UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

GIULLIANA TESSARIN E ALMEIDA

Efeitos do pareamento no perfil de expressão gênica do parasita *Schistosoma mansoni*

SÃO PAULO
Data do Depósito na SPG: 30/06/2010

GIULLIANA TESSARIN E ALMEIDA

Efeitos do pareamento no perfil de expressão gênica do parasita *Schistosoma mansoni*

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)

Área de Concentração: Bioquímica

Orientador: Sergio Verjovski-Almeida

SÃO PAULO

2010

Giulliana Tessarin e Almeida

Efeitos do pareamento no perfil de expressão gênica do parasita *Schistosoma mansoni*

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Dedico esta tese a minha família que me ensinou que o conhecimento é a única herança que ninguém pode tirar de nós. Dedico de maneira especial a minha mãe que me ensinou que era bom crescer, que a minha essência nunca ficaria mais velha do que naquele dia, e eu sempre teria lições para aprender.

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus, que me manteve equilibrada durante todos os momentos, que me deu a capacidade de acreditar na minha paixão e perseguir meus sonhos. Eu nunca poderia ter feito isso sem a fé que tenho em Você.

A minha mãe, Maria Catarina. Pela primeira vez em 30 anos estou sem palavras! Eu mal consigo encontrar as palavras para expressar toda a sabedoria, amor e apoio que você me deu. Você é minha fã nº 1 e por isso eu sou eternamente grata. Se serei abençoada para viver por muito tempo, espero que o prazer de nossa convivência dure muito. Obrigada por ouvir, muitas vezes sem entender os por quês, todas as minhas explicações e idéias frente a cada experimento. Ao meu pai, Antonio, o desejo que você tivesse orgulho de mim, fez com que eu buscasse excelência em tudo o que eu fiz. Agradeço também a minha irmã Graziela, pelo companheirismo e amizade nos momentos alegres e tristes, você tem o dom de ser um "*fun magnet*".

Aos meus amigos Beth Ballard, Carlos Osvaldo, Linda Huber, Kyndra Singer, Lisâneas e Teca Moura e Sônia Maria pelas orações, amizade e pelos conselhos nos momentos mais difícieis.

Ao meu orientador, Sergio Verjovski-Almeida pela confiança e pelos ensinamentos científicos. Sua valiosa orientação sem duvida moldou minha mente e minha perspectiva sobre a importância da ciência e como fazê-la.

Ao Prof. Ricardo de Marco pela contribuição inestimável no desenvolvimento deste trabalho, pela amizade e pelas discussões científicas, sugestões e inquisões sobre os resultados experimentais. Aos colegas de trabalho, Thiago Venancio e Kátia Oliveira, pela colaboração neste trabalho e pelo companheirismo. Thiago, por favor, acredite o mundo não conspira contra nós!

Aos amigos de laboratório, Ana Claudia, Ana Ayupe, Esther, Felipe, e Susan pela amizade, pelas discussões e pelos conselhos. Um novo olhar para a mesma pergunta é sempre importante e suas duvidas, curiosidades e sugestões foram muito importantes.

Aos colegas de laboratório, Prof. Eduardo, Ana Tahira, Ângela, Anna, Camila, Carlos, Glauber, Helder, Julio, Katia, Kleber, Lauren, Murilo, Rodrigo Louro, Santiago, Vinícius, Yuri. Cada um de voz contribuiu de uma maneira singular.

Aos Prof. Bayardo Torres e Profa. Aline Maria da Silva, por terem me ensinado que a Bioquímica e a Biologia Molecular são matérias fascinantes.

A Ana Paula Vidal, pela amizade, pelo auxilio e pela eficiência para lidar com toda a parte burocrática que envolve uma pesquisa, sem nunca esquecer um prazo ou uma prestação de conta para a FAPESP.

Aos técnicos de laboratório, Renato Alvarenga, Denise Yamamoto, Adriana Matsku e Jefferson Santos que auxiliaram na execução deste projeto.

A FAPESP, por ter finaciado o meu doutorado e consequentemente viabilizado esta tese.

“God is most glorified in us when we are most satisfied in Him. Our happiness is not the highest good, but pursuing the highest good will always result in our greatest happiness in the end. We should pursue this happiness, and pursue it with all our might. The desire to be happy is a proper motive for every good deed, and if you abandon the pursuit of your own joy you cannot love man or please God.”

John Piper

Resumo

Almeida, G.T. Efeitos do pareamento no perfil de expressão gênica do parasita *Schistosoma mansoni*, 2010, 123 páginas. Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Bioquímica. Instituto de Química. Universidade de São Paulo, São Paulo.

Esquistossomose é uma doença crônica e debilitante. *Schistosoma* representa a única classe de trematódeos com vida dióica. Um contínuo pareamento com o macho é essencial para a maturação sexual do sexo feminino. Fêmeas adultas provenientes de infecções uni-sexuadas são subdesenvolvidas, apresentam atrofia do tamanho e um sistema reprodutivo imaturo. Para estudar os mecanismos envolvidos no pareamento de vermes adultos foram utilizadas duas plataformas de microarranjos distintas: uma composta por 4 mil sondas de cDNA dupla fita produzida pelo nosso grupo de pesquisas e outra composta por 44 mil sondas de oligonucleotideos desenhadas pelo nosso grupo e produzida pela empresa Agilent Technologies.

Com a plataforma de 4 mil sondas detectamos 113 transcritos diferencialmente expressos em fêmeas adultas mantidas separadas de seus respectivos pares durante 24 horas de cultivo *in vitro* quando comparadas com fêmeas adultas pareadas; para 10 destes genes obtivemos uma confirmação adicional da expressão diferencial por transcrição reversa fita específica seguida de PCR em Tempo Real. Observamos também os efeitos do pareamento no perfil de expressão gênica de machos adultos mantidos separados de seus respectivos pares durante 24 horas de cultivo *in vitro; f*oram encontrados 152 transcritos diferencialmente expressos.

Com a plataforma de 44 mil sondas foi detectada a expressão de 5.798 genes transcricionalmente ativos em verme adulto, em um conjunto de 19.907 genes

únicos representados nesta plataforma. A análise do conjunto de genes “no match” mostrou que em 156 genes ocorria expressão senso e anti-senso; para 6 destes transcritos obtivemos uma confirmação adicional da expressão nas duas fitas por transcrição reversa fita específica seguida de PCR em Tempo Real.

Adicionalmente foram identificados 2717 transcritos diferencialmente expressos em fêmeas separadas de seus respectivos pares durante 13 dias de cultivo *in vitro*, quando comparadas com fêmeas mantidas pareadas. Para as análises com machos separados durante 13 dias foram encontrados 243 transcritos diferencialmente expressos.

Por fim, realizamos estudos com o objetivo de observar os genes que podem estar correlacionados com o contato físico do pareamento (macho e fêmea) e genes que podem ser regulados pela possível difusão de proteínas e hormônios secretados no meio, para os quais a mudança do nível de expressão não dependa da necessidade de contato entre o macho e a fêmea. Sabe-se que o contato direto da fêmea com o macho é necessário para manter a atividade reprodutiva feminina e observamos que o re-pareamento pode restabelecer o perfil de expressão gênica de fêmeas ou machos separados. Além disso, observamos que fêmeas separadas e depois mantidas na presença do macho, porém sem re-pareamento, apresentam uma expressão gênica diferente das fêmeas separadas e depois mantidas na ausência de machos, sugerindo que algum fator secretado pelo macho no meio regula a expressão. Este trabalho representa uma importante contribuição no entendimento da relação macho-fêmea em nível molecular.

Palavras Chave: *Schistosoma mansoni*, expressão gênica, pareamento, *microarranjos*

Abstract

Almeida, G.T. Effects of pairing on the gene expression profiles of the parasite *Schistosoma mansoni*, 2010, 123 pages. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Schistosomiasis is a chronic and debilitating disease. *Schistosoma* represents the only class of trematodes with a dioecious life. A continuous pairing with the male is essential for female sexual maturation. Adult females from uni-sexual infections are underdeveloped, have body atrophy and an immature reproductive system. To study the mechanisms involved in pairing of adult worms two microarray platforms were used: one comprised by 4000 cDNA probes and printed by our research group and another comprised by 44 000 oligonucleotide probes designed by our group and printed by Agilent Technologies Company.

With the 4000-probes platform we detected 113 transcripts differentially expressed in adult females kept separated from their mates during 24 hours *in vitro* when compared with paired adult females; for 10 of these genes we obtained additional confirmation of differential expression by Real Time RT-PCR. We also observed the effects of pairing on the gene expression profile of adult males kept separate from their mates during 24 hours *in vitro*, where we found 152 differentially expressed transcripts.

With the 44 000-probes platform we detected the expression of 5798 genes in adult worms, out of a set of 19 907 unique genes represented on this platform. Analysis of the "no match" genes showed that 156 have transcription from the sense and anti-sense strands; for 6 of them we obtained additional confirmation of expression by strand specific Real Time RT-PCR.

Additionally, we identified 2717 differentially expressed transcripts in females separated from their mates during 13 days *in vitro* when compared to females that

remained paired. In the analysis of males separated for 13 days we found 243 differentially expressed transcripts.

Finally, we performed a study aimed at observing genes which might be correlated to physical contact pairing (male and female) and compared to genes that might be regulated by the possible diffusion of secreted proteins and hormones in the medium, for which the change of expression level does not depend on physical contact between male and female. It is known that direct female-male contact is needed to keep the female reproductively activity and we observed that repairing can restore the gene expression profile of females or males that were kept separated. Furthermore, we observed that females separated and then maintained in the presence of male, but without re-pairing, have a different gene expression from the separated females kept without males, suggesting that some male secreted factors might be involved in gene regulation. This work represents an important contribution to the understanding of male-female relation at the molecular level.

Keywords: *Schistosoma mansoni*, gene expression, pairing, *microarrays*

Lista de abreviaturas e siglas

200KDa surf. Prot: *Schistosoma mansoni 200 kDa surface protein* (Proteina de superfície de *Schistosoma mansoni* com 200kDa)

ABC1: *ATP-binding cassette C1*

ABC7: *ATP-binding cassette, sub-family B, member 7, mitochondrial precursor*

ATPDase2: *ATP-diphosphohydrolase 1* (ATP difosfohidrolase 1)

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool* (Ferramenta de Busca por Alinhamento Local Básico)

CA150: *Schistosoma mansoni* mRNA for transcriptional cofactor CA150 (mRNA de *Schistosoma mansoni* para o co-fator transcricional CA150)

DALY: *Disability-adjusted life years (A*nos de vida ajustados por incapacidade)

DGC : *Dystrophin-glycoprotein complex* (Complexo distrofina-glicoproteína)

DMSO: *Dimethyl Sulfoxide* (Dimetilsulfóxido)

DNA: *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido desoxirribonucléico)

EDTA: *Ethylenediamine tetraacetic acid* (Ácido Etilenodiamino Tetra-acético)

EGTA: *Ethylene glycol tetraacetic acid* (Ácido Rtileno Glicol Tetra-acético)

ELISA: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio Imunoenzimático Indireto em Fase Sólida)

EST: *Expressed Sequence Tags* (Etiquetas de Seqüências Transcritas)

FAST: *Falcon™ Assay Screening Test*

FDR: *False Discovery Rate* (Taxa de Falsos Positivos)

GEO:*Gene Expression Omnibus*

Glu Synt: *Glutamate synthase* (Glutamato sintase)

GO: *Gene Ontology* (Ontologia Gênica)

gpGaNTase-T7: *n-acetylgalactosaminyltransferase* (n-acetilgalactosamina transferase)

HDAC: *Histone Deacetylases* (Histonas deacetilases)

HGPRTase: *Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase* (Hipoxantina-guanina fosforibosil transferase)

HZ: Hemozoina

IHA: *Indirect Hemagglutination Assay* (Ensaio de hemaglutinação indireta)

IPA: *Ingenuity Pathway Analysis*

JNKS: *c-Jun N-terminal kinases* (c-Jun N-terminal Quinase)

LOWESS: *Locally Weighted Scatterplot Smoothing* (Regressão Linear Local Ponderada)

MAPK: *Mitogen-activated protein kinases* (Proteínas quinase ativadas por mitógenos)

NCBI: *National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional de Informação Biotecnologica)*

NMJ: *Neuromuscular Junction* **(**Junção neuromuscular)

OC: *Oligochromatographic* (oligocromatográfico)

ORF: *Open Reading Frame* (Fase de Leitura Aberta)

PBS: *Phosphate buffered saline* (Tampão Fosfato Salino)

PCPTP1: *receptor protein tyrosine phosphatase r* (receptor da proteína tirosina fosfatase r)

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

PEPCK: *phosphoenolpyruvate carboxykinase* (fosfoenolpiruvato carboxiquinase)

RNA: *Ribonucleic Acid* (Ácido ribonucléico)

RT: *Reverse Transcription* (Transcrição Reversa)

SAGE: *Serial Analysis of Gene Expression (Análise Serial de Expressão Gênica)*

Sm*AE:Schistosoma mansoni Assembled ESTs*

SmMLC: *Schistosoma mansoni myosin light chain (C*adeia leve de miosina de *S. mansoni)*

SmZF1: *Schistosoma mansoni zinc finger protein* (Proteína de dedos de zinco de *S. mansoni*)

TGF-β: *Transforming Growth Factor-β* (Fator β de crescimento transformante)

TSA: *Trichostatin A* (Trichostatina A)

TSP: *Tetraspanin* (Tetraspaninas)

TYR1: *Tyrosinase 1 precursor mRNA* (mRNA precursor de tirosinaquinase 1)

UTR: *Untranslated Region* (Região Não Traduzida)

Sumário

1. Introdução 16
1.1. História 16
1.2. Espécies e Distribuição Geográfica 18
1.3. Sintomas 22
1.4. O ciclo da esquistossomose 23
1.5. Diagnostico e Tratamento 27
1.6. A interação parasita-hospedeiro na esquistossomose 28
1.7. Importância do Pareamento na Maturação do Verme Adulto 29
1.8. Projeto Genoma e Transcriptoma do Schistosoma mansoni 30
1.9. Tecnologia de Microarranjos no estudo do transcriptoma de S. mansoni 31
2. Objetivos 34
2.1. Estudo do transcriptoma de vermes adultos de S. mansoni utilizando a plataforma de oligonucleotideos com 44.000 (44K) elementos 34
2.2. Estudo dos efeitos do pareamento no perfil de expressão gênica de vermes adultos utilizando a plataforma de 4K 34
2.3. Estudo dos efeitos da difusão de proteínas e/ou hormônios secretados pelo macho no meio sobre o perfil de expressão gênica de fêmeas adultas e dos efeitos do contato físico direto de vermes machos e fêmeas adultas utilizando a plataforma de 4 x 44K 34
3. Metodologia 35
3.1. Obtenção do Material Biológico 35
3.1.1. Cepa Utilizada 35
3.1.2. Infecção de Moluscos 35
3.1.3. Infecção de Camundongos 36
3.1.4. Perfusão e Coleta dos vermes 36
3.1.5. Extração de ovos de S. mansoni e de miracídios livres de contaminação do tecido do hospedeiro 36
3.2. Cultivo de esquistossômulos por 7 dias 38
3.3. Cultivo de S. mansoni in vitro por 24 horas 39
3.4. Cultivo de S. mansoni in vitro por 13 dias 40
3.5. Extração de RNA total 41
3.6. Quantificação e purificação do RNA total 42
3.7. Ensaios Realizados em lâminas de microarranjos em plataforma de 4K 43
3.7.1. Obtenção, purificação e deposição em lâmina de produtos de PCR para microarrays de DNA em lâmina de vidro 43
3.7.2. Síntese, amplificação e marcação de cRNA 45
3.7.3. Hibridização das amostras 46

3.7.4. Processamento de imagens e Normalização 47
3.8. Ensaios Realizados em lâminas de microarranjo em plataforma 4 x 44K 48
3.8.1. Especificações das lâminas comerciais 4 x 44K Agilent Technologies 48
3.8.2. Síntese, amplificação e marcação de cRNA 54
3.8.3. Hibridização das amostras e lavagem das lâminas 56
3.8.4. Processamento de imagens e Normalização 57
3.9. Análise de genes diferencialmente expressos 57
3.10. Anotação funcional dos genes diferencialmente expressos 58
3.10.1. Análise por Ontologia Gênica 58
3.11. Reações em cadeia da polimerase (PCR – Polymerase Chain Reaction) 59
3.11.1. PCR em Tempo Real 59
3.11.2. PCR em Tempo Real – fita especifica 60
4. Resultados 62
4.1. Estudo do transcriptoma de vermes adultos de *S. mansoni* utilizando a plataforma de oligonucleotideos com 44.000 (44K) elementos 62
4.2. Estudos dos efeitos do pareamento no perfil de expressão gênica de vermes adultos de *S. mansoni* mantidos *in vitro* durante 24 horas. 73
4.3. Estudos dos efeitos do pareamento no perfil de expressão gênica de vermes adultos de *S. mansoni* mantidos *in vitro* durante 13 dias. 88
4.4. Estudo dos efeitos do contato físico do pareamento (macho e fêmea) e efeitos da possível difusão de proteínas e hormônios no meio de cultura no perfil de expressão gênica de vermes adultos de *S. mansoni* mantidos in vitro durante 13 dias. 96
5. Discussão 102
6. Conclusões 110
7. Bibliografia 111
8. Súmula Curricular 1

1. Introdução

1.1. História

Esquistossomose é uma doença crônica e debilitante, que ocupa o segundo lugar, perdendo apenas para a malária, em termos de morbidade e mortalidade (Fenwick *et al.*, 2009). É uma doença parasitária de ocorrência mundial que está distribuída em 74 países situados em três continentes diferentes (América, África e Ásia) (Figura 1).

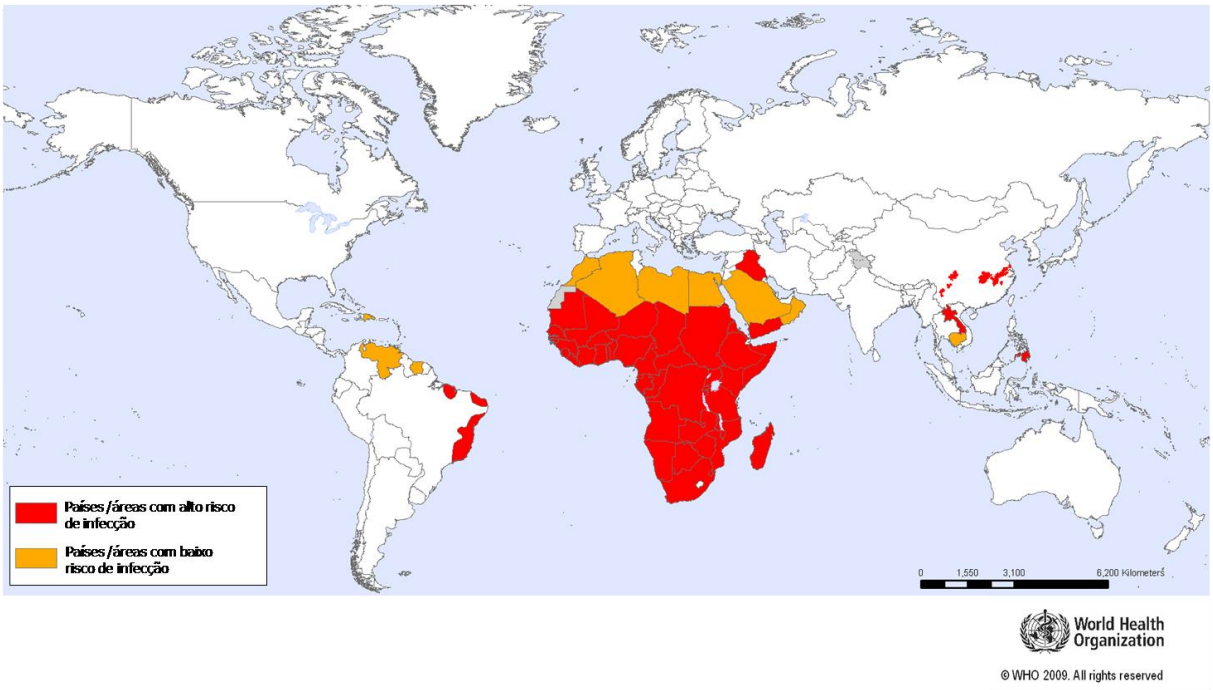

Figura 1 – Mapeamento dos países/áreas com risco de infecção por *Schistosoma*
Fonte: WHO, 2009

Por volta de 779 milhões de pessoas residem em áreas endêmicas e estão expostas ao risco de infecção (Lammie *et al.*, 2006; Steinmann *et al.*, 2006), das quais, 200 milhões são acometidas pela esquistossomose. Metade dos pacientes infectados é sintomático e menos de 20 milhões apresenta manifestações severas da doença (Steinmann *et al.*, 2006). Estima-se que 200 mil mortes anuais são

decorrentes da esquistossomose (van der Werf *et al.*, 2003). A esquistossomose é responsável por 1,7 (Morel, 2000; Utzinger *et al.*, 2001) a 4,5 milhões de anos de vida ajustados por incapacidade (*DALY's - disability-adjusted life years*)(WHO, 2002) perdidos no mundo, um dos índices mais altos entre todas as doenças tropicais negligenciadas. DALY é uma medida que pontua a intensidade da incidência de incapacidade, para isso ela inclui os pesos do tempo gasto em cuidados com uma saúde debilitada, somando os anos de vida perdidos e os anos de vida vividos com incapacidade (Murray e Lopez, 1997).

O patologista alemão Theodore Maximilian Bilharz (1825-1862) foi o primeiro a descrever a esquistossomose em seres humanos (Contis e David, 1996; Ross *et al.*, 2002). Ele realizou 400 necropsias em no Egito a fim de identificar parasitas intestinais tropicais e subtropicais (Ramez e Ibrahim, 2008). De maio 1851 até junho de 1853, Bilharz relatou através de diversas cartas a seu professor, Th. Von Siebold, em Breslau, a descoberta de um parasita na região das veias porta. Primeiramente, pensou ser uma cercária, mas posteriormente reconheceu ser um trematódeo com sexos separados. Ele encontrou os ovos do parasita em pequenos cálculos urinários e ovos calcificados em fígados infectados. Os ovos foram descritos como tendo uma casca fina e delicada com uma espícula. Bilharz foi capaz de identificar o ciclo de vida do parasita em detalhe. O verme foi nomeado de *Distomum (Schistosoma)* (Ramez e Ibrahim, 2008).

O médico e pesquisador responsável pela descoberta do *Schistosoma mansoni* no Brasil foi o cientista brasileiro Manuel Augusto Pirajá da Silva (1873-1961), que morreu antes mesmo que fosse descoberto, em 1980, um medicamento para a doença, o Praziquantel. Foi no dia 1º de agosto de 1908, no número um da Revista Brazil Médico, que Manoel Augusto Pirajá da Silva, 35 anos de idade,

publicou o primeiro trabalho sobre a esquistossomose no Brasil, intitulado *“Contribuição para o estudo da Schistosomíase na Bahia” (Pirajá da Silva, 1908).*

1.2. Espécies e Distribuição Geográfica

Existem três principais espécies de *Schistosoma* que têm o ser humano como hospedeiro definitivo: *S. mansoni*, *S. japonicum* e *S. haematobium*. Conforme o mapa abaixo (Figura 2), a esquistossomose encontra-se concentrada na África sub-saariana, onde existe pouco ou nenhum controle sobre a doença.

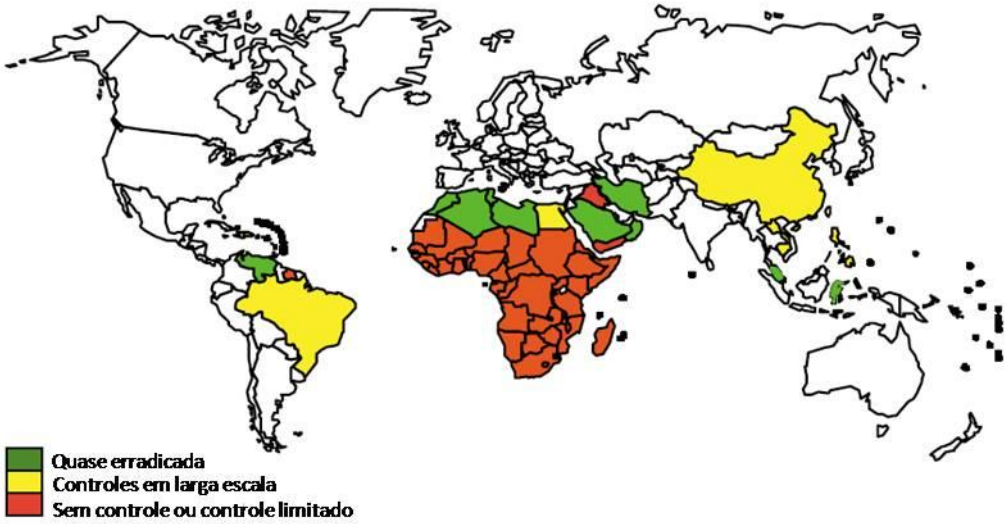

Figura 2 - Status do controle da esquistossomose no mundo. Fonte: (van der Werf *et al.*, 2003)

O *S. mansoni*, é encontrado em muitos países da África, América do Sul (Brasil, Suriname e Venezuela), Caribe (incluindo Porto Rico, Santa Lúcia, Guadalupe, Martinica, República Dominicana, Antigua e Montserat) e em partes do Oriente Médio Oriente (Figura 3).

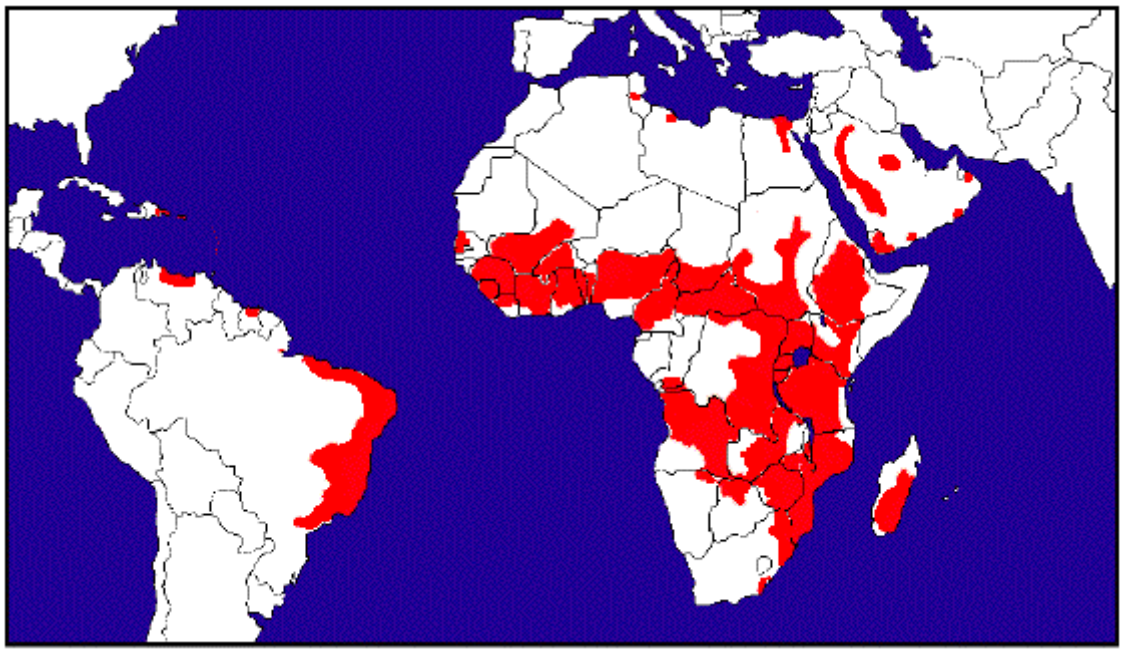

Figura 3 - Distribuição da esquistossomose mansônica no mundo. Fonte: (http://www.path.cam.ac.uk/~schisto/schistosoma/schisto_distribution.html)

O *S. haematobium* é encontrado em grandes partes da África, partes da Arábia, o Oriente Médio, província de Khuzestan no Irã, Madagáscar e Ilhas Maurícias, (Figura 4) enquanto que *S. japonicum* é encontrado no Extremo Oriente, particularmente na China e nas Filipinas (Figura 5).

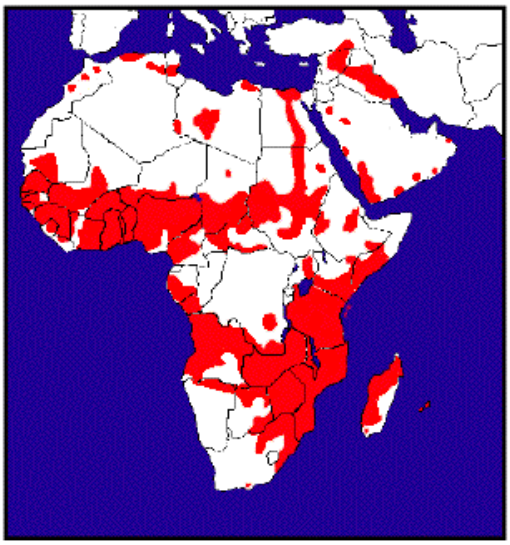

Figura 4 - Distribuição da esquistossomose haematobia no mundo. Fonte: (http://www.path.cam.ac.uk/~schisto/schistosoma/schisto_distribution.html)

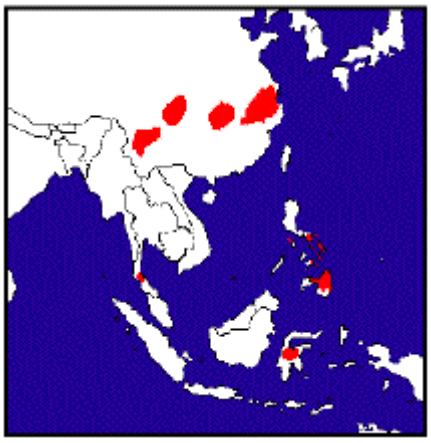

Figura 5 - Distribuição da esquistossomose japônica no mundo. Fonte: (http://www.path.cam.ac.uk/~schisto/schistosoma/schisto_distribution.html)

As duas primeiras espécies causam fibrose hepática e intestinal crônica enquanto a ultima, *S. haematobium*, afeta o trato urinário e rins, bem como o sistema reprodutivo (van der Werf *et al.*, 2003).

No Brasil existem casos e focos registrados nos estados do Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Distrito Federal, Mato Grosso, Goiás, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Figura 6).

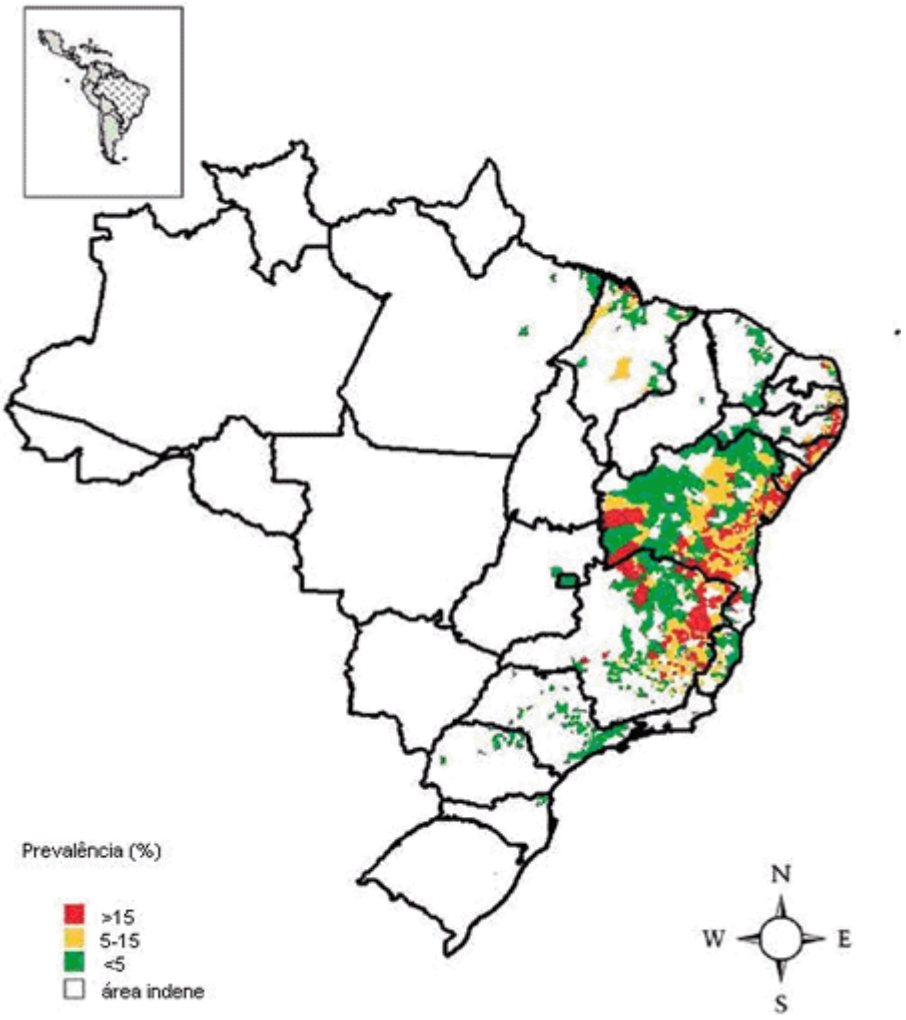

Figura 6 - Distribuição da esquistossomose no Brasil. (Fonte: Gerência do Programa Nacional de Controle da Esquistossomose/Secretaria de Vigilância em Saúde/MS. 1998)

Os primeiros focos de esquistossomose no estado de São Paulo ocorreram a partir das migrações, nas primeiras décadas do séc. XX e depois mais intensamente na década de 70, de populações vindas de Estados do Nordeste (Bahia, Pernambuco, Alagoas e Sergipe) e de alguns do Sudeste como Minas Gerais, as quais se fixavam em áreas sem infra-estrutura urbana, sem saneamento e com coleções hídricas com espécies de caramujos transmissores (CVE, 2009).

Da década de 70 até o presente, o Estado de São Paulo, em seus intensos trabalhos realizados para prevenção e controle da doença, conseguiu promover uma

redução importante da doença adquirida em suas coleções hídricas por meio da vigilância, da assistência médica e medidas ambientais (CVE, 2009). Foram também identificados e tratados os casos importados, isto é, aqueles residentes em território paulista, porém procedentes de outros Estados endêmicos do Brasil (CVE, 2009).

Essa redução da doença permite agora partir para um novo estágio de controle e vigilância, que é tentar eliminar a transmissão em suas coleções hídricas, e com isso acabar com a doença adquirida no Estado (CVE, 2009).

Na década de 80, cerca de 20 mil casos eram notificados a cada ano. Na década de 90, esse número baixou para pouco mais de 10 mil casos notificados ao ano, e nos últimos anos registra-se em média um total de 2 mil casos por ano, 10% deles autóctones (CVE, 2009).

Dados de levantamento planorbídico – isto é, identificação da existência de localidades com caramujos da esquistossomose - mostram que 248 municípios entre os 645 existentes no estado de São Paulo, possuem criadouros das espécies transmissoras em suas coleções hídricas, constituindo-se em potenciais focos de risco à doença, especialmente em locais com problemas de saneamento, em áreas de periferia urbana ou rurais (CVE, 2009).

Entre estes municípios, 170 registraram casos autóctones (contraídos no próprio território) nos últimos cinco anos, sendo as regiões de maior prevalência da doença as do Vale do Ribeira, Vale do Paraíba, Litoral Norte e Baixada Santista, Grande Campinas e alguns municípios da Grande São Paulo, incluído o município de São Paulo (CVE, 2009).

1.3. Sintomas

A esquistossomose mansônica apresenta-se inicialmente assintomática na maior parte das pessoas. Em alguns casos pode surgir eritema (vermelhidão),

reação de sensibilidade com urticária (dermatite cercáriana) prurido e pele rosada ou pápulas na pele no local penetrado, que duram alguns dias (Rey, 2001). Sintomas inespecíficos como febre, calafrios, tosse e dores musculares podem começar após 1-2 meses da infecção. Podem também ocorrer sintomas predominantemente intestinais (cólicas intestinais, diarréia e/ou disenteria). Nas formas mais graves, há hepatoesplenomegalia, hipertensão portal, formação de granulomas, fibrose periportal, lesões cardiopulmonares, dentre outras lesões. Os sintomas da esquistossomose são causados pela reação do organismo aos ovos produzidos pelos vermes, e não pelos vermes em si (Rey, 2001).

1.4. O ciclo da esquistossomose

A esquistossomose possui um ciclo de vida complexo que envolve um hospedeiro intermediário, um molusco aquático (do gênero *Biomphalaria*) e um hospedeiro definitivo, vertebrado (homem e outros mamíferos) (Figura 7) (Hagan *et al.*, 2004). É causada por um parasita do gênero *Schistosoma,* podendo cinco espécies parasitar o homem: *S. haematobium, S. intercalatum, S. japonicum, S. mansoni e S. mekongi.* Na América a única espécie de interesse médico é a *S. mansoni* (WHO, 2002).

O *S. mansoni* pertence à família *Schistosomatidae*, classe *Trematoda*, subclasse *Digenea*. Os trematódeos do gênero *Schistosoma* distinguem-se dos outros *Digenea* por apresentarem os sexos separados, diferentemente dos demais representantes da subclasse, que são hermafroditas (Rey, 2001).

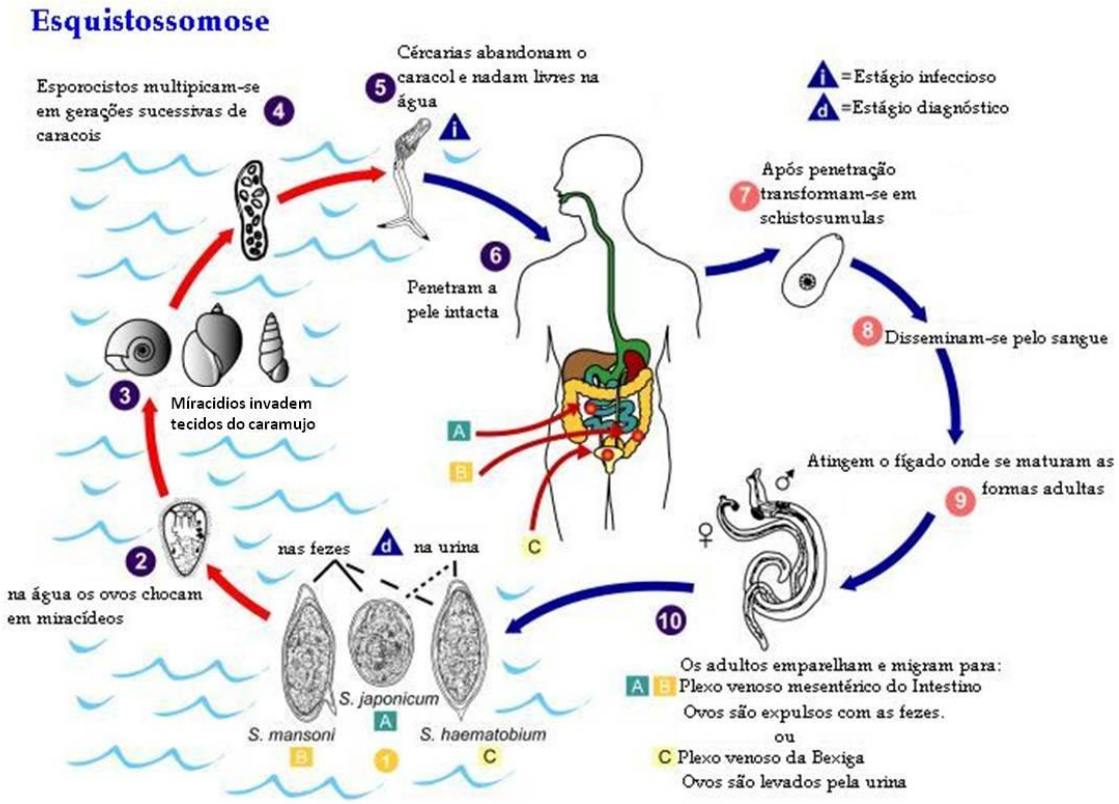

Figura 7 – Ciclo de vida da esquistossomose. Fonte: CDC

Tipicamente o *S. mansoni* passa por cinco estágios larvários (além do **ovo**): **miracídios,** formas unicelulares ciliadas, que, após a eclosão do ovo em meio líquido, nadam durante algumas horas em busca do molusco hospedeiro adequado para o seu desenvolvimento; **esporocisto primário e esporocisto secundário**, formas unicelulares que se dividem assexualmente no interior do molusco, dando mais tarde origem às formas multicelulares; **cercárias**, que abandonam o molusco e constituem a forma infectante para o homem e outros vertebrados (Rey, 2001).

As cercárias, com 500 µm comprimento, são as formas larvares multicelulares com caudas bífidas que abandonam o caracol e penetram a pele dos seres humanos. Uma vez que se estabelece o contato da cercária com na pele de seu

hospedeiro vertebrado (homem) a cercária inicia um processo ativo de penetração (Rey, 2001).

A capacidade invasora das cercárias depende de um esforço mecânico de penetração e da ação química exercida pela secreção das glândulas cefálicas de penetração. Nessa secreção encontram-se proteases, ou um complexo de enzimas que são ativas contra as glicoproteínas da pele. Entre os extratos das camadas da pele é aberto um túnel por onde penetra o corpo da cercária, que deixa para trás sua cauda destacada. A penetração demora 2 a 15 minutos, ao mesmo tempo em que as cercárias se transformam em **esquistossômulos**, o último estágio larvário (Rey, 2001).

A permanência do esquistossômulo na pele limita-se a dois ou três dias, ao fim dos quais o parasita, se não foi destruído pelos mecanismos de defesa do hospedeiro, acaba por penetrar em um vaso cutâneo e é passivamente arrastado pela circulação em direção aos pulmões (Rey, 2001).

Do pulmão, os esquistossômulos vão para o coração e são enviados pela circulação geral a todas as partes do organismo. O parasita começa a se alimentar de plasma sanguíneo e migra então para a veia porta hepática para completar seu desenvolvimento e se tornar sexualmente maduro. Assim, no estado de **vermes adultos**, migram para as vênulas da parede intestinal, preferencialmente as vênulas do plexo hemorroidário superior e ramificações mais finas das veias mesentéricas, particularmente da mesentérica inferior (Rey, 2001).

Os vermes adultos machos medem aproximadamente 1 cm (0,6-1,1 cm) de comprimento e 0,1 cm de largura (Machado-Silva *et al.*, 1995). São brancos e possuem uma ventosa oral e outra ventral. A parte externa do verme é composta por uma bicamada dupla, que é continuamente renovada à medida que a camada

externa, conhecida como o membrano-cálice (*membranocalyx*), é descamada continuamente (Braschi *et al.*, 2006). O aparelho genital masculino é composto por 6-9 massas testiculares, situadas dorsalmente. Há um canal deferente no início de cada testículo, que é ligado a um único canal deferente, que se dilata para formar um reservatório, a vesícula seminal, localizada no início do canal ginecóforo. A cópula acontece por meio da coaptação dos orifícios genitais masculino e feminino (Rey, 2001).

A fêmea tem um corpo cilíndrico, mais longo e mais fino que o macho (1,2-1,6 cm de comprimento por 0,016 centímetros de largura). A fêmea possui uma cor mais escura, devido à presença de hemozoina em seu tubo digestivo (Oliveira *et al.*, 2005); este pigmento é derivado da digestão do sangue do hospedeiro. O ovário é composto por células hexagonais germinativas (ovócitos) com cordões de células com um núcleo central; tais células apresentam diferentes estágios de maturação (Neves *et al.*, 2005). O ovário é levemente lobulado e está localizado na metade anterior do corpo. Um pequeno oviducto conduz para o que continua para a tuba uterina. Mais anteriormente, uma região dilatada da tuba uterina é chamada de ootipo, composto de células cilíndricas com bases entrançadas e núcleos com cromatina flácida. Apenas um dos ovos foi observado no útero de cada vez. O útero termina em um poro genital situado abaixo da ventosa ventral (Neves *et al.*, 2005).

O tubo digestivo começa na extremidade anterior do verme, na parte inferior da ventosa oral. O tubo digestivo é composto por um esôfago que se divide em dois ramos (direito e esquerdo) e que se reúne em um único ceco. Os intestinos terminam cegamente, o que significa que não há um ânus.

As fêmeas põem seus **ovos** nas veias mesentéricas (Rey, 2001). Os ovos são elípticos com cerca de 60 µm e têm uma espícula lateral afiada, que lesa os

tecidos do hospedeiro quando são expelidos. Os miracídios imaturos no seu interior secretam enzimas que geram uma resposta imune ocasionando um granuloma.

Depois de atravessarem a parede dos vasos e a mucosa intestinal, e serem evacuados com as fezes, os ovos, devem chegar a tempo útil a alguma coleção de água doce, eclodem e libertam suas larvas ou miracídios reiniciando seu ciclo biológico.

1.5. Diagnostico e Tratamento

O diagnostico laboratorial da esquistossomose mansônica recomendado pela OMS é o método de Kato-Katz (Katz *et al.*, 1970; Katz *et al.*, 1972) por ser um método sensível rápido e de fácil execução. É feito através do diagnostico coproscópico da presença de ovos *S. mansoni* nas fezes do paciente. Ensaios Sorológicos - ELISA (Rabello, 1997; Pardo *et al.*, 2007), FAST ELISA (Hancock e Tsang, 1986), Dot ELISA (Rabello *et al.*, 1993), indirect hemagglutination assay (IHA) (Van Gool *et al.*, 2002) e *Immunoblot* (Al-Sherbiny *et al.*, 1999) – bem como ensaios moleculares – PCR (Pontes *et al.*, 2002; Abath *et al.*, 2006), RT-PCR em tempo real (Gomes *et al.*, 2006; ten Hove *et al.*, 2008) ou *oligochromatographic* - PCR (OC-PCR) (Akinwale *et al.*, 2008) podem ser usados como métodos auxiliares.

Atualmente, existem duas drogas disponíveis para o tratamento da infecção por *S. mansoni*, praziquantel e oxamniquina, Tais drogas são consideradas equivalentes em relação à eficácia e segurança. Devido ao custo acessível (U$ 0,30) e a fácil administração (dose única por via oral), praziquantel se apresenta mais disponível do que outros esquisonticidas (Hagan *et al.*, 2004; Fenwick e Webster, 2006).

A dose recomendada é: praziquantel, 60 mg/kg de peso corporal para crianças até 15 anos de idade, e 50 mg/kg de peso corporal em adultos; oxamniquina, 15 mg/kg para adultos e 20 mg/kg para crianças até aos 15 anos de idade. O objetivo do tratamento é curar a doença e evitar a evolução da fase aguda para a forma crônica da doença.

Esta estratégia controla a morbidade, mas não confere imunidade aos pacientes tratados. Freqüentemente os indivíduos tratados que vivem em regiões endêmicas se re-infectam. Assim, a solução deste grande problema de saúde pública, além da implementação em larga escala de saneamento básico, reside no desenvolvimento de novas terapias e/ou vacinas que possam ser acessíveis e eficazes na população mundial que vive em zonas endêmicas.

1.6. A interação parasita-hospedeiro na esquistossomose

Esquistossomose é provavelmente uma das doenças mais antigas da humanidade. Sua cronicidade e transmissão por contato com água contaminada são adequadas para manter a infecção em porções relativamente pequenas e isoladas de seres humanos e acompanhar a evolução humana. Sendo assim, acredita-se que o parasita e o hospedeiro co-evoluiram, limitando a morbidade e prevenindo a morte do hospedeiro. Isso requer uma complexa interação parasita-hospedeiro para manter o equilíbrio e permitir a transmissão contínua do parasita sem efeitos deletérios para o hospedeiro (King, 2001).

O parasita apresenta um sofisticado sistema de escape do sistema imune de seus hospedeiros, o que lhe permite habitar os vasos do sistema circulatório, por longos períodos. Uma das formas de escape envolve a expressão de antígenos de

superfície e modificação da resposta imune do parasita (Salzet *et al.*, 2000). Já foi determinado que um dos fatores de modificação desta resposta se dá através de um mecanismo ativo de interferência do parasita na síntese de citocinas (Angeli *et al.*, 2001), ou através da indução da apoptose de células de defesa do hospedeiro (Chen *et al.*, 2002). Existe também interferência dos hormônios do hospedeiro definitivo no desenvolvimento do parasita, efetivada por meio de receptores para hormônios humanos existentes no parasita (Osman *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2009).

1.7. Importância do Pareamento na Maturação do Verme Adulto

Além de sua capacidade de viver por décadas no sistema sanguíneo de seus hospedeiros vertebrados, *Schistosoma* representa a única classe de trematódeos com vida dióica (Knobloch *et al.*, 2006). Um contínuo pareamento com o macho é essencial para a maturação sexual do sexo feminino (Popiel e Basch, 1984; Kunz, 2001b; Grevelding, 2004) e para manter a atividade reprodutiva e produção de ovos (Kunz, 2001b; LoVerde, 2002; Hoffmann, 2004).

Vermes adultos fêmeas provenientes de infecções unissexuadas ("*single-sex*") são subdesenvolvidos, apresentam atrofia do tamanho e um sistema reprodutivo imaturo. Em particular, o vitelino, cujas células produzem os precursores da casca e os nutrientes do ovo, não é desenvolvido (LoVerde *et al.*, 2009). No nível molecular, a síntese de DNA aumenta 4-5-vezes quando as fêmeas de infecções unissexuadas são re-pareadas com vermes machos, indicando atividade mitótica associada com o desenvolvimento do vitelino (Knobloch *et al.*, 2006). Macho e fêmea possuem um contato íntimo ao longo de todo o canal ginecóforo do macho. Tal pareamento ocorre quando ambos ainda são imaturos, quando a fêmea se acomoda totalmente

dentro do canal ginecóforo do macho (Platt *et al.*, 1991). Tal associação íntima é necessária para o crescimento, o desenvolvimento reprodutivo e a produção de ovos contínua.

1.8. Projeto Genoma e Transcriptoma do *Schistosoma mansoni*

O genoma do *S. mansoni* possui 363 milhões de bases dispostas em oito pares de cromossomos, sete pares autossômicos e um par de cromossomos sexuais (Berriman *et al.*, 2009). A fêmea do *S. mansoni* é heterogamética (ZW), e o macho é homogamético (ZZ). O sexo é determinado no zigoto por um mecanismo cromossomal.

Os primeiros estudos estimavam que o genoma possuísse um conteúdo GC de 34% (Hillyer, 1974); apresentava 4-8% de seqüências altamente repetitivas, 32-36% seqüências moderadamente repetitivas e 60% de seqüência cópia única (Simpson *et al.*, 1982). Numerosos elementos altamente ou moderadamente repetitivos haviam sido identificados e sugeriam que 30% do DNA era repetitivo (Le Paslier *et al.*, 2000). Estimava-se que existiam 15-20.000 genes expressos.

Em 2000, a primeira biblioteca genômica de *Schistosoma* foi construída em vetor BAC, a seqüências das extremidades dos insertos de 93 clones foi determinada, e a biblioteca com mais de 21 mil clones foi imobilizada em membranas de nylon e usada para experimentos de hibridização (Le Paslier *et al.*, 2000). Até 2003 haviam sido obtidas 16.813 seqüências de fragmentos de genes expressos (ESTs), um esforço de alguns grupos no mundo, incluindo um consórcio internacional financiado pela OMS (Franco *et al.*, 1995; Machado-Silva *et al.*, 1995; Franco *et al.*, 1997; Rabelo *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 1999; Merrick *et al.*, 2003).

Entre maio de 2001 e agosto de 2002 foram geradas 163.586 ESTs (Expressed Sequence Tags) pelo projeto "*Schistosoma mansoni* EST Genome", financiado pela FAPESP e pelo CNPq, e as sequências foram tornadas públicas em 2003 (Verjovski-Almeida *et al.*, 2003). Os ESTs foram agrupados em um conjunto não-redundante de 30.988 SmAEs (Schistosoma mansoni Assembled EST sequences).

Utilizando o conjunto dos dados de SmAEs gerados, foi estimado que cerca de 92% dos 14000 genes previstos do *Schistosoma mansoni* tiveram fragmentos seqüenciados no projeto. Análises complementares indicam que vários destes genes apresentam diversos padrões de expressão nas diferentes fases do ciclo de vida do parasita (Verjovski-Almeida *et al.*, 2003). Este projeto gerou um repositório de grande potencial para seleção e análise de genes críticos para o desenvolvimento e sobrevivência do parasita, que ainda permanece bastante inexplorado.

Em 2009, foram publicados os genomas do *S. mansoni* e *S. japonicum*, descrevendo 11.809 e 13.469 genes, respectivamente (Berriman *et al.*, 2009; Zhou Y, 2009). A análise do genoma do *S. mansoni* destacou expansões na família das proteases e deficiências no metabolismo de lipídeos; ambas as observações podem ser relacionadas diretamente ao ciclo de vida do parasita. Os resultados abrem caminho para pesquisas sobre novos alvos de tratamento.

1.9. Tecnologia de Microarranjos no estudo do transcriptoma de *S. mansoni*

Microarranjos de cDNA são uma tecnologia promissora para uma maior compreensão e elucidação da expressão gênica diferencial em diversos tecidos e organismos que se apresentam em situações normais e patológicas. Esta tecnologia possibilita uma visão do funcionamento dos organismos como um todo, uma vez que ela proporciona uma imagem da expressão de milhares de genes simultaneamente.

A principal aplicação desta técnica, atualmente, é o monitoramento da expressão gênica para diagnósticos, e para os estudos de farmacogenômica - desenvolvimento de novas drogas, bem como uma maior compreensão dos pacientes que respondem ou não a uma terapia, dentre outras aplicações (Heller, 2002).

Milhares de fragmentos de cDNA são depositados em alta densidade em lâminas de vidro, utilizando-se uma máquina robotizada (por exemplo o *Generation III Microarrays Spotter*™ da Amersham), que opera em alta velocidade e precisão, produzindo assim as lâminas.

As lâminas com as sondas de cDNA depositadas e imobilizadas são hibridizadas com amostras de cDNA fita simples marcado fluorescentemente pela incorporação de Cy3-dCTP ou Cy5-dCTP (Amersham Pharmacia Biotech). Este último cDNA é gerado a partir do RNA extraído das células e tecidos nos quais se deseja caracterizar o nível de expressão dos genes. Amostras que foram submetidas a diferentes condições podem ser comparadas, possibilitando a determinação de padrões de alteração na expressão gênica em diversas condições.

Dois trabalhos pioneiros foram publicados utilizando a tecnologia de microarranjo para analisar a expressão gênica em larga escala de *Schistosoma*, um deles realizado na Inglaterra por Hoffmann e equipe, descreve que através de microarranjos de cDNA (com uma lâmina que possuía sondas para 576 fragmentos) foram identificados 16 novos genes relacionados à maturação sexual, sendo que 12 destes genes eram associados a maturação sexual de fêmeas e 4 novos genes associados com machos adultos de *S. mansoni* (Hoffmann *et al.*, 2002). O outro trabalho do mesmo grupo estudou a expressão de genes de *S. japonicum* (Fitzpatrick *et al.*, 2004). Estes microarranjos foram construídos com fragmentos de genes já conhecidos anteriormente à aquisição dos 160.000 ESTs de *S. mansoni*

Embora os estudos pioneiros tenham usado um repertório limitado de genes para a seleção das sondas, estudos mais recentes (DeMarco *et al.*, 2006; Verjovski-Almeida *et al.*, 2007; Fitzpatrick *et al.*, 2009) empregaram um maior repositório de informações de transcrição para gerar mais sondas para as plataformas, permitindo um maior repertório de genes testados em cada experimento.

O aumento na quantidade de informação genética disponível, bem como o desenvolvimento da tecnologia que permita um maior número de sondas a ser depositado na lâmina, permite que todos os genes de *S. mansoni* estejam depositados na mesma plataforma.

O uso de microarranjos é um poderoso recurso a ser explorado para a análise do transcriptoma do *Schistosoma mansoni*. A análise que ele possibilita é capaz de evidenciar genes, vias de transdução de sinal, vias metabólicas vitais para o desenvolvimento do parasita na relação parasito-hospedeiro, bem como mecanismos de escape do parasita frente ao sistema imune do hospedeiro e mecanismos de resistência frente à esquisonticidas. A compreensão destas vias e mecanismos poderá permitir um melhor entendimento das dificuldades de encontrar uma terapia eficaz contra o parasita, além da indicação de outros candidatos para o desenvolvimento de novas drogas e vacinas contra a esquistossomose.

2. Objetivos

Os objetivos deste trabalho podem ser divididos em três grupos:

2.1. Estudo do transcriptoma de vermes adultos de S. mansoni utilizando a plataforma de oligonucleotideos com 44.000 (44K) elementos

2.2. Estudo dos efeitos do pareamento no perfil de expressão gênica de vermes adultos utilizando a plataforma de 4K

- Avaliar os efeitos em curto prazo do pareamento na expressão gênica entre vermes pareados ou mantidos separados de seu respectivo par durante 24 horas
- Avaliar os efeitos em longo prazo do pareamento na expressão gênica entre vermes pareados ou mantidos separados de seu respectivo par durante 13 dias

2.3. Estudo dos efeitos da difusão de proteínas e/ou hormônios secretados pelo macho no meio sobre o perfil de expressão gênica de fêmeas adultas e dos efeitos do contato físico direto de vermes machos e fêmeas adultas utilizando a plataforma de 4 x 44K

- Avaliar os genes possivelmente regulados pela difusão de proteínas e hormônios secretados pelo macho no meio, para os quais a mudança do nível de expressão não dependa da necessidade de contato direto entre o macho e a fêmea.

- Avaliar os efeitos do re-pareamento na expressão gênica entre vermes mantidos pareados durante 13 dias ou mantidos separados por 6 dias e que foram re-pareados durante os próximos 7 dias.

3. Metodologia

3.1. Obtenção do Material Biológico

3.1.1. Cepa Utilizada

Neste trabalho, utilizamos a cepa LE de *S. mansoni*. Esta cepa foi isolada de um indivíduo residente em Belo Horizonte e tem sido mantida pelo Laboratório de Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz, coordenado pela Dra Cibele Gargioni, através de sucessivas infecções em moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata* e hamsters da espécie *Cricetus auratus* (Pellegrino e Katz, 1968).

3.1.2. Infecção de Moluscos

Para manutenção do ciclo de *S. mansoni* foram utilizados moluscos (*B. glabrata*). Estes caramujos são originários de exemplares capturados em Belo Horizonte (Pellegrino e Katz, 1968).

Hamsters infectados com *S. mansoni* foram perfundidos e seus fígados coletados, para a obtenção de ovos do parasita. Tais fígados foram homogeneizados e triturados junto a 100 mL de PBS. A suspensão foi dividida em dois cálices de Hoffman e deixada parar decantar durante 30 minutos. O sobrenadante foi removido e 50 mL de água foram usados parar ressuspender o *pellet*, o cálice foi deixado para decantar por mais 30 minutos. Tal procedimento de lavagem foi repetido duas vezes. O sobrenadante foi descartado, o *pellet*

ressuspendido em 20 mL de água e vertido em uma placa de Petri que permaneceu exposta à luz branda por uma hora (Pino-Heiss *et al.*, 1985).

Logo após a eclosão, os miracídios foram colocados frente a exemplares de *B. glabrata*. Cada molusco foi colocado em contacto com 10 miracídios.

Trinta dias após a exposição aos miracídios, os caramujos foram examinados individualmente para a verificação da liberação de cercárias.

3.1.3. Infecção de Camundongos

Para a infecção, foram utilizados hamsters (*C. auratus*) fêmeas, com aproximadamente 45 dias de vida. Os camundongos foram infectados individualmente, no dorso por via subcutânea com aproximadamente 100 cercárias por animal.

3.1.4. Perfusão e Coleta dos vermes

Quarenta e cinco dias após a infecção os hamsters foram sacrificados por inalação de CO_2. A técnica de perfusão de camundongos utilizada para obtenção dos vermes adultos foi descrita por (Brener e Pellegrino, 1956)

3.1.5. Extração de ovos de *S. mansoni* e de miracídios livres de contaminação do tecido do hospedeiro

O protocolo de extração de ovos baseia-se na publicação de Dalton e colaboradores (Dalton *et al.*, 1997). Três a quatro fígados de hamsters infectados com *S. mansoni* foram lâminados em pequenos pedaços com uma lâmina de bisturi e então misturados a 50 mL de tampão fosfato (PBS), para obter uma suave consistência. A suspensão foi decantada em tubo cônico de 50 mL (Falcon). Foi adicionado ao tubo 20 mg de colagenase B (Gibco #17101), 100 µL (10 µg) de

penicilina e 100 µL (20 µg) de estreptomicina. Tal mistura foi incubada com agitação a 37°C durante 16 horas. O tubo foi então centrifugado a 400 g por 5 minutos; o sobrenadante removido e o *pellet* ressuspendido em 50 mL de PBS fresco. Este procedimento de lavagem foi repetido mais duas vezes, sendo que após a última centrifugação o *pellet* foi ressuspendido em 25 mL de PBS. A mistura ressuspensa passou por uma peneira de 250 µm, e então por uma peneira de 150 µm. O filtrado foi centrifugado a 400 g por 5 min, e o sobrenadante descartado. O sedimento foi ressuspendido em 3 mL de PBS e aplicado no topo de uma coluna Percoll, preparada pela mistura de 8 mL de Percoll com 32 mL de sacarose 0,25 M em um tubo cônico (Falcon) de 50 mL.

O tubo foi centrifugado a 800 g por 10 min. As células do fígado permaneceram no topo da coluna de Percoll e foram removidas com uma pipeta Pasteur. Os ovos do *S. mansoni* sedimentaram no fundo do tubo, e foram removidos com uma pipeta Pasteur. Os ovos foram lavados 3 vezes com PBS contendo EDTA 1 mM, EGTA 1 mM em um tubo de 10 mL a 30 g. Os quelantes de metal foram incluídos para inativar a colagenase B. As células residuais de fígado foram removidas pelo descarte do sobrenadante. Uma purificação adicional dos ovos foi realizada com a ressuspensão dos ovos em 0,5 mL de PBS e aplicação em uma segunda coluna de Percoll, preparada através da mistura de 2,5 mL de Percoll com 7,5 mL de sacarose 0,25 M em tubo cônico de 10 mL (Falcon). Os ovos foram sedimentados e lavados como descrito anteriormente, com exceção dos tampões de lavagem que continham EDTA e EGTA.

Os ovos foram adicionados a 0,5 mL de água destilada em um tubo de microcentrífuga e expostos a uma luz brilhante (Pino-Heiss *et al.*, 1985). Miracídios eclodiram dentro de 15 minutos, e o sobrenadante foi removido a cada 30 minutos

durante o período de 2 horas e substituído por água fresca. Os sobrenadantes contendo os miracídios foram agrupados, resfriados em gelo (Miracídios perdem a mobilidade em água fria e afundam) e recuperados pela centrifugação a 15.000 g por 20 segundos a 4°C.

3.2. Cultivo de esquistossômulos por 7 dias

O procedimento a seguir baseia-se na metodologia de Basch (1981). Primeiramente colocamos os meios ELAC e M-169 em banho a 37 ºC e os tubos cônicos (Falcon) de 50 mL com cercárias no gelo por 30 minutos. Os tubos foram então centrifugados por 1 ou 2 minutos a 201 g a 4 ºC. Sobrenadante foi despejado de uma vez em béquer com etanol absoluto (descarte). A partir deste ponto toda a manipulação foi feita dentro de um fluxo lâminar em condições estéreis. Um mL de ELAC foi adicionado ao 1º tubo contendo o *pellet* de cercária. O *pellet* foi misturado à solução de forma delicada para dissolver o *pellet*. O conteúdo foi transferido deste 1º tubo para o 2° tubo contendo as cercárias e misturado delicadamente. Este procedimento foi repetido até o 5º tubo. Ao final, o conteúdo desses cinco tubos foi colocado em um tubo cônico (Falcon) de 15 mL (tubo A). Novamente um mL do meio ELAC foi adicionado ao 1º tubo e todo o procedimento repetido até o 5º tubo. O conteúdo foi transferido para o tubo (A). Os tubos cônicos (Falcon) de 50 mL foram descartados em um béquer de descarte. O tubo (A) foi selado com parafilme e o vórtex ajustado a máxima agitação. O tubo foi agitado por 1 minuto e meio no vórtex, para quebrar as caudas das cercárias (transformação mecânica). O conteúdo foi deixado decantar por alguns minutos. O sobrenadante foi retirado, deixando apenas um pouco do meio (onde estão os corpos de cercárias); é de total importância lembrar-se de não tocar no *pellet* decantado. Foram adicionados 5 mL de ELAC no

tubo cônico (Falcon) de 15 mL (A). O conteúdo foi homogeneizado com uma pipeta 5 vezes (devagar, sem borbulhar) e deixado sedimentar por 5-6 minutos. O sobrenadante foi retirado novamente. As lavagens foram repetidas até que todos os corpos cercárianos estivessem livres das caudas. Os tubos foram trocados, para evitar contaminação e continuar as lavagens. Foram colocados aproximadamente de 10 a 20 mL (dependendo da quantidade de corpos cercárianos) do meio M-169 em garrafa(s) estéril(eis). Para retirar os esquistossômulos dos tubos cônicos (Falcon) de 15 mL, foi adicionado 1 mL de M-169 em cada tubo e misturado por pipetagem, transferindo para a garrafa estéril. As garrafas foram deixadas na estufa a 37 º C por 7 dias.

Após sete dias de cultura, as garrafas foram deixadas em pé, aproximadamente por 5 minutos, para que as larvas (esquistossômulos) sedimentassem. Parte do meio utilizando foi retirada com uma pipeta. O meio restante (aproximadamente 10 mL) foi transferido para um tubo cônico (Falcon) de 15 mL e centrifugado por 1 minuto a 201 g. O meio foi retirado e adicionamos aproximadamente 5 mL de solução salina (0,85%) ou PBS no tubo cônico (Falcon). O tubo foi centrifugado novamente e as larvas foram transferidas para microtubo (Eppendorf) contendo *RNAlater* (1,5 mL). O tubo foi deixado na geladeira por 24 horas e após este período foi transferido para um freezer a – 20 ºC.

3.3. Cultivo de *S. mansoni in vitro* por 24 horas

Após a perfusão dos hamsters, os vermes foram imediatamente transferidos para meio de cultura *Advanced RPMI 1640*, não estéril, a 37 ^{o} C. Vermes pareados ou machos e fêmeas separadas foram mantidos em placas de cultura 150m (Corning, # 430599) utilizando 30 mL de meio de cultura *Advanced Medium RPMI*

1640 (Gibco, # 12633-012) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor, 2% de HEPES (4 - (2 hidroxietil) piperazina-1-etanossulfonico) pH 7,4, e 1% da mistura de antibiótico / antimicótico para cultura de células (Gibco, # 15240-096).

Vermes foram lavados três vezes com o meio *Advanced RPMI 1640* suplementado e mantidos a 37°C e 5% CO_2 durante 24 horas em uma estufa. Um número máximo de 100 vermes foi mantido por placa.

Após 24 horas os vermes de cada uma das culturas foram examinados no microscópio; para as culturas de macho e fêmea não pareados apenas os que permaneceram vivos foram coletados e no caso da cultura de vermes pareados, apenas os que permaneceram pareados e vivos foram coletados.

Os vermes coletados foram colocados em uma solução de *RNALater* (Ambion # AM7020) com o auxilio de uma pinça em forma de gancho e armazenados em microtubos (Eppendorf). Os tubos foram deixados na geladeira por 24 horas e após este período foram transferidos para um freezer a – 20 º C.

3.4. Cultivo de *S. mansoni in vitro* por 13 dias

Após a perfusão dos hamsters, os vermes foram imediatamente transferidos para meio de cultura *Advanced RPMI 1640*, não estéril, a 37 ^{o}C. Vermes foram agrupados em 5 cinco grupos diferentes: 1- Vermes pareados, 2- Fêmeas adultas separadas, 3 – Machos adultos separados, 4 – Vermes (machos e fêmeas) que permaneceram separados (dia 1-6) e ficaram na presença um do outro sem contato físico (dia 7-13), 5 – Vermes (machos e fêmeas) que permaneceram separados (dia 1-6) e foram repareados (dia 7-13). Os vermes dos diversos grupos foram mantidos em placas de seis poços (BD Falcon # 353046) sendo que cada poço continha 5 mL

de meio de cultura *Advanced Medium RPMI 1640* (Gibco, # 12633-012) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor, 2% de HEPES pH 7,4, e 1% da mistura de antibiótico / antimicótico para cultura de células (Gibco, # 15240-096).

Os vermes foram lavados três vezes com o meio *Advanced RPMI 1640* suplementado e mantidos a 37°C e 5% CO_2 durante 13 dias em uma estufa. O meio de cultura foi trocado nos dias 2, 5, 7, 9 e 12. O re-pareamento ocorreu no sexto dia de incubação e para tal os vermes machos foram colocados na presença de fêmeas. Para o experimento em que os vermes ficaram no mesmo meio, mas sem contato físico utilizamos um inserto para cultura celular com poros de 8 µm (BD BioCoat # 353093) para manter as fêmeas de um dos dois lados do compartimento, sem contato físico com os machos que estavam separados pelo inserto poroso, mas possibilitando a troca entre os dois compartimentos de meio e substâncias secretadas. Um número máximo de 20 vermes foi mantido por poço.

Após 24 horas os vermes de cada condição estudada foram recolhidos com uma pinça em forma de gancho e armazenados em microtubos (Eppendorf) contendo *RNAlater* (Ambion # AM7020). Os tubos foram deixados na geladeira por 24 horas e após este período foram transferidos para um freezer a – 20 º C.

3.5. Extração de RNA total

Para extração de RNA total os vermes foram descongelados, o *RNAlater* foi retirado e cada amostra foi lavada duas vezes com 2 mL de água DEPEC.

Para os ensaios *in vitro* durante 24 horas os vermes foram homogenizados com o disruptor de tecidos Heidolph Diax 900 utilizando o dispersor - Modelo 6F. O RNA total foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies # 15596-

026) de acordo com o protocolo de extração de RNA total descrito pelo fabricante. O RNA total final foi ressuspendido em 30 µL de água DEPC.

Para os ensaios *in vitro* de 13 dias os vermes foram homogenizados com o disruptor de tecidos Silent Crusher M (Heidolph) utilizando o dispersor - Modelo 6F. O RNA total foi extraído utilizando o *RNeasy Mini Kit* de acordo com o protocolo de extração de RNA total descrito pelo fabricante (Qiagen # 74104). O RNA total final foi eluido em 30 µL de água DEPC.

3.6. Quantificação e purificação do RNA total

A dosagem das amostras foi realizada no espectrofotômetro UV-Vis *Nano Drop 6000* (Thermo Scientifc) usando 1,5 µL de cada amostra de RNA total. O sistema de retenção de amostras elimina a necessidade de cubetas ou capilares, o que diminui a quantidade de amostra necessária para a quantificação. A tensão superficial é utilizada para manter uma coluna de amostra de líquido no local enquanto uma medição é feita.

Em seguida, as amostras foram purificadas em colunas de troca iônica e tratadas com DNAse utilizando os *RNAse-free DNAse set* (Qiagen # 79524) e *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, # 74104). A integridade do RNA total foi verificada utilizando *Agilent 2100 Bioanalyzer* (*Agilent Technologies*), uma eletroforese capilar microfluídica (tecnologia *Lab-on-a-Chip* da *Agilent)*. O programa do equipamento *Bioanalyzer* analisa a qualidade das amostras baseado no padrão das bandas do RNA ribossomal 28S e 18S e confere uma nota denominada RIN (*RNA Integrity Number).* As amostras de *S. mansoni* apresentam somente a banda do RNA ribossomal 18S. Isso ocorre devido a um pequeno *gap* na molécula de RNA ribossomal 28S; essa interrupção faz com que o RNA se dissocie em dois fragmentos de mesmo tamanho (2000pb aproximadamente) o que resulta em uma corrida com apenas uma banda

detectável próxima a 18S (van Keulen *et al.*, 1985). Sendo assim o RNA total de *S. mansoni* é considerado de boa qualidade quando apresenta uma banda íntegra de 18S, ou seja, sem a presença de arraste.

3.7. Ensaios Realizados em lâminas de microarranjos em plataforma de 4K

3.7.1. Obtenção, purificação e deposição em lâmina de produtos de PCR para *microarrays* de DNA em lâmina de vidro

Utilizou-se a coleção de clones da biblioteca de cDNA previamente sequenciada pelo grupo ((Verjovski-Almeida *et al.*, 2003) para amplificação por PCR dos insertos de genes selecionados, e sua deposição nas lâminas. As amplificações foram feitas diretamente a partir de cultura de células bacterianas da biblioteca, em placas de 96 poços, em um volume total de reação de 100ul. A reação de PCR foi preparada na seguinte concentração: $MgCl_2$ 1,5 mM, Taq Buffer 1x, dATP 0,2 mM, dGTP 0,2 mM, dCTP 0,2 mM, dTTP 0,2 mM, Taq polimerase 1 U/100 μl , *primer* T7 100 pmol/100 μl, *primer* SP6 100 pmol/100 μl . A reação de PCR foi feita em um Termociclador *DNA engine PTC-225* (MJ Research) segundo um programa de 40 ciclos de desnaturação a 95 ^{o}C por 2 minutos, anelamento a 60 ^{o}C por 1 minuto, polimerização a 72 ^{o}C por 3 minutos, finalizada por incubação a 72 ^{o}C por 10 minutos.

Após este processo foi realizada a purificação dos produtos de PCR, utilizando para tal a placa de 96 poços *MultiScreen – PCR Plates* (Millipore - #Manu 030). As amostras foram colocadas sobre a placa e centrifugadas a 2252 g por 4 minutos. Após descartar o filtrado, as amostras (já aderidas na placa) foram lavadas quatro vezes com 200 μL de água destilada e deionizada estéril (no mesmo tempo e centrifugação do passo anterior). Para recuperar os produtos de PCR 50 μl de Tris

10 mM foram colocados em cada poço, a placa foi colocada em agitador automático por 5 minutos e logo após os 50 μl onde estavam os produtos de PCR foram recuperados aspirando-os pelos poços (sem centrifugação). Os produtos foram então submetidos à eletroforese em gel de agarose, as imagens foram capturadas utilizando o programa *Liscap* (GE Biosciences) e os fragmentos de DNA quantificados utilizando o programa *Imagemaster total lab 2.01* (GE Biosciences).

Para a confecção dos arranjos de DNA, os produtos de PCR purificados foram manualmente rearranjados das placas de 96 poços para placas de 384 poços. No processo de rearranjo, 15 μL de produto de PCR purificado foram misturados com igual volume de DMSO. O conjunto de produtos de PCR foi depositado automaticamente por um robô em posições fixas pré-determinadas sobre lâminas espelhadas tipo 7 silanizadas, usando o equipamento *Generation III Microarranjos Spotter*™ (Amersham Pharmacia Biotech). Após a deposição dos fragmentos de DNA, as lâminas foram submetidas a 50 mJ de luz UV para imobilização do DNA por *cross-linking* e armazenadas em dessecador. Como um controle de qualidade do processo de manufatura dos arranjos, uma das lâminas de cada lote foi corada com *VistraGreen*® (Amersham Biosciences) e seus sinais foram quantificados somente para a verificação de que a deposição ocorreu de forma aproximadamente homogênea por toda a lâmina.

Além dos cDNAs de *Schistosoma* amplificados foram também depositados nas lâminas amostras controle do sistema *Scorecard Universal Lucidea*™ (Amersham Biosciences, EUA). Este sistema é composto por 23 genes sintéticos de regiões intergênicas de leveduras que funcionam como genes controle. Estes genes foram hibridizados com dois tipos de RNA controle, fornecidos pelo kit, denominados “spikes”, que foram adicionados às amostras de RNA testadas. As amostras do

sistema *scorecard* foram utilizadas de acordo com a metodologia recomendada pelo fabricante.

Os controles do *scorecard* são categorizados como:

- Controles de calibração: permitem a avaliação da faixa de abrangência e sensibilidade do sistema;
- Controles de razão: servem como referência para medir a expressão diferencial entre os microarranjos. Os controles de razão são fornecidos em diluições de modo que representem baixos e altos níveis de expressão dos microarranjos;
- Controles de utilidade: permitem que se estime a eficiência do processo de marcação e a ausência de contaminantes inibidores da marcação no RNA mensageiro purificado; também podem ser utilizados como controles negativos ou controles adicionais de razão e calibração.

3.7.2. Síntese, amplificação e marcação de cRNA

500 ng de RNA total, previamente tratados com DNAse foram utilizados para a obtenção de cRNA amplificado e marcado com Cy3 e Cy5, utilizando o kit *SuperScript Indirect RNA Amplification System (*Invitrogen*, # L1016-02)*. Para a análise da expressão gênica foram realizadas hibridizações com as duas populações distintas (tratadas e não tratadas). As amostras foram marcadas com os dois fluoróforos e hibridizadas na mesma lâmina, de modo a obter uma réplica técnica no mesmo experimento (*dye-swap*). A **Figura 8** esquematiza as etapas do processo de amplificação de RNA.

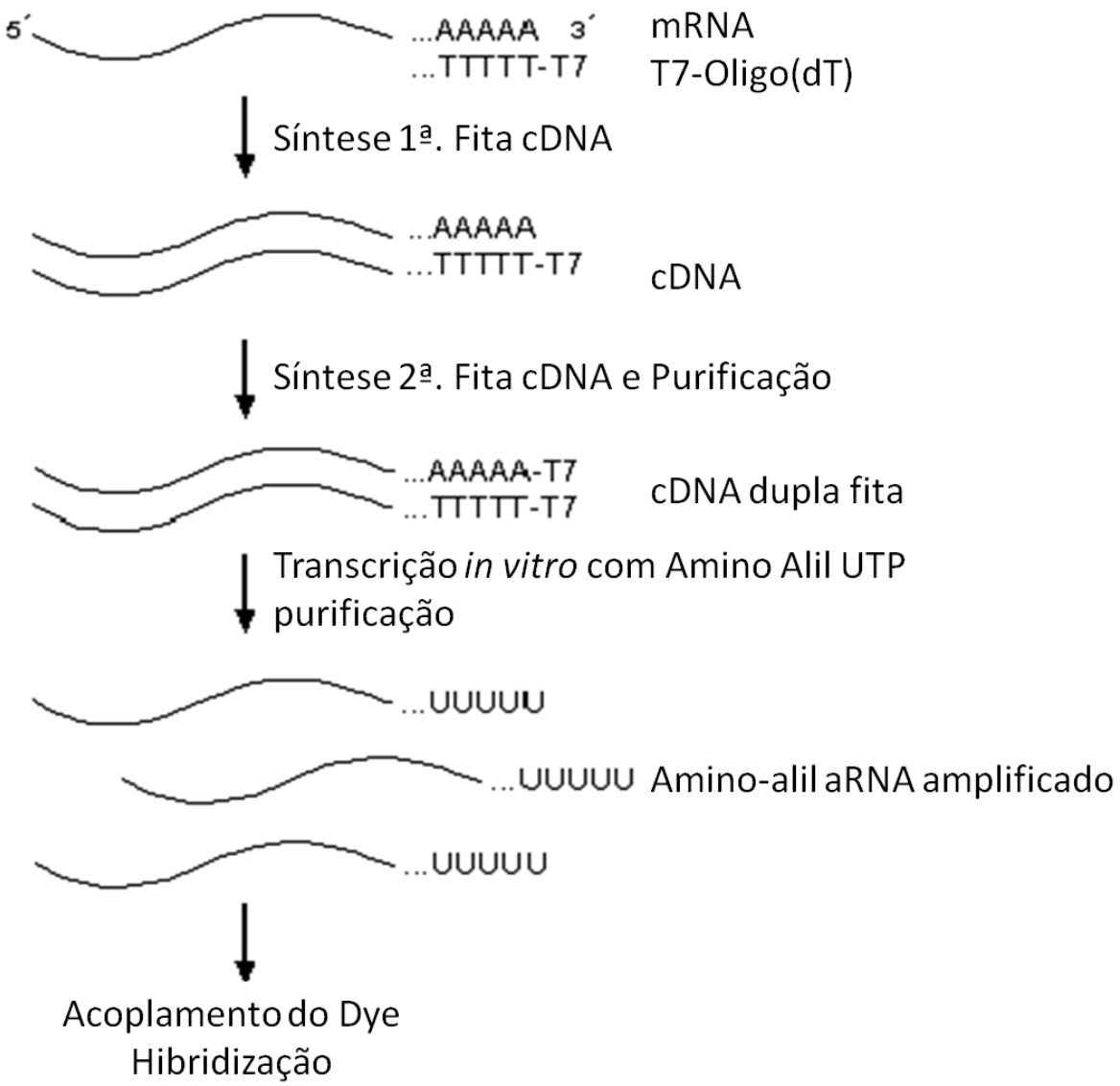

Figura 8 – Representação esquemática das etapas do processo de amplificação de RNA utilizando a metodologia e reagentes fornecidos pela empresa *Invitrogen Corporation*.

3.7.3. Hibridização das amostras

As sondas marcadas e secas foram ressuspendidas com 28,75 μL de água mili-Q tratada com dietil-pirocarbonato (DEPC). A sonda marcada com Cy3 foi misturada com a marcada com Cy5, fornecendo um volume total de 57,5 μL. Foram adicionados 57,5 μL de tampão de hibridização (*Microarray Hybridization Buffer*®-

Amersham Biosciences) e 115 μL de formamida. As soluções foram incubadas a 92°C por 2 min e colocadas em gelo logo em seguida. A lâmina de vidro foi limpa com nitrogênio e colocada na câmara do hibridizador automático ASP (Amersham). Os 230 μL de solução contendo as sondas marcadas foram aplicados com uma seringa na câmara do aparelho ASP. A hibridização ocorreu por 16h, a 42°C e, após este tempo, foram efetuadas automaticamente as lavagens na seguinte ordem: uma vez em 1 x SSC, 0,2 % SDS 10 minutos a 55°C, duas vezes em 0,1 x SSC, 0,2 % SDS por 10 minutos a 55°C, uma vez em 0,1 x SSC por 1 minuto em temperatura ambiente, seguidos por 1 minuto em água mili-Q e secagem imediata com jato de nitrogênio.

A leitura dos sinais foi feita utilizando-se o *scanner* 4000B (Molecular Devices). Os arquivos obtidos foram nomeados de acordo com o código de barras das lâminas e a voltagem utilizada na fotomultiplicadora (PMT).

3.7.4. Processamento de imagens e Normalização

Os dados numéricos das intensidades de cada gene foram extraídos das imagens com o programa *ArrayVision 8.0* (Imaging Research Inc.) utilizando-se a medida de densidade MTM (Média truncada com base na mediana, *Median-based Trimmed Mean*) e subtraindo-se o valor da intensidade de fundo.

Para corrigir um desvio sistemático dos dados originados a partir de pequenas diferenças na eficiência de marcação e/ou detecção entre os corantes fluorescentes, as razões de intensidade (pareado/não-pareado) foram transformadas para log (base 2) e normalizadas usando um algoritmo local de regressão linear (LOWESS) (Yang e Speed, 2002b).

Cada lado da lâmina foi tratado como um ponto (metade esquerda e direita da lâmina, onde existem réplicas do mesmo gene). Realizamos a média das duas

réplicas técnicas, uma vez que elas são réplicas com inversão de cor (*dye-swap*). O *dye-swap* é feito para eliminar os efeitos de incorporação diferente dos dois corantes, e para eliminar este efeito totalmente fizemos a média das duas medidas.

3.8. Ensaios Realizados em lâminas de microarranjo em plataforma 4 x 44K

3.8.1. Especificações das lâminas comerciais 4 x 44K *Agilent Technologies*

Uma nova plataforma de microarranjos de oligonucleotídeos foi desenhada por nosso grupo e fabricada sob encomenda pela *Agilent Technologies*, com aproximadamente 44.000 sondas representando todos os fragmentos de genes expressos de *S. mansoni* conhecidos. Por meio da tecnologia *Agilent* esta plataforma possibilita a hibridização de quatro experimentos de microarranjo simultaneamente em uma lâmina, que possui quatro conjuntos completos de sondas, cada um com 44 mil sondas de oligonucleotídeos *60-mer*, fixados em sub-compartimentos separados na lâmina. O grande número de sondas combinado com uma anotação extensiva das seqüências disponíveis permitiu uma abordagem compreensiva na qual a maior parte do transcriptoma do *S. mansoni* foi representada (Verjovski-Almeida *et al.*, 2007)

Para o desenho das sondas que constituiriam esta plataforma de oligonucleotídeos, o Dr. Thiago Motta Venâncio, na época aluno de doutorado de nosso grupo de pesquisa, utilizou todas as seqüências de ESTs e mRNA de *S. mansoni* e *S. japonicum* do *GeneBank,* além da montagem parcial do genoma de *S. mansoni* disponível no *site* do Wellcome Trust Sanger Institute (http:// www.genedb.org/genedb/smansoni/). As seqüências foram filtradas contra contaminantes (elementos de transposição, DNA mitocondrial, DNA ribossomal,

DNA de *Biomphalaria* e DNA humano) e montadas a fim de formar um consenso, sendo para tal utilizado o programa CAP3. *Contigs* resultantes desta montagem foram nomeados C8XXXXX e *singlets* foram nomeados C9XXXXX, onde X representa qualquer dígito.

Os *contigs* e *singlets* gerados foram submetidos à busca no banco nr do GeneBank utilizando BLASTx, para atribuir a orientação das mensagens. O alinhamento com maior pontuação foi utilizado para anotação de uma possível função e para a atribuição da fita codificante, na qual a sonda foi projetada (fita +). Para cada um destes *contigs* ou *singletes* foram selecionadas todas as seqüências *60-mer* que satisfaziam uma série de condições que foram estabelecidas pela *Agilent Technologies* (Hughes *et al.*, 2001) descritas a seguir: as sondas não deveriam ter 8 ou mais bases derivados de regiões repetitivas do genoma ou trechos homopoliméricos de 7 ou mais bases (baixa complexidade); conteúdo GC de 35-55% e temperatura de fusão (Tm) de 68-76°C.

A fim de reduzir hibridizações cruzadas não-específicas foi feita uma busca das sondas de *60-mer* por BLASTn contra as seqüências do genoma *S. mansoni*, obtidas do Instituto *Wellcome Trust Sanger*. Para passar por esta filtragem a sonda deveria apresentar um alinhamento perfeito e não alinhar em outra posição do genoma com *bit-score* maior que 42,1. O valor de corte com *bit-score* de 42,1 corresponde a um alinhamento sem lacuna (*gap*) de no máximo 21 bases. Sondas comerciais com *bit-score* maiores que 42,1 por hibridação cruzada contra o segundo melhor alinhamento são utilizadas nas plataformas comercias da *Agilent* de *oligoarrays* humanos, uma vez que a *Agilent* testou cada uma das suas sondas individualmente para a ausência de hibridação cruzada (Hughes *et al.*, 2001). Uma

vez que não testamos nossas sondas de forma individual, optou-se por utilizar esse parâmetro de corte conservador para as sondas personalizadas de *S. mansoni*.

Os *contigs* ou *singletes* sem nenhum alinhamento contra o banco nr foram anotados como *no match*, e um par de sondas simples-fita foi desenhado, uma para cada fita (fita + e fita -). Para alguns *contigs* e *singletes* só foi possível desenhar a sonda de uma única fita que atendesse aos critérios estabelecidos pela Agilent. Na outra fita todas as sondas falharam nos testes de regiões não-repetitivas, conteúdo de CG, etc. e para estes transcritos só incluimos no *array* a sonda em uma única fita.

A fim de incluir possíveis novos genes de *S. mansoni* que possuíssem seqüências ortólogas expressas em *S. japonicum*, mas que ainda não haviam sido clonadas e seqüenciadas em *S. mansoni*, foi adotada a seguinte estratégia: as seqüências de RNA de *S. japonicum* do *GenBank* foram reunidas e submetidas à uma pesquisa tBLASTx contra a montagem de transcritos de *S. mansoni.* Aquelas que já estavam representadas no conjunto de ESTs de *S. mansoni*, ou seja, que apresentavam alinhamento contra os ESTs de *S. japonicum* com e-*value* inferior a 1×10^{-05} foram descartadas. As demais seqüências foram consideradas seqüências de *S. japonicum* sem transcrição correspondente na base de dados pública de *S. mansoni*, sendo candidatas de um novo gene de *S. mansoni*. A fim de obter as seqüências de *S. mansoni*, correspondentes a essas transcrições, as seqüências de *S. japonicum* foram submetidas a uma busca BLASTn contra a montagem do genoma (versão 3) de *S. mansoni*, obtida no *Wellcome Trust Sanger Institute*. Foram selecionados os *loci* genômicos de *S. mansoni* que produziram um alinhamento com no mínimo 100 pares bases e possuíam uma identidade superior a 70%. Alternativamente, tBLASTx foi usado, e seqüências genômicas de *S. mansoni* foram selecionadas quando apresentaram duas *HSPs* com e-*value* máximo de 0,005.

Estas regiões conservadas do genoma do *S. mansoni* foram então utilizadas no processo de desenho de sonda para o *oligoarray*.

Um conjunto de 2256 controles positivos e negativos das sondas comerciais *Agilent* (IS-44.290-1-V1_eQC-V1) foi projetado pela empresa para os *oligoarrays*. Os controles negativos no *oligoarray* (1198 sondas *Agilent* de controle comercial) incluíram seqüências de transcritos do adenovírus E1A, mRNAs sinteticamente gerados, genes de *Arabidopsis* e sondas controle projetadas para não hibridizar com os alvos devido a formação de estruturas secundárias.

Os *oligoarrays* de 44 mil sondas foram impressos de forma personalizada pela *Agilent Technologies*. Todas as seqüências e anotações, bem como as informações estão disponíveis em http://verjo18.iq.usp.br/thiago/Agilent-schisto/cgi-bin/agilentSearch.pl.

A empresa *Agilent Technologies* utiliza a tecnologia *SurePrint* para a fabricação dos microarranjos. Tal tecnologia é uma poderosa combinação de algoritmos de design de sondas e métodos validados altamente flexíveis. Essa metodologia se baseia na impressão a jato de tinta (*inkjet*) industrial, em que monômeros são uniformemente depositados em lâminas de vidro especialmente preparadas (Figura 9). Este processo de síntese *in situ* permite a deposição de base por base de cada sonda de *60-mer*, a partir de arquivos digitais contendo as seqüências desejadas (eliminando a necessidade de clones físicos de cDNA).

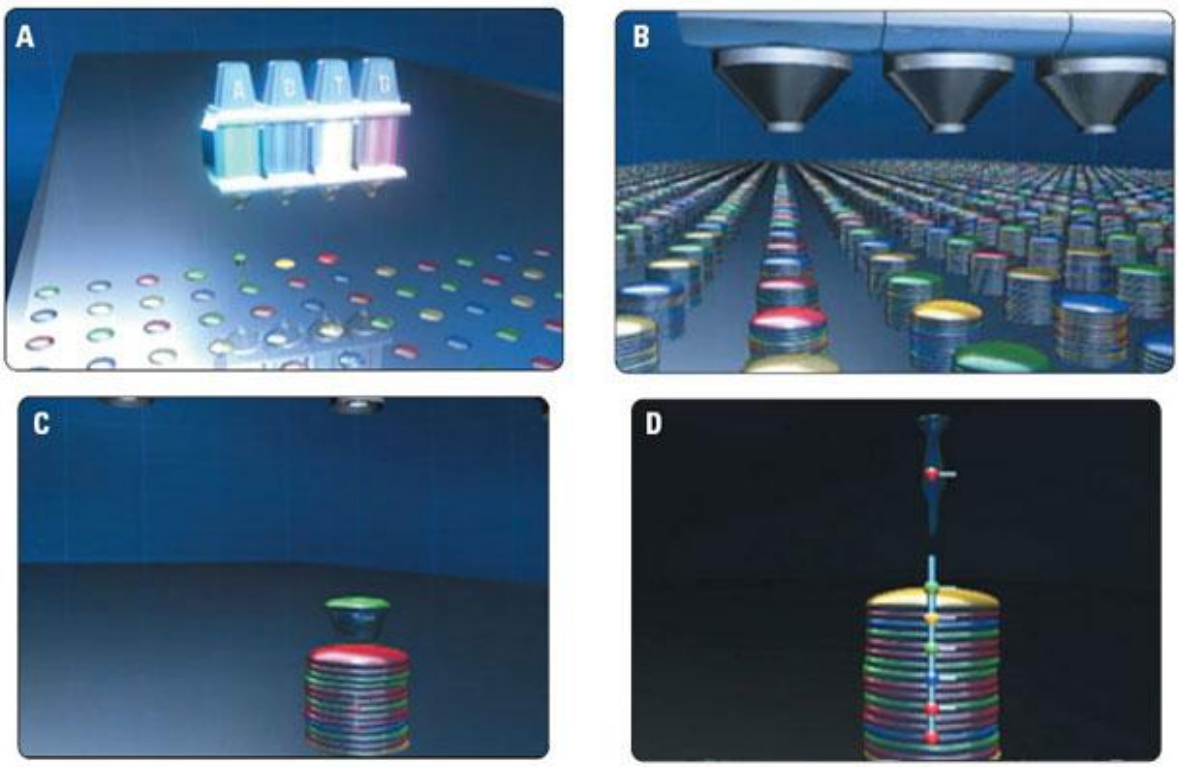

Figura 9 - Mecanismo geral do processo de síntese de sondas de *60-mer* através da tecnologia de impressão *inkjet.* A: a primeira camada de nucleotídeos é depositada sobre a superfície do microarranjo ativado. Cada local corresponde a uma sonda, e o nucleotídeo alí depositado é determinado pela seqüência daquela sonda. B: O crescimento da síntese do oligonucleotídeo em cada ponto ocorre após várias camadas de nucleotídeos serem precisamente impressas de acordo com a seqüência desejada. C e D: Adição de um oligonucleotídeos à cadeia. Fonte: *Agilent Technologies*

O ciclo de síntese dos oligonucleotídeos começa quando o primeiro nucleótido de cada oligo é impresso na superfície de vidro ativada do microarranjo. Em reações de síntese por fosforamidita, os sítios reativos nos nucleotídeos são bloqueados com grupos químicos (DMT – Dimetoxitritil) que podem ser removidos de forma seletiva. Isto permite que as bases possam ser adicionadas à cadeia de oligonucleotídeos de forma controlada, uma base por vez. Após a primeira base ser

impressa, o grupo tritil que protege o grupamento hidroxila 5' do nucleotídeo é removido (de-tritilação) resultando em um grupamento hidroxila 5' livre na primeira base. O próximo nucleosídeo fosforamidico a ser depositado é ativado por um catalisador (agente oxidante). Esse nucleosídeo é colocado em contato com o oligonucleotídeo cujo grupamento hidroxila 5' livre reage com a molécula fosforamidita formando uma ligação fosfito-triéster (acoplamento). Após a conclusão da reação de acoplamento, uma pequena percentagem do grupamento hidroxila 5' permanece sem reagir e necessita ser bloqueada para permitir o elongamento de oligonucleotídeos somente nas cadeias corretas. É realizada uma acetilação dos grupamentos hidroxila 5' que não tenham reagido. A ligação triester recém-formada não é natural e possui estabilidade limitada. A lâmina é tratada com iodo e água na presença de uma base fraca (piridina, lutidina ou colidina) oxidando a ligação fosfito-triéster em fosfato triéster tetracoordenado, estabilizando a ligação. Entre cada etapa, o excesso de reagentes é retirado para impedir que eles reajam posteriormente de forma aleatória na síntese Esse processo é mostrado de maneira simplificada na Figura 10. O processo de impressão de um nucleotídeo seguido pela de-tritilação, acoplamento, oxidação e lavagem é repetido 60 vezes. Após a última base ser impressa na cadeia de oligonucleotídeos, o microarranjo é submetido a um passo final de desproteção.

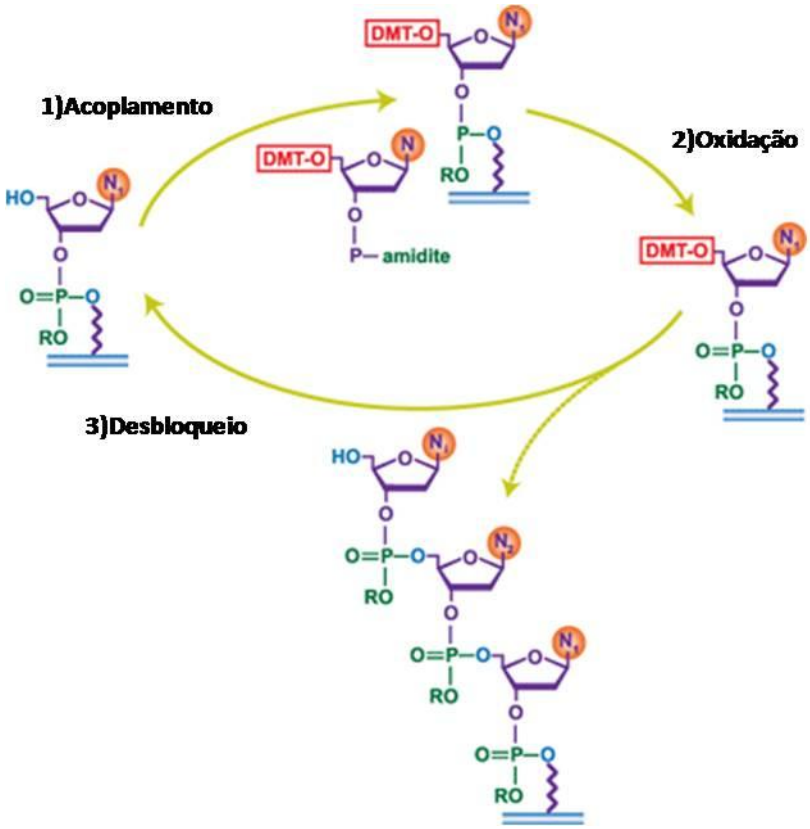

Figura 10 - O ciclo geral simplificado da síntese de oligonucleotídeos via fosforamidita. O processo é repetido 60 vezes. Fonte: *Agilent Technologies*

A descrição das seqüências e sua disposição na lâmina por nós desenhada estão depositadas na base de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information* - http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) no repositório GEO (*Gene Expression Omnibus*) com o número de acesso GPL4791.

3.8.2. Síntese, amplificação e marcação de cRNA

300 ng de RNA total, previamente tratados com DNAse, foram utilizados para a obtenção de cRNA amplificado e marcado com Cy3 e Cy5, utilizando o kit *Quick Amp Labeling Kit - Two colors (*Agilent Technologies, # 5190-0424). O cRNA obtido foi purificado com *RNeasy Mini Kit*(Qiagen # 74104) de acordo com o protocolo

descrito pelo fabricante. A **Figura 11** esquematiza as etapas do processo de amplificação de RNA utilizando o kit.

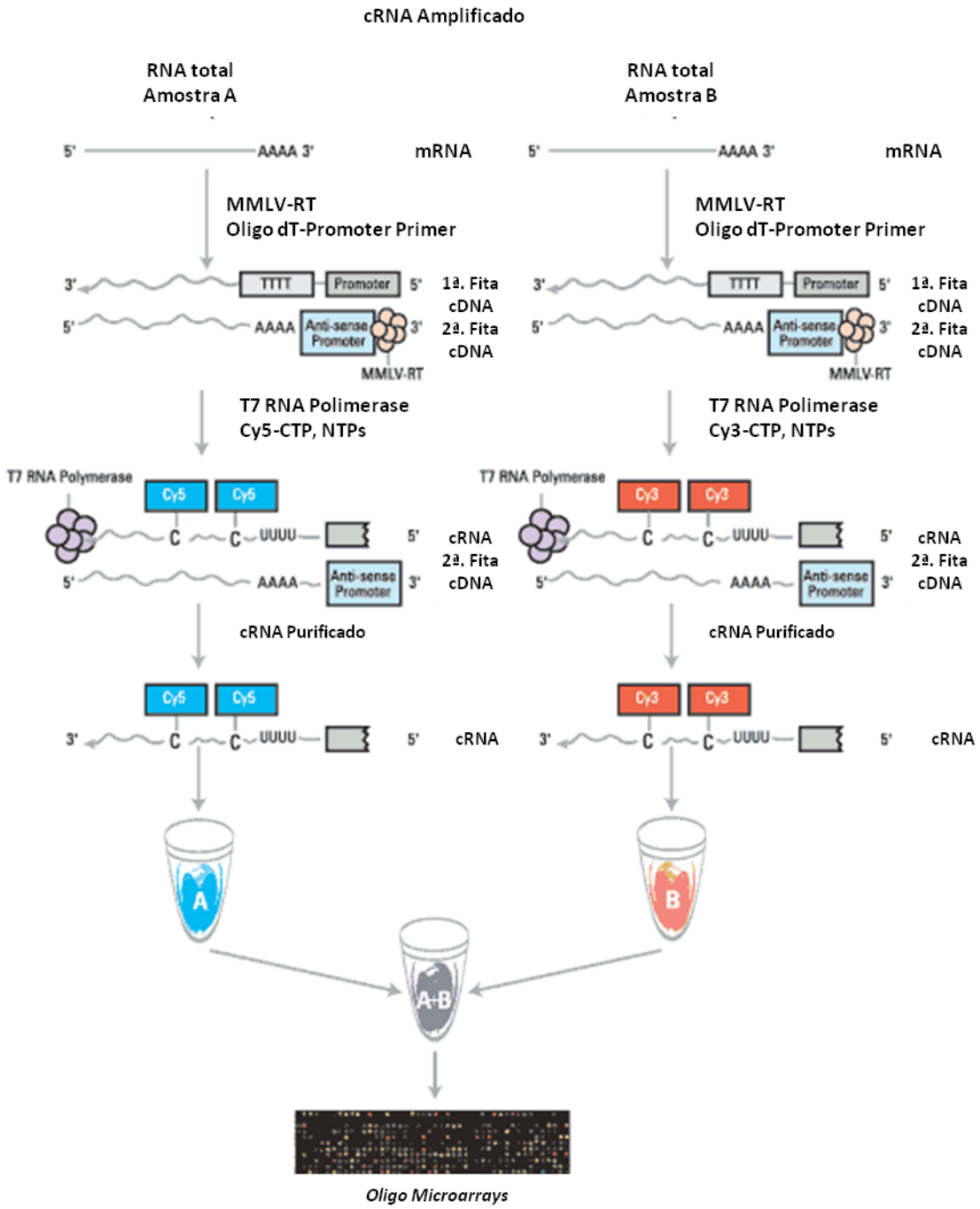

Figura 11 – Representação esquemática das etapas do processo de amplificação de RNA utilizando a metodologia e reagentes fornecidos pela empresa *Agilent Technologies*.

3.8.3. Hibridização das amostras e lavagem das lâminas

Para cada lâmina de microarranjo, cada um dos componentes a seguir foi adicionado a um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL livre de nuclease: 825 ng de cRNA amplificado e marcado com Cy3, 825 ng de cRNA amplificado e marcado com Cy5, 11 µL de 10x b*locking agent*, 2 µL de 25x *fragmentation buffer* e quantidade suficiente de água para que a reação tivesse um volume final de 55 µL. A preparação foi incubada a 60°C por exatamente 30 minutos para fragmentar o cRNA e imediatamente resfriada no gelo durante um minuto. Foram adicionados 55 µL de 2x *GEx Hybridization Buffer HI-RPM* à preparação para interromper a reação de fragmentação. Para cada hibridização foi colocada uma lâmina de vedação (*gasket)* na base da câmara de hidridização (*Agilent SureHyb)* com o rótulo da lâmina voltado para cima e alinhado com a seção retangular da base da câmara. Lentamente, foram dispensados 100 µL de amostra de hibridização sobre o poço da lâmina de vedação. O procedimento de dispensar as amostras foi repetido quatro vezes, com quatro amostras diferentes, uma vez que trabalhamos com lâminas 4 x 44 mil.

Em seguida, foi colocado sobre a lâmina de vedação um microarranjo com o "lado ativo" voltado para baixo, de modo que a etiqueta com código de barras "*Agilent*" ficasse voltada para baixo e o código de barras numérico voltado para cima. A câmara *de hibridização* foi montada e fechada com um conjunto de grampos. Neste protocolo, o volume de solução é menor do que o volume da câmara, e restam bolhas que se movimentam ao se manter a câmara sob agitação durante a hibridização, o que assegura a distribuição homogênea do líquido de hibridização; cada câmara foi verificada para avaliar a mobilidade das bolhas. As câmaras de hibridização foram incubadas sob agitação de 10 rpm, a 65°C por 17 horas. Após o período de hibridização as lâminas foram lavadas conforme as

recomendações da *Agilent Tecnologies* para ambiente com altas concentrações de ozônio (> 5ppb).

3.8.4. Processamento de imagens e Normalização

As lâminas foram lidas no *scanner Gene Pix 4000B* (Molecular Devices), utilizando a função *Auto PMT* a qual determina as voltagens dos fotomultiplicadores (PMTs) dos canais Cy3 e Cy5 de forma que a razão das intensidades dos canais fique próxima de 1. Quando há a digitalização de várias áreas, o *Auto PMT* é calculado separadamente para cada área.

Os dados foram extraídos utilizando o software *Agilent Feature Extraction*.

As medidas da intensidade da fluorescência em cada canal de cor da imagem podem ser distorcidas durante os passos de obtenção de dados, principalmente durante a marcação e a hibridização das amostras. Logo, com propósito de fazer o ajuste de variações técnicas para garantir a confiabilidade nas comparações entre os resultados obtidos de diferentes lâminas de microarranjos, foram utilizadas técnicas de normalização dos dados. Os dados foram normalizados utilizando a média truncada (*trimmed*) da intensidade das amostras, isto é, excluídos os 20% de valores de cada extremo.

3.9. Análise de genes diferencialmente expressos

A análise estatística dos genes diferencialmente expressos foi realizada utilizando o programa SAM (*Significance Analysis of Microarrays*) (Tusher *et al.*, 2001). O método atribui um *score* para cada gene com base nas mudanças do nível de expressão gênica em relação ao desvio padrão das réplicas. Para genes com *scores* superiores a um corte ajustável, o SAM realiza permutações para encontrar a

porcentagem de genes que seriam encontrados ao acaso e usa essa permutação para estimar o *False Discovery Rate* (FDR) (Tusher *et al.*, 2001).

A estatística é similar ao *teste t-student*, com exceção do fator de correção, o qual torna o teste mais conservador, o que é muito importante em experimentos de microarranjos nos quais o número de réplicas biológicas é baixo. Cada conjunto analisado foi permutado a fim de calcular a distribuição nula do mesmo, sendo possível assim calcular a probabilidade de que a expressão diferencial seja atribuída de forma aleatória.

É importante ressaltar que o filtro de *fold-change* foi usado após a identificação dos genes diferencialmente expressos e assim nossos resultados não estão afetados por um erro sistemático que aconteceria caso fossem usados parâmetros de corte antes de realizar os testes de significância (Larsson *et al.*, 2005).

3.10. Anotação funcional dos genes diferencialmente expressos

3.10.1. Análise por Ontologia Gênica

O projeto GO (Gene Ontology) é um consórcio entre vários centros de pesquisa na área do genoma. O objetivo desse projeto é fornecer um conjunto de vocábulos estruturados para um domínio biológico específico que possa ser usado para descrever produtos de genes em um organismo e comparado com o conjunto de outros organismos. A ontologia abrange três domínios; ***componentes celulares***, as partes de uma célula ou seu ambiente extracelular; ***função molecular***, as atividades elementares de um produto de gene a nível molecular, como processo de catálise ou atividade de ligação (*binding activities*) ou; e ***processos biológicos***, operações ou séries de eventos moleculares com um começo e um fim definidos, pertinentes ao funcionamento de células, tecidos, órgãos e organismos. Um produto gênico pode

estar associado com ou estar localizado em um ou mais componentes celulares; pode ser ativo em mais de um processo biológico, durante isto ele pode ser relacionado a uma ou mais funções moleculares.

O uso dos mesmos termos de GO por várias bases de dados das instituições envolvidas no projeto facilita a pesquisa de informações entre essas bases. Os termos da GO são associados com os produtos de genes através das anotações que são realizadas nas bases de dados dos colaboradores do projeto.

Termos de ontologia gênica foram atribuídos aos genes representados na lâmina, sempre que possível. A anotação foi feita automaticamente usando BLASTx contra o banco de dados de GO (excluindo anotações eletrônicas de GO) com um e-*value* de corte de $1x10^{-10}$. Todos os alinhamentos foram carregados em uma copia local da base de dados de GO, acessível através do *browser* AmiGO (http://verjo18.iq.usp.br/amigo_ag/go.cgi). Enriquecimento dos termos de GO foi calculado usando o programa *Ontologizer* (Robinson *et al.*, 2004; Grossmann *et al.*, 2006) e o *p-value* foi ajustado para múltiplas comparações utilizando o método de Benjamini–Hochberg.

3.11. Reações em cadeia da polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*)

3.11.1. PCR em Tempo Real

1,5 µg de RNA total de cada condição experimental foram utilizadas para a transcrição reversa e síntese de cDNA fita simples. Cada amostra foi transcrita reversamente com *SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix* (Invitrogen), usando as recomendações do fabricante, a 50 ^{o}C por 50 min, com *primer* de oligo-$(dT)_{20}$.

Para a reação de PCR, pares específicos de *primers* (Tabela 12) foram desenhados no programa *Primer Express* usando os parâmetros padrão (Applied Biosystems*) e chamados de forma arbitrária de primers 1 e 2. As reações de* Real-time PCR foram feitas em triplicata em um volume de 20 μL contendo 10 μL de *Sybr Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 160 nmol de cada *primer* (*primer* 1 e 2), 0,30 μL cDNA de uma transcrição reversa. *Real-time PCR* foi realizado no aparelho *7300 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) usando os seguintes parâmetros: 60 ºC por 10 minutos, 95 ºC por 10 minutos, 40 ciclos de 95 ºC por 15 segundos e 60 ºC por 1 minuto, e passo de dissociação de 95 ºC por 15 segundos, 60 ºC por 1 minuto, 95 ºC por 15 segundos, 60 ºC por 15 segundos. Medimos as eficiências de amplificação de cada par de *primers*, através da análise das curvas de variação da intensidade do sinal ao longo dos ciclos, usando o software LinRegPCR (Ramakers et. al., 2003). Dados de *Real-time PCR* foram normalizados em relação ao nível de expressão de actina. *P-values* foram determinados para a triplicata através de teste-t, usando distribuição mono caudal e variância heterocedástica.

3.11.2. PCR em Tempo Real – fita especifica

Amostras de RNA foram tratadas por 1 hora a 37 ºC com 2U de Turbo DNAse (Ambion, #AM2238) para cada μg de RNA. Após o tratamento, as amostras foram purificadas utilizando *RNAeasy kit* (QIAGEN, #74104), de acordo com as instruções do fabricante. Três microgramas de RNA tratado com DNAse foram utilizados para a síntese de cDNA, usando 200 U de Super Script III (200 U/μl, Invitrogen, # 18080-051) e 50 pmol dos *primers* específicos (*primer* 1 ou 2) para uma reação de volume final de 21 μl.

Realizamos dois tipos diferentes de reação de controle negativo para a

reação de transcrição reversa (RT): uma com nenhuma adição de transcriptase reversa na etapa da reação da RT, para assegurar que os amplicons gerados na etapa de PCR não fossem derivados por amplificação de eventual contaminação genômica, e outra reação sem adição do *primer* na etapa da reação do RT, para assegurar que o cDNA resultante não fosse derivado de eventos espúrios de *priming*, o que poderia comprometer a reação de RT fita específica.

Reações de *Real time PCR* foram realizadas em triplicata com um volume final de 20 µl contendo 10 µl de *Sybr Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, #4309155), 10 pmol de cada *primer* (*primer* 1 e 2) (Tabela 5), 0,45 µl de cDNA da transcrição reversa. A reação de *Real time PCR* foi realizada no aparelho *GeneAmp 5700 Sequence Detector* (Applied Biosystems) com um protocolo de 33 ciclos de acordo com as instruções do fabricante. Realizamos uma eletroforese em gel de agarose 3% corado com Brometo de Etídio para identificar os produtos de PCR.

4. Resultados

4.1. Estudo do transcriptoma de vermes adultos de *S. mansoni* utilizando a plataforma de oligonucleotideos com 44.000 (44K) elementos

Um dos primeiros experimentos realizados pelo nosso grupo (em colaboração com o Dr. Ricardo de Marco) foi a análise do perfil de expressão gênica de vermes adultos machos e fêmeas. Os primeiros trabalhos publicados utilizavam uma pequena quantidade de genes nos *arrays* (Hoffmann *et al.*, 2002), enquanto trabalhos mais recentes (DeMarco *et al.*, 2006; Verjovski-Almeida *et al.*, 2007; Fitzpatrick *et al.*, 2009) utilizaram o amplo repertório de informações sobre os transcritos de *S. mansoni* para gerar plataformas com um maior número de sondas (cerca de 4 mil sondas), possibilitando assim, que uma maior quantidade de genes seja testada em um mesmo experimento.

Além destas plataformas, nosso grupo desenhou e utilizou uma nova plataforma de microarranjo de oligonucleotídeos com aproximadamente 44.000 sondas representando os genes de *S. mansoni* (Tabela 1). O grande número de sondas combinado com uma anotação extensiva das seqüências disponíveis permitiu uma abordagem compreensiva onde a maior parte do transcriptoma do *S. mansoni* foi representada.

Tabela 1 – Resumo do oligoarranjo de 44 mil sondas de *S. mansoni*.
[a] Indica o número calculado de genes representados no *oligoarray* após a eliminação de redundância

Numero total de sondas	**39.343**
Sondas de genes que codificam proteínas com função conhecida	6.913
Sondas de genes que codificam proteínas conservadas sem função conhecida	6.957
Sondas para genes “no match”	25.473
Numero total de genes únicos representados [a]	**19.907**
Genes que codificam proteínas com função conhecida	3.677
Genes que codificam proteínas conservadas sem função conhecida	3.935
Genes “no match” com sondas para apenas uma fita	1.375
Genes “no match” com sondas para ambas as fitas	10.920

O perfil de expressão gênica de vermes adultos foi analisado usando um ensaio de microarranjo com 44 mil sondas (Figura 12). O mesmo RNA foi marcado com dois fluoróforos diferentes (Cy3 e Cy5) e o experimento foi realizado em duplicata, resultando em quatro medidas de intensidade para cada sonda. Uma sonda foi considerada positiva quando a medida de intensidade estava acima da media mais três desvios padrão em relação à intensidade media das sondas de controle negativo. O critério para considerar que a sonda de um gene revelava alguma expressão exigia que as quatro réplicas estivessem acima do limite excludente. Baseado neste critério, 7.927 das 39.342 sondas válidas indicavam expressão, o que, depois da eliminação da redundância entre as sondas do *array*, representava 5.798 genes transcricionalmente ativos em verme adulto, em um conjunto de 19.907 genes únicos presentes nesta plataforma.

Análise do grupo dos genes transcricionalmente ativos em vermes adultos mostrou que mais do que a metade (56%) dos genes com função conhecida (*known function*) são transcritos em adultos, enquanto somente 32% e 20% dos genes conservados sem função conhecida e genes "*no matches*" são transcritos, respectivamente (Figura 12). Isto era esperado, pois a maioria dos genes que codificam proteínas de manutenção são altamente expressos, amplamente estudados e apresentam seqüências altamente conservadas entre as espécies, facilitando sua identificação. Conseqüentemente, uma fração dos genes conhecidos deve representar genes *housekeeping* que são expressos durante todo o ciclo de vida do *S. mansoni*. Em contraste, a maioria dos genes "no match" e genes conservados sem função conhecida devem codificar proteínas com funções especializadas, esperando-se que apenas uma fração deles esteja ativa nos vermes adultos. Adicionalmente, deve-se notar que para 1.375 genes "no match" (11% dos genes "no match") somente foi possível desenhar sonda para uma das fitas (Tabela 1), e portanto se espera que em média 50% destes genes estejam representados por uma sonda na fita oposta errada, e que estas sondas não sejam capazes de detectar a transcrição do gene correspondente. Isto contribui para reduzir ainda mais a fração de genes "no match" identificados como expressos.

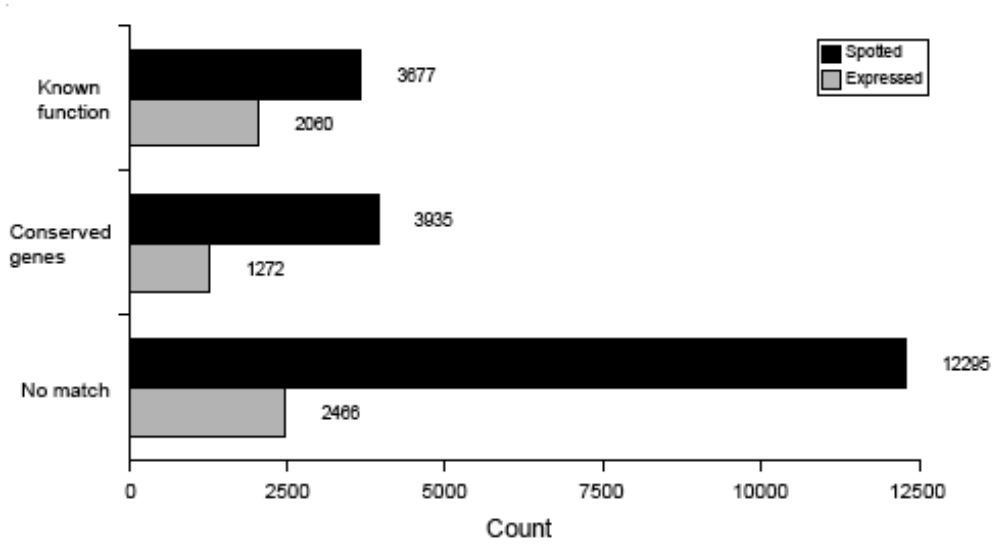

Figura 12 - Genes de *S. mansoni* expressos em vermes adultos, separados por categoria. A categoria “Known function” (função conhecida) representa os genes com função conhecida e/ou anotação dos termos de GO, “Conserved genes” (Genes conservados) são genes de *S. mansoni* com hits de BLASTx para ortólogos de outras espécies, sem função conhecida nem anotação de GO, e os da categoria “”no matches” representam os genes de *S. mansoni* sem função conhecida e sem ortólogos no GeneBank. As barras pretas indicam o número total de genes representados no *oligoarray* de 44 mil sondas (“Spotted” - Depositados) e a barra cinza representa o número total de genes expressos em vermes adultos (“Expressed” - Expressos). Fonte: (Verjovski-Almeida *et al.*, 2007)

A partir dos termos de Ontologia Gênica (*GO – Gene Ontology*) atribuídos a cada gene com função predita no *oligoarray*, foi realizado um cálculo computacional dos termos enriquecidos no conjunto de genes expressos em relação à população de genes com expressão diminuída no *oligoarray* (Tabela 2). Entre os termos GO enriquecidos há alguns relacionados à síntese de proteínas e fosforilação oxidativa. A presença de tais termos era esperada, uma vez que representam genes envolvidos em funções celulares essenciais que codificam um número de proteínas diferentes.

Tabela 2 – Termos GO enriquecidos dentre os genes expressos em vermes adultos de *S. mansoni.* *Adjusted p-value* (*p-value* ajustado) é o *p-value* ajustado utilizando o método Benjamini-Hochberg. *Total Count* (Contagem total) é o número total de genes presentes no *oligoarray* de 44 mil que possuem anotação de GO correspondente. *Study Count* (Número no estudo) é o número total de genes com a anotação de GO correspondentes que foram detectados como transcritos em vermes adultos. Fonte: (Verjovski-Almeida *et al.*, 2007)

ID	Name	Adjusted *p*-value	Total count	Study count
Cellular component				
GO:0031090	Organelle membrane	7.36E−007	319	142
GO:0044429	Mitochondrial part	1.72E−006	242	121
GO:0005840	Ribosome	1.54E−005	173	90
GO:0031975	Envelope	1.65E−005	215	100
GO:0044444	Cytoplasmic part	6.97E−005	1388	499
GO:0043234	Protein complex	8.17E−005	1105	389
GO:0044424	Intracellular part	1.64E−004	3053	952
GO:0031967	Organelle envelope	1.69E−004	215	100
GO:0005622	Intracellular	3.45E−004	3089	959
GO:0005739	Mitochondrion	3.79E−004	488	200
GO:0030529	Ribonucleoprotein complex	6.84E−004	316	134
GO:0044455	Mitochondrial membrane part	0.0028	61	34
GO:0005737	Cytoplasm	0.006454998	1889	638
GO:0015934	Large ribosomal subunit	0.007181034	91	48
GO:0042175	Nuclear envelope-endoplasmic reticulum network	0.017765844	68	32
GO:0044422	Organelle part	0.04219807	1324	433
Molecular function				
GO:0003735	Structural constituent of ribosome	7.36E−007	144	73
GO:0015077	Monovalent inorganic cation transporter activity	3.45E−004	45	23
GO:0019001	Guanyl nucleotide binding	0.035441809	64	25
Biological process				
GO:0009059	Macromolecule biosynthetic process	1.07E−004	400	160
GO:0044249	Cellular biosynthetic process	1.16E−004	517	202
GO:0006119	Oxidative phosphorylation	1.64E−004	43	25
GO:0045184	Establishment of protein localization	1.69E−004	168	70
GO:0006412	Translation	2.81E−004	283	121
GO:0009058	Biosynthetic process	2.81E−004	567	215
GO:0015031	Protein transport	0.00205	159	65
GO:0008104	Protein localization	0.0107	228	80

Foram selecionados os 50 genes que apresentaram o maior valor médio de suas intensidades em todos os experimentos (Tabela 3), o que deve representar os genes mais expressos em vermes adultos. As sondas do *oligoarray* foram desenhadas dentro de um rigoroso conjunto de valores para conteúdo CG e Tm, fazendo com que a cinética de hibridação entre todas as sondas e os seus alvos seja muito semelhante. Portanto, é razoável prever que a intensidade do sinal para cada sonda esteja correlacionada com a abundância do RNA alvo. Não surpreendentemente, muitos dos genes mais expressos codificam proteínas estruturais, proteínas ribossomais, proteínas de choque térmico e proteínas do proteassoma.

Tabela 3 – Cinqüenta genes mais expressos em vermes adultos de *S. mansoni.* As anotações foram baseadas em resultados de BLASTx. Fonte: (Verjovski-Almeida *et al.*, 2007).

Probe	Contig	Class	Annotation	Intensity
Q2_P07062	C812345.1	Conserved	Eggshell protein	2245.561
Q2_P40373	JAP05338.S	Conserved	None	1641.268
Q2_P29302	C903424.1	No match	None	1148.473
Q2_P27006	C812786.1	No match	None	1135.752
Q2_P28562	C902385.1	No match	None	938.164
Q2_P40321	JAP04026.S	Known gene	MGC83152 protein [*Xenopus laevis*]	803.434
Q2_P27886	C901395.1	No match	None	773.918
Q2_P12449	C908554.1	Known gene	Nuclear ribonucleoprotein A2/B1 isoform 2 isoform 18 [*Bos taurus*]	744.022
Q2_P33940	C911708.1	No match	None	674.644
Q2_P16658	C917510.1	Known gene	Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase [*Fasciola hepatica*]	648.146
Q2_P19435	C802155.1	Known gene	Heat shock 90 kDa protein 1, alpha isoform 1 [*Homo sapiens*]	560.274
Q2_P40715	JAP00636.S	Conserved	NADH dehydrogenase subunit 1 [*Fasciola hepatica*]	557.492
Q2_P17622	C920071.1	Known gene	Eelongation factor 1 [*Schistosoma mansoni*]	531.141
Q2_P38863	JAP05506.S	Known gene	Polyubiquitin 2 [*Plasmodiophora brassicae*]	520.791
Q2_P17731	C920575.1	Conserved	Ribosomal protein S27a [*Aedes aegypti*]	495.662
Q2_P22461	C806269.1	Known gene	26S protease regulatory subunit 4 (P26s4) [*Drosophila melanogaster*]	492.253
Q2_P17305	C918995.1	No match	None	473.291
Q2_P40727	JAP01512.S	Conserved	NADH dehydrogenase subunit 4 [*Paragonimus westermani*]	466.265
Q2_P20951	C804177.1	No match	None	443.896
Q2_P39528	JAP04005.C	Conserved	SJCHGC06883 protein [*Schistosoma japonicum*]	437.67
Q2_P19561	C802307.1	Known gene	Pherophorin-C2 protein precursor [*Chlamydomonas reinhardtii*]	428.103
Q2_P07490	C812972.1	No match	None	414.48
Q2_P20541	C803622.1	Conserved	Ribosomal protein rpa6 [*Schizosaccharomyces pombe*]	405.372
Q2_P26635	C812247.1	No match	None	401.633
Q2_P05085	C809309.1	No match	None	394.705
Q2_P07661	C813214.1	No match	None	393.757
Q2_P35752	C915463.1	Known gene	Fibrillin 2	391.333
Q2_P19972	C802829.1	Conserved	Hypothetical protein C06H2.2 [*Caenorhabditis elegans*]	382.591
Q2_P38301	C921042.1	No match	None	368.195
Q2_P24626	C809145.1	Known gene	Myosin regulatory light chain [*Riftia pachyptila*]	354.999
Q2_P18515	C800741.1	Known gene	Alpha-1 tubulin [*Hirudo medicinalis*]	353.071
Q2_P19798	C802605.1	Known gene	Keap1-prov protein [*Xenopus tropicalis*]	348.665
Q2_P41085	JAP04005.C	Conserved	SJCHGC06883 protein [*Schistosoma japonicum*]	348.647
Q2_P18643	C800907.1	Known gene	Acidic ribosomal protein rpA2 [*Drosophila melanogaster*]	339.147
Q2_P38912	JAP06934.S	Conserved	None	325.391
Q2_P10630	C904960.1	No match	None	320.524
Q2_P03411	C806594.1	Conserved	Hypothetical protein GK3462 [*Geobacillus kaustophilus*]	317.363
Q2_P23547	C807732.1	Conserved	Endonuclease-reverse transcriptase [*Schistosoma mansoni*]	313.432
Q2_P34511	C912810.1	No match	None	312.685
Q2_P20643	C803769.1	Known gene	Hypothetical protein F33A8.3 [*Caenorhabditis elegans*]	312.605
Q2_P25864	C811174.1	No match	None	311.375
Q2_P19610	C802367.1	Known gene	Thioredoxin [*Drosophila yakuba*]	299.764
Q2_P18473	C800688.1	Known gene	Mitochondrial ribosomal protein S9 [*Gallus gallus*]	289.901
Q2_P35175	C914191.1	No match	None	285.073
Q2_P41605	JAP07867.S	Known gene	Polyubiquitin with 3 Ub domains [*Cryptosporidium parvum*]	284.335
Q2_P13604	C910817.1	No match	None	283.119
Q2_P03481	C806706.1	No match	None	277.684
Q2_P06993	C812232.1	Known gene	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing protein 2 [*Bos taurus*]	271.747
Q2_P00185	C800594.1	Known gene	Smc3 protein [*Xenopus laevis*]	271.201
Q2_P20698	C803850.1	Known gene	14-3-3 Protein [*Schistosoma mansoni*]	267.115

A análise do conjunto de genes “no match” para os quais havíamos desenhado sondas para ambas as fitas mostrou que em 156 genes ocorria expressão senso e anti-senso, já que foram detectados sinais acima do limite excludente em ambas as sondas que representavam fitas complementares (Tabela 4). Esta transcrição anti-senso está presente em uma fração considerável (7%) dos genes “no match” ativos em vermes adultos.

Tabela 4 – Resumo da atividade transcricional dos genes “no match” em vermes adultos.

Genes “no match”	**12.295**
Genes “no match” com sondas em uma fita	1.375
Transcrição detectada em adultos	183
Transcrição não detectada em adultos	1.192
Genes “no match” com sondas em ambas as fitas	10.920
Transcrição detectada em ambas as fitas em adultos	156
Transcrição detectada em uma das fitas em adultos	2.127
Transcrição não detectada em adultos	8.637

Uma vez que a construção do *chip* de microarranjo e o processo de anotação asseguram que a informação sobre as fitas seja preservada nos ensaios, é possível dizer com certeza que os *loci* genômicos onde se detectou sinal para ambas as sondas representam uma transcrição bi-direcional. Usando esta série de dados, calculamos a razão da intensidade do sinal senso-antisenso para os pares de sondas que representavam fitas opostas para o mesmo *locus*, sendo que chamamos de forma arbitrária a sonda com uma maior intensidade como senso e a outra, antisenso.

Subseqüentemente, realizamos uma análise de distribuição das razões das intensidades para todos os 156 genes “no match” com o sinal válido para ambas as fitas (Figura 13). É possível notar que a maioria das razões de intensidade do sinal senso/antisenso dos genes está na região das razões 1–3, com um pico na razão próxima de 1.

Figure 13 - Distribuição das razões de intensidade do sinal senso-antisenso do conjunto de genes “no match” de *S. mansoni* com expressão detectada em ambas as fitas. A razão da intensidade do sinal senso-antisenso foi calculada para cada um dos 156 *loci* contendo genes “no match” com expressão detectada em ambas as fitas; chamamos de forma arbitrária a sonda com uma maior intensidade de senso, quando comparada com a intensidade da outra sonda depositada no *oligoarray* que representava a outra fita do gene no mesmo *locus*. Fonte: (Verjovski-Almeida *et al.*, 2007).

A fim de confirmar a expressão destes pares senso-antisenso, selecionamos nove pares de genes “no match” candidatos com níveis diferentes da expressão entre as duas fitas observadas em todas as quatro medidas das replicas do *oligoarray*. Realizamos real-time RT-PCR fita especifica com pares de *primers* específicos (que chamamos de 1 e 2) desenhados para cada um dos nove genes. Os pares de *primers* específicos (Tabela 5) foram desenhados pelo programa *Primer Express* usando os parâmetros padrão.

Tabela 5 - *Primers* usados na validação dos genes por Real Time RT-PCR

Contig	*Primer* 1	*Primer* 2
C809968	CGGAATAACATTTGCGCTCC	TTCCATCTGCCAAAACATGC
C915954	AACTTTAAAACACATAGCCGCATG	ACCTAGATCGTCTTCCCTGAAATAAG
C801963	TAATTTTGTCGGTAGTTGTCAATGG	TTGTTAGTGACACTCATGGTGTTGTT
C803466	GAATCCCAAGCTAGTCAAAAGGAAC	TTCTGTGATTGACTTCCATAACTTCAC
C812786	AATGAAACAATTTGCCAGGACC	TGGTTACCCCTCATTGAGGAGT
C812972	CACGAACATCCACACGTACACC	CGGGTAAAGGATGTGATTGTCC
C813267	TGCCATCACATTTACAGGTGC	GTGAAGGAAAATGTGGTTGCG
C911708	TCAGAAAAACTCCCACTAATTGCTAC	ACATTCATCAGTGATGGTTATTTCATC
C918995	GCAACCAATAAGCCCCACG	AGCCGCGAGTCTGGTGAG

Fomos capazes de confirmar a transcrição em ambas as fitas de 8 dos 9 genes “no match” que estudamos (89%). Para 6 dos 9 genes (67%) a fita com nível de transcrição mais elevado era a mesma identificada no *oligoarray* (Figura 14). Em todos os casos, a transcrição de uma das fitas é significativamente maior (*p-value* ≤0.05) do que a outra. Na verdade, a diferença nos níveis de transcrição entre as duas fitas detectada pelo real-time RT-PCR é de duas ordens de grandeza, que apresenta uma diferença de menos de uma ordem de grandeza nas intensidades dos experimentos de microarranjos. Isso sugere que a relação entre o sinal de intensidade dos experimentos de *oligoarray* e a abundância do transcrito não são lineares. Sendo assim, a relação da intensidade do sinal entre as fitas dos ensaios de *array*, embora refletindo uma diferença na expressão gênica não pode ser usada para obter uma medida direta da diferença da abundância dos transcritos senso-antisenso.

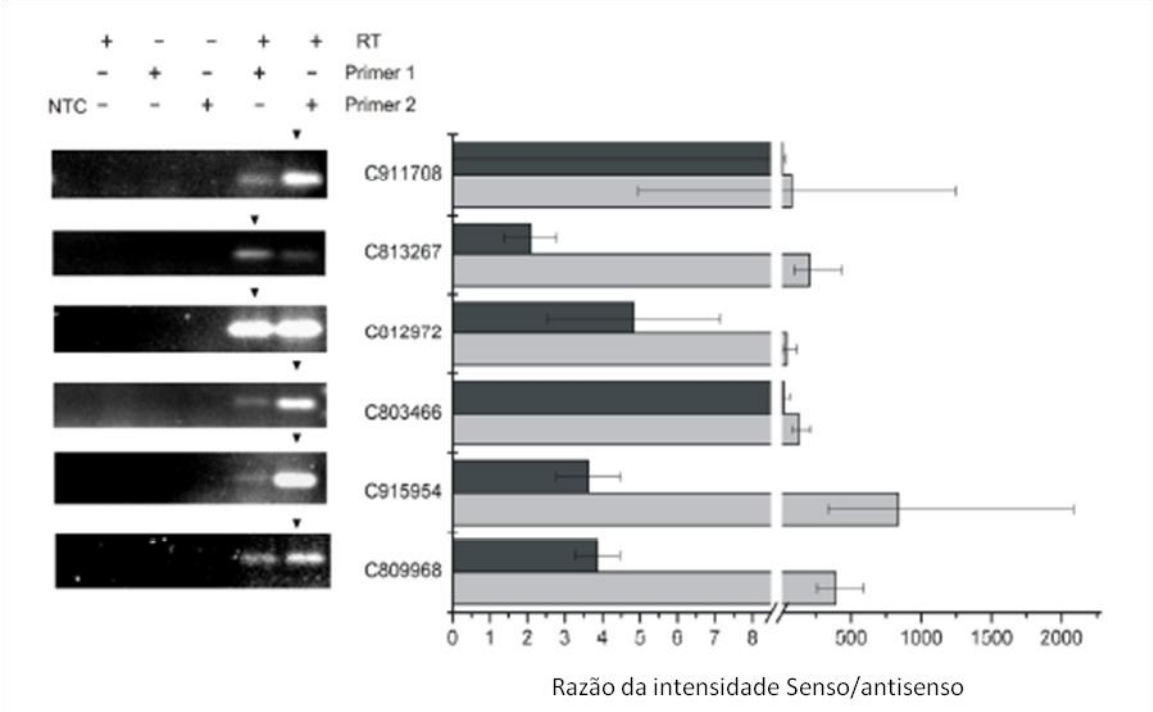

Figure 14 - Detecção da transcrição bidirecional dos genes "no match" de *S. mansoni*. A figura mostra os experimentos de validação utilizando Real-time RT-PCR fita especifica para 6 genes "no match" ativos transcricionalmente em ambas as fitas; cada gene é indicado pelo respectivo número de cluster (C8xxxxx ou C9xxxxx). O gráfico da direita mostra a razão da expressão senso/antisenso, obtida pela intensidade do sinal no oligoarray (barra cinza escuro), ou pela reação de real-time RT-PCR fita especifica (barra cinza claro); para cada gene "no match" a fita senso foi arbitrariamente designada como a fita que possuía o maior sinal de intensidade nos experimentos de microarranjo, em relação à fita oposta, que possuía um menor sinal de intensidade. À esquerda, temos a eletroforese em gel de agarose 3% dos produtos finais da reação de real-time RT-PCR. **NTC** indica o controle sem *template* na reação de PCR. **RT** indica a presença (reação teste) ou a ausência (controle negativo) da transcriptase reversa na reação de transcrição reversa. **Primer 1 e 2** indicam uso de *primers* fita-específicos na reação de transcrição reversa para cada gene "no match". As setas indicam o produto da fita com uma transcrição mais alta, de acordo com o experimento de *oligoarray*. Todos os dados têm um *p*-value ≤0.05, com exceção dos dados de *oligoarray* de C911708. Fonte: (Verjovski-Almeida *et al.*, 2007).

Interessante notar que para todos os seis genes, com exceção do gene representado pelo *contig* C911708, é possível encontrar um ou mais ESTs no GeneBank oriundos de bibliotecas direcionais, e todas elas apresentam a mesma orientação do que as fitas mais expressas nos experimentos de real-time. Isso nos dá outras evidências indiretas para a alta abundância de uma das fitas detectada nos experimentos de real-time RT-PCR. Deve-se notar que não podemos inferir com as evidências que possuímos se estes transcritos senso-antisenso representam RNA codificadoress ou não codificadores de proteína; as sequências dos *contigs* de cDNA dos genes “no match” testados neste experimento (Figura 14) são curtas (200-270 bp), com exceção de dois que possuem 450-500 bp. Para todos eles, usando ESTScan (Iseli *et al.*, 1999) ou o software de predição do ORF Finder (GenBank) obtivemos sequências codificadoras de pequenas proteínas preditas, codificando peptídios putativos que possuem 37 a 92 aminoácidos de extensão.

4.2. Estudos dos efeitos do pareamento no perfil de expressão gênica de vermes adultos de *S. mansoni* mantidos *in vitro* durante 24 horas.

Pareamento é um pré-requisito essencial para o crescimento e maturação da morfogênese reprodutiva na maioria das espécies de *Schistosoma*. Estudos histológicos clássicos demonstraram que o contato direto da fêmea adulta com o macho é necessário para a fêmea alcançar e manter a maturidade (Popiel e Basch, 1984). Se fêmeas adultas forem separadas de seu par, a deposição de ovos será interrompida e as fêmeas irão retornar a um estado imaturo. Um estudo de expressão gênica em fêmeas adultas de *S. mansoni* cultivadas *in vitro* revelou que a transcrição de genes específicos é influenciada pelo pareamento. Em contraste, a

atividade dos genes que são expressos em ambos os sexos não foi afetada pela falta de contato com o macho (Grevelding *et al.*, 1997). Devido às tecnologias disponíveis na época, o estudo só abordou cinco genes.

Nosso experimento foi proposto para investigar e compreender melhor a influência da interação macho-fêmea na expressão gênica em larga escala de vermes adultos. Os vermes foram obtidos e cultivados como descrito na metodologia. Ao final possuíamos quatro grupos:

1. Fêmeas adultas recolhidas pareadas durante a perfusão e mantidas pareadas em cultura por 24 horas; ao final as fêmeas foram separadas para a extração de RNA.
2. Fêmeas adultas recolhidas pareadas durante a perfusão, imediatamente separadas e assim mantidas em cultura por 24 horas.
3. Machos adultos recolhidos pareados durante a perfusão e mantidos pareados em cultura por 24horas; ao final os machos foram separados para a extração de RNA.
4. Machos adultos recolhidos pareados durante a perfusão, imediatamente separados e assim mantidos em cultura por 24 horas.

Para analisar o efeito do pareamento em machos e fêmeas, consideramos os grupos de vermes pareados como controles e os grupos de vermes mantidos separados seriam os grupos para a análise de genes diferencialmente expressos (Tabela 6 e 7).

Tabela 6 – Esquema das hibridizações das amostras de RNA de fêmeas adultas separadas dos machos durante o cultivo de 24 horas (FS) versus fêmeas adultas pareadas durante o cultivo de 24 horas (FP). As hibridizações foram feitas com réplicas técnicas (*dye swap*) e réplicas biológicas (R).

Lâmina 1	FS - Cy3	FP - Cy5
Lâmina 2	FS - Cy5	FP - Cy3
Lâmina 3	FS - Cy3(R)	FP - Cy5(R)
Lâmina 4	FS – Cy5(R)	FP - Cy3 (R)

Tabela 7 – Esquema das hibridizações das amostras de RNA de machos adultos separados das fêmeas durante o cultivo de 24 horas (MS) versus machos adultos pareados durante o cultivo de 24 horas (MP). As hibridizações foram feitas com réplicas técnicas (*dye swap*) e réplicas biológicas (R).

Lâmina 1	MS - Cy3	MP - Cy5
Lâmina 2	MS - Cy5	MP - Cy3
Lâmina 3	MS - Cy3(R)	MP - Cy5(R)
Lâmina 4	MS – Cy5(R)	MP - Cy3 (R)

Para cada uma das condições (macho pareado versus macho não pareado e fêmea pareada versus fêmea não pareada) foram reunidos dados de 4 experimentos, totalizando 8 dados de razão para cada gene. Foi feita a média das duas réplicas técnicas, uma vez que elas são réplicas com inversão de cor (*dye-swap*). O *dye-swap* é feito para eliminar os efeitos de incorporação diferente dos dois corantes, e para eliminar este efeito totalmente deve-se fazer a média das duas medidas. O número de medidas para cada gene foi reduzido, mas a significância estatística ficou mais poderosa, uma vez que o ruído das amostras foi diminuído.

Foram encontrados 113 transcritos diferencialmente expressos (*FDR* 5% e *fold-change* 1,5 vezes), sendo que 75 genes apresentam sua expressão aumentada em fêmeas separadas e 38 genes a expressão diminuída em fêmeas separadas (Figura 15). A identidade e a função em potencial destes genes foram determinadas por anotação automática.

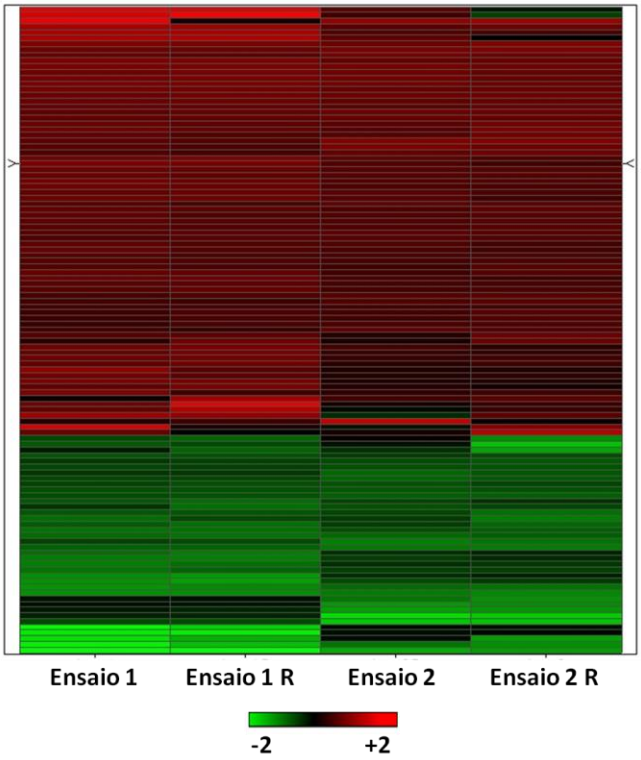

Figure 15 – Efeito do pareamento no perfil de expressão gênica de fêmeas adultas mantidas separadas de seus respectivos pares durante 24 horas de cultivo *in vitro*. Cada ensaio (1) e sua respectiva réplica biológica (2) estão representados em uma coluna. Réplicas técnicas estão indicadas pela letra R de cada ensaio. Cada linha do painel representa um transcrito diferencialmente expresso entre fêmeas adultas mantidas pareadas quando comparadas com fêmeas adultas mantidas sozinhas. Transcritos foram selecionados pelo teste *Significance Analysis of Microarrays* (SAM-*one class*) (q <0,05 e *fold change* ≥ 1,5). Para cada linha, a razão das expressões foi normalizada e conferida uma cor em função do número de desvios-padrão da média. Análise UPGMA (Baseada em matriz de distância) foi realizada usando a “distância Euclidiana” para determinar a medida de similaridade. Genes com log2 (razão) negativo (isto é, expressão diminuída em fêmeas separadas) estão em verde; genes com log2 (razão) positivo (isto é, expressão aumentada em fêmeas separadas) estão em vermelho.

Dos 75 genes que apresentam sua expressão aumentada em fêmeas separadas apenas 41 genes (55%) possuem função descrita em outros organismos. Dentre os 34 genes restantes, 14 (19%) são "*no matchs*" e 20 (26%) possuem similaridade com proteínas hipotéticas de outros organismos. Já em relação aos genes com expressão diminuída em fêmeas separadas, apenas 19 genes (50%) possuem função descrita em outros organismos, 09 (21%) são "*no matchs*" e 11 (29%) possuem similaridade com proteínas hipotéticas de outros organismos, sem função conhecida.

Os genes com função descrita, e com expressão aumentada em fêmeas separadas foram divididos em oito categorias principais (Tabela 8): relacionados à transcrição, metabolismo de lipídeo, proteínas de tegumento, proteínas transportadoras de membrana correlacionadas à resistência a drogas, proteínas que interagem com receptores, proteínas com atividade oxido-redutase, proteínas intracelulares de transporte de vesículas e comunicação, e constituintes estruturais da musculatura. A relevância e a possível implicação funcional destes resultados estão comentadas na Discussão.

Tabela 8 - Identidade, categorias de função celular e *fold-change* dos genes com expressão aumentada identificados nas fêmeas separadas mantidas *in vitro* por 24hs em relação às fêmeas pareadas.

Contig	Identidade	Fold-Change
Relacionadas a Transcrição		
C606657.1	Transducin beta-like	2,2
C605453.1	Nuclear factor Y transcription factor subunit B homolog	2,0
C601674.1	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT) (HGPRTase)	2,0
C606792.1	DNA-directed rna polymerase II, subunit n	2,0
C605540.1	Tuberin	1,9
C611106.1	Similar to PHD finger protein 10 isoform a; PHD zinc finger protein XAP135-related	1,8
C606008.1	Jumonji domain containing protein-related including hairless	1,8
C600805.1	Suppressor of hairy wing homolog, putative	1,7
C605135.1	Jnk, putative	1,7
C701831.1	*Schistosoma mansoni* TR4 (TR4) mRNA, partial cds	1,7
C606698.1	*Schistosoma mansoni* mRNA for transcriptional cofactor CA150 (CA150 gene)	1,7
C710681.1	Arginine/serine-rich splicing factor, putative	1,6
C601429.1	Symplekin, putative	1,5
C702225.1	P53 inducible protein-related	1,5
C602624.1	Nuclear transcription factor, X-box binding 1 (nfx1)	1,5
Metabolismo de Lipídeos		
C600278.1	Oxysterol-binding protein 1	1,6
C604979.1	High density lipoprotien binding protein / vigilin	1,5
Proteínas de Tegumento		
C612364.1	Calmodulin related calcium binding protein	1,9
C608449.1	*Schistosoma mansoni* ATP-diphosphohydrolase 1 (ATPDase1)	1,9
C610673.1	Dystrophin [*Schistosoma mansoni*]	1,7
Proteínas de Membrana		
C612448.1	Adenylyl cyclase-associated protein	1,9
C605315.1	Four and A half lim domains	1,7
C609378.1	Sialin (solute carrier family 17 member 5) (sodium/sialic acid cotransporter)	1,7
C610857.1	ATP-binding cassette, sub-family B, member 7, mitochondrial precursor (abc7)	1,6
C611592.1	Lar interacting protein (lip)-related protein	1,5
C611034.1	ATP-dependent transporter	1,5
Proteínas Interativas de Receptores		
C611973.1	Reticulon/nogo	1,9
C602256.1	Integrin beta subunit	1,8
C600231.1	Smad1	1,6
C607345.1	Gtpase-activating protein gyp2	1,6
C605766.1	Fgf receptor activating protein	1,6
C600539.1	Septin	1,6
C605356.1	Sorting nexin, putative	1,5
Proteínas com Atividade Oxidoredutase		
C603370.1	Glutamate synthase	1,8
C606067.1	Thioredoxin peroxidase (TPx-1)	1,7
Proteínas Intracelulares de transporte e Comunicação		
C604670.1	Notchless homolog 1	2,3
C611591.1	SEC-related A,B	1,5
Constituintes Estruturais da Musculatura		
C601439.1	Slit-robo rho gtpase activating protein 1,3	1,8
C610631.1	Traf2 and nck interacting kinase (tnik)	1,6
C609196.1	Myotubularin-related protein	1,6
C607250.1	Titin	1,5
Outras		
C601921.1	n-acetylgalactosaminyltransferase, putative	2,8
C607951.1	Adenosine deaminase-related	1,9
C602730.1	Replication A protein	1,6
C600314.1	lis1-interacting protein nude, putative	1,5

Já os genes com função descrita e com expressão diminuída em fêmeas separadas (Tabela 9) foram classificados em seis categorias: formação da casca do ovo, transcrição, metabolismo de lipídeos, proteínas de tegumento, tradução e comunicação intracelular e transporte de proteínas. A relevância e a possível implicação funcional destes resultados estão comentadas na Discussão.

Tabela 9 - Identidade, categorias de função celular e *fold-change* dos genes com expressão diminuída identificados nas fêmeas separadas mantidas *in vitro* por 24 hs em relação às fêmeas pareadas.

Contig	Identidade	Fold Change
Formação da casca do ovo		
C607704.1	Sm28 GST=28 kda glutathione S-transferase	2,1
C608019.1	Tyrosinase 1 precursor (TYR1) mRNA	1,7
Transcrição		
C602710.1	set and mynd domain containing, putative	2,6
C607633.1	E1b-55kD-associated protein, putative	1,6
C606289.1	polybromo-1, putative	1,6
C612246.1	Ubiquitin (ribosomal protein L40)	1,5
Metabolismo de Lipideos		
C602018.1	Fatty acid-binding protein Sm14	1,6
C601665.1	Fatty acid-binding protein Sm14	1,5
Proteínas de tegumento		
C600011.1	200-kDa GPI-anchored surface glycoprotein	1,8
C704906.1	200-kDa GPI-anchored surface glycoprotein	1,8
C601484.1	heat shock protein 86	1,6
Tradução		
C701798.1	Elongation factor 1-alpha	2,0
C607130.1	Initiation factor 5a	1,5
C714516.1	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	1,5
C604061.1	60S ribosomal protein L24	1,5
Comunicação Intracelular e Transporte de Proteínas		
C612463.1	Testis development protein nyd-sp29	1,9
Outras		
C606983.1	phosphoenolpyruvate carboxykinase	2,0
C708807.1	DNA polymerase eta, putative	1,8
C604780.1	Receptor protein tyrosine phosphatase r (pcptp1)	1,8
C606054.1	basigin related	1,6
C605967.1	Tropomyosin	1,5

A fim de confirmar a expressão de alguns genes, selecionamos 10 genes com níveis diferentes de expressão homogêneos em todas as quatro medidas das replicas do microarranjo, sendo que seis apresentam-se com expressão aumentada em fêmeas separadas (Tabelas 10) e quatro apresentam-se com expressão diminuída em fêmeas separadas (Tabela 11). Foram realizadas validações por real-time RT-PCR de genes diferencialmente expressos em fêmeas adultas separadas em comparação a fêmeas adultas pareadas. Para a reação de PCR utilizamos pares específicos de *primers* (Tabela 12) que foram desenhados no programa *Primer Express* usando os parâmetros padrão (*Applied Biosystems*) e chamados de forma arbitrária de *primers* 1 e 2.

Tabela 10 - Identidade, Anotação e *fold-change* dos genes com expressão aumentada em fêmeas separadas que foram selecionados para validação por *real-time* RT-PCR.

Contig	**Anotação**	***Fold Change***
C601921.1	n-acetylgalactosaminyltransferase, putative	2,8
C601674.1	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT) (HGPRTase)	2,0
C608449.1	Schistosoma mansoni ATP-diphosphohydrolase 1 (ATPDase1)	1,9
C603370.1	Glutamate synthase	1,8
C606698.1	Schistosoma mansoni mRNA for transcriptional cofactor CA150 (ca150 gene)	1,7
C610857.1	ATP-binding cassette, sub-family B, member 7, mitochondrial precursor (ABC7)	1,6

Tabela 11 - Identidade, Anotação e *fold-change* dos genes com expressão diminuída em fêmeas separadas que foram selecionados para validação por *real-time* RT-PCR.

Contig	Anotação	*Fold Change*
C606983.1	phosphoenolpyruvate carboxykinase	2,0
C704906.1	surface protein, putative- OBS: Schistosoma mansoni 200 kDa surface protein	1,8
C604780.1	receptor protein tyrosine phosphatase r (PCPTP1), putative	1,8
C608019.1	Tyrosinase 1 precursor (TYR1) mRNA	1,7

Tabela 12 - Primers utilizados na validação por *Real Time* RT-PCR dos genes determinados em experimentos de microarranjos com fêmeas adultas separadas mantidas *in vitro* por 24hs em relação às fêmeas pareadas.

Contig	*Primer* 1	*Primer* 2
C601674.1	CGAGGTATCGTCCTACCAATGTC	CCGAAGGATCTCCTAAACCAGTT
C601921.1	AAAAACGTATAGTTTGCCCAATCAT	CTATTTCTCTATCTACAACAGTTTCCCAAT
C603370.1	TTATATTAATCCAGAATCCCAGTCGTT	ACCATCCACACCGGCATTT
C604780.1	TCTCATTGTACACCGTGCGAAT	AAGACAGGTAACATGATTATAGGGTGAA
C606698.1	TGAGCCAATACGAATTTCCAAA	GTAGAACTACGGAAACGTGAGAAAGA
C606983.1	GTTGCTTTTCAACTTCATGTGCTT	ATGTCTACGAACAACAATGAAAGAAGA
C608019.1	AATATTAAATGATCGACATACAGGACTGA	AAGGGAATCTTCCGGATGTAGAG
C608449.1	GCCAAGATCCAAAGAACCAACT	AGGACTTTATGGTTGGGTATCAGTGA
C610857.1	CCGCCCAACTGGAGTTTTAAA	CCAGTCGGATAAAATTGCTTTTTG
C704906.1	GTGCACATAAATTCACCAATAATTCC	CCATTCAACAAAAGAATCCTGAAGA

As amostras de RNA de ambos os experimentos confirmaram a expressão dos 10 genes testados (Figura 16 e 17). A validação destes genes confirmou o aumento da expressão previamente observado nas análises de microarranjo, embora exista variabilidade entre as réplicas biológicas.

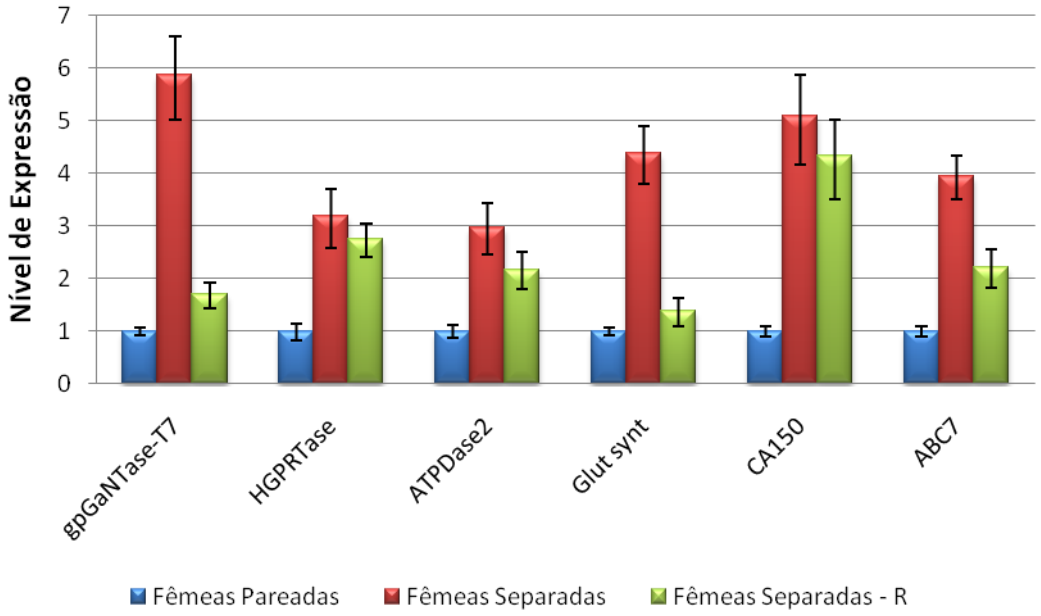

Figura 16 - Detecção dos genes com expressão aumentada em fêmeas adultas de *S. mansoni* mantidas *in vitro* separadas de machos adultos. Medidas de *real-time* RT-PCR em amostras de fêmeas adultas pareadas (azul) e amostras de fêmeas adultas mantidas separadas (vermelho, e uma réplica biológica - R, verde). Os seis genes validados foram indicados pelas respectivas siglas: gpGaNTase-T7 (n-acetylgalactosaminyltransferase), HGPRTase (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase), ATPDase2 (ATP-diphosphohydrolase 1), Glu Synt (Glutamate synthase), CA150 *(Schistosoma mansoni* mRNA for transcriptional cofactor CA150), ABC7 (ATP-binding cassette, sub-family B, member 7, mitochondrial precursor).

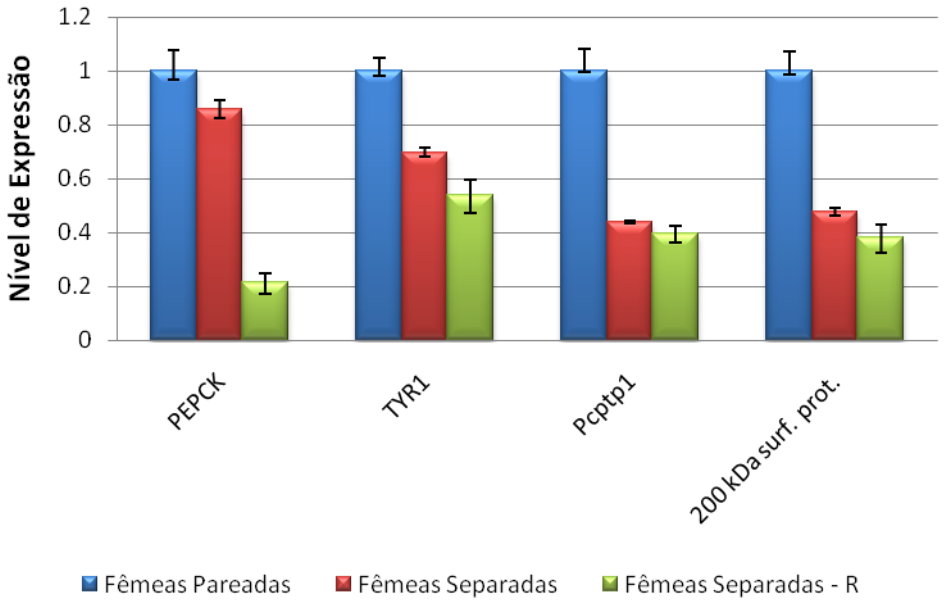

Figura 17 - Detecção dos genes com expressão diminuída em fêmeas adultas de *S. mansoni* mantidas *in vitro* separadas de machos adultos. Medidas de real-time RT-PCR em amostras de fêmeas adultas pareadas (azul) e amostras de fêmeas adultas mantidas separadas (vermelho, e uma replica biológica, verde). Os quatro genes validados foram indicados pelas respectivas siglas: PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase), TYR1 (Tyrosinase 1 precursor mRNA), PCPTP1 (receptor protein tyrosine phosphatase r), 200KDa surf. prot (*Schistosoma mansoni* 200 kDa surface protein).

O gene ABC7 codifica uma proteína que faz parte de uma importante família de proteínas de membrana envolvidas na resistência de drogas e em outras atividades biológicas (Pereira *et al.*, 1998). Foram realizadas validações por real-time RT-PCR a fim de confirmar a expressão deste gene em seis estágios de desenvolvimento do parasita (ovo, miracídio, cercária, esquistossômulo, fêmeas adultas pareadas e machos adultos pareados) (Figura 18). Para a reação de PCR utilizamos pares específicos de *primers* (Tabela 12) que foram desenhados no programa *Primer Express* usando os parâmetros padrão (*Applied Biosystems*) e chamados de forma arbitrária de *primers* 1 e 2.

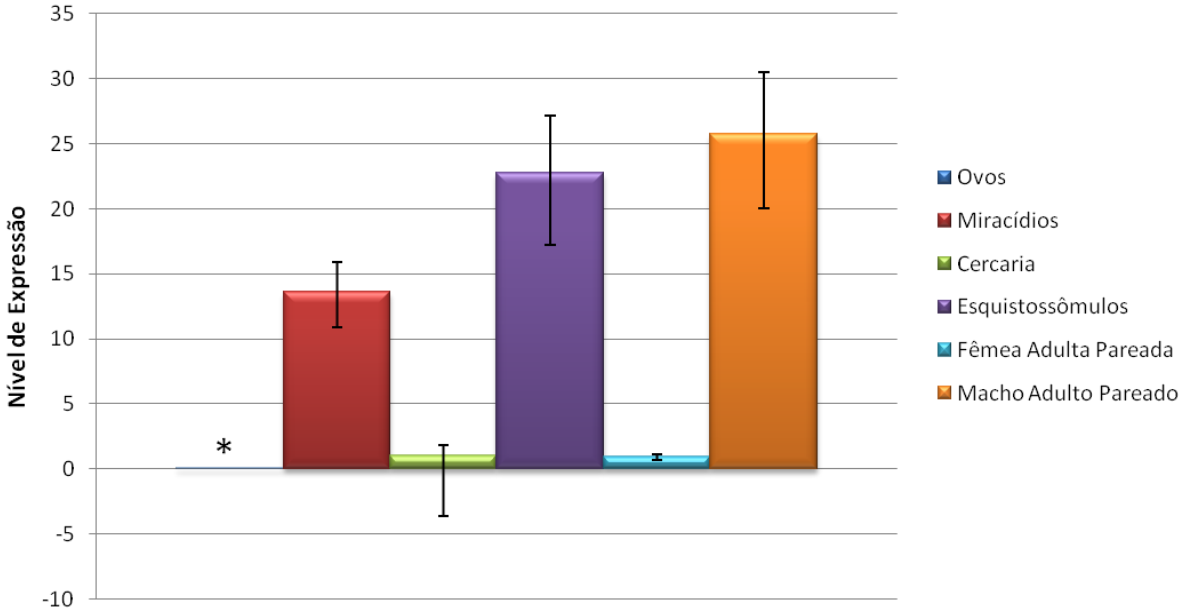

Figura 18 - Detecção do gene ABC7 em diferentes estágios de desenvolvimento do parasita *S. mansoni*. Medidas de real-time RT-PCR em seis estágios de desenvolvimento do parasita: ovo, miracídio, cercária, esquistossômulo, fêmeas adultas pareadas e machos adultos pareados. (*) = Não foi detectado nível de transcrição do gene ABC7 para as amostras de ovo

Observamos também os efeitos do pareamento no perfil de expressão gênica de machos adultos mantidos separados durante 24 horas. Foram encontrados 152 transcritos diferencialmente expressos (*FDR* 5% e *fold-change* 1,5 vezes), sendo que 151 genes apresentam sua expressão aumentada em machos separados e apenas 1 gene (*ATP-dependent transporter*) apresentava a expressão diminuída em machos separados (Figura 19). A identidade e a função em potencial destes genes foram determinadas por anotação automática.

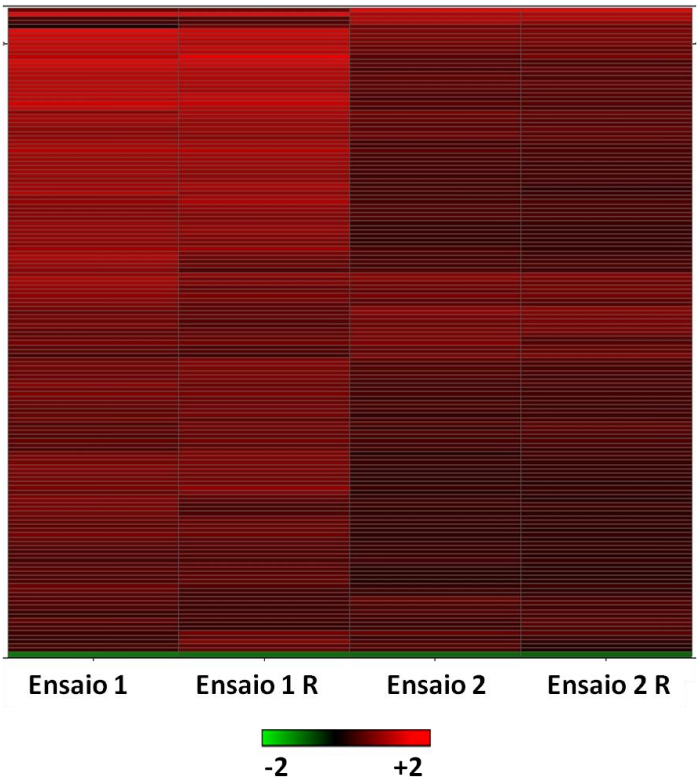

Figure 19 – Efeito do pareamento no perfil de expressão gênica de machos adultos mantidos separados de seus respectivos pares durante 24 horas de cultivo *in vitro*. Cada ensaio (1) e sua respectiva réplica biológica (2) estão representados em uma coluna. Réplicas técnicas estão indicadas pela letra R de cada ensaio. Cada linha do painel representa um transcrito diferencialmente expresso entre fêmeas adultas mantidas pareadas quando comparadas com fêmeas adultas mantidas sozinhas. Transcritos foram selecionados pelo teste *Significance Analysis of Microarrays* (SAM-*one class*) (q <0,05 e *fold change* ≥ 1,5). Para cada linha, a razão das expressões foi normalizada e conferida uma cor em função do número de desvios-padrão da média. Análise UPGMA (Baseada em matriz de distância) foi realizada usando a "distância Euclidiana" para determinar a medida de similaridade. Genes com log2 (razão) negativo (isto é, expressão diminuída em fêmeas separadas) estão em verde; genes com log2 (razão) positivo (isto é, expressão aumentada em fêmeas separadas) estão em vermelho.

Dos 152 genes que apresentam sua expressão aumentada em machos separados apenas 75 genes (49%) possuem função descrita em outros organismos. Dentre os 77 genes restantes, 19 (12,5%) são "*no matches*" e 58 (38,5%) possuem similaridade com proteínas hipotéticas de outros organismos. Os genes com função descrita, e com expressão aumentada em machos separados foram divididos em

dez categorias principais (Tabela 13): constituintes estruturais do músculo, proteínas relacionadas à transcrição, degradação e síntese do grupo Heme, reparo de DNA, proteínas com atividade oxido-redutase, proteínas de tegumento, proteínas relacionadas à adesão celular, proteínas de membrana, glicosiltransferases, proteínas relacionadas à tradução. A relevância e a possível implicação funcional destes resultados estão comentadas na Discussão.

Tabela 13 - Identidade, categorias de função celular e *fold-change* dos genes com expressão aumentada identificados nos machos separados mantidos *in vitro* por 24hs em relação às machos pareados.

Contig	Identidade	Fold-change
Constituintes estruturais do Músculo		
C607128.1	heart-specific myosin light chain phosphatase small subunit, putative	2,2
C610954.1	glutamate receptor, NMDA, putative	2,1
C706917.1	cytoskeletal protein, putative	2,0
C606417.1	arp2/3, putative	2,0
C603972.1	fimbrin, putative	1,8
C607081.1	dynein heavy chain, putative	1,6
C601535.1	alpha-actinin, putative	1,5
Proteínas relacionadas à transcrição		
C604197.1	eukaryotic translation initiation factor 2c, putative mRNA	2,5
C608651.1	retinoblastoma binding protein, putative	2,3
C609274.1	glycyl-tRNA synthetase, putative	2,3
C612571.1	histidine triad (hit) protein member, putative	2,1
C610520.1	DNAj-related	2,0
C604966.1	alanyl-tRNA synthetase, putative	2,0
C601216.1	zinc finger protein, putative	2,0
C609837.1	zinc finger protein, putative	1,9
C611828.1	jumonji/arid domain-containing protein, putative	1,9
C611489.1	26S proteasome regulatory subunit S3, putative	1,9
C603749.1	groes chaperonin, putative	1,9
C610477.1	histone deacetylase hda2, putative	1,8
C603541.1	mitochondrial ribosomal protein S9, putative	1,7
C606357.1	zinc finger protein, putative	1,7
C611493.1	tyrosine kinase	1,7
C717897.1	cbl, putative	1,6
C609443.1	synoviolin	1,6
C600901.1	zinc/iron transporter, putative	1,5
Degradação e Sintese do grupo Heme		
C610625.1	5-aminolevulinic acid synthase	2,1
C611213.1	uroporphyrinogen decarboxylase	1,8
Reparo DNA		
C612230.1	xpa DNA repair protein family, putative	2,1
C611397.1	8-oxoguanine DNA glycosylase, putative	1,5
Proteínas com atividade oxido-redutase		
C609066.1	aldehyde dehydrogenase, putative	2,0

Contig	Identidade	Fold-change
Proteínas de Tegumento		
C607243.1	alkaline phosphatase, putative	2,0
C601244.1	serine/threonine kinase	1,6
C601365.1	serine/threonine kinase mRNA,	3,3
C609462.1	tetraspanin D76 , putative	1,9
C610254.1	tetraspanin family protein 16, invertebrate, putative	2,1
C604563.1	tetraspanin, putative	2,0
C607961.1	tetraspanin, putative	1,7
C609462.1	tetraspanin D76 , putative	1,9
C610254.1	tetraspanin family protein 16, invertebrate, putative	2,1
C604563.1	tetraspanin, putative	2,0
C607961.1	tetraspanin, putative	1,7
C604310.1	cell polarity protein	1,5
C605086.1	major tegumental antigen SM15 (GSM70) gene, complete cds	3,8
C603901.1	loss of heterozygosity 11 chromosomal region 2 gene a protein homolog (mast cell surface antigen 1) (masa-1), putative	1,9
C610626.1	monocarboxylate transporter, putative	1,7
Proteínas relacionadas à adesão celular		
C608749.1	cadherin, putative	2,0
Proteinas de Membrana		
C605465.1	AMP-activated protein kinase, gamma regulatory subunit, putative	2,4
C609020.1	ATP synthase gamma-related	2,3
C611067.1	mesoderm induction early response 1 related	1,9
C609602.1	copper-transporting atpase 1, 2 (copper pump 1, 2), putative	1,9
C609856.1	clathrin light chain, putative	1,7
C605069.1	multidrug resistance protein 1 (ATP-binding cassette C1), putative	1,5
Glicosiltransferases		
C607606.1	n-acetylgalactosaminyltransferase, putative	1,6
C607110.1	glycosyltransferase, putative	1,6
Proteínas relacionadas à tradução		
C612252.1	phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain, putative	2,5
C604197.1	eukaryotic translation initiation factor 2c, putative mRNA	2,5
C600569.1	splicing factor 3a, putative	1,7
Outras		
C603357.1	tpr repeat nuclear phosphoprotein, putative mRA	2,5
C601241.1	sh3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein mRNA	2,4
C609884.1	pak-interacting exchange factor, beta-pix/cool-1, putative	2,3
C602959.1	fkbp-rapamycin associated protein, putative	2,2
C715533.1	apg5-related	2,1
C607921.1	sideroflexin 1,2,3, putative	2,0
C605987.1	sugar transporter, putative	1,9
C610602.1	protein phosphatase 1 regulatory inhibitor subunit 16a, putative	1,9
C603452.1	SmCL2-like peptidase (C01 family)	1,8
C601160.1	vacuolar protein sorting 26, vps26, putative	1,7
C609043.1	supervillin, putative	1,7
C612307.1	tar DNA-binding protein, putative	1,7
C608161.1	ribose-5-phosphate isomerase, putative	1,7
C711165.1	rab GDP/GTP exchange factor, putative	1,7
C707839.1	subfamily S1B unassigned peptidase (S01 family)	1,6
C603401.1	phosphatidylinositol 4-kinase	1,6
C602061.1	Ribonuclease P/MRP protein subunit POP5, putative	1,6
C608906.1	platelet binding protein-related	1,5

4.3. Estudos dos efeitos do pareamento no perfil de expressão gênica de vermes adultos de *S. mansoni* mantidos *in vitro* durante 13 dias.

Para avaliar os efeitos em longo prazo do pareamento na expressão gênica entre vermes pareados ou mantidos separados de seu respectivo par foi proposto um segundo experimento onde os vermes seriam cultivados em diversas condições durante 13 dias (Figura 20)

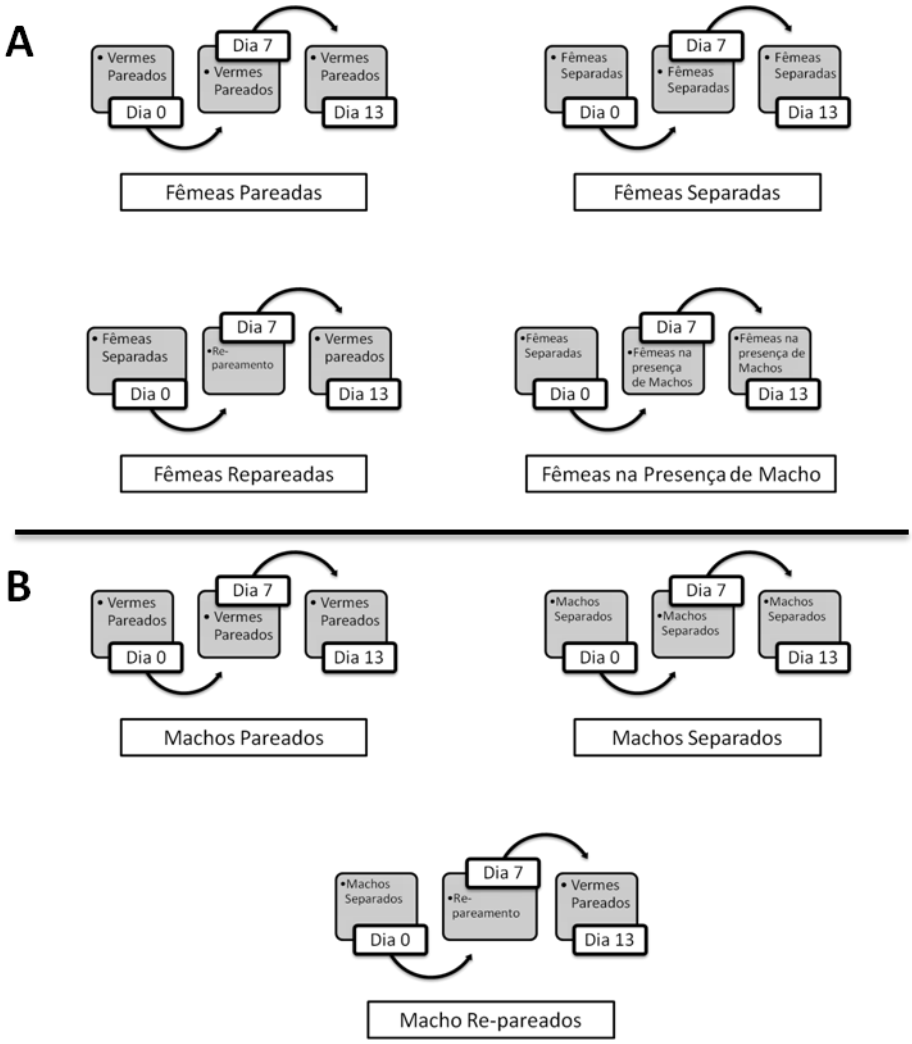

Figura 20 - Esquema do experimento *in vitro* de re-pareamento com fêmeas (A) ou machos (B) adultos de *S. mansoni*. Nos experimentos em que as fêmeas foram mantidas na presença de machos, sem re-pareamento, os vermes de diferentes sexos foram mantidos em cada um dos lados de uma membrana porosa (poros de 8 µm) que impedia o contato físico, mas possibilitava a difusão de moléculas.

Os vermes foram obtidos e cultivados como descrito na metodologia. Ao final possuíamos sete grupos:

1. Fêmeas adultas recolhidas pareadas durante a perfusão e mantidas pareadas em cultura por 13 dias; ao final as fêmeas foram separadas para a extração de RNA.
2. Fêmeas adultas recolhidas pareadas durante a perfusão, imediatamente separadas e assim mantidas em cultura por 13 dias.
3. Fêmeas adultas recolhidas pareadas durante a perfusão, imediatamente separadas e mantidas em cultura por 6 dias. No 7º dia estas fêmas foram repareadas com machos adultos.
4. Fêmeas adultas recolhidas pareadas durante a perfusão, imediatamente separadas e mantidas em cultura por 6 dias. No 7º dia estas fêmas foram colocadas na presença de machos adultos, mas sem a possibilidade de contato físico.
5. Machos adultos recolhidos pareados durante a perfusão e mantidos pareados em cultura por 13 dias; ao final os machos foram separados para a extração de RNA.
6. Machos adultos recolhidos pareados durante a perfusão, imediatamente separados e assim mantidos em cultura por 13 dias.
7. Machos adultos recolhidos pareados durante a perfusão, imediatamente separados e mantidos em cultura por 6 dias. No 7º dia estes machos foram repareados com fêmeas adultas.

Para analisar tais efeitos, consideramos todos os grupos de igual interesse, sendo assim, nenhum grupo foi considerado grupo controle. Utilizamos uma co-

hibridização multifatorial (Yang e Speed, 2002a) para obter uma comparação mais precisa entre as amostras e reduzir o número de slides necessários (Figuras 21 e 22).

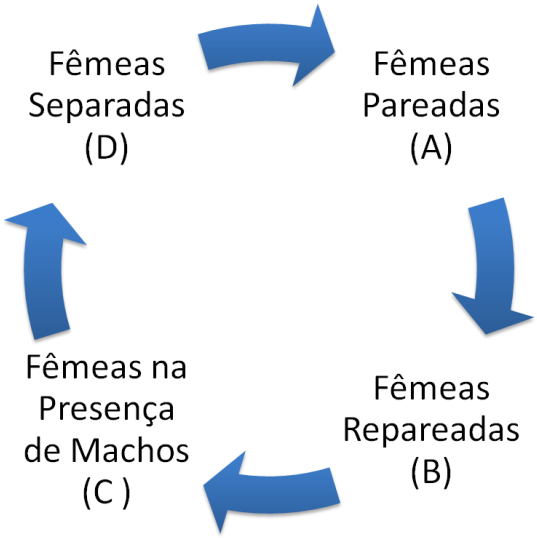

Figura 21 - Esquema das hibridizações das amostras de RNA de fêmeas cultivadas em diversas condições durante 13 dias. Cada uma das amostras é hibridizada em pares consecutivos, As hibridizações foram feitas com réplicas técnicas (dye swap) e réplicas biológicas.
.

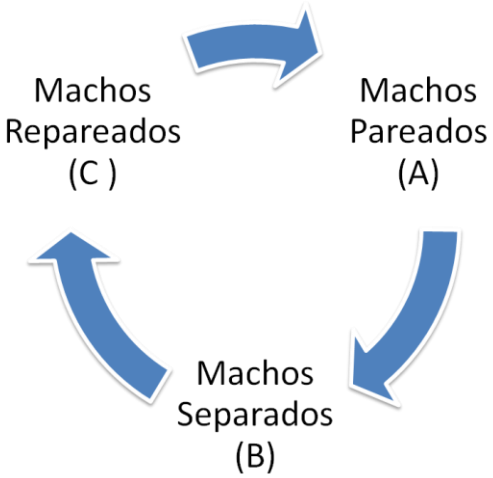

Figura 22 - Esquema das hibridizações das amostras de RNA de machos cultivados em diversas condições durante 13 dias. Cada uma das amostras é hibridizada em pares consecutivos, As hibridizações foram feitas com réplicas técnicas (dye swap) e réplicas biológicas.

Foram encontrados 2717 transcritos diferencialmente expressos (FDR 1%), sendo que 1517 genes apresentam sua expressão aumentada em fêmeas separadas e 1220 genes a expressão diminuída em fêmeas separadas (Figura 23).

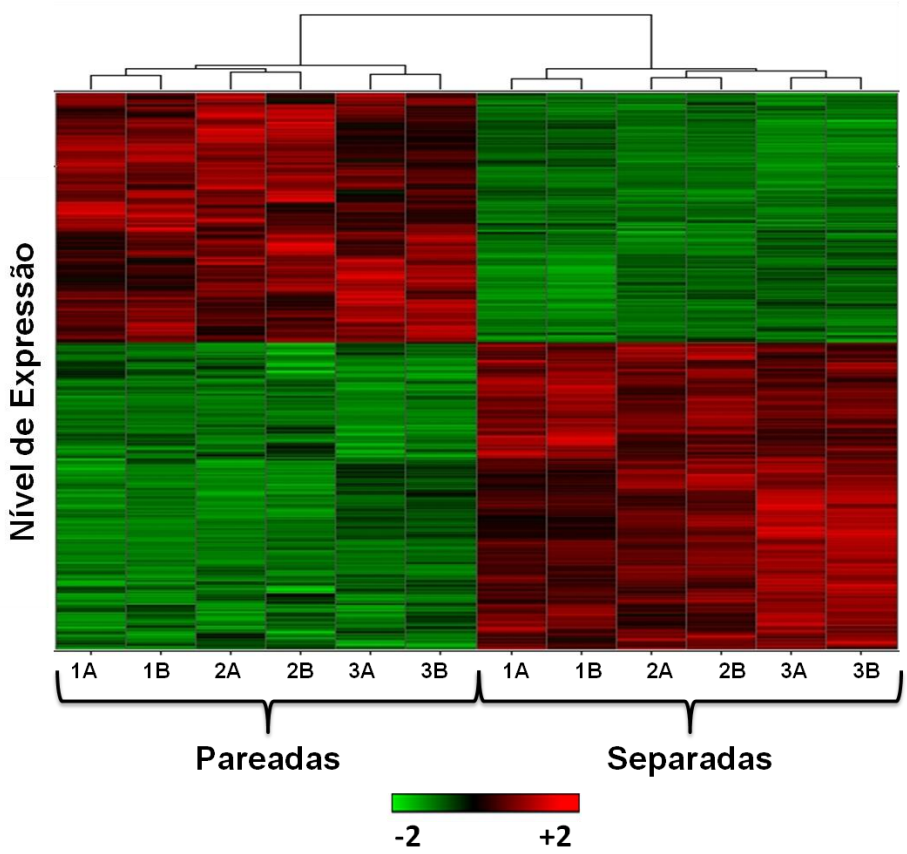

Figura 23 - Comparação entre fêmeas pareadas (Pareadas), fêmeas separadas (Separadas). Agrupamento hierárquico dos 2717 genes encontrados utilizando o teste Significance Analysis of Microarrays (SAM) two-classes (Tusher et al., 2001). Cada amostra (1) e suas respectivas réplicas biológicas (2 e 3) estão representadas em uma coluna (indicada na parte de baixo). As réplicas técnicas são indicadas pelas letras da respectiva amostra (A, B) e os genes estão representados um em cada linha. Um dendograma mostra o agrupamento baseado na similaridade do perfil de expressão entre os genes. Análise UPGMA (Baseada em matriz de distância) foi realizada usando a “distância Euclidiana” para determinar a medida de similaridade. As cores indicam o número de desvios padrão acima (vermelho) ou abaixo (verde) do valor médio de cada gene calculado ao longo de todas as amostras, como mostrado na escala de cores, na parte de baixo da figura.

Para as analises com machos separados versus machos paredados foram encontrados 243 transcritos diferencialmente expressos (FDR 5%), sendo que 112 genes apresentam sua expressão aumentada em machos separados e 131 genes a expressão diminuída em machos separados (Figura 24).

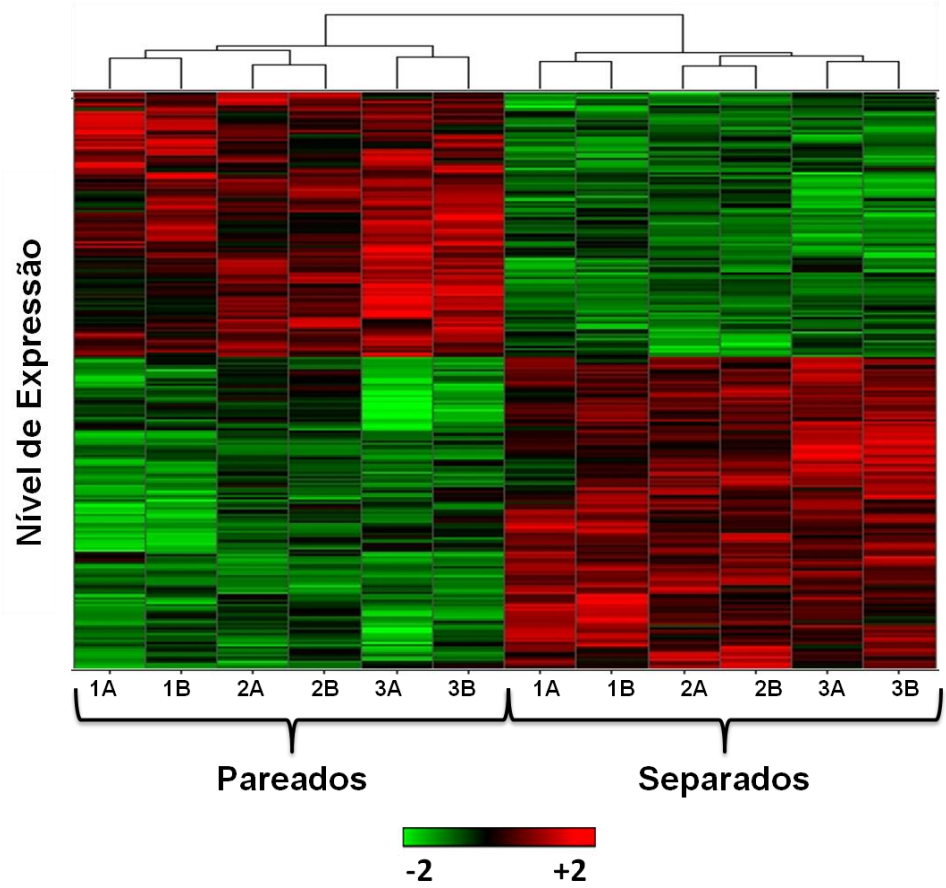

Figura 24 - Comparação entre machos pareados (Pareados), machos separados (Separados). Agrupamento hierárquico dos 243 genes encontrados utilizando o teste Significance Analysis of Microarrays (SAM) two-classes (Tusher et al., 2001). Cada amostra (1) e suas respectivas réplicas biológicas (2 e 3) estão representadas em uma coluna (indicada na parte de baixo). As réplicas técnicas são indicadas pelas letras da respectiva amostra (A, B) e os genes estão representados um em cada linha. Um dendograma mostra o agrupamento baseado na similaridade do perfil de expressão entre os genes. Análise UPGMA (Baseada em matriz de distância) foi realizada usando a “distância Euclidiana” para determinar a medida de similaridade. As cores indicam o número de desvios padrão acima (vermelho) ou abaixo (verde) do valor médio de cada gene calculado ao longo de todas as amostras, como mostrado na escala de cores, na parte de baixo da figura.

Foram selecionados os 30 genes mais diferencialmente expressos em fêmeas separadas (15 genes com expressão aumentada e 15 genes com expressão diminuída) (Tabela 14) e 30 genes em machos separados (15 genes com expressão aumentada e 15 genes com expressão diminuída) (Tabela 15), o que deve representar os genes mais expressos em cada uma das condições. As sondas do *oligoarray* foram desenhadas dentro de um rigoroso conjunto de valores para conteúdo CG e Tm, fazendo com que a cinética de hibridação entre todas as sondas e os seus alvos seja muito semelhante. Portanto, é razoável prever que a intensidade do sinal para cada sonda está correlacionada com a abundância do RNA alvo. Não surpreendentemente, muitos dos genes mais expressos codificam proteínas estruturais, proteínas ribossomais, proteínas relacionadas à musculatura e proteínas do tegumento.

Tabela 14 - Identidade, categorias de função celular e *fold-change* dos 30 genes mais diferencialmente expressos em fêmeas separadas mantidas *in vitro* por 13 dias em relação a fêmeas pareadas. 15 genes estão com sua expressão aumentada (↑) e 15 genes estão com sua expressão diminuida (↓).

Contig	Identidade	Expressão	Fold Change
C919228.1	AMP dependent ligase, putative	↑	91,5
C807873.1	dynein heavy chain, putative	↑	12,3
C813246.1	calcium binding protein, putative	↑	9,5
C800692.1	calmodulin, putative	↑	7,9
C802233.1	myosin heavy chain, putative	↑	6,9
C813400.1	egf-like domain protein	↑	6,8
C801630.1	tropomyosin, putative	↑	6,4
C905265.1	cationic amino acid transporter, putative	↑	6,2
C900186.1	actin, putative	↑	6,0
JAP08831.S	atpase, class VI, type 11c, putative	↑	5,8
JAP09074.S	tropomyosin, putative	↑	5,6
C904960.1	cationic amino acid transporter, putative	↑	5,6
C915696.1	venom allergen-like (VAL) 6 protein	↑	5,6
C811688.1	multidrug resistance protein 1, 2, 3 (p glycoprotein 1, 2, 3), putative	↑	4,8
C810602.1	NAD dependent epimerase/dehydratase, putative	↓	4,7
C801015.1	mitochondrial ribosomal protein L24, putative	↓	4,5
C900014.1	innexin, putative	↓	4,4
C811270.1	phospholipase C beta, putative	↓	4,3
C910061.1	cytoplasmic polyadenylation element binding protein (cpeb), putative	↓	4,3
JAP10240.C	membrane associated ring finger 1,8, putative	↓	3,5
C806184.1	negative cofactor 2 transcriptional co-repressor (nc2), putative	↓	3,1
C806251.1	requim, req/dpf2, putative	↓	3,1
C804704.1	early growth response protein, putative	↓	3,1
JAP07739.C	serine/threonine protein kinase, putative	↓	3,0
JAP02446.C	GTP binding protein, putative	↓	2,9
C800241.1	serine hydroxymethyltransferase, putative	↓	2,8
C918198.1	tetraspanin, putative	↓	2,7
C916778.1	ribosome biogenesis protein bms1, putative	↓	2,7
C802317.1	putative ATP-ase	↓	2,7
C805758.1	serine hydroxymethyltransferase, putative	↓	2,7

Tabela 15 - Identidade, categorias de função celular e *fold-change* dos 30 genes mais diferencialmente expressos em machos separados mantidas *in vitro* por 13 dias em relação a machos pareados. 15 genes estão com sua expressão aumentada (↑) e 15 genes estão com sua expressão diminuida (↓).

Contig	Identidade	Expressão	Fold Change
C919228.1	AMP dependent ligase, putative	↓	3,2
C810602.1	NAD dependent epimerase/dehydratase, putative	↓	3,1
JAP00720.C	amino acid transporter, putative	↓	2,5
C920999.1	dynein light chain, putative	↓	2,2
C810030.1	steroid dehydrogenase, putative	↓	1,7
C810059.1	tegumental protein , putative	↓	1,7
C810572.1	cytoplasmic dynein light chain, putative	↓	1,7
C920438.1	DNA-directed rna polymerase II, putative	↓	1,7
C806775.1	Antigen Sm21.7, putative	↓	1,6
C919540.1	calmodulin, putative	↓	1,6
C803904.1	DNA replication licensing factor MCM2, putative	↓	1,4
C905343.1	atpase, class VI, type 11c, putative	↓	1,4
C811176.1	nebulin, putative	↓	1,4
JAP00768.S	synaptotagmin, putative	↓	1,3
C917058.1	Cdk5, putative	↓	1,3
C801630.1	tropomyosin, putative	↑	1,6
C811329.1	inositol triphosphate 3-kinase C, putative	↑	1,5
C902025.1	nuclear movement protein related	↑	1,5
C919187.1	alpha-actinin, putative	↑	1,5
C903291.1	oxalate:formate antiporter, putative	↑	1,5
C800287.1	aspartate aminotransferase, putative	↑	1,4
C812028.1	calponin-related	↑	1,4
C913200.1	GTP-binding protein era, putative	↑	1,4
C810248.1	ryanodine receptor related	↑	1,4
C905032.1	dock-9, putative	↑	1,3
C811085.1	rna-binding protein musashi-related	↑	1,3
C800727.1	protein phosphatase 2c, putative	↑	1,3
C806645.1	heat shock protein 70 (hsp70)-interacting protein, putative	↑	1,3
C903315.1	sugar transporter, putative	↑	1,3
C803643.1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase, putative	↑	1,3

4.4. Estudo dos efeitos do contato físico do pareamento (macho e fêmea) e efeitos da possível difusão de proteínas e hormônios no meio de cultura no perfil de expressão gênica de vermes adultos de *S. mansoni* mantidos in vitro durante 13 dias.

Realizamos este estudo com o objetivo de observar os genes que estão correlacionados ao contato físico do pareamento (macho e fêmea) e genes que são regulados pela possível difusão de proteínas e hormônios secretados no meio, para os quais a mudança do nível de expressão não dependa da necessidade de contato entre o macho e a fêmea (Figura 20).

Utilizamos o programa SAM (*Significance Analysis of Microarray*) (Tusher *et al.*, 2001) para realizar uma análise estatística, SAM *multiclass*. Para os dados de expressão gênica dos quatro grupos de fêmeas (fêmeas pareadas, fêmeas separadas, fêmeas re-pareadas, e fêmeas separadas colocadas na presença de macho, porem sem contato direto) foram encontrados 545 genes diferencialmente expressos (FDR < 0,01%) (Figura 25).

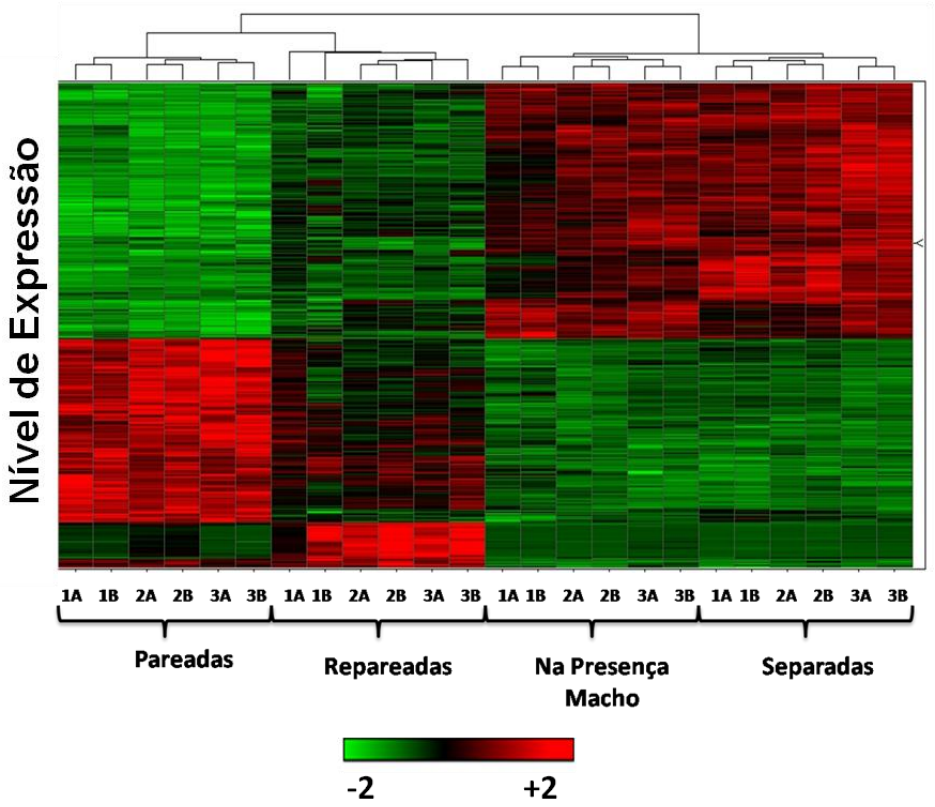

Figura 25 - Comparação entre fêmeas pareadas (Pareadas), fêmeas separadas e depois mantidas na ausência de machos (Separadas), fêmeas re-pareadas (Repareadas) e fêmeas na presença de macho porém sem re-pareamento (Na Presença Macho). Agrupamento Hierárquico dos 545 genes encontrados utilizando o teste *Significance Analysis of Microarrays* (SAM) multi-classes (Tusher et al., 2001). Cada amostra (1) e suas respectivas réplicas biológicas (2 e 3) estão representadas em uma coluna (indicada na parte de baixo). As réplicas técnicas são indicadas pelas letras da respectiva amostra (A, B) e os genes estão representados um em cada linha. Um dendograma mostra o agrupamento baseado na similaridade do perfil de expressão entre os genes. Análise UPGMA (Baseada em matriz de distância) foi realizada usando a "distância Euclidiana" para determinar a medida de similaridade. As cores indicam o número de desvios padrão acima (vermelho) ou abaixo (verde) do valor médio de cada gene calculado ao longo de todas as amostras, como mostrado na escala de cores, na parte de baixo da figura.

Investigamos também se tal comportamento ocorreria com vermes machos adultos, ou seja, se a expressão gênica de machos adultos pode ser regulada pelo contato com as fêmeas e se pode ser restabelecida aos re-parearmos os vermes. Utilizamos o programa SAM (Tusher *et al.*, 2001) para realizar uma analise estatística, *SAM multiclass*, dos dados de expressão gênica. Para os três grupos de machos encontramos 277 genes diferencialmente expressos (FDR 1 %) (Figura 26).

A análise revelou que o contato direto também é necessário para o macho manter sua atividade funcional e que o re-repareamento restabelece um perfil de expressão gênica semelhante ao de machos pareados.

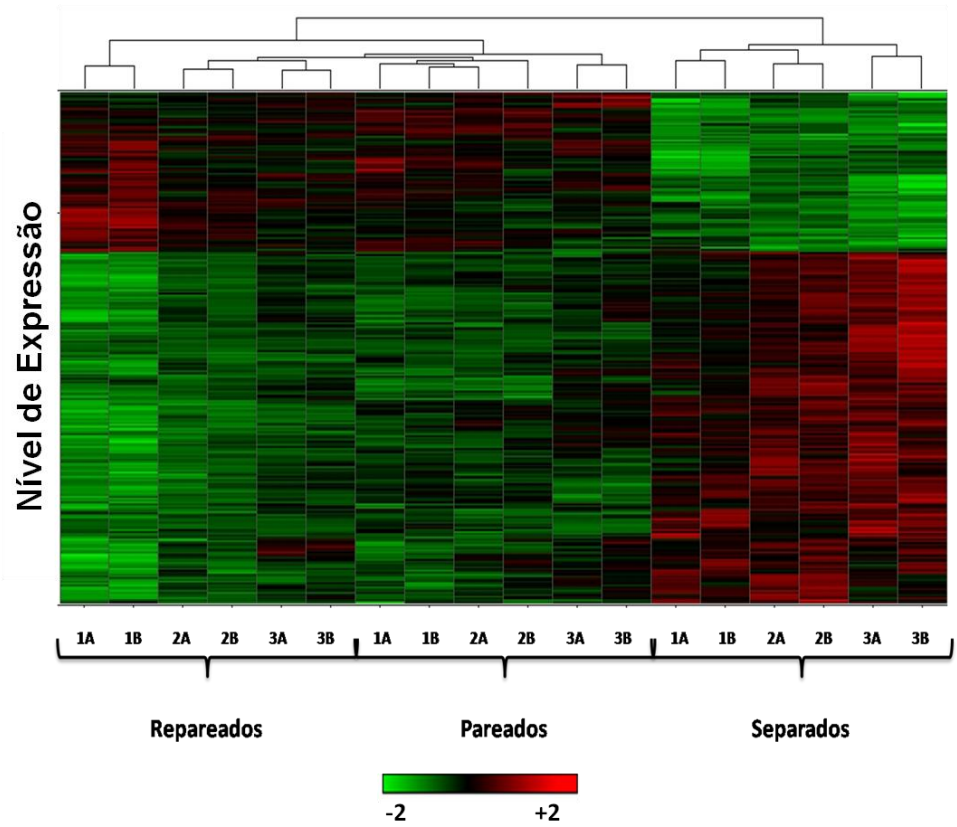

Figura 26 - Comparação entre machos pareados (Pareados), machos separados e depois mantidos na ausência de fêmeas (Separados), machos re-pareados (Repareados). Agrupamento hierárquico dos 277 genes encontrados utilizando o teste *Significance Analysis of Microarrays* (SAM) multi-classes (Tusher *et al.*, 2001). Cada amostra (1) e suas respectivas réplicas biológicas (2 e 3) estão representadas em uma coluna (indicada na parte de baixo). As réplicas técnicas são indicadas pelas letras da respectiva amostra (A, B) e os genes estão representados um em cada linha. Um dendograma mostra o agrupamento baseado na similaridade do perfil de expressão entre os genes. Análise UPGMA (Baseada em matriz de distância) foi realizada usando a “distância Euclidiana” para determinar a medida de similaridade. As cores indicam o número de desvios padrão acima (vermelho) ou abaixo (verde) do valor médio de cada gene calculado ao longo de todas as amostras, como mostrado na escala de cores, na parte de baixo da figura.

Além disso, observamos que fêmeas separadas e depois mantidas na presença do macho, porém sem re-pareamento, apresentam uma expressão gênica diferente das fêmeas separadas e depois mantidas na ausência de machos (Figura 27).

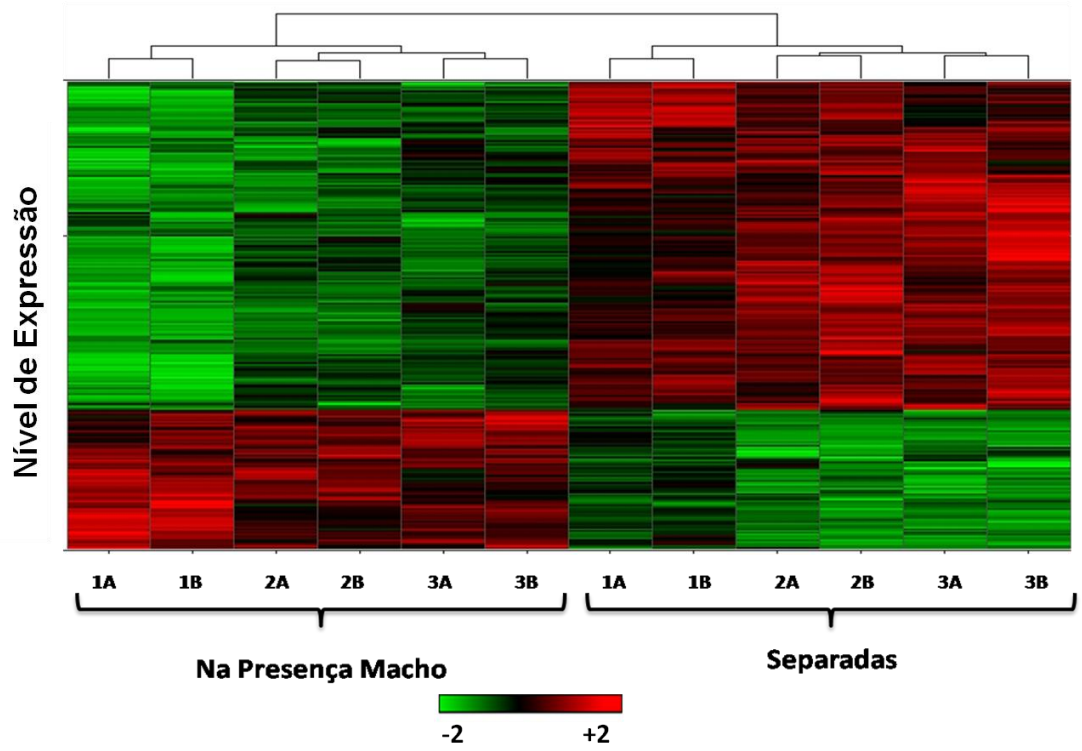

Figura 27 - Comparação entre fêmeas separadas e depois mantidas na ausência de machos e fêmeas separadas e depois mantidas na presença de macho, porém sem re-pareamento. Agrupamento hierárquico dos 253 genes encontrados utilizando o teste *Significance Analysis of Microarrays* (SAM) com duas-classes (Tusher et al., 2001). Cada amostra (1) e duas réplicas biológicas (2 e 3) estão representadas em uma coluna (indicada na parte de baixo). As réplicas técnicas são indicadas pelas letras da respectiva amostra (A, B). Os genes estão representados um em cada linha. Um dendograma mostra o agrupamento baseado na similaridade do perfil de expressão entre os genes. Análise UPGMA (Baseada em matriz de distância) foi realizada usando a "distância Euclidiana" para determinar a medida de similaridade. As cores indicam o número de desvios padrão acima (vermelho) ou abaixo (verde) do valor médio de cada gene calculado ao longo de todas as amostras, como mostrado na escala de cores, na parte de baixo da figura.

Dos 75 genes que apresentam sua expressão aumentada em fêmeas separadas e depois mantidas na presença de macho (porém sem re-pareamento) apenas 23 genes (30%) possuem função descrita em outros organismos (Tabela 16). Dentre os 51 genes restantes, 31 (41%) são "*no matchs*" e 21 (29%) possuem similaridade com proteínas hipotéticas de outros organismos.

Tabela 16 - Identidade, Contig e fold change dos 23 genes com função descrita em outros organismos e que apresentaram expressão aumentada em fêmeas

separadas e depois mantidas na presença de macho (porém sem re-pareamento) *in vitro* por 13 dias em relação às fêmeas separadas.

Contig	Identidade	FoldChange
C800944.1	rab-gap/tbc-related	6,0
C910100.1	syndecan, putative	3,4
JAP02139.S	macroglobulin/complement, putative	2,1
C921202.1	macroglobulin/complement, putative	2,1
JAP08703.C	fatty acid acyl transferase-related	2,1
JAP03991.C	macroglobulin/complement, putative	2,0
C912599.1	ubiquitin-specific protease, putative	1,9
C812730.1	annexin, putative	1,7
C806921.1	alpha-galactosidase/alpha-n-acetylgalactosamini da se,putative	1,5
C806201.1	carbamoyl-phosphate synthase large chain, putative	1,5
C803770.1	carbamoyl-phosphate synthase large chain, putative	1,5
C916699.1	afadin (af-6 protein), putative	1,4
C804828.1	carbamoyl-phosphate synthase large chain, putative	1,3
C805449.1	ATP-binding cassette transporter, putative	1,3
C804057.1	Spectrin beta chain, brain 4 (Spectrin, non- erythroid beta chain 4) (Beta-V spectrin) (BSPECV), putative	1,3
C809175.1	fer-1-related	1,3
C808892.1	multidrug resistance protein 1, 2, 3 (p glycoprotein 1, 2, 3), putative	1,3
C806188.1	choline dehydrogenase, putative	1,2
C908573.1	phospholipase d - related	1,2
C804239.1	dead box ATP-dependent rna helicase, putative	1,2
C808899.1	phospholipase d - related	1,2
C921269.1	cysteine-rich with egf-like domains protein	1,2
C810833.1	isochorismatase family protein, putative	1,2

Já em relação aos 178 genes com expressão diminuída em fêmeas separadas e depois mantidas na presença de macho (porém sem re-pareamento), apenas 87 (49%) genes possuem função descrita em outros organismos, 38 (21%) são "*no matchs*" e 53 (30%) possuem similaridade com proteínas hipotéticas de outros organismos, sem função conhecida (Tabela 17).

Tabela 17 - Identidade, Contig e fold change dos 63 genes (sem redundância) com função descrita em outros organismos e que apresentaram expressão diminuida em fêmeas separadas e depois mantidas na presença de macho (porém sem re-pareamento) *in vitro* por 13 dias em relação às fêmeas separadas.

Contig	Identidade	**FoldChange**
C810389.1	aspartic proteinase-related	3,3
C904960.1	cationic amino acid transporter, putative	2,5
JAP02446.C	GTP binding protein, putative	2,2
C904724.1	sorting nexin, putative	2,1
C807873.1	dynein heavy chain, putative	2,1
JAP10094.S	fatty acid desaturase, putative	2,0
C902299.1	phopholipase d, putative	2,0
C800076.1	similar to tetraspanin TE736	1,9
C916653.1	venom allergen-like (VAL) 6 protein	1,8
C807419.1	sodium/solute symporter, putative	1,8
C900256.1	protein tyrosine phosphatase prl, putative	1,8
C804365.1	nuclear transcription factor, X-box binding 1 (nfx1), putative	1,8
C811703.1	ATP-diphosphohydrolase 1, putative	1,7
C904240.1	multidrug resistance pump, putative	1,7
C800699.1	phospholipid scramblase 1,, putative	1,7
JAP03801.C	glucose transporter, putative	1,6
C917254.1	actin, putative	1,6
C802810.1	nebulin, putative	1,5
C900185.1	f-box and wd40 domain protein, putative	1,5
C903149.1	gtpase activating protein-related	1,5
C800398.1	calpain 4, 6, 7, invertebrate, putative	1,5
C800230.1	tyrosine protein kinase csk (ptk group III), putative	1,5
C811578.1	maguk P55 subfamily member 2,6, putative	1,5
C802204.1	annexin, putative	1,5
C918315.1	zinc finger protein, putative	1,5
C801714.1	monocarboxylate transporter, putative	1,5
C905343.1	atpase, class VI, type 11c, putative	1,5
C915534.1	fasting-inducible integral membrane protein tm6p1-related	1,4
C902748.1	glutamate receptor, ionotropic, n-methyl d- aspartate, putative	1,4
C919831.1	transcriptional adaptor 2 (ada2)-related	1,4
C917058.1	Cdk5, putative	1,4
C800321.1	rap1 and, putative	1,4
JAP03778.C	ef-hand domain (C-terminal) containing protein, putative	1,4
C807330.1	apoptosis inhibitor, putative	1,3
C813198.1	prokaryotic DNA topoisomerase, putative	1,3
C915712.1	sialin (solute carrier family 17 member 5) (sodium/sialic acid cotransporter) (ast) (membrane glycoprotein hp59), putative	1,3
C906658.1	high-affinity cgmp-specific 3,5-cyclic phosphodiesterase, putative	1,3
C803482.1	transmembrane protein 56 , putative	1,3
C800175.1	ribosomal pseudouridine synthase, putative	1,3
C800033.1	rabb and C, putative	1,3
C809659.1	neurotracting/lsamp/neurotrimin/obcam related cell adhesion molecule	1,3
C800691.1	lipoma hmgic fusion partner-like protein 4,	1,3
C810263.1	adenylate cyclase, putative	1,3
JAP06511.S	mitochondrial carrier protein-related	1,3
C802579.1	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit gamma, mitochondrial, putative	1,3
C804924.1	Exosome complex exonuclease RRP43, putative	1,3
JAP05707.S	Intersectin-1 (EH and SH3 domains protein 1), putative	1,3
JAP09819.C	coproporphyrinogen III oxidase, putative	1,3
C809804.1	tubulin epsilon chain, putative	1,2
C810522.1	protease U48 caax prenyl protease rce1, putative	1,2
C812133.1	aspartate aminotransferase, putative	1,2
C800458.1	dehydrodolichyl diphosphate synthase (dedol-pp synthase), putative	1,2
C915531.1	snf7-like protein (bc-2) (putative breast adenocarcinoma marker)	1,2
JAP08149.S	neurotransmitter gated ion channel, putative	1,2
JAP11260.C	activating signal cointegrator 1 complex subunit 3, helc1, putative	1,2
JAP10895.C	acyl-CoA thioesterase-related	1,2
C803803.1	ADP-ribosylglycohydrolase, putative	1,2
JAP07518.C	syntaxin, putative	1,2
C802166.1	arginyl-tRNA synthetase, putative	1,2
C910167.1	nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase, putative	1,2
C802252.1	eukaryotic translation initiation factor 4h, putative	1,2
C809917.1	hematopoietic lineage cell specific protein, putative	0,9

5. Discussão

Para os estudos dos efeitos do pareamento no perfil de expressão gênica de fêmeas adultas separadas usamos inicialmente a plataforma de 4 mil elementos uma vez que esta era a técnica disponível na época dos experimentos (isto é, o ensaio *in vitro* por 24 horas). Posteriormente, com o avanço de novas tecnologias, tinhamos a possibilidade de analisar outra condição de pareamento (*in vitro* por 13 dias) em uma plataforma mais robusta (44 mil elementos). Apesar da diferença entre as plataformas e do tempo de cultura encontramos um grande número de genes igualmente diferencialmente expressos em ambas as análises. Sendo assim, iremos discutir tais genes em conjunto, independente do tempo de cultivo. Tal abordagem também será utilizada para discutir o efeito do pareamento em tempos curto e longo (24 hs e 13 dias, respectivamente) sobre o perfil de expressão gênica de machos adultos separados.

Dois genes interessantes encontrados com a expressão aumentada em fêmeas separadas são CA150 de *S. mansoni* (SmCA150) e Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HGPRTase). SmCA150 (DeMarco *et al.*, 2006) é um fator transcricional conhecido em humanos que interage com RNA polimerase II e com o complexo spliceossomo (Sune *et al.*, 1997; Goldstrohm *et al.*, 2001). Já a Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HGPRTase) catalisa a conversão de hipoxantina a inosina monofosfato e guanina para guanosina e, foi descrita no ano de 1998, como potencial alvo no tratamento da esquistossomose (Pereira et al., 1998).

O gene JNK de *S. mansoni* mostrou aumento de expressão em fêmeas separadas. As c-Jun N-terminal Quinases (JNKs) são uma família de quinases ativadas por estresse (como citocinas, radiação ultravioleta, irradiação, choque

térmico e choque osmótico) (Vlahopoulos e Zoumpourlis, 2004). As JNKs fazem parte da família das MAPK. A via de sinalização das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) é evolutivamente conservada entre os eucariotos e tem um papel fundamental em vários processos celulares (Lili *et al.*, 2006). Tais vias também estão envolvidas na maturação sexual das fêmeas de *Schistosoma,* na produção de ovos e na resposta inflamatória do hospedeiro aos ovos (Kunz, 2001a). Recentemente as JNKs foram descritas com expressão aumentada em fêmeas adultas de *S. japonicum* (Lili *et al.*, 2006).

S. mansoni apresenta a maior parte dos genes necessários para os principais processos metabólicos, como a glicólise, ciclo do ácido tricarboxílico e da via das pentoses fosfato (Brouwers *et al.*, 1997). Entretanto, o parasita possui uma deficiência no metabolismo de lipídios e é incapaz de fazer a síntese *de novo* de esteróis e ácidos graxos livres (Brouwers *et al.*, 1997). Tal observação foi confirmada pelo genoma do *S. mansoni,* que identificou genes codificadores de uma extensa gama de proteínas de transporte de lipídios, mas nenhum gene codificador de proteína relacionada à síntese de lipídios (Berriman *et al.*, 2009). Nossos resultados mostram um aumento da expressão de dois genes que codificam proteínas envolvidas com a ligação de lipídeos, a Oxysterol-binding protein 1 e a High density lipoprotien binding protein/vigilin. É ainda interessante notar, com relação ao metabolismo de lipídeos que a cristalização do grupo heme livre em hemozoina (Hz) dentro do intestino do *S. mansoni* é uma rota importante de desintoxicação que envolve gotículas lipídicas (Oliveira *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2005) e pode ser considerada um potencial alvo quimioterápico (Corrêa Soares *et al.*, 2009).

SmATPase 1, distrofina e ABC (ABC 7, proteinas de multi-resistência a droga) são genes com a expressão significativamente aumentada em fêmeas separadas. É notável que estes genes codifiquem proteínas importantes para a manutenção do metabolismo da fêmea. SmATPse1 é uma enzima de tegumento que pode ter um papel na interação com o hospedeiro (Bentley *et al.*, 2004). Sabe-se que a distrofina e a distrobrevina formam um heterodímero para formar o dobramento central de um complexo crucial associado à membrana, o complexo distrofina-glicoproteína (DGC). Embora o papel da DGC, provavelmente, varie de organismo para organismos, há uma associação recorrente entre a DGC e a junção neuromuscular (NMJ), uma sinapse especializada colinérgica (Tan *et al.*, 2007). Assim, no *S. mansoni*, a remoção da distrofina, poderia resultar em uma característica de hipersensibilidade dos músculos à acetilcolina (Giugia *et al.*, 1999; Gieseler *et al.*, 2001; Grisoni *et al.*, 2003). *ATP Binding Cassette* (ABC) representa uma importante família de proteínas de membrana envolvidas na resistência de drogas e em outras atividades biológicas (Pereira *et al.*, 1998).

Os genes codificadores de membros da superfamília de fatores de crescimento transformante (*transforming growth factor*, TGF-β) estão com a expressão significativamente aumentada em fêmeas separadas. As proteínas por eles codificadas têm um papel central na migração celular, diferenciação, adesão, formação de padrões e apoptose (Roberts e Sporn, 1993; Kingsley, 1994; Hogan, 1996). A família de proteínas Smad atua como transdutores de sinalização intracelular de peptídeos TGF-β e afins. O receptor regulado Smad1 de *S. mansoni* foi previamente identificado e demonstrada sua ação na sinalização de TGF-β (Beall *et al.*, 2000).

Os genes codificadores das proteínas com atividade oxido-redutase, a tireodoxina peroxidase e a glutamato sintase, que são enzimas antioxidantes que auxiliam na prevenção de danos oxidativos (Kwatia *et al.*, 2000) estão com a expressão significativamente aumentada em fêmeas separadas. Isso sugere um possível aumento na quantidade de radicais livres gerados por grupos heme livres (Oliveira *et al.*, 2004), que poderiam ser consequência de um maior consumo de sangue pelas fêmeas separadas do que pela pareadas, uma situação similar a descrita para fêmeas tratadas com quinina (Oliveira *et al.*, 2004).

O gene que codifica a glicoproteína de superfície de 200 kDa está com a expressão significativamente diminuída em fêmeas separadas mantidas *in vitro* em relação as fêmeas pareadas. Tal glicoproteína foi descrita como um potencial alvo no tratamento da esquistossomose (Hall *et al.*, 1995) e é necessária para a ação do praziquantel sobre *Schistosoma* (Brindley *et al.*, 1989). Uma menor quantidade desta glicoproteína na superfície das fêmeas poderia explicar porque fêmeas separadas são mais resistentes ao praziquantel do que fêmeas pareadas, um efeito descrito na literatura (Pica-Mattoccia e Cioli, 2004) para o qual não se conhece o mecanismo.

Quanto a formação da casca do ovo temos dois genes importantes com a expressão diminuída, Sm28 (Boulanger *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 1993) e precursor da tirosinase 1 (TYR1). O gene TYR1 codifica proteínas que estão correlacionadas na formação da casca do ovo (Fitzpatrick *et al.*, 2004).

Dois genes que codificam proteínas antigênicas e que têm sido apontados como candidatos vacinais estão com sua expressão diminuída em fêmeas separadas: Sm28 glutationa S-transferase (Comoy *et al.*, 1998) e Sm14, que podem induzir a resposta imune celular em indivíduos de áreas endêmicas para esquistossomose (Brito *et al.*, 2000).

Referente aos estudos dos efeitos do pareamento no perfil de expressão gênica de machos adultos separados de *S. mansoni* mantidos *in vitro* encontramos genes relacionados à musculatura do parasita. L-glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central de mamíferos e, portanto, receptores e transportadores de glutamato têm sido amplamente estudados nestes sistemas (Miller *et al.*, 1996). Alfa actina foi previamente detectada no citoplasma do tegumento apical (MacGregor e Shore, 1990). É possível que a tropomiosina e a actina estejam presentes em prontidão para a utilização em processos que envolvam o reparo do tegumento (Matsumoto *et al.*, 1988).

Uma observação interessante foi o aumento da expressão do gene que codifica para a cadeia leve de miosina de *S. mansoni* (SmMLC) em machos adultos separados. Análises *in vitro* confirmaram que o praziquantel (PZQ) liga-se fortemente a proteína SmMLC (Gnanasekar *et al.*, 2009). Além disso, estudos de mapeamento mostraram que PZQ se liga aos aminoácidos 46-76 da SmMLC. Curiosamente, níveis significativos de anticorpos anti-SmMLC estavam presentes em camundongos vacinados em comparação com o conjunto de camundongos infectados, sugerindo que SmMLC pode ser um alvo potencial para a imunidade protetora em esquistossomose (Gnanasekar *et al.*, 2009).

Encontramos diversos genes relacionados à transcrição e sua regulação com expressão aumentada em machos separados. Motivos dedos de zinco são encontrados em diversas proteínas reguladoras da transcrição entre os organismos eucarióticos (Vanchinathan *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008). Entre eles está o gene que codifica para SmZF1 (proteína de dedo de zinco de *S. mansoni*), que é uma proteína de 19 kDa contendo três motivos C2H2 tipo dedo de zinco. A transcrição de SmZF1 também foi detectada por PCR em ovos, cercárias, esquistossômulos e

bibliotecas de cDNA de verme adulto, sugerindo que a proteína é essencial para o metabolismo durante as diferentes fases do ciclo de vida do parasita (Souza *et al.*, 2001). Recentemente SmZF1 foi caracterizada como um fator transcricional (Drummond *et al.*, 2009).

Entre os genes com expressão aumentada em machos separados identificamos os que codificam para Histonas deacetilases (HDACs). Em eucariotos as HDACs têm sido tradicionalmente divididas em três classes I, II e III, com classes I e II incluindo enzimas que partilham domínios catalíticos semelhantes e um mecanismo catalítico dependente de Zn^{2+} e a classe III inclui as enzimas relacionadas com o gene da levedura Sir2 (sirtuins) e são dependentes de NAD^{+} (Dubois *et al.*, 2009). Inibidores de histonas deacetilases têm sido estudados para identificar seu potencial de ação como drogas antiparasitárias. A trichostatina A (TSA), um inibidor de histonas deacetilases induz a morte de *S. mansoni*, a apoptose, a hiperacetilação de histonas e o aumento da expressão de genes (Dubois *et al.*, 2009). Nossas observações sugerem que machos separados seriam mais susceptíveis a tratamento com inibidores de HDACs do que machos pareados.

Machos separados apresentam um aumento dos genes que codificam enzimas relecionadas à degradação do grupo prostético Heme e proteínas ligadas à atividade oxidoredutase. Mais uma vez, isso sugere um possível aumento na quantidade de radicais livres gerados por grupos heme livres (Oliveira *et al.*, 2004), que poderiam ser consequência de um maior consumo de sangue pelos machos separados do que pelos pareados, uma situação similar a descrita para fêmeas tratadas com quinina (Oliveira *et al.*, 2004).

Foram identificados genes codificadores de tetraspanina (TSP) com expressão aumentada em machos separados. A família das tetraspaninas parece

estar abundantemente representada no tegumento do *S. mansoni* (van Balkom *et al.*, 2005; Braschi *et al.*, 2006; Simon *et al.*, 2006). Ensaios recentes com TSP2 indicam potencial desta molécula como uma vacina recombinante segura e eficaz contra a esquistossomose humana (Tran *et al.*, 2006). Nossas observações sugerem que machos separados seriam mais susceptíveis à vacinação do que machos pareados.

Genes codificadores de proteinas de multi-resistência a droga foram aqui detectados com expressão aumentada em machos separados. A superfamilia de proteínas relacionadas à resistencia a drogas (ABC) possui várias bombas de efluxo ATP-dependentes envolvidas no transporte de toxinas e xenobióticos das células. Estes transportadores são componentes essenciais da fisiologia normal, e um subconjunto das ABC está associado com o desenvolvimento de multi-resistência. Já foi relatado que os genes SmMRP1 e SmMRP2, que codificam para duas proteínas da família dos transportadores ABC, apresentam-se com expressão aumentada em machos e fêmeas tratados com Praziquantel (PZQ)(Messerli *et al.*, 2009; Kasinathan *et al.*, 2010). Interessante notar que trabalho anterior apontou que machos sozinhos são mais sucetiveis a tratamento com PZQ (Pica-Mattoccia e Cioli, 2004), sugerindo que o aumento na expressão de genes da família ABC, aqui detectado, não seja suficiente para aumentar a resistência a PZQ.

As análises SAM *multiclass* revelaram que o contato direto macho - fêmea é necessário para manter a atividade reprodutiva feminina e que o re-pareamento pode restabelecer o perfil de expressão gênica de fêmeas e machos anteriormente separados.

A difusão de possíveis proteínas secretadas no meio não é suficiente para reverter a mudança de expressão de certos genes, que havia sido causada pela

separação dos pares. Entre estes genes, estão dois que codificam proteínas relacionadas à resistencia a drogas (transportadores ABC), que estão aumentados em fêmeas separadas e posteriormente se mantêm aumentados mesmo na presença de macho.

A difusão de possíveis proteínas e/ou hormônios secretados no meio afeta a expressão de genes em fêmeas mantidas na presença de machos, sem contato direto, porém parece não favorecer a manutenção do organismo das fêmeas, uma vez que diversos genes importantes para tal manutenção apresentam-se com expressão diminuída: genes relacionados à produção de actina, tubulina e receptor de glutamato (importantes para a musculatura do parasita), às proteínas dedos de zinco, fundamentais para a regulação da transcrição (Souza *et al.*, 2001; Vanchinathan *et al.*, 2005), além do gene que codifica a proteína tirosina quinase, que está envolvida na regulação do processo de pareamento, proliferação e diferenciação de células do vitelíno e embriogênese de ovos (LoVerde *et al.*, 2009).

6. Conclusões

Vermes adultos separados têm sua expressão gênica modulada, de modo a sobreviverem sem seu respectivo par. Há uma diminuição na expressão de antígenos de superfície, o que pode ser um importante mecanismo que evoluiu com *Schistosoma* para reduzir os danos causados pelo sistema imune do hospedeiro. Tais vermes também parecem apresentar um metabolismo energético acelerado com maior consumo de sangue do hospedeiro; a demanda de nutrientes poderia ser justificada devido ao grande número de genes relacionados à transcrição que estão com sua expressão aumentada.

O contato direto da fêmea com o macho é necessário para manter a atividade reprodutiva feminina e o re-pareamento pode restabelecer o perfil de expressão gênica de fêmeas ou machos separados.

As fêmeas separadas e depois mantidas na presença do macho, porém sem re-pareamento, apresentam uma expressão gênica diferente das fêmeas separadas e depois mantidas na ausência de machos. Tais genes são possivelmente regulados pela difusão de proteínas e hormônios secretados pelo macho no meio, para os quais a mudança do nível de expressão não depende da necessidade de contato direto entre o macho e a fêmea. Uma interessante abordagem futura seria a identificação destes fatores secretados pelos machos, aqui detectados como afetando a expressão gênica de fêmeas.

7. Bibliografia

Abath, F. G., Gomes, A. L., Melo, F. L., Barbosa, C. S. and Werkhauser, R. P. (2006). "Molecular approaches for the detection of Schistosoma mansoni: possible applications in the detection of snail infection, monitoring of transmission sites, and diagnosis of human infection." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **101 Suppl 1**: 145-148.

Akinwale, O. P., Laurent, T., Mertens, P., Leclipteux, T., Rollinson, D., Kane, R., Emery, A., Ajayi, M. B., Akande, D. O. and Fesobi, T. W. (2008). "Detection of schistosomes polymerase chain reaction amplified DNA by oligochromatographic dipstick." *Mol Biochem Parasitol* **160**(2): 167-170.

Al-Sherbiny, M. M., Osman, A. M., Hancock, K., Deelder, A. M. and Tsang, V. C. (1999). "Application of immunodiagnostic assays: detection of antibodies and circulating antigens in human schistosomiasis and correlation with clinical findings." *Am J Trop Med Hyg* **60**(6): 960-966.

Angeli, V., Faveeuw, C., Delerive, P., Fontaine, J., Barriera, Y., Franchimont, N., Staels, B., Capron, M. and Trottein, F. (2001). "Schistosoma mansoni induces the synthesis of IL-6 in pulmonary microvascular endothelial cells: role of IL-6 in the control of lung eosinophilia during infection." *Eur J Immunol* **31**(9): 2751-2761.

Beall, M. J., McGonigle, S. and Pearce, E. J. (2000). "Functional conservation of Schistosoma mansoni Smads in TGF-[beta] signaling." *Molecular and Biochemical Parasitology* **111**(1): 131-142.

Bentley, G. N., Jones, A. K., Oliveros Parra, W. G. and Agnew, A. (2004). "ShAR1alpha and ShAR1beta: novel putative nicotinic acetylcholine receptor subunits from the platyhelminth blood fluke Schistosoma." *Gene* **329**: 27-38.

Berriman, M., Haas, B. J., LoVerde, P. T., Wilson, R. A., Dillon, G. P., Cerqueira, G. C., Mashiyama, S. T., Al-Lazikani, B., Andrade, L. F., Ashton, P. D., et al. (2009). "The genome of the blood fluke Schistosoma mansoni." *Nature* **460**(7253): 352-358.

Boulanger, D., Reid, G. D., Sturrock, R. F., Wolowczuk, I., Balloul, J. M., Grezel, D., Pierce, R. J., Otieno, M. F., Guerret, S., Grimaud, J. A., et al. (1991). "Immunization of mice and baboons with the recombinant Sm28GST affects both worm viability and fecundity after experimental infection with Schistosoma mansoni." *Parasite Immunol* **13**(5): 473-490.

Braschi, S., Borges, W. C. and Wilson, R. A. (2006). "Proteomic analysis of the schistosome tegument and its surface membranes." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **101 Suppl 1**: 205-212.

Brener, Z. and Pellegrino, J. (1956). "Method for isolating schistosome granulomas from mouse liver." *J Parasitol* **42**(6): 564.

Brindley, P. J., Strand, M., Norden, A. P. and Sher, A. (1989). "Role of host antibody in the chemotherapeutic action of praziquantel against Schistosoma mansoni: identification of target antigens." *Mol Biochem Parasitol* **34**(2): 99-108.

Brito, C. F., Caldas, I. R., Coura Filho, P., Correa-Oliveira, R. and Oliveira, S. C. (2000). "CD4+ T cells of schistosomiasis naturally resistant individuals living in an endemic area produce interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha in response to the recombinant 14KDA Schistosoma mansoni fatty acid-binding protein." *Scand J Immunol* **51**(6): 595-601.

Brouwers, J. F. H. M., Smeenk, I. M. B., van Golde, L. M. G. and Tielens, A. G. M. (1997). "The incorporation, modification and turnover of fatty acids in adult Schistosoma mansoni." *Molecular and Biochemical Parasitology* **88**(1-2): 175-185.

Chen, L., Rao, K. V., He, Y. X. and Ramaswamy, K. (2002). "Skin-stage schistosomula of Schistosoma mansoni produce an apoptosis-inducing factor that can cause apoptosis of T cells." *J Biol Chem* **277**(37): 34329-34335.

Comoy, E. E., Capron, A. and Thyphronitis, G. (1998). "Adjuvant is the major parameter influencing the isotype profiles generated during immunization with a protein antigen, the Schistosoma mansoni Sm28-GST." *Scand J Immunol* **47**(5): 444-452.

Contis, G. and David, A. R. (1996). "The epidemiology of Bilharzia in Ancient Egypt: 5000 years of schistosomiasis." *Parasitology Today* **12**(7): 253-255.

Corrêa Soares, J. B. R., Menezes, D., Vannier-Santos, M. A., Ferreira-Pereira, A., Almeida, G. T., Venancio, T. M., Verjovski-Almeida, S., Zishiri, V. K., Kuter, D., Hunter, R., et al. (2009). "Interference with Hemozoin Formation Represents an Important Mechanism of Schistosomicidal Action of Antimalarial Quinoline Methanols." *PLoS Negl Trop Dis* **3**(7): e477.

CVE (2009). Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Vigilância Epidemiológica e Controle da Esquistossomose: normas e instruções. São Paulo: SES. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br (em Doenças Transmitidas por Água e Alimentos e em Documentos Técnicos).

Dalton, J. P., Day, S. R., Drew, A. C. and Brindley, P. J. (1997). "A method for the isolation of schistosome eggs and miracidia free of contaminating host tissues." *Parasitology* **115 (Pt 1)**: 29-32.

DeMarco, R., Oliveira, K. C., Venancio, T. M. and Verjovski-Almeida, S. (2006). "Gender biased differential alternative splicing patterns of the transcriptional cofactor CA150 gene in Schistosoma mansoni." *Mol Biochem Parasitol* **150**(2): 123-131.

Drummond, M. G., Calzavara-Silva, C. E., D'Astolfo, D. S., Cardoso, F. C., Rajão, M. A., Mourão, M. M., Gava, E., Oliveira, S. C., Macedo, A. M., Machado, C. R., et al. (2009). "Molecular Characterization of the <italic>Schistosoma mansoni</italic> Zinc Finger Protein SmZF1 as a Transcription Factor." *PLoS Negl Trop Dis* **3**(11): e547.

Dubois, F., Caby, S., Oger, F., Cosseau, C., Capron, M., Grunau, C., Dissous, C. and Pierce, R. J. (2009). "Histone deacetylase inhibitors induce apoptosis, histone hyperacetylation and up-regulation of gene transcription in Schistosoma mansoni." *Molecular and Biochemical Parasitology* **168**(1): 7-15.

Fenwick, A. and Webster, J. P. (2006). "Schistosomiasis: challenges for control, treatment and drug resistance." *Curr Opin Infect Dis* **19**(6): 577-582.

Fenwick, A., Webster, J. P., Bosque-Oliva, E., Blair, L., Fleming, F. M., Zhang, Y., Garba, A., Stothard, J. R., Gabrielli, A. F., Clements, A. C., et al. (2009). "The Schistosomiasis Control Initiative (SCI): rationale, development and implementation from 2002-2008." *Parasitology* **136**(13): 1719-1730.

Fitzpatrick, J. M., Johansen, M. V., Johnston, D. A., Dunne, D. W. and Hoffmann, K. F. (2004). "Gender-associated gene expression in two related strains of Schistosoma japonicum." *Mol Biochem Parasitol* **136**(2): 191-209.

Fitzpatrick, J. M., Peak, E., Perally, S., Chalmers, I. W., Barrett, J., Yoshino, T. P., Ivens, A. C. and Hoffmann, K. F. (2009). "Anti-schistosomal intervention targets identified by lifecycle transcriptomic analyses." *PLoS Negl Trop Dis* **3**(11): e543.

Franco, G. R., Rabelo, E. M., Azevedo, V., Pena, H. B., Ortega, J. M., Santos, T. M., Meira, W. S., Rodrigues, N. A., Dias, C. M., Harrop, R., et al. (1997). "Evaluation of cDNA libraries from different developmental stages of Schistosoma mansoni for production of expressed sequence tags (ESTs)." *DNA Res* **4**(3): 231-240.

Franco, G. R., Simpson, A. J. and Pena, S. D. (1995). "Sequencing and identification of expressed Schistosoma mansoni genes by random selection of cDNA clones from a directional library." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **90**(2): 215-216.

Gieseler, K., Mariol, M. C., Bessou, C., Migaud, M., Franks, C. J., Holden-Dye, L. and Segalat, L. (2001). "Molecular, genetic and physiological characterisation of dystrobrevin-like (dyb-1) mutants of Caenorhabditis elegans." *J Mol Biol* **307**(1): 107-117.

Giugia, J., Gieseler, K., Arpagaus, M. and Segalat, L. (1999). "Mutations in the dystrophin-like dys-1 gene of Caenorhabditis elegans result in reduced acetylcholinesterase activity." *FEBS Lett* **463**(3): 270-272.

Gnanasekar, M., Salunkhe, A. M., Mallia, A. K., He, Y. X. and Kalyanasundaram, R. (2009). "Praziquantel Affects the Regulatory Myosin Light Chain of Schistosoma mansoni." *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**(3): 1054-1060.

Goldstrohm, A. C., Albrecht, T. R., Sune, C., Bedford, M. T. and Garcia-Blanco, M. A. (2001). "The transcription elongation factor CA150 interacts with RNA polymerase II and the pre-mRNA splicing factor SF1." *Mol Cell Biol* **21**(22): 7617-7628.

Gomes, A. L., Melo, F. L., Werkhauser, R. P. and Abath, F. G. (2006). "Development of a real time polymerase chain reaction for quantitation of Schistosoma mansoni DNA." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **101 Suppl 1**: 133-136.

Grevelding, C. G. (2004). "Schistosoma." *Curr Biol* **14**(14): R545.

Grevelding, C. G., Sommer, G. and Kunz, W. (1997). "Female-specific gene expression in Schistosoma mansoni is regulated by pairing." *Parasitology* **115 (Pt 6)**: 635-640.

Grisoni, K., Gieseler, K., Mariol, M. C., Martin, E., Carre-Pierrat, M., Moulder, G., Barstead, R. and Segalat, L. (2003). "The stn-1 syntrophin gene of C.elegans is functionally related to dystrophin and dystrobrevin." *J Mol Biol* **332**(5): 1037-1046.

Grossmann, S., Bauer, S., Robinson, P. and Vingron, M. (2006). An Improved Statistic for Detecting Over-Represented Gene Ontology Annotations in Gene Sets. *Research in Computational Molecular Biology***:** 85-98.

Hagan, P., Appleton, C. C., Coles, G. C., Kusel, J. R. and Tchuem-Tchuente, L. A. (2004). "Schistosomiasis control: keep taking the tablets." *Trends Parasitol* **20**(2): 92-97.

Hall, T. M., Joseph, G. T. and Strand, M. (1995). "Schistosoma mansoni: molecular cloning and sequencing of the 200-kDa chemotherapeutic target antigen." *Exp Parasitol* **80**(2): 242-249.

Hancock, K. and Tsang, V. C. (1986). "Development and optimization of the FAST-ELISA for detecting antibodies to Schistosoma mansoni." *J Immunol Methods* **92**(2): 167-176.

Hillyer, G. V. (1974). "Buoyant density and thermal denaturation profiles of schistosome DNA." *J Parasitol* **60**(4): 725-727.

Hoffmann, K. F. (2004). "An historical and genomic view of schistosome conjugal biology with emphasis on sex-specific gene expression." *Parasitology* **128 Suppl 1**: S11-22.

Hoffmann, K. F., Johnston, D. A. and Dunne, D. W. (2002). "Identification of Schistosoma mansoni gender-associated gene transcripts by cDNA microarray profiling." *Genome Biol* **3**(8): RESEARCH0041.

Hogan, B. L. M. (1996). "Bone morphogenetic proteins in development." *Current Opinion in Genetics & Development* **6**(4): 432-438.

Hughes, T. R., Mao, M., Jones, A. R., Burchard, J., Marton, M. J., Shannon, K. W., Lefkowitz, S. M., Ziman, M., Schelter, J. M., Meyer, M. R., et al. (2001). "Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer." *Nat Biotechnol* **19**(4): 342-347.

Iseli, C., Jongeneel, C. V. and Bucher, P. (1999). "ESTScan: a program for detecting, evaluating, and reconstructing potential coding regions in EST sequences." *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*: 138-148.

Kasinathan, R. S., Morgan, W. M. and Greenberg, R. M. (2010). "Schistosoma mansoni express higher levels of multidrug resistance-associated protein 1 (SmMRP1) in juvenile worms and in response to praziquantel." *Molecular and Biochemical Parasitology* **173**(1): 25-31.

Katz, N., Chaves, A. and Pellegrino, J. (1972). "A simple device for quantitative stool thick-smear technique in Schistosomiasis mansoni." *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **14**(6): 397-400.

Katz, N., Coelho, P. M. and Pellegrino, J. (1970). "Evaluation of Kato's quantitative method through the recovery of Schistosoma mansoni eggs added to human feces." *J Parasitol* **56**(5): 1032-1033.

King, C. (2001). *Schistosomiasis*, World Scientific Publishing Company.

Kingsley, D. M. (1994). "The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms." *Genes Dev* **8**(2): 133-146.

Knobloch, J., Kunz, W. and Grevelding, C. G. (2006). "Herbimycin A suppresses mitotic activity and egg production of female Schistosoma mansoni." *Int J Parasitol* **36**(12): 1261-1272.

Kunz, W. (2001a). "Schistosome male-female interaction: induction of germ-cell differentiation." *Trends in Parasitology* **17**(5): 227-231.

Kunz, W. (2001b). "Schistosome male-female interaction: induction of germ-cell differentiation." *Trends Parasitol* **17**(5): 227-231.

Kwatia, M. A., Botkin, D. J. and Williams, D. L. (2000). "Molecular and enzymatic characterization of Schistosoma mansoni thioredoxin peroxidase." *J Parasitol* **86**(5): 908-915.

Larsson, O., Wahlestedt, C. and Timmons, J. A. (2005). "Considerations when using the significance analysis of microarrays (SAM) algorithm." *BMC Bioinformatics* **6**: 129.

Le Paslier, M. C., Pierce, R. J., Merlin, F., Hirai, H., Wu, W., Williams, D. L., Johnston, D., LoVerde, P. T. and Le Paslier, D. (2000). "Construction and characterization of a Schistosoma mansoni bacterial artificial chromosome library." *Genomics* **65**(2): 87-94.

Lili, W., Zhong, Y., Yuanyuan, L., Fudong, Y., Paul, J. B., Donald, P. M., Dongzhi, W., Zeguang, H., Zheng, F., Yixue, L., et al. (2006). "Reconstruction and in silico analysis of the MAPK signaling pathways in the human blood fluke, Schistosoma japonicum." *FEBS letters* **580**(15): 3677-3686.

LoVerde, P. T. (2002). "Presidential address. Sex and schistosomes: an interesting biological interplay with control implications." *J Parasitol* **88**(1): 3-13.

LoVerde, P. T., Andrade, L. F. and Oliveira, G. (2009). "Signal transduction regulates schistosome reproductive biology." *Curr Opin Microbiol* **12**(4): 422-428.

MacGregor, A. N. and Shore, S. J. (1990). "Immunocytochemistry of cytoskeletal proteins in adult Schistosoma mansoni." *International Journal for Parasitology* **20**(3): 279-284.

Machado-Silva, J. R., Galvao, C., de Oliveira, R. M., Presgrave, O. A. and Gomes, D. C. (1995). "Schistosoma mansoni Sambon, 1907: comparative morphological studies of some Brazilian strains." *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **37**(5): 441-447.

Matsumoto, Y., Perry, G., Levine, R. J., Blanton, R., Mahmoud, A. A. and Aikawa, M. (1988). "Paramyosin and actin in schistosomal teguments." *Nature* **333**(6168): 76-78.

Merrick, J. M., Osman, A., Tsa, J., Quackenbush, J., LoVerde, P. T. and Lee, N. H. (2003). "The *Schistosoma mansoni* gene index: gene discovery and biology by reconstruction and analysis of expressed gene sequences." *J Parasitol.* **89**(2): 261-269.

Messerli, S. M., Kasinathan, R. S., Morgan, W., Spranger, S. and Greenberg, R. M. (2009). "Schistosoma mansoni P-glycoprotein levels increase in response to praziquantel exposure and correlate with reduced praziquantel susceptibility." *Molecular and Biochemical Parasitology* **167**(1): 54-59.

Miller, C. L., Day, T. A., Bennett, J. L. and Pax, R. A. (1996). "Schistosoma mansoni:-Glutamate-Induced Contractions in Isolated Muscle Fibers; Evidence for a Glutamate Transporter." *Experimental Parasitology* **84**(3): 410-419.

Morel, C. M. (2000). "Reaching maturity - 25 years of the TDR." *Parasitol Today* **16**(12): 522-528.

Murray, C. J. and Lopez, A. D. (1997). "Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study." *Lancet* **349**(9061): 1269-1276.

Neves, R. H., de Lamare Biolchini, C., Machado-Silva, J. R., Carvalho, J. J., Branquinho, T. B., Lenzi, H. L., Hulstijn, M. and Gomes, D. C. (2005). "A new description of the reproductive system of Schistosoma mansoni (Trematoda: Schistosomatidae) analyzed by confocal laser scanning microscopy." *Parasitology Research* **95**(1): 43-49.

Oliveira, K. C., Carvalho, M. L., Venancio, T. M., Miyasato, P. A., Kawano, T., DeMarco, R. and Verjovski-Almeida, S. (2009). "Identification of the Schistosoma mansoni TNF-alpha receptor gene and the effect of human TNF-alpha on the parasite gene expression profile." *PLoS Negl Trop Dis* **3**(12): e556.

Oliveira, M. F., d'Avila, J. C., Tempone, A. J., Soares, J. B., Rumjanek, F. D., Ferreira-Pereira, A., Ferreira, S. T. and Oliveira, P. L. (2004). "Inhibition of heme aggregation by chloroquine reduces Schistosoma mansoni infection." *J Infect Dis* **190**(4): 843-852.

Oliveira, M. F., d'Avila, J. C., Torres, C. R., Oliveira, P. L., Tempone, A. J., Rumjanek, F. D., Braga, C. M., Silva, J. R., Dansa-Petretski, M., Oliveira, M. A., et al. (2000). "Haemozoin in Schistosoma mansoni." *Mol Biochem Parasitol* **111**(1): 217-221.

Oliveira, M. F., Kycia, S. W., Gomez, A., Kosar, A. J., Bohle, D. S., Hempelmann, E., Menezes, D., Vannier-Santos, M. A., Oliveira, P. L. and Ferreira, S. T. (2005). "Structural and morphological characterization of hemozoin produced by Schistosoma mansoni and Rhodnius prolixus." *FEBS Lett* **579**(27): 6010-6016.

Oliveira, M. F., Timm, B. L., Machado, E. A., Miranda, K., Attias, M., Silva, J. R., Dansa-Petretski, M., de Oliveira, M. A., de Souza, W., Pinhal, N. M., et al. (2002). "On the pro-oxidant effects of haemozoin." *FEBS Lett* **512**(1-3): 139-144.

Osman, A., Niles, E. G., Verjovski-Almeida, S. and LoVerde, P. T. (2006). "Schistosoma mansoni TGF-beta receptor II: role in host ligand-induced regulation of a schistosome target gene." *PLoS Pathog* **2**(6): e54.

Pardo, J., Arellano, J. L., Lopez-Velez, R., Carranza, C., Cordero, M. and Muro, A. (2007). "Application of an ELISA test using Schistosoma bovis adult worm antigens in travellers and immigrants from a schistosomiasis endemic area and its correlation with clinical findings." *Scand J Infect Dis* **39**(5): 435-440.

Pellegrino, J. and Katz, N. (1968). "Experimental chemotherapy of Schistosomiasis mansoni." *Adv Parasitol* **6**: 233-290.

Pereira, C., Fallon, P. G., Cornette, J., Capron, A., Doenhoff, M. J. and Pierce, R. J. (1998). "Alterations in cytochrome-c oxidase expression between praziquantel-resistant and susceptible strains of Schistosoma mansoni." *Parasitology* **117 (Pt 1)**: 63-73.

Pica-Mattoccia, L. and Cioli, D. (2004). "Sex- and stage-related sensitivity of Schistosoma mansoni to in vivo and in vitro praziquantel treatment." *Int J Parasitol* **34**(4): 527-533.

Pino-Heiss, S., Brown, M. and McKerrow, J. H. (1985). "Schistosoma mansoni: degradation of host extracellular matrix by eggs and miracidia." *Exp Parasitol* **59**(2): 217-221.

Pirajá da Silva, M. A. (1908). "Contribuição para o estudo da Schistosomíase." *Braz. Med* **22**: 281-282.

Platt, T. R., Blair, D., Purdie, J. and Melville, L. (1991). "Griphobilharzia amoena n. gen., n. sp. (Digenea: Schistosomatidae), a Parasite of the Freshwater Crocodile Crocodylus johnstoni (Reptilia: Crocodylia) from Australia, with the Erection of a New Subfamily, Griphobilharziinae." *The Journal of Parasitology* **77**(1): 65-68.

Pontes, L. A., Dias-Neto, E. and Rabello, A. (2002). "Detection by polymerase chain reaction of Schistosoma mansoni DNA in human serum and feces." *Am J Trop Med Hyg* **66**(2): 157-162.

Popiel, I. and Basch, P. F. (1984). "Reproductive development of female Schistosoma mansoni (Digenea: Schistosomatidae) following bisexual pairing of worms and worm segments." *J Exp Zool* **232**(1): 141-150.

Rabello, A. (1997). "Diagnosing schistosomiasis." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **92**(5): 669-676.

Rabello, A. L., Garcia, M. M., Dias Neto, E., Rocha, R. S. and Katz, N. (1993). "Dot-dye-immunoassay and dot-ELISA for the serological differentiation of acute and chronic schistosomiasis mansoni using keyhole limpet haemocyanin as antigen." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **87**(3): 279-281.

Rabelo, E. M., Franco, G. R., Azevedo, V. A., Pena, H. B., Santos, T. M., Meira, W. S., Rodrigues, N. A., Ortega, J. M. and Pena, S. D. (1997). "Update of the gene discovery program in Schistosoma mansoni with the expressed sequence tag approach." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **92**(5): 625-629.

Ramez, A. and Ibrahim, A. (2008). "THE LIFE OF THEODORE MAXIMILLIAN BILHARZ." *The Journal of urology* **179**(4): 310.

Rey, L. (2001). *Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África*, Editora Guanabara Koogan.

Roberts, A. B. and Sporn, M. B. (1993). "Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta)." *Growth Factors* **8**(1): 1-9.

Robinson, P. N., Wollstein, A., Bohme, U. and Beattie, B. (2004). "Ontologizing gene-expression microarray data: characterizing clusters with Gene Ontology." *Bioinformatics* **20**(6): 979-981.

Ross, A. G., Bartley, P. B., Sleigh, A. C., Olds, G. R., Li, Y., Williams, G. M. and McManus, D. P. (2002). "Schistosomiasis." *N Engl J Med* **346**(16): 1212-1220.

Salzet, M., Capron, A. and Stefano, G. B. (2000). "Molecular crosstalk in host-parasite relationships: schistosome- and leech-host interactions." *Parasitol Today* **16**(12): 536-540.

Santos, T. M., Johnston, D. A., Azevedo, V., Ridgers, I. L., Martinez, M. F., Marotta, G. B., Santos, R. L., Fonseca, S. J., Ortega, J. M., Rabelo, E. M., et al. (1999). "Analysis of the gene expression profile of Schistosoma mansoni cercáriae using the expressed sequence tag approach." *Mol Biochem Parasitol* **103**(1): 79-97.

Simon, B., Rachel, S. C., Peter, D. A., Sergio, V.-A. and Alan, W. (2006). "The tegument surface membranes of the human blood parasite <B><I>Schistosoma mansoni</I></B>: A proteomic analysis after differential extraction." *PROTEOMICS* **6**(5): 1471-1482.

Simpson, A. J., Sher, A. and McCutchan, T. F. (1982). "The genome of Schistosoma mansoni: isolation of DNA, its size, bases and repetitive sequences." *Mol Biochem Parasitol* **6**(2): 125-137.

Souza, P. R. E. d., Valadão, A. F., Calzavara-Silva, C. E., Franco, G. R., Morais Júnior, M. A. d. and Abath, F. G. C. (2001). "Cloning and characterization of SmZF1, a gene encoding a Schistosoma mansoni zinc finger protein." *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **96**: 123-130.

Steinmann, P., Keiser, J., Bos, R., Tanner, M. and Utzinger, J. (2006). "Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk." *Lancet Infect Dis* **6**(7): 411-425.

Sune, C., Hayashi, T., Liu, Y., Lane, W. S., Young, R. A. and Garcia-Blanco, M. A. (1997). "CA150, a nuclear protein associated with the RNA polymerase II holoenzyme, is involved in Tat-activated human immunodeficiency virus type 1 transcription." *Mol Cell Biol* **17**(10): 6029-6039.

Tan, S., Johnston, D. A. and Roberts, R. G. (2007). "Schistosome dystrophin and dystrobrevin proteins contain large insertions." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **362**(3): 700-706.

ten Hove, R. J., Verweij, J. J., Vereecken, K., Polman, K., Dieye, L. and van Lieshout, L. (2008). "Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of Schistosoma mansoni and S. haematobium infection in stool samples collected in northern Senegal." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **102**(2): 179-185.

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. and Loukas, A. (2006). "Tetraspanins on the surface of Schistosoma mansoni are protective antigens against schistosomiasis." *Nat Med* **12**(7): 835-840.

Tusher, V. G., Tibshirani, R. and Chu, G. (2001). "Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(9): 5116-5121.

Utzinger, J., Xiao, S., N'Goran, E. K., Bergquist, R. and Tanner, M. (2001). "The potential of artemether for the control of schistosomiasis." *Int J Parasitol* **31**(14): 1549-1562.

van Balkom, B. W. M., van Gestel, R. A., Brouwers, J. F. H. M., Krijgsveld, J., Tielens, A. G. M., Heck, A. J. R. and van Hellemond, J. J. (2005). "Mass Spectrometric Analysis of the Schistosoma mansoni Tegumental Sub-proteome." *Journal of Proteome Research* **4**(3): 958-966.

van der Werf, M. J., de Vlas, S. J., Brooker, S., Looman, C. W., Nagelkerke, N. J., Habbema, J. D. and Engels, D. (2003). "Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa." *Acta Trop* **86**(2-3): 125-139.

Van Gool, T., Vetter, H., Vervoort, T., Doenhoff, M. J., Wetsteyn, J. and Overbosch, D. (2002). "Serodiagnosis of imported schistosomiasis by a combination of a commercial indirect hemagglutination test with Schistosoma mansoni adult worm antigens and an enzyme-linked immunosorbent assay with S. mansoni egg antigens." *J Clin Microbiol* **40**(9): 3432-3437.

van Keulen, H., Loverde, P. T., Bobek, L. A. and Rekosh, D. M. (1985). "Organization of the ribosomal RNA genes in Schistosoma mansoni." *Mol Biochem Parasitol* **15**(2): 215-230.

Vanchinathan, P., Brewer, J. L., Harb, O. S., Boothroyd, J. C. and Singh, U. (2005). "Disruption of a locus encoding a nucleolar zinc finger protein decreases tachyzoite-to-bradyzoite differentiation in Toxoplasma gondii." *Infect Immun* **73**(10): 6680-6688.

Verjovski-Almeida, S., DeMarco, R., Martins, E. A., Guimaraes, P. E., Ojopi, E. P., Paquola, A. C., Piazza, J. P., Nishiyama, M. Y., Jr., Kitajima, J. P., Adamson, R. E., et al. (2003). "Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite Schistosoma mansoni." *Nat Genet* **35**(2): 148-157.

Verjovski-Almeida, S., Venancio, T. M., Oliveira, K. C., Almeida, G. T. and DeMarco, R. (2007). "Use of a 44k oligoarray to explore the transcriptome of Schistosoma mansoni adult worms." *Exp Parasitol* **117**(3): 236-245.

Vlahopoulos, S. and Zoumpourlis, V. C. (2004). "JNK: A Key Modulator of Intracellular Signaling." *Biochemistry (Moscow)* **69**(8): 844-854.

Wang, H.-W., Muguira, M., Liu, W.-D., Zhang, T., Chen, C., Aucoin, R., Breslin, M. B. and Lan, M. S. (2008). "Identification of an INSM1-binding site in the insulin promoter: negative regulation of the insulin gene transcription." *J Endocrinol* **198**(1): 29-39.

WHO (2002). "Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis:Report of a WHO Expert Committee." *World Health Organ Tech Rep Ser* **912**: i-vi, 1-57, back cover.

Xu, C. B., Verwaerde, C., Gras-Masse, H., Fontaine, J., Bossus, M., Trottein, F., Wolowczuk, I., Tartar, A. and Capron, A. (1993). "Schistosoma mansoni 28-kDa glutathione S-transferase and immunity against parasite fecundity and egg viability. Role of the amino- and carboxyl-terminal domains." *J Immunol* **150**(3): 940-949.

Yang, Y. H. and Speed, T. (2002a). "Design issues for cDNA microarray experiments." *Nat Rev Genet* **3**(8): 579-588.

Yang, Y. H. and Speed, T. (2002b). "Design issues for cDNA microarray experiments." *Nat Rev Genet* **3**(8): 579-588.

Zhou Y, Z. H., Chen Y, Zhang L, Wang K, Guo J, Huang Z, Zhang B, Huang W, Jin K, Dou T, Hasegawa M, Wang L, Zhang Y, Zhou J, Tao L, Cao Z, Li Y, Vinar T, Brejova B, Brown D, Li M, Miller DJ, Blair D, Zhong Y, Chen Z, Liu F, Hu W, Wang ZQ, Zhang QH, Song HD, Chen S, Xu X, Xu B, Ju C, Huang Y, Brindley PJ, McManus DP, Feng Z, Han ZG, Lu G, Ren S, Wang Y, Gu W, Kang H, Chen J, Chen X, Chen S, Wang L, Yan J, Wang B, Lv X, Jin L, Wang B, Pu S,

Zhang X, Zhang W, Hu Q, Zhu G, Wang J, Yu J, Wang J, Yang H, Ning Z, Beriman M, Wei CL, Ruan Y, Zhao G, Wang S, Liu F, Zhou Y, Wang ZQ, Lu G, Zheng H, Brindley PJ, McManus DP, Blair D, Zhang QH, Zhong Y, Wang S, Han ZG, Chen Z, Wang S, Han ZG, Chen Z. (2009). "The Schistosoma japonicum genome reveals features of host-parasite interplay." *Nature* **460**(7253): 345-351.

8. Súmula Curricular

Dados Pessoais

Nome: Giulliana Tessarin e Almeida

Nascimento: 24 de novembro de 1980;

Naturalidade: São Paulo; Nacionalidade: Brasileira;

Endereço: Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo,

Av. Prof. Lineu Prestes 748 sala 1200, 05508-000 São Paulo, SP.

E-mail: giuliana@iq.usp.br

Formação:

Graduação:

Bacharel em Fármacêutica e Bioquímica
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo –
Período 1999-2004.

Pós Graduação:

Doutorado em Ciências Biológicas (Bioquímica)
Instituto de Química - Universidade de São Paulo, USP

Titulo da Tese: Efeitos do pareamento no perfil de expressão gênica do parasita *Schistosoma mansoni.*

Orientador: Prof. Dr. Sergio Verjovski Almeida
Período 2005-2010

Formação Complementar

- *New Aprroaches in drug design*
  Universidade de São Paulo, Instituto de Química, São Paulo – SP
  Carga Horária: 20h
  Período: Agosto/2004

- Curso de Proteção Radiológica com ênfase no uso, preparo e manuseio de fontes radioativas não seladas
  Universidade de São Paulo, Instituto de Química, São Paulo – SP
  Carga Horária: 45h
  Período: Março/2005

- Biomarcadores de Processos Oxidativos
  SBBQ, Salvador - Bahia
  Carga Horária: 6h
  Período: Maio/2007

- *The Highly-Prevalent Neglected Tropical Diseases: Update on Clinical Aspects and Novel Approaches to Control*
  ASTMH, Washington D.C., Estados Unidos
  Carga Horária: 12h
  Período Novembro/2009

- Explorando o genoma, o transcriptoma e o proteoma do Schistosoma mansoni;
  Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan, São Paulo – SP
  Carga Horária: 20h
  Período Fevereiro/2010

Histórico Profissional

08/2001-06/2004 Aluna de Iniciação Cientifica, Intituto de Quimíca – USP

Projeto: Otimização da Tecnica de Microarrays de DNA Visando sua Aplicação no Estudo da Expressão Gênica em Tumores de Prostata Humanos

Orientador: Prof. Sergio Verjovski-Almeida

Bolsista FAPESP: Vigência da Bolsa: 01/02/02 a 30/06/04

02/2005-08/2010 Aluna de Doutorado Direto, Intituto de Quimíca – USP

Projeto: Análise do Perfil de Expressão Genica de Esquistossômulos de *Schistosoma masoni* utilizando Microarrays de cDNA

Orientador: Prof. Sergio Verjovski-Almeida

Bolsista FAPESP: Vigência da Bolsa: 01/03/05 a 28/02/10

Publicações

Artigos completos publicados em periódicos

CORRÊA SOARES JB, MENEZES D, VANNIER-SANTOS MA, FERREIRA-PEREIRA A, **ALMEIDA GT**, VENANCIO TM, VERJOVSKI-ALMEIDA S, ZISHIRI VK, KUTER D, HUNTER R, EGAN TJ, OLIVEIRA MF. Interference with hemozoin formation represents an important mechanism of schistosomicidal action of antimalarial quinoline methanols. PLoS Negl Trop Dis. 2009 Jul 14;3(7):e477.

CARDOSO FC, MACEDO GC, GAVA E, KITTEN GT, MATI VL, DE MELO AL, CALIARI MV, **ALMEIDA GT**, VENANCIO TM, VERJOVSKI-ALMEIDA S, OLIVEIRA SC. *Schistosoma mansoni* tegument protein Sm29 is able to induce a Th1-type of immune response and protection against parasite infection. PLoS Negl Trop Dis. 2008 Oct 1;2(10):e308.

VENANCIO TM, DEMARCO R, **ALMEIDA GT**, OLIVEIRA KC, SETUBAL JC, VERJOVSKI-ALMEIDA S. Analysis of *Schistosoma mansoni* genes shared with Deuterostomia and with possible roles in host interactions. BMC Genomics. 2007 Nov 8;8:407.

VERJOVSKI-ALMEIDA S, VENANCIO TM, OLIVEIRA KC, **ALMEIDA GT**, DEMARCO R. Use of a 44k oligoarray to explore the transcriptome of Schistosoma mansoni adult worms. Exp Parasitol. 2007 Nov;117(3):236-45

REIS EM, NAKAYA HI, LOURO R, CANAVEZ FC, FLATSCHART AV, **ALMEIDA GT**, EGIDIO CM, PAQUOLA AC, MACHADO AA, FESTA F, YAMAMOTO D, ALVARENGA R, DA SILVA CC, BRITO GC, SIMON SD, MOREIRA-FILHO CA, LEITE KR, CAMARA-LOPES LH, CAMPOS FS, GIMBA E, VIGNAL GM, EL-DORRY H, SOGAYAR MC, BARCINSKI MA, DA SILVA AM, VERJOVSKI-ALMEIDA S. Antisense intronic non-coding RNA levels correlate to the degree of tumor differentiation in prostate cancer. Oncogene. 2004 Aug 26;23(39):6684-92.

Trabalhos apresentados na forma oral em congressos nacionais e internacionais

ALMEIDA, G. T.; VENANCIO, T.; DEMARCO, R.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. The Influence of pairing on gene expression of *Schistosoma mansoni* adult females American Society of Tropical Medicine and Hygiene - 58th Annual Meeting, 2009, Washington D.C., Estados Unidos. American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 2009

Resumos publicados em anais de congressos

LAGE, R C G.; PEREIRA, R. A. S.; **ALMEIDA, G. T.**. ; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; OLIVEIRA, G. Identification of genes and proteins differentially expressed in *Schistosoma mansoni* adult worms treated with praziquantel. American Society of Tropical Medicine and Hygiene - 58th Annual Meeting, 2009, Washington D.C. Estados Unidos. American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 2009

ALMEIDA, G.T ; VENANCIO, T.M.; CARDOSO, F. C.; OLIVEIRA, S. C.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. Differential gene expression in *S. mansoni* adult worms recovered from control mice or from mice immunized with Sm29 tegument protein as a possible vaccine candidate. Genomic Perspectives to Host Pathogen Interactions, 2008, Hinxton, Reino Unido. Join Cold Sprin Harbor Laboratory/ Wellcome Trust Conference, 2008.

LAGE, R C G ; PEREIRA, R.A.S. ; ANDRADE, H M ; **ALMEIDA, G.T**. ; VENANCIO, T. ; NAKAYA, H. ; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. ; OLIVEIRA, G. C. . Identification of genes and proteins differentially expressed in Schistosoma mansoni adult worms treated with praziquantel.: X-Meeting. Third International Conference of the Brazilian Association for Bioinformatics and Computational Biology, 2007, São Paulo.

ALMEIDA, G.T ; DEMARCO, R.; VENANCIO, T.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. The Influence of Pairing in Adult Females of *Schistosoma Mansoni.* XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBQ e 10th IUBMB Conference: “Infectious diseases: Biochemistry of parasites, vectors and hosts” Salvador - BH, Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2007

ALMEIDA, G.T ; DEMARCO, R.; VENANCIO, T.;LEVANO-GARCIA, J.C.; FARIAS, L.P.; LEITE, L.C.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. Differential gene expression in *Schistosoma mansoni* adult worms recovered from control mice or mice immunized with apyrase as an antigen to induce host protection. XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBQ. Águas de Lindóia, Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2006.

OLIVEIRA, K. C.; DEMARCO, R.; VENANCIO, T. M.; **ALMEIDA, G. T.** ; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. otimização de amplificação de RNA de *Schistosoma mansoni* para estudo em larga escala do trasncriptoma de diferentes fases de desenvolvimento através de microarrays de cDNA. XiX Congresso Brasileiro de Parasitologia, 2005, Proto Alegre – RS. Sociedade Brasileira de Parasitologia, 2005