, not significant.

^aSome patients had more than one site of involvement.

Prognostic implications of p53 mutations in childhood B-NHL

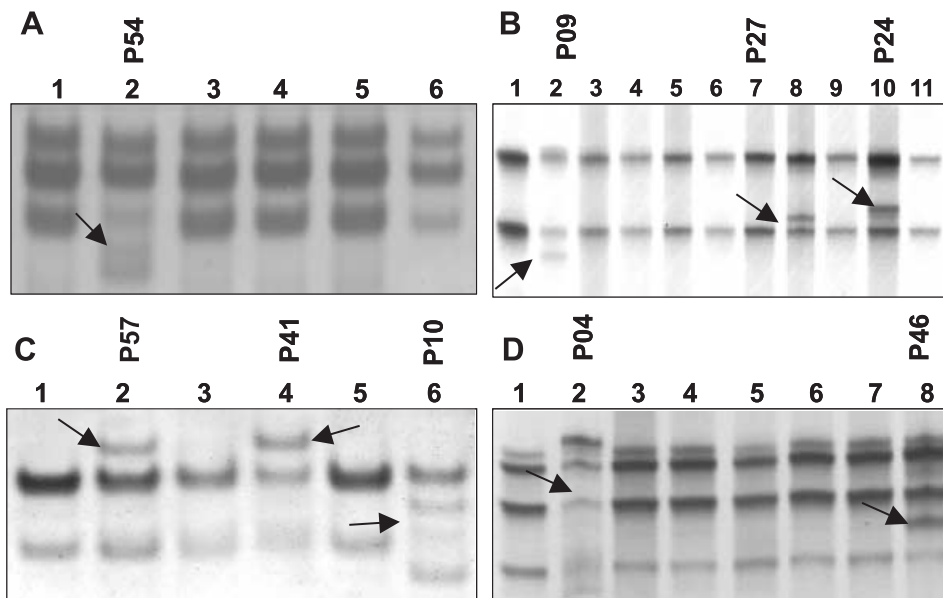


Fig. 1. Polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism analysis (PCR-SSCP) analysis. The PCR-amplified genomic DNA fragments were electrophoresed on 8% polyacrylamide gels at room temperature (A, C) and on Pharmacia PhastSystem (B, D). (A) 1, normal control; 2, patient P54; 3–6 normal tumor; (B) 1, normal control; 2–7,11, normal tumor; 8,10, patients P27 and P24; (C) 1, normal control; 2,4,6, abnormal mobility shift in patients P57, P41, P10; (D) 1, normal control; 2,8, patients P04, P46. Abnormal mobility shifts are indicated by arrowheads.

Table 2. B non-Hodgkin's lymphoma patients with mutations in the *TP53* gene and protein expression

Tumor no.	Histologic type ^a /clinical stage	Exon	Codon	Sequence change	Amino Acid change	Protein expression	EFS (months)/outcome
P02	BL/III	7	239	AAC → GAC	Asn → Asp	+	0/Dead ^b
P04	BL/III	7	248	CGG → TGG	Arg → Trp	++	45/Alive
P09	BL/I	6	218–219	3-bp insertion	The resulting protein displays an extra valine.	++	52/Alive
P10	BL/III	7	249	AGG → AGT	Arg → Ser	+++	0/Dead ^b
P24	DLC/II	6	208	GAC → GTC	Asp → Val	++	64/Alive
P41	BL/III	7	248	CGG → TGG	Arg → Trp	NA	34/Alive
P46	BL/III	7	234	TAC → TGC	Tyr → Cys	++	0/Dead ^b
P50	BL/III	8	286	GAA → GGA	Glu → Gln	+	26/Alive
P54	BL/IV	5	161	GCC → GTC	Ala → Val	NA	19/Alive
P57	BL/III	7	248	CGG → TGG	Arg → Trp	+++	13/Alive
P59	DLC/III	6	193	CAT → CCT	His → Pro	+++	0/Dead ^b

NA, data not available; (–), no staining in any cell or <5% cells positive; (+), 5% to 25% cells positive; (++) ≥25 to 50% cells positive; and (+++), > 50% cells positive.

^aClassification was based on the morphologic criteria of REAL: BL, Burkitt's lymphoma; DLC, diffuse large B cell lymphoma; BLL, Burkitt's like lymphoma. ^bDied from refractory disease.

samples confirmed that 11 patients had *TP53* mutation (Table 2). We have found mutations in all the exons studied, excluding exon 9. These mutations included one in exon 5; three in exon 6; six in exon 7 and one in exon 8. Sequence analysis showed single base-pair missense mutations in 10 cases (Fig. 2). Mutations of nucleotide transition type occurred more frequently than transversion type (seven of 11). Transversions were present in only three tumors. Analysis of spectrum of single-nucleotide substitutions in these tumors showed a 30% frequency of transition mutations in CpG dinucleotide sequences. Codons for eight different amino acids were affected by these

mutations; the codon for amino acid arginine was the most frequently affected (four of 10). The sequence data of one case showed an insertion of three nucleotides involving codons 218–219. The mobility shifts in SSCP of three cases (P24, P27, and P48) resulted in a silent base change at codon 213, representing a common polymorphism previously described (31) (Fig. 2D).

p53 expression

p53 protein analysis was performed in 41 of 49 patients. The MIB-1 antibody was used as a control of antigen conservation and successful antigen

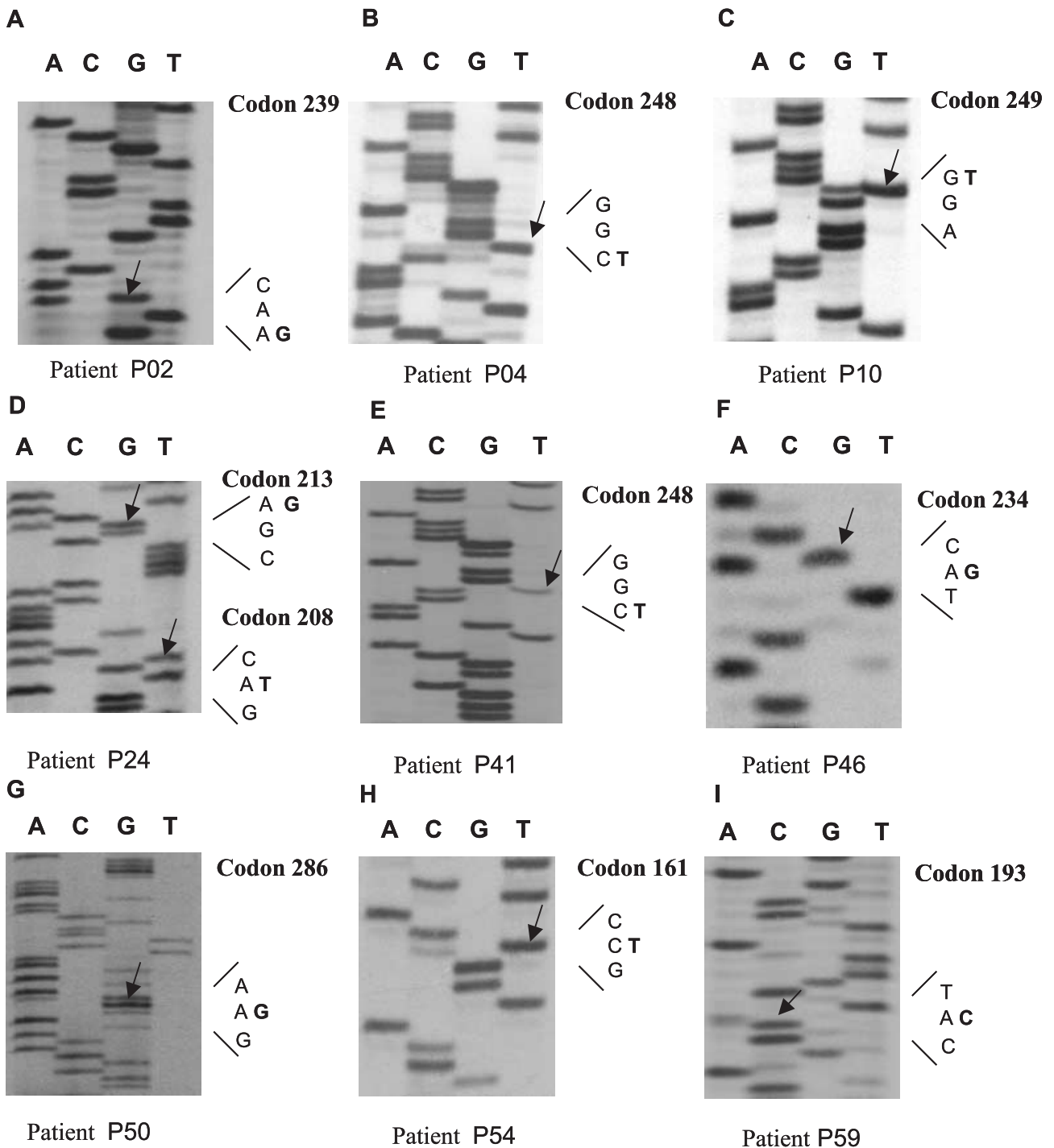


Fig. 2. TP53 sequence analysis. Each sequence is shown from 5' (bottom) to 3' (top). Coding strands are shown, with base substitutions indicated by arrows. Mutations are indicated in each gel. In the sample from patient P41 (E), in contrast to the sample from patient P04 (B), the normal nucleotide band was still present and normal and abnormal nucleotide bands were of similar intensity.

unmasking and six negative cases for MIB-1 antibody were excluded from the analysis. In two additional cases, there was not enough material for IHC study. Staining of the sections was performed without prior knowledge of SSCP results. For the positive cases, the antigen was localized in the

nucleus of neoplastic lymphoid cells and showed varying intensity. We classified p53 immunoreactivity in three grades, according to the percentage of positive cells. However, in some tumors, strongly positive isolated cells were observed. These cases were considered negative. The overall frequency of

p53 positivity in childhood B-NHL was 36% (15 of 41). In the group with *TP53* mutation, p53 expression was detected in nine of nine tumors tested (Table 2). This is in contrast to the frequency of six p53-positive cases identified among 32 tumors without mutations in which IHC study was performed; the difference was significant ($P = 0.0005$). Furthermore, there was very good correlation between protein expression as detected by IHC and the presence of an abnormal *TP53*-SSCP result. In nine of 13 tumors with an abnormal SSCP migration pattern, p53 expression was observed (Table 2). P53 IHC was not performed in two patients with an abnormal migration pattern detected by SSCP analysis because of lack of material. In the remaining six cases without *TP53* mutations, but showing p53 expression, the p53 positivity varied from 5% to 50%. Strong association was observed between p53 overexpression and missense mutations. P53 expression was detected in eight of nine tumors with missense mutation; one tumor with a 3-bp insertion was also positive. We found that the majority of cases with mutations in the *TP53* gene (seven of nine) showed a percentage of p53-positive cells over 25%, although two cases showing low level of p53 expression had mutations. Immunoreactivity for p53 was not present in two cases with polymorphism at codon 213 of *TP53* gene.

TP53 mutations, clinical initial characteristics and survival

Table 2 shows the initial data of patients with *TP53* mutation and those without detectable mutation. No significant correlation was found between these two groups regarding age, gender, clinical stage, and LDH level. Comparison of the EFS at 5 year using the log-rank test were also not significant ($P = 0.16$).

Discussion

The first question addressed in our study concerns the frequency of *TP53* mutations in childhood B-NHL. Previous studies of *TP53* mutations in NHL were limited to select adulthood groups or a heterogeneous series comprising adults and children (15–17, 21, 23). We identified a mutation rate of 22.5% in B-NHL and a 20–42% rate for BL and DLC, respectively. Although in a previous study the overall frequency of *TP53* mutation in South American BL was 37%, there was no reference indicated on how many children were included and whether they represented newly diagnosed or relapse of disease (20). The same situation applies to a report by Gaidano *et al.*, where a high frequency (33%) of *TP53* mutated samples among

BL biopsies was observed (19). The results reported by our group may have underestimated the frequency of *TP53* mutations, although it is known that mutations in the exons 4 and 10 are rare. Most studies describing the screening of alterations in the *TP53* gene analyzed exons in the 5–8 region, where the majority of mutations have been described and were considered a hot spot for mutations. Mutations outside of exons 5–9 constitute less than 5% of mutations in general and are infrequent in NHL (32, 33). In relation to DLC lymphoma, at the time of diagnosis, 20% of patients exhibited somatic mutations in *TP53* gene and expression of p53 protein is higher in mutated cases (17). It is remarkable that three of seven children with DLC lymphoma in our series had *TP53* mutations. Whether this reflects a pathogenic peculiarity of this lymphoma type in childhood, or if it is a bias as a result of small number of cases needs further clarification.

Concerning *TP53* alterations most were point mutations that lead to an increase in protein stability and accumulation in the nucleus of tumor cells. The correlation between p53 accumulation and *TP53* mutation previously described was 80% (34). A very significant association between p53 expression and mutation ($P = 0.0005$) was observed in our study. This was also observed for missense mutation and p53 expression ($P = 0.001$). Most of the patients with *TP53* mutations in our series showed a high percentage of p53-positive cells. Another information which emerged from our study is p53 expression dissociated from the presence of mutations. One possible explanation for this apparent discrepancy is that the distribution of mutations in high-grade lymphomas is not limited to the classic hot spots of the *TP53* gene (35). Nevertheless, mutations in the exons 4 and 10 are rare and frequently these mutations are frameshift or non-sense type. Such null mutations are usually not detected by IHC analysis because no protein is produced (34). In the order hand, the specificity of SSCP analysis is < 75%, and many mutations may simply have escaped detection. Therefore, we can not exclude the presence of *TP53* mutations in these tumors.

Analysis of *TP53* mutations in NHL, more specifically in BL, has demonstrated that, as for other tumors, these consisted of missense mutations (17–23). Previous studies in South American patients showed a high prevalence of *TP53* mutations in the exons 6 and 7 (20). These results are similar to our observations in which nine of 11 patients displayed mutations in these regions of the gene. However, this pattern of mutation differs from those observed by other authors. Among 48 patients with BL in Preudhomme's serie, only

three of nine mutated cases showed *TP53* mutations in exons 6 and 7 (23).

In the present study, nucleotide substitutions of the transition type were identified in 64% of samples, whereas transversions were less frequent (36%). Ours results are in agreement with several reports that show a high frequency of *TP53* point mutations in NHL as transitions (17, 20, 23). We also identified three cases with mutation in the CpG site involving codon 248, the most frequent target for mutations in BL (36). As suggested previously, the data indicate that endogenous mutagenesis probably related to cytosine methylation is more frequent in B-NHL than mutations induced by exogenous mutagens (17, 23).

Analysis of *TP53* mutations in human cancers has demonstrated that 80–90% of mutations lies in central part of the protein, in an area between residues 102–292 which contains the four conserved regions II–V. Based on the crystal structure of the core DNA-binding domain analyzed by Cho *et al.* in 1991 (37), two classes of mutations were described. Class I mutants who affect residues that directly contact DNA and class II named ‘structural’ mutants which made contacts with other residues and are involved in the stabilizing the tertiary structure of the protein (34). While the contact mutants retain a wild conformation and form stable complexes with wild-type p53, class II mutants have an altered conformation and are associated with a more oncogenic phenotype *in vitro* (38, 39). Several reports have revealed that biologic variations between mutants can alter the p53 protein distinctly lead to different biologic characteristics and response to chemotherapy (7, 8).

We observed a statistically not significant difference in EFS between patients with and without mutation. In addition no significant correlation was found between these two groups regarding age, gender, clinical stage, and LDH level. Similar results have been found in the literature. Preudhomme *et al.* suggested that the persistence of normal *TP53* alleles in BL patients with *TP53* mutation could be related to response to chemotherapy and a better outcome (23). We cannot exclude this hypothesis to explain the results found in our patients. In some cases of our series, residual bands corresponded to the wild-type allele from the normal or tumoral cells were present on the raw data of the sequencing results. However, the analysis of the effects of *TP53* mutations on the structure of core domain of p53 performed by Martin *et al.* (40), make it possible to understand the relationship between some types of mutations and individual response to therapy observed in patients from our series. Through the model suggested by those authors, we analyzed the muta-

tions based on the structure and conservation. Among 11 patients with *TP53* mutation, in three cases (R249S, T234C, H193P), the substituted residue results in incorrect folding of the protein. This type of mutation may be classified as a structural type. In the case with N239D mutation although there is no structural alteration, the mutated residue is 100% conserved across the species and is involving in DNA binding (41). It is remarkable that these four patients died from disease progression. The analysis of R248W found in three patients with very good evolution in our and other series (41) showed only local conformational changes. Furthermore, in previous studies, the R248W had a milder protective effect against cisplatin-induced apoptosis (7). We also found three patients in complete remission with very rare mutations, A161V, D208V, and E286G (less than 10 examples in the literature) that could not be explained by structural changes or conservation (36). As suggested by Martin *et al.* (40), it is probable that these rare substitutions have no effect on protein function, and that they may be detected as a ‘passenger event’ occurring in the clonal expansion. The interpretation of 3-bp insertion observed in one case from our series is more difficult because the structural analysis of this mutation has not been carried out. This patient had stage I disease and is alive in remission.

Recently, it has been demonstrated that the concurrent disruption of p16INK4 and ARF-p53 pathway were associated with poor prognosis in adult diffuse large B-cell lymphomas (42, 43). However, the molecular profiling in pediatric diffuse large B-cell lymphoma has not been well studied yet and recent studies have suggested a different biologic spectrum of B diffuse large-cell lymphomas (DLBCL) in children (44).

In conclusion, our data suggest that some types of *TP53* mutations can alter the protein distinctly and lead to different response to therapy. In addition, the impact of *TP53* mutations in response to therapy may also be influenced by disruption of other genes. This may explain the conflicting results in the literature with regard to the predictive value of *TP53* mutations in BL and other neoplasias (21, 23, 34). In the future, a more extensive p53 structural mutation analysis associated with functional assay (45) and the analysis of alterations in other tumor suppressor genes should be performed in order to evaluate the role of *TP53* mutations in the therapy response and clinical outcome.

Acknowledgments

The authors wish to acknowledge the financial support of CAPES, PRONEX, FAPERJ and FUJB. The authors are also

grateful to Prof. Pedro C. Rodrigues and Dr Regina M. Ferreira for the statistical analyses.

References

1. VOUSDEN KH. p53, Death star. *Cell* 2000;**103**:691–694.
2. VOGELSTEIN B, LANE D, LEVINE, AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000;**408**:307–310.
3. LEVINE JA. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997;**88**:323–331.
4. GREENBLATT MS, BENNETT WP, HOLLSTEIN M, HARRIS CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994;**54**:4855–4878.
5. BRACHMANN RK, EBY KYY, PAVLETICH NP, BOEKE JD. Genetics selection of intragenic suppressor mutations that reverse the effects of common p53 cancer mutations. *EMBO J* 1998;**18**:1847–1859.
6. DITTMER D, PATI S, ZAMBETTI G, CHU S, TERESKY AK, MOORE M, FINLAY C, LEVINE AJ. Gain of function mutations in p53. *Nat Genet* 1993;**4**:42–46.
7. BLANDINO G, LEVINE AJ, OREN M. Mutant p53 gain of function: differential effects of different p53 mutants on resistance of cultured cells to chemotherapy. *Oncogene* 1999;**18**:477–485.
8. AAS T, BORRESEN AL, GEILSLER S, SMITH-SORENSEN B, JOHNSEN H, VARHAUG J, LONNING PE, AKSLEN LA. Specific p53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients. *Nat Med* 1996;**2**:811–814.
9. YOUNG JL Jr, RIES LG, SILVERBERG E, HORM JW, MILLER RW. Cancer incidence, survival and mortality for children younger than age 15 years. *Cancer* 1996;**58**:598–602.
10. BLEYER WA. The impact of childhood cancer on the United States and the world. *CA Cancer J Clin* 1990;**40**:355–367.
11. LINK MP, SHUSTER JJ, DONALDSON SS, BERARD CW, MURPHY SB. Treatment of children and young adults with early-stage non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1997;**337**:1259–1266.
12. REITER A, SCHARAPPE M, TIEMANN M, LUDWING WD, YAKISAN E, ZIMMERMANN M, MANN G, CHOTT A, EBELL W, KLINGEBIEL T, GRAF N, KREMMENS B, MULLER-WEHRICH S, PLUSS HJ, HENZE G, RIEHM H. Improved treatment results in childhood B-cell neoplasms with tailored intensification of therapy: a report of Berlin-Frankfurt-Münster Group trial NLH-BFM 90. *Blood* 1999;**94**:3294–3306.
13. TOMIZAWA Y, KOHNO T, FUJITA T, KIYAMA M, SAITO R, NOGUCHI M, MATSUNO Y, HIROHASHI S, YAMAGUCHI N, NAKAJIMA T, YOKOTA J. Correlation between the status of the p53 gene and survival in patients with stage I non-small cell lung carcinoma. *Oncogene* 1999;**18**:1007–1014.
14. BERNES EM, FOEKENS JA, VOSSEN R, LOOK MP, DEVILEE P, HENZEN-LOGMANS SC, VAN STAVEREN IL, VAN PUTTEN WL, INGANAS M, Meijer-van Gelder ME, Cornelisse C, Claassen CJ, Portengen H, Bakker B, Klijn JG. Complete sequencing of *TP53* predicts poor response to systemic therapy of advanced breast cancer. *Cancer Res* 2000;**60**:2155–2162.
15. HERNANDEZ L, FEST T, CAZORLA M, TERUYA-FELDSTEIN J, BOSH F, PEINADO MA, PIRES MA, MONTSERRAT E, CARDESA A, JAFFE ES, CAMPO E, RAFFOLD M. p53 gene mutations and protein overexpression are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood* 1996;**87**:3351–3359.
16. ICHIKAWA A, KINOSHITA T, WATANABE T, WATANABE T, KATO H, NAGAI H, TSUSHITA K, SAITO H, HOTTA T. Mutations of the p53 gene as prognostic factor in aggressive B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 1997;**337**:529–534.
17. KODURU PR, RAJU K, VADMAL V, MENEZES G, SHAH S, SUSIN M, KOLITZ J, BROOME JD. Correlation between mutation in p53, p53 expression, cytogenetics, histologic type, and survival in patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997;**90**:4078–4091.
18. IMAMURA J, MIYOSHI I, KOEFFLER PH. p53 in hematologic malignancies. *Blood* 1994;**84**:2412–2421.
19. GAIDANO G, BALLERINI P, GONG JZ, INGHIRAMI G, NERI A, NEWCOMB EW, MAGRATH IT, KNOWLES DM, Dalla-Favera R. p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;**88**:5413–5417.
20. BHATIA KG, GUTIERREZ MI, HUPPI K, SIWARSKI D, MAGRATH IT. The pattern of p53 mutations in Burkitt's lymphoma differs from that of solid tumors. *Cancer Res* 1992;**52**:4273–4276.
21. GUTIERREZ MI, BHATIA K, DIEZ B. Prognostic significance of p53 mutations in small non-cleaved cell lymphomas. *Int J Oncol* 1994;**4**:567–571.
22. NOMDEDÉU JF, LEITE I, MONTSERRAT B, LASA A, ESTIVILL C, RUBIOL E, BADELL I, PARDO N, CUBELLS J, MATEU R, BRUNET S, BORDES R, SOLER J. Mutational analysis of p53 in 16 cases of acute lymphoblastic leukemia and Burkitt's lymphoma. *Haematologica* 1997;**82**:550–554.
23. PREUDHOMME C, DERVITE I, WATTEL E, VANRUMBEKE M, FLACTIF M, LAI LUC J, HECQUET B, COPPIN MC, NELKEN B, GOSSELIN B, FENAUX P. Clinical significance of p53 mutations in newly diagnosed Burkitt's lymphoma and acute lymphoblastic leukemia: a report of 48 cases. *J Clin Oncol* 1995;**13**:812–820.
24. KLUMB CE, de RESENDE LM, TAJARA EH, BERTELLI EC, RUMJANEK VM, MAIA RC. P53 gene analysis in childhood B non-Hodgkin's lymphoma. *São Paulo Med J* 2001;**119**:212–215.
25. HARRIS NL, JAFFE ES, STEIN H, BANKS PM, CHAN JKC, CLEARY ML, DELSON G, DE WOLF-PEETERS C, FALINI B, GATTER KC, GROGAN TM, ISAACSON PG, KNOWLES DM, MASON DY, MULLER-HERMELINK HK, PILERI AS, PIRIS MA, RALFKIAER E, WARNEKE RA. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: A proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994;**84**:1361–1392.
26. MURPHY SB. Classification, staging and end results of treatment of childhood non-Hodgkin's lymphomas: dissimilarities from lymphoma in adults. *Semin Oncol* 1980;**7**:332–339.
27. WRIGHT DK, MANOS MM. Sample preparation from paraffin-embedded tissues. In: INNIS MA, GELFAND DH, SNINSKY JJ, WHITE TJ, Eds. *PCR Protocols: A guide to Methods and Applications*. New York: Academic Press, 1990:153–158.
28. BASSAM BJ, CAETANO-ANOLLÉS G, GRESSHOFF PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1991;**196**:80–83.
29. WILLIAMS C, PONTÉN F, MOBERG C, SÖDERKVIST P, UHLÉN M, PONTÉN J, SITBON G, LUNDEBERG J. A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. *Am J Pathol* 1999;**155**:1467–1471.
30. SANGER F, NICKLEN S, COULSON AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;**74**:5463–5546.
31. CARBONE D, CHIBA I, MITSUDOMI T. Polymorphism at codon 213 within the p53 gene. *Oncogene* 1991;**9**:1691–1692.
32. HOOLLSTEIN M, SIDRANSKY D, VOGELSTEIN B, HARRIS CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991;**253**:49–53.
33. PIGNON JM, VINATIER I, FANEN P, JONVEAUX P, TOURNIHAC O, IMBERT M, ROCHANT H, GOOSSENS M. Exhaustive analysis of the p53 gene coding sequence by denaturing

- gradient gel electrophoresis: application to the detection of point mutations in acute leukemias. *Hum Mutat* 1994;**3**:126–132.
34. SOUSSI T and BÉROUD C. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2001;**1**:233–239.
 35. KOČIĄLKOWSKI S, PEZZELA F, MORRISON H, JONES M, LAHA S, HARRIS AL, MASON DY, GATTER KC. Mutations in the p53 gene are not limited to classic hot spots and are not predictive of p53 protein expression in high-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol* 1995;**89**:55–60.
 36. HAINAUT P, HERNANDEZ T, ROBISON A, RODRIGUEZ-TOME P, FLORES T, HOLLSTEIN M, HARRIS CC, MONTESANO R. IARC data base of *p53* gene mutations in human tumors and cell lines: updated compilation, revised formats and new visualisation tools. *Nucleic Acids Res* 1998;**26**:205–213.
 37. CHO Y, GORINA S, JEFFREY PD, PAVLETICH NP. Crystal structure of p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 1994;**265**:334–335.
 38. MAY P, MAY E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of p53 protein. *Oncogene* 1999;**18**:7621–7636.
 39. SIGAL A, ROTTER V. Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res* 2000;**60**:6788–6793.
 40. MARTIN ACR, FACCHIANO AM, CUFF AL, HERNANDEZ-BOUSSARD T, OLIVIER M, HAINAUT P, THORNTON JM. Integrating mutation data and structural analysis of the TP53 tumor-suppressor protein. *Hum Mutat* 2002;**19**:149–164.
 41. POWELL B, SOONG R, IACOPETTA B, SESHADRI R, SMITH DR. Prognostic significance of mutations to different structural and functional regions of the *p53* gene in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2000;**6**:443–451.
 42. SÁNCHEZ-BEATO M, SÁEZ AI, NAVAS IC, ALGARA P, MATEO MS, VILLUENDAS R, CAMACHO F, SÁNCHEZ-AGUILERA A, SÁNCHEZ E, PIRIS M. Overall survival in aggressive B-cell lymphomas is dependent on the accumulation of alterations in p53, p16, and p27. *Am J Pathol* 2001;**159**:205–213.
 43. GRONBAEK K, de NULLY BROWN P, MOLLER MB, NEDERGAARD T, RALFKIAER E, MOLLER P, ZEUTHEN J, GULDBERG P. Concurrent disruption of p16INK4a and the ARF-p53 pathway predicts poor prognosis in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* 2000;**14**:1727–1735.
 44. OSCHLIES I, SCHIRRMACHER J, KRAMS M, ZIMMERMANN M, REITER A, PARWARESCH R. The immunophenotype and genotype of pediatric diffuse large B cell lymphomas differs from that of adults B-cell lymphomas. *J Pediatr Hematol Oncol* 2003;**25**:S3.
 45. FLAMAN JM, FREBOURG T, MOREAU V, CHARBONNIER F, MARTIN C, CHAPPUIS P, SAPPINO AP, LIMACHER JM, BRON L, BENHATTAR J, TADA M, VAN MEIR EG, ESTREICHER A, IGGO RD. A simple p53 functional assay for screening cell lines, blood, and tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;**92**:3963–3967.

ANEXO IV – TRABALHO PUBLICADO EM PERIÓDICO DE CIRCULAÇÃO INTERNACIONAL

TEMPONE, A. J.; FURTADO, D. R.; GIMBA, E. R.; OLIVEIRA, F. M.; RUMJANEK, F. D. Dolichol phosphate mannose synthase is differentially expressed in male and female worms of *Schistosoma mansoni*. **Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.**, v. 131, n. 3, p. 465-474, Mar., 2002.



ELSEVIER

Comparative Biochemistry and Physiology Part B 131 (2002) 465–474

CBP

www.elsevier.com/locate/cbpc

Dolichol phosphate mannose synthase is differentially expressed in male and female worms of *Schistosoma mansoni*[☆]

A.J. Tempone^a, D.R. Furtado^b, E.R.T. Gimba^c, F.M.B. Oliveira^b, F.D. Rumjanek^{b,*}

^aDepartamento de Medicina Tropical, Laboratório de Hanseníase, Fundação Oswaldo Cruz Avenida Brasil 4365 CEP 21045-900, Rio de Janeiro, Brazil

^bDepartamento de Bioquímica Médica, ICB/CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, Bloco E, sala 22. CEP 21941-590, Rio de Janeiro, Brazil

^cDepartamento de Medicina Experimental Pesquisa Básica, Instituto Nacional do Câncer, Praça da Cruz Vermelha, 23, CEP 20230-105, Rio de Janeiro, Brazil

Received 11 September 2001; received in revised form 12 November 2001; accepted 22 November 2001

Abstract

The cDNA encoding the *Schistosoma mansoni* dolichol phosphate mannose synthase was completely sequenced, displaying the highest homology with *Cricetulus griseus* and *Saccharomyces pombe* genes. The Schistosoma enzyme had a K_m of 0.127 μ M, a value that is within the range of those reported for several other species. Thin-layer chromatography of the radiolabelled schistosoma lipid intermediate showed it was identical to dolichol–phosphate (C₈₀–C₁₀₅). Expression of dolichol phosphate mannose synthase of *S. mansoni* (SmDPMS) was analysed by Northern blot and quantified by semi-quantitative RT–PCR with cDNA from mature and immature male and female worms. Northern blot analysis revealed a single 1-kb band. Both approaches confirmed a higher level of expression in mature female worms, as compared to immature and male worms. © 2002 Elsevier Science Inc. All rights reserved.

Keywords: *Schistosoma mansoni*; Dolichol phosphate; DNA sequence; Differential expression; Male and female worms; K_m ; RT–PCR; Northern blot

1. Introduction

The striking sexual dimorphism observed in *Schistosoma mansoni* must reflect the overall physiological adaptations of the worms. Although there are many gaps in our understanding of the schistosoma's biochemistry and physiology, an increasing body of evidence shows that for some parameters, there are differences which are typical of each sex. In other words, when male and female

worms are compared, some biochemical patterns can be readily associated to each sex. For example, studies comparing protein composition (Blanton and Licate, 1992; Braga et al., 1989), solute transport (Cornford and Fitzpatrick, 1992), gene expression (Bostic and Strand, 1996; Schussler et al., 1997; Fantappié et al., 1999), as well as sensitivity to steroids and steroid analogues (Nakazawa et al., 1997; Giannini et al., 1995; Engelen-der et al., 1993), have all shown significant qualitative and quantitative traits, which can be summed up as indicating sex-specific regulation of metabolism. This is not surprising in view of the female specialisation, particularly regarding its reproductive functions.

[☆] Note: Nucleotide sequence data reported in this paper have been deposited in the GenBank under accession number AF283817.

*Corresponding author. Fax: +55-21-2270-8647.

E-mail address: franklin@bioqmed.ufjf.br (F.D. Rumjanek).

The general consensus is that as a whole, female schistosomes are metabolically more active than males.

Recently it was reported that the activity of the enzyme dolichol phosphate mannose synthase of adult *S. mansoni* females was 2–3-fold higher than that of male worms (Tempone et al., 1999). In *S. mansoni*, as in other species, this enzymatic system is involved in the synthesis of several glycoconjugates and utilises dolichol phosphate, a phosphorylated terpenoid, as one of the substrates. Dolichol phosphate acts as an acceptor for the monosaccharide.

Interestingly, the relatively high enzymatic activity of female worms was found to be directly proportional to the concentration of dolichol phosphate and, therefore, it was proposed that this substrate constituted a rate-limiting factor for the dolichol phosphate mannose synthase reaction. Because maximum activity of the dolichol phosphate mannose synthase occurred only in mature females, it was concluded that at this stage of the life cycle, dolichol phosphate must be present in saturating amounts in the parasite's tissues, so as to provide an adequate supply of glycoconjugates to the active vitellaria. A model was then elaborated in which male worms, using mechanisms as yet unknown, were able to maintain a low concentration of dolichol phosphate in their own tissues. Although a down-regulating mechanism restricting dolichol phosphate biosynthesis could be operational in male worms, it is conceivable that a concentration gradient would form naturally, resulting from the greater consumption of the isoprenoid by adult females. This concentration gradient would then create a unidirectional transport of dolichol phosphate in the direction of the female parasites.

The idea that in schistosomes the rate of synthesis of dolichol phosphate mannose might be subject to control at the level of enzymatic activity does not exclude other forms of regulation. It is entirely possible that like so many other genes in *S. mansoni*, the dolichol phosphate mannose synthase itself could be differentially expressed. In this manner, sex-specific regulation of transcription of the dolichol phosphate mannose synthase would endow the worms with a more precise form of matching supply and demand for glycoconjugates.

In the present paper we have investigated this hypothesis by carrying out experiments in which *S. mansoni* dolichol phosphate mannose synthase

cDNA was amplified in mature males and females by semi-quantitative RT-PCR. To this end, *S. mansoni* dolichol phosphate mannose synthase (*SmDPMS*) was cloned and characterised by sequence analysis. The K_m of the *S. mansoni* enzyme was also determined.

2. Materials and methods

2.1. Parasites

Adult worms of *S. mansoni* were obtained by perfusion of Syrian hamsters infected 6 weeks previously with approximately 400 cercariae, as described by Smithers and Terry (Smithers and Terry, 1965). For experiments using male and female worms separately, the worm pairs were physically teased apart with a Pasteur pipette. Homogenates were prepared as described before (Tempone et al., 1999). The worms were either used immediately or stored at -70°C .

2.2. Screening of *S. mansoni* cDNA libraries

The probe used to screen *S. mansoni* cDNA libraries consisted of the human gene for dolichol phosphate mannose synthase (DPMS) and was a kind gift from Dr Peter Orlean from the University of Illinois. The probe was labelled with [α - ^{32}P] dCTP (Amersham), specific activity 220 TBq/mmol, using the random primer method ('Ready-to-Go' labelling beads, Pharmacia), according to the manufacturer's instructions. The labelled probe was separated from the unincorporated nucleotide by gel filtration chromatography using the S-400 HR microspin columns (Pharmacia). The *S. mansoni* cDNA library constructed in the lambda-ZAP vector (Stratagene), was a kind gift from Dr Phil LoVerde (State University of New York at Buffalo). The conditions used for the sequential washes were essentially those described in the Stratagene's manual.

2.3. DNA sequencing

DNA was sequenced in a Pharmacia A.L.F. sequencer based on Sanger's dideoxy dye terminator method, using Pharmacia's Auto Cycle Sequencing kit. For the sequencing reaction the primers were M13 universal and M13 reverse, flanking the multi-cloning site in pBluescript KS vector containing the *S. mansoni* clone (*Sm*-

DPMS). DNA fragments obtained after the reactions were fractionated on a 0.4-mm 6% polyacrylamide gel containing 8 M urea. Both DNA strands, sense and anti-sense were sequenced. Homology searches were carried out using the NCBI's (National Center for Biotechnology Information) BLAST network service and the GenBank databases (Altschul et al., 1997). Identity levels were calculated by means of the BESTFIT (GCG software package version 8.0, Genetics Computer Group).

2.4. Enzymatic assay

Dolichol phosphate mannose synthase assays were conducted essentially as described previously (Tempone et al., 1999). Briefly, aliquots of 0.1 ml of the total homogenate containing 1–2 mg protein were incubated in 2 ml polypropylene tubes for 2 min at 37 °C, in a 0.05 M Tris–HCl buffer pH 7.1, containing 0.05% Triton X-100, 10 mM MnCl₂, 2 mM EDTA and GDP [U-¹⁴C] mannose, 11.3 GBq/mmol (Amersham). The reaction was stopped with 1 ml of chloroform:methanol (1:1 v/v). The tubes were immediately stirred with a vortex mixer and centrifuged for 1–2 min at maximum speed (16 000×g) in an Eppendorf microcentrifuge. The upper aqueous phase was discarded and aliquots of the organic phase were collected for radioactivity counting. In order to eliminate the chloroform, the samples were evaporated to dryness under a stream of N₂ and finally desiccated in a HETO vacuum drying system. The dried samples were directly solubilized in scintillation fluid (toluene containing 0.4% diphenyloxazole (PPO) w/v, 0.01% w/v 1,4-bis-2-(5-phenyloxazolyl) benzene (POPOP). Radioactivity was counted in a Packard 1600 Tricarb Liquid Scintillation Analyzer. Negative controls consisted of homogenates that were incubated in the absence of Mn²⁺ and reactions with a previously boiled homogenate (3 min). In experiments in which exogenous dolichol phosphate (C₈₀–C₁₀₅) was added (SIGMA), the polyprenol dissolved in chloroform:methanol (2:1 v/v), was evaporated to dryness under a stream of N₂ in a polypropylene tube to which the homogenate and the other components of the reaction were subsequently added. For the determination of the K_m, the source of the enzyme was the total worm homogenate, which was kept at a constant protein concentration, as indicated in the legend of the appropriate figure.

In these determinations the reaction mixtures contained increasing concentrations of GDP [U-¹⁴C] mannose, with a 0.041–2.0 μM concentration range. In these reactions, dolichol phosphate was incubated in 20 μM saturating concentrations.

2.5. Thin layer chromatography

After the enzymatic reactions, homogenates were extracted with 1 ml of a solvent mixture consisting of chloroform:methanol (1:1 v/v), followed by 300 μl of water-saturated chloroform. The homogenates were then vortexed for 20 s and centrifuged at 10 000×g for 10 min. The organic phase was then collected and re-extracted with 400 μl water. From the organic phase, 10 μl were applied on plastic-backed silica gel plates (J.T. Baker) and developed with a solvent system consisting of chloroform:methanol:water (65:25:4 v/v/v). After the run, the gel was evaporated to dryness and small pieces were cut and counted on a liquid scintillation spectrometer.

2.6. DNA and RNA extraction

Fresh or frozen adult worms (stored at –70 °C) were ground in a mortar immersed in liquid nitrogen, and the nucleic acids were extracted according to the methods already described (Fantappiè et al., 1999). The integrity of the nucleic acids was checked by electrophoresis on a 1.2% agarose gel. DNA/RNA concentrations were estimated by measuring absorption (A₂₆₀) in a Ultrospec 3000 (Pharmacia) spectrophotometer.

2.7. Northern blot

Total RNA from male and female worms was extracted (Fantappiè et al., 1999) and 20 μg were fractionated by electrophoresis in a 1% agarose gel, taking all the necessary precautions to avoid degradation by RNase (pre-treatment of all the material with diethylpyrocarbonate). After separation, RNA was transferred overnight by capillarity to a nylon membrane (Amersham Hybond-C-extra), using a 10X sodium chloride/sodium citrate solution (SSC). After immobilisation of the RNA at 80 °C for 3 h, the membranes were pre-hybridised for 3 h at 42 °C as described before (Fantappiè et al., 1999). The *SmDPMS* probe was radioactively labelled with [α-³²P]-dCTP, 220 TBq/mmol (Amersham), as described in Section

2.2, and hybridised overnight at 42 °C. The membranes were then washed twice for 15 min at room temperature in 0.5 X SSC containing 0.1% SDS and once at 60 °C for 20 min in 0.1 X SSC containing 0.1% SDS. The membranes were then exposed to an X-ray film (Kodak X-OMAT) for 3–5 days. The position of *SmDPMS* was calculated taking as reference a 0.24–9.5 kb RNA ladder (Life Technologies).

2.8. cDNA preparation and semi-quantitative RT-PCR

First strand cDNA was prepared from total *S. mansoni* RNA and oligo dT primer using reverse transcriptase Superscript II (Gibco–BRL) according to the manufacturer's instructions. Semi-quantitative RT-PCR expression of *SmDPMS* was determined with reverse transcriptase analysis as follows: total RNA was extracted from male and female schistosomes and carefully quantified by A₂₆₀ spectrophotometry; 3.5 µg were used for the synthesis of cDNA. 1 µl of cDNA was used for the PCR reactions. Two pairs of primers were used simultaneously. Primers paramyo-1 (5' GGTGTA-ATGCAGGCTTGATATGG 3') and paramyo-2 (5' CTTACATCTTCTTTGATTCACC 3') were controls introduced to amplify a 300-bp DNA fragment of the housekeeping gene paramyosin (Laclette et al., 1991) and primers *SmDPMS*-1 (5' CTGCCCACCTACAATGAG 3') and *SmDPMS*-2 (5' CCCAGCCACTTACACCTCCG 3') specifically amplified a 382-bp sequence of the *S. mansoni* dolichol phosphate mannose synthase (*SmDPMS*). The PCR reaction volume was 75 µl. The PCR program consisted of a 94 °C/3 min denaturation step followed by 35 cycles of 94 °C /1 min, 58 °C/1 min, 72 °C /1.5 min and ending with an extension step of 72 °C/7 min. Aliquots of 15 µl were withdrawn at cycles 15, 20, 25 and 35 and the amplicons were fractionated by electrophoresis on a 2% agarose gel and visualised by staining with ethidium bromide (SIGMA). The RT-PCR assays with stage and sex-specific RNA preparations were carried out in three independent experiments.

3. Results

Tertiary screening of the *Schistosoma mansoni* cDNA library with the human dolichol phosphate mannose synthase probe yielded four positive

clones. The clone displaying the higher mass on agarose gel electrophoresis (*SmDPMS*), was selected for sequencing. The full-length sequence of clone *SmDPMS* is presented in Fig. 1a.

The 987 bp cDNA fragment included an open reading frame of 237 amino acids, starting with the initiation ATG codon at nucleotides 51 to 53 and ending with the stop codon TAA at nucleotides 712 to 714. No further data corresponding to the untranslated sequences upstream of the 5' initiation codon were obtained with the available cDNA library. However, we were satisfied with the position of the ATG initiation codon since the size of the *SmDPMS* open reading frame was similar to the overall data in the literature, specially the *S. pombe* sequence.

The deduced amino acid sequence is also presented in Fig. 1a. The molecular mass calculated for the *S. mansoni* enzyme is similar to reported values for dolichol phosphate mannose synthases from other species, which is approximately 30 kDa (Colussi et al., 1997). The sequence included two putative catalytic motifs (enclosed by the rectangles). The serine residue enclosed by the ellipse and nearest to the first catalytic motif is highly conserved and almost certainly represents a glycosylation site. The other putative glycosylation site, GTRY, also enclosed by an ellipse, is commonly found in dolichol phosphate mannose synthases. Also present was a phosphorylation motif RKLIS (underlined), typical of dolichol phosphate mannose synthases. No consensus sequence for dolichol binding was found. However, this putative motif is often absent from other reported sequences for glycosyl transferases (Kim et al., 2000) and may not have any functional relevance.

When the *S. mansoni* sequence was entered in the databank, extensive homology with several dolichol phosphate mannose synthases from different species was observed. The results are summarised in Fig. 1b. The highest amino acid identities (65%) occurred with *C. griseus* and *S. pombe*. The similarity indices of *SmDPMS* for both species were 82% and 83%, respectively. Mouse and human sequences also displayed a high degree of homology with *SmDPMS*.

In order to include a functional parameter for comparative purposes, Michaelis–Menten analysis of the GDP-mannose at saturating concentrations of dolichol phosphate was carried out in total homogenates of *S. mansoni*. The results shown in Fig. 2 revealed an apparent K_m of 0.127 µM, a

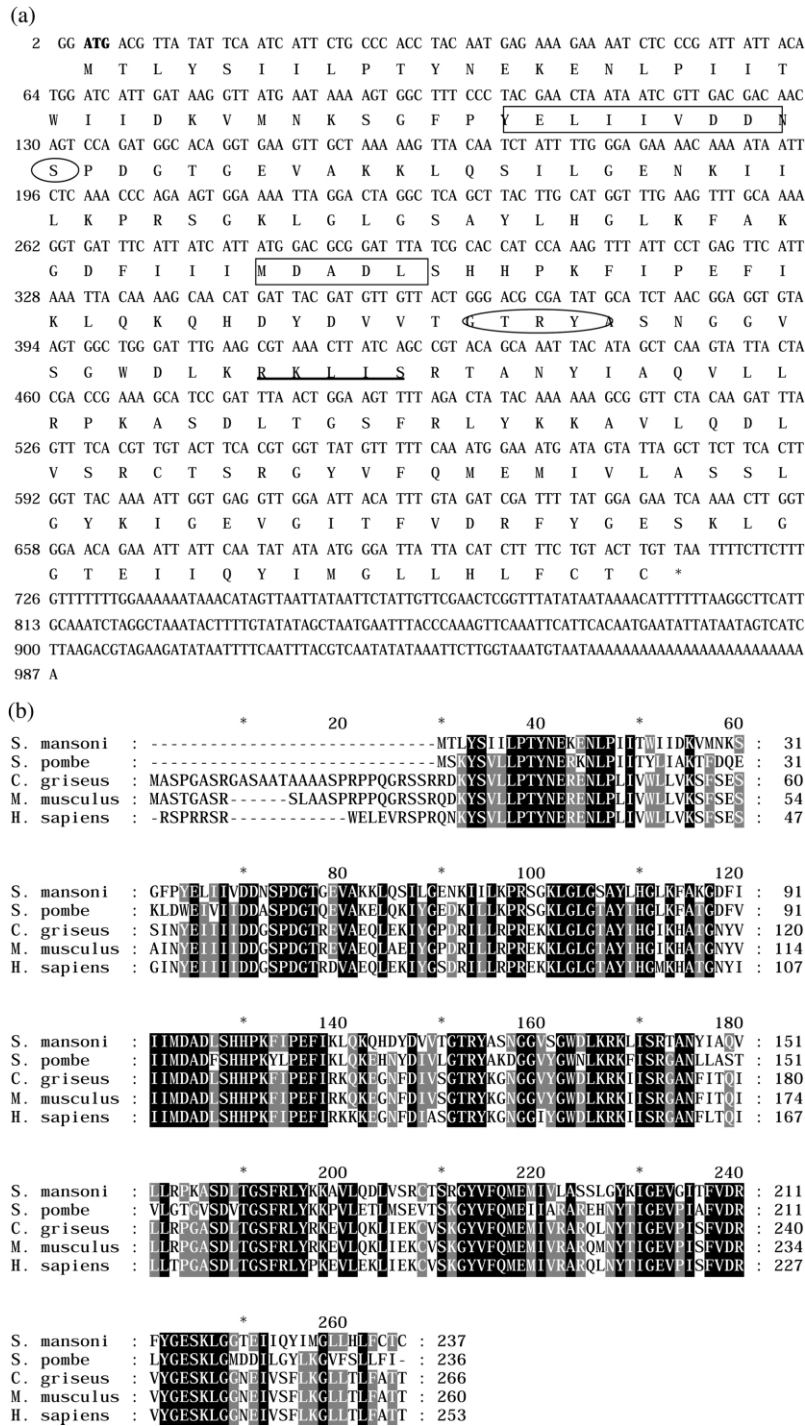


Fig. 1. (a) Nucleotide and deduced amino acid sequence of *SmDPMS*. On each row, the figures on the left indicate the nucleotide number. Amino acids are shown in the one letter code. The initiation codon is in bold and the stop codon is indicated by an asterisk. The boxes enclose catalytic sites typical of β glycosyl transferases. The sequences enclosed by ellipses represent putative glycosylation sites and the putative phosphorylation site is underlined. (b) Alignment of the amino acid sequence of *SmDPMS* with sequences obtained from *Cricetulus griseus*, *Saccharomyces pombe*, *Mus musculus* and *Homo sapiens*. The spaces filled in black indicate 100% identity. The grey spaces indicate 80% identity between the sequences aligned.

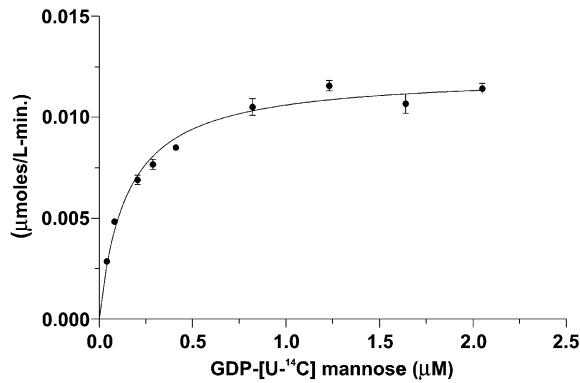


Fig. 2. Michaelis–Menten analysis of the *S. mansoni* dolichol phosphate mannosyl transferase. The plot was obtained by incubating increasing concentrations of GDP ¹⁴C-mannose with homogenates of mixed populations of the adult worms, and maintaining a saturating concentration of dolichol phosphate (20 μg) per reaction, as described in materials and methods.

value that suggests a relatively high affinity for the sugar dinucleotide substrate. For most species investigated, the apparent K_m for dolichol phosphate was approximately 20 μM. Therefore, in our experiments, dolichol phosphate was added in a final saturating concentration of 20 μM.

Values for the apparent K_m for GDP-mannose reported in the literature vary widely. The schistosome enzyme has a K_m closer to *C. albicans* (0.36 μM), porcine aorta (0.4 μM), and rat liver microsomes (0.69 μM) (Arroyo-Flores et al., 1995; Heifetz and Elbein, 1977; Jensen and

Schutzbach, 1985). In contrast, human dolichol phosphate mannosyl transferase have a K_m for GDP-mannose of 6 ± 2 μM (Kim et al., 2000).

For the sake of validation of the kinetic data above, it was important to establish whether in *S. mansoni* the lipid intermediate was in fact dolichol phosphate. With this in mind, an experiment was carried out in which the R_f of the mannosyl lipid synthesised in the presence, or absence of added dolichol phosphate was compared. The results in Fig. 3 show that when exogenous dolichol phosphate C₈₀–C₁₀₅ was the source of the lipid intermediate, a major labelled peak was produced, which on thin layer chromatography co-migrated with the labelled mannosyl lipid formed with endogenous lipid intermediate alone. In addition to previous kinetics evidence (Tempone et al., 1999), this result strongly suggested that in *S. mansoni* the lipid acceptor for the sugar nucleotides was indeed dolichol phosphate.

Earlier results (Tempone et al., 1999) have shown that adult female schistosomes displayed a higher activity of the dolichol phosphate mannosyl transferase when compared to adult males. These results prompted us to carry out experiments aimed at determining whether differential expression of *SmDPMS* gene occurred in schistosomes. Therefore, a Northern blot was carried out using a probe consisting of the excised *SmDPMS* gene itself. The results are shown in Fig. 4.

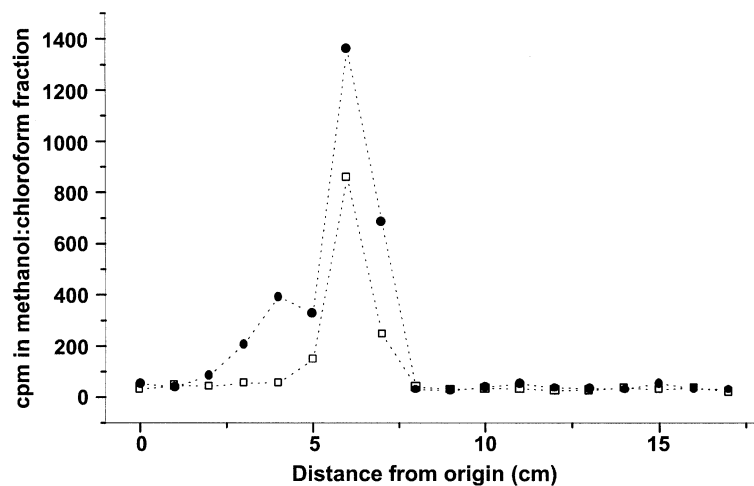


Fig. 3. Thin layer chromatography fractionation of endogenous and exogenous mannosyl lipid of *S. mansoni*. Homogenates of *S. mansoni* were incubated for the mannosyl transferase assay in the presence (---●---) or absence (---□---) of commercial dolichol phosphate C₈₀–C₁₀₅. After the reaction the products were fractionated and radioactivity measured as described in materials and methods.

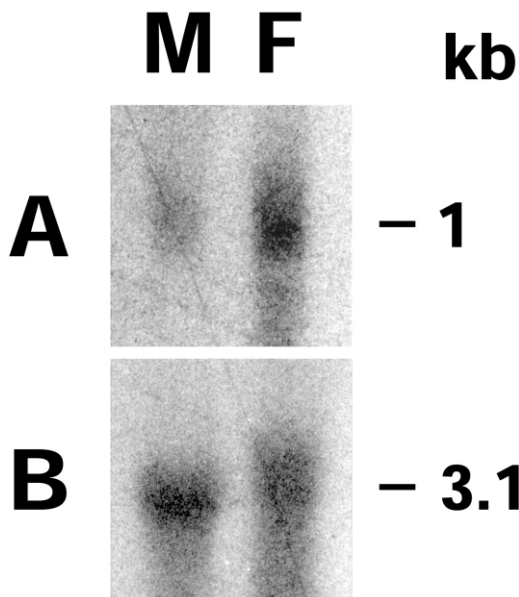


Fig. 4. Northern blot analysis of *SmDPMS*. The membrane contained 20 μ g of total RNA extracted from adult worms as described in methods. This was then hybridised with 32 P probes, consisting of *SmDPMS* (A) and paramyosin (B). Lanes marked F and M contained RNA from adult female and male worms, respectively. The molecular masses of *SmDPMS* mRNA and of paramyosin were 1 and 3.1 kb, respectively, and were calculated using standards consisting of a 0.24–9.5 kb RNA ladder.

When the blot in Fig. 4, containing male and female RNA, was hybridized with the *SmDPMS* probe, a single band with a size corresponding to 1 kb was apparent. The value for mass was obtained either directly, by graphic plotting against the RNA ladder standard, or by fitting the *Sm*-

DPMS Rf value in a logarithmic plot. This result is in very good agreement with the expected RNA size (987 bp) derived from the sequence data shown in Fig. 1a.

The blot also showed that in the adult female RNA preparation, there was more binding of the probe, indicating a higher level of expression of this gene. In contrast, when the housekeeping paramyosin gene probe was hybridised to the same membrane, a pattern of equal intensities in the male and female RNA preparations was revealed. Independent experiments using different RNA preparations, showed that the results in Fig. 4 were reproducible.

In order to confirm the results in Fig. 4 using another approach, semi-quantitative RT-PCR was carried out. The primers were derived from the *SmDPMS* sequence shown in Fig. 1a and from the paramyosin gene. The results are presented in Fig. 5. In this experiment, the identities of both amplimers, *SmDPMS* and of paramyosin, were confirmed by DNA sequencing.

The results in Fig. 5 (top) showed that with adult female cDNA, there was a noticeable amplification of the predicted amplicon of *SmDPMS* beginning at cycle 20 (MF in Fig. 5), whereas at cycle 20 in the male preparation (MM), there was hardly any amplification of *SmDPMS*. In contrast, in both preparations, the amplification of paramyosin was directly proportional to the cycle number. Consistently, immature female worms did not express *SmDPMS* to the same extent as the adult females. The results in Fig. 5 (bottom) with immature female cDNA, showed typically, that amplification of *SmDPMS* could only be detected

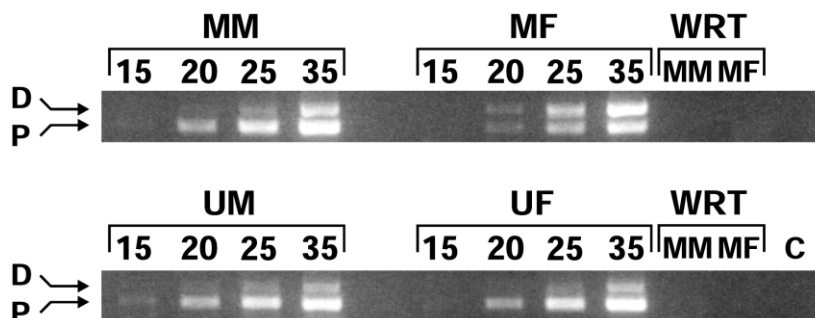


Fig. 5. Semi-quantitative RT-PCR of samples from different stages of *S. mansoni*. Top: lanes marked MM represent PCR carried out with cDNA samples from mature male schistosomes and MF, mature female worms. Samples were collected at cycles 15, 20, 25 and 35, respectively. Lanes marked WRT are controls without reverse transcriptase. Bottom: UM and UF correspond to cDNA from unisexual male worms and unisexual female worms, respectively. The arrows indicate the position of amplified *SmDPMS* (D) and paramyosin (P) sequences. The lane marked C is a negative control in which the DNA template was omitted.

at cycle 25, mimicking the pattern observed for mature and immature males. The interpretation of the results in Fig. 5, namely that mature females express *SmdPMS* at a higher rate than paramyosin, relied also on the preliminary quantification of the RNA used as a template for the reverse transcriptase reaction. Notwithstanding, Fig. 5 also shows clearly that male preparations contained more cDNA than the female extracts, and yet in the mature female preparation, the band corresponding to *SmdPMS* was already visible at cycle 20, whereas it was barely discernible at the same cycle with male RNA. Several independent experiments produced identical patterns, thus confirming the higher expression of *SmdPMS* in mature female schistosomes.

4. Discussion

Dolichol phosphate glycosyl synthases are enzymes widely distributed in nature and their ubiquity reflects the importance of glycoconjugate biosynthesis for all species considered, even those far apart in the evolutionary scale. Although not much is known about glycoconjugate biosynthesis in *S. mansoni*, one could infer that glycoproteins, glycolipids, polysaccharides and maybe even GPI anchors, all probably follow the same biochemical pathway, namely, mannose → GDP-mannose → dolichol phosphate-mannose → glycoconjugate. Indeed, the results in the present work have shown that not only the gene encoding the schistosome dolichol phosphate mannose synthase is homologous to sequences available in the data banks, but also that the lipid intermediate is identical to dolichol phosphate. Thus, these initial findings suggest that *S. mansoni* contain the typical elements of the glycosyl transferase systems.

Curiously, structural similarity of the gene did not mean comparable kinetic properties. In spite of the relatively high homology between the of *S. mansoni* and human sequences, the apparent K_m for GDP-mannose of 0.127 μM determined for *S. mansoni* was closer to *C. albicans*, and rat liver (Arroyo-Flores et al., 1995; Heifetz and Elbein, 1977), as compared to $6 \pm 2 \mu\text{M}$, the K_m of human DPM1 for GDP-mannose (Kim et al., 2000). The high affinity displayed by the schistosome enzyme might have been evolutionary selected to ensure that the worms would be able to synthesise their glycoconjugates even in an environment surrounded by host tissues actively incorporating blood

glucose and/or other monosaccharides. One must keep in mind that the dietary carbohydrate supplements present in the mesenteric veins of the host will be mostly glucose. Presumably this glucose is interconverted into mannose along the parasite's own metabolic routes, thus establishing a GDP-mannose concentration gradient compatible with the K_m encountered for the schistosome dolichol phosphate mannose synthase.

It would be interesting to compare the K_m of the recombinant and native enzymes. However, preliminary attempts to assay the enzymatic activity of the recombinant *SmdPMS* fusion protein have failed (results not shown).

Both the Northern blot results shown in Fig. 4 and the semi-quantitative RT-PCR analysis in Fig. 5, reproducibly showed a higher level of expression *SmdPMS* in adult female schistosomes. This result reinforced earlier observations (Tempone et al., 1999).

It is not surprising that the intense metabolic activity associated to oogenesis, with its underlying recruitment of all biosynthetic pathways, would be reflected as well in the increased activity of the schistosome dolichol phosphate mannose synthase. However, the observation of a higher expression of dolichol phosphate mannose synthase in mature females was interesting by taking into account the previous results reported by our group (Tempone et al., 1999). These results showed that exogenous dolichol phosphate could act as a rate-limiting factor in the dolichol phosphate mannose synthase activity and, therefore, the initial model assumed that the parasites controlled enzymatic activity through an uneven distribution of the phosphorylated isoprenoid between the two sexes. Such a model was compelling because dolichol phosphate is a central donor of activated mannose for several glycosylation pathways. Nevertheless, the sex-specific differential expression observed in the present work only adds to the general idea that in mature females there are mechanisms of positive reinforcement for the glycosylation pathways.

Besides a direct participation on the biosynthesis of structural glycoconjugates, a novel role for glycosyl transferases as modulators of morphogenesis has been recently proposed (Brückner et al., 2000). In the developing *Drosophila*, cellular signalling responses were shown to be mediated by a glycosyl transferase that catalyses the addition of *N*-acetylglucosamine to fucose. Thus, in schistosomes, a similar role for glycosyl transferases

might be assigned within the context of the developing miracidium. The increased dolichol phosphate mannose synthase activity observed in adult females might in fact represent the sum total of both activities; that produced by a greater supply of dolichol phosphate and that due to enhanced gene expression. Direct substrate-dependent regulation of enzyme activity may be associated to the synthesis of structural glycoconjugates, whereas the finer tuning represented by the expressed gene would be linked to morphogenesis.

At any rate, redundancy of regulatory mechanisms is a recurring theme in cellular biology, especially when central pathways are concerned. Differential expression would, thus, ensure that the cells of the female vitellarium, supporting the intense biosynthesis associated with oogenesis and egg laying, would not lack glycoconjugates.

At present there are no clues as to what factors could be involved in the regulation of transcription of *SmDPMS*. On the other hand, it is known that steroids have a profound effect on hen oviduct function. Absence of steroids provokes involution of the organ, which is restored to normal following the addition of oestrogens. Return of the oviduct to normal function is accompanied by a substantial increase in mannosyl concentration and glycosyl transferase activity (Singh and Lucas, 1981). Whilst the effect of oestrogen on glycosyl transferase activity could be related to de novo dolichol and dolichol phosphate synthesis, a direct effect on transcription remains a possibility. In *S. mansoni* many indirect evidence link maturation of females to steroid action and it has been proposed that the male worms may have a role in promoting and maintaining oogenesis in mature females, through the secretion of steroid or steroid-like hormones (de Mendonça et al., 2000). Thus, it is conceivable that the differential expression of *SmDPMS* could be under the direct control of such effectors. Alternatively, dolichol phosphate itself may have a role in directly activating the transcription of *SmDPMS*, in a manner analogous to the glucose effect on the expression of LDH in *S. mansoni* (Rodrigues V and Guerra Sá, personal communication).

These and other questions are currently being addressed through experiments involving the expression of *SmDPMS*, aiming at kinetic studies carried out with the recombinant product.

Acknowledgments

The authors wish to acknowledge the financial support of FINEP, CNPq, CAPES and CNPq/PRONEX and the excellent technical help of Maria Marta Freire. The kind gift of the monoclonal anti-GST antibody, by Dr Sandra Estarzulias Farias from the Centro de Biotecnologia, UFRGS, is also acknowledged.

References

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* 25, 3389–3402.
- Arroyo-Flores, B., Calvo-Mendez, C., Flores-Carreón, A., Lopez-Romero, E., 1995. Biosynthesis of glycoproteins in *Candida albicans*: activity of dolichol phosphate mannose synthase and protein mannosylation in a mixed membrane fraction. *Microbiology* 141, 2289–2294.
- Blanton, R.E., Licate, L.S., 1992. Developmental regulation of protein synthesis in schistosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 51, 201–208.
- Bostic, J.R., Strand, M., 1996. Molecular cloning of a *Schistosoma mansoni* protein expressed in the gynecophoral canal of male worms. *Mol. Biochem. Parasitol.* 79, 79–89.
- Braga, V.M.M., Tavares, C.A.P., Rumjanek, F.D., 1989. Protein characterization of sexually mature and immature forms of *Schistosoma mansoni*. *Comp. Biochem. Physiol.* 94B, 427–433.
- Brückner, K., Perez, L., Clausen, H., Cohen, S., 2000. Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch-Delta interactions. *Nature* 406, 411–415.
- Colussi, P.A., Taron, C.H., Orlean, P., 1997. Human and *Saccharomyces cerevisiae* dolichol phosphate mannose synthases represent two classes of the enzyme, but both function in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 22, 7873–7878.
- Cornford, E.M., Fitzpatrick, A.M., 1992. Glucose-induced modulation of nutrient influx in *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 78, 266–270.
- de Mendonça, R.L., Escrava, H., Bouton, D., Laudet, V., Pierce, R.J., 2000. Hormones and nuclear receptors in schistosome development. *Parasitol. Today* 16, 233–240.
- Engelender, S., Giannini, A.L., Rumjanek, F.D., 1993. Protein interactions with a gender-specific gene of *Schistosoma mansoni*: characterization by DNase I footprinting, band shift and UV cross-linking. *Mol. Cell. Biochem.* 124, 159–168.
- Fantappiè, M.R., Galina, A., de Mendonça, R.L., Furtado, D.R., Secor, W.E., Colley, D.G., et al., 1999. Molecular characterisation of a NADH ubiquinone oxidoreductase subunit 5 from *Schistosoma mansoni* and inhibition of mitochondrial respiratory chain function by testosterone. *Mol. Cell. Biochem.* 202, 149–158.
- Giannini, A.L., Linhares, S.V., Braga, V.M.M., Caride, E.C., Rumjanek, F.D., 1995. Aspects of female *S. mansoni* maturation. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 90, 179–184.

- Heifetz, A., Elbein, A.D., 1977. Solubilization and properties of mannose and *N*-acetylglucosamine transferases involved in the formation of polyprenyl-sugar intermediates. *J. Biol. Chem.* 252, 3057–3063.
- Jensen, J.W., Schutzbach, J.S., 1985. Activation of dolychylphospho-mannose synthase by phospholipids. *Eur. J. Biochem.* 153, 41–48.
- Kim, S., Westphal, V., Srikrishna, G., Mehta, D.P., Peterson, S., Filiano, J., et al., 2000. Dolichol phosphate mannose synthase (DPM1) mutations define congenital disorder of glycosylation Ie (CDG-Ie). *J. Clin. Invest.* 105, 191–198.
- Laclette, J.P., Landa, A., Arcos, L., Willms, K., Davis, A.E., Shoemaker, C.B., 1991. Paramyosin is the *Schistosoma mansoni* (Trematoda) homologue of antigen B from *Taenia solium* (Cestoda). *Mol. Biochem. Parasitol.* 44, 287–296.
- Nakazawa, M., Fantappiè, M.R., Freeman, G.L., Eloi-Santos, S., Olsen, N.J., Kovacs, W.J., et al., 1997. *Schistosoma mansoni*: susceptibility differences between male and female mice can be mediated by testosterone during early infection. *Exp. Parasitol.* 85, 233–240.
- Schussler, P., Grevelding, C.G., Kunz, W., 1997. Identification of Ras, MAP kinases and a GAP protein in *Schistosoma mansoni* by immunoblotting and their putative involvement in male–female interaction. *Parasitology* 115, 629–634.
- Singh, B.N., Lucas, J.J., 1981. Increased transfer of oligosaccharide from oligosaccharide phosphoryl dolichol to protein acceptors upon estrogen-induced chicken oviduct differentiation. *J. Biol. Chem.* 256, 12018–12022.
- Smithers, S.R., Terry, R.J., 1965. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of adult worms. *Parasitology* 55, 695–700.
- Tempone, A.J., Afonso, A.O., Nascimento, D., Rumjanek, F.D., 1999. Dolichol phosphate is a rate-limiting factor in mannosyl transferase activity of adult male worms of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Cell. Biochem.* 198, 187–191.

ANEXO V – TRABALHO PUBLICADO EM PERIÓDICO DE CIRCULAÇÃO INTERNACIONAL

FANTAPPIÉ, M. R.; GALINA, A.; DE MENDONÇA, R. L.; FURTADO, D. R.; SECOR, W. E.; COLLEY, D. G.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; FREEMAN, G.; TEMPONE, A. J.; LANNES DE CAMARGO, L.; RUMJANEK, F. D. Molecular characterisation of a NADH ubiquinone oxidoreductase subunit 5 from *Schistosoma mansoni* and inhibition of mitochondrial respiratory chain function by testosterone. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 202, n. 1-2, p. 149-158, Dec., 1999.

Molecular characterisation of a NADH ubiquinone oxidoreductase subunit 5 from *Schistosoma mansoni* and inhibition of mitochondrial respiratory chain function by testosterone

Marcelo Rosado Fantappié,¹ Antônio Galina,¹ Ricardo Luís de Mendonça,² Daniel Rodrigues Furtado,¹ W. Evan Secor,³ Daniel G. Colley,³ Rodrigo Corrêa-Oliveira,⁴ George Freeman Jr,³ Antônio Jorge Tempone,¹ Lia Lannes de Camargo¹ and Franklin David Rumjanek¹

¹Departamento de Bioquímica Médica ICB/CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro-Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, Brasil; ²Centre D'Immunologie et de Biologie Parasitaire, INSERM U167, Institut Pasteur de Lille, France; ³Division of Parasitic Diseases, National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta GA, USA; ⁴Centro de Pesquisas René Rachou-Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz-Avenue, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

Received 12 April 1999; accepted 8 July 1999

Abstract

Complementary DNA, encoding the mitochondrial enzyme NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit 5 (*SmND5*) of the human parasite *Schistosoma mansoni* was isolated by screening a *S. mansoni* cDNA library with a human androgen receptor (hAR) cDNA probe. The complete nucleotide and deduced aminoacid sequences of *SmND5* were determined. Southern blot analysis revealed the occurrence of a single copy gene for *SmND5* and by means of RT-PCR, it was shown that sex- and stage-specific expression of *SmND5* occurred. In order to establish a functional relationship between the mitochondrial enzyme and the androgen receptor, the effects of testosterone were compared to those of classical respiratory chain inhibitors, using adult schistosome and beef heart submitochondrial particles. Physiological concentrations of testosterone were able to inhibit the maintenance of proton gradient across the mitochondrial membranes, as well as ATP synthesis. The steroid was found to be cytotoxic to the larvae, but not to adult schistosomes. A model is proposed to explain the observed *in vivo* testosterone-related differences in worm burdens, in experimental chronic infections. (Mol Cell Biochem **202**: 149–158, 1999)

Key words: NADH Q oxidoreductase, *S. mansoni*, testosterone, mitochondria

Address for offprints: F.D. Rumjanek, Departamento de Bioquímica Médica, ICB/CCS Bloco E-sala 22, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, CEP 21941-590, Rio de Janeiro, Brasil

Present address: M.R. Fantappié, State University of New York, School of Medicine and Biomedical Sciences, 3435 Main Street, Buffalo, NY 14214-3009, USA

Introduction

Schistosomiasis is the second major parasitic disease in the world, affecting approximately 300 million individuals in tropical and subtropical areas. Its causative agent, the digenetic trematode *Schistosoma mansoni*, lives for many years in the portal mesenteric veins of the host, in direct contact with the blood. Because of its intravascular location, adult *Schistosoma mansoni* homeostasis is largely dictated by the extracellular milieu in the blood. Thus, besides adjusting to the plasma pH and osmolarity, the schistosomes obtain part of their nutrients through trans-tegumental transport and incorporate not only small molecules such as glucose and aminoacids, but also several macromolecules [1–3]. Furthermore, schistosomes ingest whole blood red cells, which are digested in the gut and which constitute the worms main source of proteins.

If on one hand the survival and development of the parasites is supported by these nutrients, on the other, the schistosomes are also targets for potentially harmful host components present in the circulation. These include the effectors of the immune system and circulating hormones.

A point in case is the recently reported cytotoxic effect of testosterone on schistosomes [4, 5]. These experiments showed that during the early stages of the infection, testosterone pellets implanted on female mice consistently decreased the worm burden in these animals to levels comparable to those observed in male hosts. Since in this case, non-specific effects of testosterone on the immune system, or for that matter, on any other systemic parameters of the host were ruled out [5], it was concluded that testosterone was interacting directly with the parasites. Thus, if schistosomes were to comply with the canonical model described for steroids, one could predict that the parasites would express cognate protein receptors and that the complex receptor-ligand would then inhibit some developmental pathway through interaction with hormone regulatory elements, usually located on upstream sequences of responsive genes [6].

Following this rationale, it became important to investigate if schistosomes contained either a typical androgen receptor, a testosterone binding protein, or whether the cytotoxic effects of testosterone on the parasites could be brought about by the free ligand alone. By the same token, information about the actual mode of action of testosterone on the schistosomes also became directly relevant. The present paper describes our efforts to characterise the putative testosterone ligand and to dissect the underlying biochemical mechanism involved in the testosterone-mediated cytotoxicity.

Materials and methods

Parasites

Seven-week-old adult schistosomes were obtained after perfusion of Syrian hamsters as described previously [7]. Schistosomula were obtained from mechanically transformed cercariae according to the method of Ramalho-Pinto *et al.* [8]. In these preparations, cercariae are transformed and incubated in medium for 3 h to allow for glycoalyx shedding. The time starting after the 3 h incubation is then considered as 'age' 0.

Isolation of cDNA clones

The probe used for the screening of a *S. mansoni* cDNA library was a kind gift by Dr. Elizabeth Wilson from the University of North Carolina, USA. This probe contained part of the human androgen receptor (hAR). 700.000 pfu of an adult schistosome cDNA λ ZAP II library (Stratagene), obtained from Dr. Kathy Hancock, CDC, Atlanta, USA by Dr. Phillip Lo Verde, State University of New York at Buffalo, USA was screened with the human androgen receptor. The probe was hybridised according to Sambrook *et al.* [9] at 42°C, in the presence of 45% formamide and dextran sulfate.

DNA sequencing

After screening, positive colonies were plaque purified, excised into pBluescript II SK(+) phagemid (Stratagene). Inserts obtained by the cDNA screening were sequenced with the Dye Terminator Ready Reaction mix (Perkin Elmer) using 200 ng of DNA and 3.2 pmol of each forward and reverse universal primers in a Perkin Elmer ABI PRISM 310 sequencer. The nucleotide sequence was recorded with the PC/Gene software (Intelligenetics). Homology searches were done using the NCBI (National Centre for Biotechnology Information), using the Swissprot, GenBank databases and the BLAST network service and by FASTA method [9]. Identity levels were calculated by means of the BESTFIT (GCG software package version 8.0, Genetics Computer Group).

DNA and RNA extraction

Genomic DNA was extracted by incubating homogenised adult worms in 10 vol of a solution containing 100 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl and 100 μ g/ml of proteinase K for 5 h at 50°C. Proteins were extracted once each with phenol, phenol:chloroform and

chloroform. The aqueous phase was treated with DNase-free RNase (1 µg/µl) (GIBCO-BRL) and precipitated with ethanol. Plasmid DNA was purified using the Wizard *Plus* Minipreps DNA purification System (Promega). Phage purification was carried out using the Wizard Lambda Preps DNA purification System (Promega). Total RNA from adult worms, cercariae and schistosomula was isolated using the TRIZOL Reagent (Life Technologies) following the manufacturer's recommendations.

Southern, Northern and dot-blot analysis

Southern blotting was carried out using Hybond N+ nylon membranes (Amersham). Five µg of digested DNA were electrophoresed on a 0.7% agarose gel. For Northern blotting, we used nitrocellulose membranes (Schleicher and Schuell). Thirty micrograms of total RNA were electrophoresed on a 1.3% agarose gel containing formamide. Both procedures were carried out according to Sambrook *et al.* [10]. Hybridisations were carried out in the presence of 45% formamide and dextran sulphate at 42°C. Membranes were washed twice in 2X SSC/0.1% SDS at room temperature and once in 0.5X SSC/0.1% SDS at 52°C and finally once in 0.1X SSC/0.1% SDS at 68°C. The *SmND5* was used as probe and was labelled using the Prime-a-gene labelling system (Promega) following the supplier's protocol.

Dot blot analysis was carried out by adding different amounts of DNA to a Hybond nylon membrane (Amersham). DNA (spotted in 10 µL aliquots) was immobilised by incubating the membrane at 80°C/2h. The probe consisting of ³²P hAR, was hybridised to the immobilised DNA under the same low stringency conditions used for the screening of cDNA libraries (42°C overnight) and washed as follows: 1X for 20 min in 2X SSC, 0.1% SDS at room temperature; 2X 10 min each in 1X SSC, 0.1% SDS at 50°C.

Semi-quantitative RT-PCR

RNA from all samples were subjected to DNase treatment (PCR amplification grade RNAase – Life Technologies) for 30 min at room temperature. DNase was inactivated with EDTA 2.5 mM at 65°C for 10 min. First strand cDNA from cercariae, schistosomula, male and female adult worms were synthesised using the SuperScript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (Life Technologies) and an oligo dT primer. The PCR was performed using 10 ng of cDNA templates in a 30 µl reaction containing: 1 × reaction buffer (Pharmacia), 250 µM of each dNTPs, 0.2 µCi of α-dCTP³² (Amersham), 1.5 mM MgCl₂ 5 units

of *Taq* DNA polymerase (Pharmacia) and 25 pmol of each primer. To amplify a product of 800 bp from the *S. mansoni* NADH-Q-oxidoreductase gene, we used the following oligonucleotides (Genset oligos): 5'-GCC-TTATCTACTTGTAGTAA-3' (sense) and 5'-AACCCA-TGTATCAACCCAAC-3' (anti sense). The paramyosin housekeeping-positive control gene was amplified using the following primers: 5'-CGTCTTCGTGAAGCAGCTGA-3' (sense) and 5'-AGAAGCTTGTTTAGCATTAA-3' (anti sense). The cycling program was as follows: first 35 cycles at 94°C for 1 min, at 55°C for 1 min, and at 72°C for 1.5 min, and the final cycle step was 72°C for 5 min. For the quantitative analysis, aliquots of 10 µl were taken at cycles 7, 15, 25 and 35.

Mitochondria and submitochondrial particles (SMP) from beef heart and S. mansoni

The tissues from both species were treated in the same way. Tissues were homogenised in a teflon homogeniser at 4°C in a 0.25 M sucrose solution buffered to pH 7.4 with 5 mM Tris-HCl. The P3 fraction [11], enriched in mitochondria, was either frozen at -70°C until used, or further processed in order to obtain SMP. This was achieved essentially as described elsewhere [12].

Proton uptake

The accumulation of protons inside the vesicles was determined by measuring the fluorescence quenching of 9-amino-6-chloro-2-methoxyacridine (ACMA) with an Hitachi F-3010 fluorimeter with excitation and emission wavelengths of 415 nm and 485 nm, respectively [13].

ATP synthesis

Phosphorylation of ADP by ³²P_i was determined according to methods already described [14].

In vitro incubation of parasites

Live adult worms and schistosomula were incubated with a range of concentrations of water-soluble testosterone (SIGMA) dissolved in Modified Eagles media with high glucose (GIBCO) containing 10% foetal bovine serum, during up to 72 h at 37°C in a CO₂ incubator. The parasites were incubated in flat-bottomed 96 well tissue culture plates. Control experiments containing 1–30 µM of 17β

estradiol (SIGMA) and cholesterol, or the hydroxypropyl- β -cyclodextrin carrier alone in the culture media, were also included. Viability of the schistosomula was assessed with 10 μ g/ml fluorescein diacetate (SIGMA), by visual scoring of fluorescence intensity using a fluorescence microscope. For adult schistosomes, pairs were incubated as above and then assessed for motility under standard light microscopy.

Results

Screening of the cDNA library with the human androgen receptor probe yielded two positive clones. The full-length sequence of, clone *SmND5*, is presented in Fig. 1, along with the deduced aminoacid sequence. The second clone also displayed homology to NADH Q dehydrogenases.

The 1692 bp cDNA included an open reading frame of 390 aminoacids, beginning with the initiation codon ATG at nucleotide 17 and ending with the TAG termination codon at position 1189. The sequence also included a putative polyadenylation signal (ATAAAA) 18 nucleotides upstream from the start of the poly (A) tail.

When this sequence was entered in the data bank, the 1.7 kb clone displayed extensive homology with chain 5 of several NADH Q dehydrogenase from different species. The result of this comparison is shown in Fig. 2. The highest score occurred with the *Apis mellifera* enzyme. The domain NDIKQSI, starting at aminoacid residue 350 in Fig. 2, is specifically mentioned, since it contains the conserved functional motif **DI**, which is actually the binding site for the coenzyme NADH.

The results in Fig. 2 raised the question as to why a human androgen receptor would select a clone encoding a mitochondrial enzyme. This question was addressed by comparing the full length nucleotide sequence of the human androgen receptor gene with that of the 1.7 kb NADH ubiquinone oxidoreductase, using the optimal alignments in linear space. The comparison revealed a 30% identity, a value which could in fact be considered conservative, since the probe used for screening the *S. mansoni* cDNA library, was a construct of the hAR gene, containing only the DNA binding domain, the ligand binding domain and a short linker sequence. Such degree of homology, together with a G + C content of 36.6% at the paired regions, would explain satisfactorily why, under the stringency conditions used in this work, the oxidoreductase clone was selected by the probe. In this context, it is worth mentioning that some identity between the deduced aminoacid sequence of the androgen receptor and that of *SmND5*, was detected. The frequency of homology became maximised towards the C-terminal end of *SmND5* (between residues 290 and 320), a feature which

is compatible with the fact that in almost all steroid receptors, the amino acids constituting the ligand binding domain are indeed found in this region [15, 16]. At any rate, chimeras such as the one invoked are commonplace in nature, a phenomenon generally known as gene sharing [17].

In order to determine whether such homology could be detected experimentally, the hAR probe was hybridised against the 800 bp fragment of the NADH Q oxidoreductase gene, using the same stringency as that for the screening of the *S. mansoni* cDNA library. The results are shown in Fig. 3.

It can be seen that whereas hAR hybridised against the oxidoreductase clone and against itself, there was no detectable hybridisation to a human gene encoding for dolichol phosphate-dependent dolichol phosphate manose synthase (DPM1) [18]. There was a very faint radioactive spot with the PKS bluescript vector (Stratagene) DNA, but only at the highest DNA concentration. These results showed conclusively that there was indeed sufficient homology between the hAR probe and the mitochondrial enzyme, to explain the results obtained with the screening of the *S. mansoni* cDNA library.

Following the serendipitous selection of a clone encoding a mitochondrial enzyme, using an androgen receptor probe, it became important to demonstrate a link between testosterone and mitochondrial function. The results in Fig. 4 show the effects of rotenone and testosterone, respectively, on proton transport across membranes of beef heart SMP, as revealed by fluorescence quenching of ACMA. Fig. 4A, shows that 3 μ M rotenone (included as a control), was able to completely inhibit NADH-dependent proton pumping. Total inhibition of H^+ membrane potential by rotenone was confirmed by the observation that FCCP added after rotenone, did not alter the pattern of fluorescence intensity. Figure 4B shows that adding of 30 μ M testosterone to the SMP produced over 65% inhibition of the H^+ proton pumping. Subsequent addition of rotenone abolished the residual H^+ pumping to the end-point. On the other hand, succinate was able to promote partial quenching of ACMA-induced fluorescence, suggesting that testosterone was still exerting its inhibitory effect on site II. Such an interpretation was supported by the results shown in Fig. 4C. In this experiment, inhibition of the succinate-induced fluorescence quenching by testosterone was less pronounced, than the steroid effect on site I (Fig. 4B). Interestingly, upon further addition of NADH, the rate of fluorescence quenching was reduced (compare B to C in Fig. 4), which suggested a sustained inhibitory effect of testosterone on H^+ pumping. Control experiments carried out with either 17- β estradiol (1–30 μ M) or cholesterol, did not affect the quenching of fluorescence. Likewise, ethanol and propionic acid (the solvents used to dissolve testosterone)


```

1  GTAGATTGTATTTTTAATGTTGATAGGTGTAGTTTTATTGTCGTTAATTTTTATTCTTTC      60
      M L I G V V L L S L I F I L S
61  AGTGTTAGTATTTTCAGGGTGGTGTGGTTAGATACAGTTGGGTAGGGCTTATCTTTTTTT      120
      V L V F Q G G V V S Y S L G S A Y L F F
121 CGGGGATATAAGGTTGCATTTTTCTAGTGAATTAGTAGTAGAATGCTTTTGATGCTTTT      180
      G D I S L H F S S G I S S S M L L M L L
181 ATGTTGCAGGATACTTTCTTTGTGTTATGCTTTTCATTATTTGGATGAGTATAGATATGG      240
      C C S I L S L C Y A F H Y L D E Y S Y G
241 AAAGATTTAGCTGTGAGGATGTTTATGTTTAGTACTGTGATGGTAGTTCTTGTATGAG      300
      K I L A V S M F M F S T V M V V L V L S
301 TTATGAGGTAGTCTCGACTCTTATATATGAGAATATCTTGGGTAGTTAGTTTTTTGCT      360
      Y E V V S T L I L W E Y L G L V S F L L
361 AATATTGTATTATGGGGTGTGGAGGTGTATCGGGGTGGAGTAGTGACTTTAGTTTTGTC      420
      I L Y Y G V W S C Y R G G V V T L V L S
421 TTGGTTTTGGTGTAGTGTAGCTTTATTCTTTTGTAGCATTTTATATAACTGGGAGCGGAG      480
      W F G D V A L F F L L A F Y I T G S G S
481 TTCCTGTTTAGTTTTCGTTGTGTATATTATTAGTGGTAGCTACTAAGAGGGCTCTGTTTCC      540
      S C L V S L C I L L V V A T K S A L F P
541 TTTTTCGAGTTGATTATTAGAGGCAATGCGTGCTCCCACTCCGGTTAGTTCTTTAGTACA      600
      F S S W L L E A M R A P T P V S S L V H
601 TTCCTCTACTTTAGTGGCTGCTGGGATATGATTTTTATTAGAGTATAGGCAAGTAATGAA      660
      S S T L V A A G I W F Y L E Y S Q V M N
661 ATGTTTTGAGGGTGTAGGTTGTTGTATAGTTTTAGTATGGCTTGTGCTCTGTTAACTAT      720
      C F E G C S L L Y S F S M A C A L L T I
721 ACTGATTAGGGGTACGTATTTCTTTAATTTGTAATGATATAAAGCAGTCAATAGCCTTATC      780
      L I S G T Y S L I C N D I K Q S I A L S
781 TACTTGTAGTAATATTTTCATGAGTCGTAGTGTATGTTATTGGGTGAGTATGATTTGGG      840
      T C S N I S W V V V M M L L G E Y D L G
841 GTTGGTTC AATTGGTGATTCATGGATTAAGTAAGTGTTAGTTTTTATTTGGTTGGTGA      900
      L V Q L V I H G L S K C L V F I L V G D
901 TTATATTTCTGGGGTTTTGGTGGGCAGAAAGTAAATCAGGTGATGGTGAGTTTTTTAGG      960
      Y I S G G F F G G Q N V N Q V M V S F L G
961 TTGCTTACGTGAGTTTGTATATTTAATTCACTTTTATTTTGGTCTTTCTGGATTTCTTTT 1020
      C L R E F V Y L F T L L F G L S G F P F
1021 TATTTGTATATATTTTAGTAAGCATGCTTTTATTAGTAGAATTGGTGGGTATAAAGTATT      1080
      I C I Y F S K H A F I S S I G G Y N V F
1081 TAAAGTGTGTTTAGTGATTGTTATAATATTATGTGTTTTATTATCTGTAGTTTATAGTTT      1140
      N V C L V I V I I L C V L L S V V Y S L
1141 GCGACTATTTTTCTTTTTGATGGAGGGGGGGTCAGAAAAGTGATTAGGATTCGTCGGT      1200
      R L F F L F D G G G G Q N S D *
1201 TTTATTCAATTAGCTTATATTTACCCTTATTAAGTTCGTGTTAGGCTATAGCTATTTAT      1260
1261 TTAGGTTAGTGGTTGGTTATACTGATTTATTTGTTATCAGTCAATGTTGTTGTCGGTGG      1320
1321 TATACATAGTTGGATTGATAGTTGGATTTGGTTTTGTGGTTGGTTACTGGAAGATAAGTG      1380
1381 GATGTGATAAATTTGGCGGATGAATAGCTTAGTGGTTTTATTAAAGGTTGATGTATA      1440
1441 CTTTTTCAGATTTGATTAGTTTTGTAGTATTTGTTGAGAGATAGCTTTATTTAATTACT      1500
1501 TGTATCGATTGTTAAGGAGATTAGTGTGGGTTGATACATGGGTTTAGTAGTATTGGTTT      1560
1561 TGAGAATTTAATGTTGGTAGTGATAGTACTTAGTATATAGAAGTGAGTAGTGGGAGTGG      1620
1621 TATAATTTACTAGGTGTATAAAAGTTTAGATGGTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA      1680
1681 AAAAAAAAAAAAAA

```

Fig. 1. Nucleotide and deduced amino acid sequence of *Sm*ND5. Nucleotides are numbered at both sides of each row. Amino acids are shown in one letter code. The translation stop codon is in bold and indicated by an asterisk. A putative polyadenylation signal (ATAAA) is underlined. The NADH binding site is double underlined. The putative Hormone Response Element is indicated by boldface letters.

did not affect the fluorescence quenching (results not shown).

Taken together, the results shown in Fig. 4 also argue against a non-specific, ionophore-like effect of testosterone on the SMP membranes.

The results in Table 1 show that whereas 3 μ M rotenone completely abolished ATP synthesis in both, beef heart

and adult schistosome SMP, (at a protein concentration of 45 μ g/ml), 30 μ M testosterone inhibited ATP synthesis by approximately 66% and 84%, respectively. By increasing protein concentration to 450 μ g/ml, the inhibition of ATP synthesis by testosterone in beef heart and in schistosome SMP, was reduced to 20 and 16%, respectively. While rotenone was able to completely abolish ATP

```

S. mansoni ..... ..MLIGVVLL SLIFILSVLV
Honeybee .....MI KMMVCGILLF EFSFLMMLMS
C. elegans ..... ..MNISIFLI GFVFMGGIS
Human MTMHTTMTTL TLTSLIPPIL TTLVNPKNKN SYPHYVKSIV ASTFIISLFP
Consensus ..... ..M.IG..L. ...FI.S...
51 100
S. mansoni FQGGVVSYS. .LGSAYLF.. FGDISLHFS. .SGISSSMMLL MLLCCSILSL
Honeybee LYLLYLNKE. .FFFEWNIYT FNSMKFNELL LIDYKSLMFI FLVSMIFSMI
C. elegans VWLMPTFKLG IFFLEWD... FLSLKFNFY. ...FNSILFS FILFLVTFSV
Human TTMFMCLDQE VIIISNHWAT TQTTQLSLSF KLDYFMMFI PVALFVTVSI
Consensus ..... ..S..... F...L.FS. ....S.M.. .LL....S.
101 150
S. mansoni C.YAFHYLD. EYSYGKILAV SMFMFSTVMV VLVLSYEVVS TLILWEYLGL
Honeybee IYYSISYMDL SELKMDRFLY LMILFLISMY MLILSPNMLS IILGWDGLGL
C. elegans LVFSTYYLN. SELNFNYYYF VLLIFVGSMF SINFNISIFT MLLSVDLLGI
Human MEFSLWYMN. SDPNINQFFK YLLIFLITML ILVTANNLFQ LFIGWEGVGI
Consensus ..Y...YLD. .... ..M..F...M. .LVLS....S .LI.WE.LGL
151 200
S. mansoni VSFLLILY.Y GVWSCYRGGV VTLVLSWFGD VALFFLLAFY ITGSGS....
Honeybee ISYCLVIY.Y MKMKSFTSGM VTILNRLGD IGLLLIMG.L MYYGWSN..
C. elegans SSFFLVLF.Y NNWDSCSGAM NTALTNRLGD YFMFVFFG.L SVFSGYYF..
Human MSFLLISWWY ARADANTAAI QAILYNRIGD IGFI LALAWF ILHNSWDPO
Consensus .SFLILY.Y ..W....GG. VT..L...GD ..LF..LA.. IT.SGSW...
201 250
S. mansoni .....S CLVSLCILLV VATKSALFFP SSWLLEAMRA PTPVSSLVHS
Honeybee .LSFYKMEF M..MIYILLM AFTKSAQIFP STWLPAMMA PTPVSSLVHS
C. elegans .LSFSMFSSY M..SLLLLLT AFTKSAQFPF SSWLPKAMSA PTPVSSLVHS
Human QMALLNANPS LPPLGLLLA AAGKSAQLGL HPWLPsameg PTPVALLHS
Consensus .....S ...SL.I.LL. .ATKSA.FFP SSWL..AM.A PTPVSSLVHS
251 300
S. mansoni STLVAAGIWF YLEYSQVMNC FEGCSLLYSF SMACALLTIL ISGTYSLICN
Honeybee STLVTAGIYL LIRYVNL... .LDFNYKNIYI ML.IASLTMF FAGLVANFEL
C. elegans STLVTAGLIL LMNFNNLV.. .MQKDFISFV LI.IGLFTMF FSSLASLVEE
Human STMVVAGVFL LIRFHPLA.. .ENSPLIQTL TLCLGAIITL FAAVCALTQN
Consensus STLV.AGI.. ...Y..... .E...L.... ..ALLT.L .SG..SL..N
301 350
S. mansoni DIKQSIALST CSNISWVVVM MLLGEYDLGL VQLVIHGLSK CLVFILVGDY
Honeybee DLKKVVAYST LSQLGFMMSM LSIGSTELVF LHLFIHAMFK SIMFMCVGSY
C. elegans DLKKVVALST LSQMGFSMVT LGLGLSFISF IHLVSHALFK SCLFMQVGYI
Human DIKKIVAFST SSQGLMVVT IGINQPHLAF LHICTHAFK AMLFMCSGSI
Consensus DIK...ALST .S.....VVM ..LG...L.. ..LVIH.L.K .L.F..VG.Y
351 400
S. mansoni ISGGFGGQNV NOVMVSFLGC LREFVYLF TL LFGLSGFPFI CIYFSKHAFI
Honeybee MHYMYSNQDI RMYGMYIYI PMKSMILIFS ILSLCGFPFL VGYYSKD.LI
C. elegans IHCSFGQDQ RNYSNNGNLP NFIQLQMLVT LFCLCGLIFS SGAVSKD.FI
Human IHNLNNEQDI RKMGGLLKTM PLTSTSLTIG SLALAGMPFL TGFYSKD.HI
Consensus I...FG.Q... ..L... LF.L.GFPF. ..Y.SK..FI
401 450
S. mansoni SSIGGYNVFN VCLVIVILC VLLSVVYSR LFFLFDGGGG QNSD.....
Honeybee IEMFFSKMI YFSMINLIIG TIFTVSYSFR MILVLTskfl MNVIYSKED
C. elegans LELFFSNYIM MFFSLMFVVS VFLTFGYSFR L...WKSFFL SFNKVMNHYS
Human IETANMSYTN AWALSITLIA TSLTSAYSTR MILLTLTGQP RFPTLTNINE
Consensus .....N..N ....I..I.. V.L.V.YS.R L..L...G.. .....
451 500
S. mansoni .....
Honeybee KIMCISMMM MIFSLIYSKL IFNLNMFNLL GINLLMIYKL MVFKMIMVGL
C. elegans STVFMNFLSL VL..VIFSIS FLWMMNENLL NIPSLFLYVD FFGPLVFLFM
Human NNPTLLNPIK RLAAGSLFAG FLITNNISPA SPFQTTIPLY LKLTALAVTF
Consensus .....
501 550
S. mansoni .....
Honeybee IMGFNFYKLI LLNNKIGY.F .KMSFLFMNL IYKIIYKII MMFTYEVYI
C. elegans MIFLSFLILK MLFKELMYKF .LVDYLAKNS IYKMKNLKF. MDLFLNNINS
Human LGLLTALDLN YLTNKLKMKs PLCTFYFSNM LGFYPSITHR TIPYLGLLTS
Consensus .....
551 600
S. mansoni .....
Honeybee EKSIIEILS. ...SKFMSVT LNIYELKISN LMINIYLITL IYLIYLLIYL
C. elegans KGYTLFLSS. ...GMFKNYI LKSLNFNSVV VLIFFFMIC .....
Human QNLPLLLLDL TWLEKLLPKT ISQHQISTSI ITSTQKGMK LYFLSFFFP
Consensus .....
601
S. mansoni .....
Honeybee INF.....
C. elegans .....
Human ILTLLIT
Consensus .....

```

Fig. 2. Alignment of the amino acid sequence of the NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit 5 from *S. mansoni* (*SmND5*), honey bee *Apis mellifera* (*AmellND5*), *C. elegans* (*CellegND5*) and *Human* (*HumND5*).



Fig. 3. Dot blot analysis of the hAR ³²P-probe against several samples of DNA. The membrane was spotted with 0.25, 0.5, 1 and 2 µg of DNA, as indicated by the small arrows and hybridised with the hAR probe. The large arrows indicate the several dilutions of (1), the SmND5 containing plasmid, (2) PKS plasmid with no insert and (3) the human DPM gene. The arrowhead indicates the position of 4 x 10⁻⁶ mg of the hAR DNA.

synthesis in beef heart SMP, this inhibitor reduced ATP synthesis in schistosome SMP by only 51%, even when higher protein concentrations were tested. Table 1 also shows that raising protein concentration of either schistosome or beef heart SMP, produced a consistent decrease in specific of ATP synthesis activity.

The results above demonstrated an impairment of mitochondrial function by testosterone. With a view to determining whether the steroid could affect the whole

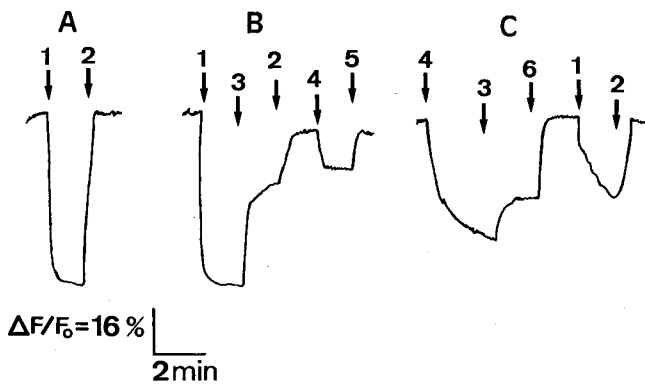


Fig. 4. Inhibition of H⁺pumping in beef heart submitochondrial particles by testosterone and rotenone. The SMP (40 µg/ml) were incubated at 25°C in a medium consisting of 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.25 M sucrose, 5 mM MgCl₂, 20 mM KCl, 2 µM ACMA, 0.5 mM NADH (A, B and C) or 5 mM succinate (B and C). The reaction started with the addition of NADH to the mixture. Additions were: 1-NADH; 2-2.5 µM rotenone; 3-30 µM testosterone; 4-5 mM succinate; 5-2.5 µM FCCP, and 6-10 mM malonate. FCCP = carbonyl cyanide p (trifluoromethoxy)- phenylhydrazone. In the figure, a decrease in fluorescence at 485 nm means a quenching of the ACMA fluorescence due to protonation resulting from H⁺ transport.

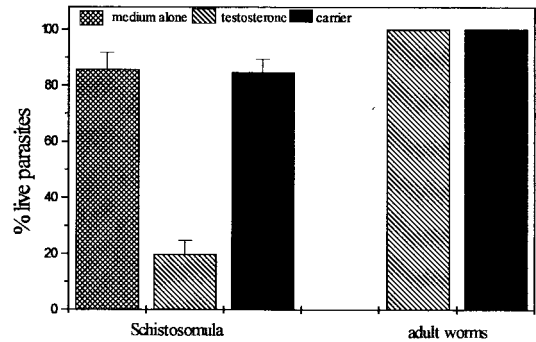


Fig. 5. Viability of parasites incubated *in vitro* with testosterone. Schistosomula and adult worms were incubated at 37°C for 72 h in CO₂ incubator, as described in Materials and methods, with either medium alone or with 3.4 mM water-soluble testosterone. A control containing equimolecular amounts of the cyclo-dextrin used as a carrier for testosterone was also included. After the incubation the schistosomula were treated with fluorescein diacetate and inspected under a microscope with UV light. Fluorescence intensity was then assessed. High intensity was scored for healthy organisms. The viability of adult worms was assessed by motility alone.

organism, live worms were incubated *in vitro* with testosterone and checked for viability, either by measuring the intracellular fluorescence produced by esterase action on fluorescein diacetate, or by visually scoring adult worms for motility. The results are shown in Fig. 5.

It can be seen that while testosterone was cytotoxic to schistosomula, the adult worms were virtually impervious to the steroid at concentrations of 3 mM. Admittedly, the concentration of testosterone used for these experiments

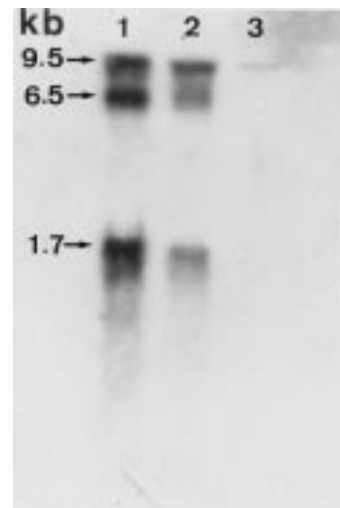


Fig. 6. Northern blot analysis of SmND5. 30 µg of total RNA from female (1) male (2) *S. mansoni* and (3) mouse (as a RNA-loading control), were fractionated on a 1.3% agarose gel and hybridised to the ³²P- SmND5 probe as described in Materials and methods. Molecular mass standards (in kb), are indicated by the arrows.

Table-1: Effect of testosterone and respiratory chain inhibitors on ATP synthesis by beef heart and *Schistosoma mansoni* submitochondrial particles

	Specific activity		% of maximal activity					
	Beef heart		S. mansoni		Beef heart		S. mansoni	
	Low ptn	High ptn	Low ptn	High ptn	Low ptn	High ptn	Low ptn	High ptn
Control	4869	1907	20.3	8.5	100	100	100	100
Rotenone	0	0	0	4.2	0	0	0	49
Testosterone	1659	1540	3.4	7.2	34	80	16.7	84
Oligomycin	15.3	ND	6	4.1	0.3	ND	29	48

Table 1. From A–D the composition of the reaction mixture was 50 mM MOPS-Tris pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 5 mM [³²P] Pi-Tris, 2 mM ADP, 120 mM KCl, 0.25 M sucrose, 20 mM glucose, 7 U/ml yeast hexokinase and 3 mM NADH. The reaction was started by adding submitochondrial particles to a final concentration of 45 mg/ml beef heart or 90 mg/ml worm protein. The experiment was carried out at 35°C. The concentration of respiratory inhibitors was 2.5 mM rotenone and 2 mg/ml oligomycin. Testosterone was added at 30 mM. Specific activity is nmol ATP.mg⁻¹.10 min⁻¹. High ptn = protein at concentration of 450 µg/ml; Low ptn = protein at concentration of 45 µg/ml; ND = Not determined.

was well over the physiological range, but a clear stage-specific difference in susceptibility to testosterone was demonstrated nonetheless.

Concerning this stage-specific sensitivity to testosterone, two possibilities came to mind: (1) adult worms do not depend on the oxidative metabolism, or (2) as the parasite matures, different rates of expression of *SmND5* occur.

Expression of *SmND5* in adult worms was studied by Northern blot analysis. The results are shown in Fig. 6. Three mRNA population of about 1.7, 6.5 and 9.5 kb were apparent in male and female worms. The 1.7 kb band probably accounts for the fully processed mRNA, as this size conforms with that of the predicted open reading frame. Although the identity of the other bands are unknown, we may infer that they correspond to unprocessed RNAs. As far as male and female adult worms were

concerned, there were no significant differences in the expression of *SmND5*.

Because of the limited amount of RNA from the larval stages of *S. mansoni*, which precluded Northern blot analysis, expression of *SmND5* in schistosomula was investigated by the semi-quantitative RT-PCR method. The results in Fig. 7 show that the expression of *SmND5* in cercariae was much higher than in schistosomula and adult worms (Fig. 7C, lanes 2–4). This finding was not surprising, considering that cercariae and freshly transformed schistosomula, but not adult worms, are still dependent on the aerobic metabolism, with the NADH ubiquinone dehydrogenase playing a key role in the process of respiration. In these experiments an internal control consisting of the house-keeping gene paramyosin, was included (Fig. 7 b).

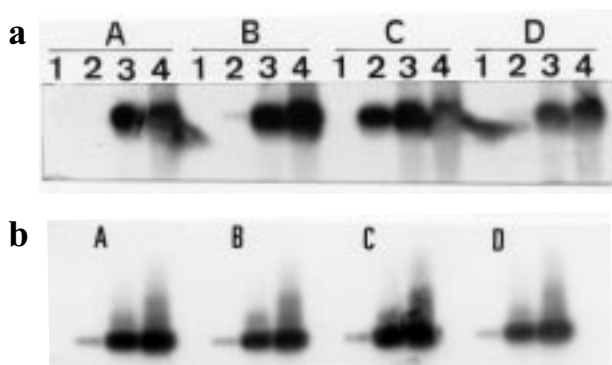


Fig. 7. Developmental expression of *SmND5* gene by semi-quantitative RT-PCR. (A) cDNA from male worms; (B) cDNA from female worms; (C) cDNA from cercariae; (D) cDNA from schistosomula. Lanes 1–4, correspond to aliquots collected at PCR cycles, 7, 15, 25 and 35, respectively. The amplified DNA was then transferred to a membrane and hybridised with the ³²P- *SmND5* probe. The bands shown above are the 800 bp-fragment amplified using primers obtained from the *SmND5* gene. b- Internal control cDNA obtained after the same PCR cycles as in Fig. 7a and probed with the house keeping gene paramyosin. A–D represents the same source of RNA as in Fig. 7a.



Fig. 8. Southern blot analysis of *SmND5*. Genomic DNA extracted from *S. mansoni* was digested with several restriction enzymes. Lanes 1–8 are the digestions with: Taq I, Hpa II, Msp I, Eco RI, Eco RV, Sca I, Acc I and Hind III, respectively. Blots were probed with [^α-³²P]dCTP-labeled *SmND5* 1,0 kb fragment, according to Materials and methods.

Finally, the southern blot analysis in Fig. 8, was carried out in order to estimate the number of genes likely to encode *SmND5*. The pattern of digestion obtained with 8 restriction enzymes suggested the presence of a single copy gene. The only enzyme producing two bands was Hpa II (lane 2), which actually recognises a restriction site within the *SmND5* gene sequence (see Fig. 1). Both rare cutters, Eco RI and Eco RV, produced the largest restriction fragments.

Discussion

The fact that a human androgen receptor probe could select a clone with sequence homology to a mitochondrial enzyme was surprising at first, since we expected positive clones to contain genes belonging to the super-family of steroid receptors. Notwithstanding, it soon became apparent that there were many instances functionally linking steroids to the mitochondria, i.e., examples in which steroid/thyroid binding proteins either bore sequence homologies, or had functional relationships with mitochondrial enzymes. Thus, in *Candida albicans* an estrogen binding protein was characterised and shown to be an oxidoreductase [19]. Likewise, mouse liver contains an NADH dehydrogenase subunit whose gene is regulated by thyroid hormone [20] and androgens have been shown to regulate mitochondrial RNA-processing endoribonuclease [21]. Furthermore, in both, rat liver or beef heart mitochondria, steroids have been shown to directly affect electron transport [22] the oxidation of several catabolites [23], and inhibit the reoxidation of coenzymes [24]. In all these reports, the effective concentration of the steroids were in the range of 27–100 μM . By analogy, the testosterone concentration used in the present work (30 μM), which was based on the average circadian concentration of testosterone in the mouse, was well within what we defined as a physiological concentration. In addition, this value is not too far off from the *in vitro* experiments reported recently [25] in which half maximum responses to several androgens, including testosterone were only clearly observed at steroid concentrations greater than 10 μM .

The results in Fig. 4 showed that 30 μM testosterone was able to effectively inhibit proton pumping in beef heart SMP, although we failed to demonstrate a similar effect on adult *S. mansoni* SMP. This probably occurred because of the much-reduced tissue mass obtained from the parasites when compared to that of beef heart. In addition, heart muscle is particularly enriched in mitochondria. On the other hand, a testosterone effect could be readily observed in the ATP synthesis experiments, as shown in Table 1. ATP synthesis in SMP was clearly inhibited by

testosterone. In these experiments, the effects of oligomycin and rotenone at higher protein concentration, led us to speculate that the residual ATP synthesis could have originated from non-mitochondrial enzymes present in schistosome SMP preparation. Similar results were obtained in three independent experiments (results not shown).

The cytotoxicity of testosterone to *S. mansoni* was further evidenced by *in vitro* experiments, in which the viability of the worms was tested in the presence of the steroid. These experiments (Fig. 5) revealed that testosterone cytotoxicity appears to be stage-specific, a result consistent with the previous *in vivo* observations of Nakazawa *et al.* [5], who were able to demonstrate that the testosterone-induced reduction in worm burden only took place when the hormone was given 10 days prior to infection.

The results in Fig. 5 raised the question as to why the adult schistosomes became less susceptible to the steroid action. Two possibilities, which are not mutually exclusive, can be considered. As clearly shown in Fig. 7, there were differences in the rate of expression of *SmND5*, cercariae and schistosomula displaying a higher rate of transcription than the adult stage. Therefore, one could assume that if indeed the schistosome NADH Q oxidoreductase is the target for the androgen action, the larval stages simply contained a higher amount of the enzyme. Alternatively, cercariae and by extension, newly transformed schistosomula, are still dependent on the oxidative metabolism. Therefore, at this moment in development, any interference with the mitochondrial function would be necessarily deleterious to the organisms. In contrast, adult worms, which are essentially homolactic fermenters, deriving the bulk of their energy requirements from the anaerobic glycolytic pathway would be insensitive to testosterone, or for that matter, any other mitochondrial poison. Although the adult worms do have mitochondria, it appears that the organelle's contribution in terms of ATP generation corresponds to only a third of the total concentration found in the parasite [26]. Thus, according to our hypothesis, only after successfully switching from aerobiosis to anaerobiosis, the parasites would be able to resist the effects of testosterone, since the depletion of mitochondrially derived ATP would be amply compensated by glycolysis. Consequently, the subpopulation of organisms infecting a male host and whose switch to anaerobiosis suffered any delay, would have its development arrested and would then be eventually killed by the androgen at this early stage. This seems to be the case, since in the experiments of Nakazawa *et al.* [5], no intermediary stages of *S. mansoni* in testosterone treated mice could be recovered. It could also be argued that the observed stage-specific cytotoxic effects of

testosterone were due to anatomical features of the parasites, i.e. the adult worms with a fully developed heptalaminated membrane would offer a more stringent barrier to diffusion, than the larval stage, still undergoing membrane formation. Whilst this interpretation holds true for a hydrophilic molecule, it certainly does not apply for a hydrophobic steroid such as testosterone, which diffuses freely through the lipid bilayer. Indeed, experiments carried out in our laboratory (not shown) showed that ^3H -testosterone diffuses readily across all compartments in schistosomes.

Acknowledgements

The authors wish to acknowledge Dr. Phil LoVerde for the kind gift of the *S. mansoni* cDNA library and Dr. Peter Orlean for the DPM1 cDNA. This work received financial support from FINEP, CNPq-PRONEX and FUJB.

References

- Cornford EM, Diep CP, Rowley GA: *Schistosoma mansoni*, *S. japonicum*, *S. haematobium*: Glycogen content and glucose uptake in parasites from fasted and control hosts. *Exp Parasitol* 56: 397–408, 1983
- Cornford EM: *Schistosoma mansoni*, *S. japonicum* and *S. haematobium*: Permeability to acidic aminoacids and effect of separated and unseparated adults. *Exp Parasitol* 59: 355–363, 1985
- Tempone AJ, Bianconi ML, Rumjanek FD: The interaction of human LDL with the tegument of adult *Schistosoma mansoni*. *Mol Cell Biochem* 177: 139–144, 1997
- Eloi-Santos S, Olsen NJ, Correa-Oliveira R, Colley DG: *Schistosoma mansoni*: Mortality, pathophysiology and susceptibility differences in male and female mice. *Exp Parasitol* 75: 168–175, 1992
- Nakazawa M, Fantappiè MR, Freeman GL Jr, Eloi-Santos S, Olsen NJ, Kovacs WJ, Secor WE, Colley DG: *Schistosoma mansoni*: Susceptibility differences between male and female mice can be mediated by testosterone during early infection. *Exp Parasitol* 85: 233–240, 1997
- Beato M, Arnemann J, Chalepakis G, Slater E, Willman T: Gene regulation by steroid hormones. *J Steroid Biochem* 27: 9–14, 1987
- Smither SR, Terry RJ: The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of adult worms. *Parasitology* 55: 695–700, 1965
- Ramalho-Pinto FJ, Gazzinelli G, Howells RE, Mota-Santos TA, Figueiredo EA, Pellegrino J: *Schistosoma mansoni*: A defined medium for stepwise transformation of cercariae to schistosomula *in vitro*. *Exp Parasitol* 36: 360–372, 1974
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang Z, Miller W, Lipman D: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl Acids Res* 25: 3389–3402, 1997
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: In: *Molecular Cloning*, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- Cunha VMN, Souza W, Noêl F: A Ca^{2+} stimulated, Mg^{2+} dependent ATPase activity in subcellular fractions from *Schistosoma mansoni*. *FEBS Lett* 241: 65–68, 1988
- Matsuno-Yagi A, Hatefi Y: Studies on the mechanism of oxidative phosphorylation; flow force relationships in mitochondrial energy-linked reactions. *J Biol Chem* 262: 14158–14163, 1987
- Perlin DS, Kasamo J, Brooker RJ, Slayman CW: Electrogenic H^+ translocation by the plasma membrane ATPase of *Neurospora*. *J Biol Chem* 259: 7884–7892, 1984
- de Meis L: Approaches to studying the mechanisms of ATP synthesis in sarcoplasmic reticulum. *Meth. Enzymol* 157: 190–206, 1988
- Vivat V, Gofflo D, Garcia T, Wurtz JM, Bourguet W, Philibert D, Gronemeyer H: Sequences in the ligand-binding domain of the human androgen and progesterone receptors which determine their distinct ligand identities. *J Mol Endocrinol* 18: 147–160, 1997
- Lanz RL, Rusconi S: A conserved carboxi-terminal sub-domain is important for ligand interpretation and transactivation by nuclear receptors. *Endocrinology* 135: 2183–2195, 1994
- Tomarev SI, Piatigorski J: Lens crystallins of invertebrates – Diversity and recruitment from detoxification enzymes and novel proteins. *Eur J Biochem* 235: 449–465, 1996
- Orlean P, Albright C, Robbins PW: Cloning and sequencing of the yeast gene for dolichol phosphate mannosyl synthase, an essential protein. *J Biol Chem* 263: 17499–17507, 1988
- Madani ND, Malloy PJ, Rodriguez-Pombo P, Krishnan AV, Feldman D: *Candida albicans* estrogen-binding protein gene encodes an oxidoreductase that is inhibited by estradiol. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 922–926, 1994
- Iglesias T, Caubin J, Zaballos A, Bernal J, Muñoz A: Identification of a mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 3 (ND3) as a thyroid hormone regulated gene by whole genome PCR analysis. *Biochem Biophys Res Commun* 210: 995–1000, 1995
- Cornwall GA, Orgebin-Crist MC, Hann SR: Differential expression of the mouse mitochondrial genes and the mitochondrial RNA-processing endoribonuclease RNA by androgens. *Mol Endocrinol* 6: 1032–1042, 1992
- Yelding KL, Tomkins GM, Munday JS, Cowley IJ: The effect of steroids on electron transport. *J Biol Chem* 235: 3413–3416, 1960
- Vallejos RH, Stoppani OM: Site-specific effects of steroids on mitochondrial metabolism. *Biochim Biophys Acta* 131: 295–309, 1967
- Varrichio F: Inhibition of mitochondrial respiration by progesterone and azasteroid. *Arch Biochem Biophys* 121: 187–193, 1967
- Forman BM, Tzanelli I, Choi HS, Chen J, Sinha D, Seol W, Evans RM, Moore DD: Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR- β . *Nature* 395: 612–615, 1998
- van Oordt BE, van den Heuvel JM, Tielens AG, van den Bergh SG: The energy production of the adult *Schistosoma mansoni* is for a large part aerobic. *Mol Biochem Parasitol* 16: 117–126, 1985

CURRICULUM VITÆ

Nome: Daniel Rodrigues Furtado

Nascimento: 16/11/1977

Naturalidade: Rio de Janeiro

Formação Acadêmica

- Graduação: Ciências Biológicas – Modalidade Médica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, março de 1997 a janeiro de 2001.
- Doutorado em Química Biológica – Instituto de Bioquímica Médica – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Comunicações em Congressos

- 9 comunicações em congressos nacionais
- 2 comunicações em congressos internacionais

Publicações

- MANSURE, J. J.*; **FURTADO, D. R.***; BASTOS DE OLIVEIRA, F. M.; RUMJANEK, F. D.; FRANCO, G. R.; FANTAPPIÉ, M. R. Cloning of a protein arginine methyltransferase PRMT1 homologue from *Schistosoma mansoni*: Evidence for roles in nuclear receptor signaling and RNA metabolism. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 335, n. 4, p. 1163-1172, Oct. 7, 2005.
- MORALES, F. C.; **FURTADO, D. R.**; RUMJANEK, F. D. The N-terminus moiety of the cystatin SmCys from *Schistosoma mansoni* regulates its inhibitory activity *in vitro* and *in vivo*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 134, n. 1, p. 65-73, Mar., 2004.
- KLUMB, C. E.; **FURTADO, D. R.**; MAGALHAES DE RESENDE, L. M.; CARRICO, M. K.; COELHO, A. M.; MEIS, E.; MAIA, R. C.; RUMJANEK, F. D. DNA sequence profile of TP53 gene mutations in childhood B-cell non-Hodgkin's lymphomas: prognostic implications. **Eur. J. Haematol.**, v. 71, n. 2, p. 81-90, Aug., 2003.
- TEMPONE, A. J.; **FURTADO, D. R.**; GIMBA, E. R.; OLIVEIRA, F. M.; RUMJANEK, F. D. Dolichol phosphate mannose synthase is differentially expressed in male and female worms of *Schistosoma mansoni*. **Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.**, v. 131, n. 3, p. 465-474, Mar., 2002.
- FANTAPPIÉ, M. R.; GALINA, A.; DE MENDONÇA, R. L.; **FURTADO, D. R.**; SECOR, W. E.; COLLEY, D. G.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; FREEMAN, G.; TEMPONE, A. J.; LANNES DE CAMARGO, L.; RUMJANEK, F. D. Molecular characterisation of a NADH ubiquinone oxidoreductase subunit 5 from *Schistosoma mansoni* and inhibition of mitochondrial respiratory chain function by testosterone. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 202, n. 1-2, p. 149-158, Dec., 1999.

* Estes autores contribuíram de forma igualitária a este trabalho.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)