



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Mapeamento Físico dos Retrotransposons Boudicca e  
Perere no Genoma do *Schistosoma mansoni***

**AUTOR: CLÁUDIA LAIGNIER LAGE VALENTIM**

**ORIENTADOR: PROF. DR ELIO HIDEO BABÁ**

**CO-ORIENTADOR: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup> RENATA GUERRA DE SÁ**

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Biologia Molecular.

**Ouro Preto, julho de 2006**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.



Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular - ICEB/NUPEB/UFOP, com suporte das seguintes instituições:

**OMS -Organização Mundial de Saúde**

**Centro de Pesquisas Renné Rachou FIOCRUZ-MG CPqRR/FIOCRUZ-MG**

**UFOP -Universidade Federal de Ouro Preto**

## **Dedicatória**

## **Agradecimentos**

---

**Sumário**

<b>1) INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1) ASPECTOS GERAIS.....	2
1.2) O PARASITO.....	3
1.3) O GENOMA DO <i>S. MANSONI</i> .....	5
1.4) PROJETO GENOMA DO <i>S. MANSONI</i> .....	5
1.5) TRANSCRIPTOMA .....	7
1.6) TRANSPOSONS .....	9
1.6.1) Retrotransposons LTR .....	10
1.6.2) Retrotransposons não-LTR.....	12
<b>2) OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
2.1) OBJETIVO GERAL.....	15
2.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
<b>3) MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
3.1) SELEÇÃO DOS BAC CLONES .....	17
3.1.1) Análise de Bioinformática.....	17
3.1.2) Critérios de seleção .....	17
3.2) PREPARAÇÃO DOS BAC CLONES PARA A TÉCNICA DE FISH.....	18
3.2.1) Maxi-Preparação dos BAC clones 1A e 11A.....	18
3.2.2) Obtenção de sondas biotinizadas .....	19
3.3) PREPARAÇÃO DE DNA GENÔMICO.....	20
3.3.1) Extração do DNA genômico .....	20
3.3.2) Digestão do DNA genômico com a enzima de restrição <i>Sau3A</i> .....	21
3.4) PRIMERS DE RETROTRANSPOSONS.....	22
3.4.1) Síntese dos <i>primers</i> de retrotransposons.....	22
3.4.2) Reação de PCR .....	22
3.4.3) Eletroforese em gel de PAGE .....	23
3.4.4) Preparação do gel de PAGE .....	23
3.4.5) Coloração do gel de PAGE com Nitrato de Prata.....	23
3.5) ETAPAS UTILIZADAS PARA AS REAÇÕES DE FISH .....	24
3.5.1) FISH .....	24

---

3.5.2)	Obtenção de cromossomos metafásicos.....	24
3.6)	BANDEAMENTO C PARA CARIOTIPAGEM.....	27
3.7)	PREPARO PARA HIBRIDIZAÇÃO PELA TÉCNICA DE FISH.....	27
3.7.1)	Desnaturação da sonda marcada com biotina .....	27
3.7.2)	Desnaturação dos cromossomos metafásicos da lâmina.....	28
3.7.3)	Hibridização .....	28
3.7.4)	Detecção do Sinal após hibridização .....	28
3.8)	PRINS (PRIMED <i>IN SITU</i> LABELING) .....	30
3.8.1)	Desnaturação das lâminas.....	30
3.8.2)	Reação de PCR <i>in situ</i> .....	30
3.8.3)	Observação ao microscópio confocal e captura de imagens.....	31
<b>4)</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>32</b>
4.1)	ANÁLISE E SELEÇÃO DOS BAC CLONES .....	33
4.2)	BANDEAMENTO C PARA CARIOTIPAGEM.....	38
4.3)	PREPARAÇÃO DOS BAC CLONES PARA A TÉCNICA DE FISH.....	40
4.3.1)	Extração e purificação dos BAC clones.....	40
4.4)	PREPARAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE <i>S.MANSONI</i> .....	41
4.4.1)	Extração e purificação do DNA genômico .....	41
4.5)	ELETROFORESE PAGE.....	41
4.6)	REAÇÕES DE FISH E PRINS .....	43
4.6.1)	FISH (Fluorescence in situ hybridization) .....	43
4.7)	PRINS (PRIMED <i>IN SITU</i> LABELING) .....	51
<b>5)</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>6)</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>66</b>
<b>7)</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>68</b>
<b>8)</b>	<b>ENDEREÇOS ELETRÔNICOS .....</b>	<b>70</b>
<b>9)</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>72</b>

**Resumo**

O *Schistosoma mansoni* é o agente etiológico da esquistossomose, uma doença endêmica em vários países. O estudo do seu genoma, estimado em 270Mb é de grande importância para se entender a sua biologia, os mecanismos de resistência a drogas e sua variação antigênica. O mapeamento físico do genoma do *S.mansoni* está sendo construído e a localização de fragmentos de DNA pelas técnicas de FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) e PRINS (Primed *in situ* labeling) são estratégias utilizadas neste estudo. Entretanto, há pouca informação disponível sobre este mapeamento e visando contribuir com esta iniciativa, o retrotransposon Perere, com grande nível de expressão gênica e o Boudicca, que está presente em grande número de cópias, e que representam as famílias de retrotransposon não-LTR e LTR respectivamente, foram selecionados para o mapeamento. Os BAC clones 1A e 11A que apresentaram similaridade para os retrotransposons Perere e Boudicca respectivamente, através de estudos de bioinformática foram selecionados e localizados no genoma do parasito pela técnica de FISH e *primers* fluorescentes para os retrotransposons foram utilizados na técnica de PRINS. A técnica de FISH consiste em marcar com biotina os BAC clones em uma reação de amplificação com *primers* aleatórios usando a enzima Klenow polimerase em uma lâmina contendo os cromossomos metafásicos. A técnica de PRINS envolve o anelamento de *primers* específicos de retrotransposons, seguidos de um alongamento *in situ* com a Taq DNA polimerase nas lâminas contendo os cromossomos metafásicos. Após a contra-coloração das lâminas de FISH e PRINS com Iodeto de Propídeo, estas foram observadas no microscópio confocal.

Observou-se um sinal de hibridização do retrotransposon Perere na região de heterocromatina do par de cromossomos 2 e para o retrotransposon Boudicca, foram observados sinais de hibridização nos cromossomos 2 e Z pela técnica de FISH e posteriormente confirmada pela técnica de PRINS.

**Abstract**

*Schistosoma mansoni* is the main causative agent of schistosomiasis, an endemic disease in many countries, being on the second rank behind malaria in terms of socio-economic and public health importance. The study of its genome, expected in 270Mb is very important to understand its biology, the mechanisms of drug resistance and their antigenic variation. The *S. mansoni* genome physical map is under construction and DNA fragments localization by FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) and PRINS (Primed *in situ* labeling) are strategies used for this study. Therefore, little information about this is actually available. In order to contribute with this initiative, the retrotransposon Perere, presenting high transcriptional activity and Boudicca, present in high copy number and representing the families of retrotransposon non-LTR and LTR respectively, were selected for the mapping. The BAC clones 1A and 11A showing similarities to the retrotransposons Perere and Boudicca respectively, were selected through bioinformatic analysis and mapped in the parasite's genome by FISH technique and fluorescent *primers* for the retrotransposons were used in the PRINS technique. The FISH technique consists of biotinylating BAC clones in a randomly primers amplification labeling system, using Klenow polymerase in slides containing metaphase cells spreads. The PRINS technique involves annealing of specific oligonucleotides primers of retrotransposons, followed by *in situ* elongation using Taq DNA polymerase in slides containing metaphase chromosomes. After counter-staining the slides with Propidium Iodide, they were observed in a confocal microscopy.

A signal of hybridization for the retrotransposon Perere was observed in the heterochromatin region of the pair of chromosomes 2 and for the retrotransposon Boudicca was observed on chromosomes 2 and Z using the technique of FISH and was then confirmed by the PRINS technique.

**Lista de abreviaturas**

EST	Expressed Sequence Tag
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
FISH	Fluorescence <i>in situ</i> Hybridization
FITC	Fluorescein Iso thio cyanate
Kb	Kilobases – $10^3$ pares de bases
LINE	Long Interspersed Sequences
LTR	Long terminal repeat
MB	Megabases – $10^6$ pares de bases
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ORF	Open Reading Frame
ORESTES	Open Reading Frame ESTs
PI	Propidium Iodide
pb	Pares de Bases
PRINS	Primed <i>in situ</i> labeling
SDS	Duodecil Sulfato de Sódio
SINE	Short Interspersed Sequences
SGN	Schistosoma Genome Network
Spread	Conjunto de cromossomos metafásicos bem espalhados.
TE	Tampão Tris-EDTA
TIGR	The Institute of Genome Research
Tris	Tri-hidroximetil amino metano
WHO	World Health Organization
14-dCTP-biotina	Desoxicitosina tri-fosfato 14 Biotina

## 1) INTRODUÇÃO

## 1.1) Aspectos gerais

A esquistossomose, popularmente conhecida como barriga d'água ou bilharziose é uma doença crônico-debilitante que afeta em torno de 250 milhões de pessoas e está presente em aproximadamente 76 países principalmente os de clima tropical e subtropical e estima-se que ocorra entre 250 a 500 mil mortes por ano (Hu e cols., 2004). Estima-se que 200 milhões de pessoas estejam infectadas e destas, cerca de 120 milhões são sintomáticas e 20 milhões apresentam a forma severa da doença. Cerca de 600 milhões de pessoas estão sob risco de infecção (Chitsulo e cols., 2000).

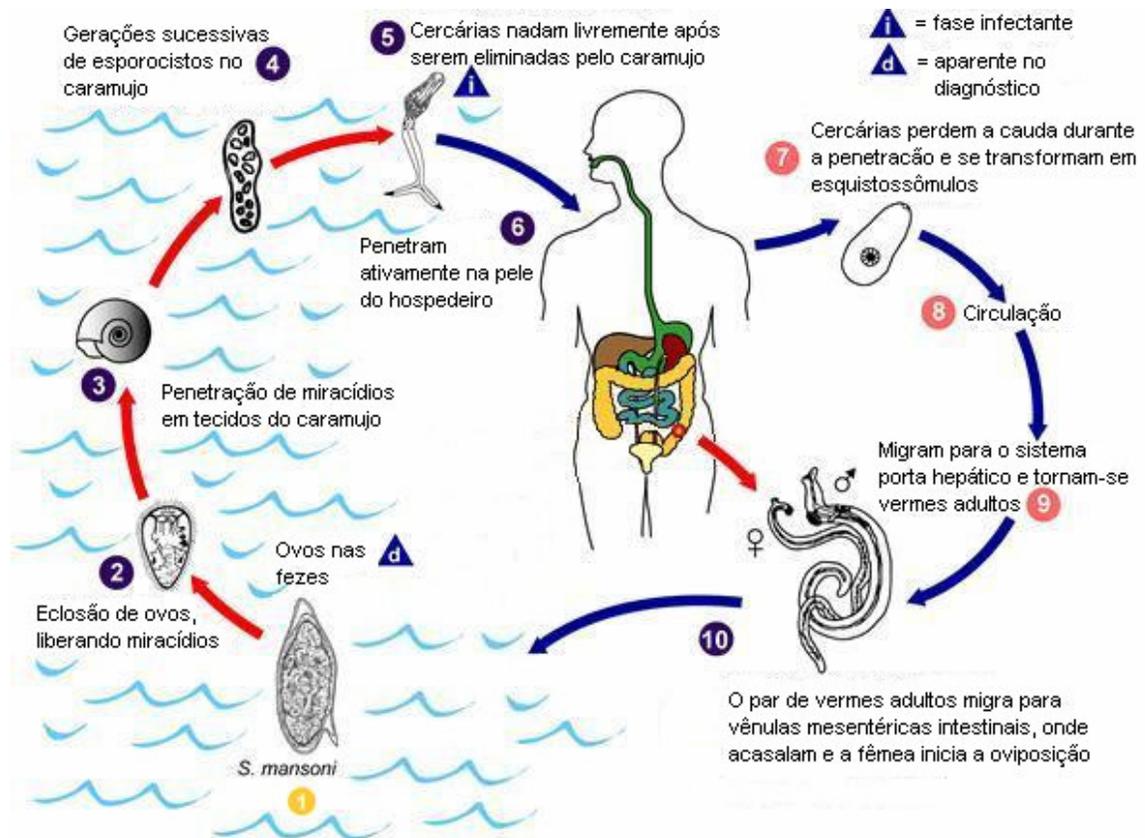
As formas da esquistossomose humana são causadas principalmente por cinco espécies do gênero *Schistosoma*: *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. intercalatum*, *S. japonicum* e *S. mekongi*. A esquistossomose intestinal, causada pelo *S. mansoni* é a que apresenta prevalência no Brasil e estima-se que 12 milhões de pessoas estejam infectadas e destas, de 500.000 a 1.000.000 sofram com a forma severa da doença (Kloetzel, 1989).

Assim, devido a grande importância sócio-econômica desta doença, torna-se necessário adotar programas para o controle da mesma, como melhorias nas condições de vida da população, busca de novos agentes terapêuticos, pesquisa de possíveis candidatos de fármacos e vacinas eficazes. O tratamento da doença é realizado com o fármaco praziquantel, que apesar de seguro e efetivo, não oferece proteção contra reinfeções em áreas consideradas endêmicas e muitas cepas já apresentaram resistência ao tratamento com este medicamento (Ismail e cols., 1999).

## 1.2) O parasito

O parasito *S.mansoni* pertence ao filo platelminto e a classe dos trematodos. É um verme digenético, apresentando claro dimorfismo sexual entre os seus vermes na fase adulta. O seu ciclo de vida é complexo e compreende duas fases distintas: fase sexuada que ocorre no hospedeiro definitivo, o homem e uma fase assexuada, que ocorre no hospedeiro intermediário que compreendem os caramujos do gênero *Biomphalaria* incluindo as espécies *B. glabrata*, *B. straminae* e *B. tenagophila*.

A infecção ocorre quando o homem entra em contato com água fresca que contenha a forma larvária de cercária. As cercárias nadam ativamente e ao penetrarem na pele do homem, perdem as caudas e se transformam em esquistossômulos. Estes migram através do sistema sanguíneo e atingem o coração, pulmão e, em seguida, o fígado. Os parasitos permanecem no sistema porta intra-hepático até a maturação sexual. Uma vez transformados em vermes adultos, eles acasalam e migram para as vênulas da parede intestinal onde a fêmea inicia a oviposição. Após algumas semanas estes ovos podem migrar para o intestino e ser eliminados nas fezes ou ficar retidos nos capilares do sistema porta e na mucosa intestinal, ocasionando lesões conhecidas como granulomas que, em longo prazo, representam a causa primária de morbidade da doença (Stadecker, 1992). Os ovos são eliminados junto com as fezes e ao entrar em contato com a água, estimulados pela temperatura, luz e oxigenação, liberam a larva miracídio que nada ativamente à procura do caramujo do gênero *Biomphalaria*. Após a penetração nas partes moles do caramujo, eles se transformam em esporocistos de primeiro estágio que por poliembrionia se transformam em esporocistos de segundo estágio. Estes, por expansão clonal nas glândulas digestivas e ovotestes, se transformam na forma infectante que é a cercária completando-se o ciclo como esquematizado na Figura 1.



**Figura 1 - Ciclo de vida do *S. mansoni*** : Ovos eliminados nas fezes 1; Forma larvária miracídio após eclosão dos ovos 2; Penetração do miracídio nas partes moles do molusco, hospedeiro intermediário *B. glabrata* 3; Formas larvárias intramolusco: esporocisto mãe, primário e secundário após gerações sucessivas 4; Liberação da forma larvária cercária na água 5; Penetração ativa de cercária na pele do hospedeiro definitivo, o homem 6; Perda da cauda pela cercária, que se transforma em esquistossômulo 7; esquistossômulo atinge a corrente sanguínea 8; Migração até o sistema porta hepático e maturação até a fase de vermes adultos 9; Pareamento e acasalamento dos vermes adultos nas veias e capilares do plexo mesentérico e oviposição com depósito de ovos no fígado, além de retenção destes na mucosa intestinal 10; Letra d indica a fase do parasito vista no diagnóstico. Letra i indica a fase em que o parasito apresenta-se na forma infectante para o homem.

### 1.3) O genoma do *S. mansoni*

O parasito *S. mansoni* apresenta genoma diplóide ( $2n=16$ ), estimado em  $2 \times 10^8$  pares de bases organizados em oito pares de cromossomos, sendo 7 pares autossômicos e um par de cromossomos sexuais. Os machos são homogaméticos (ZZ) e as fêmeas heterogaméticas (ZW) (Short & MENZEL, 1960; Short e cols., 1979). Estima-se que de 4-8% do genoma seja constituído de seqüências de DNA altamente repetitivo, 35-40% de seqüências de DNA com repetitividade média e o restante das seqüências de DNA, de cópia única. O genoma é composto por 65% de seqüência ricas em AT e 35% de seqüências ricas em GC (Simpson e cols., 1982).

### 1.4) Projeto genoma do *S. mansoni*

O Schistosoma Genome Network foi criado no ano de 1992 e contou com o apoio do The Institute for Genomic Research (TIGR) e foi inicialmente financiada pela FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais), Fundação Oswaldo Cruz e TIGR. Desde 1994, o projeto genoma conta com o apoio internacional da Organização Mundial da Saúde (WHO/UNDP/World Bank Special Program for Research), do Centro de Treinamento em Doenças Tropicais (Training in Tropical Diseases – TDR) e laboratórios de pesquisas de diversos países e, desde então, vem estudando o genoma deste parasito (Foster & Johnston, 2002; Franco e cols., 2000). O *S. mansoni* e o *S. japonicum* foram as duas espécies escolhidas para serem estudadas no Projeto Genoma uma vez que há conservação de alguns genes entre estas espécies e assim, a informação obtida em um organismo pode ser de relevância para o outro (Franco e cols., 2000).

Os objetivos iniciais do projeto eram o desenvolvimento de ferramentas de bioinformática como a construção de bancos de dados com seqüências de DNA e proteínas, descoberta de novos genes utilizando-se bibliotecas de cDNA de vários estágios de desenvolvimento de *S. mansoni* e *S. japonicum* já

existentes e o mapeamento físico destes genes com a construção de bibliotecas de grandes fragmentos de DNA de *S. mansoni*.

A estratégia utilizada para descoberta de novos genes começou com a iniciativa brasileira, pelo emprego de uma abordagem baseada na geração de Etiquetas de Seqüências Transcritas (“ESTs”) que são pequenas seqüências de aproximadamente 300 nucleotídeos geradas das extremidades dos cDNA selecionados ao acaso de um biblioteca (Franco e cols., 2000). Esta estratégia também foi utilizada para realizar o sequenciamento do genoma do parasita uma vez que este é muito grande. A análise dos transcritos identificados em *S.mansoni* torna possível inferir sobre o papel dos mesmos como nas interações parasito-hospedeiro, evolução do parasito, dependência das fêmeas em relação aos machos para se obter a maturação sexual, evasão do parasito do sistema imune e com isso, propor estratégias para o controle da doença (Hoffmann & Dunne, 2003).

Para realizar o mapeamento físico do parasito, foi construída inicialmente uma Biblioteca Artificial de Levedura (YAC) com DNA genômico de cercária resultando em 2,283 clones apresentando insertos com tamanho médio de 358 Kpb e uma cobertura de 2,6 vezes o genoma. Mas, apesar de muitos representantes, apresentou muitos clones quiméricos devido provavelmente à instabilidade do DNA inserido e à dificuldade de se ter uma preparação pura de YAC contendo o DNA (Tanaka e cols., 1995). Para complementar esta biblioteca de YAC e obter mais informações do genoma foi construído uma nova biblioteca de BAC (Cromossomo Artificial de Bactéria) pelo grupo de Le Paslier do Instituto Pasteur da França (Le Paslier e cols., 2000). O sistema de clonagem BAC permite que DNA complexos sejam propagados de forma muito mais estável em bactérias *E. coli* (Shizuya e cols., 1992). Uma outra vantagem está relacionada com a possibilidade de se inserir fragmentos de 100-150 kb, o que permite uma análise bem detalhada de clones específicos. A biblioteca de BAC gerou aproximadamente 21.000 clones em vetor pBeloBAC11 e apresenta uma cobertura de aproximadamente 8 vezes o genoma. Assim, o mapeamento dos genes presentes nestes vetores

pode ser realizado utilizando as técnicas de hibridização *in situ*, FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) e de PRINS (Primed *in situ* labeling).

Com a aquisição de conhecimento sobre o genoma do *S. mansoni*, espera-se encontrar genes candidatos que satisfaçam os requisitos para a produção de vacinas eficazes e de baixo custo bem como favorecer o desenvolvimento de técnicas simples de diagnóstico e de medicamentos de baixo custo que sejam efetivos em esquemas de tratamento ou mesmo que auxiliem na tarefa de suplantar o desafio da resistência aos medicamentos já existentes.

### 1.5) Transcriptoma

O ciclo de vida do parasito *S.mansoni* é bem complexo sendo importante que ele coordene um conjunto de genes necessários para as adaptações entre os diferentes estágios evolutivos e os hospedeiros. Assim, torna-se importante identificar os genes responsáveis por tais alterações, bem como os mecanismos que regulam a sua expressão.

Em 2003, a primeira versão do transcriptoma do *S.mansoni* e do *S.japonicum* foram publicados. Para o *S.japonicum* foram obtidos 43.707 ESTs gerados de vermes adultos machos e fêmeas e de ovos, que foram agrupados em 13.131 clusters e apenas 20,6% apresentaram similaridades com genes conhecidos (Hu e cols., 2004).

Para o *S.mansoni* foram obtidos aproximadamente 163.000 ESTs, sendo 150.000 ESTs obtidas por mini-bibliotecas ORESTES e 11.000 por bibliotecas normalizadas de cDNA de vermes adultos.

Para a construção das mini-bibliotecas utilizou-se a técnica de ORESTES (Open Reading Frame ESTs) que consiste em uma etapa de transcrição reversa utilizando oligos degenerados seguido de uma PCR de baixa estringência (de Souza e cols., 2000). Para o projeto genoma do Schistosoma utilizou-se pequenas quantidade de mRNA (15-40ng) obtidos de

6 estágios do ciclo de vida do parasito (verme macho e fêmea, ovo, miracídeo, esporocistos, cercária e esquistossômulo pulmonar).

As seqüências obtidas pelo método ORESTES foram agrupadas em aproximadamente 31,000 contigs de *S. mansoni* denominadas SmAEs (*S.mansoni* assembly ESTs). Verjovski e cols sugerem que estas seqüências representam 92% da análise de cerca de 14.000 genes presentes no genoma do parasito, do qual aproximadamente 7,200 correspondem a genes expressos na fase adulta.

Com a análise do transcriptoma do parasito, observou-se a presença de genes específicos de metazoários envolvidos na transdução de sinal, interações célula-célula, processos de desenvolvimento e respostas a estímulos externos. Já nas seqüências conservadas de eucariotos, observou-se abundância dos genes relacionados ao metabolismo.

A descoberta da função de 28 genes sugerem que os mesmos estão envolvidos nos mecanismos de sobrevivência do parasito e podem ser candidatos a vacinas, uma vez que apresentam características importantes como ser expostos ou secretados na superfície, expressos em estágios intra-mamíferos. Os genes expressos nas diferentes fases de vida como, por exemplo, na transição de cercária para esquistossômulo e verme adulto também podem ser candidatos potenciais para vacinas. Observou-se também a presença de oito transcritos que codificam proteínas da família de transportadores ABC que apresentam resistência a multidrogas (MDR) que estão envolvidas na detoxificação e transporte de metabólitos e sua análise poderia ser aplicada para o desenvolvimento de novos fármacos assim como para se estudar o mecanismo de resistência a fármacos (Verjovski-Almeida e cols., 2003; Verjovski-Almeida e cols., 2004) .

## 1.6) Transposons

Os Transposons, também conhecidos como Elementos Genéticos Móveis ou Elementos Transponíveis (TE), são seqüências de DNA que apresentam a capacidade de migrar para diferentes sítios de um genoma através de um processo chamado transposição. Várias famílias de elementos transponíveis (TE) foram identificadas em praticamente todos os organismos, incluindo bactérias, plantas, protozoários, fungos e animais e a proporção destes TEs presentes nos genomas pode ser significativa como na *Drosophila melanogaster* em que está presente em 15% (Adams e cols., 2000) e 40% no *Homo sapiens* (Lander e cols., 2001). De acordo com o seu mecanismo de transposição eles podem ser classificados em Classe I e Classe II.

Os elementos da Classe II são os Transposons que são inseridos no genoma por meio de um mecanismo de “corte e colagem” via um intermediário de DNA. Eles podem ser encontrados em bactérias onde são chamados de IS (seqüências de inserção), no genoma de vários metazoários incluindo insetos, vermes e humanos. Como a especificidade das seqüências de integração é limitada a um pequeno número de nucleotídeos, as inserções podem ocorrer em um grande número de sítios. Os transposons apresentam em sua estrutura uma única ORF (open reading frame) que codifica a enzima transposase como pode ser observado na Figura 2:



**Figura 2 - Representação esquemática de um Transposon:** O transposon apresenta uma única ORF que codifica a enzima transposase e é delimitado por regiões ITR (repetições terminais invertidas) e estas são flanqueadas por DR (repetições curtas diretas) no genoma alvo. (Kazazian, Jr., 2004)

Os transposons geralmente apresentam de 1,3 a 3,0 Kb e codificam a enzima transposase, responsável pela integração do transposon no genoma (Brindley e cols., 2003). Como exemplos de transposons podemos citar o elemento P (Bingham e cols., 1982) e mariner (Jacobson e cols., 1986) de

*Drosophila* e Tc1 de *C. elegans* (Emmons e cols., 1983; Jacobson e cols., 1986).

Os elementos de classe I compreendem os retrotransposons e os retrovírus que são elementos que transpõem por meio de um intermediário de RNA utilizando a enzima transcriptase reversa. Os retrotransposons podem ser classificados de acordo com a presença ou não de longas repetições terminais (LTRs).

### 1.6.1) Retrotransposons LTR

Os retrotransposons LTR geralmente apresentam um tamanho de 5 a 10Kb e duas ORFs flanqueadas por longas repetições terminais diretas (LTR) que possuem aproximadamente de 200 a 600pb. Alguns elementos como o gypsy de *D. melanogaster* e Osvaldo de *D.buzzatii* apresentam uma terceira ORF, *env*, que codifica o envelope protéico que é característico de retrovírus (Brindley e cols., 2003). A estrutura geral deste elemento é apresentada na Figura 3:



**Figura 3 - Representação esquemática de um retrotransposon LTR gypsy de *D.melanogaster*.** A primeira ORF é a *gag* como observado em azul. A segunda ORF apresentada em vermelho é a *pol* e em amarelo está representada a terceira ORF *env*. (Brindley e cols., 2003).

A ORF *gag* codifica uma proteína de ligação ao ácido nucléico que apresenta um motivo de cisteína/histidina característico (CX<sub>2</sub>CX<sub>4</sub>HX<sub>4</sub>C), um motivo de dedo de zinco ou zíper de leucina. Esta mesma ORF contendo o motivo cisteína/histidina também é encontrado nos retrovírus, e codifica as proteínas da estrutura do córion viral que empacotam o genoma de RNA viral. A segunda ORF codifica uma poliproteína chamada POL que apresenta domínios para protease aspártica, transcriptase reversa (RT), RNase H e integrase. Até o momento são conhecidas três famílias de retrotransposon

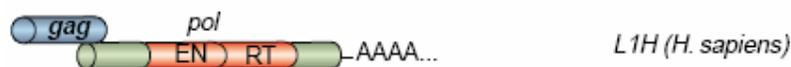
LTR: gypsy/Ty3, Copia/Ty1 e BEL/Pao-like. Uma característica marcante destas famílias é a variação da estrutura da *pol* entre eles.

Os retrotransposons LTR apresentam similaridades aos produtos dos genes *gag* e *pol* dos retrovírus. A terceira ORF, *env* codifica as proteínas do envelope protéico que está associado com o empacotamento do genoma de RNA e proteínas estruturais. Estas particularidades permitem a existência extracelular destes transposons além de conferir a habilidade de serem infecciosos e transmitidos horizontalmente.

O mecanismo de transposição é semelhante ao dos retrovírus. O DNA é transcrito em RNAm e este por ação da transcriptase reversa dá origem ao cDNA. A enzima RNaseH cliva o RNA do híbrido RNA-cDNA. A fita dupla de DNA formada é integrada no genoma hospedeiro por meio da ação da enzima integrase. A integrase compreende três domínios: domínio de ligação de dedo de zinco N-terminal, domínio catalítico central (DDE) e um domínio de ligação a DNA não específico C-terminal. A protease aspártica possui domínio com característica Asp Thr/ Ser Gly (DT/SG) sendo responsável por clivar os domínios enzimáticos da *pol* (Brindley e cols., 2003). Alguns retrotransposons LTR foram encontrados no genoma do *S.mansoni* como o Boudicca (Copeland e cols., 2003), Saci (DeMarco e cols., 2004), Fugitive (Laha e cols., 2004), Sinbad (Copeland e cols., 2005) e o Gulliver no *S.japonicum* (Laha e cols., 2001). Entretanto, a função destes retrotransposons ainda permanecem desconhecidas.

## 1.6.2) Retrotransposons não-LTR

Os retrotransposons não-LTR possuem aproximadamente de 4 a 6kb e geralmente apresentam uma ou duas ORFs como mostrado na Figura 4.



**Figura 4 - Representação esquemática de um retrotransposon não LTR do elemento L1H de *Homo sapiens*.** Em azul está a ORF gag, em vermelho a segunda ORF pol que é seguida de uma região rica em adenina (poliA). (Brindley e cols., 2003)

A primeira ORF codifica uma proteína GAG com função de ligação ao DNA e a segunda ORF uma poliproteína com atividade de transcriptase reversa e endonuclease, e em alguns elementos, está também presente a RNase H. Em todos os retrotransposons não-LTR descritos em parasitos observa-se a ausência da cauda poliA, sendo substituída por pequenas seqüências de repetição ou uma seqüência 3' terminal distinta (Brindley e cols., 2003). X e Y sugerem que os atributos para se classificar os retrotransposons como pertencentes a uma mesma família, ..... o que permitiu classificar os retrotransposons não-LTR em 11 grupos sendo o único domínio comum a todos os elementos desta classe o da transcriptase reversa.

O mecanismo de transposição destes elementos ocorre quando o produto da segunda ORF que possui atividade endonucleásica de reparoapurínica quebra o cromossomo hospedeiro promovendo o sítio de iniciação que é um grupo hidroxila 3' para começar a transcrição reversa do retrotransposon de DNA no genoma alvo (Luan e cols., 1993). A duplicação do sítio alvo serve como um *footprint* que nos fornece indícios do retrotransposon. A grande maioria das cópias de retrotransposons LTR são truncadas na região 5' como conseqüência da terminação prematura da transcrição reversa (Eickbush, 1992; Finnegan, 1997). Alguns retrotransposons não-LTR integram em sítios específicos no genoma como os elementos R1 e R2 de *D. melanogaster*.

LINES (Long Interspersed Elements) e SINES (Small Interspersed Elements) são elementos presentes na classe dos retrotransposons não-LTR. OS LINES estão presentes no genoma humano representado pela família LINE-1. Os SINES são pequenos, apresentando menos de 600pb e são considerados não autônomos uma vez que utilizam a maquinaria dos retrotransposons não-LTR para sua inserção (Luan e cols., 1993). Como exemplos podemos citar a família Alu presente em humanos (Batzer & Deininger, 2002) e a família Sma de *S.mansoni*, *S.japonicum* e *S.haematobium* (Laha e cols., 2000).

Como exemplos de retrotransposons não-LTR descritos de *S.mansoni* podemos citar: SR1 (Drew & Brindley, 1997), SR2 (Drew e cols., 1999), SR3 (Laha e cols., 2005), Perere (DeMarco e cols., 2004), e pido do *S.japonicum* (Laha e cols., 2002).

**2) OBJETIVOS**

## 2.1) Objetivo Geral

Mapear fisicamente os retrotransposons Boudicca e Perere utilizando as técnicas de FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) e PRINS (Primed *in situ* labeling).

## 2.2) Objetivos Específicos

- ✓ Selecionar BAC clones que apresentam similaridades para os retrotransposons Boudicca e Perere através da bioinformática;
- ✓ Preparar cromossomos metafásicos de *S.mansoni*;
- ✓ Localizar fisicamente os retrotransposons Boudicca e Perere no genoma do *S.mansoni* através da técnica de FISH.
- ✓ Confirmar a localização física dos retrotransposons Boudicca e Perere no genoma do *S.mansoni* através da técnica de PRINS modificada.

### **3) MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1) Seleção dos BAC clones**

No laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular existem 19 BAC clones que nos foram fornecidos por um grande projeto onde estão envolvidos pesquisadores da Fundação Oswaldo Cruz de Belo Horizonte, da Universidade de Kyoto (Japão), do Instituto Pasteur (França) e da Universidade do Estado de Nova York (Buffalo, USA). Este grupo detém uma biblioteca de BAC clones construída utilizando-se DNA isolado de cercária da cepa Porto Rico de *S. mansoni*, clonadas em vetor pBeloBAC11 com cerca de 21,000 clones correspondendo a cerca de 8X a cobertura do genoma do parasito (Le Paslier e cols., 2000). Esta biblioteca foi ordenada com o sequenciamento das extremidades pela técnica do Shotgun.

#### **3.1.1) Análise de Bioinformática**

As seqüências das extremidades 5` e 3` dos BAC clones foram utilizadas para análises em bancos de dados da FAPESP, NCBI, TIGR e SchistoDB por meio do alinhamento destas seqüências com as depositadas nos bancos de dados. A FAPESP, TIGR e SchistoDB fornecem informações sobre o genoma do *S.mansoni* e o NCBI de seqüências homólogas do próprio parasito bem como a de outros organismos. Assim, foram selecionados os BAC clones que apresentaram similaridades para seqüências de retrotransposons.

#### **3.1.2) Critérios de seleção**

Os BAC clones foram selecionados de acordo com os valores de e-value obtidos pelo BlastN e BlastX. O e-value informa a probabilidade de pareamento não específico da seqüência analisada (query) com a depositada no banco de dados. Para o BlastN, que fornece informações das seqüências homólogas de nucleotídeos, foram adotados valores menores que  $e^{-20}$  e para o BlastX, que traduz as seqüências obtidas homólogas e as pesquisa no banco de proteínas

sobre as possíveis funções das mesmas, foram adotados valores menores que  $e^{-5}$ .

### **3.2) Preparação dos BAC clones para a técnica de FISH**

#### **3.2.1) Maxi-Preparação dos BAC clones 1A e 11A**

O processo de extração e purificação dos BAC clones 1A e 11A foi realizado com o sistema QIAGEN tip100 (QIAGEN) que utiliza colunas de cromatografia de troca iônica, sendo as soluções preparadas de acordo com as recomendações do fabricante.

Inicialmente uma alíquota do estoque de BAC clones mantido a  $-70^{\circ}\text{C}$  foi plaqueada em meio LB ágar suplementado com  $12,5\ \mu\text{g/mL}$  de cloranfenicol e incubados durante a noite a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 16 horas. Em seguida, uma colônia foi transferida para 5 mL de meio LB suplementado com cloranfenicol ( $12,5\ \mu\text{g/mL}$ ) e incubadas no shaker a 185 rpm durante 8 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . A cultura foi expandida para 500 mL de meio LB suplementado com cloranfenicol ( $12,5\ \mu\text{g/mL}$ ) utilizando-se 2 mL do pré-inóculo sob agitação no shaker a 185 rpm durante 16-18 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . A cultura foi dividida em 2 tubos e centrifugada a  $3,320\text{g}$  durante 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  e o sobrenadante foi descartado. O precipitado de cada tubo foi ressuspensão em 10 mL de tampão P1 (Tris 50 mM; EDTA 10 mM; pH 8,0), adicionando-se 1 mg de RNaseA e a solução foi incubada em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. Após este tempo, adicionou-se 10 mL de tampão P2 (NaOH 200 mM e SDS 1%) a fim de promover a lise celular. Agitou-se 6 vezes por inversão e incubou-se à temperatura ambiente por exatamente 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 10 mL de tampão P3 contendo acetato de potássio 3M, pH 5,5, previamente resfriado em banho de gelo para precipitação de proteínas e outros restos celulares. Misturou-se 25 vezes por inversão e incubou-se em banho de gelo durante 30 minutos. Centrifugou-se a  $3,287\text{g}$  durante 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  e o sobrenadante contendo o DNA do BAC clone removido com cuidado. Esta

solução foi centrifugada novamente a 3,287g durante 15 minutos a 4°C recolhendo-se cuidadosamente o sobrenadante. Completou-se o volume com isopropanol (q.s.p 50 mL) para precipitação do DNA. Centrifugou-se a 3,287g durante 30 minutos a 4°C e descartou-se cuidadosamente o sobrenadante.

O pellet de DNA foi ressuspensão em 500 µL de água milliQ estéril e adicionou-se o tampão QBT (NaCl 750 mM; MOPS 50 mM; Isopropanol 15% (v/v); Triton X-100 0,15% (v/v); pH 7,0) completando-se o volume para 5 mL.

A coluna de purificação QIAGEN foi equilibrada aplicando-se 4 mL de tampão QBT que fornece ótimas condições de ligação ao DNA. Em seguida aplicou-se na coluna os 5 mL da solução de DNA sem forçar o êmbolo. A coluna foi lavada 2 vezes com 10 mL de tampão QC (NaCl 1M; MOPS 50mM; isopropanol 15% (v/v); pH 7,0) para eliminação dos produtos não ligados. Eluiu-se o DNA ligado na coluna com 1 mL de tampão QF (Tris-HCl 50mM pH8,5; NaCl 1,25M; isopropanol 15% v/v) previamente aquecido a 65°C por 5 vezes, coletando-se o eluato em tubos novos tipo eppendorff® de 1.5 mL. Adicionou-se a cada eluato, 500 µL de isopropanol à temperatura ambiente para precipitação do DNA e em seguida homogeneizou-se e centrifugou-se a 3,287g durante 30 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante descartado com cuidado. O pellet foi lavado com 700 µL de etanol 70%, centrifugado a 7.000g durante 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado cuidadosamente. O pellet foi seco no speed-vac por aproximadamente 10 minutos e ressuspensão em 40 µL de água milliQ estéril.

Após a extração e purificação dos BAC clones, uma alíquota de 10 µL foi utilizada para quantificação nas absorvâncias de 260 nm e 280 nm. As preparações foram consideradas de boa qualidade quando apresentaram uma razão A260 /A280 maior ou igual a 1,8. A integridade da preparação foi avaliada em gel de agarose a 0,5%.

### **3.2.2) Obtenção de sondas biotinizadas**

Os BAC clones foram utilizados como molde para a obtenção de sondas. Utilizou-se o kit Bioprime DNA Labeling System (Invitrogen) conforme descrito:

Dilui-se 800 ng do BAC clone em 10  $\mu$ L de água milliQ estéril e incubou-se no termociclador a 99°C durante 5 minutos para desnaturação do DNA e em seguida, incubou-se imediatamente por 2 minutos em banho de gelo. Adicionou-se ao tubo contendo 10  $\mu$ L de sonda desnaturada, 20  $\mu$ L de solução de *primers* randômicos 2,5X concentrada, 5  $\mu$ L de solução de dNTPs 10X concentrada contendo 14-dCTPs biotinilados, 14  $\mu$ L de água milliQ estéril e 1  $\mu$ L de enzima Klenow na concentração de 40U/ $\mu$ L.

A solução foi homogeneizada com o auxílio de uma pipeta e incubada a 37°C no termociclador durante 3 horas. Aqueceu-se a solução a 65°C durante 10 minutos no termociclador para interromper a reação seguida de uma breve centrifugação a 13,148g. Dividiu-se o volume de 50  $\mu$ L em 2 tubos tipo eppendorff® e realizou-se a precipitação do DNA com etanol adicionando-se a cada tubo 72,5  $\mu$ L de água milliQ estéril, 37  $\mu$ L de NaCl 5M, 1  $\mu$ L de DNA de esperma de salmão na concentração de 1 $\mu$ g/ $\mu$ L, 800 ng de DNA genômico de vermes adultos de *S.mansoni* previamente digerido com Sau3A e 233,5  $\mu$ L de etanol 99,5% previamente resfriado. Misturou-se a solução no agitador tipo vortex® e centrifugou-se a 13,148g durante 10 minutos a 4°C e descartando-se o sobrenadante. O pellet foi mantido à temperatura ambiente durante 20 minutos para secagem e ressuspensão em 20  $\mu$ L de formamida bidestilada 100%.

### **3.3) Preparação de DNA genômico**

#### **3.3.1) Extração do DNA genômico**

Para cada 100  $\mu$ L de extrato ou 100 mg de peso úmido de verme adulto da cepa L.E. foram adicionados 500  $\mu$ L de tampão T.E. (Tris 50mM ; EDTA 1mM; pH 7,5). Esta suspensão foi submetida três vezes ao vortex por 30 segundos com intervalos de 1 minuto. A seguir foram adicionados 100  $\mu$ L de SDS 10% e a suspensão homogeneizada. Acrescentou-se 50  $\mu$ L de Proteinase K 20 mg/mL e incubou-se a 37°C no banho-maria durante 2 horas até completa

homogeneização. Posteriormente, adicionou-se 250  $\mu\text{L}$  de NaCl 5M, homogeneizou-se e incubou-se a 65  $^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos. Utilizando uma pipeta com a ponteira cortada, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) 10% em solução de NaCl 0,85M e a mistura foi homogeneizada vagarosamente por inversão. O DNA genômico foi extraído com adição de igual volume de clorofórmio seguido de agitação durante 30 segundos com o auxílio de um vortex. A solução com aspecto leitoso foi centrifugada a 5,000g durante 10 minutos à temperatura ambiente. Transferiu-se a fase aquosa para um tubo tipo eppendorff® com o auxílio de uma ponteira cortada e em seguida adicionou-se o mesmo volume de isopropanol seguido de uma incubação de 30 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, centrifugou-se a solução a 6,700g durante 15 minutos à temperatura ambiente e descartou-se o sobrenadante. Adicionou-se 1 mL de etanol 70% ao pellet e homogeneizou-se 3 vezes por inversão. Centrifugou-se novamente a 9,000g durante 5 minutos à temperatura ambiente e descartou-se o sobrenadante. O pellet foi seco com o auxílio de um fluxo laminar durante 10 a 20 minutos. Após a secagem, adicionou-se 60  $\mu\text{L}$  de água milliQ estéril, incubou-se durante a noite em banho-maria a 37 $^{\circ}\text{C}$  e na manhã seguinte, ressuspendeu-se vagarosamente o DNA genômico com o auxílio de uma ponteira cortada.

### **3.3.2) Digestão do DNA genômico com a enzima de restrição *Sau3A***

Cerca de 2  $\mu\text{g}$  de DNA genômico obtido conforme descrito acima foram digeridos com 60 unidades da enzima de restrição *Sau3A* (10U/ $\mu\text{L}$ ). Esta enzima, específica para o sítio de restrição GATC, gerou fragmentos de diferentes tamanhos. O volume da reação foi de 20  $\mu\text{L}$  e a digestão foi realizada na presença de BSA durante aproximadamente 12 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$ . A presença dos fragmentos foi verificada em gel de agarose a 0,5% utilizando-se TBE 0,5X como tampão de corrida. O padrão de digestão foi verificado utilizando uma alíquota de 5  $\mu\text{L}$  para análise em gel de agarose 0,5%.

### 3.4) Primers de retrotransposons

#### 3.4.1) Síntese dos *primers* de retrotransposons

Para a síntese dos primers, foram utilizadas as seqüências dos retrotransposons Boudicca (Genedb n° BH187252) e Perere (Genedb n° BH177115) e os oligos foram sintetizados na Invitrogen e tiveram suas extremidades 5' marcadas com fluoresceína (FITC). As seqüências dos primers foram obtidas com o auxílio do software Gene Runner e, para o retrotransposon Boudicca foram construídas as seqüências: Boudicca F 5'-3': TAACCTTCGTGCGCGTGTGTC e Boudicca R 5'-3': CGAAAGGCAAACGGCGGACAT. Para o retrotransposon Perere foram construídas as seqüências: Perere F: 5'-3': CCAGCGGAGGAAGAAATCAGG e Perere R: CTTGTGTAATGCGGCGTCGT. O produto de amplificação do retrotransposon Boudicca apresenta 179pb e o do Perere 150pb.

#### 3.4.2) Reação de PCR

Nas reações de amplificação, utilizamos 250 ng de DNA genômico obtido como descrito no item 3.3 e BAC clones como descrito no item 3.2. Realizou-se a reação de PCR para amplificação da seqüência do retrotransposon correspondente a cada par de primers. Adicionou-se em cada tubo, 1 µL de cloreto de magnésio 50mM, 5 µL de tampão da Taq 10X concentrado, 5 µL de solução de dNTPs a 10mM, 1 µL do *primer* L e 1 µL do *primer* R a 100 picomol/µL, 5 µL de água milliQ, 1 µL de enzima Taq a 5U/µL e 1 µL de DNA (DNA genômico ou BAC).

Em seguida, adicionou-se 30 µL de óleo mineral à mistura de reação e iniciou-se a reação de PCR com a seguinte ciclagem: Uma etapa de desnaturação inicial de 5 minutos seguida de 30 ciclos com: uma etapa de desnaturação a 95°C durante 45 segundos, uma etapa de pareamento de

primers por 1 minuto a 55°C e uma de extensão a 72°C por 2 minutos. Após esta, uma etapa de extensão final durante 10 minutos a 72°C.

### **3.4.3) Eletroforese em gel de PAGE**

### **3.4.4) Preparação do gel de PAGE**

Preparou-se um gel de poliacrilamida na concentração de 10% a fim de se detectar os fragmentos dos retrotransposons previamente amplificados na reação de PCR. Para 5 mL de gel, adicionou-se em um tubo do tipo falcon, 1,65 mL de solução de Bis-Acrilamida (1:29) , 1,0 mL de solução de tampão TBE 5X. A polimerização foi realizada com adição de 0,15 mg de persulfato de amônia em 100 µL e 5 µL de Temed. As amostras foram aplicadas nas canaletas e o gel foi submetido a uma voltagem de 100V por aproximadamente 1 hora.

### **3.4.5) Coloração do gel de PAGE com Nitrato de Prata**

Após a corrida, o gel foi retirado da cuba e incubado durante 5 minutos sob agitação lenta, na solução fixadora composta de etanol 10% e ácido acético glacial 0,5% (v/v). A solução fixadora foi desprezada e adicionou-se a solução com nitrato de prata composta de 25 mL de solução fixadora e 0,07g de nitrato de prata em 50 mL de água destilada.

O gel foi incubado nesta solução sob agitação lenta durante 10 minutos. Após este tempo, a solução foi descartada e o gel lavado por 2 vezes com água destilada. Adicionou-se a solução reveladora composta de hidróxido de sódio 3% (p/v) e quantidade suficiente de formaldeído para se visualizar as bandas sob agitação lenta. A solução reveladora foi desprezada e o gel foi transferido para solução fixadora por pelo menos 5 minutos e após este tempo ele foi fotografado.

### **3.5) Etapas utilizadas para as reações de FISH**

#### **3.5.1) FISH**

A técnica de FISH consiste em se marcar com biotina as sondas de BAC clones através do kit Bioprime. Através deste kit, são utilizados *primers* randômicos que promovem a amplificação dos BAC clones com o auxílio da enzima Klenow polimerase em uma lâmina contendo os cromossomos metafásicos. Os cromossomos são contra-corados com PI e observados no microscópio confocal.

#### **3.5.2) Obtenção de cromossomos metafásicos**

Inicialmente preparou-se as soluções necessárias a preparação:

- A solução hipotônica de colchicina foi obtida adicionando-se 0,5 mL de solução de colchicina 0,1% (p/v) em 9,5 mL de água destilada.
- A solução fixadora foi preparada mantendo-se uma proporção de 3:1 (v/v) de etanol 99,5% e ácido acético glacial.

Caramujos com 28 ou 29 dias de infecção por miracídios da cepa L.E foram comprimidos entre duas placas de petri e com o auxílio de duas pinças removeu-se o hepatopâncreas ou glândula digestiva, localizada na porção terminal do corpo do caramujo e altamente parasitado por esporocistos secundários. O hepatopâncreas foi transferido para um vidro de relógio contendo 1,5 mL da solução hipotônica de colchicina (0,1%), reduzido a fragmentos menores e incubado à temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente, os fragmentos foram transferidos para outro vidro de relógio contendo 2,0 mL da solução fixadora (etanol 99,5% e ácido acético glacial na proporção de 3:1 (v/v)) e reduzidos a fragmentos ainda menores até se formar uma suspensão. A suspensão foi transferida para um tubo do tipo Falcon<sup>®</sup> de 15 mL novo e o volume foi completado para 10 mL com solução fixadora.

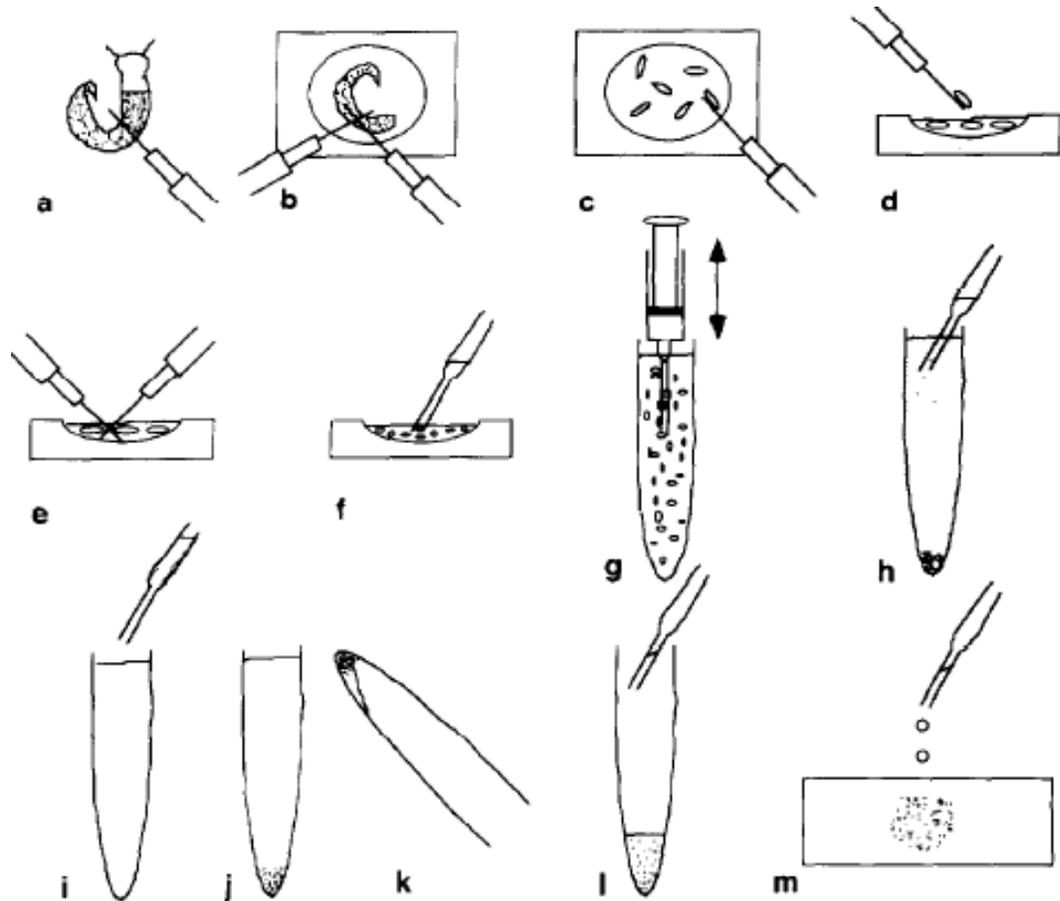
Com o auxílio de uma agulha de 18 gauge acoplada a uma seringa BD<sup>®</sup> de 10 mL, aspirou-se a suspensão para homogeneização. Este processo foi repetido por apenas cinco vezes para se evitar a ruptura das células que contém os cromossomos metafásicos, o que resultaria em um decréscimo destes. A suspensão foi mantida em repouso durante 10 minutos à temperatura ambiente para separação das células e dos aglomerados de tecidos. Após a decantação, o sobrenadante foi transferido cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta para um novo tubo do tipo Falcon <sup>®</sup> de 15 mL e centrifugado a 151g durante 5 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante descartado. Adicionou-se 8 mL de solução fixadora ao pellet de células para ressuspendê-las e centrifugou-se novamente a suspensão a 151g durante 5 minutos à temperatura ambiente. Este processo foi repetido mais uma vez. Após a última centrifugação, descartou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 2,0 mL de solução fixadora, sendo mantidas no freezer a -20°C.

### **3.5.2.1) Preparo de lâminas contendo cromossomos metafásicos**

Antes de se iniciar a preparação, a sala teve sua umidade monitorada a 60-70% com o auxílio de um Higrômetro (Fisher <sup>®</sup>) tipo “de cabelo”. Preparou-se 2 mL de solução fixadora (etanol 99,5% e ácido acético, na proporção de 3:1) que foi mantida em banho de gelo. Com a estabilização da umidade do ar a 70%, as lâminas previamente armazenadas no etanol 99,5% foram retiradas e o excesso de álcool removido com o auxílio de um lenço de papel.

Adicionou-se uma gota da suspensão de células contendo cromossomos metafásicos no centro da lâmina com o auxílio de uma pipeta. Após o espalhamento e secagem parcial, a superfície da lâmina adquiriu um aspecto granuloso e então, acrescentou-se uma gota da solução fixadora previamente preparada e mantida em banho de gelo, no mesmo local em que foi gotejada a suspensão. As lâminas foram incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente e em seguida transferidas para uma estufa a 37°C por um período mínimo de 3 dias para desidratação. Após este tempo, duas lâminas foram coradas com GIEMSA 6% e observadas em microscópio óptico para avaliação

da qualidade e quantidade de cromossomos metafásicos por lâmina. Após este período de secagem, as lâminas foram mantidas na estufa a 37°C por um período máximo de 10 dias. A Figura 5 ilustra esquematicamente as etapas para preparação dos cromossomos metafásicos:



**Figura 5 - Esquema das etapas de preparação de cromossomos metafásicos a partir de esporocistos secundários e o preparo de lâminas contendo cromossomos metafásicos.** A dissecção do hepatopâncreas do caramujo contendo 28 ou 29 dias de infecção está representada pelas letras a e b. Em c tratou-se os tecidos com solução de colchicina hipotônica. Em d e e observa-se a transferência destes tecidos para a solução fixadora e a sua fragmentação a pedaços ainda menores. Em f e g transferiu-se a suspensão para um novo tubo e homogeneizou-se com o auxílio de uma seringa. H e i ilustram o sobrenadante da suspensão que foi mantido em repouso e transferido para outro tubo. J,k e l representam as etapas de centrifugação sendo a l aquela em que o pellet foi ressuspensionado. A preparação das lâminas contendo os cromossomos metafásicos está representada pela letra m. (Adaptado de Hirai et al, 1995 ).

### **3.6) Bandeamento C para cariotipagem**

As lâminas contendo os cromossomos metafásicos foram incubadas em uma cuba contendo solução de HCl 0,2M durante 25 minutos para que ocorresse a depurinação do DNA e em seguida as lâminas foram lavadas com água destilada. Posteriormente foram transferidas para outra cuba contendo solução de Ba(OH)<sub>2</sub> (SIGMA<sup>®</sup>) 5% (p/v) previamente filtrada, por 10 minutos a 55°C para desnaturação e hidrólise da ligação fosfodiéster do DNA. As lâminas foram lavadas novamente com água destilada e incubadas em uma cuba contendo SSC 2X para proporcionar a renaturação do DNA, por 10 minutos a 55°C. Repetiu-se a lavagem com água destilada, adicionou-se às lâminas GIEMSA 4% (SIGMA<sup>®</sup>) em tampão fosfato pH 6,8 (NaHPO<sub>4</sub> 4,8 g ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4,54 g ; 1L dH<sub>2</sub>O), que interage com os grupos fosfato do DNA para coloração das regiões de heterocromatina constitutiva. Em seguida as lâminas foram incubadas à temperatura ambiente durante 2 horas, lavadas com água destilada e secadas com o auxílio de um ventilador quente. Finda a secagem, as lâminas foram observadas no microscópio óptico para detectar as regiões de heterocromatina nos cromossomos e assim, identificá-los.

### **3.7) Preparo para hibridização pela técnica de FISH**

#### **3.7.1) Desnaturação da sonda marcada com biotina**

Para duas amostras de BAC clones previamente marcadas com biotina, pipetou-se com o auxílio de uma ponteira cortada, 30 µL de uma solução contendo 45 µL de dextran sulfato 30% e 15 µL de solução de SSC 20X concentrada. A esta solução, adicionou-se 20 µL de formamida bidestilada e homogeneizou-se gentilmente. Aqueceu-se a 75°C no termociclador durante 10 minutos para desnaturação do DNA e em seguida incubou-se a 37°C no termociclador por 30 minutos.

### **3.7.2) Desnaturação dos cromossomos metafásicos da lâmina**

Inicialmente preparou-se as três soluções para desnaturação. A primeira cuba continha solução SSC 2X pH12,5 e para isso, adicionou-se 5mL de solução de SSC 20X concentrada, 0,5 mL de solução de NaOH 5M e o volume foi completado com água destilada para 50 mL. A cuba II continha solução de etanol 70% (35mL de etanol 99,5% diluído em 15mL de água destilada) e cuba III, 50mL de etanol 99,5%.

As lâminas foram incubadas exatamente por 4 minutos e meio na cuba I. Em seguida, foram transferidas para a cuba II por 5 minutos. E posteriormente foram incubadas por 5 minutos na cuba III. Após as incubações, as lâminas foram secas à temperatura ambiente por aproximadamente 15 minutos e identificadas com a sonda a ser adicionada.

### **3.7.3) Hibridização**

Após secagem e identificação das lâminas contendo os cromossomos metafásicos, adicionou-se 50 µL da sonda de BAC clones desnaturada na região central da lâmina e estas foram cobertas com fita Parafilm® (American National Can™) . As lâminas foram incubadas na estufa a 37°C durante 19 horas em uma câmara úmida composta de uma placa de Petri contendo papel de filtro umidificado com SSC 2X concentrado.

### **3.7.4) Detecção do Sinal após hibridização**

As soluções seguintes foram inicialmente preparadas e acondicionadas em cubas de vidro separadas nas respectivas temperaturas: A cuba I possuía formamida a 40% em SSC2X a 42°C (20mL de formamida bidestilada 100%, 5mL de SSC 20X concentrado e q.s.p. 50 mL de água destilada). A solução da cuba II contém SSC2X a 42°C (10mL de solução de SSC 20X concentrada q.s.p. 50mL de água destilada). A cuba III contém solução SSC2X à

temperatura ambiente e a cuba IV tampão BN à temperatura ambiente (5mL de solução de NaHCO<sub>3</sub> 1M, 0,5mL de Igepal 1% em 50mL de água destilada).

Após estabilização da temperatura atingida nas cubas I e II de 42°C, iniciou-se o procedimento para detecção do sinal.

Retirou-se a fita tipo Parafilm® das lâminas e estas foram incubadas à 42°C nas cubas I e II por 10 minutos e em seguida, transferidas para a cuba III por mais 10 minutos à temperatura ambiente. Finda esta incubação, elas foram transferidas para a cuba IV por 10 minutos à temperatura ambiente.

Antes da última incubação, foram preparadas as soluções de bloqueio e de Streptoavidina-FITC (AV-FITC), sendo o conjugado AV-FITC adicionado na hora do uso. A solução de bloqueio foi preparada adicionando-se 5 µL de NaHCO<sub>3</sub>, 5 µL de Igepal 1%, 25 µL de sobrenadante de leite em pó desnatado 10% e 15 µL de água destilada, totalizando um volume de 50 µL/lâmina. A solução de AV-FITC foi preparada na hora do uso e utilizou-se a proporção 1:50 (AV-FITC: bloqueio). Após a lavagem na última cuba, adicionou-se 50 µL da solução de bloqueio, cobriu-se com fita tipo Parafilm® e as lâminas foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente na câmara úmida. Em seguida retirou-se a fita tipo Parafilm® e o excesso de solução de bloqueio e adicionou-se 50 µL da solução AV-FITC. As lâminas foram incubadas durante 2 horas na estufa a 37°C e ao abrigo de luz. Posteriormente, as lâminas foram transferidas para uma cuba envolta em papel alumínio contendo tampão BN e lavadas 3 vezes com este tampão durante 5 minutos à temperatura ambiente sob agitação constante de 100 rpm no agitador.

A solução foi descartada, retirou-se o excesso da lâmina, e sobre a mesma, ainda úmida, aplicou-se a solução de contra-coloração. Esta solução foi preparada adicionando-se a 1 mg de p-fenilenodiamino (SIGMA®), 200 µL de tampão fosfato pH 7,4. Homogeneizou-se a mistura no vortex®, acrescentou-se 800 µL de glicerol e agitou-se novamente. Transferiu-se 199 µL desta solução para um novo tubo tipo eppendorff® de 1,5 mL devidamente envolto em papel alumínio e acrescentou-se 1,0 µL de Iodeto de Propídio (PI) a 1ng/µL. Adicionou-se a cada uma das lâminas, 40 µL da solução de contra-

coloração e as lâminulas foram acrescentadas de forma a se evitar a formação de bolhas. As lâminas foram incubadas na geladeira por 30 minutos, logo após o excesso de solução foi retirado com o auxílio de um lenço de papel e a resina Eukitt foi adicionada para fixação da lamínula. Finda a preparação das lâminas, estas foram mantidas sob refrigeração até sua observação no microscópio confocal de imunofluorescência.

### **3.8) PRINS (Primed *in situ* labeling)**

A técnica de PRINS envolve o anelamento de *primers* específicos de retrotransposons, seguidos de um alongamento *in situ* com a Taq DNA polimerase nas lâminas contendo os cromossomos metafásicos. Após a reação de PCR, as lâminas são transferidas para uma solução de parada e tampões de lavagem. Os cromossomos são contra-corados com PI e observados no microscópio confocal.

#### **3.8.1) Desnaturação das lâminas**

As lâminas foram desnaturadas em uma solução de formamida 70% em SSC2X a 72°C por 1 minuto. Em seguida foram desidratadas com uma incubação de 5 minutos sucessivamente em soluções de etanol 70, 90 e 99,5% previamente resfriadas. Após a incubação, as lâminas foram secadas à temperatura ambiente.

#### **3.8.2) Reação de PCR *in situ***

Primeiramente, deve-se preparar o mix contendo o par de *primers* marcados com fluoresceína na extremidade 5'. Para cada lâmina deve-se adicionar a um tubo tipo eppendorff® de 0,5 mL: 3,0 µL de solução de dNTPs na concentração de 10 mM, 3,0 µL do tampão da Taq DNA Polimerase 10X concentrado, 22,0 µL de água milliQ estéril, 1,0 µL do Primer R a 100

picomol/ $\mu\text{L}$ , 1,0  $\mu\text{L}$  do Primer L a picomol/ $\mu\text{L}$  e 1,0  $\mu\text{L}$  da enzima Taq DNA polimerase a 5U/ $\mu\text{L}$ .

Aplicou-se 30  $\mu\text{L}$  do mix na região central da lâmina onde se encontram os cromossomos metafásicos, adicionou-se a lamínula e esta foi selada com o auxílio de uma fita isolante. Em seguida, a lâmina foi transferida para o termociclador Px2 Thermal Cycler contendo o adaptador para lâminas Flat Block Module.

Na programação cíclica do termociclador, as lâminas foram incubadas a 93°C por 5 minutos para desnaturação dos cromossomos metafásicos seguida de um ciclo de 55°C por 10 minutos para anelamento dos primers. E a 72°C para extensão dos primers. Após a amplificação, removeu-se a fita isolante cuidadosamente e as lâmina foram incubadas por 3 minutos em uma solução de parada a 60°C contendo 0,5 mL de solução de NaCl 5M ,5 mL de solução de EDTA 5M em 44,5 mL de água destilada sob abrigo de luz.

Posteriormente, as lâminas foram lavadas 3 vezes em tampão BN ( $\text{NaHCO}_3$  1M e Igepal 1%) por 3 minutos à temperatura ambiente sob agitação de 80RPM. Retirou-se o excesso de solução e acrescentou-se 40  $\mu\text{L}$  da solução anti-fade, adicionou-se a lamínula cuidadosamente para se evitar a formação de bolhas e selou-se a lâmina com esmalte base Risque®. Após o preparo das lâminas, estas foram acondicionadas sob refrigeração até a observação no microscópio confocal.

### **3.8.3) Observação ao microscópio confocal e captura de imagens**

As lâminas foram observadas no microscópio confocal ZEISS® modelo LSM510, equipado com três lasers para microscopia confocal. O laser Argônio possui a capacidade de emitir três frequências distintas: 458, 488 e 514nm, Hélio/Neônio com emissão de 543nm e Hélio/Neônio com emissão de 633nm. A captura das imagens foi realizada com os lasers e com a câmera digital OLYMPUS® modelo ZOOM 3040, que foi acoplada ao microscópio por meio de um adaptador, sendo as fotos assim obtidas transferidas para o computador.

#### 4) RESULTADOS

#### 4.1) Análise e seleção dos BAC clones

As seqüências da biblioteca genômica de BAC clones contendo DNA de cercária da cepa Porto Rico clonadas em vetor pBeloBAC11 (Le Paslier e cols., 2000) foram analisadas em bancos de dados da FAPESP, NCBI, TIGR e SchistoDB por meio do alinhamento destas seqüências. Utilizou-se o algoritmo BlastN que compara as seqüências de nucleotídeos dos BAC clones (Query) com as demais depositadas nos bancos de dados, adotando-se como referência os valores de e-value menores que  $e^{-20}$ . Para o algoritmo BlastX, as seqüências de nucleotídeos de BAC clones (Query) foram traduzidas em seqüências de proteínas e comparadas com as depositadas nos bancos de dados adotando-se valores de e-value menores que  $e^{-5}$ .

Os 19 BAC clones disponíveis em nosso laboratório foram analisados e selecionados para localização dos retrotransposons por meio da técnica de FISH. Os BAC clones selecionados podem ser vistos em destaque na tabela 1. A biblioteca de BAC clones contém grandes insertos (100kpb) e como o genoma é composto de muitas seqüências repetitivas, torna-se difícil o seu sequenciamento. Assim adotou-se como alternativa iniciar o seu sequenciamento através das extremidades dos BAC clones por meio da técnica de shotgun. A técnica de shotgun consiste em se fragmentar o DNA genômico e estes fragmentos menores são selecionados em gel de agarose. Várias bibliotecas são construídas e os clones são selecionados aleatoriamente, seqüenciados em ambas as extremidades e posteriormente agrupadas em contigs

As análises de bioinformática do BAC clone 1A mostrou a presença de uma endonuclease transcriptase reversa do retrotransposon não-LTR Perere como pode ser visto nas tabelas 2 e 3. Os retrotransposons não-LTR geralmente apresentam uma ou duas ORFs e o domínio RT (Transcriptase Reversa) é o único comum a todos estes elementos (DeMarco e cols., 2004). A endonuclease geralmente é apurínica e marca o cromossomo hospedeiro promovendo o sitio de integração dos novos retrotransposons e a RT está

envolvida na transcrição reversa do RNA do retrotransposon em DNA e sua posterior integração no genoma hospedeiro (Brindley e cols., 2003).

Relação dos BAC Clones				
Código LBBM	Localização do Clone	Identidade do Clone	Código do GenBank	Contig
BAC 1A	008-F-15	BAC -31c8	BH177115 BH177114	16 - AL614073, BH177115, AL615715
BAC 2A	021-G-17	BAC -81d9	BH182387 BH182388	08 - BH201579, AL619337, BH182388
BAC 3A	016-L-06	BAC -64F3	BH180473 BH180474	N/C
BAC 4A	017-H-14	BAC -68D7	BH181015 BH181014	10 - AL617964, BH181014, AL616105 BH179150
BAC 5A	003-G-19	BAC -9D10	BH175371 BH175370	02 - BH175370, AL614991, BH178034
BAC 6A	024-P-14	BAC -96H7	BH184178 BH184177	15 - AL621131, BH184178, AL621166, BH184213
BAC 7A	028-I-13	BAC -109E7	BH185741 BH185740	11 - AL622690, BH185741, BH185655
BAC 8A	028-J-03	BAC -111E2	BH185998 BH185997	07 - AL622946, BH185998, BH199485, BH208985
BAC 9A	029-E-12	BAC -114C6	BH186399 BH186398	14 - BH203126, AZ694954, AZ694952, EST54, AL623345, BH186398
BAC 10A	031-K-12	BAC -122F6	BH186664	06 - AL623610, BH186664, AL616931, BH179977
BAC 11A	033-C-16	BAC -130B8	BH187252 BH187251	12 - BH200117, AL618420, BH187252 BH207179
BAC 12A	037-G-21	BAC -145D11	BH188911 BH188910	03 - BH208848, AL625850, BH188911
BAC 13A	037-E-23	BAC -145C12	BH188889 BH188888	04 - AL625828, BH188889, AL613229, BH176270, BH207937, BH206039, BH179703
BAC 14A	038-P-11	BAC -151H6	BH189654 BH189653	05: AL624535, AL626591, BH189653
BAC 16A	005-D-07	BAC -19B4	BH176055 BH176054	13 - BH201303, BH204073, BH205584, BH209974, AL612995, BH200833, BH176055, AL626527, BH189589, BH204866, BH206227, BH209640, BH207425, BH208248, BH201737, BH206863, BH208639
BAC 17A	005-P-20	BAC -20H10	BH176293 BH176292	17 - AL613251, BH176292, AL612616, BH175667
BAC 18A	009-P-24	BAC -36H12	BH177502 BH177503	09 - AL614462, BH177503
BAC 19A	N/C	BAC -156A9		N/C

**Tabela 1 - Identificação das seqüências dos BAC clones:** A localização do clone diz respeito a sua localização na placa, a identificação do clone se refere a codificação do clone no laboratório de origem e o código do GenBank a sua seqüência de nucleotídeos. Os contigs informam as seqüências presentes em cada um dos BAC clones. NC: Não consta.

O Perere é um retrotransposon não-LTR que faz parte da família CR1 e apresenta uma única ORF que codifica uma poliproteína com domínios para endonuclease e RT. Estima-se que este elemento genético móvel esteja presente no genoma do parasito num valor considerado intermediário (250-2,500 cópias) e apresenta um nível considerável de expressão. O Perere, filogeneticamente, está relacionado com o retrotransposon Pido de *S.japonicum* o que indica uma aquisição ancestral (DeMarco e cols., 2004).

Identificação do clone	Número de acesso do GenBank	Provável homólogo (organismo)	Número de acesso	Identidade	E-Value
16275711	BH177115	TPA: Perere-3 non-LTR retrotransposon ( <i>S. mansoni</i> )	gi 67625700	97%	0.0
16027297	AL614073	TPA: Perere-3 non-LTR retrotransposon ( <i>S. mansoni</i> )	gi 67625700	97%	0.0
16028938	AL615714	DNA, homologous to intron of GST gene and reverse transcriptase-like protein ( <i>S. mansoni</i> )	gi 1552189	89%	6e-42

**Tabela 2 - Resultado da busca de similaridade das seqüências do BAC clone 1A no banco de dados do NCBI usado-se o algoritmo BlastN.**

Identificação do clone	Número de acesso do GenBank	Provável homólogo (organismo)	Número de acesso	Identidade	E-Value
16275711	BH177115	TPA: endonuclease-reverse transcriptase ( <i>S. mansoni</i> )	gi 67625701	84%	1e-87
16275710	BH177114	SJCHGC03600 protein ( <i>S. japonicum</i> )	gi 76157294	73%	2e-75
16027297	AL614073	TPA: endonuclease-reverse transcriptase ( <i>S. mansoni</i> )	gi 67625701	84%	1e-87
16028938	AL615714	hypothetical protein ( <i>S. mansoni</i> )	Phat09669	81%	2.7e-23

**Tabela 3 - Resultado da busca de similaridade das seqüências do BAC clone 008\_F\_15 no banco de dados do NCBI usado-se o algoritmo BlastX.**

O BAC clone 11A apresentou similaridades com a polimerase de *S. mansoni* que está correlacionada com a presença de Retrotransposons (tabelas 4 e 5). O retrotransposon identificado foi o Boudicca, o primeiro Retrotransposon LTR a ser descrito no parasito *S. mansoni*, o qual possui um tamanho de 5,8 Kb sendo expresso em todos os estágios do ciclo de vida deste parasito. Geralmente, os LTRs retrotransposons apresentam uma ou duas janelas de leitura (ORF) cujos produtos apresentam similaridades aos polipeptídeos retrovirais Gag e Pol. A polimerase do Boudicca possui quatro domínios enzimáticos: Protease Aspártica, Transcriptase Reversa, RNaseH e Integrase, que são característicos de poliproteínas de Retrotransposon LTR do grupo Gypsy/Ty3 (Copeland e cols., 2003). O Boudicca, retrotransposon LTR, pertence ao grupo Kabuki/CsRn1 dos retrotransposons gypsy-like (bae), é transcrito ativamente e estima-se que mais de 1.000 cópias estejam espalhadas no genoma do parasito.

Identificação do clone	Número de acesso do GenBank	Provável homólogo (organismo)	Número de acesso	Identidade	E-Value
16296817	BH187252	TPA_exp: Boudicca LTR retrotransposon mRNA, ( <i>S. mansoni</i> )	gi 44829163	98%	0.0
16370157	BH200117	TPA_exp: Boudicca LTR retrotransposon mRNA, complete sequence ( <i>S. mansoni</i> )	gi 44829163	98%	0.0
16031924	AL6188420	TPA_exp: Boudicca LTR retrotransposon mRNA, complete sequence ( <i>S. mansoni</i> )	gi 44829163	97%	0.0
16383966	BH207179	TPA_exp: Boudicca LTR retrotransposon mRNA, complete sequence ( <i>S. mansoni</i> )	gi 44829163	96%	0.0

**Tabela 4 - Resultado da busca de similaridade das seqüências do BAC clone 033\_C\_16 no banco de dados do NCBI usado-se o algoritmo BlastN.**

Identificação do clone	Número de acesso do GenBank	Provável homólogo (organismo)	Número de acesso	Identidade	E-Value
16296817	BH187252	TPA_exp: pol polyprotein ( <i>S. mansoni</i> )	gi 44829164	98%	3,00E-155
16370157	BH200117	TPA_exp: pol polyprotein ( <i>S. mansoni</i> )	gi 44829164	98%	3,00E-72
16031924	AL6188420	TPA_exp: pol polyprotein ( <i>S. mansoni</i> )	gi 44829164	65%	1,00E-79
16383966	BH207179	TPA_exp: pol polyprotein ( <i>S. mansoni</i> )	gi 44829164	69%	5,00E-54

**Tabela 5 - Resultado da busca de similaridade das seqüências do BAC clone 033\_C\_16 no banco de dados do NCBI usado-se o algoritmo BlastX.**

## 4.2) Bandeamento C para cariotipagem

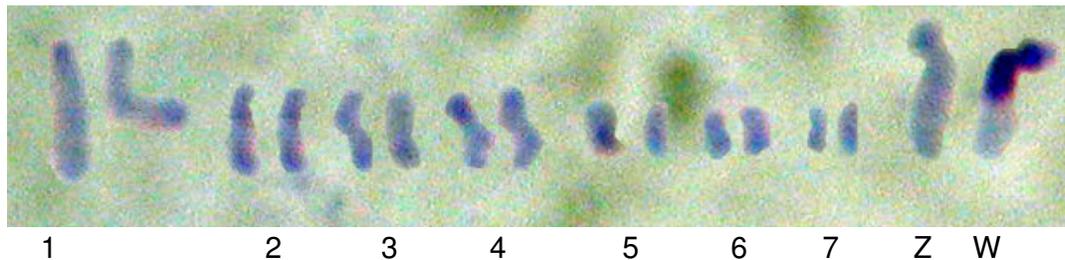
A técnica de Bandeamento C utilizada foi a descrita por Short e Grossman, 1981 e modificada por Hirai e cols em 1995. Com o padrão de bandas C obtido, o tamanho dos cromossomos e a localização dos centrômeros, pôde-se identificar o conjunto de cromossomos que constitui o genoma do parasito. Os 8 pares de cromossomos foram visualizados e o padrão das bandas observadas foram semelhantes aquelas previamente descritas.

O par de cromossomo 1 apresenta o braço curto mais estreito que o braço longo, uma banda peri-centromérica e é considerado acrocêntrico. O par de cromossomo 2 também possui o braço curto mais estreito que o longo e apresenta duas bandas, uma peri-centromérica e outra intersticial e é subtelocêntrico. O par de cromossomos 3 apresenta uma banda peri-centromérica no braço curto e três bandas no braço longo, sendo uma peri-centromérica, uma intersticial e outra telomérica e é considerado como submetacêntricos. O par de cromossomos 4 também possui o braço curto mais estreito que o longo e apresenta uma única banda peri-centromérica, sendo considerado subtelocêntrico. O par de cromossomos 5 é metacêntrico, apresentando uma banda telomérica no braço curto. O par de cromossomos 6 é submetacêntrico e o par de cromossomos 7 apresenta uma banda peri-centromérica e outra telomérica em seu braço longo, sendo classificado como metacêntrico e é o menor de todos os cromossomos. O par de cromossomo sexual é subtelocêntrico, o cromossomo Z apresenta uma única banda intersticial no seu braço longo e o W apresenta um grande bloco de heterocromatina na região peri-centromérica, relativo a duas bandas nesta região dos braços curto e longo, o que facilita sua identificação. A fêmea é heterogamética, com o par de cromossomos ZW e o macho, homogamético, apresentando o par de cromossomos ZZ.

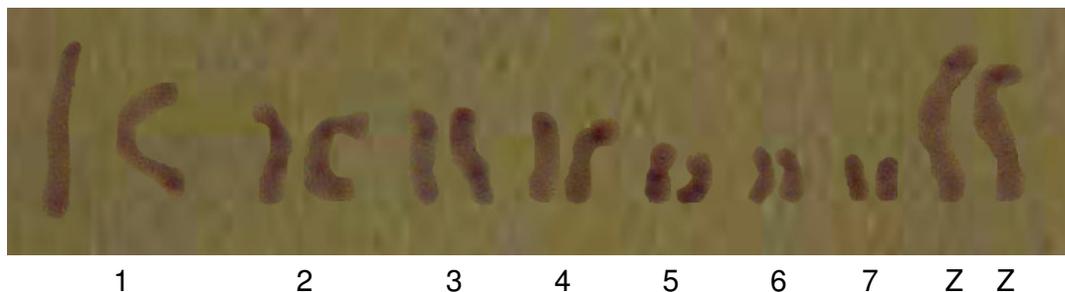
As regiões brancas representam as porções de eucromatina e as regiões escuras, as de heterocromatina. Os centrômeros estão representados

pelas constrições. As letras e números representam os respectivos cromossomos

Nas figuras 6 e 7 podem ser vistas fotos de cariótipos de uma fêmea e de um macho de *S. mansoni* que foram submetidas a técnica de bandeamento C. Os primeiros sete pares representam os cromossomos autossômicos e o oitavo par, o de cromossomo sexual. É notável a presença do bloco de heterocromatina na cromossomo W de fêmea, o que possibilita a diferenciação entre os dois cariótipos.



**Figura 6 - Cariótipo de fêmea** Os números 1 ao 7 representam os cromossomos autossômicos e o par 8 o cromossomo sexual. O cromossomo W da fêmea apresenta um bloco de heterocromatina, o que facilita a sua identificação.

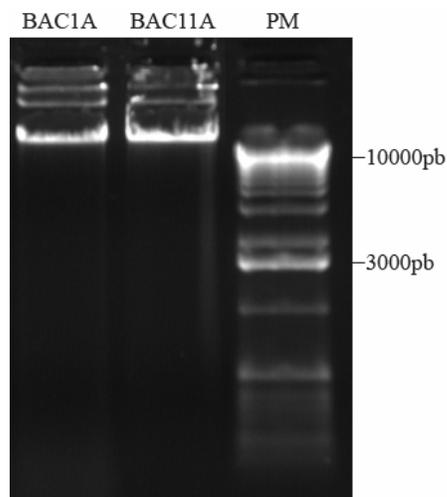


**Figura 7 - Cariótipo de macho** Os números 1 ao 7 representam os cromossomos autossômicos e o par 8 o cromossomo sexual. O macho é homogamético apresentando o par de cromossomos ZZ.

### 4.3) Preparação dos BAC clones para a técnica de FISH

#### 4.3.1) Extração e purificação dos BAC clones

Os BAC clones extraídos pela maxi-preparação, como previamente descrito, apresentaram alto grau de pureza como pode ser observado na figura 8 em que uma alíquota dos mesmos (500ng) foi submetida a uma eletroforese em gel de agarose a 0,8%, 60V por aproximadamente 1 hora.

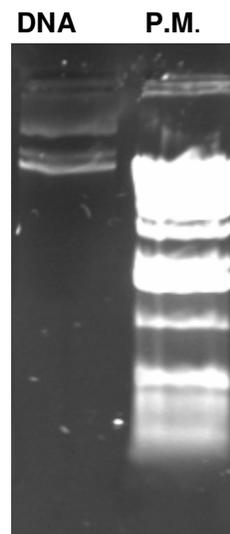


**Figura 8 - Determinação da integridade dos BAC clones 1A e 11A .** Uma alíquota de 500 ng dos BAC clones 1A e 11A, extraídos e purificados conforme descrito em materiais e métodos foram analisadas em gel de agarose a 0,8%. Como marcador de peso molecular foi utilizado o padrão de 1Kb da Gibco e a visualização foi realizada com brometo de etídeo.

#### 4.4) Preparação do DNA genômico de *S.mansoni*

##### 4.4.1) Extração e purificação do DNA genômico

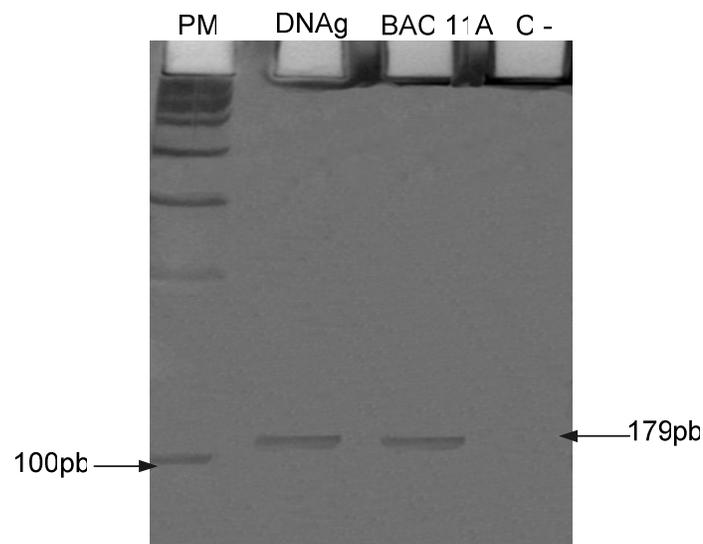
O DNA genômico extraído e purificado de acordo com o protocolo previamente descrito, foi analisado em gel de agarose a 0,5%. Na Figura 9 podemos observar gel típico desta preparação.



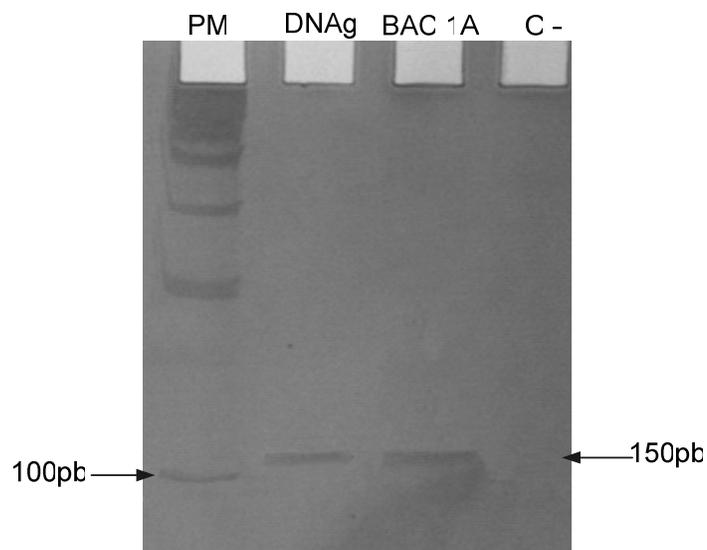
**Figura 9 - Análise do DNA genômico de *S.mansoni*** Uma alíquota de 1µg de DNA genômico extraído e purificado conforme descrito em materiais e métodos foi analisado em gel de agarose a 0,5%. Como marcador de peso molecular foi utilizado o padrão de 1Kb da Gibco e a visualização foi realizada com brometo de etídeo.

#### 4.5) Eletroforese PAGE

Após a reação de PCR utilizando-se o par de primers dos retrotransposons Boudicca e Perere, os produtos amplificados foram avaliados em gel de poliacrilamida a 10%. Na figura 10 observa-se o produto de amplificação com o par de primers do retrotransposon Boudicca e na figura 11 com o par de primers do Perere.



**Figura 10 - Análise do produto de PCR utilizando o par de *primers* do Boudicca em gel PAGE.** Na primeira canaleta está representado o padrão de peso molecular de 100 pb. Na segunda canaleta o fragmento amplificado do par de *primers* utilizando-se como molde o DNA genômico, na terceira canaleta, o produto amplificado utilizando o molde do BAC clone 11A e na última canaleta, o controle negativo. O produto de amplificação apresenta 179 pb e foi analisado e corado com nitrato de prata.



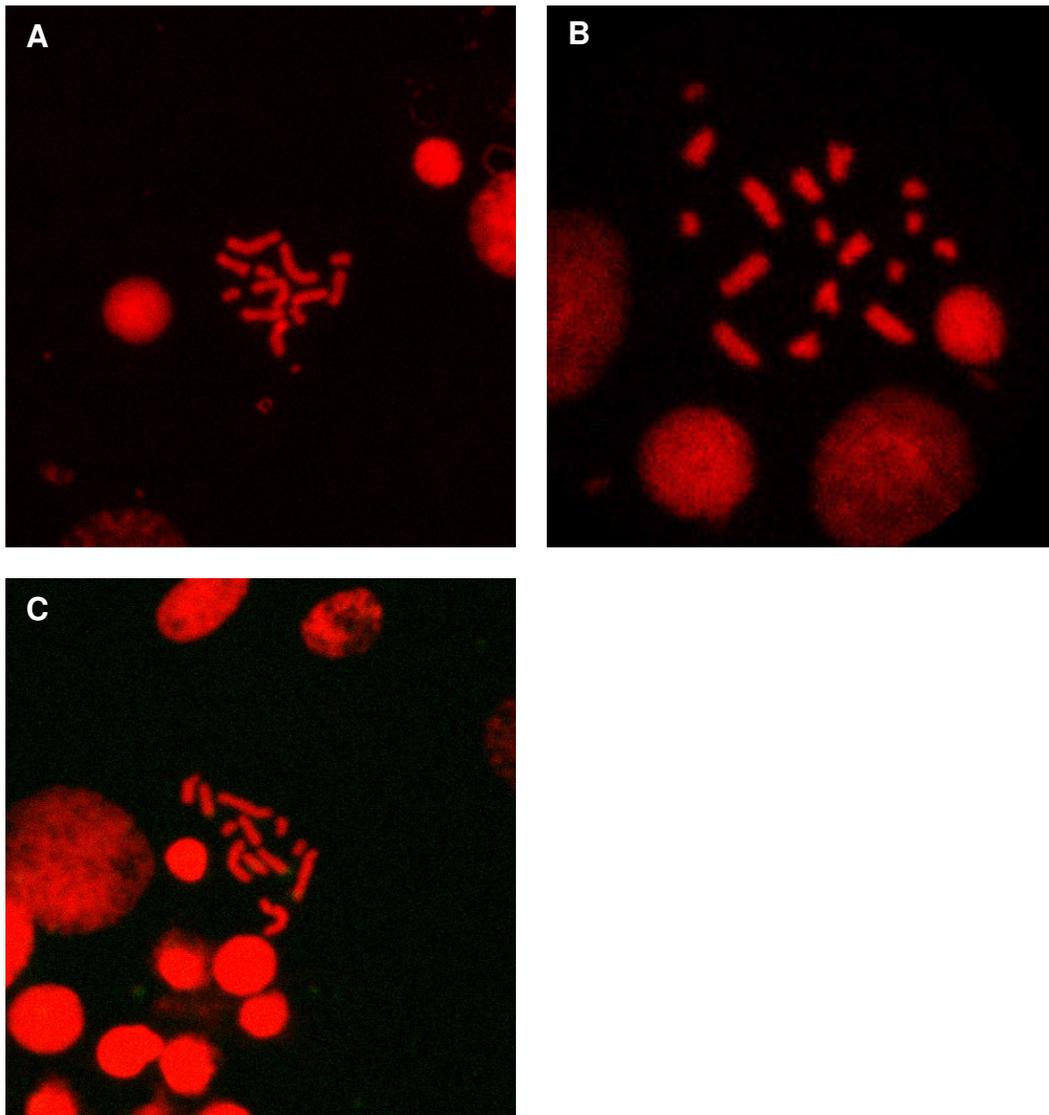
**Figura 11- Análise do produto de PCR utilizando o par de *primers* do Perere em gel PAGE.** Na primeira canaleta está representado o padrão de peso molecular de 100 pb. Na segunda canaleta o fragmento amplificado do DNA genômico, na quarta canaleta, o produto amplificado do BAC clone 1A e na última canaleta, o controle negativo. O produto de amplificação apresenta 150 pb e foi analisado e corado com nitrato de prata.

Os géis PAGE foram registrados no programa Photocapt (Biosystem) e após análise dos mesmos, pôde-se confirmar que o par de *primers* sintetizados para os retrotransposons Boudicca e Perere amplificou o fragmento destes elementos.

#### **4.6) Reações de FISH e PRINS**

##### **4.6.1) FISH (Fluorescence in situ hybridization)**

A técnica de FISH utiliza como conjugado a avidina marcada com fluoresceína (FITC) que se liga especificamente nos locais de hibridização e como contra-coloração o Iodeto de Propídeo (PI) que marca os cromossomos de vermelho. Inicialmente, procedemos a padronização da concentração ideal da contra-coloração (0,005ng/ $\mu$ L), como pode ser observado na figura 12.



**Figura 12- Cromossomos metafásicos de *S. mansoni* corados com Iodeto de Propídeo:** Em A, B e C, três spreads distintos foram corados com iodeto de propídeo na concentração de 0,005ng/ $\mu$ L e capturadas com o auxílio de um microscópio confocal ZEISS® modelo AXIOPHOTO LSM510

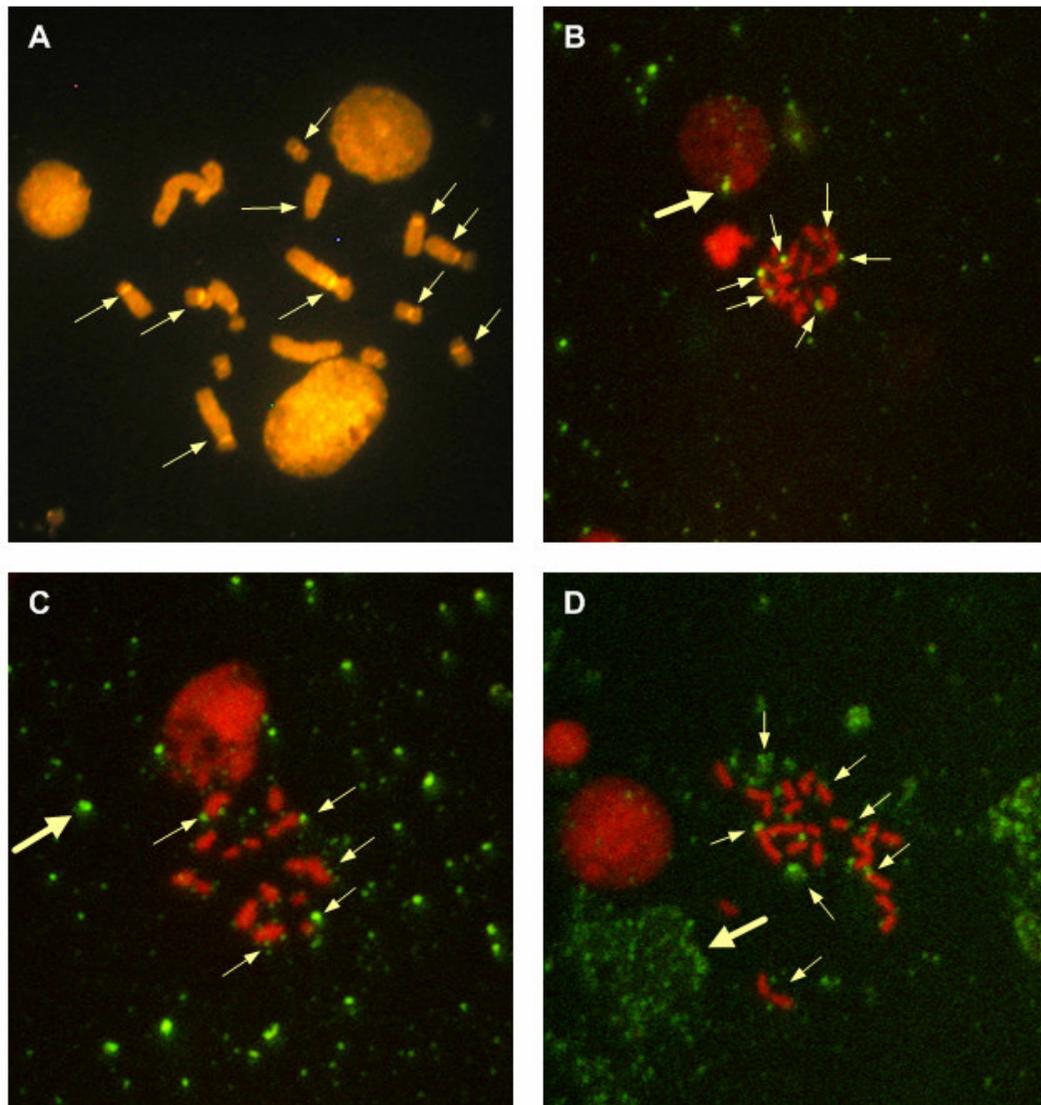
Uma vez estabelecida a concentração ideal do iodeto de propídeo, foram realizadas as reações de FISH com os BAC clones 1A e 11A. Utilizamos uma diluição inicial do conjugado AV-FITC de 250 vezes conforme sugerido no boletim técnico do fabricante e nessas condições esperávamos detectar os sinais de hibridização, como pontos de fluorescência verdes e os cromossomos

contra-corados de vermelho. No entanto, os primeiros resultados apresentaram marcações inespecíficas, uma vez que houve sinais de hibridização em praticamente todos os cromossomos. Além disso, em algumas lâminas também detectamos pontos de precipitação ao longo das mesmas. A figura 13, mostra os sinais observados quando o BAC clone 11A foi utilizado como sonda. Para a sonda de BAC clone 1A foram observadas alterações semelhantes, como pode ser observado na Figura 14.

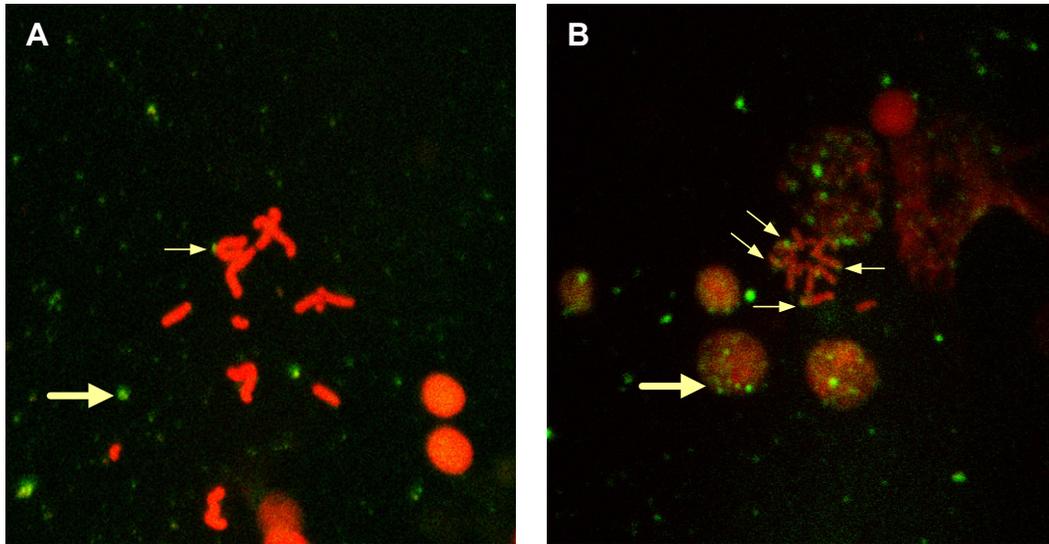
Com o objetivo de otimizar a reação, utilizamos uma nova solução do conjugado AV-FITC (Amershan<sup>®</sup>), cuja concentração inicial era de 0,5 ng/mL e foi utilizada com concentração final de 0,01ng/mL em tampão BN. Além disso, alteramos tanto o tempo de hibridização (de 1 hora para 3 horas) como a quantidade de DNA genômico previamente digerido com a *Sau3A* (800ng) e DNA de esperma de salmão (2ng). E, por fim, adaptações nas concentrações dos fluoróforos.

Assim, estas alterações foram realizadas para fornecer ótimas condições de hibridização das sondas dos BAC clones 1A e 11A nos cromossomos metafásicos de *S.mansoni*. Foram utilizados 800 ng de BAC clones previamente extraídos e purificados para marcação com Biotina por meio do kit Bioprime. A hibridização da sonda de BAC clones com os cromossomos metafásicos presentes nas lâminas, ocorreu em uma estufa a 37°C durante 19 horas. O Iodeto de propídeo foi utilizado na concentração de 0,005 ng/μL e a nova solução do conjugado AV-FITC foi diluída 1:50 em tampão BN. As demais etapas da reação não foram modificadas e foram realizadas como descrito por Hirai e colaboradores em 1995.

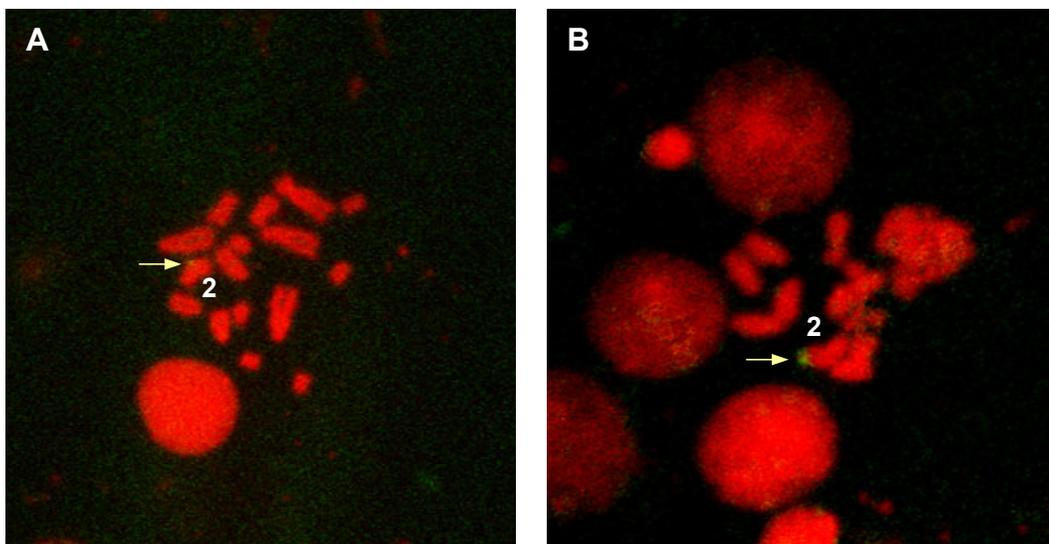
Diante de tais alterações pode-se observar a presença de sinais específicos de marcação e redução do background (ligações inespecíficas, precipitados de conjugado) para os BAC clones 1A e 11A. Estes resultados são apresentados nas figuras 15,16,17 e 18.



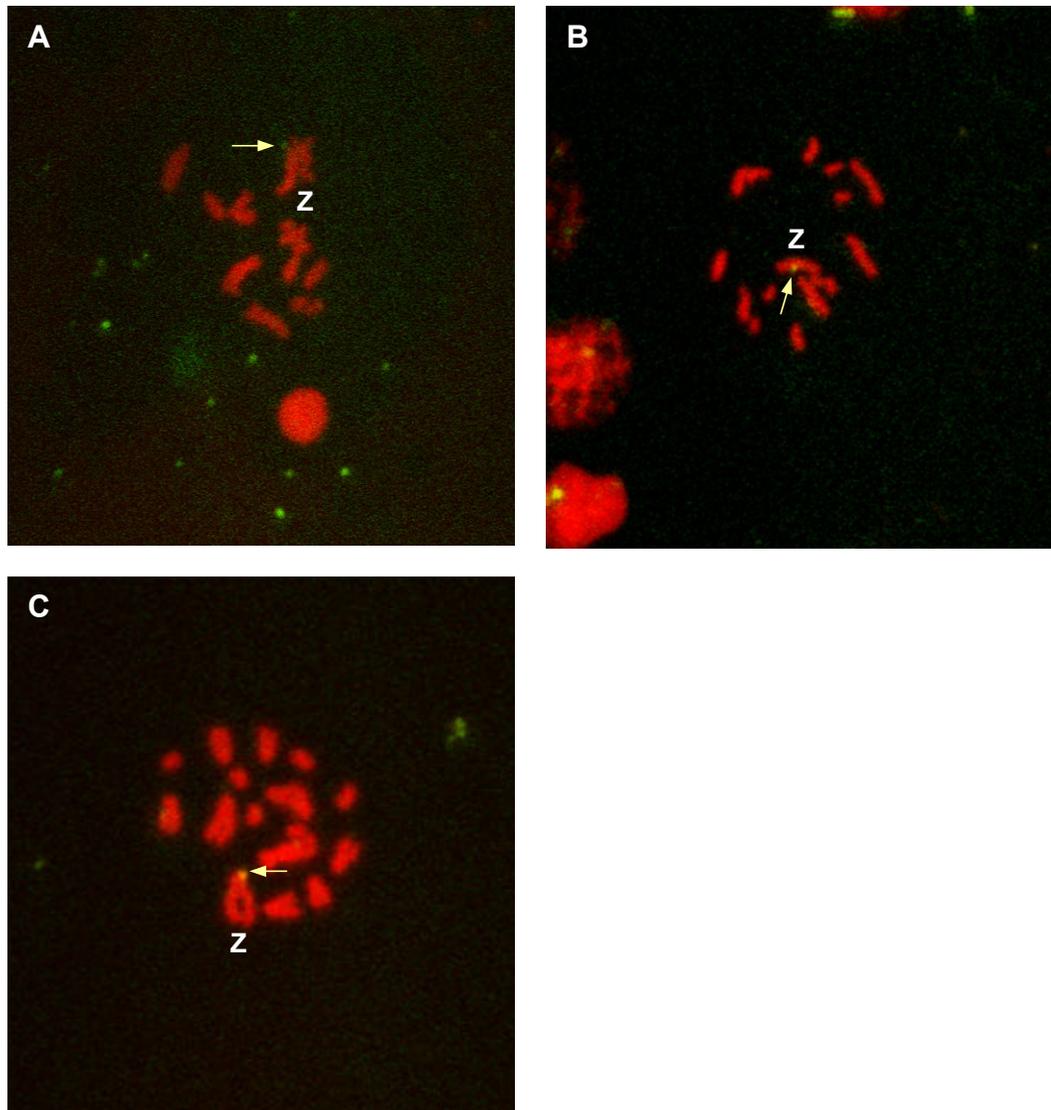
**Figura 13 - Cromossomos metafásicos apresentando sinais não específicos de hibridização com a sonda de BAC clone 11A.** Nas figuras 13A, B, C e D, estão representados os cromossomos metafásicos que apresentaram sinais de hibridização na maioria dos cromossomos. A foto A foi capturada por uma máquina digital acoplada ao microscópio confocal. Nas figuras B, C e D houve sinais de hibridização em vários cromossomos e muitos precipitados ao longo das lâminas. As fotos foram capturadas com o auxílio do microscópio confocal. As setas amarelas finas indicam marcações não específicas nos cromossomos e as setas amarelas grossas, os precipitados do conjugado presentes ao longo da lâmina e nas células próximas aos cromossomos.



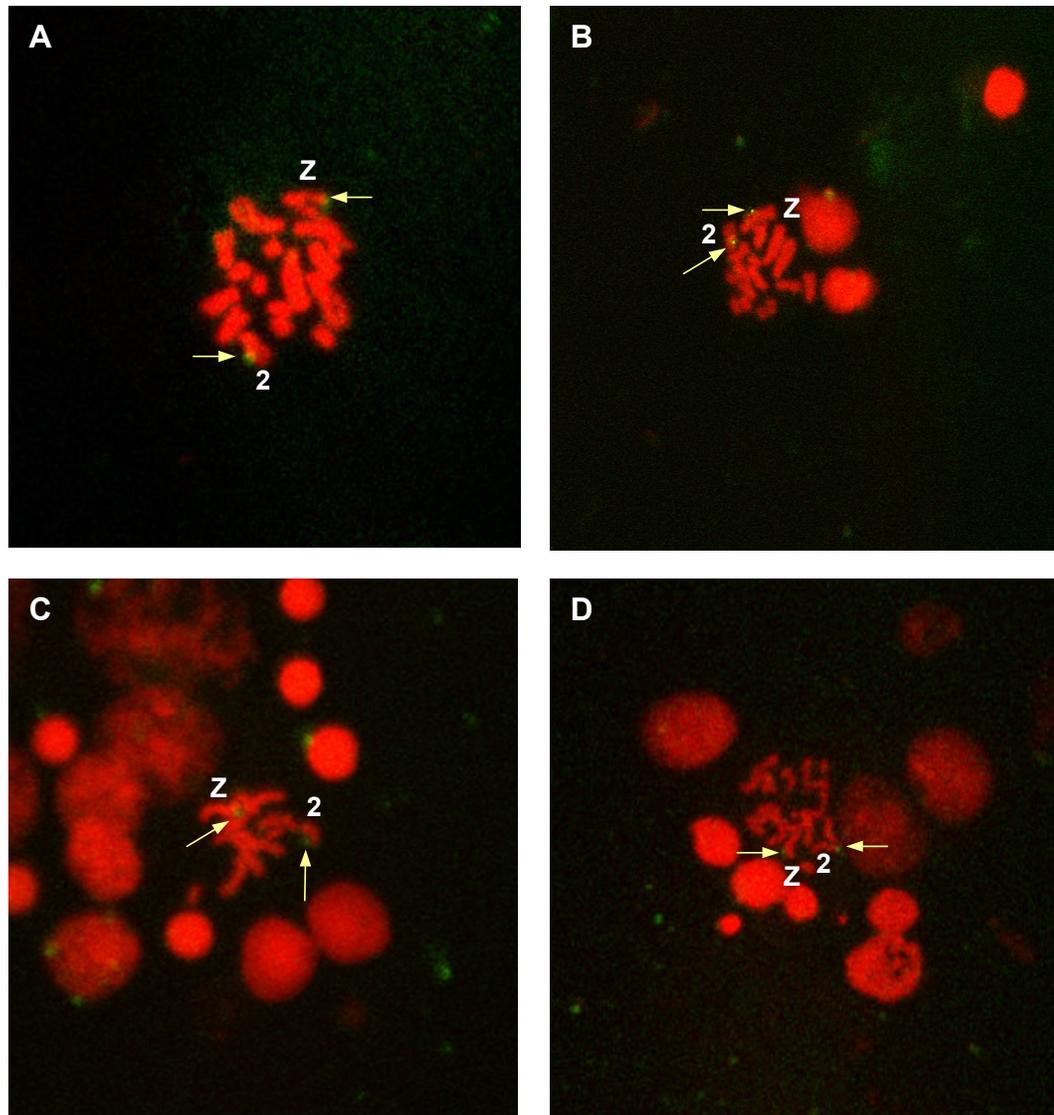
**Figura 14- Cromossomos metafásicos apresentando sinais não específicos de hibridização com a sonda de BAC clone 1A.** As figuras 14A e B apresentam um spread de cromossomos metafásicos em que ocorreram marcações inespecíficas e precipitados do conjugado ao longo da lâmina. As imagens foram capturadas pelo sistema de lasers do microscópio confocal. As setas amarelas finas indicam marcações não específicas nos cromossomos e as setas amarelas grossas, os precipitados do conjugado presentes na lâmina e nas células próximas aos cromossomos.



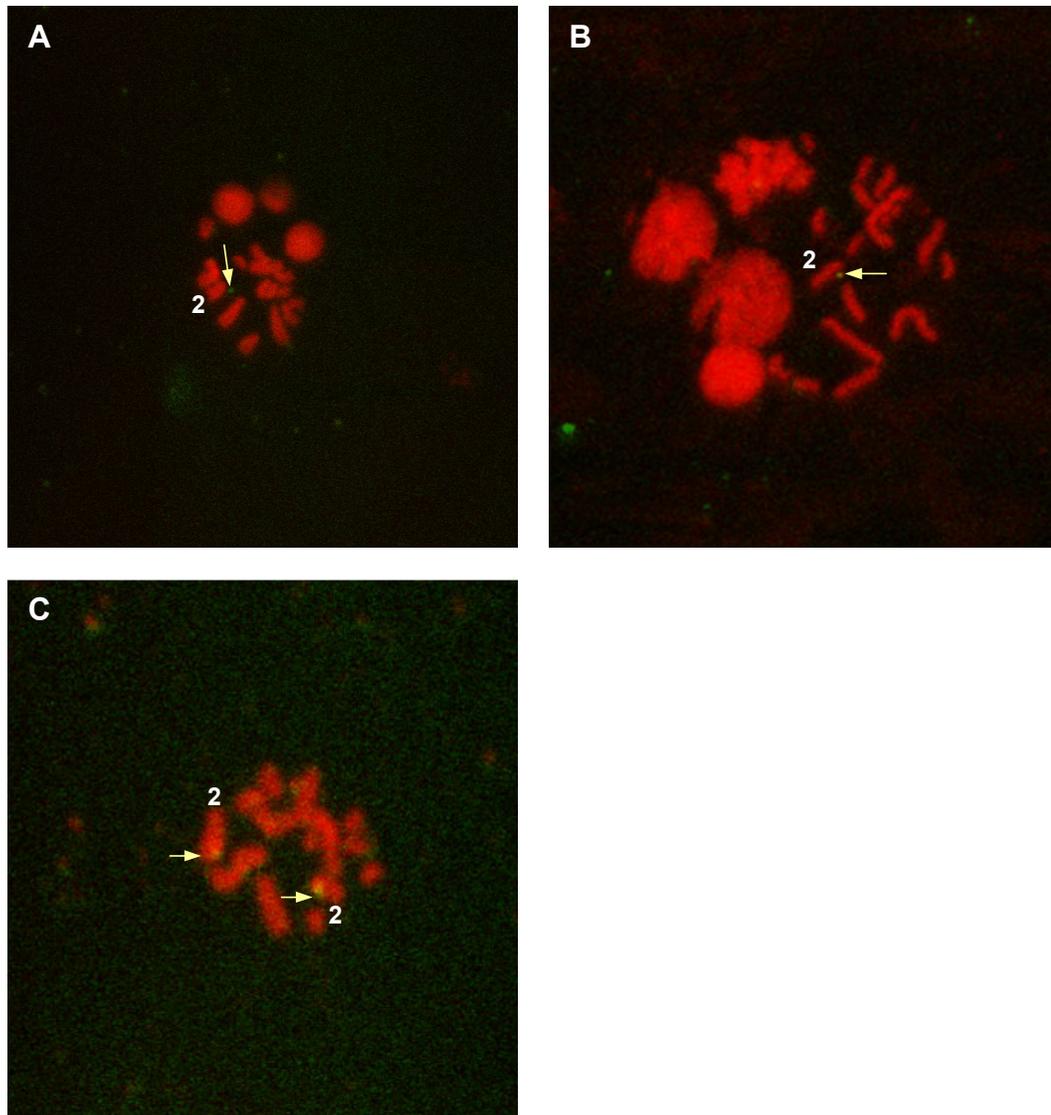
**Figura 15- Cromossomos metafásicos com sinais de hibridização utilizando a sonda BAC11A.** Nas figuras A e B houve sinal de hibridização apenas na região de heterocromatina do cromossomo 2. A seta amarela indica as regiões em que ocorreram as hibridizações.



**Figura 16 - Cromossomos metafásicos com sinais de hibridização utilizando a sonda BAC11A.** Nas figuras A ,B e C houve sinal de hibridização apenas na região de heterocromatina do cromossomo Z. A seta amarela indica as regiões em que ocorreram as hibridizações.



**Figura 17- Localização física do retrotransposon Boudicca nos cromossomos 2 e Z utilizando a sonda BAC11A.** Nas figuras A, B, C e D houve sinais de hibridização indicando a presença do retrotransposon Boudicca na porção de heterocromatina dos cromossomos 2 e Z conforme indicado pela seta amarela.

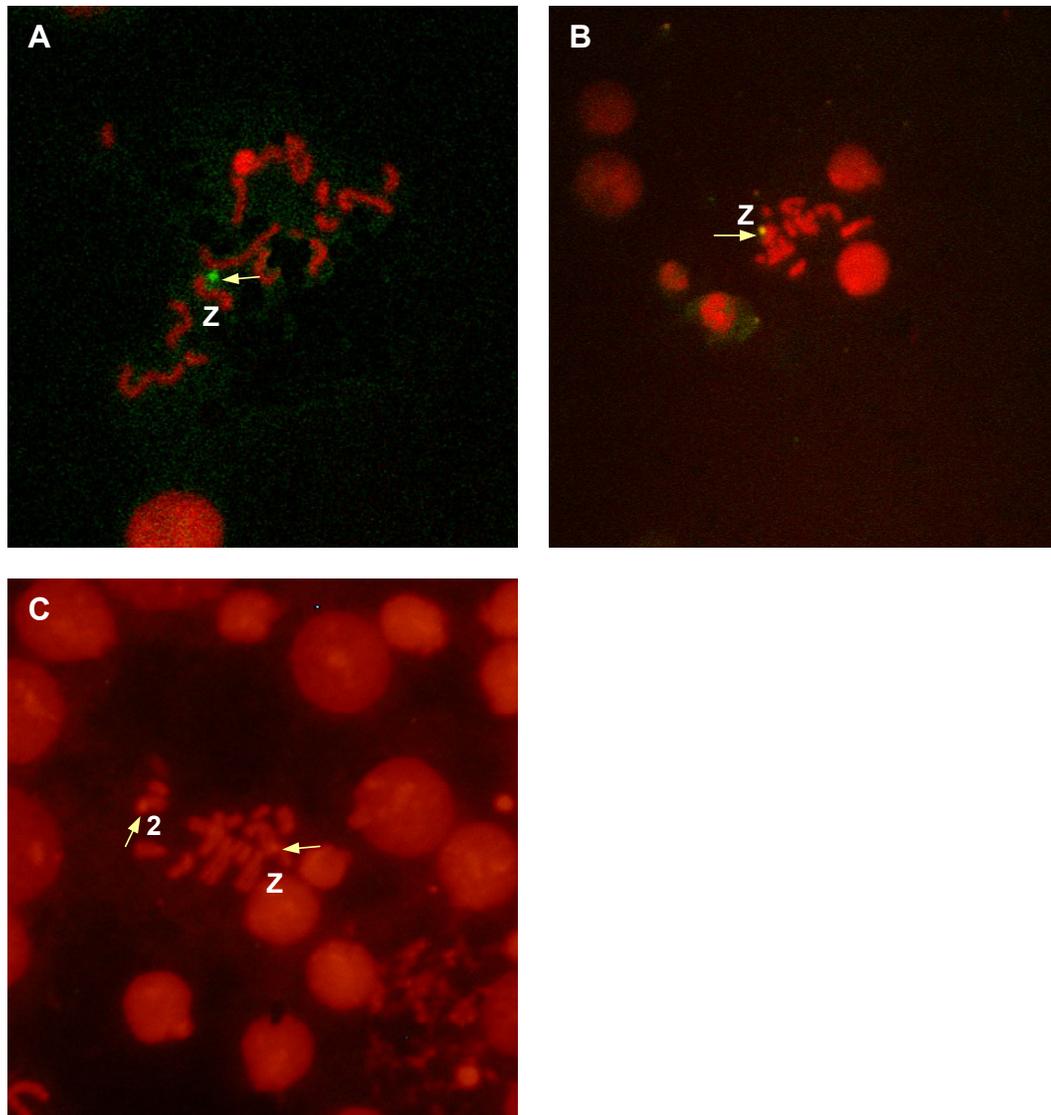


**Figura 18- Localização física do retrotransposon Perere no cromossomo 2 utilizando a sonda BAC1A.** Nas figuras A, B houve sinal de hibridização na porção de heterocromatina do cromossomo 2, indicando a presença do retrotransposon Perere. Na figura D pode-se observar um sinal de localização na porção de heterocromatina do par de cromossomos homólogos 2. A seta amarela indica a localização da marcação.

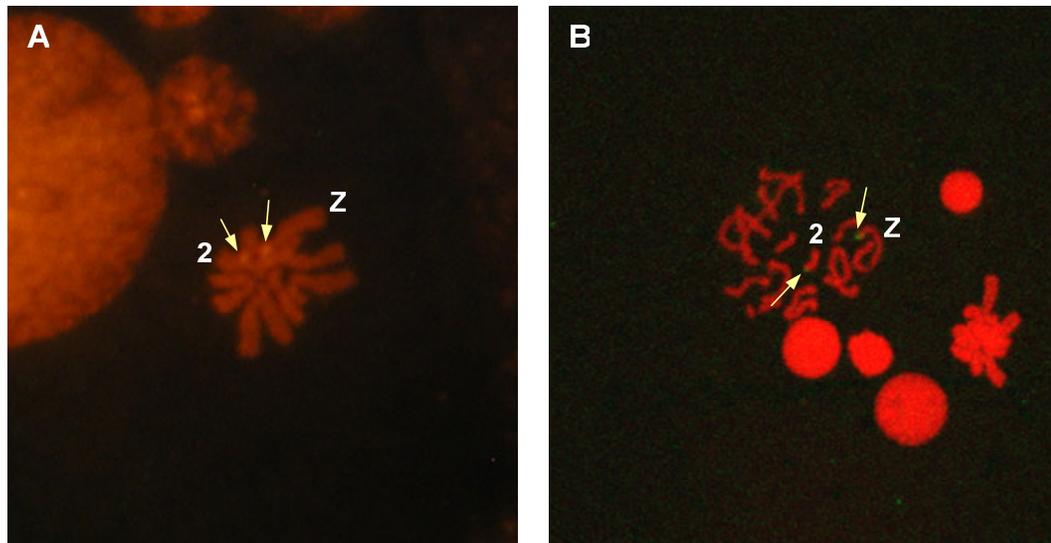
#### 4.7) PRINS (Primed *in situ* labeling)

O PRINS é uma técnica que apresenta grande especificidade e confiabilidade nos seus resultados uma vez que são utilizados primers específicos para o gene que se deseja localizar fisicamente seguido de uma reação de PCR *in situ*. Realizamos algumas modificações na técnica como o uso de *primers* marcados com FITC na extremidade 5' e uma etapa adicional de desnaturação com formamida a 70% durante 1 minuto seguido de incubações de 5 minutos em álcool 70, 90 e 99,5%. Para o par de primers do Boudicca, detectamos a localização deste retrotransposon nos cromossomos 2 e Z confirmando os resultados observados na técnica de FISH com a sonda de BAC11A. As figuras 19 e 20 apresentam os sinais de hibridização nos cromossomo 2 e Z:

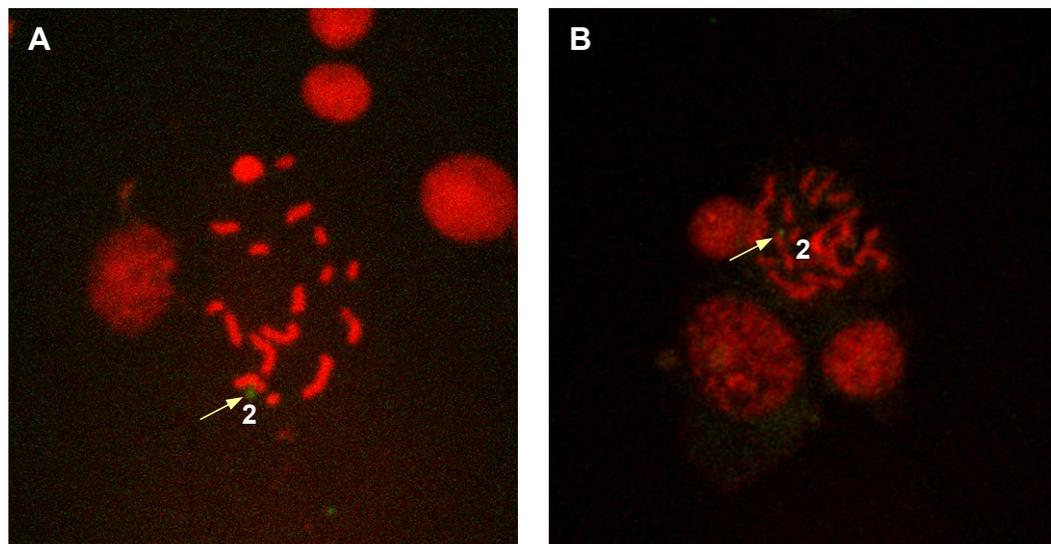
Utilizando-se o par de primers para o retrotransposon Perere observou-se um sinal de hibridização no par de cromossomos homólogos 2 como previamente descrito na técnica de FISH utilizando-se a sonda de BAC 1A. As figuras 21 e 22 mostram os sinais de hibridização.



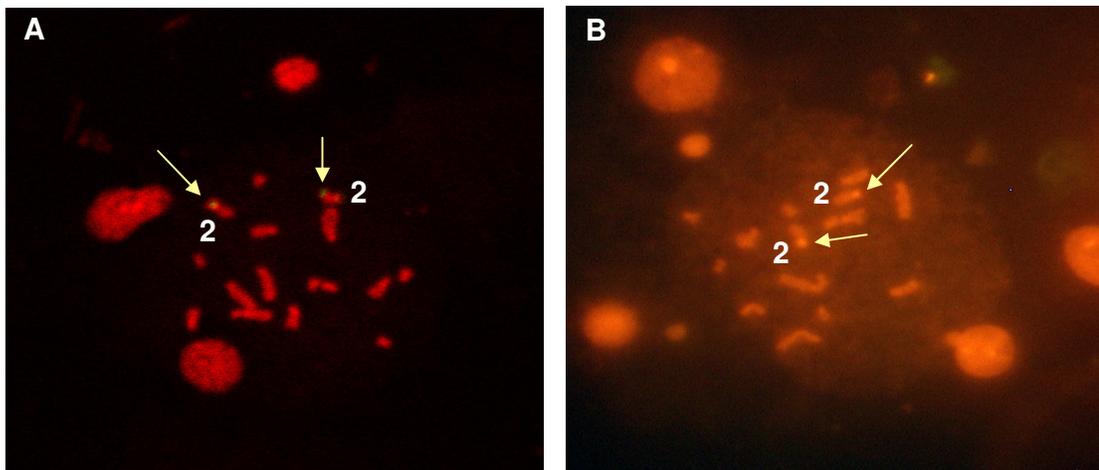
**Figura 19 Cromossomos metafásicos com sinais de hibridização utilizando o par de *primers* do Boudicca:** Nas figuras A e B observa-se um sinal de hibridização na porção de heterocromatina do cromossomo Z e 2 respectivamente indicando a presença do retrotransposon Boudicca. Na figura C pode-se observar um sinal de hibridização fraco na porção de heterocromatina dos cromossomos 2 e Z. A seta amarela indica a localização da marcação.



**Figura 20 - Localização física do retrotransposon Boudicca nos cromossomos 2 e Z utilizando a técnica de PRINS.** Nas figuras A e B observa-se um sinal de hibridização na porção de heterocromatina dos cromossomos 2 e Z indicando a presença do retrotransposon Boudicca. A seta amarela indica a localização da marcação.



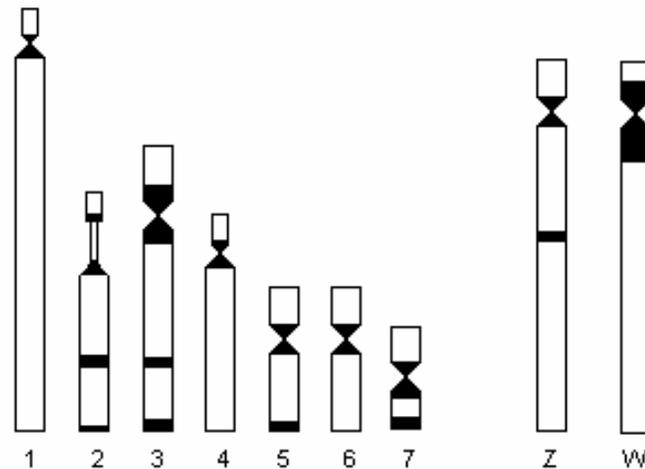
**Figura 21 - Localização física do retrotransposon Perere no cromossomo 2 utilizando a técnica de PRINS:** Nas figuras A e B observa-se um sinal de hibridização na porção de heterocromatina do cromossomo 2 indicando a presença do retrotransposon Perere. A seta amarela indica a localização da marcação.



**Figura 22 :Localização física do retrotransposon Perere no par de cromossomos 2 utilizando a técnica de PRINS:** Nas figuras A e B observa-se um sinal de hibridização na porção de heterocromatina do par de cromossomos homólogos 2 indicando a presença do retrotransposon Perere. A seta amarela indica a localização da marcação.

## 5) DISCUSSÃO

O *S.mansoni* é um parasito cujo genoma se encontra distribuído em oito pares de cromossomos, sendo sete autossômicos e um sexual (ZZ para machos e ZW para fêmeas). Por possuírem cromossomos que apresentam a capacidade de se condensar durante a etapa de metáfase, torna-se possível a sua identificação por meio da técnica de bandeamento-C. Por meio desta técnica, são obtidos padrões de bandas C característicos de cada cromossomo e, além disso, o tamanho dos mesmos bem como a localização dos centrômeros nos possibilita inferir sobre a identidade de cada um dos cromossomos. Realizando-se a técnica de bandeamento-C, observamos nas preparações um padrão de bandas semelhante ao descrito por Hirai e cols em 1995. A figura 23 mostra um idiograma típico de *S.mansoni* :



**Figura 23- Representação esquemática do perfil de bandas C cromossômicas observadas no cariótipo de *S. mansoni*.** As regiões brancas representam as porções de eucromatina e as regiões escuras, as de heterocromatina. As constrições representam a posição dos centrômeros. As letras e números representam os respectivos cromossomos. Os centrômeros estão representados pelas constrições. (Hirai & LoVerde, 1995)

O grande tamanho dos cromossomos do parasita dificulta a sua separação pela técnica de eletroforese de campo pulsado mas, por outro lado, permite a sua visualização em microscopia, o que torna esta característica vantajosa quando comparamos o seu tamanho com a de outros protozoários parasitos como *Leishmania* e *Trypanosoma*, que por serem muito pequenos,

são dificilmente visualizados em microscopia. Assim, uma alternativa para o estudo do seu genoma é a construção de mapas físicos de baixa resolução envolvendo todo o seu genoma.

Embora um dos principais objetivos do projeto genoma do *S.mansoni* foi a construção de mapas físicos de baixa resolução utilizando-se as técnicas de FISH e PRINS, até o momento este objetivo ainda não foi atingido.

Visando contribuir com esta iniciativa, realizamos o mapeamento físico de genes no genoma do parasito. Neste trabalho, nosso objetivo foi localizar retrotransposons no genoma do parasito utilizando-se as técnicas de FISH e PRINS.

Estima-se que cerca de 40% do genoma do *S.mansoni* seja constituído de seqüências repetitivas e grande parte destas seja composta de retrotransposons (Charlesworth e cols., 1994). Por muito tempo, estes elementos genéticos móveis foram considerados DNA lixo ou DNA egoísta uma vez que se multiplicavam em grandes proporções no genoma hospedeiro (egoísta) e não se conheciam benefícios dos mesmos para o organismo hospedeiro (lixo), entretanto, desde a década de 90 esta visão vem mudando.

As ações dos TEs foram por muito tempo consideradas como deletérias no genoma dos eucariotos e assim, esperava-se que as pressões seletivas tenderiam a eliminar estes elementos do genoma humano (Charlesworth, 1988). Porém os TES podem tanto causar mutações deletérias devido a sua inserção bem como interagir benéficamente com o genoma hospedeiro (Batzer & Deininger, 2002). Os efeitos deletérios dos TEs podem ser devido as mutações causadas por eles quando se inserem ou são excisados do genoma alvo bem como de efeitos a níveis genéticos que são associados com o movimento de transposição (Kidwell & Lisch, 1997) e quando estas mutações ocorrem em humanos, eles podem causar uma série de doenças (Kazazian, Jr., 1998). Cópias acumuladas dos TEs no genoma levam a multiplicação de seqüências homólogas ao longo do cromossomo e a recombinação gênica entre elementos inseridos em diferentes sítios podem causar vários rearranjos cromossômicos como inversões, deleções ou translocações (Langley e cols., 1988). Os TEs podem se inserir dentro dos éxons, podendo alterar ou não o

perfil de expressão gênica. Quando em íntrons eles podem ser eliminados no processamento do mRNA e não ter nenhuma função gênica ou mesmo processados eles podem funcionar como sítios de seqüências regulatórias e também podem se inserir nas regiões de heterocromatina (Kidwell & Lisch, 1997). Assim, estes eventos de transposição que inserem os TEs em regiões de codificação, promotoras, ou intergênicas, podem aumentar as taxas de mutação e modificar os níveis de expressão gênica (Le & Deceliere, 2005). Em situações específicas como no estresse, a ativação dos TEs pode contribuir para a variabilidade genética e fenotípica (Arnault & Dufournel, 1994; Capy e cols., 2000). Há também especulações de que estes TEs possam estar envolvido no mecanismo de resistência a drogas.

Os TEs podem também interagir positivamente com o genoma hospedeiro e contribuir para a sua evolução (Makalowski, 2003), bem como participar na evolução do gene (Ganko e cols., 2003; Iwashita e cols., 2003; Kapitonov & Jurka, 1999; Makalowski, 2003), diversidade fenotípica (Clegg & Durbin, 2000; Long e cols., 2000), especiação (McFadden & Knowles, 1997), reparo do DNA (Gasior e cols., 2006), influência do tamanho de íntrons e éxons, proteção da região terminal telomérica (Biessmann e cols., 1997).

Um bom exemplo desta função ocorre quando os retrotransposons semelhantes a LINE HeT-A e TART, se direcionam para o final dos cromossomos de *D.melanogaster* (Biessmann e cols., 1997) onde eles parecem ser essenciais para manutenção das extremidades teloméricas.

Como exemplos de retrotransposons da família LTR identificados no genoma do *S.mansoni*, podemos citar: Boudicca (Copeland e cols., 2003), Saci (DeMarco e cols., 2004), Fugitive (Laha e cols., 2004), Sinbad (Copeland e cols., 2005) e o Gulliver do *S.japonicum* (Laha e cols., 2001), e de retrotransposons da família não-LTR: SR1 (Drew & Brindley, 1997), SR2 (Drew e cols., 1999), SR3 (Laha e cols., 2005), Perere (DeMarco e cols., 2004), e Pido do *S.japonicum* (Laha e cols., 2002).

Identificamos os retrotransposons Boudicca da família LTR e o Perere da família não-LTR através da análise de uma biblioteca de BAC clones presentes em nosso laboratório em bancos de dados de bioinformática. É

importante ressaltar que as análises de bioinformática nos fornecem dados dos genes presentes nas extremidades dos BAC clones. Para o BAC clone 1A obteve-se similaridade para o retrotransposon Perere e para o BAC clone 11A o retrotransposon Boudicca. Considerando que o tamanho médio dos insertos dos BAC clones é de 100,000 pb, não podemos excluir a presença de genes flanqueados por estes elementos, entretanto, como estes BACs estão enriquecidos com seqüências de retrotransposons, há uma maior probabilidade de que ocorra o mapeamento destes genes.

Estes retrotransposons foram escolhidos uma vez que o Boudicca está presente em um grande numero de cópias no genoma (Copeland e cols., 2003) e o Perere além de apresentar um número de cópias intermediária, é um dos elementos que possuem um dos maiores níveis de expressão (DeMarco e cols., 2004).

O retrotransposon Boudicca, da família gypsy/Ty3 apresenta um tamanho aproximado de 5,8KB com alto número de cópias estimado entre 1,000 e 10,000 por metodologias de bioinformática, sendo considerado o elemento mais abundante no genoma do parasito. Com isso, há suposições de que ele tenha contribuído para o tamanho do genoma e represente cerca de 4% ou mais dele (Copeland e cols., 2004). Provavelmente ele influenciou o tamanho do genoma através de ações mutagênicas de seu movimento e em recombinações cromossômicas (Charlesworth e cols., 1994; Petrov e cols., 2000).

O Perere pertence a família CR1 e apresenta um número de cópias intermediário quando comparado a outros retrotransposons previamente descritos (250 a 2,500 cópias) e possui uma maior atividade transcripcional por cópia (5,6) quando comparada ao Boudicca (0,4) através de metodologias de bioinformática (DeMarco e cols., 2004). Estas diferenças nos níveis de transcrição entre os elementos com baixo e alto número de cópias pode ser explicada pelo silenciamento gênico causado por cossupressão, a qual diminui os níveis de mRNA de elementos com alto número de cópias (Jiang, 2002) e a maior atividade dos retrotransposons pode ser associada as adaptações do parasito aos diferentes estágios de vida e hospedeiro.

Embora vários retrotransposons de *S.mansoni* tenham sido identificados, ainda permanece por ser determinado tanto a função como a localização física destes no genoma do parasito. Este trabalho mostra pela primeira vez, a localização física dos retrotransposons Boudicca e Perere utilizando-se as técnicas de FISH e PRINS.

Utilizando-se a técnica de FISH e sondas com o BAC clone 1A, observamos uma hibridização localizada preferencialmente na região de heterocromatina do par de cromossomos homólogos 2 como apresentado na figura 22. Posteriormente, utilizou-se a técnica de PRINS que é uma técnica mais sensível e específica que utiliza *primers* específicos para o gene que se deseja localizar. Utilizando-se esta técnica observou-se o mesmo padrão de marcação como apresentado na figura 17. Para a localização do retrotransposon Boudicca pela técnica de FISH, utilizou-se o BAC clone 11A como sonda e obteve-se um sinal de hibridização preferencialmente na região de heterocromatina dos cromossomos 2 e Z como mostrado na figura 17. Utilizando-se a técnica de PRINS para este retrotransposon observou-se repetição deste sinal de hibridização como apresentado na figura 20. Assim, os resultados obtidos pelo PRINS confirmaram os obtidos anteriormente pela técnica de FISH para o mapeamento dos retrotransposons Boudicca e Perere.

A técnica de FISH utiliza sondas de BAC clones e um conjunto de *primers* aleatórios. Observou-se um sinal de hibridização na região de heterocromatina do par de cromossomos homólogos 2 com o BAC clone 1A e nos cromossomos 2 e Z utilizando-se o BAC clone 11A. Estes sinais de hibridização foram posteriormente confirmados quando se utilizou a técnica de PRINS, que é uma técnica mais sensível e específica. Nesta técnica, são utilizados *primers* específicos para o gene que se deseja localizar. É interessante notar que duas famílias de retrotransposons mapeiam no mesmo cromossomo (2) e que sob várias condições de marcação, como baixa estringência, ocorreu uma certa especificidade de marcação na região heterocromática como pode ser observado nas figuras 13 e 14.

Os elementos genéticos móveis estão presentes em diferentes distribuições nas regiões de eucromatina e heterocromatina (Di e cols., 1997) e

assim, sofrem influência das mesmas em relação a sua conservação, número de cópias (Junakovic e cols., 1998; Kidwell & Lisch, 1997) e diferenças nos níveis de expressão. Em várias espécies como *D.melanogaster* (Bartolome e cols., 2002), *Arabidopsis thaliana* (Anonymous2000) e *Tetraodon nigroviridis* (Dasilva e cols., 2002), os TEs tendem a se acumular nas regiões de heterocromatina. Nesta região a taxa de recombinação gênica é menor e assim, estes elementos não sofrem ações deletérias do genoma hospedeiro o que favorece a sua presença nestas regiões.

A heterocromatina é uma região que está envolvida em funções estruturais como na atividade centromérica, pareamento de cromossomos (Karpen & Allshire, 1997; Brandes e cols., 1997) sendo composta principalmente de uma variedade de elementos de repetição principalmente de DNA satélites e também de transposons como por exemplo em *D.melanogaster*. Nesta região, há uma menor densidade gênica e assim, os TEs apresentam menores chances de recombinação e podem causar menos danos ao hospedeiro o que favorece a sua sobrevivência (Dimitri & Junakovic, 1999). Nas regiões de eucromatina, por haver uma maior densidade gênica, o movimento de transposição dos elementos provoca um aumento no número de suas cópias e assim, aumentam-se as chances de recombinação genética e de efeitos deletérios dos mesmos no genoma hospedeiro (Dimitri & Junakovic, 1999). Acredita-se que os TEs estejam presentes em maior abundância nestas regiões de heterocromatina (Dimitri e cols., 2003; Junakovic e cols., 1998; Kidwell & Lisch, 1997) embora sejam mais degenerados e expressos a menores níveis do que os elementos presentes na eucromatina (Junakovic e cols., 1998) provavelmente devido a presença de cópias truncadas o que os tornaria inativos (DeMarco e cols., 2004). Sugere-se também que esta presença pode ser determinada pela interação entre a família do retrotransposon e o genoma hospedeiro. Tem-se observado que certos fatores do hospedeiro são necessários para a transposição os quais podem então influenciar no sucesso de uma colonização de um dado elemento numa determinada espécie (Miskey e cols., 2005). Podemos citar o elemento P de *Drosophila* que não é encontrado fora deste gênero, (Rio e cols., 1988). Além

disso, os TEs podem ter contribuído para a evolução da heterocromatina (Steinemann & Steinemann, 1997), nos processos de remodelamento através de deleções, inversões, ampliações (Dimitri e cols., 1997; Dorer & Henikoff, 1994) e esta reestruturação pode ter contribuído para a criação de variantes que promoveram a especiação e as divergências evolutivas.

Em alguns organismos como no genoma da *D. Melanogaster* os TEs parecem acumular tanto nas regiões de heterocromatina quanto nas de eucromatina com baixas taxas de recombinação (Bartolome e cols., 2002). O retrotransposon Penelope de *D. virilis* está presente na região de heterocromatina.

Em *S.mansoni*, os elementos de repetição W1 e W2 foram localizados nas regiões de heterocromatina do cromossomo sexual W (Hirai e cols., 1993) e um gene específico de fêmea também localizado na região de heterocromatina foi evidenciado por Jeremias e cols durante a sua dissertação de mestrado.

Uma vez que estes elementos de transposição estão presentes em grande número de cópias no genoma, esperávamos encontrá-los distribuídos em todos ou quase todos os cromossomos como já demonstrado para o retrotransposon Mariner (Reiter e cols.,1999). Assim, observamos sinais de hibridização em apenas dois cromossomos, sugerindo-se então que a presença estes elementos na fase evolutiva de esporocisto, estejam concentrados nestes dois cromossomos. Entretanto, não podemos descartar a possibilidade da não detecção de algumas cópias devido a rearranjos nos cromossomos durante a transição de esporocisto a verme adulto. As preparações contendo cromossomos metafásicos são obtidas na fase assexuada de esporocisto, mas, as técnicas atuais não disponibilizam condições para preparação de cromossomos metafásicos em outros estágios do ciclo de vida evolutivo principalmente na fase sexuada de vermes adultos.

Em alguns casos numa mesma lâmina contendo vários spreads, observou-se um sinal de hibridização em apenas um dos cromossomos como mostrado nas figuras 15,16,17A e B, 19A e B e 21, provavelmente devido a ineficiência nas condições de desnaturação. Assim, os cromossomos adotaram

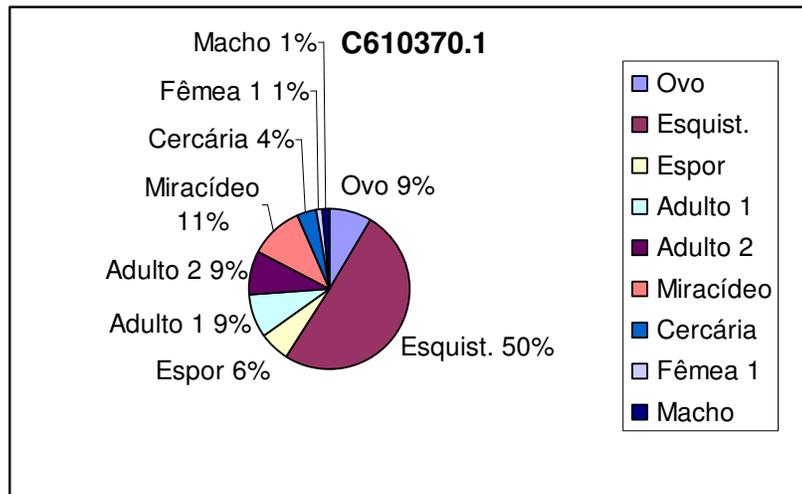
uma posição que impediu a interação da sonda de BAC clones ou do par de *primers*. Na tentativa de se aumentar a estringência da desnaturação, observamos uma perda na estrutura dos cromossomos, o que inviabilizou a técnica. O fato de ser ter encontrado sinais de hibridização em regiões de heterocromatina de apenas 2 cromossomos como mostrado nas figuras 17, 18C, 19C, 20 e 22 nos levou a vários questionamentos como por exemplo o impacto destes na biologia do parasito.

Com a análise das seqüências dos retrotransposons Boudicca (BK004066) e Perere (BK004067) no banco de dados da FAPESP (BlastN) observou-se que para o Perere, a grande maioria dos transcritos foram obtidos na fase evolutiva de esquistossômulo (50%), seguido de miracídeo (11%), ovo (9%), vermes adultos (9%) e esporocistos (6%) como mostrado na figura 24. Para o retrotransposon Boudicca, 45% das seqüências foram obtidas da fase evolutiva de esquistossômulo, seguido de cercária (22%), miracídeos (11%), vermes adultos e vermes machos (11%) como mostrado na figura 25.

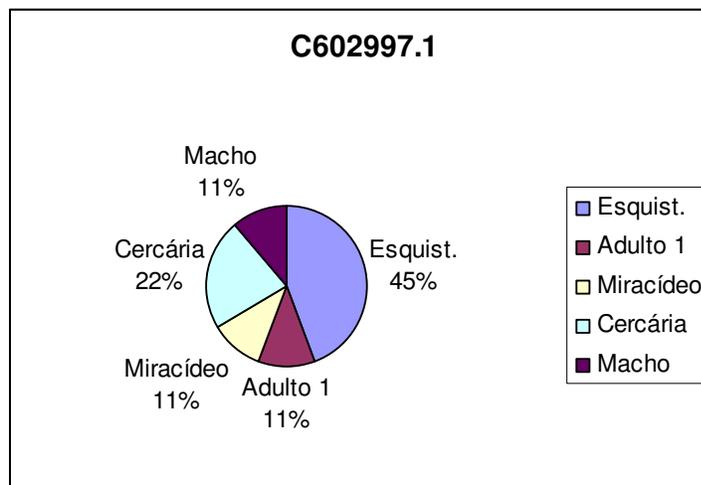
Diante dos resultados e das análises nos bancos de dados, sugerimos que a alta taxa de transcrição quando comparamos ESTs obtidas de esporocistos e esquistossômulos pode ser resultado de um remodelamento de cromatina durante essa transição de fase. Além disso, as ESTs detectadas em eporocistos podem ser resultados de algumas cópias destes retrotransposons na eucromatina.

Diante dos dados obtidos neste trabalho, sugerimos que há evidências de remodelamento de cromatina que são modificações que resultam em mudanças na sua funcionalidade, o que justificaria a forte presença destes elementos na fase de esquistossômulo. Provavelmente a função destes elementos nesta fase do ciclo de vida está associada com as modificações na morfologia do parasito bem como as adaptações do mesmo no meio em que se encontra. Sugere-se que a pequena presença destes elementos na fase de esporocisto possa ter ocorrido por um mecanismo de silenciamento gênico pelos RNAi e com isso o fato deles apresentarem baixa expressão ou a

presença de cópias truncadas na fase de esporocisto.



**Figura 24- Origem dos transcritos obtidos do retrotransposon Perere.**  
O SmAE C610370.1 apresentou alta similaridade para a seqüência completa do Perere e a origem destes transcritos podem ser observados no gráfico.



**Figura 25- Origem dos transcritos obtidos do retrotransposon Boudicca**  
O SmAE C602997.1 apresentou alta similaridade para a seqüência completa do Boudicca e a origem destes transcritos podem ser observados no gráfico.

A identificação, descoberta da função e a localização física destes retrotransposons no genoma do parasito *S.mansoni* é de grande importância para o seu estudo uma vez que poucos elementos foram identificados e não se tem conhecimento a respeito de suas funções e pouco se sabe da localização

física destes elementos. A localização física destes TEs pode nos fornecer pistas sobre o silenciamento de genes no genoma através dos mecanismos de silenciamento gênico e aumentar o conhecimento da dinâmica e biologia do seu genoma (DeMarco e cols., 2004).

## 6) CONCLUSÕES

- ✓ Com a utilização de duas técnicas de hibridização *in situ* FISH e PRINS, foi possível localizar o retrotransposon Perere na região de heterocromatina do par de cromossomos homólogos 2 e o retrotransposon Boudicca na região de heterocromatina dos cromossomos 2 e Z no genoma do *S.mansoni*.
- ✓ As análises dos nossos dados e de fulano sugerem que ocorreu remodelamento de cromatina na fase adulta.

## **7) PERSPECTIVAS**

- ✓ Identificação de genes *em tandem* aos retrotransposons por análises de bioinformática;
  
- ✓ Localização de outros retrotransposons no genoma do *S.mansoni*. Como por exemplo, o retrotransposon Saci-1 que esta presente em baixo número de cópias mas apresenta um alto nível de expressão.

## 8) ENDEREÇOS ELETRÔNICOS

<http://www.who.int/ctd/schisto/epidemiology.htm>

<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/sma1/>

[http://www.sanger.ac.uk/Projects/S\\_mansoni/](http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_mansoni/)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

<http://www.genedb.org/genedb/smansoni/blast.jsp>

<http://verjo18.iq.usp.br/schisto/>

**9) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## Referências Bibliográficas

Anonymous(2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*

1. *Nature* **408**, 796-815.

ADAMS M.D., CELNIKER S.E., HOLT R.A., EVANS C.A., GOCAYNE J.D., AMANATIDES P.G., SCHERER S.E., LI P.W., HOSKINS R.A., GALLE R.F., GEORGE R.A., LEWIS S.E., RICHARDS S., ASHBURNER M., HENDERSON S.N., SUTTON G.G., WORTMAN J.R., YANDELL M.D., ZHANG Q., CHEN L.X., BRANDON R.C., ROGERS Y.H., BLAZEJ R.G., CHAMPE M., PFEIFFER B.D., WAN K.H., DOYLE C., BAXTER E.G., HELT G., NELSON C.R., GABOR G.L., ABRIL J.F., AGBAYANI A., AN H.J., NDREWS-PFANNKOCH C., BALDWIN D., BALLEW R.M., BASU A., BAXENDALE J., BAYRAKTAROGLU L., BEASLEY E.M., BEESON K.Y., BENOS P.V., BERMAN B.P., BHANDARI D., BOLSHAKOV S., BORKOVA D., BOTCHAN M.R., BOUCK J., BROKSTEIN P., BROTTIER P., BURTIS K.C., BUSAM D.A., BUTLER H., CADIEU E., CENTER A., CHANDRA I., CHERRY J.M., CAWLEY S., DAHLKE C., DAVENPORT L.B., DAVIES P., DE P.B., DELCHER A., DENG Z., MAYS A.D., DEW I., DIETZ S.M., DODSON K., DOUP L.E., DOWNES M., DUGAN-ROCHA S., DUNKOV B.C., DUNN P., DURBIN K.J., EVANGELISTA C.C., FERRAZ C., FERRIERA S., FLEISCHMANN W., FOSLER C., GABRIELIAN A.E., GARG N.S., GELBART W.M., GLASSER K., GLODEK A., GONG F., GORRELL J.H., GU Z., GUAN P., HARRIS M., HARRIS N.L., HARVEY D., HEIMAN T.J., HERNANDEZ J.R., HOUCK J., HOSTIN D., HOUSTON K.A., HOWLAND T.J., WEI M.H., IBEGWAM C., JALALI M., KALUSH F., KARPEN G.H., KE Z., KENNISON J.A., KETCHUM K.A., KIMMEL B.E., KODIRA C.D., KRAFT C., KRAVITZ S., KULP D., LAI Z., LASKO P., LEI Y., LEVITSKY A.A., LI J., LI Z., LIANG Y., LIN X., LIU X., MATTEI B., MCINTOSH T.C., MCLEOD M.P., MCPHERSON D., MERKULOV G., MILSHINA N.V., MOBARRY C., MORRIS J., MOSHREFI A., MOUNT S.M., MOY M., MURPHY B., MURPHY L., MUZNY D.M., NELSON D.L., NELSON D.R., NELSON K.A., NIXON K., NUSSKERN D.R., PACLEB J.M., PALAZZOLO M., PITTMAN G.S., PAN S., POLLARD J., PURI V., REESE M.G., REINERT K., REMINGTON K., SAUNDERS R.D., SCHEELER F., SHEN H., SHUE B.C., SIDEN-KIAMOS I., SIMPSON M., SKUPSKI M.P., SMITH T., SPIER E., SPRADLING A.C., STAPLETON M., STRONG R., SUN E., SVIRSKAS R., TECTOR C., TURNER R., VENTER E., WANG A.H., WANG X., WANG Z.Y., WASSARMAN D.A., WEINSTOCK G.M., WEISSENBACH J., WILLIAMS S.M., WOODAGET, WORLEY K.C., WU D., YANG S., YAO Q.A., YE J., YEH R.F., ZAVERI J.S., ZHAN M., ZHANG G., ZHAO Q., ZHENG L., ZHENG X.H., ZHONG F.N., ZHONG W., ZHOU X., ZHU S., ZHU X., SMITH H.O., GIBBS R.A., MYERS E.W., RUBIN G.M. & VENTER J.C. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*

2. *Science* **287**, 2185-2195.

- ARNAULT C. & DUFOURNEL I. (1994) Genome and stresses: reactions against aggressions, behavior of transposable elements. *Genetica* **93**, 149-160.
- BARTOLOME C., MASIDE X. & CHARLESWORTH B. (2002) On the abundance and distribution of transposable elements in the genome of *Drosophila melanogaster*  
2. *Mol.Biol.Evol.* **19**, 926-937.
- BATZER M.A. & DEININGER P.L. (2002) Alu repeats and human genomic diversity  
3. *Nat.Rev.Genet.* **3**, 370-379.
- BIESSMANN H., WALTER M.F. & MASON J.M. (1997) *Drosophila* telomere elongation  
3. *Ciba Found.Symp.* **211**, 53-67.
- BINGHAM P.M., KIDWELL M.G. & RUBIN G.M. (1982) The molecular basis of P-M hybrid dysgenesis: the role of the P element, a P-strain-specific transposon family  
1. *Cell* **29**, 995-1004.
- BRANDES A., HESLOP-HARRISON J.S., KAMM A., KUBIS S., DOUDRICK R.L. & SCHMIDT T. (1997) Comparative analysis of the chromosomal and genomic organization of Ty1-copia-like retrotransposons in pteridophytes, gymnosperms and angiosperms  
25. *Plant Mol.Biol.* **33**, 11-21.
- BRINDLEY P.J., LAHA T., MCMANUS D.P. & LOUKAS A. (2003) Mobile genetic elements colonizing the genomes of metazoan parasites. *Trends Parasitol.* **19**, 79-87.
- CAPY P., GASPERI G., BIEMONT C. & BAZIN C. (2000) Stress and transposable elements: co-evolution or useful parasites?  
2. *Heredity* **85 ( Pt 2)**, 101-106.
- CHARLESWORTH B. (1988) The maintenance of transposable elements in natural populations  
4. *Basic Life Sci.* **47**, 189-212.
- CHARLESWORTH B., SNIEGOWSKI P. & STEPHAN W. (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes  
1. *Nature* **371**, 215-220.
- CHITSULO L., ENGELS D., MONTRESOR A. & SAVIOLI L. (2000) The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop.* **77**, 41-51.
- CLEGG M.T. & DURBIN M.L. (2000) Flower color variation: A model for the experimental study of evolution  
1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 7016-7023.

- COPELAND C.S., BRINDLEY P.J., HEYERS O., MICHAEL S.F., JOHNSTON D.A., WILLIAMS D.L., IVENS A.C. & KALINNA B.H. (2003) Boudicca, a retrovirus-like long terminal repeat retrotransposon from the genome of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *J.Virol.* **77**, 6153-6166.
- COPELAND C.S., HEYERS O., KALINNA B.H., BACHMAIR A., STADLER P.F., HOFACKER I.L. & BRINDLEY P.J. (2004) Structural and evolutionary analysis of the transcribed sequence of Boudicca, a *Schistosoma mansoni* retrotransposon. *Gene* **329**, 103-114.
- COPELAND C.S., MANN V.H., MORALES M.E., KALINNA B.H. & BRINDLEY P.J. (2005) The Sinbad retrotransposon from the genome of the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*, and the distribution of related Pao-like elements 1. *BMC.Evol.Biol.* **5**, 20
- DASILVA C., HADJI H., OZOUF-COSTAZ C., NICAUD S., JAILLON O., WEISSENBACH J. & CROLLIUS H.R. (2002) Remarkable compartmentalization of transposable elements and pseudogenes in the heterochromatin of the *Tetraodon nigroviridis* genome 1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**, 13636-13641.
- DE SOUZA S.J., CAMARGO A.A., BRIONES M.R., COSTA F.F., NAGAI M.A., VERJOVSKI-ALMEIDA S., ZAGO M.A., ANDRADE L.E., CARRER H., EL-DORRY H.F., ESPREAFICO E.M., HABR-GAMA A., GIANNELLA-NETO D., GOLDMAN G.H., GRUBER A., HACKEL C., KIMURA E.T., MACIEL R.M., MARIE S.K., MARTINS E.A., NOBREGA M.P., PACO-LARSON M.L., PARDINI M.I., PEREIRA G.G., PESQUERO J.B., RODRIGUES V., ROGATTO S.R., DA S., I, SOGAYAR M.C., DE FATIMA S.M., TAJARA E.H., VALENTINI S.R., ACENCIO M., ALBERTO F.L., AMARAL M.E., ANEAS I., BENGTON M.H., CARRARO D.M., CARVALHO A.F., CARVALHO L.H., CERUTTI J.M., CORREA M.L., COSTA M.C., CURCIO C., GUSHIKEN T., HO P.L., KIMURA E., LEITE L.C., MAIA G., MAJUMDER P., MARINS M., MATSUKUMA A., MELO A.S., MESTRINER C.A., MIRACCA E.C., MIRANDA D.C., NASCIMENTO A.N., NOBREGA F.G., OJOPI E.P., PANDOLFI J.R., PESSOA L.G., RAHAL P., RAINHO C.A., DA R.N., DE SA R.G., SALES M.M., DA SILVA N.P., SILVA T.C., DA S.W., Jr., SIMAO D.F., SOUSA J.F., STECCONI D., TSUKUMO F., VALENTE V., ZALCBEG H., BRENTANI R.R., REIS F.L., AS-NETO E. & SIMPSON A.J. (2000) Identification of human chromosome 22 transcribed sequences with ORF expressed sequence tags. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 12690-12693.
- DEMARCO R., KOWALTOWSKI A.T., MACHADO A.A., SOARES M.B., GARGIONI C., KAWANO T., RODRIGUES V., MADEIRA A.M., WILSON R.A., MENCK C.F., SETUBAL J.C., AS-NETO E., LEITE L.C. & VERJOVSKI-ALMEIDA S. (2004) Saci-1, -2, and -3 and Perere, four novel retrotransposons with high transcriptional activities from the human parasite *Schistosoma mansoni*. *J.Virol.* **78**, 2967-2978.

- DI F.C., TERRINONI A., DIMITRI P. & JUNAKOVIC N. (1997) Intragenomic distribution and stability of transposable elements in euchromatin and heterochromatin of *Drosophila melanogaster*: elements with inverted repeats Bari 1, hobo, and pogo  
1. *J.Mol.Evol.* **45**, 247-252.
- DIMITRI P., ARCA B., BERGHELLA L. & MEI E. (1997) High genetic instability of heterochromatin after transposition of the LINE-like I factor in *Drosophila melanogaster*  
3. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 8052-8057.
- DIMITRI P. & JUNAKOVIC N. (1999) Revising the selfish DNA hypothesis: new evidence on accumulation of transposable elements in heterochromatin  
1. *Trends Genet.* **15**, 123-124.
- DIMITRI P., JUNAKOVIC N. & ARCA B. (2003) Colonization of heterochromatic genes by transposable elements in *Drosophila*  
1. *Mol.Biol.Evol.* **20**, 503-512.
- DORER D.R. & HENIKOFF S. (1994) Expansions of transgene repeats cause heterochromatin formation and gene silencing in *Drosophila*  
1. *Cell* **77**, 993-1002.
- DREW A.C. & BRINDLEY P.J. (1997) A retrotransposon of the non-long terminal repeat class from the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. Similarities to the chicken-repeat-1-like elements of vertebrates  
2. *Mol.Biol.Evol.* **14**, 602-610.
- DREW A.C., MINCHELLA D.J., KING L.T., ROLLINSON D. & BRINDLEY P.J. (1999) SR2 elements, non-long terminal repeat retrotransposons of the RTE-1 lineage from the human blood fluke *Schistosoma mansoni*  
1. *Mol.Biol.Evol.* **16**, 1256-1269.
- EICKBUSH T.H. (1992) Transposing without ends: the non-LTR retrotransposable elements  
2. *New Biol.* **4**, 430-440.
- EMMONS S.W., YESNER L., RUAN K.S. & KATZENBERG D. (1983) Evidence for a transposon in *Caenorhabditis elegans*  
1. *Cell* **32**, 55-65.
- FINNEGAN D.J. (1997) Transposable elements: how non-LTR retrotransposons do it  
2. *Curr.Biol.* **7**, R245-R248
- FOSTER J.M. & JOHNSTON D.A. (2002) Helminth genomics: from gene discovery to genome sequencing. *Trends Parasitol.* **18**, 241-242.

- FRANCO G.R., VALADAO A.F., AZEVEDO V. & RABELO E.M. (2000) The Schistosoma gene discovery program: state of the art. *Int.J.Parasitol.* **30**, 453-463.
- FREEMAN J.L. & RAYBURN A.L. (2005) Localization of repetitive DNA sequences on in vitro *Xenopus laevis* chromosomes by primed in situ labeling (PRINS) 3. *J.Hered.* **96**, 603-606.
- GANKO E.W., BHATTACHARJEE V., SCHLIEKELMAN P. & MCDONALD J.F. (2003) Evidence for the contribution of LTR retrotransposons to *C. elegans* gene evolution  
1. *Mol.Biol.Evol.* **20**, 1925-1931.
- GASIOR S.L., WAKEMAN T.P., XU B. & DEININGER P.L. (2006) The human LINE-1 retrotransposon creates DNA double-strand breaks  
4. *J.Mol.Biol.* **357**, 1383-1393.
- HIRAI H. & LOVERDE P.T. (1995) FISH techniques for constructing physical maps on schistosome chromosomes  
2. *Parasitol.Today* **11**, 310-314.
- HIRAI H., TANAKA M. & LOVERDE P.T. (1993) *Schistosoma mansoni*: chromosomal localization of female-specific genes and a female-specific DNA element  
1. *Exp.Parasitol.* **76**, 175-181.
- HOFFMANN K.F. & DUNNE D.W. (2003) Characterization of the *Schistosoma* transcriptome opens up the world of helminth genomics. *Genome Biol.* **5**, 203
- HU W., BRINDLEY P.J., MCMANUS D.P., FENG Z. & HAN Z.G. (2004) Schistosome transcriptomes: new insights into the parasite and schistosomiasis. *Trends Mol.Med.* **10**, 217-225.
- ISMAIL M., BOTROS S., METWALLY A., WILLIAM S., FARGHALLY A., TAO L.F., DAY T.A. & BENNETT J.L. (1999) Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from Egyptian villagers. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* **60**, 932-935.
- IWASHITA S., OSADA N., ITOH T., SEZAKI M., OSHIMA K., HASHIMOTO E., KITAGAWA-ARITA Y., TAKAHASHI I., MASUI T., HASHIMOTO K. & MAKALOWSKI W. (2003) A transposable element-mediated gene divergence that directly produces a novel type bovine Bcmt protein including the endonuclease domain of RTE-1  
1. *Mol.Biol.Evol.* **20**, 1556-1563.
- JACOBSON J.W., MEDHORA M.M. & HARTL D.L. (1986) Molecular structure of a somatically unstable transposable element in *Drosophila*  
1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **83**, 8684-8688.

- JIANG Y.W. (2002) Transcriptional cosuppression of yeast Ty1 retrotransposons  
4. *Genes Dev.* **16**, 467-478.
- JUNAKOVIC N., TERRINONI A., DI F.C., VIEIRA C. & LOEVENBRUCK C. (1998) Accumulation of transposable elements in the heterochromatin and on the Y chromosome of *Drosophila simulans* and *Drosophila melanogaster*  
1. *J.Mol.Evol.* **46**, 661-668.
- KAPITONOV V.V. & JURKA J. (1999) The long terminal repeat of an endogenous retrovirus induces alternative splicing and encodes an additional carboxy-terminal sequence in the human leptin receptor  
6. *J.Mol.Evol.* **48**, 248-251.
- KARPEN G.H. & ALLSHIRE R.C. (1997) The case for epigenetic effects on centromere identity and function  
1. *Trends Genet.* **13**, 489-496.
- KAZAZIAN H.H., Jr. (2004) Mobile elements: drivers of genome evolution  
2. *Science* **303**, 1626-1632.
- KAZAZIAN H.H., Jr. (1998) Mobile elements and disease. *Curr.Opin.Genet.Dev.* **8**, 343-350.
- KIDWELL M.G. & LISCH D. (1997) Transposable elements as sources of variation in animals and plants  
1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 7704-7711.
- KLOETZEL K. (1989) Schistosomiasis in Brazil: Does social development suffice?  
*Parasitol.Today* **5**, 388-391.
- LAHA T., BRINDLEY P.J., VERITY C.K., MCMANUS D.P. & LOUKAS A. (2002) pido, a non-long terminal repeat retrotransposon of the chicken repeat 1 family from the genome of the Oriental blood fluke, *Schistosoma japonicum*  
2. *Gene* **284**, 149-159.
- LAHA T., KEWGRAI N., LOUKAS A. & BRINDLEY P.J. (2005) Characterization of SR3 reveals abundance of non-LTR retrotransposons of the RTE clade in the genome of the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*  
1. *BMC.Genomics* **6**, 154
- LAHA T., LOUKAS A., SMYTH D.J., COPELAND C.S. & BRINDLEY P.J. (2004) The fugitive LTR retrotransposon from the genome of the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*  
1. *Int.J.Parasitol.* **34**, 1365-1375.
- LAHA T., LOUKAS A., VERITY C.K., MCMANUS D.P. & BRINDLEY P.J. (2001) Gulliver, a long terminal repeat retrotransposon from the genome of the oriental blood fluke *Schistosoma japonicum*  
1. *Gene* **264**, 59-68.

- LAHA T., MCMANUS D.P., LOUKAS A. & BRINDLEY P.J. (2000) Sjalpha elements, short interspersed element-like retroposons bearing a hammerhead ribozyme motif from the genome of the oriental blood fluke *Schistosoma japonicum*  
1. *Biochim.Biophys.Acta* **1492**, 477-482.
- LANDER E.S., LINTON L.M., BIRREN B., NUSBAUM C., ZODY M.C., BALDWIN J., DEVON K., DEWAR K., DOYLE M., FITZHUGH W., FUNKE R., GAGE D., HARRIS K., HEAFORD A., HOWLAND J., KANN L., LEHOCZKY J., LEVINE R., MCEWAN P., MCKERNAN K., MELDRIM J., MESIROV J.P., MIRANDA C., MORRIS W., NAYLOR J., RAYMOND C., ROSETTI M., SANTOS R., SHERIDAN A., SOUGNEZ C., STANGE-THOMANN N., STOJANOVIC N., SUBRAMANIAN A., WYMAN D., ROGERS J., SULSTON J., AINSCOUGH R., BECK S., BENTLEY D., BURTON J., CLEE C., CARTER N., COULSON A., DEADMAN R., DELOUKAS P., DUNHAM A., DUNHAM I., DURBIN R., FRENCH L., GRAFHAM D., GREGORY S., HUBBARD T., HUMPHRAY S., HUNT A., JONES M., LLOYD C., MCMURRAY A., MATTHEWS L., MERCER S., MILNE S., MULLIKIN J.C., MUNGALL A., PLUMB R., ROSS M., SHOWNKEEN R., SIMS S., WATERSTON R.H., WILSON R.K., HILLIER L.W., MCPHERSON J.D., MARRA M.A., MARDIS E.R., FULTON L.A., CHINWALLA A.T., PEPIN K.H., GISH W.R., CHISSOE S.L., WENDL M.C., DELEHAUNTY K.D., MINER T.L., DELEHAUNTY A., KRAMER J.B., COOK L.L., FULTON R.S., JOHNSON D.L., MINX P.J., CLIFTON S.W., HAWKINS T., BRANSCOMB E., PREDKI P., RICHARDSON P., WENNING S., SLEZAK T., DOGGETT N., CHENG J.F., OLSEN A., LUCAS S., ELKIN C., UBERBACHER E., FRAZIER M., GIBBS R.A., MUZNY D.M., SCHERER S.E., BOUCK J.B., SODERGREN E.J., WORLEY K.C., RIVES C.M., GORRELL J.H., METZKER M.L., NAYLOR S.L., KUCHERLAPATI R.S., NELSON D.L., WEINSTOCK G.M., SAKAKI Y., FUJIYAMA A., HATTORI M., YADA T., TOYODA A., ITOH T., KAWAGOE C., WATANABE H., TOTOKI Y., TAYLOR T., WEISSENBACH J., HEILIG R., SAURIN W., ARTIGUENAVE F., BROTTIER P., BRULS T., PELLETIER E., ROBERT C., WINCKER P., SMITH D.R., DOUCETTE-STAMM L., RUBENFIELD M., WEINSTOCK K., LEE H.M., DUBOIS J., ROSENTHAL A., PLATZER M., NYAKATURA G., TAUDIEN S., RUMP A., YANG H., YU J., WANG J., HUANG G., GU J., HOOD L., ROWEN L., MADAN A., QIN S., DAVIS R.W., FEDERSPIEL N.A., ABOLA A.P., PROCTOR M.J., MYERS R.M., SCHMUTZ J., DICKSON M., GRIMWOOD J., COX D.R., OLSON M.V., KAUL R., RAYMOND C., SHIMIZU N., KAWASAKI K., MINOSHIMA S., EVANS G.A., ATHANASIOU M., SCHULTZ R., ROE B.A., CHEN F., PAN H., RAMSER J., LEHRACH H., REINHARDT R., MCCOMBIE W.R., DE LA B.M., DEDHIA N., BLOCKER H., HORNISCHER K., NORDSIEK G., AGARWALA R., ARAVIND L., BAILEY J.A., BATEMAN A., BATZOGLOU S., BIRNEY E., BORK P., BROWN D.G., BURGE C.B., CERUTTI L., CHEN H.C., CHURCH D., CLAMP M., COPLEY R.R., DOERKS T., EDDY S.R., EICHLER E.E., FUREY T.S., GALAGAN J.,

- GILBERT J.G., HARMON C., HAYASHIZAKI Y., HAUSSLER D., HERMJAKOB H., HOKAMP K., JANG W., JOHNSON L.S., JONES T.A., KASIF S., KASPRYZK A., KENNEDY S., KENT W.J., KITTS P., KOONIN E.V., KORF I., KULP D., LANCET D., LOWE T.M., MCLYSAGHT A., MIKKELSEN T., MORAN J.V., MULDER N., POLLARA V.J., PONTING C.P., SCHULER G., SCHULTZ J., SLATER G., SMIT A.F., STUPKA E., SZUSTAKOWSKI J., THIERRY-MIEG D., THIERRY-MIEG J., WAGNER L., WALLIS J., WHEELER R., WILLIAMS A., WOLF Y.I., WOLFE K.H., YANG S.P., YEH R.F., COLLINS F., GUYER M.S., PETERSON J., FELSENFELD A., WETTERSTRAND K.A., PATRINOS A., MORGAN M.J., DE J.P., CATANESE J.J., OSOEGAWA K., SHIZUYA H., CHOI S. & CHEN Y.J. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome  
2. *Nature* **409**, 860-921.
- LANGLEY C.H., MONTGOMERY E., HUDSON R., KAPLAN N. & CHARLESWORTH B. (1988) On the role of unequal exchange in the containment of transposable element copy number  
1. *Genet.Res.* **52**, 223-235.
- LE PASLIER M.C., PIERCE R.J., MERLIN F., HIRAI H., WU W., WILLIAMS D.L., JOHNSTON D., LOVERDE P.T. & LE P.D. (2000) Construction and characterization of a *Schistosoma mansoni* bacterial artificial chromosome library. *Genomics* **65**, 87-94.
- LE R.A. & DECELIERE G. (2005) Models of the population genetics of transposable elements  
1. *Genet.Res.* **85**, 171-181.
- LONG A.D., LYMAN R.F., MORGAN A.H., LANGLEY C.H. & MACKAY T.F. (2000) Both naturally occurring insertions of transposable elements and intermediate frequency polymorphisms at the achaete-scute complex are associated with variation in bristle number in *Drosophila melanogaster*  
1. *Genetics* **154**, 1255-1269.
- LUAN D.D., KORMAN M.H., JAKUBCZAK J.L. & EICKBUSH T.H. (1993) Reverse transcription of R2Bm RNA is primed by a nick at the chromosomal target site: a mechanism for non-LTR retrotransposition  
9. *Cell* **72**, 595-605.
- MAKALOWSKI W. (2003) Genomics. Not junk after all  
4. *Science* **300**, 1246-1247.
- MCFADDEN J. & KNOWLES G. (1997) Escape from evolutionary stasis by transposon-mediated deleterious mutations  
1. *J.Theor.Biol.* **186**, 441-447.

- MISKEY C., IZSVAK Z., KAWAKAMI K. & IVICS Z. (2005) DNA transposons in vertebrate functional genomics  
1. *Cell Mol.Life Sci.* **62**, 629-641.
- PETROV D.A., SANGSTER T.A., JOHNSTON J.S., HARTL D.L. & SHAW K.L. (2000) Evidence for DNA loss as a determinant of genome size  
1. *Science* **287**, 1060-1062.
- RIO D.C., BARNES G., LASKI F.A., RINE J. & RUBIN G.M. (1988) Evidence for Drosophila P element transposase activity in mammalian cells and yeast  
3. *J.Mol.Biol.* **200**, 411-415.
- SHIZUYA H., BIRREN B., KIM U.J., MANCINO V., SLEPAK T., TACHIIRI Y. & SIMON M. (1992) Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in Escherichia coli using an F-factor-based vector. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**, 8794-8797.
- SHORT R.B. & MENZEL M.Y. (1960) Chromosomes of nine species of schistosomes  
1. *J.Parasitol.* **46**, 273-287.
- SHORT R.B., MENZEL M.Y. & PATHAK S. (1979) Somatic chromosomes of Schistosoma mansoni  
1. *J.Parasitol.* **65**, 471-473.
- SIMPSON A.J., SHER A. & MCCUTCHAN T.F. (1982) The genome of Schistosoma mansoni: isolation of DNA, its size, bases and repetitive sequences  
1. *Mol.Biochem.Parasitol.* **6**, 125-137.
- STADECKER M.J. (1992) The role of T-cell anergy in the immunomodulation of schistosomiasis. *Parasitol.Today* **8**, 199-204.
- STEINEMANN M. & STEINEMANN S. (1997) The enigma of Y chromosome degeneration: TRAM, a novel retrotransposon is preferentially located on the Neo-Y chromosome of Drosophila miranda  
1. *Genetics* **145**, 261-266.
- TANAKA M., HIRAI H., LOVERDE P.T., NAGAFUCHI S., FRANCO G.R., SIMPSON A.J. & PENA S.D. (1995) Yeast artificial chromosome (YAC)-based genome mapping of Schistosoma mansoni. *Mol.Biochem.Parasitol.* **69**, 41-51.
- 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., ASHTON P.D., BONALDO M.F., COULSON P.S., DILLON G.P., FARIAS L.P., GREGORIO S.P., HO P.L., LEITE R.A., MALAQUIAS L.C., MARQUES R.C., MIYASATO P.A., NASCIMENTO A.L., OHLWEILER F.P., REIS E.M., RIBEIRO M.A., SA R.G., STUKART G.C., SOARES M.B., GARGIONI C., KAWANO T., RODRIGUES V., MADEIRA A.M., WILSON R.A., MENCK C.F., SETUBAL

J.C., LEITE L.C. & AS-NETO E. (2003) Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*  
2. *Nat.Genet.* **35**, 148-157.

VERJOVSKI-ALMEIDA S., LEITE L.C., AS-NETO E., MENCK C.F. & WILSON R.A. (2004) Schistosome transcriptome: insights and perspectives for functional genomics  
3. *Trends Parasitol.* **20**, 304-308.

# Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)