

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

GIULLIANA TESSARIN E ALMEIDA

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

SÃO PAULO

Data do Depósito na SPG: 30/06/2010

GIULLIANA TESSARIN E ALMEIDA

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

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

Área de Concentração: Bioquímica

Orientador: Sergio Verjovski-Almeida

SÃO PAULO

2010

Giulliana Tessarin e Almeida

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

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

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

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

Agradecimentos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

A FAPESP, por ter financiado o meu doutorado e conseqüentemente viabilizado esta tese.

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

John Piper

Resumo

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

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

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

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

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

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

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

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

Abstract

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

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

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

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

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

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

