



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

Localização Física do BAC Clone AL 619337 no Genoma de *Schistosoma mansoni* Utilizando a Técnica de FISH (*Fluorescence in situ Hybridization*)

AUTOR: WANDER DE JESUS JEREMIAS

ORIENTADOR: PROF. DR ÉLIO HIDEO BABÁ

CO-ORIENTADOR: PROF. DR GUILHERME CORRÊA OLIVEIRA

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, maio de 2004

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

OMS - Organização Mundial de Saúde

CAPES - Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

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

UFOP - Universidade Federal de Ouro Preto

*Dedico esse trabalho à minha amada
Marilza, aos meus Pais e minha Avó,
Irmã, Familiares e a Todos os meus
Amigos e Amigas.*

Agradecimentos

Agradeço a Deus, por ter me concedido a dádiva de viver sendo um homem, e por poder, racionalmente, modificar o que me cerca em favor do bem comum.

Ao Mestre, Prof. Dr. Élio Hideo Babá, por ter me oferecido a oportunidade e o privilégio de conviver e trabalhar com ele. E, sobretudo, por ser um exemplo de vida e de dedicação ao trabalho, à família e aos amigos.

A minha amada Marilza, que sempre esteve comigo e acreditou em mim, mesmo nos momentos em que nem eu mesmo acreditei. Por sua paciência, confiança e compreensão nos momentos de ausência em momentos importantes de nossa vida.

Aos Meus queridos Pais, à minha "Vó Sinoca" e minha "Tia Nena", "Tia Nem" e Djalma, Victor, Hélder, Edgar e todas meus familiares que sempre me deram o apoio e o carinho necessário e por acreditarem em minhas lutas e compreenderem minha ausência em momentos importantes.

A minha amada Vá, por estar sempre presente em minha vida e confiar em mim. Pelo seu imenso carinho e pela atenção a mim devotada.

Aos meus grandes Amigos e Amigas Adelma, Adriana, Alessandro, Alex, Daniel, Daniely, Giovanni, Helimar, Jaime, Júlio, Kilder, Leliane, Lucas, Luís, Marcelo, Márcia, Roseany, Semir, Silvânia, Simone e Wauilliam, pela sincera amizade e pela constante presença em minha vida.

A toda a família de Marilza, em especial a "Vó Inhá" e ao "Vô Antônio" pelo carinhoso acolhimento, pelo respeito e pela confiança.

A todos do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular: Amanda, Ângela, Ângelo, Carla, Cássio Barros, Júlio, Keila, Levindo, Maísa, Matheus e Nancy, pela amizade, pela saudável convivência e companheirismo. Agradeço, em especial, a querida e estimada Profa Dra Maria Lúcia pelo privilégio da convivência, pelo carinho quase maternal e por todo conhecimento a mim transmitido. Ao Prof Dr Elísio pela saudável convivência, pelo respeito, pelo conhecimento a mim transmitido e por proporcionar momentos de descontração e alegria com seus maravilhosos "causos". A querida Regina, pelo privilégio da respeitosa e alegre convivência, pela

*sincera e fraterna amizade, por todos os conhecimentos a mim transmitidos, pelo constante apoio e por todos os conselhos que me ofereceu. A **Profa Dra Renata**, recém chegada, mas já estimada, pelo apoio, pelo respeito, pelo conhecimento a mim transmitido e pela colaboração direta. Ao nosso Técnico Laboratorial **Ezequiel**, pelo suporte técnico durante a realização do trabalho, pela alegre e respeitosa convivência e pela grande amizade. A **Juliana** pela participação ativa na realização do trabalho, pela constante presença e pela sincera e grande amizade. A **Helaine** pela carinhosa convivência, pela sincera amizade e consideração e pelo belo exemplo de luta e perseverança. A **Claúdia** pelo apoio na fase inicial do trabalho, pela sincera amizade e pela saudável convivência. Ao **Gustavo** pela grande amizade, pela alegre e saudável convivência.*

*Aos meus estimados professores do NUPEB, **Prof. Dr. Luís Carlos**, **Prof. Dr. Ieso Miranda**, **Prof. Dr. Milton Hércules**, **Prof. Dr. Deoclécio Chianca**, **Profa. Dra. Cláudia**, **Profa. Dra. Teresinha**, **Profa. Dra. Marta**, **Prof. Dr Marcelo**, **Profa. Dra. Raquel**, **Profa. Dra. Simone** pela saudável convivência, pela receptividade em seus respectivos Laboratórios, contribuindo assim para a realização deste trabalho e por todo conhecimento a mim transmitido seja em atividades didáticas, de pesquisa ou mesmo em conversas informais.*

*Á querida e estimada Secretária "**Super Cida**" pela sua notável dedicação e pela carinhosa atenção devotada a todos que em algum instante necessitam de seus préstimos.*

*A todos do **Laboratório de Biofísica**, pela harmoniosa convivência, em especial ao **Marcelo**, pela sincera amizade e companheirismo desde nossa graduação.*

*A todos do **Laboratório de Biologia Celular e Molecular**, em especial ao **Luciano** e a **Juliana Fieto** e ao "**Totola**" pelos conhecimentos a mim transmitidos e pelo apoio direto na realização deste trabalho. A **Maristela** pela sincera amizade e convivência. A **Ana**, **Kátia**, **Lys**, **Pilar**, **Thiago**, **Zezé** e todos os demais pela saudável convivência.*

*A todos do **Laboratório de Imuno Parasitologia**, em especial **Cássio**, **Daniel**, **Juceani**, **Leandro**, **Márcia** e **Roberta** pela harmoniosa e saudável convivência e pela grande amizade.*

*A todos dos **Laboratórios de Parasitologia** e de **Patologia**, em especial **Helen**, **Maria Chaves Ramiro**, **Vítor** e **Wanja**, pela saudável e harmoniosa convivência.*

A todos do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, especialmente, Arlete, Daniele, Eduardo e Graça, pela harmoniosa convivência e amizade.

Aos amigos ex-alunos do NUPEB Flávio, Olavo, Marcos, Paulo, Ricardo, Helder e Renata pela alegre convivência e saudosa amizade.

Aos meus amigos e colegas do mestrado Alessandra, Ana Paula, Daniele, Eduardo, Marília, Michele, Hebert, Laura, Leonardo, Luiza, Marcos, Regina e Tatiani pelo companheirismo, pela amizade e pela saudosa convivência.

Ao Prof. Dr. Guilherme Corrêa pelo constante apoio, pelo suporte técnico e financeiro e por me oferecer, juntamente como o Babá, a oportunidade de realizar este trabalho. A todos do Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular CPqRR/FIOCRUZ-BH, em especial a Diana e Nilton pelo suporte técnico necessário à realização do trabalho, a Fernanda, Lívia, Mariana e Silvane pela saudável convivência.

A todos do Laboratório de Esquistossomoses GIDE/UFMG, especialmente à Profa Dra Débora, Cíntia e Raquel pela inestimável colaboração e pelo apoio nos primeiros procedimentos em busca de esporocistos secundários para realização do trabalho.

*Ao Dr Omar do Laboratório de Malacologia do CPqRR/FIOCRUZ-BH por gentilmente fornecer os caramujos infectados, tão importantes para a realização deste trabalho. A Dra Liana, a Déuza e Sueleny responsáveis pela manutenção do ciclo intramolusco do *S. mansoni*, pela atenção e presteza ao me receber e preparar os exemplares de caramujos e pelas valiosas informações a mim transmitidas.*

Ao Dr Paulo Pimenta por me auxiliar com informações importantes relacionadas à microscopia de fluorescência e confocal, além de gentilmente me receber em seu laboratório e permitir a realização da captura das imagens utilizando seu equipamento e pela amizade. E a todos do Laboratório de Entomologia Médica CPqRR/FIOCRUZ-BH, em especial a Dra Nágila pela atenção, pelo suporte a mim oferecido e pela amizade. A Taciana, Márcio e Rafael por me fornecerem as informações e o conhecimento da prática com microscopia e pela amizade. A Diane, Érica, Fabíola, Marlene, Monique e Tatiana pela saudável convivência e amizade.

Sou eternamente grato a todas as pessoas que mesmo em sua mais breve passagem ou curta convivência me ofereceram sua contribuição, de qualquer natureza, para a realização deste trabalho.

Índice

| | Página |
|---|------------|
| Lista de Tabelas..... | xi |
| Lista de Figuras..... | xii |
| Lista de Abreviaturas..... | xiv |
| Resumo..... | xvii |
| Abstract..... | xviii |
| I – Introdução..... | .01 |
| 1.1 – Aspectos Gerais da Esquistossomose..... | 02 |
| 1.2 – O Parasita..... | 03 |
| 1.3 – O Genoma do <i>S. mansoni</i> | 06 |
| 1.4 – O Estudo da variabilidade genética do <i>S. mansoni</i> | 07 |
| 1.5 – O Estudo do Genoma de <i>S. mansoni</i> – O Projeto Genoma do <i>S. mansoni</i> (SGN – <i>Schistosoma</i> Genome Network)..... | 11 |
| 1.6 – O Mapeamento Físico do Genoma do <i>S. mansoni</i> | 14 |
| 1.7 – A técnica de FISH (“Fluorescence <i>in situ</i> Hybridization”)..... | 16 |
| 1.8 – A Localização de DNA no Genoma de <i>S. mansoni</i> utilizando a técnica de FISH..... | 21 |

| | |
|---|----|
| II - Objetivos | 23 |
| 2.1 – Objetivos Gerais..... | 24 |
| 2.2 – Objetivos Específicos..... | 24 |
| | |
| III - Materiais e Métodos | 25 |
| 3.1 – Seleção dos Clones de BAC a serem localizados..... | 26 |
| 3.2 – Alinhamento da seqüência do BAC2A em bancos de dados..... | 26 |
| 3.3 – Preparo de Cromossomos Metafásicos a partir de Esporocistos Secundários de <i>Schistosoma mansoni</i> | 26 |
| 3.4 – Preparo de Lâminas contendo cromossomos metafásicos..... | 28 |
| 3.5 – Teste de aglutinação celular mediada por lectinas..... | 31 |
| 3.6 – Cariotipagem de <i>Schistosoma mansoni</i> utilizando o método “ <i>C-banding</i> ” | 32 |
| 3.7 – Extração de DNA de Clones de BAC (MAXI PREP)..... | 33 |
| 3.8 – Avaliação do DNA extraído..... | 34 |
| 3.9 – Marcação de DNA de BAC Clone..... | 36 |
| 3.10 – Desnaturação do DNA Marcado | 37 |
| 3.11 – Desnaturação da lâmina contendo cromossomos metafásicos..... | 37 |
| 3.12 – Hibridização..... | 38 |
| 3.13 – Detecção do Sinal após Hibridização..... | 38 |
| 3.14 – Observação ao Microscópio de Fluorescência e Captura de Imagens..... | 41 |

| | |
|---|-----------|
| IV- Resultados..... | 42 |
| 4.1 – Seleção dos Clones de BAC..... | 43 |
| 4.2 – Alinhamento da Seqüência do BAC 2A em Bancos de Dados..... | 47 |
| 4.3 – Preparo de Cromossomos Metafásicos a partir de Esporocistos Secundários de <i>Schistosoma mansoni</i> | 49 |
| 4.4 – Teste de aglutinação celular mediada por lectinas..... | 51 |
| 4.5. – Cariotipagem de <i>Schistosoma mansoni</i> utilizando o método “C-banding..... | 53 |
| 4.6. – Extração de DNA de Clones de BAC (MAXI PREP)..... | 55 |
| 4.7. – Hibridização <i>in situ</i> por Fluorescência (FISH)..... | 58 |
| | |
| V - Discussão..... | 66 |
| | |
| VI - Conclusões..... | 73 |
| | |
| VII - Perspectivas..... | 75 |
| | |
| VIII - Endereços Eletrônicos..... | 77 |
| | |
| IX - Referências Bibliográficas..... | 79 |

Lista de Tabelas

| | Página |
|---|---------------|
| Tabela I - Lectinas utilizadas no teste de aglutinação celular e seus respectivos carboidratos ligantes..... | 32 |
| Tabela II – Relação dos Clones de BAC selecionados para serem localizados por meio da técnica de FISH..... | 45 e 46 |
| Tabela III – Dados obtidos nos alinhamentos da seqüência nucleotídica do “ <i>contig</i> 2303595”, que apresenta identidade com o BAC2A, em diferentes bancos de dados | 51 |
| Tabela IV –Resumo dos resultados obtidos no ensaio de aglutinação celular mediada por lectinas..... | 54 |

Lista de Figuras

| | Página |
|---|---------------|
| Figura 1 – Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i> | 05 |
| Figura 2 – Representação esquemática da situação do mapeamento físico do genoma de <i>S. mansoni</i> | 22 |
| Figura 3 - Representação esquemática das etapas de preparo de células de esporocisto secundário fixadas e de lâminas contendo cromossomos metafásicos de <i>S. mansoni</i> | 31 |
| Figura 4 – Representação esquemática dos alinhamentos das seqüências nucleotídicas do BAC2A e do “ <i>contig 2303595</i> ”..... | 50 |
| Figura 5 – Obtenção de metáfases de <i>S. mansoni</i> em lâmina preparadas com células recuperadas do caramujo hospedeiro <i>B. glabrata</i> após dias crescentes de infecção..... | 52 |
| Figura 6 – Representação esquemática da sedimentação durante o ensaio de aglutinação celular mediada por lectinas..... | 53 |
| Figura 7 – Representação esquemática do perfil de bandas C cromossômicas reveladas no cariótipo de <i>S. mansoni</i> | 56 |
| Figura 8 – Cariótipo de uma fêmea e de um macho de <i>S. mansoni</i> caracterizados pelo método de Bandas C cromossômicas..... | 57 |

Figura 9 - Gel de Agarose a 0,8% corado com Brometo de Etídio de alíquotas do DNA do BAC2A extraído e purificado.....59

Figura 10 – Fotos de metáfases mitóticas de *S. mansoni* contra-coradas com Fluoróforo Iodeto de Propídio e capturadas sob observação em microscópio OLYMPUS® modelo BX51 equipado com epi-iluminação para microscopia de fluorescência.....61

Figura 11 – Fotos de metáfases mitóticas de *S. mansoni* contra-coradas com Fluoróforo Iodeto de Propídio (PI) capturadas em microscópio ZEISS´ modelo AXIOPHOTO equipado com epi-iluminação para microscopia de fluorescência e “Lasers” para microscopia confocal.....64 a 65

Lista de Abreviaturas

AP-PCR – Reação da Polimerase em Cadeia com Iniciadores Arbitrários – “Arbitrary Primed Polymerase Chain Reaction”

CPqRR – Centro de Pesquisas René Rachou

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

dNTP – Desoxirribonucleotídeos Tri-Fosfatados

dCTP – Desoxicitosina

EST – Etiqueta de Sequência Transcrita – “Expressed Sequence Tag”

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

EMBL - Laboratório Europeu de Biologia Molecular – “European Molecular Biology Laboratory”

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FISH – Fluorescence *in situ* Hybridization

FITC – Isotiocianato de Fluoresceína – “Fluorescein Iso thio cyanate”.

Kb – Kilobases – 10^3 pares de bases

LINE – Elemento repetitivo Intercalado de Sequência Longa

LTR Repetição Terminal Longa

M – Molar – 1mol/Litro

MB – Megabases – 10^6 pares de bases

MG – Minas Gerais

min – Minuto

ml – Mililitros – 10^{-3} Litros

mM – Milimolar – 10^{-3} Molar

mRNA – RNA mensageiro

mtDNA – DNA mitocondrial

μ g – Microgramas – 10^{-6} gramas

μ l – Microlitros – 10^{-6} Litros

Lista de Abreviaturas

- μM – Micromolar – 10^{-6} Molar
- NCBI Centro Nacional para Informações em Biotecnologia – “National Center for Biotechnology Information”.
- ng – Nanogramas – 10^{-9} gramas
- ORF – Janela aberta de Leitura – “Open Read Frame”
- PCR – Reação da Polimerase em Cadeia – “Polymerase Chain Reaction”
- PI – Propidium Iodide
- pb – Pares de Bases
- pH – Potencial Hidrogeniônico
- p/v – Proporção Peso por Volume
- RNA – Ácido Ribonucléico
- RFLP – Polimorfismo do Tamanho de Fragmento de Restrição – “Restriction Fragment Length Polymorphism”
- rRNA – RNA ribossômico
- SDS – Duodecil Sulfato de Sódio
- Seg – Segundos
- SINE – Elemento Repetitivo Intercalado de Sequência Curta – “Short Interspersed Sequences”
- SGN – Rede Genoma do *Schistosoma* – “Schistosoma Genome Network”
- SRS – Sequência Repetitiva Simples – “Simple Repetitive Sequences”
- SSR – Repetições de Sequências Simples – “Simple Sequence Repeats”
- STR – Sequências Repetidas em *Tandem* – “Short Tandem Repeat Sequences”.
- TE – Tampão Tris-EDTA
- TIGR – Instituto de Pesquisas do Genoma – “The Institute of Genome Research”
- Tris – Tri-hidroximetil amino metano
- U – Unidade
- VNTR – Número Variável de Repetições em *Tandem* – “Variable Number of Tandem Repeats”
- v/v – Proporção Volume por Volume

Lista de Abreviaturas

WHO – Organização Mundial de Saúde – “World Health Organization”

14-dCTP-biotina – Desoxicitosina tri-fosfato 14 Biotina

Resumo

A Esquistossomose, também conhecida como “Bilharziose” ou, popularmente, “Barriga d’água” ou “Chistosa” é uma doença crônica e debilitante ou mesmo fatal em alguns casos, que afeta principalmente indivíduos em áreas rurais, sendo endêmica em países tropicais e subtropicais. È causada pelo platelminto trematódeo digenético *Schistosoma mansoni*. Devido a sua grande importância sócio-econômica da doença em países em desenvolvimento, foi montado um projeto para seqüenciamento e estudo do genoma de seu agente etiológico, o *S. mansoni*. A ênfase inicial do projeto foi dada na etapa de seqüenciamento de cDNA, devido à existência de poucos genes seqüenciados do parasita. Como parte deste projeto, iniciou-se a construção de um mapa físico do genoma do *S. mansoni*. E para a consolidação de tal mapa, a localização física de grandes fragmentos de DNA genômico clonados em vetores BAC e YAC no genoma do parasita por meio da técnica de FISH (“*Fluorescence in situ Hybridization*”) é de fundamental importância. Neste trabalho, o DNA do BAC clone AL619337, desde então denominado BAC2A, foi fisicamente localizado no genoma do *S. mansoni* por meio da técnica de FISH. Foi estabelecido como 28 dias o melhor tempo de infecção do caramujo hospedeiro para obtenção de maior número de células metafásicas do parasita por lâmina. Uma vez ajustada a concentração do fluoróforo PI com qual os cromossomos metafásicos do parasita foram contra corados e também do conjugado Avidina-FITC, o sinal de hibridização foi visualizado na região de transição entre euromatina e heterocromatina do braço curto do cromossomo sexual W em todas as metáfases de fêmea observadas. Não foi observado sinal homólogo no outro cromossomo sexual Z, mostrando que o DNA localizado é específico de fêmeas de *S. mansoni*. Trabalhos desta natureza permitem obter informações sobre a estrutura do genoma. Tais informações associadas a outras referentes à função de determinado gene permitem responder questões determinantes na patologia causada por este importante parasita.

Abstract

The *Schistosoma mansoni* genome physical map is under construction and large DNA fragments localization by FISH is priority for this strategy. Therefore, little information about this respect is actually available. To contribute with this initiative, a BAC clone DNA was located on the *S. mansoni* genome by FISH technique in this work. The BAC DNA was labeled by the biotinylated 14-dCTP incorporation in a randomly primers amplification labeling system, using the Klenow polymerase. Cells on metaphase were recovered by dissection of the intramoluscan stage, secondary sporocyst. These were fixed and used to prepare slides containing metaphase spreads. The labeled BAC DNA was hybridized to the *S. mansoni* chromosomes and the slides were washed several times before to reveal the hybridization signal with an Avidin-FITC conjugated. Chromosomes were counter stained with Propidium Iodide in the anti fade solution, and the slides were covered and observed in an epi-fluorescent microscopy coupled to a digital camera to capture the images. C banding was performed to help in identifying and assembling the chromosomes. We were able to establish the better infection time of the snail that yielded good amounts of metaphase spreads. The PI and FITC fluorescence were adjusted too, according to the microscopy power of resolution. The main signal was observed in the heterochromatin-euchromatin transition region of the chromosome W short arm in all female metaphases observed, but nether on the chromosome Z of the male metaphases, showing that the localized BAC clone contains a female specific DNA. With this work, we hope to contribute to the *S. mansoni* genome physical mapping, becoming an additional place to obtain DNA localization by FISH for this important worm. After the sequencing of the genome is finished, gaining knowledge of the sequences localization is an important step. It will help to associate the physical structure of genome and the functional data of the genes for better understanding different features related to the pathology caused for this important worm.

I - Introdução

1.1. - Aspectos Gerais da Esquistossomose

Entre as doenças parasitárias humanas, a esquistossomose, também conhecida como “Bilharziose” ou, popularmente, “Barriga d’água” ou “Chistosa” é a segunda em termos de importância sócio-econômica e de saúde pública em países de áreas tropicais e subtropicais, ficando atrás apenas da Malária. É uma doença crônica e debilitante ou mesmo fatal em alguns casos. Afeta principalmente indivíduos em áreas rurais, sendo endêmica em países tropicais e subtropicais (WHO, 1993).

Mais de 600 milhões de pessoas de áreas rurais e áreas periféricas de centros urbanos de 74 países em desenvolvimento estão expostas ao risco de infecção. Destas pessoas, pelo menos 200 milhões estão infectadas (www.who.int/ctd/schisto/epidemio.htm). No Brasil, ainda é válida a estimativa de que aproximadamente 12 milhões de pessoas estão infectadas, sendo que destas, 500.000 a 1.000.000 sofrem com formas severas da doença (Kloetzel, 1989). As principais formas da esquistossomose humana são causadas por cinco das várias espécies do platelminto do gênero *Schistosoma*: *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. intercalatum*, *S. japonicum* e *S. mekongi*. A esquistossomose intestinal é causada pelo *Schistosoma mansoni*, que prevalece no Brasil. E além destas, sabe-se que as espécies *S. matheei* e *S. malayensis* também infectam o homem (McManus, 1993).

A esquistossomose representa um problema de saúde pública em vários países em desenvolvimento e, dentre as espécies do trematoda que causam a doença, *S. mansoni* é a de maior distribuição geográfica. Embora haja uma alta mortalidade, a morbidade crônica é o principal impacto da doença. E isto se deve, sobretudo, a repetida infecção e ao desenvolvimento de seqüelas debilitantes, não fatais (WHO/TDR, 2002). Kloetzel em 1989, estudando uma região endêmica do estado de Minas Gerais, Brasil, mostrou que um programa para controle eficiente da transmissão da esquistossomose requer uma abordagem multidisciplinar. Mostrou ainda que o tratamento em massa da população perde sua eficácia na ausência de melhorias nas condições gerais de vida da população, sendo esta a principal abordagem adotada por esquemas de controle da doença em áreas endêmicas.

Várias tentativas de controle de doenças parasitárias, dentre elas a esquistossomose, são realizadas em países em desenvolvimento, empregando estratégias diversas, como busca por novos agentes terapêuticos eficazes, desenvolvimento de novos métodos diagnósticos ou pesquisas de possíveis candidatos a vacinas eficazes. O emprego de novas técnicas de abordagem molecular é importante para o entendimento da patogenia, do desenvolvimento clínico, da epidemiologia e do controle da doença, podendo responder a questões relevantes sobre os mecanismos biológicos da relação do parasita com seus hospedeiros.

1.2. - O Parasita

O *Schistosoma mansoni* é um parasita platelminto, trematódeo, digenético, que apresenta claro dimorfismo sexual entre seus vermes na fase adulta. Mas, tal característica é perdida em estágios larvários de miracídio, esporocistos e cercaria do parasita. Seu ciclo de vida é complexo, envolvendo uma fase de reprodução sexuada dos vermes adultos no homem, seu hospedeiro definitivo, e uma fase de reprodução assexuada em caramujos aquáticos do gênero *Biomphalaria*, seu hospedeiro intermediário. A infecção se inicia quando o homem entra em contato com água fresca que contenha a forma larvária de cercaria do parasita, que nada livremente. A cercaria penetra a pele intacta do homem e transforma-se em esquistossômulo. Estes migram para o pulmão cerca de 7 dias após a penetração. Posteriormente vão para o sistema porta hepático, onde sofrem maturação, diferenciando-se em vermes adultos, o macho e a fêmea, que se fixam às veias do plexo mesentérico, onde acasalam. Algumas semanas após o acasalamento, a oviposição se inicia e persiste até a morte dos vermes. Durante a infecção nos vertebrados, cada par de vermes adultos vive acasalado nas veias mesentéricas do hospedeiro, produzindo cerca de 300 ovos por dia (Valadares *et al*, 1981). Alguns ovos passam pelo intestino, sendo finalmente eliminados junto com as fezes, ao passo que outros permanecem retidos nos capilares do sistema porta e na mucosa intestinal do hospedeiro definitivo, onde originam uma resposta granulomatosa aguda que em longo prazo, representam a causa primária da morbidade

(Utzinger *et al*, 2003). O ciclo é completo quando os ovos entram em contato com água fresca e eclodem, liberando miracídeos. Estes infectam caramujos aquáticos do gênero *Biomphalaria*, transformando-se em esporocisto I. Cada esporocisto I origina, por poliembrionia, 150 a 200 esporocistos II, que migram para as glândulas digestivas e ovoteste do caramujo, originando as cercárias, que são liberadas na água, fechando o ciclo evolutivo esquematizado na Figura 1.

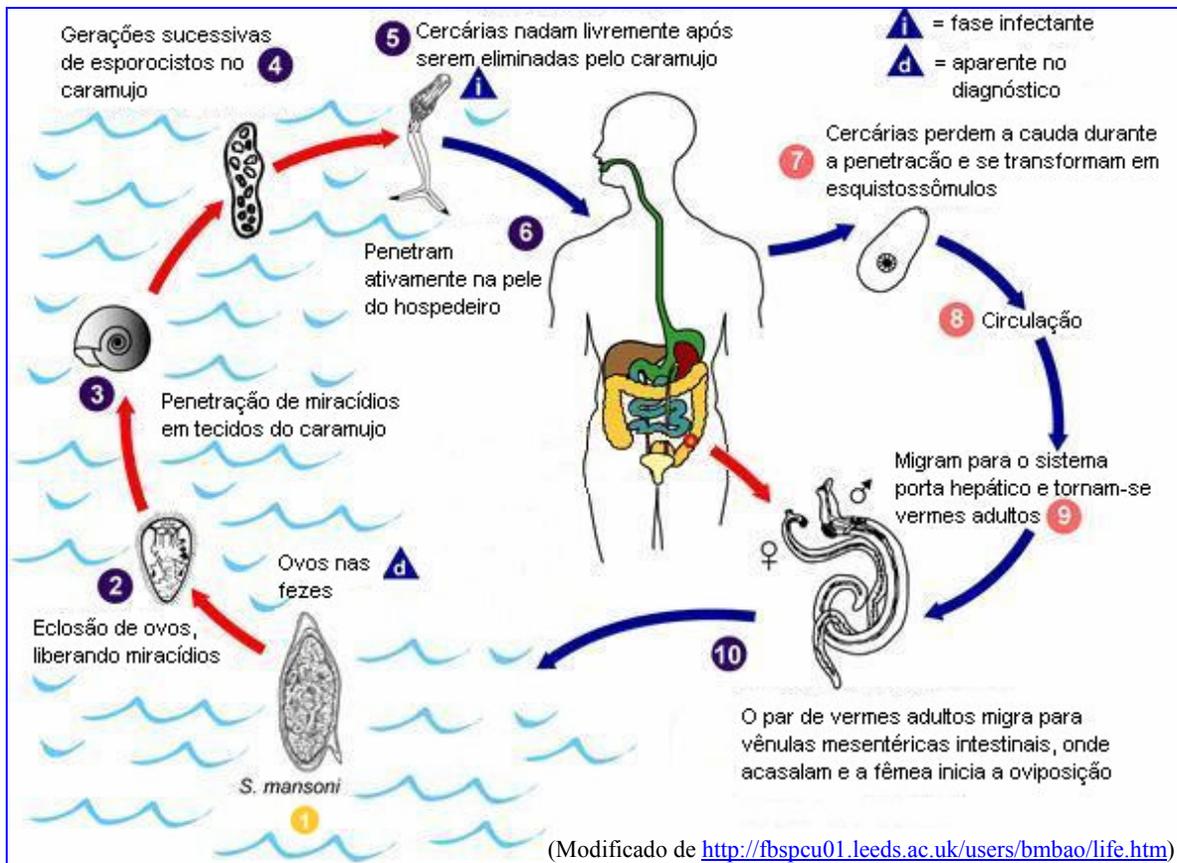


Figura 1 – Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni* – Ovos eliminados nas fezes 1; Forma **miracídio** após eclosão dos ovos em contato com a água 2; Penetração do miracídio no molusco hospedeiro intermediário *B. glabrata* 3; Formas larvárias intramolusco: **esporocisto mãe, primário e secundário** após gerações sucessivas 4; Liberação pelo molusco da forma **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 parasita vista no diagnóstico. Letra i indica a fase em que o parasita apresenta-se na forma infectante para o homem.

1.3. - O Genoma do *S. mansoni*

Nos primeiros estudos citogenéticos do *S. mansoni*, observou-se que este parasita possui genoma diplóide ($2n=16$), com sete pares de cromossomos autossômicos e 1 par de cromossomos sexuais (Short & Menzel, 1960; Short *et al*, 1979). Por comparação entre o método convencional e o de Bandeamento C, determinou-se que a fêmea é heterogamética, possuindo um par de cromossomos denominado ZW e o macho é homogamético, possuindo um par de cromossomos ZZ (Short & Menzel, 1960; Short & Grossman, 1981). Estes cromossomos contêm um genoma de aproximadamente $2,7 \times 10^8$ pb e destes, 4-8% consistem de seqüências de DNA altamente repetitivo, com mais de 1000 cópias; 35-40% de seqüências de DNA de repetitividade média, com aproximadamente 100 cópias; e o restante das seqüências de DNA de cópia única (Simpson *et al*, 1982).

Em um estudo multicêntrico, empregando uma biblioteca normalizada de cDNA de vermes adultos (Soares, *et al*, 1994) e mini-bibliotecas ORESTES dos seis estágios evolutivos do parasita (Dias-Neto *et al*, 2000) para a geração de Etiquetas de Seqüências Transcritas (“Expressed Sequence Tags- ESTs”), uma extensa anotação dos dados do transcriptoma do *S. mansoni* foi realizada (Verjovsky *et al*, 2003). De acordo com este estudo, o emprego de diferentes métodos permitiu prever que aproximadamente 14000 genes são expressos pelo parasita. E destes, 7200, aproximadamente 50%, são expressos pelo parasita quando em fase de verme adulto. Segundo uma classificação funcional, também realizada no referido estudo, a classe de proteínas do metabolismo intermediário foi identificada com

maior frequência dentre as demais categorias de processos biológicos. Uma análise comparativa em banco de dados mostrou que a maioria dos domínios conservados com que foram observadas homologias nas seqüências depositadas pertence a proteínas envolvidas na comunicação intracelular e na regulação da transcrição, o que é esperado em parasitas com múltiplos tecidos e órgãos.

1.4. - O estudo da variabilidade genética do *S. mansoni*

O fenômeno da variação intra-específica, ou variedade de cepas, do *S. mansoni*, é reconhecido pelos pesquisadores estudiosos deste parasita e identificada pela variação da patologia por ele causada. Diferenças em aspectos importantes como infectividade ao caramujo e ao homem, periodicidade da eliminação de cercarias, resposta aos medicamentos, produção de ovos, patogenicidade e imunogenicidade induzidas pelo *S. mansoni* são conseqüências da sua variabilidade intra-específica (McManus & Hope, 1993).

A técnica de eletroforese de isoenzimas foi primeiramente utilizada para estudar a variabilidade genética de *S. mansoni*. Empregando um sistema de coloração para 14 enzimas, Fletcher *et al* (1981a) realizaram um estudo com cepas de *S. mansoni* que apresentavam diferentes graus de infectividade ao hospedeiro intermediário *B. glabrata*. Dos 18 “loci” identificados, três mostraram-se polimórficos, mas não apresentaram clara correlação entre polimorfismo isoenzimático e infectividade das cepas estudadas. Em outros estudos semelhantes, a mesma técnica foi empregada para avaliar a diferença entre vermes adultos individuais de *S. mansoni* oriundos de diferentes regiões geográficas (Fletcher *et al*, 1981b; Navarro *et al*, 1992). Os dados obtidos mostraram que a maioria das cepas estudadas apresentou relativamente baixa variabilidade. Posteriormente, o número de enzimas utilizadas no sistema eletroforético foi aumentado de 14 para 34, permitindo a detecção de três novos “loci” polimórficos (Lo Verde *et al*, 1985).

Estudos convencionais do cariótipo empregando coloração com GIEMSA e realizados com diferentes cepas de *S. mansoni* não foram suficientes para revelar diferenças marcantes entre as cepas em questão. E nem mesmo com o emprego da técnica de revelação das bandas C cromossômicas (“C banding”) permitiu fazer inferências de grande relevância em relação à variação genética intra-específica do *S. mansoni*. Com este enfoque, só foi possível demonstrar diferenças entre as formas asiáticas, *S. japonicum* e *S. mekongi*, que apesar de possuírem similaridades entre a morfologia de seus cromossomos, apresentam diferenças claras entre seus cariótipos (Short *et al*, 1983).

O desenvolvimento das técnicas de Biologia Molecular foi de grande importância para a evolução dos estudos da variabilidade genética de *S. mansoni*, uma vez que novas abordagens em que se empregam genes ou fragmentos genômicos de *S. mansoni* clonados surgiram, tornando-se ferramentas valiosas neste tipo de estudo. A análise de restrição do DNA de *S. mansoni* mostrou a existência de seqüências repetidas “*em tandem*”, sendo que algumas destas foram subseqüentemente clonadas (Simpson *et al*, 1982). Assim, por meio da técnica de “*Southern Blot*”, utilizando seqüências de DNA clonadas para produção de sondas marcadas radioativamente hibridizadas ao DNA genômico, a primeira região de DNA repetitivo de *S. mansoni* foi descrita. Esta região compreende o complexo de genes do RNA ribossômico (rRNA) (Simpson *et al*, 1984). Cada unidade, repetida “*em tandem*”, é composta por 10 Kb de extensão e aparece aproximadamente 100 vezes por genoma haplóide. Assim como no genoma de eucariotes, cada unidade codifica as três espécies de rRNA altamente conservadas, 5.8s, 18s e 28s, que têm suas regiões codificadoras intercaladas por DNA espaçador não transcrito (Simpson *et al*, 1984; Van Keulen *et al*, 1985). A família de genes ribossômicos de *S. mansoni* é polimórfica, com aproximadamente 10% das unidades repetitivas mostrando heterogeneidade de tamanho, e esta característica revelou-se de grande importância para estudos taxonômicos (Simpson *et al*, 1984). Assim, a técnica de “*Southern blot*” foi utilizada para fins tão importantes como determinação do sexo de cercárias (Webster *et al*, 1989; Drew *et al*, 1995; Quack *et al*, 1998) e diferenciação entre espécies e cepas (McCutchan, *et al*, 1984).

O polimorfismo encontrado em outras regiões do DNA de *S. mansoni* foi explorado para diferenciação do gênero *Schistosoma*, bem como para a identificação de vermes individuais ou mesmo de sub populações de vermes. Estas regiões compreendem, respectivamente, o elemento altamente repetitivo presente em muitos transcritos de mRNA(s), que apresenta similaridades com regiões hipervariáveis do genoma humano (Spotila *et al*, 1991), e também o DNA mitocondrial (mtDNA), que é haplóide e de herança materna (Depres *et al*, 1991). Com o advento das técnicas baseadas na Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), um processo em que se promove a amplificação de um DNA específico de interesse, utilizando a enzima DNA polimerase (Saiki *et al*, 1985; Mullis & Faloona *et al*, 1987), uma interessante e poderosa ferramenta para auxiliar nos estudos de variabilidade genética foi desenvolvida. Assim, utilizando o DNA repetitivo de 476pb de comprimento, de alto número de cópias no genoma e presente somente em fêmeas, denominado W1 (Webster *et al*, 1989), Gasser e colaboradores (1991) desenvolveram uma técnica de PCR simples, em que foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores sintéticos para a referida seqüência repetitiva, o que permitiu uma rápida determinação do sexo de cercárias individuais de *S. mansoni*. Já com o objetivo de discriminar separadamente espécies e cepas de parasitas do gênero *Schistosoma*, foi utilizada uma técnica derivada da PCR simples. Tal técnica emprega oligonucleotídeos iniciadores aleatórios, a AP-PCR ou RAPD (“Random Amplified Polimorphic DNA”) Barral *et al*, (1993). Neste estudo foram utilizadas populações de parasitas de diferentes espécies e localizações geográficas: *S. mansoni* (Brasil, Guadalupe e Venezuela), *S. rodhaini* (Burundi), *S. bovis* (Nigéria), *S. intercalatum* (Camarões) e *S. japonicum* (China), que foram mantidas em laboratório por intervalos de tempo diferentes. Mais de 90% dos iniciadores utilizados geraram perfis com forte polimorfismo quando realizado o ensaio para diferenciação entre espécies, o que facilitou esta diferenciação. Já entre as diferentes cepas de *S. mansoni*, pôde-se notar uma alta freqüência de fragmentos compartilhados (maior que 90%), entre os mais de 300 gerados pelo emprego dos vários iniciadores, sendo, conseqüentemente, detectado um limitado, mas claro, polimorfismo entre as cepas. Empregando a mesma técnica, Dias Neto e colaboradores (1993) obtiveram resultados concordantes com as inferências feitas a partir

de estudos de eletroforese de isoenzimas e rDNA com relação à baixa variabilidade genética observada entre diferentes cepas de *S. mansoni* (Fletcher *et al*, 1981b; Simpson *et al*, 1984; Van Keulen *et al*, 1985; McCutchan *et al*, 1984; Vieira *et al*, 1991).

A análise do polimorfismo no tamanho do DNA mitocondrial foi, primariamente, considerado como um outro aspecto promissor a ser explorado para mostrar a variabilidade genética (Depres *et al*, 1991), sendo a PCR uma ferramenta adequada para realizar estes estudos e obter resultados esclarecedores (Le *et al*, 2000). Mas, muito embora o mtDNA tenha mostrado variabilidade entre diferentes clones de uma mesma cepa de *S. mansoni* (Pena *et al*, 1995), este tipo de DNA não expressa diploidia e nem herança mendeliana, o que impede a aplicação de estudos populacionais, de ligação e nem mesmo estudos de diferentes espécies do mesmo gênero sobre este DNA (Jannoti-Passos *et al*, 1997),

O polimorfismo dos microsatélites, um tipo de DNA repetido em “*tandem*”, ou seja, repetições de 2 a 6pb que ocorrem uma após a outra, altamente dispersos no genoma de eucariontes, mas também localizados no genoma de procariontes, vírus e DNA de organelas (Field & Willis, 1996), tem sido utilizado para vários fins, dentre os quais o estudo da genética populacional de vários organismos (Santos *et al*, 1996).

Rodrigues *et al*. (2002) estudaram sub populações da cepa LE de *S. mansoni* por meio de PCR. Neste estudo, foram identificados 622 “*loci*” de microsatélites em 487 seqüências depositadas em bancos de dados. Foram selecionados 6 *loci* contendo repetições perfeitas para estudo de seu polimorfismo em dois grupos de vermes. O primeiro foi composto por indivíduos da cepa LE de ambos os sexos e o segundo composto por indivíduos isolados no campo, sendo parte deles isolados de humanos e outra parte isolada do caramujo hospedeiro. Indivíduos da cepa LE mostraram menor média do número de alelos por *locus* polimórfico do que aqueles isolados no campo, sugerindo que um longo tempo de manutenção em laboratório exerceu uma pressão seletiva sobre a cepa LE. Este trabalho salienta a importância de se explorar a abundância e o alto polimorfismo dos microsatélites, associados à alta sensibilidade da PCR, para estudos da estrutura populacional de *S. mansoni*, empregando quantidades mínimas de DNA como amostras.

Assim, a busca por outros marcadores moleculares polimórficos, cada vez mais confiáveis e reprodutíveis para estudo da variabilidade genética de *S. mansoni* segue seu curso. Devota-se esperança no conhecimento do genoma deste parasita para tentar encontrar marcadores com tais características, assim como para responder a questões importantes, inerentes à relação entre parasita e hospedeiro que regem a patogenia e imunologia da doença.

1.5. - O estudo do Genoma de *S. mansoni* – O Projeto Genoma do *S. mansoni* (SGN – *Schistosoma* Genome Network)

Na década de 90, o mundo pode testemunhar o surgimento e progresso de vários Projetos Genoma. O sucesso de tais ambiciosas investidas atribui-se, em grande parte, ao crescente número de genomas integralmente seqüenciados, que compreendem desde bactérias (Blattner *et al*, 1997) e leveduras como *Sacharomyces cerevisiae* (Mewes *et al*, 1997) até o primeiro organismo pluricelular, o nematódeo *Caenorhabditis elegans* (Burglin, 1998). Mas, não há dúvidas de que o mais importante projeto desta natureza é o Projeto Genoma Humano (“Human Genome Project – HGP”), do qual os resultados serão subsídios para uma revolução da biologia e a medicina (Franco *et al*, 2000), sobretudo com os frutos colhidos na etapa em que se encontra atualmente, a análise funcional do genoma.

Com a aquisição de conhecimento sobre o genoma do *S. mansoni*, os pesquisadores esperam encontrar genes candidatos que satisfaçam os requisitos para a produção de vacinas eficazes e de baixo custo contra a doença causada por este parasita, bem como favorecer o desenvolvimento de técnicas simples de diagnóstico desta doença 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. O *S. mansoni* possui características vistas como vantajosas e que facilitam o estudo do genoma. Tais aspectos compreendem: seu pequeno genoma, em relação a outros organismos, sua diploidia, com cromossomos sexuais bem diferenciados, Z e W e sua adaptação biológica para escapar ou modular o sistema imune do hospedeiro definitivo

(Butterworth *et al*, 1998; Maizels *et al*, 1993). Além disso, diferente de protozoários parasitas como *Tripanossoma sp* ou *Plasmodium sp*, tanto o polimorfismo nos genes de *Schistosoma* (Tanaka *et al*, 1994; Triglia *et al*, 1992), quanto sua estrutura cromossômica são razoavelmente limitados, o que facilita a análise filogenética (Simpson *et al*, 1982; Meadows *et al*, 1989; Johnston *et al*, 1993; McManus *et al*, 1993).

Portanto, o estudo detalhado do genoma deste organismo foi iniciado em 1992 por pesquisadores que formaram o então denominado Projeto Genoma do *Schistosoma* (“*Schistosoma* Genome Project – SGP”). O SGP passou a contar com suporte da Organização Mundial de Saúde (“WHO/UNDP/World Bank Special Program for Research”), do Centro de Treinamento em Doenças Tropicais (“Training in Tropical Diseases – TDR”), além de laboratórios de pesquisa de vários países que se associaram à iniciativa. Desde então, este se tornou um dos mais difundidos consórcios internacionais de colaboração para pesquisa, incluindo países de vários continentes (Franco *et al*, 2000).

Dois espécies importantes, *Schistosoma japonicum* e *Schistosoma mansoni*, foram escolhidas para serem utilizadas na descoberta de genes, ao contrário de outros projetos que adotam uma cepa como referência em seus estudos. Esta determinação foi baseada nas considerações de que a colaboração internacional deveria ser o mais ampla possível; permitindo o uso de várias bibliotecas genômicas e de cDNAs existentes, agilizando a geração de dados e minimizando o tempo gasto com a obtenção de novas fontes; as duas espécies abrangem a faixa de diversidade das espécies de *Schistosoma* que infectam o homem (Johnston *et al*, 1993; Littlewood & Johnston, 1995), o que viabiliza a análise comparativa; e problemas relacionados à transferência do parasita, bem como do caramujo hospedeiro entre laboratórios foram considerados (Williams & Johnston, 1999).

A ênfase inicial do projeto foi dada na descoberta de novos genes, uma vez que poucos dados sobre a genética de *Schistosoma* estavam disponíveis (Pica Mattoccia *et al*, 1993). Foram então identificadas quatro prioridades na estratégia delineada (Williams & Johnston, 1999):

1. A descoberta de novos genes; – várias bibliotecas de cDNA de vários estágios de desenvolvimento de *S. mansoni* e *S. japonicum* já existentes foram exploradas para este

propósito; 2. Desenvolvimento de recursos de informática – isto envolve a construção de um banco de dados sobre seqüências de DNA ou proteínas, sobre mapeamento, sobre bibliografia além de outras informações pertinentes à análise do genoma e à biologia do parasita; 3. Integração entre laboratórios - objetivando, sobretudo, treinar pesquisadores de países em desenvolvimento em tecnologias de seqüenciamento, mapeamento e todos os aspectos do manuseio de DNAs de interesse; 4. Realização do mapeamento físico do genoma – Preconizava a construção de bibliotecas genômicas de grandes fragmentos de DNA de *S. mansoni* e o desenvolvimento de novas técnicas que facilitassem os futuros trabalhos de mapeamento. Trata-se de uma etapa essencial ao estudo da estrutura e organização gênica, bem como da identificação de elementos reguladores e da análise da regulação de genes.

Inicialmente, foi dada prioridade ao *S. mansoni* por ser a espécie mais bem estudada, sendo que no Brasil boa parte do seqüenciamento e outras pesquisas já eram realizadas. A busca por novos genes então começou, com a pioneira iniciativa brasileira, pelo emprego de uma abordagem baseada na geração de Etiquetas de Seqüências Transcritas (“ESTs”) (Franco *et al*, 2000).

A eficiência desta abordagem pôde ser comprovada quando são observados seus resultados. Foram geradas 163.000 ESTs a partir de diferentes bibliotecas. Após o tratamento dos dados obtidos das leituras de seqüenciamento, 30.988 associações de ESTs, então denominadas: Seqüências de ESTs associadas de *S. mansoni* (“*Schistosome mansoni* assembled EST sequences – SmAEs”) foram geradas, o que representou uma cobertura de aproximadamente 92% do transcriptoma do *S. mansoni*. A análise comparativa destas SmAEs em bancos de dados mostrou que entre elas, 77% representavam possíveis novos fragmentos gênicos de *S. mansoni*, 1% de genes já conhecidos de *S. mansoni*, 20% de genes já conhecidos de outros organismos e 55% de genes sem função conhecida (Verjovski *et al*, 2003).

A abordagem do Instituto de Pesquisas do Genoma (TIGR – USA) foi delineada objetivando-se gerar primeiramente 13Mb de seqüência genômica descontínua para auxiliar diretamente na descoberta precoce de genes, além de produzir marcadores importantes

tanto para a estratégia de mapeamento quanto para a própria estratégia de seqüenciamento. Em uma segunda fase, seriam gerados outros 8Mb de seqüência contínua de DNA de diferentes regiões do genoma, empregando uma abordagem BAC por BAC (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/sma1/>).

Já no Instituto Sanger, Inglaterra, optou-se por realizar o seqüenciamento e a anotação de Clones de BAC de *S. mansoni*, estendendo-se até 1,1Mb. (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_mansoni/).

Dentre outras etapas realizadas com o intuito de colaborar com o SGN, deve-se salientar ainda a produção de um mapa físico do genoma de *S. mansoni* pelo emprego de uma biblioteca genômica de grandes fragmentos de DNA do parasita clonados em vetor BAC. Clones de BAC desta biblioteca são utilizados para realizar hibridizações *in situ* no cariótipo representativo do genoma do parasita. Posteriormente, a localização cromossômica dos Clones de BAC poderia ser visualizada por meio de microscopia de fluorescência (“Fluorescence *in situ* Hybridization” – FISH)

Assim, um mapa físico do genoma é um guia primário para explorar o arranjo do material genético de um organismo e a informação que ele codifica (Weissenbach *et al*, 1992; Collins *et al*, 1993). Mas, como supracitado, e ao contrário do que foi feito em Projetos Genomas de outros organismos bem conhecidos como *Plasmodium falciparum*, *C. elegans* e de camundongo, o SGN optou por não dar a ênfase inicial do projeto em estratégias de mapeamento genético e físico (Williams & Johnston, 1999), devido à escassez de dados genéticos do *S. mansoni*, passando-se diretamente à etapa de seqüenciamento.

1.6. - O Mapeamento Físico do Genoma do *S. mansoni*

Como o genoma do *S. mansoni* com 270Mb é o maior entre aqueles parasitas que têm seus genomas já seqüenciados ou seqüenciamento ainda em andamento, não há disponibilidade de bibliotecas específicas de cada cromossomo, pois não é possível separá-lo por eletroforese de campo pulsado (“*pulsed field technique*”). Esta tarefa requer intervenção por

meio de técnicas de microdissecção. Portanto, o mapeamento precisa acontecer ao nível do genoma como um todo e, conseqüentemente, mapas de baixa resolução são os mais praticáveis para este parasita (Williams & Johnston, 1999).

Os primeiros estágios de um mapa físico dependem da produção de uma biblioteca de grandes fragmentos de DNA que cubra pelo menos uma vez todo o genoma do organismo a ser estudado. Com o advento de vetores do tipo YAC (“Yeast Artificial Chromosome”), capazes de carrear fragmentos de DNAs muito grandes, tornou-se viável a produção destes mapas para genomas de eucariotes (Imai *et al*, 1990; Foote *et al*, 1992).

Assim, uma biblioteca de fragmentos de DNA genômico de cercaria do *S. mansoni*, com tamanho médio de 350 Kb e clonados em vetor YAC, foi produzida. Esta biblioteca foi varrida por hibridização *in situ* com um fragmento específico de *S. mansoni*, *sm α* descrito por Spotila e colaboradores, 1989, em cromossomos metafásicos por meio da técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (“Fluorescence *in situ* Hybridization” – FISH) (Tanaka *et al*, 1995). Foi observada uma alta frequência da clonagem de DNA da região repetitiva do gene de rRNA, além da localização de alguns clones em mais de uma posição, o que retrata a presença parcial de DNAs quiméricos.

Com o objetivo de se obter uma cobertura mais uniforme do genoma, otimizar o mapeamento físico e facilitar o seqüenciamento, complementando a biblioteca de YAC clones, foi construída uma outra biblioteca de fragmentos de DNA de cercárias de *S. mansoni* com tamanho médio de 100Kb, clonados em vetor BAC (“Bacterial Artificial Chromosome”) (Le Paslier *et al*, 2000). Esta nova biblioteca apresentou uma cobertura de aproximadamente oito vezes o genoma do *S. mansoni* e não apresentou os problemas observados na biblioteca de YAC clones. Entre os 23.808 Clones de BAC gerados, 93 seqüências de extremidades de Clones de BAC, chamadas “finais de seqüências”, contendo aproximadamente 400pb foram obtidas e posteriormente submetidas a análises de similaridade em bancos de dados. Assim, não foram encontradas similaridades significativas a qualquer das seqüências contidas nos bancos de dados para 45% das seqüências analisadas. E aquelas restantes mostraram similaridades a várias famílias de

genes e seqüências de *S. mansoni*, como a família dos retrotransposons $sm\alpha$ (Spotila *et al.*, 1989), ESTs e seqüências repetitivas.

Com outro objetivo, oito Clones de BAC foram submetidos à localização cromossômica pelo emprego da técnica de FISH. Um deles foi localizado na região de rRNA repetitivo do cromossomo 2 e possuía parte da seqüência 18S rRNA em uma de suas extremidades. A análise dos resultados mostrou que esta biblioteca seria uma ferramenta de muita utilidade não só para o mapeamento do genoma, bem como para pesquisadores interessados em localizar ou caracterizar famílias de genes do *S. mansoni*. Um outro aspecto importante que tornou viável a realização do mapeamento físico foi o desenvolvimento da técnica de FISH, sobretudo para a obtenção de cromossomos em fase de metáfase, permitindo sua realização em função das características inerentes à biologia do *S. mansoni*.

1.7. - A técnica de FISH (“Fluorescence *in situ* Hybridization”)

Os primeiros relatos da utilização de técnicas citológicas associadas com hibridização revolucionaram os estudos genômicos em uma época em que as técnicas citogenéticas disponíveis limitavam o mapeamento cromossômico a apenas alguns poucos organismos que apresentavam características favoráveis, como a clara diferenciação entre cromossomos sexuais (Short & Menzel, 1960). Por outro lado, experimentos de hibridização de RNA-DNA permitiam detectar a transferência de RNA exógeno para o interior de bactérias (Smith & Dubnau, 1968). Gall & Pardue, 1969 e John *et al*, 1969 mostraram, em iniciativas individuais, mas com abordagens semelhantes, ser possível realizar a localização cromossômica de determinados segmentos de DNA adotando-se uma estratégia em que os híbridos RNA-DNA eram introduzidos nas técnicas de citogenética convencionais. Assim, famílias de genes poderiam ser identificadas por meio de experimentos de cinética de “renaturação” nas análises genômicas de células eucarióticas. Nestes experimentos, o RNA, radioativamente marcado, era introduzido na célula-alvo intacta, se hibridizava no DNA nuclear *in situ* e era posteriormente detectado em uma auto-radiografia.

A possibilidade de visualizar híbridos de ácidos nucleicos com o DNA cromossômico resultou em um grande número de estudos, empregando genes ou seqüências cromossômicas específicas. Dentre as várias aplicações da técnica, pode-se citar seu uso para localização cromossômica de seqüências de DNA não transcritos em humanos (Jones & Córneo, 1971; Gosden *et al*, 1975), estudos comparativos em primatas (Jones *et al*, 1973; Henderson & Atwood 1976; Mitchell *et al*, 1977; Gosden *et al*, 1978), localização cromossômica de DNA repetitivo em outros mamíferos como o camundongo (Pardue & Gall, 1970; Ahnstrom & Najarajan, 1974; Bostock & Clarke, 1980), localização cromossômica de seqüências transcritas de rRNA em humanos (Henderson *et al*, 1972) e também em camundongos (Elsevier & Ruddle, 1975), localização cromossômica de genes de histona, da α globina e da insulina em humanos (Yu *et al*, 1978; Gerhard *et al*, 1981; Harper *et al*, 1981) e das globinas α e β em camundongos (Henderson *et al*, 1978), estudos de associação de vírus com células de mamíferos, entre eles adenovírus (McDougall *et al*, 1972), o SV40 (Segal *et al*, 1976) e o *Herpes simplex* I (Henderson *et al*, 1981), localização cromossômica específica da integração de DNA em estudos de transformação celular (Robins *et al*, 1981) além de localização intracelular de mRNA de globina (Harrison *et al*, 1973) dentre outras hibridizações citológicas.

O mapeamento de genes de cópia única ou de baixo número de cópias só era possível se um grande número de metáfases fossem analisado após hibridização em condições ótimas. Embora não haja nenhuma restrição teórica à formação de híbridos com o DNA cromossômico, o uso de hibridização citológica para o estudo da organização de seqüências de baixo número de cópias no genoma de células eucarióticas é dificultado pela grande quantidade de DNA empacotado no cromossomo, bem como o fato de que a própria hibridização envolve o anelamento a complexos nucleoprotéicos de grande diversidade (Henderson *et al*, 1978). Consideradas juntamente com impurezas potencialmente presentes nas sondas confeccionadas, estas características são responsáveis pela ocorrência de falsas localizações. No entanto, o aumento da simplicidade e a melhora na análise dos experimentos foram notáveis após o emprego de avanços de técnicas de DNA

recombinante, que permitiram a clonagem de genes ou seqüências específicas e o emprego destes como sondas radioativamente marcadas (Gerhard *et al*, 1981; Harper *et al*, 1981).

Diversos estudos mostrando a influência de inovações técnicas sobre a eficiência da hibridização, que é matematicamente representada pelo produto da eficiência da emulsão de revelação dos pontos de hibridização pela porcentagem de hibridização, foram realizados. Nestes estudos, aspectos como peso molecular, quantidade e atividade específica do DNA marcado, tempo de exposição do autoradiograma, método de preparação das lâminas bem como de desnaturação do DNA cromossômico mostraram-se variáveis importantes para a eficiência da hibridização (Henderson, *et al*, 1982).

Ao contrário dos primeiros trabalhos, em que o DNA ou RNA a serem utilizados como sondas eram marcados *in vivo* pela incorporação de nucleotídeos radioativos por células em cultura, os DNAs clonados permitiam a marcação *in vitro*, por meio de diferentes técnicas, empregando os isótopos I^{125} e H^3 e a polimerase transcriptase reversa bem como a RNA polimerase de *E. coli*. Para a revelação do autoradiograma, as partículas β de baixa energia são liberadas por estes isótopos em uma fina camada de emulsão fotográfica que cobre a lâmina e ativam a redução da Prata ao seu estado metálico. Esta precipita e forma os pontos específicos sobre os cromossomos. A alta sensibilidade desta técnica de detecção é a principal vantagem em seu emprego e acaba por compensar a influência de fatores que possam determinar a baixa eficiência da hibridização. Entretanto, esta técnica de revelação apresenta inconvenientes, sobretudo em relação ao manuseio de radioisótopos, o que requer a montagem de uma estrutura adequada para recebê-los, aplicá-los em experimentos e descartar todo o material com o qual houve contato direto. Além disto, o processo demanda muito tempo e freqüentemente a resolução é insuficiente para localizar claramente a hibridização como uma banda nos cromossomos metafásicos de eucariotes. Para suplantar tais dificuldades, outras formas de visualizar o sinal de hibridização foram desenvolvidas, sendo o emprego de fluoróforos diretamente acoplados ao RNA ou DNA a alternativa mais promissora. Assim, nos primeiros experimentos com esta abordagem, DNA de adenovírus tipo 5 foi localizado no interior de células (Bauman *et al*, 1981a) e genes foram localizados em cromossomos gigantes de glândulas salivares de *Drosophila hydei* e *Drosophila*

melanogaster (Bauman *et al*, 1981b). Nestes estudos, a ligação de um fluoróforo ao RNA complementar não afetou sua propriedade de hibridização. O uso do fluoróforo não só tornou o procedimento mais rápido em relação à detecção do híbrido RNA-DNA cromossômico, como possibilitou a observação direta das lâminas em microscópio de imunofluorescência. Além disto, dependendo do sistema ótico do microscópio, o emprego de fluoróforos possibilitou o aumento do poder de resolução (Van Prooijen-Knegt *et al*, 1982). Embora a marcação direta do RNA ou DNA usados como sondas tornem a técnica muito sensível, métodos indiretos permitiram aumentar ainda mais a sensibilidade. Primeiramente, foram utilizados anticorpos acoplados aos fluoróforos e específicos para híbridos RNA / DNA cromossômico (Rudkin *et al*, 1977). Posteriormente, optou-se por explorar a interação de sondas de DNA marcado com biotina e anticorpos contra a biotina ligados ao fluoróforo ou ainda conjugados avidina ligada ao fluoróforo (Hirai *et al*, 1989). Assim sedimentava-se, definitivamente, a técnica de **Hibridização *In Situ*** por **Fluorescência** (“*Fluorescence in situ Hybridization*” – **FISH**), com alta sensibilidade, notável eficiência e com relativa rapidez para análise dos resultados.

Uma vez bem estabelecida, diversos relatos de emprego de FISH têm sido divulgados freqüentemente, com diferentes finalidades, principalmente devido à possibilidade de adaptação dos procedimentos citogenéticos já existentes, em que se utilizam cromossomos metafásicos mitóticos ou meióticos de diferentes organismos. Desde então, localizações cromossômicas empregando FISH foram realizadas para diversos organismos, que incluem desde procariontes como a bactéria *Escherichia coli* (Niki *et al*, 2000), parasitas de importância sanitária para o homem, como *Fasciola hepatica* (Zurita *et al*, 1989), invertebrados de importância na saúde coletiva, como o mosquito vetor da Dengue, *Aedes aegypti* (Brown *et al*, 2001) ou *Drosophila melanogaster*, um organismo modelo para estudo de células eucarióticas (Konev *et al*, 2003), vegetais de importância na alimentação humana como tomate (Peterson, *et al*, 1999; Islam-Faridi *et al*, 2002), cebola (Suzuki *et al*, 2001), arroz (Cheng *et al*, 2001; Cheng *et al*, 2002;), cereais (Miller. *et al*, 1998) dentre outros vegetais importantes como modelos biológicos (Jackson *et al*, 2000; Pedrosa *et al*, 2002), peixes (Yao *et al*, 2003) e mamíferos, tais como o cão (Breen *et al*, 2001; van de

Sluis *et al*, 1998), o rato (Yu H. *et al*, 2003), camundongo (Ishida *et al*, 2003), porco (Kokuho *et al*, 2000) e primatas (Rakotoarisoa *et al*, 2000; Montefalcone *et al*, 1999; Hirai *et al*, 1999). Para este último grupo, os resultados obtidos são, com maior frequência, utilizados para estudos filogenéticos.

A técnica de FISH foi notavelmente empregada em estudos de diversas doenças autossômicas humanas. Como exemplo, pode-se citar a descoberta de que as principais instabilidades do cromossomo 22 humano, que provocam síndromes como a DiGeorge e Velocardiofacial, ocorrem em uma região de DNA repetitivo de baixo número de cópias, contida em uma porção de DNA que é tipicamente perdida neste tipo de síndrome por “microdeleção” cromossômica (Shaikh *et al*, 2000). O ponto de quebra do cromossomo 11 de pacientes acometidos com a Síndrome de Jacobsen foi mapeado por FISH e fisicamente localizado próximo à porção distal de um marcador genético, y934D03, e à porção proximal de outro marcador, y133B06 (Tunnacliffe *et al*, 1999). A atrofia muscular espinhal (SMN) é uma desordem neuromuscular, autossômica e recessiva que se apresenta sob diferentes formas clínicas, variando desde formas muito severas a formas mais brandas. Os pacientes acometidos não possuem o gene SMN1, mas variados números de cópias de um gene SMN2, que codifica uma proteína semelhante àquela codificada por SMN1. Com auxílio da técnica de FISH, foi possível visualizar que o número de cópias de SMN2 relaciona-se inversamente com o grau de severidade da doença (Vitali *et al*, 1999).

Várias translocações cromossômicas associadas a diferentes tipos de leucemias foram também mapeadas, sendo os seus variados rearranjos caracterizados por meio de FISH (Wlodarska *et al*, 1998). Este achado é especialmente relevante, uma vez que nem sempre as aberrações associadas podiam ser facilmente visualizadas por meio das técnicas citogenéticas então disponíveis. Além disto, este tipo de informação incentivou empresas a investirem em pesquisa para desenvolvimento de técnicas diagnósticas para leucemias, baseadas neste procedimento. Hoje se encontram disponíveis “kits” para diagnóstico de várias delas.

Com o desenvolvimento da técnica de FISH em que uma sonda é específica para um único cromossomo (Pinkel *et al*, 1986; Pinkel *et al*, 1988) foi possível detectar aberrações

cromossômicas de uma forma mais objetiva do que permitiam as técnicas disponíveis. Este tipo de estudo tornou-se ainda mais esclarecedor quando se passou a utilizar outra variação da técnica original, o “*Chromosome Painting*”, uma adaptação da técnica de *Multicolor-FISH* (mFISH) em que pela combinação de alguns fluoróforos associada a sondas específicas, cada par de cromossomos apresenta-se corado com uma fluorescência diferente.(Fauth *et al*, 2001; Macville *et al*, 1997; Speicher *et al*, 1996). Assim, a troca de cromátides induzida pela Mitomicina C, um antibiótico que, neste caso, torna-se um clastógeno, pôde ser diretamente visualizada em uma linhagem de células linfoblásticas humanas (Satoh *et al*, 2002).

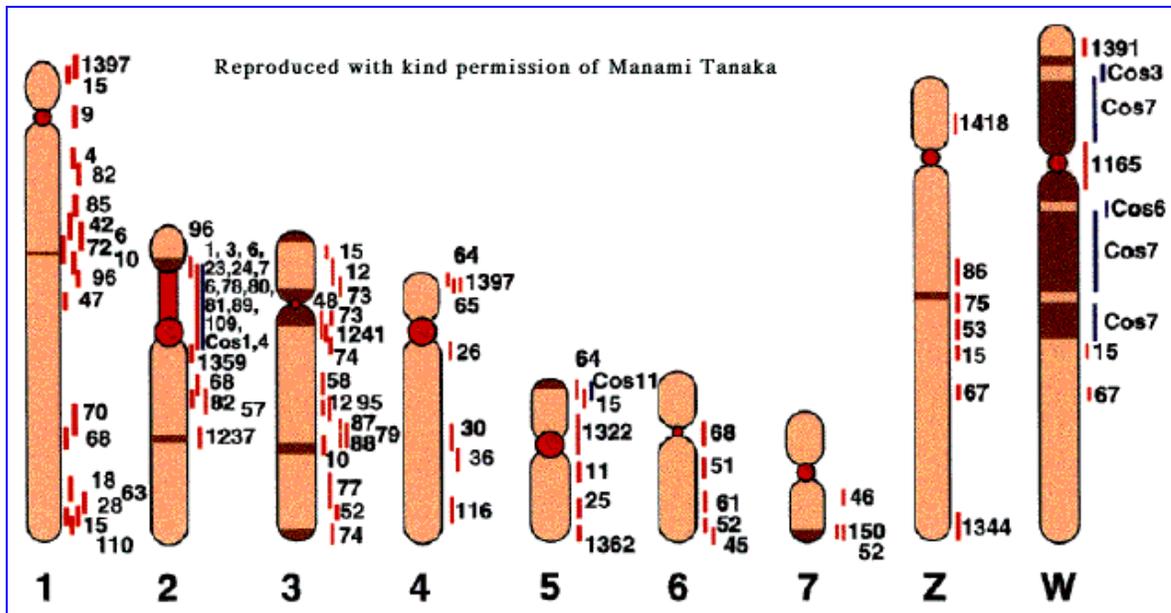
Muitas localizações foram realizadas por meio de FISH no mapeamento físico realizado no HGP, sobretudo para ordenar grandes fragmentos genômicos ou mesmo ESTs, bem como para mapear regiões de diversas doenças ligadas ao genoma e possíveis marcadores para estas (Horelli-Kuitunen *et al*, 1999).

1.8 – A Localização de DNA no Genoma de *S. mansoni* utilizando a técnica de FISH

Hirai e colaboradores, 1989 realizaram os primeiros estudos relacionados à construção do mapa físico do genoma de *S. mansoni*, em que dois genes precursores de proteínas da casca do ovo foram localizados em diferentes porções do cromossomo 2, além do elemento pW1, que compreende uma região de DNA repetitivo específico de fêmea (Webster *et al*, 1989), que, como esperado, foi estritamente localizado na região entre eucromatina e heterocromatina, eg3, do cromossomo W.

Com a mesma abordagem, elementos da família SM α e rDNA foram também localizados no genoma de *S. mansoni* (Hirai *et al*, 1993). Porém, a iniciativa de mapeamento físico maciço foi estabelecida desde que Hirai & Lo Verde, 1995 descreveram em detalhes os procedimentos para realizar a localização de genes de *S. mansoni* nas bibliotecas de grandes fragmentos genômicos disponíveis.

Embora os procedimentos para mapeamento físico do genoma do *S. mansoni* continuem sendo realizados, a última atualização do “status” do mapa físico é subestimada e pode ser visualizada no esquema abaixo:



http://fbpcu01.leeds.ac.uk/users/bmbao/schist_main.htm

Figura 2 – Representação esquemática da situação do mapeamento físico do genoma de *S. mansoni*, modificado de Tanaka *et al*, 1995. As letras e números com respectivos traços vermelhos ao lado de das figuras representativas dos cromossomos referem-se ao diferentes clones localizados. Os números são relativos a YAC clones e os códigos iniciados por Cos relativos a clones de cosmídios.

Uma vez disponibilizados os clones de BAC pelos membros do SGN, espera-se que pesquisadores sintam-se estimulados a colaborar com os estudos do mapeamento físico do genoma de *S. mansoni*, especialmente no sentido de encontrar marcadores, que se comportem de maneira reprodutiva a seqüências envolvidas em processos importantes da relação parasita-hospedeiros e que determinem aspectos relevantes ao desenvolvimento da patologia, como susceptibilidade ou resistência a tratamentos, bem como a própria patogenicidade e imunogenicidade induzidas pelo *S. mansoni* em seu hospedeiro definitivo.

Assim, o mapeamento físico por meio de FISH é uma estratégia que se mostrou eficaz e de grande importância, para complementar os resultados obtidos de esforços no sentido de obtenção da seqüência completa do genoma de *S. mansoni*. A elucidação da estrutura organizacional dos genes, e mesmo de seqüências não transcritas, dentro do genoma podem fornecer informações relevantes para aquisição de maior conhecimento sobre a biologia deste importante parasita.

II - Objetivos

2.1. - Objetivo Geral

Estabelecer a técnica de FISH (“*Fluorescence in situ Hybridization*”) para estudos envolvendo a localização física de genes ou fragmentos de DNA genômico clonados no genoma do *Schistosoma mansoni*, no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Ouro Preto.

2.2. - Objetivos Específicos

1. Selecionar Clones de BAC para serem localizados no genoma de *S. mansoni*, por meio da técnica de FISH.
2. Aperfeiçoar a técnica disponível para obtenção da preparação de esporocistos secundários de *S. mansoni*.
3. Localizar fisicamente DNA de Clones de BAC no genoma de *S. mansoni* por meio da técnica de FISH.

III - Materiais e Métodos

3.1. – Seleção dos Clones de BAC a serem localizados

Na biblioteca de fragmentos genômicos de *S. mansoni* clonados em vetor pBeloBAC11 construída por Le Paslier e Pierce, 2000, foram selecionados clones de BAC contendo seqüências de microssatélites, por meio da análise das seqüências de suas extremidades com o programa “Repeat Masker” na versão disponibilizada *on line* (<http://ftp.genome.washington.edu/cgi-bin/RepeatMasker>).

O mapeamento físico de clones de BAC contendo este tipo de seqüência é um dos objetivos prioritários do projeto de mapeamento delineado pelo TIGR.

3.2 – Alinhamento da seqüência do BAC2A em bancos de dados

Por meio do sistema de busca BlastN, disponibilizado *on line* pelo NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), a seqüência nucleotídica do BAC2A foi submetida à comparação com outras, em diferentes bancos de dados (nr, dbEST, GSS). O mesmo tipo de alinhamento foi realizado em relação às seqüências depositadas no banco de dados do Projeto Genoma do *S. mansoni* do Instituto Sanger utilizando a ferramenta de busca disponível na página eletrônica do projeto, contendo as seqüências geradas pelos grupos TIGR e SANGER (http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/s_mansoni).

3.3. - Preparo de Cromossomos Metafásicos a partir de Esporocistos Secundários de *Schistosoma mansoni*

Antes de iniciar os procedimentos, a solução hipotônica de colchicina foi preparada diluindo-se 0,5ml de uma solução estoque a 0,1% (p/v) em 9,5ml de água desmineralizada, filtrada em coluna mili Q. Foram então transferidos 1,5ml desta solução para uma pequena placa de Petri. Foi preparada também a solução fixadora, composta por uma mistura de

Etanol 99,5% (Merck®) e Ácido Acético (Merck®) na proporção 3:1 (v/v), respectivamente. Caramujos tiveram suas conchas quebradas por esmagamento entre duas placas de Petri 28 dias após infecção maciça por miracídios. A porção final do corpo do molusco, que compreende suas glândulas digestivas, ou hepatopâncreas, foi separada. Neste período de infecção esta região encontra-se altamente parasitada por esporocistos secundários de *S. mansoni*. Com o auxílio de duas pequenas pinças, os tecidos infectados foram transferidos para a solução hipotônica de Colchicina e reduzidos em fragmentos menores. Os tecidos foram então mantidos nesta solução durante 30min, à temperatura ambiente. Posteriormente estes tecidos foram transferidos para uma outra placa de Petri, contendo 2ml da solução fixadora. Os fragmentos de tecido em solução fixadora tiveram seus tamanhos reduzidos, utilizando-se as duas pinças, para formar uma suspensão, que foi transferida para um tubo plástico, tipo Falcon® de 15ml, no qual foi adicionada solução fixadora para ajustar o volume final da suspensão para 10ml. As células foram separadas dos aglomerados de tecidos por aspiração através de uma agulha número 18, acoplada e uma seringa BD® de 5ml de capacidade. Este processo foi repetido 5 vezes, sendo estas as condições em que houve menos ruptura de células e conseqüente perda de cromossomos metafásicos. A suspensão assim obtida foi mantida em repouso, à temperatura ambiente durante 10min. A suspensão sobrenadante obtida após a decantação foi transferida para um novo tubo de fundo cônico e submetida a uma centrifugação à rotação 1.500g, durante 5min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado após a centrifugação e 8,0ml da solução fixadora foram adicionados ao tubo para suspender o precipitado de células cuidadosamente, com auxílio de uma pipeta tipo Pasteur acoplada a uma pequena pêra. A suspensão novamente formada foi submetida à outra centrifugação à rotação 1.500g durante 5min e em temperatura ambiente. A suspensão do precipitado de células, seguida de centrifugação, como supracitado, foi repetida mais uma vez. Após a última centrifugação, o líquido sobrenadante foi descartado e o precipitado de células foi suspenso em 2,0ml de solução fixadora, sendo então mantido em congelador a -20°C até a preparação de lâminas.

A obtenção de maior número possível de células em metáfases por lâmina foi avaliada utilizando caramujos hospedeiros após diferentes tempos de infecção por miracídeos. Foram utilizados caramujos contando de 21 a 30 dias após a infecção para preparação de células fixadas, seguindo o mesmo procedimento descrito acima. As lâminas preparadas utilizando estas suspensões de células foram secadas e coradas com corante Giemsa (SIGMA®) a 1% em tampão fosfato 0,07M durante 2min, sendo posteriormente lavadas com água destilada e secas com auxílio de um secador de cabelos. As lâminas foram então observadas em microscópio ótico e analisadas em relação à quantidade de metáfases/lâmina por meio de contagem de metáfases em diferentes campos ao longo de cinco linhas verticais na área que compreende o material gotejado na lâmina. Foram avaliadas três lâminas de cada dia de infecção do caramujo hospedeiro.

3.4. - Preparo de Lâminas contendo cromossomos metafásicos

Antes de iniciar a preparação das lâminas, a sala a ser utilizada teve sua umidade monitorada por meio de um Higrômetro (Fisher®) tipo “de cabelo”. Os procedimentos foram realizados sempre quando a umidade relativa do ar encontrava-se próxima de 70%. Foram preparados, anteriormente, 20 ml da mesma solução fixadora usada na preparação da suspensão de células. Uma lâmina foi retirada do Etanol 99,5% (Merck®) e seca com lenço de papel. Uma gota da suspensão de células fixadas foi gotejada na região central da lâmina. Após o espalhamento e secagem parcial da solução, a superfície da lâmina adquiriu um aspecto granuloso na região onde se encontram as células. Adicionou-se em seguida uma gota da solução fixadora recém preparada e mantida em banho de gelo no mesmo local onde foi gotejada a suspensão de células. A lâmina assim preparada foi mantida em uma superfície plana para secagem em temperatura ambiente por 30 min, sendo posteriormente transferida para uma estufa a 37°C, para retirar o máximo de água, por um período de três dias. Ao final do processo de secagem, uma das lâminas preparadas era submetida à

coloração com corante GIEMSA 1%, com o objetivo de avaliar a qualidade dos cromossomos metafásicos obtidos durante a preparação.

Finda a secagem, as lâminas foram estocadas até o uso, em congelador a -70°C , acondicionada em caixa apropriada. Nesta temperatura, a lâmina pode ser mantida viável por até dois anos.

Para posterior utilização desta lâmina, esta era retirada do congelador e imediatamente colocada em Etanol 99,5% (Merck[®]), visando evitar sua hidratação, que interfere negativamente em processos subseqüentes.

As etapas supracitadas de preparo dos esporocistos e das lâminas podem ser visualizadas no esquema mostrado na figura 3:

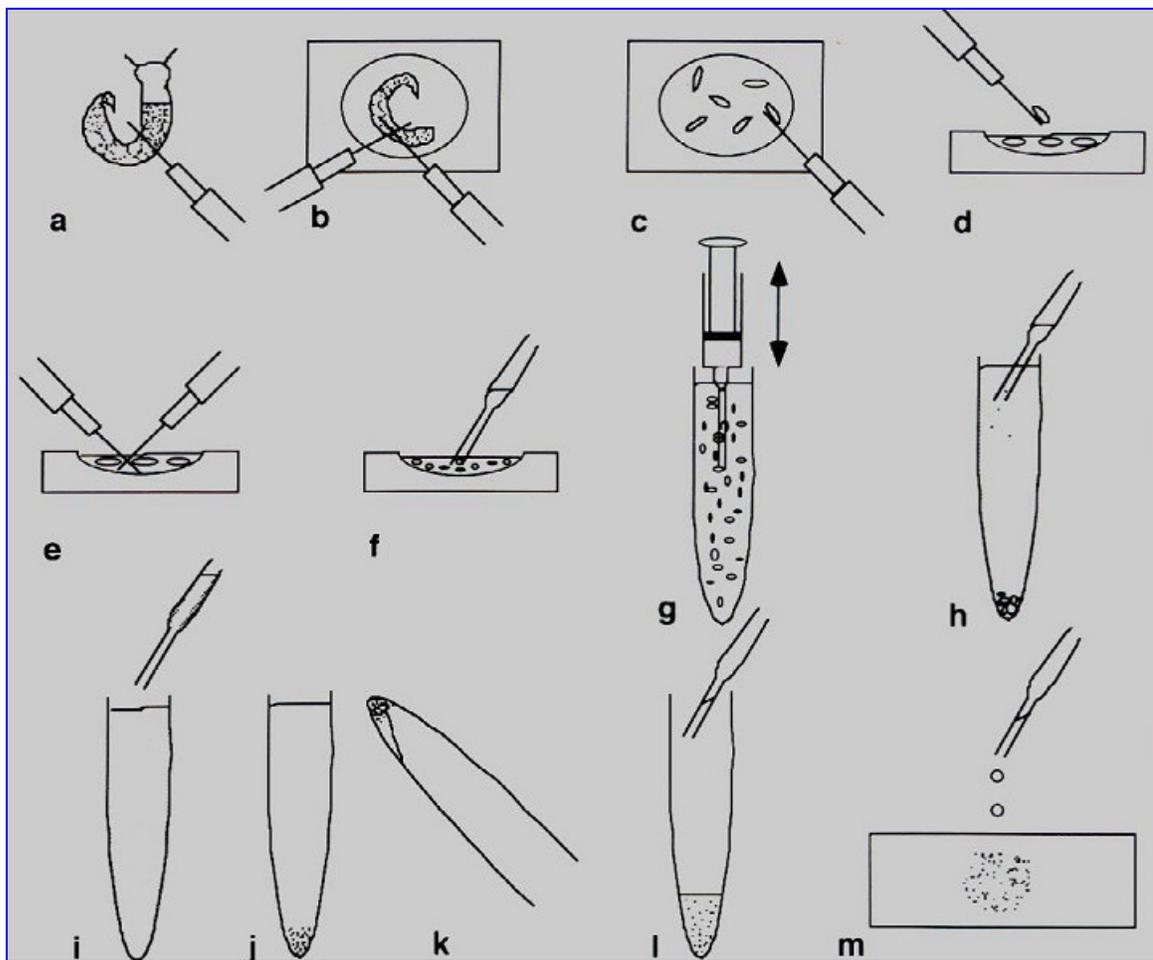


Figura 3 - Representação esquemática das etapas de preparo de células de esporocisto secundário fixadas e de lâminas contendo cromossomos metafásicos de *S. mansoni* – A dissecção da região de hepatopâncreas do *B. glabrata* pode ser visualizada em **a** e **b**. A letra **c** representa a incubação dos tecidos retirados em solução hipotônica de Colchicina. De **d** a **f** observam-se o início da fixação das células, a redução do tamanho dos tecidos e por fim a desagregação dos aglomerados formados por aspersão em uma seringa. De **h** a **l** pode-se ver a decantação dos restos celulares, lavagens dos esporocistos coletados no sobrenadante, seguida da suspensão final do precipitado celular em pequeno volume da solução fixadora. A preparação das lâminas contendo os cromossomos metafásicos é representada na letra **m**. (Adaptado de Hirai *et al*, 1995).

3.5 - Teste de aglutinação celular mediada por lectinas

Com objetivo de tentar melhorar a qualidade das preparações de células fixadas de esporocistos secundários de *S. mansoni* tentou-se realizar um ensaio de aglutinação celular mediada por lectinas com as células de *S. mansoni*. Este ensaio baseia-se na ligação específica de lectinas aos seus respectivos determinantes carboidratos presentes na superfície das células presentes na suspensão. Espera-se que os esporocistos sejam seletivamente aglutinados pela ligação da lectina e recuperados a partir do aglomerado celular obtido após uma posterior etapa de sedimentação. Para este teste foram utilizadas lectinas disponíveis em nosso laboratório, que se encontram listadas na Tabela 1:

| Lectina | Carboidrato |
|-------------------------------------|--------------------------|
| <i>Canavalia ensiformis</i> (Con A) | Manose |
| <i>Helix pomatta</i> (HPL) | N-acetil-D-Galactosamina |
| <i>Arachis hypogaea</i> (PNA) | D-Galactose |
| <i>Ulex European</i> (UEA I) | L-Fucose |

Tabela I – Lectinas utilizadas no teste de aglutinação celular e seus respectivos carboidratos ligantes.

Para a realização do teste de aglutinação a preparação de células fixadas foi feita como descrito anteriormente utilizando caramujos após 28 dias de infecção. Ao final da preparação o precipitado celular foi suspenso em 4ml de solução fixadora em um tubo de ensaio. A cada tubo de ensaio contendo esta suspensão de células fixadas foi adicionada uma pequena quantidade de solução estoque de uma das lectinas, de forma a se obter uma concentração final de 100µg/ml. Em um tubo controle foi adicionada apenas uma pequena quantidade de tampão PBS a 5% em lugar de lectina. A suspensão foi homogeneizada por leve agitação do tubo e este foi mantido em repouso durante 30min para decantação. Foram

então transferidos 3ml do líquido sobrenadante para um novo tubo. Os sobrenadantes e decantados foram então submetidos a uma centrifugação a 1000g durante 5min. Após centrifugação os sobrenadantes foram descartados e os precipitados celulares foram suspensos em 0,8ml da solução fixadora. As suspensões assim obtidas foram utilizadas para preparação de lâminas seguindo o procedimento descrito acima. Após a secagem, as lâminas foram coradas com corante Giemsa (SIGMA[®]) a 1% em tampão fosfato 0,07M durante 2min, sendo posteriormente lavadas com água destilada e secas com auxílio de um secador de cabelos. As lâminas foram então observadas em microscópio ótico, sendo analisadas em relação à obtenção de boas metáfases, bem como em relação ao enriquecimento dos esporocistos, além da presença de restos celulares e outras possíveis contaminantes.

3.6. - Cariotipagem de *Schistosoma mansoni* utilizando o método “C-banding”

A lâmina preparada, contendo cromossomos metafásicos, foi tratada com HCl (Vetec[®]) 0,2M durante 30 min, à temperatura ambiente. A lâmina foi então lavada com água destilada e transferida uma solução de Ba(OH)₂ (SIGMA[®]) a 5% (p/v) contida em uma cuba de vidro para coloração e mantida em um banho maria a 55°C, durante 10 min. Após este tratamento, a lâmina foi novamente lavada com água destilada e enxaguada em solução SSC 2X também contida em um cuba de vidro para coloração e mantida em um banho maria a 55°C, durante 10 min. Em seguida, a lâmina foi mais uma vez lavada com água Mili-Q e logo depois coberta com a solução: 4% Giemsa (SIGMA[®]) em tampão fosfato 70mM pH 6,8 (4,8g NaHPO₄ + 4,5g K₂HPO₄/1L dH₂O). Este tratamento estendeu-se por 2 horas, à temperatura ambiente. A lâmina foi então lavada com água destilada e secada com um secador de cabelos.

3.7. - Extração de DNA de Clones de BAC (MAXI PREP)

Para a preparação de DNA de BAC clone, foi utilizado o sistema QIAGEN tip100 (QIAGEN), cujo componente principal é uma coluna de cromatografia de troca iônica. Para a extração do DNA empregou-se o método da lise alcalina previamente descrita (Maniatis et al., 1989) adaptada para o sistema de escolha, como descrito a seguir.

A colônia de bactéria selecionada, contendo o DNA de BAC que se deseja purificar, foi inoculada em 5ml de meio de cultura LB (Lúria-Bertani) contendo o antibiótico Cloranfenicol na concentração de 12,5mg/ml. Esta pequena cultura foi incubada a 37 °C e sob agitação constante de 210RPM por aproximadamente 14 a 16 horas. Fez-se então o inóculo de 1ml desta cultura em 100 ml do mesmo meio seletivo, contido em um frasco erlemeyer de 500ml de capacidade, sendo esta nova cultura incubada nas mesmas condições, durante 16 horas. Ao final da incubação, observou-se o crescimento bacteriano e dividiu-se o volume da cultura em dois tubos tipo Falcon[®] de 50ml de capacidade, seguindo-se uma centrifugação a 4500g, 4°C, durante 20 min para recuperação das células bacterianas obtidas em cultura. Ao final da centrifugação, desprezou-se o líquido sobrenadante, sendo cada precipitado, “*pellet*” celular, suspenso, com auxílio de um agitador tipo Vortex[®], em 10ml de tampão Tris-HCl 50mM/EDTA 10mM/pH 8, contendo a enzima RNase (Life Technologies[®]) na concentração final de 100µg/ml. A cada suspensão obtida adicionaram-se 10ml da solução de lise, composta de 0,2M NaOH/1%SDS. Homogeneizou-se o conteúdo dos tubos por inversão, não mais do que seis vezes, seguindo-se uma incubação em temperatura ambiente durante 5min. A cada tubo foram então adicionados 10 ml da solução de neutralização, composta de tampão acetato de potássio (Vetec[®]) 3M, previamente resfriada em banho de gelo. Homogeneizou-se o conteúdo de cada tubo vagarosamente, por inversão e incubou-se em banho de gelo durante 15 min. Seguiu-se uma centrifugação a 7.500g, 4°C, durante 30 min, coletando-se os líquidos sobrenadantes, tomando-se o cuidado de evitar ao máximo a presença do precipitado formado, composto essencialmente de restos celulares. Equilibrou-se uma

coluna QIAGEN tip100 (QIAGEN), cuja matriz é composta por Sílica-DEAE (Dietil amino etano), adicionando-se a esta 4ml do tampão QBT [50mM MOPS; 0,75M NaCl pH 7,0; 15%Isopropanol (v/v); 1,5% Triton x-100 (v/v)]. À coluna equilibrada foi adicionado o líquido sobrenadante contendo o DNA do BAC clone. A lavagem da coluna foi então promovida adicionando-se 10ml do tampão de lavagem QC [50mM MOPS; 1M NaCl pH7,0; 15%Isopropanol (v/v)]. Esta lavagem foi repetida uma outra vez. Por fim, o DNA de BAC foi eluído da matriz da coluna por meio da passagem de 0,8 ml do tampão QF de eluição [50mMTris-HCL pH8,5; 1,25M NaCl; 15%Isopropanol (v/v)] à 65°C. Esta eluição foi repetida outras 5 vezes nas mesmas condições, sendo o volume de 0,8mL recolhido em tubos separados de 1,5ml de capacidade. A cada tubo, contendo 0,8ml de eluato, foram adicionados 560µl de isopropanol puro (Vetec[®]) para precipitação do DNA eluído. O conteúdo de cada tubo foi então homogeneizado por inversão, sendo logo em seguida centrifugado à 15.000 g, durante 30 min, a temperatura de 4°C. Ao final da centrifugação, retirou-se cuidadosamente o líquido sobrenadante e adicionou-se um volume de aproximadamente 100µl de Etanol (Merck[®]) 70% para lavagem. Repetiu-se a centrifugação, usando-se as mesmas condições anteriormente descritas e ao final desta centrifugação desprezou-se o pequeno volume de líquido sobrenadante, deixando o DNA puro e precipitado secar em temperatura ambiente. Ao final da secagem, o DNA purificado foi suspenso em água desmineralizada filtrada em coluna Mili Q. Sua concentração e grau de pureza foram determinados por meio de leitura espectrofotométrica em comprimentos de onda 260nm e 280nm, sendo o volume final ajustado para se obter concentração final de DNA de aproximadamente 300µg/ml.

3.8 - Avaliação do DNA extraído

Para avaliar a integridade do DNA extraído foram realizadas hidrólises com as enzimas de restrição *Hind III* e *Not I*, sendo esta última classificada dentre aquelas que promovem cortes raros no DNA. Para tanto, procedeu-se como segue:

Tubo 1

DNA do BAC2A – 3µl(990ng de DNA);

Hind III Buffer 10X - 1µl;

BSA 10µg/µL – 0,1µl

Água Mili Q estéril q.s.p. 10µl – 4,9µl

Misturar bem com auxílio da pipeta

Enzima *Hind III* (Life technologies®)– 1,0µl

Incubar a 37°C durante 2 horas

Tubo 2

DNA do BAC2A– 3µl (990ng de DNA);

Not I Buffer 10X - 1µl;

BSA 10µg/µl – 0,1µl

Água Mili Q estéril q.s.p. 10µl – 4,9µl

Misturar bem com auxílio da pipeta

Enzima *Not I*(Life technologies®) – 1,0µl

Incubar a 37°C durante 2 horas

As reações foram interrompidas pelo aquecimento dos tubos a 70°C durante 10min. Uma pequena alíquota de cada reação foi então submetida a uma eletroforese em gel de agarose a 0,8% para conferir a digestão com as enzimas *Not I* e *Hind III* e o grau de pureza do DNA extraído. As bandas relativas aos DNAs de diferentes tamanhos foram reveladas pela adição de Brometo de Etídio ao gel e observação em trans-iluminador ao término da corrida. O gel foi fotografado com uma câmera digital OLYMPUS® ZOOM 3040, acoplada a um filtro amarelo e posicionada adequadamente por meio de um suporte.

3.9. - Marcação de DNA de BAC Clone

Para a marcação dos DNAs de Clones de BAC com biotina, o sistema BIOPRIME “Labeling System” (GIBCO/BRL) foi empregado. Para iniciar o procedimento, 800ng do DNA de BAC clone purificado foi diluído em 10µl de H₂O desmineralizada estéril e submetido a uma desnaturação, sendo esta solução aquecida a 100°C durante 5min e transferida imediatamente para um banho de gelo, sendo nele mantida por outros 2min. Assim feito, a mistura reacional foi composta pela adição das seguintes soluções ao microtubo contendo o DNA previamente desnaturado:

20µl de solução dos “primers” aleatórios 2,5X concentrada;

5µl de solução de dNTPs 10X concentrada, contendo 14-dCTP-biotina;

14µl de H₂O desmineralizada, livre de RNase;

1µl da solução da enzima *Klenow* polimerase na concentração de 40U/µl;

A mistura reacional com volume final de 50µl foi homogeneizada gentilmente com auxílio de um pipetador e incubada em estufa a 37°C, durante 3horas. A reação foi parada por aquecimento a 65°C durante 10min. O vapor condensado na tampa do tubo foi sedimentado no fundo por meio de uma curta centrifugação. Foi então promovida a precipitação do DNA marcado pela adição das seguintes soluções ao microtubo contendo a mistura reacional:

145µl de H₂O desmineralizada e esterilizada em autoclave;

74µl de solução NaCl 5M;

2µl DNA de esperma de Salmão (SIGMA®);

2µl de solução de DNA genômico de *Schistosoma mansoni*;

467µl de Etanol 99,5% (MERCK®) resfriado em congelador a -20°C;

Esta mistura foi homogeneizada com auxílio de um agitador CERTOMAT® MV/ B. Braun Biotech International, tipo Vortex®. A mistura foi então submetida a uma centrifugação à 15.000g, durante 10min e a 4°C, tomando-se o cuidado de marcar o microtubo, de forma a

facilitar a visualização do precipitado, após a centrifugação. O Líquido sobrenadante foi então descartado e o precipitado foi mantido em temperatura ambiente durante 20min para secagem. O precipitado assim obtido foi suspenso em 40µl de formamida re-destilada, ultra-pura (Invitrogen[®]) resfriada. Esta solução, contendo o DNA marcado e devidamente purificado, foi mantida a 4°C até a sua utilização.

3.10. - Desnaturação do DNA Marcado

Foi preparada uma solução pela mistura de 45µl de sulfato de dextran (SIGMA[®]) 30% (v:v) com 15µl de solução SSC 20X concentrada. Foram adicionados 30µl desta solução previamente preparada a um microtubo contendo 20µl da solução de DNA marcado em formamida re-destilada, ultra-pura.(Invitrogen[®]) Esta mistura foi homogeneizada gentilmente com auxílio de um pipetador. Posteriormente, a mistura foi aquecida a 75°C durante 10 min para desnaturar o DNA, seguida de uma incubação a 37°C durante outros 30 min, antes de ser adicionada à lâmina preparada, contendo os cromossomos metafásicos, com seu DNA também devidamente desnaturado.

3.11. - Desnaturação da lâmina contendo cromossomos metafásicos

Para este procedimento, foram previamente preparadas as seguintes soluções:

Cuba 1 – SSC 2X pH12,5

5ml de solução SSC20X concentrada;

45ml de H2O desmineralizada;

0,5ml de solução NaOH (Vetec[®]) 5M;

Cuba 2 – etanol 70%

35ml de etanol 99,5% (MERCK®);

15ml de H₂O desmineralizada;

Cuba 3 – etanol 100%

50ml de etanol 99,5% (MERCK®);

Uma vez preparadas as soluções, iniciou-se o procedimento de desnaturação, com a incubação da lâmina na cuba 1, contendo a solução SSC 2X pH12,5 durante 4,5min. Em seguida, a lâmina foi transferida para a cuba 2, contendo etanol 70% por mais 5 min. Por fim, a lâmina foi transferida para a cuba 3, com etanol 100%, onde foi mantida por mais 5 min. Findas as incubações citadas, a lâmina foi submetida a uma secagem à temperatura ambiente antes da adição do DNA marcado e devidamente desnaturado sobre ela. Tomou-se ainda o cuidado identificar cada lâmina, antes da adição do DNA marcado.

3.12. - Hibridização

O DNA previamente marcado e devidamente desnaturado, compondo um volume de 50µl foi adicionado à região central da lâmina recém-preparada, onde se encontram os cromossomos metafásicos. A lâmina foi coberta com um pedaço de fita Parafilm (American National Can™) e posteriormente colocada em uma câmara úmida, feita com uma placa de Petri contendo papel de filtro umedecido com solução SSC 2X no fundo. Este conjunto foi transferido para uma estufa a 37°C e nela foi mantido para incubação durante 20 horas.

3.13. - Detecção do Sinal após Hibridização

Antes de iniciar o procedimento, as seguintes soluções foram preparadas e devidamente acondicionadas em cubas de vidro separadas:

Cuba 1 – 40% de Formamida em SSC 2X

20ml de formamida re-destilada ultrapura (Invitrogen[®]);

5ml de solução estoque SSC 20X concentrada;

25ml de água mili-Q;

Cuba 2 – SSC 2X

10ml de solução estoque SSC 20X concentrada;

40ml de água mili-Q;

Cuba 3 – SSC 2X

10ml de solução estoque SSC 20X concentrada;

40ml de água mili-Q;

Cuba 4 – Tampão BN (0,1M NaHCO₃/0,1%IGEPAL)

5ml de solução estoque 1M NaHCO₃ (Vetec[®]);

0,5ml de solução estoque 10% IGEPAL (SIGMA[®]);

45ml de água mili-Q;

As cubas 1 e 2 foram mantidas em banho maria a 42°C durante 35min, de forma a garantir que as soluções também alcançassem esta temperatura. Foi então retirada a fita Parafilm que cobria a lâmina no processo de hibridação, tomando-se o cuidado de esgotar o excesso de solução remanescente. A lâmina foi incubada na cuba 1, à 42°C durante 10min. Ao final desta incubação, a lâmina foi transferida para a cuba 2, também à 42 °C, sendo nela mantida durante outros 10min. A lâmina foi então transferida para a cuba 3 à temperatura ambiente, em que também foi incubada durante 10min. Finalmente, a lâmina foi transferida para a cuba 4 à temperatura ambiente, sendo nela incubada durante outros 10min.

Findas as lavagens, foram adicionados à lâmina ainda úmida com a última solução 50µl da solução de bloqueio recém preparada com a seguinte composição:

Solução de bloqueio (5%Leite em pó desnatado em tampão BN)

5µl da solução estoque 1M NaHCO₃ (Vetec®);

2,5µl de solução 1%IGEPAL (SIGMA®);

25µl da solução estoque 10% de Leite em pó desnatado (Nestlé®) em Água Mili-Q;

15µl de Água Mili-Q;

A lâmina foi então coberta com um pedaço de fita Parafilm e em seguida foi incubada durante 5 min a temperatura ambiente e em câmara úmida com solução SSC 2X. Transcorrido o tempo do bloqueio, foi retirada a fita que cobria a lâmina e o excesso de solução sobre a lâmina foi drenado com auxílio de papel de filtro. À lâmina ainda úmida foram adicionados 50µl da solução do conjugado Avidina FITC, com a seguinte composição:

Solução de Avidina FITC (FITC 1:100 em tampão BN com 5%Leite em pó desnatado)

5µl da solução estoque 1M NaHCO₃ (Vetec®);

2,5µl de solução 1% IGEPAL (SIGMA®);

25µl da solução estoque 10% de leite em pó desnatado (Nestlé®) em água mili-Q;

14µl de água mili-Q;

1µl de solução do conjugado avidina-FITC (Gibco BRL®);

A lâmina foi novamente coberta com fita Parafilm e incubada a temperatura de 37°C em câmara úmida com solução SSC 2X durante 1 hora. Retirou-se então a fita que cobria a lâmina e esta foi transferida para uma cuba de vidro coberta com papel alumínio para impedir a incidência interna de luz e contendo o tampão BN (0,1M NaHCO₃/0,1% IGEPAL). Todo este procedimento foi realizado à temperatura ambiente. Esta cuba encontrava-se fixada à plataforma de um agitador do tipo “Shaker”, o que permitiu a lavagem da lâmina com o referido tampão, ao abrigo da luz e sob agitação constante de 120 RPM durante 5min. Transcorrido o tempo, o tampão utilizado na lavagem foi substituído e o processo foi repetido. O excesso do tampão de lavagem foi retirado com auxílio de papel de filtro e, sobre a lâmina ainda úmida, aplicou-se a solução de contra coloração. Esta

solução foi composta pela mistura de 20µl da solução de anti fade (1mg *p*-fenilenodiamino - SIGMA[®] + 0,2ml tampão fosfato 0,1M pH 7,4 + 0,8ml glicerol - SIGMA[®]), 1µl do fluorocromo iodeto de propídio (SIGMA[®]) 0,5mg/ml e 12µl de outro fluorocromo, 4,6-diamino-2-fenil indol (DAPI/SIGMA[®]) 0,05mg/ml. Cobriu-se então a lâmina com uma lamínula, tomando-se o cuidado de evitar a formação de bolhas, pois estas atrapalham a observação microscópica. Retirou-se o excesso da solução nas bordas da lâmina, com auxílio de um lenço de papel e manteve-se a lâmina em refrigerador a 4°C e em câmara úmida por um tempo mínimo de 30min, antes de se proceder a observação microscópica. Quando a observação não pôde ser realizada no mesmo dia, a lâmina foi guardada nas mesmas condições supracitadas.

3.14 – Observação ao Microscópio de Fluorescência e Captura de Imagens

As lâminas foram observadas a princípio em um microscópio OLYMPUS[®] modelo BX51, equipado com epi-iluminação para microscopia de fluorescência, sendo a captura das imagens realizada por uma câmera digital OLYMPUS[®] modelo ZOOM 3040. Esta câmera foi acoplada ao microscópio por meio de um adaptador. As fotos foram capturadas sob condições de ISO100 de exposição, sendo posteriormente descarregadas em computador e formatadas no programa MICROSOFT Imaging[®].

Para tentar melhorar a resolução e, conseqüentemente a qualidade das fotos obtidas foi posteriormente utilizado um microscópio ZEISS[®] modelo Axiophoto, equipado com epi-iluminação para microscopia de fluorescência além de “Lasers” para microscopia confocal. Igualmente, a captura das imagens foi realizada com a mesma câmera digital OLYMPUS[®] modelo ZOOM 3040, que também foi acoplada ao microscópio por meio de um adaptador. As fotos foram capturadas sob condições de ISO400 de exposição. As fotos obtidas foram descarregadas em computador e formatadas no programa MICROSOFT Imaging[®].

IV - Resultados

4.1. – Seleção dos Clones de BAC

Foram selecionados 19 Clones de BAC contendo seqüências de microssatélites de *S. mansoni* sendo cada um destes Clones de BAC selecionados um representante de um determinado “cluster” de finais de seqüência de vários Clones de BAC. E dentre estes 19 Clones de BAC selecionados, foi realizada a localização cromossômica daquele designado como BAC 2A, que pode ser visto em destaque na Tabela 1.

| Relação de Clones de BAC Selecionados (Parte 1) | | | | |
|--|-----------------------------|----------------------------|--|--|
| 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 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 |

| Relação de Clones de BAC Selecionados (Parte 2) | | | | |
|---|----------------------|---------------------|--|---|
| Código LBBM | Localização do Clone | Identidade do Clone | Código do GenBank | Contig |
| BAC 11A | 033-C-16 | BAC –130B8 | BH187252 BH187251 | 12 - BH20117 AL62420 BH18725 BH21071 |
| 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 AL626591BH189653 |
| 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 II – Relação dos Clones de BAC selecionados para serem localizados por meio da técnica de FISH. As colunas representam, respectivamente, a codificação utilizada pelo Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBBM), a localização original do clone em placa, a codificação do clone no laboratório de origem e o código de acesso no banco de dados (“GenBank”). A coluna *contig* relaciona os BAC clones que pertencem a cada cluster. N/C – Não consta.

Resultados

Na figura 4, pode-se ver o quadro resumo da análise no programa Repeat Masker da sequência nucleotídica de uma das extremidades do BAC 2A, que o identifica no banco de dados em que consta. Nela pode-se identificar o elemento repetitivo encontrado, salientando-se sua natureza, localização, dentre outras informações:

RepeatMasker Results

Repeat Annotations

| SW score | perc div. | perc del. | perc ins. | query sequence | position begin | position end | in query (left) | matching repeat | repeat class/family | position begin | position end | in repeat (left) | ID |
|----------|-----------|-----------|-----------|-----------------|----------------|--------------|-----------------|----------------------|---------------------|----------------|--------------|------------------|----|
| 180 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | <u>AL619337</u> | 91 | 110 | (622) + | (ATG)n Simple_repeat | | 2 | 21 | (0) | 1 |

Masked Sequence:

```
>AL619337
CAATTGACTCABGATCTTACCTATTAGAATATCTATATGGTTATTGGCCT
AAGCGTAGTTAACACTTTGATAATGTGATTGAGCTTACCT
```

