

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Estudo de genes expressos diferencialmente durante o processo de  
estrobilização *in vitro* de *Mesocestoides corti*

Cristiano Valim Bizarro

Tese submetida ao Programa de Pós-  
graduação em Biologia Celular e Molecular da  
UFRGS como requisito parcial para a  
obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira

Co-orientadora: Dra. Mari Cleide Sogayar

Porto Alegre

Abril, 2005

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos (LBMC) do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal para o Ensino Superior (CAPES), pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e pela Rede para Pesquisa e Treinamento em Doenças Parasitárias no Cone Sul da América Latina (RTPD Network). No LBMC, foram realizados os cultivos *in vitro* de *Mesocestoides corti*, a organização dos estoques das bibliotecas de cDNA, o seqüenciamento automático dos clones, a análise *in silico* das seqüências e as extrações de RNA e otimizações iniciais para os experimentos de RT-PCR em tempo real. No Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, foram realizadas as otimizações iniciais das extrações de RNA, a construção das bibliotecas de cDNA subtraídas e os experimentos de validação das bibliotecas por hibridização, sendo financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). No Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP), Fundação Oswaldo Cruz, em Curitiba, foram realizados os experimentos de RT-PCR em tempo real.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Dr. Henrique B. Ferreira e Dra. Mari Cleide Sogayar, e ao Dr. Arnaldo Zaha pela amizade, atenção e dedicação dispensadas durante a realização deste trabalho.

Aos membros da Comissão de Acompanhamento, Dr. Luiz A. Basso e Dr. Arthur G. Fett Neto, pelas sugestões e críticas dispensadas.

À Dra. Irene S. Schrank, pela revisão do presente trabalho.

A todo o pessoal dos laboratórios 204, 206 e Genoma, pela amizade, colaboração e discussões proporcionadas.

À Rede Genoma PIGS.

À Adriana F. Schuck, à Deise P. Potrich, à Christyanne T. Martinkovics e à Roberta A. Campos, pela ajuda indispensável no seqüenciamento das bibliotecas de cDNA.

À Anelise Volkweiss, ao Felipe K. Ricachenevsky e ao Manuel Loncan, pela amizade e por tudo o que aprendi com vocês.

Ao pessoal do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto de Química - USP, em especial ao Mário H. Bengtson, à Katlin B. Massirer e ao Christian Colin, pela amizade, colaboração e ensinamentos.

Ao Dr. Samuel Goldenberg, ao Dr. Marco A. Krieger e ao pessoal do IBMP, em especial à Celina, à Dani e ao Felipe, pelas discussões e pela oportunidade de realizar os experimentos de RT-PCR em tempo real.

Aos colegas de outros laboratórios do Centro de Biotecnologia, em especial à Valéria Dutra e ao Charley C. Staats, pela amizade e discussões proveitosas.

Aos professores do Programa de Pós- graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS (PPGBCM), em especial ao Dr. Augusto Schrank, à Dra. Marilene H. Vainstein e ao Dr. Sérgio C. da Silva.

À minha família, mãe, pai, Gustavo, Zilca, Airton, Marcelo, Cris, pela colaboração, apoio e incentivo.

À Adri, por todo o amor, carinho, tolerância, apoio, dentro e fora do laboratório, dispensados durante este período.

Aos funcionários do Centro de Biotecnologia, em especial à Silvia R. Centeno, ao Luciano Saucedo, à Graziela Ramos, ao Milton e ao Paulo, pela amizade e colaboração.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em especial ao Centro de Biotecnologia.

Aos órgãos de fomento CNPq, FAPERGS, CAPES, RTPD Network e FAPESP, pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

## ÍNDICE

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades	7
Lista de Figuras	9
Lista de Tabelas	11
Lista de Quadros	12
Resumo	13
Abstract	14
1. Capítulo I	15
1.1. Introdução	16
1.1.1. Lophotrochozoa, Ecdysozoa e Deuterostomia: o impacto das novas filogenias no estudo dos platelmintos.	18
1.1.2. Reconstituições do Urbilateria	21
1.1.3. Segmentação	23
1.1.4. Segmentação e proglotização em cestódeos	26
1.1.5. <i>Mesocestoides corti</i>	27
1.1.6. Metodologias para análises de expressão gênica	30
1.1.7. Tecnologia de RDA	31
1.1.8. RT-PCR em tempo real	33
1.2. Objetivos	36
2. Capítulo II	38
2.1. Manuscrito submetido para publicação na revista <i>Molecular and Biochemical Parasitology</i> , em fevereiro de 2005	38
2.2. Adendo: Construção das bibliotecas subtraídas por cDNA RDA	77

2.3.	Comprovante de submissão do manuscrito	84
3.	Capítulo III: Ensaio de RT-PCR em tempo real	86
3.1.	Metodologia	87
3.1.1.	Experimentos de cultivo de <i>M. corti</i> para extração de RNA total	87
3.1.2.	Extração de RNA total	87
3.1.3	Síntese de cDNA	88
3.1.4	Projeção e síntese de <i>primers</i>	89
3.1.5	Reações de amplificação	89
3.2.	Resultados	92
4.	Capítulo IV: Discussão e Referências Bibliográficas	99
4.1.	Discussão	100
4.1.1.	Validação das bibliotecas	101
4.1.2.	Bibliotecas DP2 Direta e DP2Reversa: comparações e perspectivas	111
4.2.	Referências Bibliográficas	114
4.3.	Mini-currículo do autor	125

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

A	adenina.
aa	aminoácido(s).
ATP	adenosina trifosfato.
BAEE	etil-éster de N <sub>α</sub> -benzoil-L-arginina.
bp	par de base(s).
C	citossina.
°C	graus Celsius.
cDNA	DNA complementar.
Ci	Curie.
cm	centímetro(s).
DDRT-PCR	apresentação diferencial de produtos de transcrição reversa amplificados pela reação em cadeia da polimerase.
DNA	ácido desoxirribonucléico.
DNase	desoxirribonuclease.
dNTP	desoxirribonucleosídeo trifosfato.
DTT	ditiotreitól.
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético.
EST(s)	<i>expressed sequence tag(s)</i> ("etiqueta" de sequência expressada).
G	guanina.
h	hora(s).
kb	quilobase(s). 1 kb corresponde a 1 X 10 <sup>3</sup> pares de bases.
kDa	quilodalton(s). 1 kDa corresponde a 1 X 10 <sup>3</sup> daltons.
L	litro(s).
M	molar.
min	minuto(s).
mL	mililitro(s). 1 ml corresponde a 1 x 10 <sup>-3</sup> litros.
mRNA <sub>(s)</sub>	RNA <sub>(s)</sub> mensageiro(s).
nt	nucleotídeo(s).
ORF	<i>open reading frame</i> (fase de leitura aberta).

PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> (salina tamponada com fosfato).
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase).
RNA	ácido ribonucléico.
RNase	ribonuclease.
RPMI	acrônimo de <i>Roswell Park Memorial Institute</i> .
RT-PCR	<i>reverse transcription - polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase a partir de produtos de transcrição reversa).
s	segundo(s).
T	timina.
TE	Tris + EDTA.
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P] dATP	desoxiadenosina 5'-[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P] trifosfato.
$\mu$ g	micrograma(s). 1 $\mu$ g corresponde a $1 \times 10^{-6}$ gramas.
$\mu$ L	microlitro(s). 1 $\mu$ l corresponde a $1 \times 10^{-6}$ litros.
$\mu$ m	micrômetro(s). 1 $\mu$ m corresponde a $1 \times 10^{-6}$ metros.
$\mu$ M	micromolar. 1 $\mu$ M corresponde a $1 \times 10^{-6}$ molar.



## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo I:

Figura 1.1.	Filogenias de metazoários.	20
Figura 1.2.	Três hipóteses para a evolução da segmentação durante a evolução bilatéria.	25
Figura 1.3	Esquema simplificado do ciclo vital de <i>Mesocostoides corti</i> .	29

### Capítulo II:

Figure 1	Validation of subtracted cDNA libraries by hybridization with cDNA synthesis consensus products	67
Figure 2	Macroarrays of PCR-amplified fragments from DP2 Forward and DP2 Reverse clones.	68
Figure 3	Virtual Northern blot analysis of selected clones from the DP2Forward library.	70
Figure 4	Clustering of reads corresponding to different clones from DP2 Forward and DP2 Reverse libraries.	71
Figure 5	Functional categorization of annotated sequences from tetrathyridia (dp2rev) and segmented worms (dp2forw) subtracted cDNA libraries.	72
Figure 6	Multiple sequence alignment of <i>Mesocostoides corti</i> cDNA sequence with metazoan MTA family members.	73
Figure 7	Multiple sequence alignments of <i>Mesocostoides corti</i> cDNA sequences corresponding to different portions of a CHD 3/4 class member.	74
Figure 8	Alignment of different N-terminal portions of EHD2 domains from Osa-like gene products.	75
Figure S1	Virtual transcripts from <i>Mesocostoides corti</i> .	76

Figura 2.1.	Representação esquemática dos adaptadores utilizados nos experimentos de cDNA RDA.	78
Figura 2.2.	Produtos de amplificação de sínteses de cDNA pelo método SMART antes e após clivagem com <i>Sau3AI</i> .	78
Figura 2.3.	cDNA RDA: padronização do número de ciclos de amplificação dos cDNAs clivados com <i>Sau3AI</i> e ligados ao adaptador R.	80
Figura 2.4.	cDNA RDA: representações.	80
Figura 2.5.	cDNA RDA: produto diferencial primário (DP1).	82
Figura 2.6.	cDNA RDA: produto diferencial secundário (DP2).	82
Figura 2.7.	cDNA RDA: PCR de colônia de clones isolados das bibliotecas DP2 Direta e DP2 Reversa.	83

### Capítulo III:

Figura 3.1.	Eletroforese em gel de agarose 1,2% de extrações de RNA total de <i>M. corti</i> .	93
Figura 3.2.	Exemplos ilustrativos de curvas de amplificação e das curvas de dissociação correspondentes.	93
Figura 3.3.	Curvas-padrão dos genes normalizadores PDCD4, PABP e do gene SR6.	94
Figura 3.4.	Curvas-padrão dos genes CHD, Hindsight, LBA e RME-8.	95

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo II:

Table 1.	DP2 Forward and DP2 Reverse libraries: general aspects	66
----------	--	----

### Capítulo III:

Tabela 3.1.	Quantificações relativas utilizando o método da curva-padrão.	98
-------------	---	----

## LISTA DE QUADROS

Capítulo III:

- |             |   |    |
|-------------|---|----|
| Quadro 3.1. | Nome, seqüência e temperatura dos oligonucleoídeos utilizados nas reações de RT-PCR em tempo real e tamanho dos produtos de amplificação obtidos. | 90 |
| Quadro 3.2. | Quantificação relativa de SR6 em amostras de tetratirídeos e vermes segmentados de <i>Mesocestoides corti</i> .                                   | 97 |

## RESUMO

Os cestódeos são agentes etiológicos de doenças parasíticas em humanos e em animais domesticados. Estamos utilizando *Mesocestoides corti* como um sistema modelo para estudar a biologia do desenvolvimento dos cestódeos, particularmente a transição da fase larval para a fase adulta segmentada. Com o propósito de isolar seqüências diferencialmente expressas durante o processo de segmentação, aplicamos a metodologia de análise das diferenças de representações de cDNA (cDNA RDA) utilizando RNA total extraído de larvas e vermes segmentados em cultivos *in vitro* de *M. corti*. Duas bibliotecas de cDNA subtraídas, enriquecidas com seqüências diferencialmente expressas das formas larvais ou segmentadas, foram construídas usando uma razão de driver:tester de 100:1 e 800:1 no 1º e 2º ciclos de subtração, respectivamente. A eficiência de subtração foi avaliada com experimentos de hibridização, utilizando as seqüências subtraídas como sondas contra os produtos de cDNA amplificados por PCR, com análise de macroarranjos e com confirmação individual, em experimentos de Northern virtual, de clones selecionados. Uma estratégia de RT-PCR em tempo real para confirmação dos resultados está sendo otimizada e resultados preliminares são apresentados. Após o seqüenciamento de 1036 clones de cDNA independentes e adoção de uma estratégia de seqüenciamento de alta qualidade, foram identificadas 190 seqüências, preferencialmente expressas em tetratirídeos (49) ou em vermes segmentados (141). Entre os genes identificados, 71 foram funcionalmente anotados, incluindo seqüências relacionadas a reguladores de estrutura de cromatina e controle de transcrição, cujos ortólogos estão implicados em processos de desenvolvimento em *Drosophila* e em vertebrados.

Palavras-chave: *Mesocestoides corti*; Eucestoda; tetratirídeos; expressão gênica, estrobilação em cestódeos.

## ABSTRACT

Cestodes are the etiological agents of major parasitic diseases both in humans and in domestic animals. We are using *Mesocestoides corti* as a model system to study the developmental biology of cestodes, particularly the transition from larvae to segmented adult worms. To isolate differentially expressed sequences during the segmentation process, we undertook a cDNA representational difference analysis (cDNA RDA) using total RNA from *M. corti* larvae and *in vitro* segmented worms. Two subtracted cDNA libraries, enriched with differentially expressed sequences from larval or segmented forms, were constructed using ratios of 100:1 and 800:1 of driver/tester cDNAs in the first and second rounds of subtraction, respectively. The subtraction efficiency was assessed through hybridization experiments, using the subtracted sequences as probes against the original PCR-amplified cDNA products, by macroarray analysis, and by individual confirmation of selected clones in virtual northern blot experiments. A real-time RT-PCR strategy for further evaluation is currently being optimized and preliminary results are reported. After sequencing 1,036 independent cDNA clones and adopting a high-quality sequencing strategy, we identified at least 190 sequences preferentially expressed in tetrathyridia (49) or segmented worms (141). Among the identified genes, 71 had possible assigned functions, including some related to global regulators of chromatin structure and transcriptional control, whose orthologs are implicated in developmental processes in *Drosophila* and in vertebrates. We discuss some of the molecular differences found between the larval and segmented stages of a tapeworm parasite.

Keywords: *Mesocestoides corti*; Eucestoda; tetrathyridia; gene expression; cestode strobilation

# CAPÍTULO I

## INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

## 1.1. INTRODUÇÃO

Os helmintos compreendem metazoários parasitas dos filos Platyhelminthes e Nematoda. Já foram identificadas 342 espécies de helmintos em associação com humanos, das quais 197 habitam o trato gastrointestinal (CROMPTON, 1999). Destas, apenas 20 são consideradas causadoras de enfermidades. Dentre os helmintos, os nematódeos transmitidos pelo solo são os mais amplamente difundidos. Apenas 6 espécies (dos gêneros *Enterobius*, *Ascaris*, *Necator*, *Ancylostoma*, *Trichuris* e *Strongyloides*) acometem mais da metade da população humana (HORTON, 2003), representando um grave problema de saúde pública de amplitude global. Apesar de menos prevalentes, as zoonoses causadas por cestódeos e trematódeos são extremamente importantes, contribuindo significativamente para a morbidade humana (OLSEN *et al.*, 2001). Nestes grupos, destacam-se os gêneros *Taenia*, *Hymenolepis* e *Echinococcus* entre os cestódeos e os gêneros *Schistosoma*, *Clonorchis*, *Fasciola* e *Fasciolopsis* entre os trematódeos. As doenças causadas por infecções helmínticas são de morbidade e debilidade crônicas, sendo, portanto, difícil quantificar os seus efeitos em nível populacional. Alguns dados, contudo, são reveladores. Somente na África, onde estão 85% dos casos mundiais de infecção com espécies do gênero *Schistosoma* (CHITSULO *et al.*, 2000), a esquistossomose é responsável por 45 milhões de casos de hematúria, 21 milhões de casos de disúria, 14 milhões de casos de hidroureter e 7 milhões de casos de hepatomegalia. Os ancilostomídeos, por sua vez, são responsáveis por 33 milhões de casos de anemia entre os africanos (COLLEY *et al.*, 2001).

As helmintíases gastrointestinais apresentam baixas taxas de mortalidade quando comparadas com outras doenças parasíticas.



Contudo, elas estão frequentemente associadas com outros efeitos de difícil mensuração, tendo um pronunciado impacto na nutrição, crescimento, desempenho físico e funções cognitivas (STEPHENSON *et al.*, 1993; SIMEON *et al.*, 1995; HADJU *et al.*, 1996). A importância epidemiológica das helmintíases é ainda maior em face das observações recentes de que infestações helmínticas diminuem a eficácia de certos tipos de vacina contra várias doenças, incluindo tuberculose, HIV/AIDS e malária (MARKUS, 2001; MARKUS & FINCHAM, 2001; NACHER, 2001).

Apesar da clara importância, em termos de saúde pública, a biologia destes organismos ainda é pouco estudada, principalmente se considerarmos o atual entendimento de processos biológicos básicos de vários metazoários de vida livre. Em parte, isto se deve às dificuldades intrínsecas associadas aos estudos com endoparasitos obrigatórios, de ciclos vitais por vezes complexos. O estabelecimento de sistemas de cultivo *in vitro* é, muitas vezes, dificultado pela necessidade de se estabelecer os requerimentos nutricionais específicos de cada fase do ciclo vital. Além disso, abordagens tradicionais, envolvendo a seleção de mutantes por fenótipos de perda ou de ganho de função são, em geral, impraticáveis para estes organismos. Contudo, a necessidade de fortalecer os estudos com helmintos tem motivado a sugestão de programas de pesquisa em helmintologia médica, como o “Affirmative Action for Worms” (COLLEY *et al.*, 2001; MARKUS, 2002). A

utilização de ferramentas de análise funcional de genomas para a caracterização de genes de platelmintos e nematódeos parasitas pode contribuir para o avanço do conhecimento da biologia destes organismos. A otimização de ensaios de interferência de RNA (RNAi) e do estabelecimento de sistemas de transgênese constituem um passo fundamental nesse sentido (ABOUBAKER & BLAXTER, 2004). Técnicas envolvendo genética reversa dependem, contudo, da ampla disponibilidade de seqüências de DNA, o que ainda é uma limitação, particularmente no caso dos cestódeos. Dessa forma, novos projetos de seqüenciamento de genomas e de ESTs são fundamentais para o estudo dos helmintos. Além disso, a seleção de candidatos para estudos pormenorizados é, por si só, uma tarefa árdua. Parece razoável supor que muitos dos processos biológicos condicionados pelo hábito parasitário desses organismos, tais como a capacidade de imuno-evasão, de reprodução e de diferenciação em fases específicas do ciclo vital, envolvam mecanismos peculiares. Dessa forma, a seleção de genes para estudos funcionais não pode se restringir à busca de homólogos com função conhecida em animais de vida livre. Estudos que possibilitam a caracterização, em grande escala, do perfil de expressão gênica, em nível de proteínas e de transcritos, auxiliam na identificação de genes envolvidos no processo estudado. Como exemplo, a tecnologia de microarranjos de cDNA foi empregada na identificação de transcritos gênero-específicos em *Schistosoma mansoni* (HOFFMANN *et al.*, 2002) e nas linhagens Anhui e Zhejiang de *Schistosoma japonicum* (FITZPATRICK *et al.*, 2004). Abordagens proteômicas têm possibilitado a análise dos produtos de excreção-secreção e a comparação do perfil de proteínas entre diferentes estágios do desenvolvimento de platelmintos parasitas, incluindo estudos com os trematódeos *S. mansoni* (CURWEN *et al.*, 2004), *Opisthorchis viverrini* (BOONMEE *et al.*, 2003) e *Fasciola hepatica* (JEFFERIES *et al.*, 2001), e com o cestódeo *Echinococcus granulosus* (CHEMALE *et al.*, 2003).

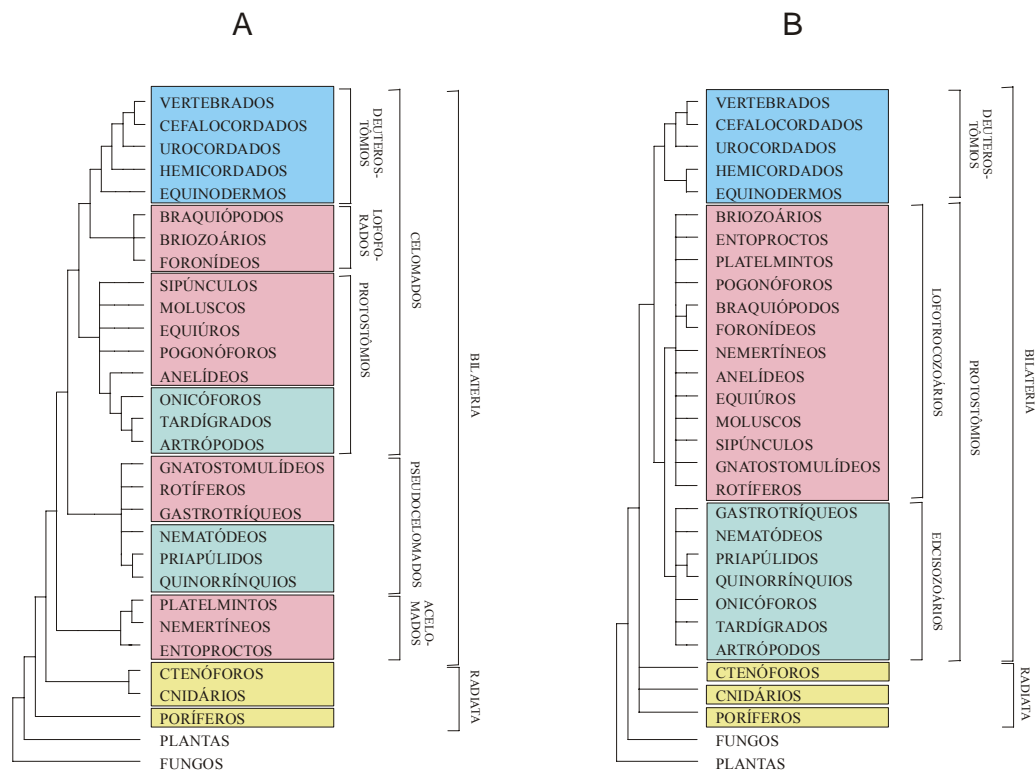
### **1.1.1. Lophotrochozoa, Ecdysozoa e Deuterostomia: o impacto das novas filogenias no estudo dos platelmintos.**

A determinação das relações filogenéticas entre os principais clados de metazoários é crucial para a reconstrução da história evolutiva dos animais, tendo recebido especial atenção de zoólogos e embriologistas nos últimos 2 séculos (WILLMER, 1990). Contudo, as diferenças morfológicas marcantes apresentadas pelos planos corporais distintos de cada filo dificultam a determinação de homologias e do sentido evolutivo de modificação de caracteres morfológicos. Dessa forma, as propostas de relações filogenéticas baseadas em estudos embriológicos e de morfologia são caracterizadas pela importância excessiva dada a caracteres cuja homologia tem sido considerada, no mínimo, discutível, tais como presença/ausência de celoma, origem embriológica das cavidades celomáticas, plano de clivagem do embrião, origem embriológica da cavidade bucal e plano corporal articulado.

As novas reconstruções filogenéticas baseadas em caracteres moleculares (AGUINALDO *et al.*, 1997; ADOUTTE *et al.*, 2000) trouxeram novo ímpeto não apenas aos debates históricos a respeito das relações evolutivas entre os distintos grupos de metazoários, mas também à emergente Biologia do Desenvolvimento Evolutiva (conhecida como “evo-devo”). A geração de topologias de árvores filogenéticas a partir de um conjunto de dados independente (molecular) possibilita a reconstituição da evolução dos mecanismos de desenvolvimento e formação de padrões, representados atualmente na grande disparidade de formas dos distintos grupos de metazoários. As “novas” filogenias apresentam alterações drásticas com respeito aos modelos tradicionais (Figura 1.1).

Os metazoários bilaterais passaram a ser subdivididos em três grandes clados, incluindo o já tradicional Deuterostomia, além dos novos Lophotrochozoa e Ecdysozoa. O

tradicional grupo Articulata, por exemplo, unindo artrópodes e anelídeos com base no padrão de segmentação do tronco corpóreo, foi erigido desde os princípios da anatomia comparada (CUVIER, 1817 apud ADOUTTE *et al.*, 2000) e mantido até os dias atuais sem grandes questionamentos. Com base nas filogenias atuais, o grupo Articulata é plesiomórfico, estando os artrópodes entre os ecdisozoários e os anelídeos entre os lofotrocozoários (ADOUTTE *et al.*, 2000).



**Figura 1.1. Filogenias de metazoários.** (A) A filogenia tradicional, baseada em morfologia e embriologia, adaptada de Hyman (1940). (B) A nova filogenia baseada em moléculas. Uma abordagem conservadora foi utilizada em (B): alguns conjuntos de dados ofereceram resolução dentro de algumas multifurcações apresentadas, mas a extensão de resolução apresentada foi limitada aos dados solidamente obtidos de rRNA. (adaptado de Adoutte *et al.*, 2000).

A percepção tradicional de que os platelmintos são representantes atuais das formas bilatérias mais primitivas tornou-se inconsistente com a árvore filogenética atualmente mais aceita (AGUINALDO *et al.*, 1997). Platelmintos são lofotrocozoários, estando, por exemplo, filogeneticamente mais relacionados aos anelídeos do que estes últimos aos artrópodes. Essa reavaliação das relações filogenéticas dos principais grupos de metazoários torna o estudo de aspectos básicos de desenvolvimento dos platelmintos fundamental na discussão mais genérica acerca da origem e evolução dos bilatérios e na eventual reconstituição do que seria o último ancestral comum a todos os bilatérios, o Urbilateria.

### **1.1.2. Reconstituições do Urbilateria**

A iniciativa de tentar reconstituir as características principais do Urbilateria tem acompanhado os estudos de anatomia comparada e evolução dos metazoários. Essa reconstituição continua sendo de grande interesse, pois afeta a nossa compreensão de como evoluíram os sistemas reguladores de desenvolvimento (ERWIN & DAVIDSON, 2002). Historicamente, duas vertentes se contrapõem, uma propondo um ancestral comum com um plano corporal simples, e a segunda propondo um organismo mais complexo, apresentando características que foram secundariamente perdidas por alguns grupos de animais atuais. O conceito planulóide-acelóide (HYMAN, 1940 apud BALAVOINE, 1998) considera que todos os bilatérios atuais seriam descendentes de um organismo similar aos platelmintos acelos, um grupo de vermes marinhos de organização extremamente simples, acelomados, sem cavidade digestiva, protonefrídios e gônadas bem delimitadas. Este organismo acelóide, por sua vez, teria sido derivado de um organismo planulóide, similar às atuais

larvas plânula de cnidários, com simetria radial. O modelo alternativo, conhecido como a teoria do ancestral arqueocelomado, sugere que o Urbilateria apresentava três compartimentos celômicos, derivados de bolsas gástricas de um ancestral cuja organização interna era similar ao dos atuais pólipos de antozoários. Dessa forma, a organização trimérica de deuterostômios e lofoforados seria um aspecto primitivo resultante desse plano de organização corporal ancestral, ao passo que a condição acelomada dos atuais platelmintos seria resultado de uma modificação evolutiva posterior.

Ainda persistem na literatura duas vertentes distintas, uma defendendo um ancestral de organização simples e outra um ancestral complexo. Contudo, os argumentos são baseados em um conjunto muito maior de dados, integrando o conhecimento atual da conservação de sistemas moleculares de diferenciação e formação de padrões ao longo do desenvolvimento com evidências paleontológicas. O nível de conservação dos programas de desenvolvimento revelado pelos estudos comparativos de “evo-devo” é impressionante: elementos reguladores de processos de diferenciação anterior, formação de padrão dorso-ventral, desenvolvimento ocular, desenvolvimento do sistema nervoso central e periférico, formação de apêndices e segmentação são pelo menos parcialmente conservados nos Bilateria. Essa constatação levou à proposta de que o Urbilateria já se tratava de um organismo extremamente complexo, contendo cabeça, olhos, coração, segmentação, apêndices, com diferenciação ântero-posterior e dorso-ventral (DE ROBERTIS & SASAI, 1996; KIMMEL, 1996; COATES & COHN, 1998; HOLLAND, 2000; HOLLAND, 2002).

A vertente contrária questiona o valor do compartilhamento de sistemas reguladores de desenvolvimento na atribuição de homologia para as respectivas partes ou processos de desenvolvimento considerados (ERWIN & DAVIDSON, 2002). Os atuais bilatérios teriam herdado um “toolkit” genômico capaz de conferir aos seus portadores uma grande

plasticidade de desenvolvimento. Estas “ferramentas” de desenvolvimento consistem em redes reguladoras ou vias de desenvolvimento capazes de conferir propriedades extremamente genéricas aproveitadas em diferentes contextos evolutivos para a construção de estruturas nada homólogas entre si. Apenas como exemplos, a determinação de bordas ou limites espaciais entre estruturas é conferida em múltiplos contextos pela via na qual atua o gene *engrailed*; a determinação de domínios proximais e distais em uma variedade de projeções morfológicas a partir da superfície do corpo é conferida pela expressão do gene *distal-less* (LOWE & WRAY, 1997; IWAKI & LENGYEL, 2002). Seguindo este raciocínio, pouco se poderia propor a respeito da real morfologia do Urbilateria, a não ser que ele já possuía as ferramentas de desenvolvimento que teriam propiciado a explosão de formas que se seguiu durante o Período Cambriano (ERWIN & DAVIDSON, 2002).

Independentemente da interpretação que venha a prevalecer, essas novas abordagens ao estudo do desenvolvimento, conciliadas às atuais propostas de filogenia dos metazoários, torna atrativo o estudo dos platelmintos. A análise comparativa das vias genéticas reguladoras envolvidas em diferentes aspectos do desenvolvimento desses organismos, ainda pouco estudados sob esta ótica, deverá trazer contribuições importantes aos modelos atuais para a evolução do desenvolvimento em metazoários. A aquecida discussão com respeito ao mono- ou polifiletismo da segmentação em bilatérios é sintomática (BALAVOINE & ADOUTTE, 2003; SEAVER, 2003; TAUTZ, 2004).

### **1.1.3. Segmentação.**

Tradicionalmente, o fenômeno de segmentação “verdadeira” é atribuído a apenas três filos de animais, os anelídeos, os

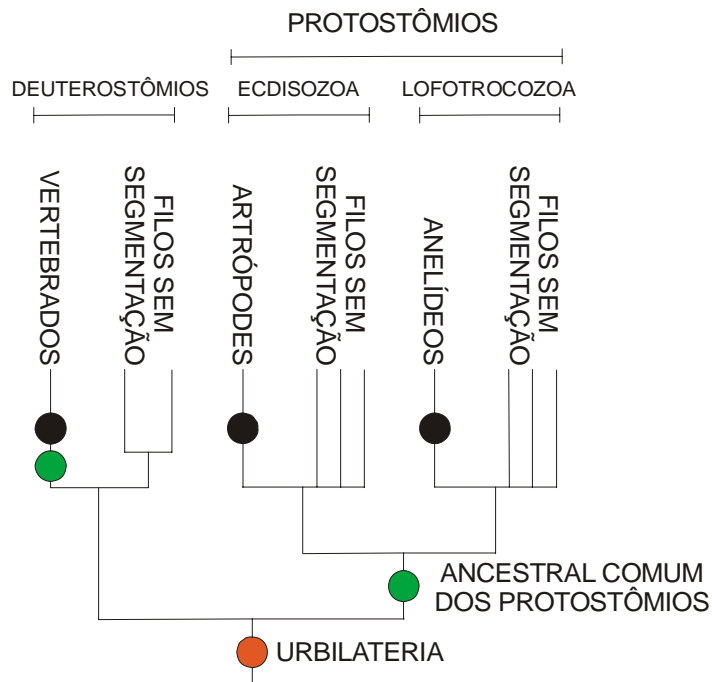
artrópodes e os cordados. Estes animais “eussegmentados” apresentam unidades repetidas ao longo do eixo corporal ântero-posterior, cada unidade compreendendo uma combinação de estruturas de origens meso- e ectodérmica, tais como órgãos excretórios, músculos, gônadas, vasos sanguíneos, nervos, apêndices e cavidades celômicas (SCHOLTZ, 2002). Historicamente, a definição de segmentação tem sido acoplada à formação de celoma (CLARK, 1963 apud TAUTZ, 2004). A diferenciação entre segmentação primária e segmentação secundária (ou segmentação metamérica) é empregada para distinguir as cavidades celomáticas apresentadas por grupos que não são usualmente classificados como segmentados, tais como equinodermos, hemicordados, pogonóforos e moluscos. Ao contrário destes casos, a segmentação metamérica envolve o desenvolvimento de uma zona de crescimento a partir da qual mais segmentos são gerados.

Estudos comparativos dos mecanismos moleculares de especificação de segmentação em diferentes espécies de artrópodes, anelídeos e cordados tem possibilitado



comparações mais úteis entre as semelhanças e as diferenças desses processos entre os três filos, sem exacerbar peculiaridades do processo apresentadas por determinados grupos, tais como por *Drosophila* (TAUTZ, 2004). A via de Delta-Notch, por exemplo, apesar de não estar envolvida na especificação inicial de segmentos em *Drosophila*, apresenta um padrão de expressão em tiras em outros artrópodes (STOLLEWERK *et al.*, 2003; KADNER & STOLLEWERK, 2004). Essa mesma via é parte integrante de um “relógio” de expressão cíclica caracterizado em vertebrados e envolvido na geração de segmentos (POURQUIÉ, 2001). Genes da via wnt são expressos nas mesmas posições relativas em vertebrados e em *Tribolium* (NAGY & CARROLL, 1994; AULEHLA *et al.*, 2003). Se a origem monofilética para a segmentação entre estes três grupos for eventualmente confirmada, então muito provavelmente o Urbilateria também apresentava um plano corporal segmentado, uma vez que cordados, artrópodes e anelídeos, pertencem, respectivamente, aos ramos Deuterostomia, Ecdisozoa e Lophotrochozoa (Figura 1.2).

Uma definição restritiva de segmentação, incluindo apenas os três grupos acima mencionados, tem sido bastante criticada recentemente (BUDD, 2001; SEAVER, 2003; MINELLI & FUSCO, 2004). Segundo estes autores, um conceito muito restritivo pode acabar por limitar o que pode ser aprendido sobre o processo evolutivo de segmentação. BUDD (2001) sugere que órgãos ou tecidos devam ser considerados segmentados e não organismos inteiros. Dessa forma, um animal poderia ser considerado parcialmente segmentado, e estes casos podem eventualmente representar potenciais intermediários entre organismos não segmentados e eussegmentados, ou ainda representar resquícios de um plano ancestral segmentado.



**Figura 1.2. Três hipóteses para a evolução da segmentação durante a evolução bilatéria.** (1) Um ancestral comum bilatério segmentado (em vermelho) pressupõe a perda desse plano corporal pelo menos três vezes, em linhagens que levam a filos de deuterostomados, ecdisozoários e lofotrocozoários. (2) A segmentação poderia ter surgido duas vezes (em verde), nas linhagens levando aos protostômios e vertebrados, respectivamente. Isso pressupõe pelo menos dois eventos de perda do plano corporal segmentado, nas linhagens que levam a filos não segmentados de ecdisozoários e lofotrocozoários. (3) A segmentação poderia ter surgido independentemente três vezes (em preto) nas linhagens que levam aos vertebrados, anelídeos e artrópodes (adaptado de Peel & Akam, 2003).

#### **1.1.4. Segmentação e proglotização em cestódeos.**

O fenômeno de estrobilização em diferentes ordens de cestódeos é de interesse particular para o estudo da evolução e diversidade do processo de segmentação em metazoários. O processo de estrobilização presente no grupo Eucestoda compreende dois eventos, considerados por alguns autores como independentes (LITTLEWOOD *et al.*, 2001). A proglotização corresponde à repetição serial dos órgãos reprodutivos, ao passo que a segmentação consiste na subdivisão externa das proglótides. A ordem Caryophyllidea, considerada a mais primitiva em uma análise filogenética sistemática do grupo (OLSON *et al.*, 2001) é a única que não apresenta proglotização nem segmentação, ao passo que a ordem Spathebothriidea, que compreende organismos ainda muito pouco conhecidos, possui proglotização sem segmentação externa. A proglotização pode aumentar dramaticamente a fecundidade, ao passo que a segmentação, quando seguida de apólise das proglótides maduras, pode permitir que o desenvolvimento e a fertilização ocorram em nichos distintos daqueles ocupados pelo verme parental (OLSON *et al.*, 2001). Cabe ressaltar que alguns membros das famílias Anoplocephalidae, Hymenolepididae, e todos os membros da família Nematotaeniidae de ciclofilídeos, juntamente com alguns gêneros de pseudofilídeos (por exemplo, *Anantrum*, *Ligula* e *Triaenophorus*) perderam secundariamente a segmentação externa ou a apresentam de forma incompleta.

Este fenômeno de repetição serial ao longo do eixo ântero-posterior dos cestódeos, de grande importância na biologia destes organismos parasitas, tem sido raramente estudado. A principal exceção que pode ser destacada consiste numa investigação, por microscopia óptica e eletrônica, da natureza das proglótides de cinco cestódeos ciclofilídeos (*Hymenolepis nana*, *Hymenolepis diminuta*, *Hymenolepis microstoma*, *Taenia taeniaeformis* e *Echinococcus multilocularis*) (MEHLHORN *et al.*, 1981). Pela primeira

vez, foi mostrado de maneira consistente que não existem membranas separando proglótides sucessivas. Os autores deste estudo sugerem que deve ser evitada a caracterização do crescimento dos cestódeos como um processo metamérico até que o mesmo seja estudado mais intensamente, deixando a questão em aberto. Na realidade, sem a caracterização dos sistemas reguladores de desenvolvimento responsáveis pela morfogênese do plano corporal estrobilado, pouco se poderá dizer a respeito de eventuais semelhanças existentes entre esse processo e outros exemplos de repetição serial em metazoários. A estrobilização poderia, por exemplo, compreender elementos de um plano ancestral segmentado do Urbilateria. Alternativamente, ela poderia ser resultante da utilização das mesmas “ferramentas” de desenvolvimento aproveitadas em outros processos de morfogênese, empregadas em um contexto evolutivo diverso. Um último cenário possível implicaria na ausência completa de conservação das vias de diferenciação associadas à estrobilização. Mesmo neste caso, o estudo desse processo não se tornaria menos interessante, pois iria revelar mecanismos novos encontrados ao longo da evolução para a geração de um padrão de repetição serial de estruturas e órgãos.

#### **1.1.5. *Mesocestoides corti***

A espécie *Mesocestoides corti* foi descrita por HOEPPLI (1925). A maior parte dos estudos com *M. corti* utilizam espécimes derivados de uma única linhagem, estabelecida a partir de isolados de duas localidades da Califórnia, coletados de uma população de lagartos (*Sceloporus occidentalis biseriatus*) (SPECHT

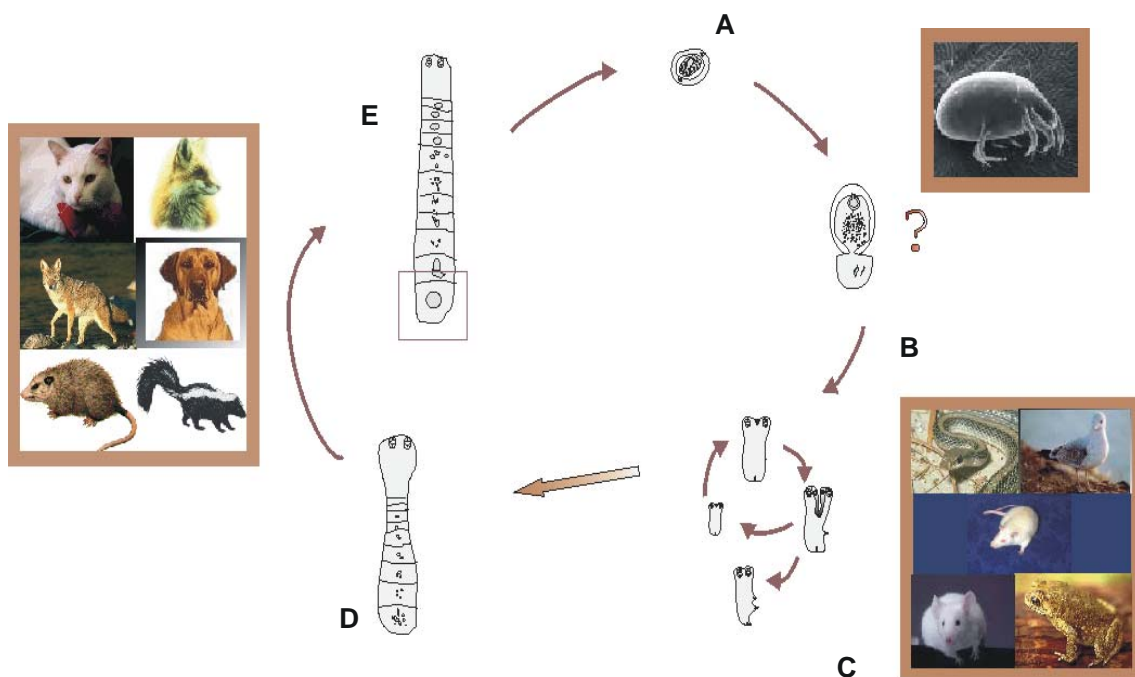
& VOGÉ, 1965). Foi posteriormente proposta a elevação dessa linhagem à condição de espécie, sendo denominada *Mesocestoides vogae* (ETGES, 1991). A proposta foi adotada apenas por alguns grupos, sendo encontradas as duas denominações na literatura. Na realidade, a taxonomia do gênero *Mesocestoides* como um todo tem sido objeto de contínuas confusões e modificações (BIZARRO, 2001).

O gênero *Mesocestoides* compreende endoparasitos que possuem um escólex com quatro ventosas desprovidas de ganchos. No verme adulto, o estróbilo (região posterior do corpo) é constituído pelas proglótides. As proglótides grávidas apresentam um órgão parauterino, ou cápsula de ovos, que consiste em uma evaginação do útero, de extremidade cega e parede espessa. O ciclo vital de *M. corti* ainda não está completamente esclarecido. A hipótese mais aceita é a de que ocorram, além das fases embrionária e adulta, duas fases larvais (Figura 1.3). Em estudos de diferenciação *in vitro*, oncosferas contendo

embriões hexacantos se diferenciaram em larvas do tipo procercóide (VOGE, 1967). Supostamente, portanto, embriões hexacantos seriam capazes de se diferenciar em larvas procercóides dentro dos hospedeiros intermediários primários, possivelmente ácaros oribatídeos, como encontrado para *Mesocestoides lineatus* (SOLDATOVA, 1944). A diferenciação de larvas procercóides em tetratirídeos, correspondentes à segunda fase larval, deve ocorrer nos hospedeiros intermediários secundários, nos quais os tetratirídeos são amplamente encontrados na natureza. Roedores, répteis, anfíbios e algumas espécies de aves são hospedeiros dos tetratirídeos. Os tetratirídeos se diferenciam em vermes estrobilados ao atingirem o trato digestivo dos hospedeiros definitivos, que podem ser canídeos, felinos, viverrídeos e, eventualmente, humanos.

A capacidade de multiplicação assexual apresentada pelos tetratirídeos, aliada à possibilidade de manutenção *in vivo* em hospedeiros experimentais, como

camundongos e ratos, torna *M. corti* um modelo de estudo atraente. Estudos demonstrando a capacidade de



**Figura 1.3 - Esquema simplificado do ciclo vital de *Mesocostoides corti*.** Embriões hexacantos (A) são supostamente capazes de diferenciação em larvas do tipo procercóide (B) em hospedeiros intermediários primários (possivelmente ácaros oribatídeos). A diferenciação das larvas procercóides em tetratirídeos (C) ocorreria no interior dos hospedeiros intermediários secundários (roedores, répteis, anfíbios e algumas espécies de aves). Os tetratirídeos entram em processo de diferenciação estrobilar ao atingirem o trato digestivo dos hospedeiros definitivos (canídeos, felinos, viverrídeos e, eventualmente, seres humanos). Ao final do processo de diferenciação estrobilar são formados vermes adultos e segmentados (D e E), capazes de gerar embriões hexacantos por reprodução sexual. Os tetratirídeos correspondem à única fase do desenvolvimento de *Mesocostoides* comprovadamente capaz de multiplicação assexual por fissão ântero-posterior.

diferenciação *in vitro* de tetratirídeos em vermes estrobilados, ainda que com eficiências baixas, mostraram o potencial de utilização desse organismo para o estudo do processo de segmentação em cestódeos (BARRETT *et al.*, 1982; THOMPSON *et al.*, 1982).



### **1.1.6. Metodologias para análise de expressão gênica**

O desenvolvimento de estratégias e metodologias para a quantificação de transcritos e de proteínas tem propiciado a descoberta da função desempenhada por diferentes famílias de genes em uma multiplicidade de situações biológicas. Um marco histórico nos estudos de expressão gênica diferencial foi, sem dúvida, a publicação da técnica de Northern blot (ALWINE *et al.*, 1977). Até hoje, mesmo após todos os avanços técnicos que a sucederam, ela continua sendo empregada na confirmação de alterações detectadas em nível de transcritos. Outras técnicas baseadas em hibridização foram posteriormente desenvolvidas, destacando-se a metodologia de hibridização diferencial de placas em filtros (MANIATIS *et al.*, 1978).

A elaboração de estratégias de construção de bibliotecas de cDNA subtraídas popularizou ainda mais as análises de padrões de expressão gênica. Uma infinidade de variações foi e ainda continua sendo desenvolvida, apresentando em comum alguma etapa de amplificação por PCR dos produtos de síntese de cDNA das condições comparadas. Destacam-se as técnicas de Display diferencial (DDRT-PCR) (LIANG & PARDEE, 1992), já empregada por nosso grupo no isolamento de genes de expressão diferencial de *Mesocestoides corti* (BIZARRO, 2001), de RDA (“Representational Difference Analysis”) (LISITSYN *et al.*, 1993) e de SSH (“Suppression subtractive hybridization”) (DIATCHENKO *et al.*, 1996), a partir das quais foram desenvolvidas modificações e adaptações (por exemplo, JIANG *et al.*, 2000; JURECIC & BELMONT, 2000).

As tecnologias existentes para análise da expressão gênica diferencial podem ser conceitualmente divididas em duas grandes famílias: sistemas com arquitetura fechada e com arquitetura aberta (GREEN *et al.*, 2001). As tecnologias que apresentam arquitetura fechada delimitam previamente um conjunto definido de genes candidatos,

impossibilitando a descoberta de novidades não incluídas no espaço de análise original. Tecnologias de hibridização de arranjos de cDNA ou oligonucleotídeos e de PCR quantitativo são exemplos de sistemas de arquitetura fechada. Geralmente, em modelos biológicos nos quais o conhecimento do complemento de genes presente é ainda limitado, utiliza-se, em um primeiro momento, uma tecnologia de análise com arquitetura aberta. Sistemas abertos não requerem um conhecimento prévio dos transcriptomas em estudo. Além disso, mesmo em sistemas experimentais com genoma e transcriptoma bastante estudados, a aplicação desse tipo de tecnologia pode ser interessante, pois podem revelar variantes de “splicing” alternativo ou outros eventos moleculares ainda não incorporados nos sistemas fechados correspondentes. Os dois tipos de arquitetura podem, evidentemente, ser utilizados de forma complementar em um dado modelo experimental. Seqüências diferencialmente expressas isoladas, por exemplo, por tecnologias de subtração podem ser incluídas em microarranjos de cDNA ou testadas por RT-PCR em tempo real, possibilitando a validação em paralelo do padrão de expressão gênica com metodologias de análise quantitativa desenvolvidas para estes sistemas. Este tipo de estratégia tem sido adotada em diferentes situações experimentais (ver, por exemplo, WELFORD *et al.*, 1998; RAJEEVAN *et al.*, 2001).

#### **1.1.7. Tecnologia de RDA**

A tecnologia de RDA (*Representational Difference Analysis*) foi originalmente desenvolvida com o propósito de identificar diferenças entre dois genomas complexos (LISITSYN *et al.*, 1993). Nesta metodologia de subtração, uma população de moléculas de DNA (“driver”) é hibridizada, em excesso, com uma segunda população de moléculas de DNA (“tester”). As moléculas compartilhadas entre as duas populações são removidas após

uma ou mais etapas de hibridização. Neste processo, ocorre um enriquecimento das seqüências-alvo, presentes unicamente na população “tester”. Para que isto ocorra, oligonucleotídeos adaptadores são adicionados às extremidades 5’ das moléculas “tester”. Ambas as populações são então desnaturadas e misturadas, seguindo-se uma etapa de hibridização na qual estão presentes moléculas “tester” e “driver”. Como resultado desse processo, são formados três tipos de moléculas de DNA dupla-fita: homo-híbridos “driver”-“driver”, hetero-híbridos “driver”-“tester” e homo-híbridos “tester”-“tester”. Como a população “driver” é adicionada em excesso, moléculas da população “tester” também presentes na população “driver” estarão, em sua maioria, na fração de hetero-híbridos “driver”-“tester”. Dessa forma, os homo-híbridos “tester”-“tester” estarão constituídos, majoritariamente, por seqüências diferencialmente expressas da população “tester” (as seqüências-alvo). Após uma reação de “fill in” com DNA polimerase, utilizando as moléculas de DNA dupla-fita recém formadas, as extremidades 3’-terminais são preenchidas. Somente os homo-híbridos “tester”-“tester” irão conter a seqüência correspondente ao adaptador nas duas extremidades. Essas seqüências são então amplificadas exponencialmente em uma reação de PCR, na qual utiliza-se como *primer* o oligonucleotídeo do adaptador. Hetero-híbridos “driver”-“tester” são amplificados apenas linearmente nessa etapa, resultando em um enriquecimento das seqüências diferencialmente expressas da população “tester”.

No RDA, os genomas comparados, as populações “tester” e “driver”, têm sua complexidade diminuída através da preparação de porções representativas de cada amostra, as “representações”. Uma menor complexidade das populações comparadas leva a uma maior eficiência de enriquecimento. Para a preparação das representações, as amostras de DNA genômico são clivadas com uma enzima de restrição, ligadas a adaptadores e, então,

amplificadas por PCR. Para possibilitar que a maior parte das diferenças entre os dois genomas pudesse ser identificada por essa metodologia, foi proposta a geração de amplicons independentes a partir de amostras de DNA genômico clivadas por enzimas de restrição diferentes.

Esta técnica foi posteriormente adaptada para permitir o isolamento de seqüências que apresentam um nível de expressão alterado entre diferentes tecidos ou amostras celulares, sendo denominada cDNA RDA (HUBANK & SCHATZ, 1994). Uma diferença importante entre o cDNA RDA e a metodologia original, além do fato de buscar diferenças entre transcriptomas e não entre genomas, está no conteúdo das “representações”: as amostras de cDNA “tester” e “driver” são clivadas com enzimas tetranucleolíticas e não hexanucleolíticas como no RDA convencional. Dessa forma, a vasta maioria das espécies de cDNA estará representada nos amplicons, uma vez que essas enzimas apresentam, em média, um sítio de clivagem a cada 256 pares de bases. Com isso, as “representações” no cDNA RDA não sofrem redução de complexidade considerável com relação às populações de cDNA originais. Acredita-se que essa redução de complexidade não seja necessária no cDNA RDA, uma vez que o complemento de transcritos é inferior ao do genoma total.

Adaptações do protocolo de RDA original para a análise de expressão gênica diferencial foram também implementadas. Estas metodologias aproveitam peculiaridades apresentadas por modelos experimentais específicos, tornando a técnica ainda mais eficiente nestes contextos (FRAZER *et al.*, 1997; KRIEGER & GOLDENBERG, 1998; O’HARA *et al.*, 2005).

### **1.1.8. RT-PCR em tempo real**

RT-PCR em tempo real é considerado o método mais sensível disponível atualmente para a quantificação dos níveis de expressão gênica, particularmente para transcritos de baixa abundância (AL-TAHER *et al.*, 2000). A introdução de ensaios de detecção por fluorescência na técnica de PCR (HIGUCHI *et al.*, 1992), acoplado ao desenvolvimento de instrumentação capaz de amplificar, detectar e quantificar os níveis de mRNAs celulares, permitiu o desenvolvimento de metodologias que permitem acompanhar o acúmulo do amplicon durante o processo de amplificação em “tempo real”. Essa estratégia de análise tem sido também denominada PCR cinética, em contraposição às técnicas de quantificação por PCR convencionais nas quais a análise é restrita ao produto final da reação (CHA *et al.*, 1993; PFAFFL *et al.*, 1998). Uma das principais vantagens dos ensaios cinéticos reside na capacidade de medir a amplificação do produto-alvo especificamente na fase de acúmulo exponencial da amplificação, sem interferências das fases posteriores de amplificação linear e estacionária, nas quais não existe uma correlação aceitável entre a quantidade de produto amplificado e a quantidade inicial de moléculas (KAINZ, 2000). Além disso, a aquisição e a análise dos dados são simultâneos, evitando a introdução de variações decorrentes do processamento pós-PCR das amostras, necessário em estratégias de quantificação de produtos finais, em que diluições de uma amostra de cDNA são amplificadas por um número definido de ciclos ou em que uma mesma quantidade de cDNA é amplificada em paralelo por um número variável de ciclos (SCHMITTGEN *et al.*, 2000). A variabilidade intra-ensaio, em experimentos com análise restrita ao produto final, foi estimada em 30-40%, ao passo que a variabilidade interensaio foi estimada em 50-70% nestes mesmos experimentos (PFAFFL, 2004). Em experimentos de RT-PCR quantitativo, valores de variabilidade intra- e interensaio de 2,5% e 7,5%,

respectivamente, foram obtidos em um sistema com baixo número de cópias (SCHUTTEN *et al.*, 2000). Além disso, a faixa de sensibilidade de ensaios de produto final não costuma ultrapassar 2 ordens de magnitude, ao passo que ensaios cinéticos atingem faixas de sensibilidade superiores a 8 ordens de magnitude (SCHMITTGEN *et al.*, 2000).

Quantificações baseadas em ensaios de RT-PCR em tempo real têm sido amplamente realizadas não só na área de pesquisa mas também como ferramenta importante de diagnóstico (PONCHEL *et al.*, 2003; STÅHLBERG *et al.*, 2003; ABRAHAMSEN *et al.*, 2005). Existem duas estratégias fundamentais de quantificação com ensaios de RT-PCR cinéticos: a quantificação absoluta ou a relativa (PFAFFL, 2004). Na maior parte das situações experimentais, a quantificação relativa já apresenta a informação fisiológica relevante, indicando o número de vezes em que um gene tem o seu nível de expressão alterado em resposta a um determinado estímulo. A quantificação absoluta, contudo, pode ser indispensável em situações como quantificação de carga viral ou bacteriana (OTT *et al.*, 2004; SHAPSHAK *et al.*, 2005). Este tipo de estratégia envolve a geração de curvas de calibração externas, com amostras com concentrações conhecidas, extremamente acuradas. A construção e a validação dessas curvas têm sido uma área de grande interesse, e diferentes estratégias já foram propostas e testadas (BUSTIN, 2000; PFAFFL & HAGELEIT, 2001). Já os ensaios de quantificação relativa dispensam a construção de curvas de calibração externas. O nível de expressão de um determinado gene em duas ou mais condições experimentais é considerado em relação ao nível de expressão de um ou, mais recentemente, vários genes “housekeeping”, que atuam como normalizadores (VANDESOMPELE *et al.*, 2002; PFAFFL *et al.*, 2004; RADONIC *et al.*, 2004; SZABO *et al.*, 2004).

Variações metodológicas foram propostas e testadas em todas as etapas da RT-PCR em tempo real, incluindo a extração e purificação do RNA total (BUSTIN, 2002), a síntese de cDNA (LEKANNÉ DEPREZ *et al.*, 2002; RESUEHR & SPIESS, 2003), a química de detecção fluorescente (BUSTIN, 2002), a avaliação da eficiência (RAMAKERS *et al.*, 2003), a normalização dos dados (ELEAUME & JABBOURI, 2004) e, por fim, a organização, análise estatística e apresentação gráfica dos resultados (MULLER *et al.*, 2002). O panorama de opções em cada uma dessas etapas é formidável, sugerindo que muitos estudos ainda serão necessários até que padrões internacionais sejam plenamente aceitos e incorporados na rotina dos diferentes grupos de pesquisa que utilizam esta técnica, o que permitiria integrar, de forma mais efetiva, os resultados destas análises.

## **1.2. OBJETIVOS**

Com o propósito de estudar os mecanismos celulares e moleculares do processo de segmentação em cestódeos, o Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos (LBMC) iniciou uma linha de pesquisa envolvendo o estabelecimento de cultivos *in vitro* de *Mesocostoides corti* (Cyclophyllidea). As condições para a manutenção e diferenciação de tetratirídeos em vermes segmentados foram estabelecidas e otimizadas (MARKOSKI, 2000; BIZARRO, 2001; MARKOSKI *et al.*, 2003; ESPINOZA *et al.*, no prelo).

A caracterização e a análise de seqüências diferencialmente expressas entre tetratirídeos e vermes segmentados representam um primeiro passo para o estudo dos mecanismos moleculares da segmentação em cestódeos. O entendimento desse processo pode trazer contribuições significativas para temas polêmicos como a definição do mono- ou polifiletismo da segmentação nos metazoários e a determinação do plano ancestral dos

organismos bilatérios. Considerando esses aspectos, o presente trabalho tem como objetivos principais:

1. O isolamento e a caracterização de transcritos diferencialmente expressos das fases larval e de verme segmentado de *M. corti*.
2. A validação do padrão de expressão diferencial apresentado por estes transcritos.
3. A análise do conjunto de transcritos diferenciais de cada fase do desenvolvimento do parasito e a seleção de alvos para estudos posteriores pormenorizados.



## CAPÍTULO II

**2.1.** Manuscrito submetido para publicação na revista *Molecular and Biochemical Parasitology*, em fevereiro de 2005.

### **Differentially Expressed Sequences from a Cestode Parasite Reveals Conserved**

#### **Developmental Genes in Platyhelminthes**

Cristiano V. Bizarro, Mário H. Bengtson, Felipe K. Ricachenevsky, Arnaldo Zaha, Mari C. Sogayar, and Henrique B. Ferreira

**2.2.** Adendo: Construção das bibliotecas subtraídas por cDNA RDA.

**2.3.** Comprovante da submissão do manuscrito.

## Title Page

# Differentially Expressed Sequences from a Cestode Parasite Reveals Conserved Developmental Genes in Platyhelminthes

Cristiano V. Bizarro<sup>b</sup>, Mário H. Bengtson<sup>c</sup>, Felipe K. Ricachenevsky<sup>b</sup>, Arnaldo Zaha<sup>a,b</sup>,  
Mari C. Sogayar<sup>c</sup>, and Henrique B. Ferreira<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup>Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup>Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

*Abbreviations:* RDA, representational difference analysis; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction

*Note:* Nucleotide sequence data reported in this paper are available in the GenBank™, EMBL and DDBJ databases under the accession numbers CX863392 - CX865174

\* Corresponding author. Present address:

Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15005, Porto Alegre, 91501-970,

RS, Brazil. Tel: +5551 3316 60 70; Fax:

+5551 3316 7309.

*E-mail address:* [henrique@cbiot.ufrgs.br](mailto:henrique@cbiot.ufrgs.br) (H.

B. Ferreira)

## **Abstract**

Cestode parasites are the etiological agents of major diseases both in humans and in domesticated animals. As a first approach to study the developmental biology of cestodes, we undertook a cDNA representational difference analysis (cDNA RDA) using total RNA from *Mesocestoides corti* larvae (tetrathyridia) and *in vitro* segmented worms. Two subtracted cDNA libraries, enriched with differentially expressed sequences from larval or segmented forms, were constructed using a ratio of 100:1 and 800:1 of driver/tester cDNAs in the first and second rounds of subtraction, respectively. The subtraction efficiency was assessed through hybridization experiments, using the subtracted sequences as probes against the original PCR-amplified cDNA products, by macroarray analysis, and by individual confirmation of selected clones in virtual northern blot experiments. After sequencing 1,036 independent cDNA clones and adopting a high-quality sequencing strategy, we identified at least 190 sequences, preferentially expressed in tetrathyridia (49) or segmented worms (141). Among the identified genes, 71 had possible assigned functions, including some related to global regulators of chromatin structure and transcriptional control, whose orthologs are implicated in developmental processes in *Drosophila* and in vertebrates. We present some of the molecular differences found between the larval and strobilated stages of a tapeworm parasite.

### ***Keywords***

*Mesocestoides corti*; Eucestoda; tetrathyridia; gene expression; cestode strobilation

## ***1. Introduction***

Cestode parasites are the etiological agents of major diseases both in humans and in domesticated animals [1,2]. Despite the considerable attention received by some disease-causing cestode species, such as *Echinococcus spp.*, and *Taenia spp.*, little is known about the molecular biology of the developmental transition from larval forms into adult parasites. The eucestodes have evolved a particularly intriguing life history strategy to increase their reproductive capability [3]. During development, the adult body plan of most eucestodes is formed by a serial repetition of reproductive organs, a process known as proglottization. Most Eucestoda orders have also evolved a segmental body organization by external division of the proglottides, resulting in strobilated adult worms [3,4]. In light of the recently proposed metazoan phylogenies, Platyhelminthes have a much more derived condition than previously thought, being placed within the lophotrocozoan branch [5,6]. In this context, inclusion of data from the currently neglected cestode strobilation phenomena would offer a more complete picture on the extent of evolutionary conservation relative to developmental mechanisms in bilaterian metazoans.

As a first step toward this end, we are using *Mesocestoides corti* as a model organism to study the development of the cestode strobilar stage. The research potential of *M. corti* has already been recognized [7-9], primarily because of the easy maintenance of the asexual multiplying tetrathyridium larval stage in the laboratory by serial passages in the peritoneal cavity of mice [9]. We have improved culture conditions that induce tetrathyridia to differentiate into strobilated worms [10] and are currently conducting a morphological and histological analysis of *M. corti in vitro* strobilation (unpublished observations).

Here, we have adapted the cDNA representational difference analysis technique [11], which enables the isolation of genes with an altered expression between tissues or cell samples, to isolate differentially expressed sequences between tetrathyridia and strobilated forms obtained from *in vitro* cultures. Subtracted cDNA libraries containing differentially expressed sequences from segmented or larval stages were constructed. The subtraction efficiency of each library was experimentally evaluated, and random clones were sequenced. Individual confirmation of differential expression was carried out for selected sequences. Based on functional annotation of the differential transcriptomes, we present a first glimpse on some of the molecular differences between tetrathyridia and strobilated *M. corti* tapeworms.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Parasites.*

*M. corti* tetrathyridia were kindly provided by Dr. Ricardo Erlich (*Universidad de la Republica*, Montevideo, Uruguay). The strain used, originally isolated from a lizard population by Specht & Vogt (1965), was maintained by intraperitoneal passage through BALB/c-strain laboratory mice (male and female), 8-12 weeks old, and Wistar female rats (*Rattus norvegicus*), 8-12 weeks old. Each mouse was inoculated with 150 to 600 tetrathyridia while each rat was inoculated with 600-1,500 tetrathyridia resuspended in PBS. The animals were provided with food and water *ad libitum* and maintained in light cycles of 12 h at 22 °C.

## 2.2. Collection of tetrathyridia.

The experimental hosts were sacrificed and *M. corti* larvae were collected from the peritoneal cavity of animals 90-350 days post infection. The tetrathyridia (5,000-20,000 larvae in a 3-7 ml ascite) samples were washed 4-6 times in RPMI medium (supplemented with 50 µg/ml gentamicin) and immediately cultured, reinjected or stored at 4 °C. The handling and killing of animals was compliant with federal, state, and local laws and regulations.

## 2.3. *In vitro* culture.

*In vitro* culture conditions and induction of *in vitro* segmentation of parasites by a trypsin pre-treatment were carried out as described elsewhere [10]. Six days after pre-treatment, undifferentiated tetrathyridia from control cultures (non-pre-treated) and trypsin pre-treated worms that started to segment were individually collected.

## 2.4. RNA isolation.

Collected segmented tapeworms and tetrathyridia were immediately immersed in RNA Later (Ambion). The samples were maintained for 30 min in RNA Later and then were pulverized with a mortar and pestle frozen in liquid nitrogen. The method for total RNA

extraction was adapted from Chirgwin *et al.* (1979) [12]. Briefly, for each sample containing 100 specimens, the pulverized material was transferred to an 8 ml lysis solution (4M guanidinium isothiocyanate, 25 mM sodium citrate pH 7.0, 100 mM  $\beta$ -mercaptoethanol). The lysates were repeatedly mixed, distributed in 1.5 ml plastic tubes and centrifuged at 15,000g for 30 min. The supernatant, without the pelleted calcareous corpuscles, were subjected to a CsCl ultracentrifugation, as described elsewhere [12].

### 2.5. *cDNA synthesis.*

First strand cDNA was synthesized using the SMART<sup>TM</sup> PCR cDNA Synthesis kit (Clontech Inc.) according to the manufacturer's instructions, except that 200U of Superscript II RNase H<sup>-</sup> (Invitrogen Life Technologies) was used. Another modification from the manufacturer's instructions was the addition of 40U RNaseOUT (Invitrogen Life Technologies) in the reaction. For each first strand cDNA synthesis reaction, we used 1  $\mu$ g of total RNA from either tetrathyridia or segmented worms. First strand cDNA synthesis products were amplified using the PCR primer (5'-AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT-3'),



which can amplify all successfully reverse transcribed mRNAs. The samples were amplified in a MJ Research PTC-225 or a Gene Amp PCR System 9700 thermocycler (Applied Biosystems). The PCR mixtures were subjected to an initial denaturation cycle at 95 °C for 1 min followed by 16 cycles of 95 °C for 5 s (denaturation), 65 °C for 5 s (annealing), and 68 °C for 6 min (extension).

#### *2.6. Representational Difference Analysis.*

For the generation of subtracted difference products we modified a previously described protocol [13], allowing the application of cDNA RDA to limited amounts of starting material. We used the SMART amplified cDNA products from both developmental stages as the starting material, which allowed us to start the libraries with only 1 µg of total RNA. The amplified cDNAs were digested with *Sau3AI* and then subjected to cDNA RDA as previously described [13]. cDNAs from segmented worms were used as tester for

the Forward library and as driver for the Reverse library, and vice-versa for the tetrathyridia cDNAs. Two rounds of cDNA RDA were carried out. The subtraction ratio between the driver and the tester in the first round was 100:1, while that in the second round was 800:1. The forward and reverse second difference products (DP2), obtained after the second round of subtraction (800:1), were cloned into pBluescript II SK(+) and randomly selected clones were stored in 96-well plates at  $-20^{\circ}\text{C}$  with 30% glycerol.

### *2.7. Radiolabeling of cDNA probes.*

Selected sequenced cDNA clones, the original SMART amplified cDNA amplicons and DP2 fragment pools from both forward and reverse subtractions were radiolabelled using the Ready-to-Go DNA labeling beads (dCTP) kit (Amersham Biosciences) and 50  $\mu\text{Ci}$  of  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dCTP per reaction. For macroarray and virtual northern blots, the probes used in each experiment were

normalized by their radioactivity incorporation, measured in cpm, upon scintillation counting.

### *2.8. Macroarray analysis.*

Colony PCR [14] products from bacterial stocks of the Forward and Reverse libraries stored in 96-well plates were spotted onto nylon membranes using Exprecision™ DNA Arraying System (Bioinformática, Campinas, Brazil).  $\alpha$ -<sup>32</sup>P- labeled amplicons derived from SMART amplified cDNAs were used as probes.

### *2.9. Automated sequencing.*

Based on the macroarray analysis, we first sequenced PCR-amplified products from 36 clones using an ABI PRISM 377 sequencer (Applied Biosystems). Subsequently, we employed a different sequencing strategy. Clones from both libraries were sequenced using a MegaBace 1000 machine (Amersham

Biosciences). We used an alkaline lysis method [15] for plasmid DNA preparation in 96-well plates. Plasmid DNAs were subsequently purified through Millipore plates and resuspended in 30 µl MilliQ water. 500 ng from each plasmid DNA was sequenced using the DYEnamic ET Terminator Kit (Amersham Biosciences), according to the manufacturer's instructions.

#### *2.10. Sequence analysis.*

Chromatograms were processed and analyzed using the Phred/Phrap/ Consed package [16-18]. Consensus sequences corresponding to different cDNA fragments were derived by clustering the reads. Additional sequencing of selected clones was carried out to result in consensus sequences with phred of at least 20 in all nucleotide positions. Clusters still containing low-quality consensus sequences, clusters corresponding to sequences found to be equally expressed between tetrathyridia and segmented worms

upon virtual northern and/or macroarray analysis and consensus sequences which were very similar to the sequence of another cluster, were excluded from the analysis. The high-quality consensus sequences were compared to public nucleotide and protein databases using the BLAST search programs [19] at NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). The sequences were conceptually translated using the Translate tool from the ExPASy proteomics server (<http://au.expasy.org>). Translated ORFs corresponding to the reading frames that aligned to other sequences in BLASTX searches or that displayed no stop codons were selected for domain and motif searches with CD-Search [20] and PROSITE [21]. Multiple sequence alignments were performed using the CLUSTAL X program [22].

### *2.11. Virtual northern blots.*

Virtual northern blots [23] were used to confirm the differential expression of isolated clones from the forward library. SMART

cDNA synthesis products from tetrathyridia and segmented worms were digested with *Sau3AI*, ligated with R-adapters, and amplified with primer R24 [13] for 12 or 14 cycles. The amplification products were transferred to a Hybond N+ membrane and hybridized with  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-labeled probes from clones that were considered as differentially expressed in the segmental stage or as undifferentially expressed clones based on macroarrays experiments.

### **3. Results**

#### *3.1. Generation and validation of the subtracted cDNA libraries.*

RDA-subtracted cDNA libraries from both larval and segmental forms of *M. corti* were constructed after two rounds of subtraction (see Materials and Methods). As a first approach to verify the efficiency of cDNA subtraction in both libraries, we used the DP2

Forward and the DP2 Reverse cDNA fragment pools as probes against the SMART cDNA synthesis products of tetrathyridia and segmented worms (Fig. 1). The DP2 Reverse probe hybridized only to SMART cDNA synthesis products from tetrathyridia, suggesting that this cDNA pool is highly enriched for tetrathyridia-specific sequences. However, the DP2 Forward probe hybridized with both SMART cDNA products. Nevertheless, the non-subtracted cDNA synthesis products, used as targets, probably display a high representation of housekeeping genes, therefore, even a relatively low frequency of contamination with non-differentially expressed sequences in the DP2 Forward probe would be sufficient to explain the result. For an additional confirmation, we prepared cDNA macroarrays with clones from both libraries and hybridized with probes prepared from the non-subtracted cDNA synthesis products from larval and segmented stages (Fig. 2). Indeed, spots of PCR-products from Reverse library-derived clones

hybridized more intensely with the non-subtracted tetrathyridia cDNA probe, as expected. However, the opposite was not found when the hybridization signals from the Forward library clones were compared. Unexpectedly, it is possible to distinguish a set of high intensity Forward library spots displaying a stronger signal after tetrathyridia-derived cDNA probe hybridization (see Fig. 2A and 2C). Interestingly, a major unidentified band comprises a considerable amount of the total cDNA synthesis reactions, which is even more abundant in the segmented cDNA used as a probe (Fig. 2B and 2D). Considering that the probes were normalized by their specific activities (cpm/ $\mu$ g), the majority of the cDNA species are under-represented, relative to the cDNA probe from tetrathyridia, in the cDNA probe from segmented worms. We reasoned that the high intensity spots could represent non-differentially expressed sequences contaminating the DP2 Forward library. To address this question, selected clones from the



Forward library were individually tested in virtual northern blot experiments using, as probes, amplicons (after R- adapter ligation) of *Sau3A*-digested Smart cDNA synthesis products (Fig. 3). These amplicons are devoid of the above-mentioned band, which is not cleaved by *Sau3AI* (see Fig. 3). We selected two clones from the set of sequences presenting high intensity spots as non-differentially expressed candidates and another four clones as differentially expressed candidates. Virtual northern blots confirmed the macroarray hybridization pattern.

### *3.2. Comparison of Forward and Reverse libraries.*

As a means to compare the transcripts present in both developmental stages, we sequenced randomly selected clones from both libraries (Table1 and Tables S1 and S2 – Supplemental Material). We have generated 1,363 reads from the Forward library and 601 reads from the Reverse library. These resulted

in 587 and 399 different clones that were assembled into, respectively, 149 and 67 analyzed clusters, each of which corresponding to clones that share the same insert sequence. The number of clones in each cluster is depicted for both libraries (Fig. 4). The Reverse library is more redundant than the Forward one. A high-level of redundancy is normally expected in cDNA RDA libraries, since they are enriched in differentially expressed sequences between the two conditions compared, usually corresponding to a minor fraction of the total transcriptome. As a further test for library specificity, we assembled all reads from the Forward and the Reverse library. Not a single cluster was found with reads from both libraries, suggesting that at least one library was very efficiently subtracted.

*3.3. A high proportion of subtracted cDNAs have no previously described orthologs in platyhelminthes.*

The high-quality consensus sequences generated for each cluster were compared with the NCBI non-redundant (nr) and EST databases using the BLAST algorithm [19]. Sequences were annotated based on sequence similarity to orthologs of known function. Sequences displaying matches uniquely to functionally uncharacterized sequences or not displaying any significant match were assigned as, respectively, conserved hypothetical and hypothetical. As shown in Table 1, we functionally annotated 40 and 57 consensus sequences from, respectively, the Reverse and Forward libraries. Only 20 consensus sequences were considered as hypothetical from the Reverse library, whereas 80 were annotated as such from the Forward library. We found 12 clusters of conserved hypothetical sequences in the Forward library, half of which presenting orthologs exclusively

in species from the Platyhelminthes phylum. In the tetrathyridia-specific Reverse library, three from the seven conserved hypothetical sequences found are restricted to the Platyhelminthes phylum. Interestingly, we did not find any flatworm orthologue among the first 100 matches (after EST and 'nr' searches) for 40 % (Forward library) and 50% (Reverse library) of the sequences that displayed significant matches after database searches. This could be attributed to the paucity of genomic information currently available for flatworms, specially the parasitic classes, except for the EST projects of model species from the *Schistosoma* and *Echinococcus* genera [24-26].

#### *3.4. Construction of virtual transcripts by sequence similarity searches.*

Since the cDNA RDA methodology involves a complete digestion step prior to the

subtraction procedure, we might expect the presence of fragments corresponding to different portions of the same transcript. Indeed, we found six gene products in the Reverse library and seven additional products in the Forward library, which were represented by more than one consensus sequences. These sequences match to distinct regions of the corresponding orthologs. Fig. S1 (Supplemental Material) depicts such “virtual transcripts”, showing the relative positions of each consensus sequence to identified orthologues.

*3.5. Forward and Reverse libraries present sequences distributed in distinct patterns of functional categories.*

Excluding redundant sequences, we retrieved fragments of 49 and 22 different cDNA sequences from the Forward and the Reverse library, respectively, which were functionally annotated (Table 1). These putative gene products were grouped into 10

functional categories (Fig. 5). Annotated sequences that could not be assigned to any of these functional categories were grouped as “others”. Segmented worms showed 25% (12 sequences) of their sampled transcriptome coding for metabolic enzymes, whereas tetrathyridia presented only two metabolism-related sequences, corresponding, solely, to 10% of its sampled transcriptome. Another 25% of the segmented-specific sequences were grouped into four functional categories found exclusively in the segmented transcriptome (see Fig. 5). Alternatively, 36% of sequences from the tetrathyridia-specific Reverse library fell into the cell cycle/ cell growth and vesicle trafficking categories, whereas only 15% of segmented-specific Forward sequences were grouped into these categories. These differences could be of developmental relevance as the larval forms are able to multiply asexually in the intermediate host, requiring the activity of cell growth and cell division mechanisms.

#### **4. Discussion**

Chromatin remodeling activities have been implicated in developmental processes in *Drosophila* and in mammals [27-28]. Our results suggest that the differential transcriptomes presented by tetrathyridia and segmented worms could be the result, at least in part, from alterations in chromatin structure mediated by chromatin remodeling activities. Indeed, we found a sequence orthologous to the histone deacetylase 3 (HDA3) in the segmented-specific transcriptome, which is a component of histone deacetylase complexes (HDACs) implicated in gene inactivation by histone deacetylation. Moreover, we also found, in the same transcriptome, a sequence related to the macroH2A1 protein variant histone, which is implicated in gene silencing and is enriched in inactive X-chromosome chromatin in mammals [29]. We observed that this consensus sequence contains part of the non-histone macro H2A1 domain. However, since this domain is also shared by other

proteins that are unrelated to the macroH2A1 histone [30], it could not be ruled out that the consensus sequence corresponds to a portion of another transcript that is unrelated to histone variants. We also found a sequence related to the MTA (metastasis-associated) protein family in the Forward library. The founder member of this family, MTA1, was initially described in rat cancer cell lines as a sequence whose expression was higher in more invasive cell lines with increased metastatic potential [31]. It was subsequently shown that vertebrates display three members of this gene family coding for five gene products and that all of them physically interact with Mi-2/NuRD complexes, which display histone deacetylation and ATP-dependent chromatin remodeling activities (for a review, see 32). The domain organization of human MTA family members and the *M. corti* ortholog fragment are depicted in Fig. 6. The *M. corti* sequence found corresponds to the N-terminal BAH (bromo-adjacent homology) domain of



vertebrate orthologs. This sequence was also similar to arthropods and other chordate orthologs.

Another sequence potentially involved in chromatin remodeling activities was also found in the Forward library. This sequence is similar to the myeloid leukemia-associated oncoprotein SET/TAF-I $\beta$  [33,34], found to be a major component of the INHAT (inhibitor of acetyltransferases), which uses a previously unknown histone-masking mechanism for HAT inhibition [35]. The orthologous fragment from *M. corti* corresponds to the N-terminal portion of the sequence, having part of the NAP (nuclear assembly protein) domain, shared by the SET/NAP protein family.

Sequences putatively involved in chromatin remodeling activities were also found in the Reverse library. We identified three clusters that correspond to different regions of a CHD 3/4 class member ortholog (Fig. 7). The CHD family name stands for the chromo, SNF2-related helicase/ ATPase, and DNA-binding

domains shared by its members [36]. The sequence clusters obtained from *M. corti* tetrathyridia encompass a chromo domain, the amino-terminal portion of a SNF2 family N-terminal domain (SNF2 N), and a complete DUF1087 domain, of unknown function, but which is also found in other chromodomain helicase-DNA-binding proteins. In contrast to the CHD 1 class proteins, CHD 3/4 class members are involved in gene silencing processes [37]. As an example, the CHD 3/4 dMi-2 cooperates with Polycomb for maintenance of homeotic gene silencing during *Drosophila* development [27].

A sequence that could couple chromatin-dependent regulatory processes with cell growth and differentiation pathways was identified in tetrathyridia. We found four clusters in the Reverse library related to different portions of SBF1 (SET binding factor 1), a member of myotubularin pseudo-phosphatases. Myotubularins are dual specificity phosphatases that contain a motif similar to the protein tyrosine phosphatases

(PTP) active sites [38]. These proteins are involved in phosphatidylinositol -3-phosphate (PI(3)P) metabolism, which is a key regulator of cellular growth and differentiation.

Myotubularin pseudo-phosphatases are naturally devoid of phosphatase catalytic activity, due to alterations in the PTP motif [39]. This subset of proteins could oppose the activity of other myotubularins [40].

Interestingly, myotubularin proteins have the ability to interact with SET (Suvar3-9, Enhancer-of-zeste, Trithorax) domain-containing proteins [41]. SET domains are present in multidomain proteins, being able to methylate lysine residues of histones and other proteins, being involved in epigenetic mechanisms of gene regulation [42]. SBF1 is naturally restricted to the cytoplasm, but the N-terminal region appears to be responsible for this subcellular localization [39].

Moreover, SBF1 and related proteins could conceivably interact with SET-containing cytoplasmic targets. The complete multidomain organization and experimental

analysis will be required to reveal the functional role of *M.corti* SBF1 ortholog in tetrathyridia development.

A sequence related to the *Drosophila* OSA/ELD gene product was also found in the Reverse library. *Drosophila osa/eld* is a homeotic gene regulator from the trithorax group (trxG) that interacts with the trxG gene *brahma* (brm), regulating *Antennapedia* (Antp) expression and possibly other homeotic genes, being maternally required for proper embryonic segmentation [43]. Two conserved amino acid sequences among OSA/ELD orthologues from *C.elegans*, *Drosophila* and *H.sapiens* were identified in its C-terminal region, named Eld/Osa homology domains (EHD) 1 and 2 [44]. The *M. corti* *osa/eld*-related sequence corresponds to part of the EHD2 domain (Fig. 8). Interestingly, the human hELD/OSA1 EHD2 domain binds BRG1, which is homologous to the yeast Swi2/Snf2 and the *Drosophila* BRAHMA protein. Additionally, the *Drosophila* *osa/eld* product appears to selectively recruit the BRM

complex, the yeast SWI/SNF complex counterpart, to some promoters, while both human homologues, p270 and *hELD/OSA1* gene products, were identified as core components of the human SWI/SNF complex [44]. This is the first sequence related to the *osa/eld* genes found in a platyhelminth, prompting further studies to investigate whether other proteins orthologous to components of the BRM and/or the mammalian SWI/SNF complexes are also found in this lophotrocozoan phylum. Interestingly, *DjXnp*, a sequence with putative ATP-dependent chromatin remodelling activity, related to mammalian SNF2-like XNP/ATRX proteins, was isolated and found to be expressed in blastema cells close to the nerve cords in the planarian *Dugesia japonica* [45]. Two additional sequences potentially involved in gene regulation processes were identified in tetrathyridia, one coding for a PHD (plant homeodomain) zinc finger type weakly similar to *Arabidopsis thaliana* trithorax 5 -related protein, and a hypothetical

protein, containing a C2H2 type zinc finger domain.

Recently, a partial LIM-homeobox containing sequence (MvLim) was isolated and found to be upregulated during strobilar development of *M. corti* [46]. MvLim contains only the homeodomain and part of a nonconserved region. Two LIM motifs, each comprising two zinc finger domains, are presumably present in the N-terminal region of the full-length sequence. We have identified sequences containing zinc finger domains in the segmented worm library. A C2H2 type zinc finger domain is present in a sequence similar to the *Drosophila hindsight* gene. This gene is involved in the morphogenetic process of germ band retraction during *Drosophila* development [47]. Another C2H2 type zinc finger was found in a sequence weakly related to the murine Snail family member Smuc. Importantly, members of the Snail family of zinc finger transcription factors are involved in many differentiation processes both in *Drosophila* and in vertebrates [48]. The

unusual C2HC type zinc finger domain is present in a sequence related to the mammalian myelin transcription factor 1, which is involved in neuronal and oligodendrocyte cell differentiation [49]. Additionally, we identified a putative BED zinc finger domain in a hypothetical sequence isolated from the library of segmented worms, which could be involved in chromatin insulation events [50]. A BTB/POZ (BR-C, ttk and bab / Pox virus and Zinc finger) domain was found in a sequence only weakly similar to a murine kelch-like 7 protein. Since this domain is normally associated with either zinc finger or kelch 1-containing proteins, no functional prediction for the *M.corti* orthologue can be made until we have the complete sequence isolated.

The molecular mechanisms of developmental processes presented by parasitic flatworms remain largely unknown. Beyond its importance *per se*, knowledge on the basic developmental biology of parasitic flatworms would be of value for comparative

studies of evolution of the metazoan developmental mechanisms, particularly those presented by bilaterians. The current revisions in the metazoan phylogeny would imply different views about the history of bilaterian development, providing a new impetus to the long-standing debates on the ancestry of the coelom [51]. Another issue being tackled in evo-devo studies concerns the evolution of metameric body plan organization, recognized in three phyla from the three major bilaterian lineages, namely: Deuterostoma (Chordata), Lophotrochozoa (Annelida), and Ecdysozoa (Arthropoda). The degree of conservation of molecular components involved in metameric development in vertebrates and arthropods is striking, prompting the suggestion that the ancestral Urbilateria could have a segmented body plan secondarily lost by the present-day unsegmented bilaterian phyla [52], and that perhaps a hidden metamerism could be present in the extant non-metameric bilaterian phyla [53]. Despite previous studies using *Hymenolepis* species as model organisms



[54,55], the strobilization and segmentation, which are essential processes in the development of most cestodes, remain largely unknown. It is possible that the cestode ability to generate a serial repetition pattern along its anteroposterior axis is a new metazoan invention, based on entirely new molecular mechanisms. Alternatively, cestodes could have preserved some components of an ancestral metamerism mode of development, co-opted to a new developmental process.

In this work, we have isolated differentially expressed sequences between the larval and the strobilated forms of a cestode. Despite major differences in the content of sequences related to metabolism, cell cycle/ cell growth, and other cellular processes, we were particularly interested in the set of transcription factors and regulators of chromatin structure, some of which were isolated for the first time from a platyhelminth species. We have sequenced cDNA fragments related to components of the SWI/SNF complexes, which are very ancient molecular

machineries, with orthologues present in yeasts, humans, and *Drosophila*. However, these transcriptomes also contain sequences that are intimately related to developmental processes in arthropods and vertebrates, recruiting chromatin remodeling activities to specific homeotic promoters or related to morphogenetic mechanisms.

This work represents an initial step towards the study of the molecular biology of the strobilization process in cestodes. Some target sequences are currently being selected for a more comprehensive characterization, involving the isolation of full-length cDNA products and expression studies by real-time RT-PCR analysis.

### **Acknowledgements**

We would like to thank Adriana de Freitas Schuck, Christyanne Thomaz Martinkovics, and Roberta Alvares Campos for helping in sequencing cDNA clones. This work was supported by CNPq/Brazil, FAPERGS/Brazil, RTPD Network (SIDA, Sweden), and

FAPESP/Brazil. C. V. B. is a recipient of a  
CAPES/Brazil Pre-Doctoral fellowship. F. K.  
R. was a recipient of a FAPERGS fellowship.  
M. H. B. was a recipient of a FAPESP Pre-  
Doctoral fellowship.

## References

- [1] Craig PS, Rogan MT, Campos-Ponce M. Echinococcosis: disease, detection and transmission. *Parasitology* 2003;127 Suppl:S5-S20.
- [2] Ito A. Serologic and molecular diagnosis of zoonotic larval cestode infections. *Parasitol Int* 2002;51:221-35.
- [3] Olson PD, Timothy D, Littlewood J, Bray RA, Mariaux J. Interrelationships and Evolution of the Tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda). *Mol Phylogenet Evol* 2001;19:443-67.
- [4] Mehlhorn H, Becker B, Andrews P, Thomas H. On the nature of the proglottids of cestodes: a light and electron microscopic study on *Taenia*, *Hymenolepis*, and *Echinococcus*. *Z Parasitenkd* 1981;65:243-59.
- [5] Adoutte A, Balavoine G, Lartillot N, Lespinet O, Prud'homme B, de Rosa R. The new animal phylogeny: reliability and implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:4453-56.
- [6] Mallatt J, Winchell CJ. Testing the new animal phylogeny: first use of combined large-subunit and small-subunit rRNA gene sequences to classify the protostomes. *Mol Biol Evol* 2002;19:289-301.
- [7] Cardona AE, Restrepo BI, Jaramillo JM, Teale JM. Development of an animal model for neurocysticercosis: immune response in the central nervous system is characterized by a predominance of gamma delta T cells. *J Immunol* 1999;162:995-1002.
- [8] Siles-Lucas M, Hemphill A. Cestode parasites: application of in vivo and in vitro models for studies on the host-parasite relationship. *Adv Parasitol* 2002;51:133-230.

- [9] Specht D, Voge M. Asexual multiplication of *Mesocestoides* tetrathyridia in laboratory animals. *J Parasitol* 1965;51:268-72.
- [10] Markoski MM, Bizarro CV, Farias S, Espinoza I, Galanti N, Zaha A, Ferreira HB. *In vitro* segmentation induction of *Mesocestoides corti* (Cestoda) tetrathyridia. *J Parasitol* 2003;89:27-34.
- [11] Hubank M, Schatz DG. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res* 1994;22:5640-48.
- [12] Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 1979;18:5294-99.
- [13] Hubank M, Schatz DG. Representational difference analysis of cDNA. In: Hunt SP, Livesey FJ, editors. *Functional Genomics - A practical approach*. Oxford University Press, Oxford, 2000;45-80.
- [14] Gussow D, Clackson T. Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* 1989;17:4000.
- [15] Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979;7:1513-23.
- [16] Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res* 1998;8:175-85.
- [17] Ewing B, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res* 1998;8:186-94.
- [18] Gordon D, Abajian C, Green P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res* 1998;8:195-202.

- [19] Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990;215:403-10.
- [20] Marchler-Bauer A, Bryant SH. CD-Search: protein domain annotations on the fly [Online]. *Nucleic Acids Res* 32: W327-331. [http://nar.oupjournals.org/cgi/content/full/32/suppl\\_2/W327](http://nar.oupjournals.org/cgi/content/full/32/suppl_2/W327) [1 July 2004].
- [21] Sigrist CJ, Cerutti L, Hulo N, Gattiker A, Falquet L, Pagni M, Bairoch A, Bucher P. PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors. *Brief Bioinform* 2002;3:265-74.
- [22] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997;25:4876-82.
- [23] Franz O, Bruchhaus II, Roeder T. Verification of differential gene transcription using Virtual Northern blotting. *Nucleic Acids Res* 27: e3. [Online.] <http://nar.oupjournals.org/cgi/content/full/27/11/e3?> [1 June 1999].
- [24] McManus DP, Le TH, Blair D. Genomics of parasitic flatworms. *Int J Parasitol* 2004;34:153-58.
- [25] Verjovski-Almeida S, DeMarco R, Martins EA, Guimarães PE, Ojopi EP, Paquola AC, Piazza JP, Nishiyama Jr MY, Kitajima JP, Adamson RE, Ashton PD, Bonaldo MF, Coulson PS, Dillon GP, Farias LP, Gregorio SP, Ho PL, Leite RA, Malaquias LC, Marques RC, Miyasato PA, Nascimento AL, Ohlweiler FP, Reis EM, Ribeiro MA, Sa RG, Stukart GC, Soares MB, Gargioni C, Kawano T, Rodrigues V, Madeira AM, Wilson RA, Menck CF, Setubal JC, Leite LC, Dias-Neto E. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. *Nat Genet* 2003;35:148-57.

- [26] Fernandez C, Gregory WF, Loke P, Maizels RM. Full-length-enriched cDNA libraries from *Echinococcus granulosus* contain separate populations of oligo-capped and trans-spliced transcripts and a high level of predicted signal peptide sequences. *Mol Biochem Parasitol* 2002;122:171-80.
- [27] Kehle J, Beuchle D, Treuheit S, Christen B, Kennison JA, Bienz M, Muller J. dMi-2, a hunchback-interacting protein that functions in polycomb repression. *Science* 1998;282:1897-1900.
- [28] Wade PA, Geggion A, Jones PL, Ballestar E, Aubry F, Wolffe AP. Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat Genet* 1999;23:62-66.
- [29] Chadwick BP, Willard HF. Cell cycle-dependent localization of macroH2A in chromatin of the inactive X chromosome. *J Cell Biol* 2002;157:1113-23.
- [30] Allen MD, Buckle AM, Cordell SC, Lowe J, Bycroft M. The crystal structure of AF1521 a protein from *Archaeoglobus fulgidus* with homology to the non-histone domain of macroH2A. *J Mol Biol* 2003;330:503-11.
- [31] Toh Y, Pencil SD, Nicolson GL. A novel candidate metastasis-associated gene, mta1, differentially expressed in highly metastatic mammary adenocarcinoma cell lines. cDNA cloning, expression, and protein analyses. *J Biol Chem* 1994;269:22958-63.
- [32] Bowen NJ, Fujita N, Kajita M, Wade PA. Mi-2/NuRD: multiple complexes for many purposes. *Biochim Biophys Acta* 2004;1677:52-57.
- [33] Adachi Y, Pavlakis GN, Copeland TD. Identification and characterization of SET, a nuclear phosphoprotein encoded by the translocation break point in acute undifferentiated leukemia. *J Biol Chem* 1994;269:2258-62.

- [34] Nagata K, Kawase H, Handa H, Yano K, Yamasaki M, Ishimi Y, Okuda A, Kikuchi A, Matsumoto K. Replication factor encoded by a putative oncogene, set, associated with myeloid leukemogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:4279-83.
- [35] Seo SB, McNamara P, Heo S, Turner A, Lane WS, Chakravarti D. Regulation of histone acetylation and transcription by INHAT, a human cellular complex containing the set oncoprotein. *Cell* 2001;104:119-30.
- [36] Woodage T, Basrai MA, Baxevanis AD, Hieter P, Collins FS. Characterization of the CHD family of proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:11472-77.
- [37] Eissenberg JC. Molecular biology of the chromo domain: an ancient chromatin module comes of age. *Gene* 2001;275:19-29.
- [38] Laporte J, Blondeau F, Buj-Bello A, Mandel JL. The myotubularin family: from genetic disease to phosphoinositide metabolism. *Trends Genet* 2001;17:221-28.
- [39] Firestein R, Cleary ML. Pseudo-phosphatase Sbf1 contains an N-terminal GEF homology domain that modulates its growth regulatory properties. *J Cell Sci* 2001;114:2921-27.
- [40] Hunter T. Anti-phosphatases take the stage. *Nat Genet* 1998;18:303-05.
- [41] Cui X, De Vivo I, Slany R, Miyamoto A, Firestein R, Cleary ML. Association of SET domain and myotubularin-related proteins modulate growth control. *Nat Genet* 1998;18:331-37.
- [42] Min J, Zhang X, Cheng X, Grewal SI, Xu RM. Structure of the SET domain histone lysine methyltransferase Clr4. *Nat Struct Biol* 2002;9:828-32.
- [43] Vazquez M, Moore L, Kennison JA. The trithorax group gene *osa* encodes an ARID-domain protein that genetically interacts with the brahma chromatin-remodeling factor to regulate transcription. *Development* 1999;126:733-42.



- [44] Hurlstone AF, Olave IA, Barker N, van Noort M, Clevers H. Cloning and characterization of hELD/OSA1, a novel BRG1 interacting protein. *Biochem J* 2002;364:255-64.
- [45] Rossi L, Deri P, Andreoli I, Gremigni V, Salvetti A, Batistoni R. Expression of *DjXnp*, a novel member of the SNF2-like ATP-dependent chromatin remodelling genes, in intact and regenerating planarians. *Int J Dev Biol* 2003;47:293-98.
- [46] Lalanne AI, Britos L, Ehrlich R, Castillo E. *Mesocestoides corti*: a LIM-homeobox gene upregulated during strobilar development. *Exp Parasitol* 2004;108:169-75.
- [47] Yip ML, Lamka ML, Lipshitz HD. Control of germ-band retraction in *Drosophila* by the zinc-finger protein HINDSIGHT. *Development* 1997;124:2129-41.
- [48] Kataoka H, Murayama T, Yokode M, Mori S, Sano H, Ozaki H, Yokota Y, Nishikawa S, Kita T. A novel snail-related transcription factor Smuc regulates basic helix-loop-helix transcription factor activities via specific E-box motifs. *Nucleic Acids Res* 2000;28:626-33.
- [49] Nielsen JA, Berndt JA, Hudson LD, Armstrong RC. Myelin transcription factor 1 (Myt1) modulates the proliferation and differentiation of oligodendrocyte lineage cells. *Mol Cell Neurosci* 2004;25:111-23.
- [50] Aravind L. The BED finger, a novel DNA-binding domain in chromatin-boundary-element-binding proteins and transposases. *Trends Biochem Sci* 2000;25:421-23.
- [51] Balavoine G. Are Platyhelminthes coelomates without a coelom? An argument based on the evolution of Hox genes. *American Zoologist* 1998;38:843-58.
- [52] Peel A, Akam M. Evolution of segmentation: rolling back the clock. *Curr Biol* 2003;3:R708-10.
- [53] Patel NH. The ancestry of segmentation. *Dev Cell* 2003;5:2-4.

[54] Kumazawa H, Suzuki N. Kinetics of proglottid formation, maturation and shedding during development of *Hymenolepis nana*. *Parasitology* 1983;86:275-89.

[55] Siddiqui AA, Podesta RB. Developmental regulation of protein synthesis in *Hymenolepis diminuta*: subcellular localization of proglottid specific gene products. *Cell Mol Biol* 1987;33:637-45.

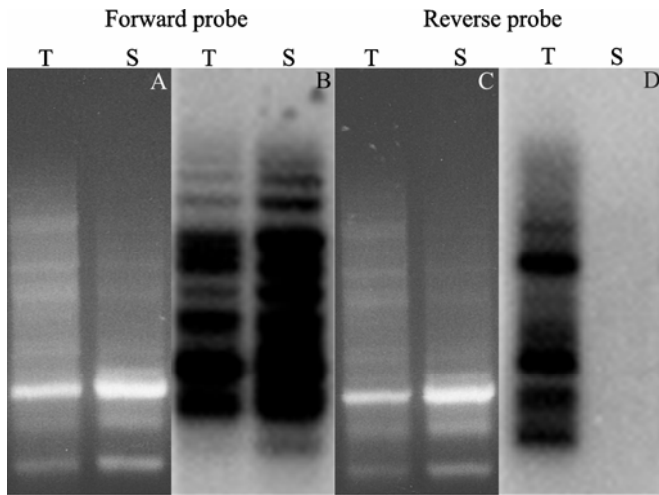
Tables

**Table 1. DP2 Forward and DP2 Reverse libraries: general aspects.**

General aspects	DP2 Forward	
	library	DP2 Reverse library
Reads assembled	1363	601
Independent clones sequenced	636	400
Independent clones assembled into analyzed clusters	587	399
Genes: total number (without redundant clusters)	141	49
Analyzed clusters: total number	149	67
Hypothetical clusters (HC)	80	20
Conserved hypothetical clusters (CHC)	12	7
Functionally annotated clusters (FC)	57	40
Redundant clusters (RC)	8	18
Valid transcripts (VT): FC – RC	49	22
VTs represented by more than one cluster	7	6
VTs without a platyhelminth orthologue sequenced / VT + CHC	24/61(40%)	15/29 (50%)
Platyhelminthes-restricted CHC/ CHC	6/12	3/7
HC + CHC with predicted domains / HC + CHC analyzed	4	3
<i>Echinococcus</i> sp orthologue as the first match	9	4
<i>Schistosoma</i> sp orthologue as the first match	27	10
Planarian orthologue as the first match	2	2

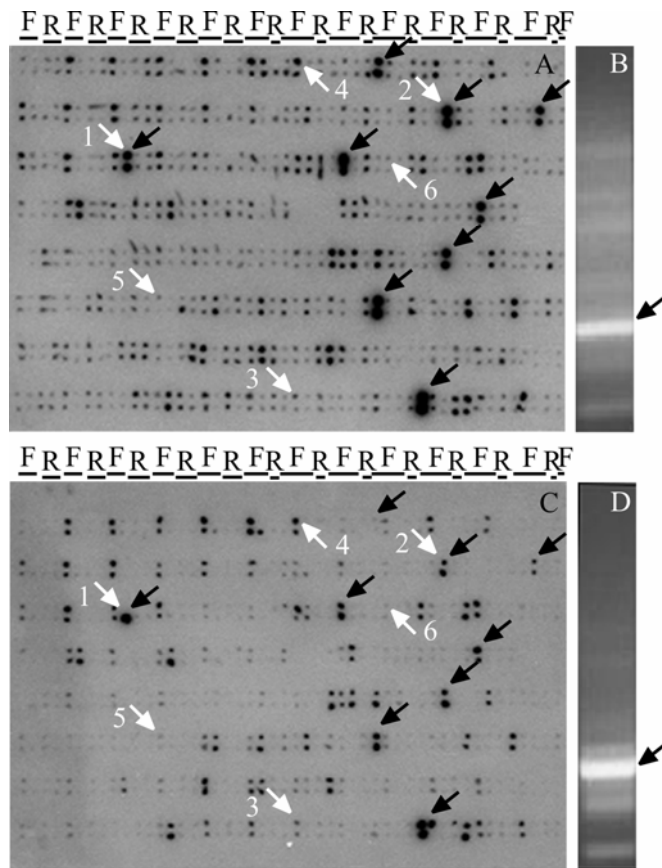
## Figures

Fig. 1.



**Fig. 1. Validation of subtracted cDNA libraries by hybridization with cDNA synthesis consensus products. The amplified SMART cDNA synthesis products from tetrathyridia (T) and from segmented worms (S) were fractionated through 1% agarose gel electrophoresis (A and C), transferred to nitrocellulose membranes and hybridized against radioactively labeled Forward (B) or Reverse (D) second differential products (DP2).**

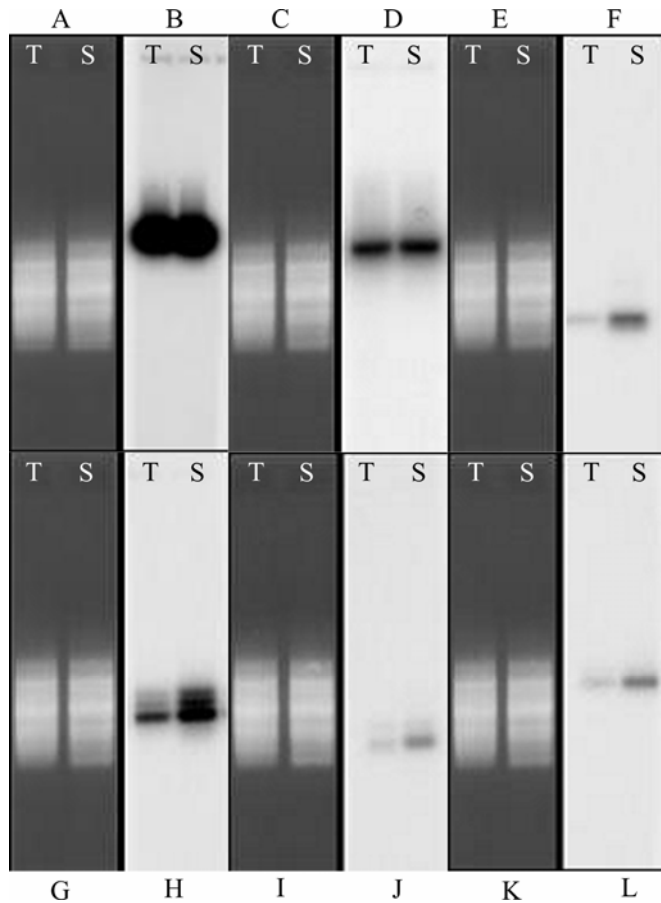
Fig. 2.



**Fig. 2. Macroarrays of PCR-amplified fragments from DP2 Forward and DP2 Reverse clones. A total of 248 randomly selected clones from DP2 Forward (F) and 136 clones from DP2 Reverse (R) libraries were amplified by PCR, and the amplicons were spotted, as duplicates, onto two nitrocellulose membrane replicas (A and C), resulting in 768 spots per membrane. The transferred PCR products were hybridized with radioactively labeled non-subtracted SMART cDNA synthesis products from tetrathyridia (A) or from segmented worms (C). The SMART cDNA synthesis**

products from tetrathyridia (B) and segmented worms (D) are depicted after agarose gel electrophoresis fractionation. The white arrows (A and C) point to spots from the DP2 Forward library corresponding to clones which were selected for virtual northern blot analysis (Fig. 3), presumed to be non-differential contaminants (1 and 2) or differentially expressed sequences (3, 4, 5, and 6). Black arrows (A and C) depict DP2 Forward PCR products duplicates that presented a stronger signal upon hybridization with tetrathyridia cDNA probe than with segmented worms cDNA probe (see text for details). Black arrows (B and D) depict a highly expressed major band more abundant in the segmented worm cDNA synthesis products than in the tetrathyridia cDNA products. 1, poly(A) binding protein (PABP); 2, apoptotic PDCD4-related sequence; 3, deoxynucleoside kinase; 4, 26S proteasome component; 5, annexin; 6, SET/TAF-1/PP2A inhibitor.

Fig. 3.



**Fig. 3. Virtual northern blot analysis of selected clones from the DP2Forward library. After R- adapter ligation, the amplicons of *Sau3A*-digested Smart cDNA synthesis products from tetrathyridia (T) and segmented worms (S) were fractionated by agarose gel electrophoresis in six replicas (A, C, E, G, I, and K), transferred to nitrocellulose membranes, and hybridized with radiolabeled probes prepared from sequences whose expression was evaluated (after macroarray analysis) to be non-differential (B and D) or augmented (F, H, J, and L) in segmented worms. B, poly(A)**

binding protein (PABP); D, apoptotic PDCD4-related sequence; F, deoxynucleoside kinase; H, 26S proteasome component; J, annexin; L, SET/TAF-1/PP2A inhibitor.

Fig. 4.

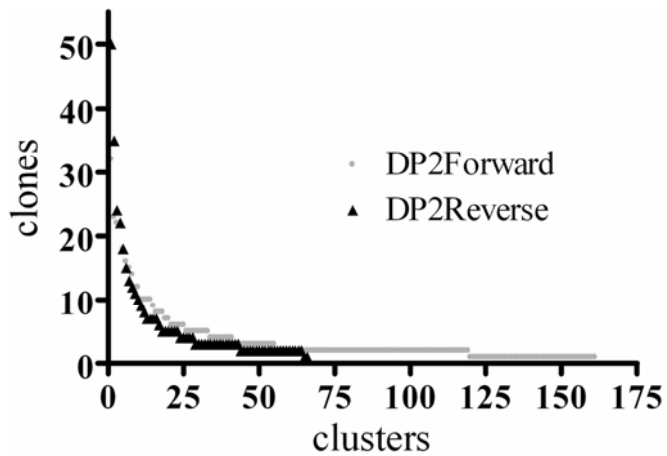
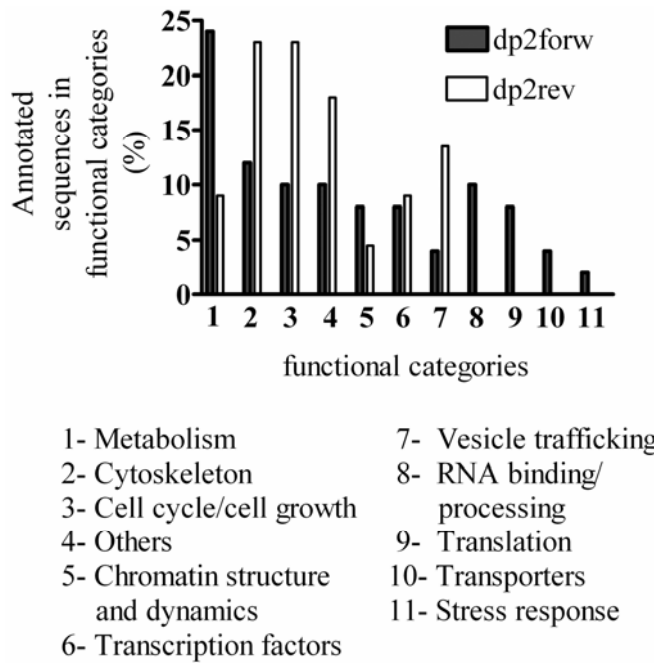


Fig. 4. Clustering of reads corresponding to different clones from DP2 Forward and DP2 Reverse libraries.

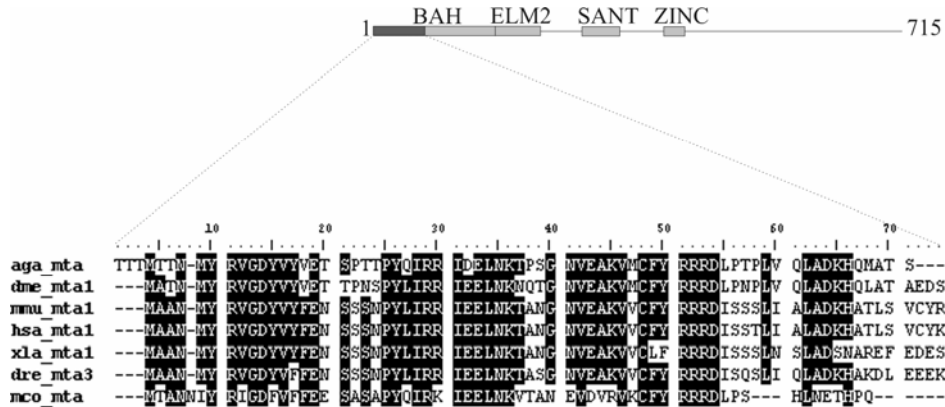


Fig. 5.



**Fig. 5. Functional categorization of annotated sequences from tetrathyridia (dp2rev) and segmented worms (dp2forw) subtracted cDNA libraries.**

Fig. 6.



**Fig. 6. Multiple sequence alignment of *Mesocestoides corti* cDNA sequence with metazoan MTA family members. A cDNA sequence from DP2 Forward library containing the N-terminal portion of a Bromo-adjacent homology (BAH) domain was aligned with different metazoan members from the metastasis-associated (MTA) family. The domain organization of the human MTA1 gene product (gi|14141149) is depicted. The BAH domain portion correspondent to the multiple alignment are shaded. ELM2, Egl-27 and MTA1 homology 2; SANT, SWI3, ADA2,N-CoR and TFIIIB B''; ZINC, GATA zinc finger; *aga*, *Anopheles gambiae*; *dme*, *Drosophila melanogaster*; *mmu*, *Mus musculus*; *hsa*, *Homo sapiens*; *xla*, *Xenopus laevis*; *dre*, *Danio rerio*; *mco*, *Mesocestoides corti*.**

Fig. 7.

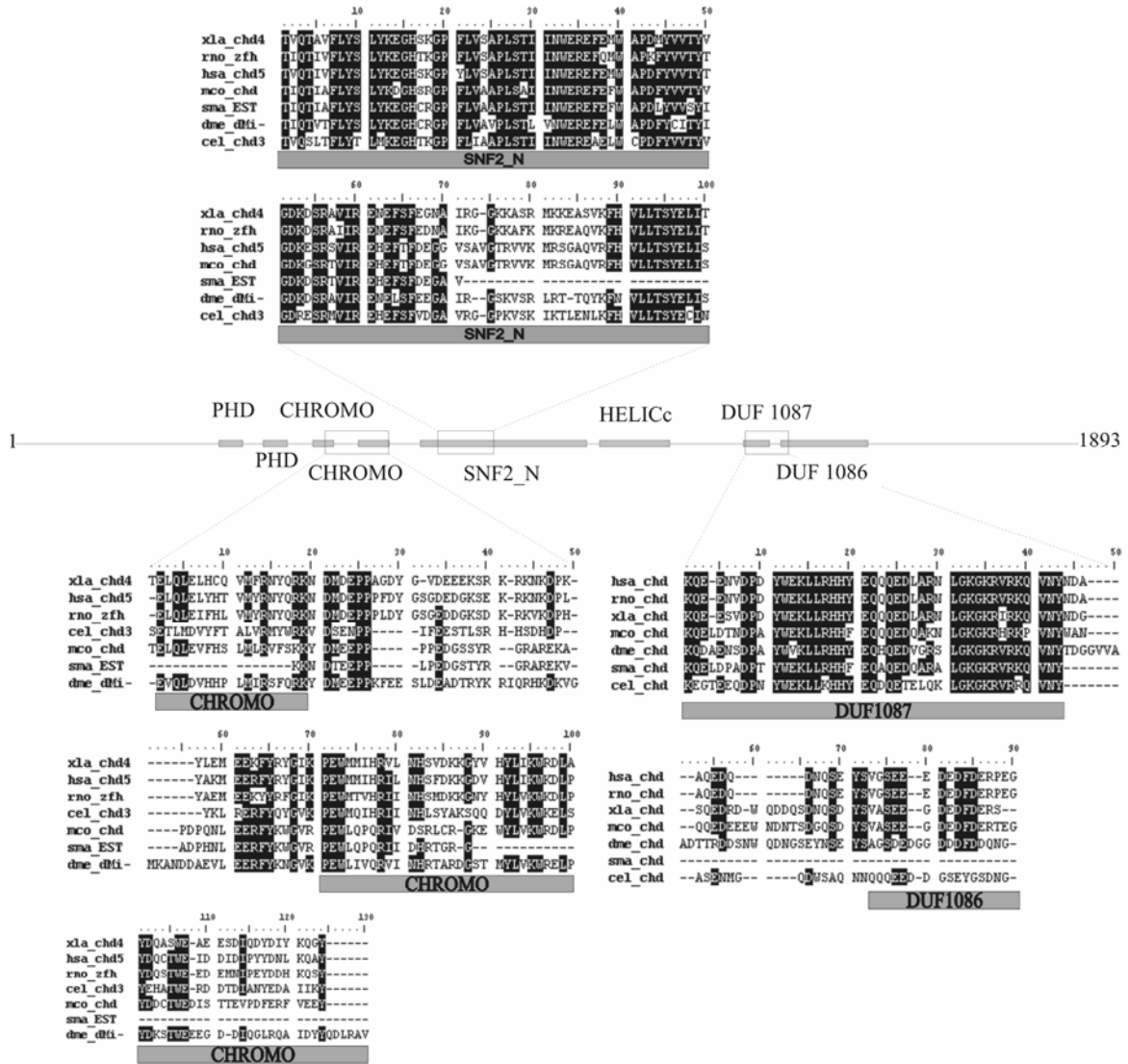


Fig. 7. Multiple sequence alignments of *Mesocestoides corti* cDNA sequences corresponding to different portions of a CHD 3/4 class member. The domain organization of a *Xenopus laevis* CHD gene product (GI 28422180) is depicted. PHD, Plant homeodomain finger, CHROMO, chromatin organizamodifier, SNF2\_N, SNF2 family N-terminal domain, HELICc, helicase superfamily C-terminal domain.

Fig. 8.

```
          10      20      30      40      50
hsa_p270  H R N I K I L E D E P H S K D E T P L C T L L D W Q D S L A R R C V C V S M T I R S L S F V P G M D
dme_dEld R R R D S S F E D E C Y T R D E A S L H L V S E S Q D S L A R R C I A L S M T F R N L I F V P G N E
mco_osa  -----ALW E V D I T S R R A E D F A D R C L C V S T V L R N L S F L E T G E
cel_osa  E L S D C K H E V E L A W P R P T A L S P K S Q A M E E L A H R A L A L S N I L R G F S F V A G S D

          60      70      80      90      100
hsa_p270  F E M S K H P G L L L L L G K L L L L H H K H P E R K Q -----A P L T E K
dme_dEld T V L A K S T R F L A W L G R L L L L H E H L R R T P -----K T R M D R
mco_osa  R V L S N H R A L L A L A G R L L T I A H T H F E G S D -----A D U A C V E
cel_osa  V L M A R N E A L L F I I G R L L K L N V R E H K I S S K R P G I V M S A E E L K T A P K Q L S A D

          110     120     130     140     150
hsa_p270  E E E D Q G V S C N ---K V E W W M D C L E M L R E N T L V L A M I S G Q L D L S P Y P E S
dme_dEld E E D T F S D S C S S L Q G E R E W W M D Y L I T I R E N M L V A M A N I A G H L E L S R Y D E L
mco_osa  D H A A R F Y S H S A -----W W H P W L D E L C E M I L V L L W N I S G H L A M P S T S R I
cel_osa  E K R A K E R S V L D E V D A T T A Q M V E T A N Q L R D D A F W M L T H M S V S L M L V D L R D A
```

**Fig. 8.** Alignment of different N-terminal portions of EHD2 domains from *Osa*-like gene products. hsa, *Homo sapiens*, dme, *Drosophila melanogaster*, mco, *Mesocestoides corti*, cel, *Caenorhabditis elegans*.



## 2.2. ADENDO

### CONSTRUÇÃO DAS BIBLIOTECAS SUBTRAÍDAS POR cDNA RDA

O protocolo empregado neste estudo baseia-se no descrito por HUBANK & SCHATZ (1994). Algumas adaptações foram introduzidas nas etapas iniciais da metodologia. No protocolo descrito por HUBANK & SCHATZ (1994), é realizada uma reação de síntese da 1ª fita de cDNA convencional a partir de mRNA purificado, seguida de uma reação de síntese da 2ª fita de cDNA. O produto de cDNA dupla fita não-amplificado é então purificado, clivado com *DpnII*, ligado ao primeiro par de oligonucleotídeos (adaptadores R), sendo geradas, por PCR, as representações das amostras “tester” e “driver”. O mRNA purificado é comumente tratado com DNase I com o propósito de evitar ao máximo eventuais contaminações com DNA genômico. Dessa forma, os protocolos tradicionais

apresentam uma limitação importante em termos de disponibilidade de material biológico: são necessários de 5 a 10 µg de mRNA purificado de cada amostra.

No presente estudo, o produto de amplificação da síntese de cDNA SMART foi utilizado como o material de partida, sendo clivado e ligado ao primeiro adaptador. Os adaptadores utilizados nas diferentes etapas estão apresentados na Figura 2.1. Como no processo de síntese de cDNA com o método SMART é gerada uma âncora 5' em cada cDNA sintetizado (complementar ao oligonucleotídeo SMART) a chance de contaminações com DNA genômico no produto final amplificado é reduzida. Além disso, o protocolo pode ser executado com apenas 1µg de RNA total de cada amostra.

As sínteses pelo método SMART dos cDNAs de tetratirídeos e de vermes segmentados, antes e após clivagem com *Sau3AI*, estão mostradas na Figura 2.2. As duas bandas de cDNA majoritárias parecem não ter sido clivadas com *Sau3AI* (a maior provavelmente apresenta um sítio em apenas uma das extremidades). Os cDNAs clivados de tetratirídeos e de vermes segmentados foram então ligados aos adaptadores R e amplificados utilizando o oligonucleotídeo R24. Por não apresentarem extremidades compatíveis com os adaptadores R, as bandas majoritárias não foram ligadas aos adaptadores e, portanto, não foram amplificadas na etapa de geração das representações. Com isso, ocorreu um processo importante de normalização antes das etapas de subtração. A padronização do número de ciclos de amplificação para a geração das representações de cDNA de tetratirídeos e de vermes segmentados está mostrada na Figura 2.3. Claramente o perfil de amplificação observado difere do perfil dos cDNAs



originais, clivados ou não com *Sau3AI* (ver Fig.2.2). Foi selecionada a condição de 12 ciclos de amplificação para os cDNAs de tetratirídeos e de 14 ciclos para os cDNAs de vermes segmentados. A Figura 2.4 mostra o perfil de amplificação das duas amostras após amplificação em maior quantidade nas condições selecionadas.

Com a técnica de cDNA RDA, foram preparadas duas bibliotecas a partir de produtos diferenciais secundários (DP2), uma enriquecida com seqüências diferencialmente expressas de vermes segmentados (biblioteca DP2Direta) e outra enriquecida com seqüências diferencialmente expressas de tetratirídeos (biblioteca DP2Reversa).

Foi feita a remoção dos adaptadores R (Figura 2.1) por clivagem com *Sau3AI* das amostras a serem utilizadas como “tester”, tanto de tetratirídeos como de vermes segmentados. As amostras tester foram então ligadas a um segundo par de



oligonucleotídeos, os adaptadores J12 e J24. Seguiu-se o primeiro ciclo das subtrações Direta e Reversa, em que foi utilizada uma razão “tester”：“driver” de 1:100. A Figura 2.5 mostra os perfis de amplificação dos produtos diferenciais gerados após esse primeiro ciclo de subtração (DP1). O perfil de bandas da DP1 Direta é nitidamente distinto do perfil de bandas da DP1 Reversa, um bom indício de que seqüências distintas estão sendo amplificadas. Deve-se observar também que o tamanho médio dos fragmentos diminuiu em relação ao das representações originais, um aspecto negativo da técnica, uma vez que introduz uma seleção dependente de tamanho e não da natureza das seqüências.

A etapa seguinte consistiu na geração dos produtos diferenciais secundários (DP2 Direta e DP2 Reversa). Para tanto, os produtos de DP1 foram clivados com *Sau3AI*, sendo com isso removidos os adaptadores J. Os produtos clivados foram então ligados a um novo par de oligonucleotídeos, os adaptadores N12 e N24. Nesse segundo ciclo, foi utilizada uma

condição mais rigorosa de subtração, com uma proporção “tester”: “driver” de 1:800. Na Figura 2.6 estão apresentados os perfis de amplificação apresentados pelas subtrações DP2 Direta e pela DP2 Reversa. Ocorreu novamente uma redução no tamanho médio dos fragmentos amplificados, por amplificação preferencial das seqüências de menor tamanho. Além disso, obteve-se uma massa de cDNA superior na DP2 Reversa comparado à DP2 Direta.

As seqüências foram clonadas utilizando o vetor pBluescript II SK(+) (Stratagene) (gi:58063). Foram executadas clonagens em paralelo com os fragmentos de DNA com extremidades do tipo cega ou coesivas. Na Figura 2.7 (A-D), uma amostra representativa de produtos de PCR de colônia foi fracionada em gel de agarose. Como pode ser observado, os produtos amplificados apresentam entre 600 e 800 pb. Como foram utilizados para as reações de PCR os *primers Forward* e *Reverse* do sítio de clonagem



múltipla do vetor (que delimitam um segmento de 226 pb no vetor vazio) os insertos apresentaram entre 370 e 570 pb.

### 2.3. COMPROVANTE DA SUBMISSÃO DO MANUSCRITO.

----- Forwarded message follows -----

Subject: AW05018  
Date sent: Tue, 15 Feb 2005 22:13:50 +0100  
From: "Waters, A.P. (PARA)" <a.P.Waters@lumc.nl>  
To: <henrique@cbiot.ufrgs.br>

Dear Dr Ferreira,

Thank you for the manuscript, it is now out to review. I will be in touch with you in due course. Many thanks for considering MBP for the publication of your work.

Sincerely

ANdy Waters

Professor A.P. Waters,  
Department of Parasitology,  
Leiden University Medical Centre,  
Albinusdreef 2  
2333ZA Leiden  
The Netherlands

Tel: +31 71 5265069.

Fax: +31 71 5266907.

Net: Waters@lumc.nl

Web: <http://www.lumc.nl/1040/research/malaria/malaria.html>

----- End of forwarded message -----





## CAPÍTULO III

### **Ensaaios de RT-PCR em tempo real**

### **3.1. METODOLOGIA**

#### **3.1.1. Experimentos de cultivo de *M. corti* para extração de RNA total.**

As larvas de *M. corti* utilizadas nos experimentos de cultivo *in vitro* foram removidas da cavidade peritoneal de camundongos fêmea BALB/c ou ratas Wistar, previamente infectadas com 0,2 mL (600 larvas) ou 0,5 mL (1500 larvas) de tetratirídeos, respectivamente. Os animais foram mantidos em condições de temperatura e luminosidade controladas, com comida e água *ad libitum*, por 5 meses, sendo obtido, após as extrações, de 3 a 5 mL de larvas. Para cada experimento de cultivo, foram utilizadas 10 garrafas de 25 cm<sup>2</sup> contendo 5 mL de RPMI suplementado (MARKOSKI *et al.*, 2003) e 0,1 mL de larvas. Os cultivos foram realizados em estufa úmida a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> atmosférico, tendo sido mantidos por 48h na ausência de soro fetal bovino (SFB). Após 24h de adição de SFB 20%, cinco garrafas foram tratadas com  $1 \times 10^5$  BAEE/mL de tripsina por 24 h para indução de segmentação. Após 6 dias de cultivo, com trocas de meio a cada 2 dias, larvas e vermes segmentados foram coletados individualmente a partir das garrafas controles e tratadas, respectivamente. O material biológico foi imediatamente submerso em 20 volumes de RNA Later (Ambion), mantido a 4 °C por 24 horas e armazenado a -20°C.

#### **3.1.2. Extração de RNA total.**

As extrações de RNA total foram realizadas utilizando o “RNeasy Mini Kit (50)” (Qiagen). Como é recomendada a utilização de no máximo 30 mg de material biológico por coluna, foi primeiramente determinado que as larvas apresentam uma densidade média de 0,5 mg/μL. No máximo 60 μL (30 mg) de larvas sedimentadas foram utilizadas em cada

extração. O material imerso em RNA Later foi transferido para tubos eppendorfs cortados contendo um papel filtro e centrifugados para remoção do reagente. O material foi então macerado em nitrogênio líquido e transferido para a solução de lise, seguindo-se a partir daí o protocolo “RNeasy Mini Protocol for Isolation of Total RNA from Animal Tissues”, descrito pelo fabricante.

Foi utilizado o sistema da “RNase-Free DNase Set (50)” (Qiagen) para a remoção de contaminantes de DNA genômico nas amostras de larvas e vermes segmentados de *M. corti*. A qualidade das diferentes preparações de RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,2%, em condições não-desnaturantes. Antes da aplicação, as amostras foram desnaturadas termicamente, na presença de 2,5 mM de EDTA, por 10 min a 65 °C. Diluições seriadas do marcador de tamanho molecular “0.24-9.5 kb RNA ladder” (Invitrogen) foram incluídas nas eletroforeses. A quantificação e determinação da pureza das preparações de RNA total foram feitas por espectrofotometria (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

### **3.1.3. Síntese de cDNA.**

O protocolo utilizado para a síntese da 1ª fita de cDNA incorpora modificações sugeridas na literatura para aumentar a eficiência de experimentos de RT-PCR em tempo real (LEKANNE DEPREZ *et al.*, 2002) ou para aumentar a representatividade dos produtos de síntese de cDNA (WANG *et al.*, 2000). Ao invés de um oligonucleotídeo (oligo) dT, convencionalmente empregado como iniciador de síntese, foi utilizada uma mistura contendo cinco oligos dT16 ancorados (oligo dT16A, oligo dT16G, oligo dT16CA, oligo dT16CC e oligo dT16CG). Foram preparadas reações para um volume final de 25 µL

contendo 50 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM dNTPs, 40 U de RNaseOUT (Invitrogen), 125 pmoles de cada oligo dT16 ancorado, 1 µg de RNA total, água MilliQ e 100 U de Superscript II (Invitrogen). Não foi adicionado ditioneitol (DTT) no tampão de reação, uma vez que foi comprovado que este composto interfere com a emissão de fluorescência do corante SYBR green I (LEKANNÉ DEPREZ *et al.*, 2002). Após desnaturaçãõ térmica dos RNAs (diluídos em água e contendo a mistura de oligos dT16 ancorados) por 10 min a 70°C, seguida de resfriamento a 4°C, o restante dos reagentes foi adicionado. As reações de síntese foram feitas a 42 °C por 60 min, seguido de inativaçãõ térmica da transcriptase reversa a 70 °C por 15 min. As reações foram, então, mantidas a 4 °C, sendo adicionados 25µL de TE (3 mM de Tris-HCl (pH 7,4); 0,2 mM EDTA) por reação.

Para cada amostra de RNA testada, foram feitas reações RT+ e RT-. As reações RT- são idênticas às reações RT+, exceto ausência da enzima SuperScript II.

#### **3.1.4. Projeção e síntese de oligonucleotídeos.**

O programa Primer 3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) foi utilizado para a projeção dos oligonucleotídeos utilizados como iniciadores nas reações de RT-PCR em tempo real. No Quadro 3.1 estão apresentadas as principais características dos oligonucleotídeos sintetizados e dos produtos de amplificação obtidos. Os oligonucleotídeos gene-específicos e os dT16 ancorados foram sintetizados com grau de pureza HPSF (“highly purified salt-free primer”) (MWG Biotech).

#### **3.1.5. Reações de amplificação.**

Testes preliminares de amplificação foram feitos utilizando, para cada reação, 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 1,5 U de Taq DNA Polimerase (Cenbiot Enzimas), 200  $\mu\text{M}$  de dNTPs, 500 nM de

cada oligonucleotídeo e 40 ng de RNA total convertido em cDNA, em um volume final de 15 µL. As amostras foram submetidas a uma desnaturação inicial a 94 °C por 2 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 s, 60°C por 30 s e 72 °C por 1 min. Alíquotas de cada reação foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 8% ou 12 % e coradas pelo método de nitrato de prata (BASSAM *et al.*, 1991). Os fragmentos de  $\phi$ X174/*Hae*III e pUC18/*Hae*III foram utilizados como marcadores de tamanho molecular. As reações de PCR em tempo real foram feitas utilizando a tecnologia SYBR green I em um aparelho ABI Prism 7000 SDS (Sequence Detection System) (Applied Biosystems). Cada reação foi feita em um volume final de 25 µL, contendo 3,75 µM de cada *primer*, 12 µL de “SYBR<sup>®</sup> green PCR Master Mix” (Applied Biosystems) e 8,5 ng de RNA total convertido em cDNA. As reações eram distribuídas em placas de 96 poços e submetidas a uma desnaturação inicial a 95°C por 10 min, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s, anelamento a 60 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 30 s. Uma análise de curva de dissociação foi feita para todas as reações após os 40 ciclos de amplificação.

### 3.2. RESULTADOS

Os perfis eletroforéticos das amostras de RNA total de tetratirídeos e de vermes segmentados, utilizadas nos experimentos de RT-PCR em tempo real, estão apresentados na Figura 3.1. Para cada seqüência estudada, foram feitos testes de amplificação com as reações de síntese de cDNA RT(+) e RT(-) de quatro amostras independentes de RNA total de tetratirídeos e de outras quatro amostras de RNA total de vermes segmentados. Os resultados das curvas de amplificação geradas foram comparados com a análise das curvas de dissociação correspondentes. Essa análise permitiu a identificação dos casos nos quais o acúmulo de um produto de amplificação nas reações RT(-) correspondia, na realidade, à presença de dímeros de oligonucleotídeos. Exemplos ilustrativos estão apresentados na Figura 3.2.

Foram geradas curvas de calibração relativas para os dois genes normalizadores (PDCD4 e PABP), dois genes da biblioteca DP2Forw (SR6 e HINDSIGHT) e três genes da biblioteca DP2Rev (CHD, RME-8 e LBA). Para o gene PDCD4, utilizado na normalização, foram geradas duas curvas de calibração independentes, a partir de um produto de síntese de cDNA de tetratirídeos ou de segmentados. Para o gene RME-8, foram geradas curvas de calibração a partir de dois produtos de amplificação independentes, o primeiro correspondente à porção amino-terminal da proteína (ARME-8) e o segundo sobrepondo parte da porção carbóxi-terminal da mesma (CRME-8). As curvas de calibração obtidas a partir de reações de amplificação em triplicata de cinco pontos de diluição seriada, com os respectivos coeficientes de regressão, estão apresentadas nas Figuras 3.3 e 3.4









Em uma primeira estratégia para a análise quantitativa dos resultados, a média da quantidade de mRNA estimada, com base na curva de calibração, para um dado transcrito, em uma determinada amostra biológica, foi normalizada pela média da quantidade de mRNA estimada para um dos genes normalizadores nas mesmas condições. Para um determinado gene, os valores obtidos em diferentes amostras biológicas foram divididos pelo valor obtido em uma amostra biológica referencial. Estes valores relativos, calibrados, foram então comparados. Os valores de desvio padrão e coeficiente de variação foram calculados em todas as análises. No Quadro 3.2 estão apresentados, de forma ilustrativa, os cálculos e os resultados finais da análise do gene SR6 da biblioteca DP2Forward normalizada com o gene PDCD4. Na Tabela 3.1 estão apresentados os resultados finais da análise dos seis produtos de amplificação.





## CAPÍTULO IV

### 4.1. DISCUSSÃO

### 4.2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

### 4.3. MINI-CURRÍCULO

#### 4.1. DISCUSSÃO

Os mecanismos moleculares responsáveis pela morfogênese do plano corporal estrobilado dos cestódeos ainda são desconhecidos. Além disso, os estudos, envolvendo a biologia dos cestódeos e de outros helmintos, tornam-se ainda mais relevantes devido a grande importância médica e veterinária apresentada por membros desses grupos.

Como primeira aproximação para o estudo da segmentação em cestódeos, o parasito da ordem Cyclophyllidea, *Mesocestoides corti*, está sendo adotado no LBMC como modelo de estudos. Tendo sido estabelecidas as condições para a manutenção e a diferenciação estrobilar em cultivos *in vitro* (MARKOSKI, 2000; BIZARRO, 2001; MARKOSKI *et al.*, 2003; ESPINOZA *et al.*, no prelo), o passo seguinte consistiu na identificação e análise de genes diferencialmente expressos ao longo desse processo de desenvolvimento. Considerando-se o número extremamente limitado de seqüências de *Mesocestoides corti* disponíveis em bancos de dados públicos de nucleotídeos e de proteínas, decidiu-se implementar tecnologias de análise de expressão diferencial que apresentam arquitetura “aberta” (GREEN *et al.*, 2001). Inicialmente, algumas seqüências de possível expressão diferencial foram isoladas por DDRT-PCR (BIZARRO, 2001). Contudo, para a obtenção de um panorama mais amplo do perfil de expressão dos transcritos deste sistema, estratégias envolvendo a construção de bibliotecas de cDNA subtraídas foram consideradas. Primeiramente, foram construídas bibliotecas de cDNA subtraídas pela técnica de SSH (“Suppression Subtractive Hybridization”) (DIATCHENKO *et al.*, 1996). Comprovou-se, contudo, que a eficiência de subtração era baixa. No presente estudo, foram construídas bibliotecas de cDNA enriquecidas com seqüências diferencialmente expressas no estágio larval ou no estágio adulto segmentado de *M. corti* pela técnica de cDNA RDA.

Foi utilizada a tecnologia SMART (Clontech) para a síntese dos cDNAs utilizados nas bibliotecas. Esta tecnologia foi empregada porque potencializa a obtenção de cDNAs completos (“full-length”) (ZHU *et al.*, 2001). Além disso, utilizando o produto de amplificação do cDNA SMART como material de partida, foi possível adaptar a metodologia de cDNA RDA para uma quantidade limitante de RNA total.

#### **4.1.1. Validação das bibliotecas.**

Apesar das tecnologias existentes de clonagem subtrativa já terem sido utilizadas em diferentes sistemas com bastante sucesso, clones falsos positivos são frequentemente encontrados. Em sistemas experimentais nos quais poucos genes são, efetivamente, diferencialmente expressos, a frequência de clones falsos positivos pode ser ainda maior, pois a razão “sinal/ruído” é diminuída. Dessa forma, torna-se essencial a validação do perfil de expressão diferencial dos clones identificados a partir de qualquer estratégia de clonagem subtrativa. Essa validação deve ser feita utilizando abordagens experimentais independentes.

Algumas estratégias de validação buscam determinar, de forma geral, a qualidade de uma biblioteca subtraída, ao passo que outras avaliam seqüências específicas. Uma forma de validar uma biblioteca subtraída consiste em hibridizar uma fração marcada radioativamente do conjunto de fragmentos de DNA, presentes no produto diferencial (DP), com os produtos de síntese de cDNA originais, das duas condições comparadas. Como, teoricamente, o conjunto de fragmentos subtraídos encontra-se enriquecido com seqüências presentes unicamente na condição “tester”, a hibridização deve ocorrer, preferencialmente, com o cDNA correspondente a essa condição. No entanto, é razoável supor que as seqüências não-diferencialmente expressas, encontradas em bibliotecas subtraídas,



correspondem a transcritos com alto nível de expressão, que, portanto, não foram completamente removidos no processo de subtração. Dessa forma, essas seqüências contaminantes, mesmo que presentes em quantidades relativamente baixas nos produtos diferenciais, podem gerar um forte sinal de hibridização nas duas condições testadas. Com isso, essa estratégia de validação pode ser considerada rigorosa, devendo ser utilizada com cautela. Como mostrado na Figura 1 (Capítulo II), o produto diferencial da biblioteca DP2 Direta hibridizou com ambos os produtos de síntese de cDNA, ao passo que o produto diferencial da biblioteca DP2 Reversa hibridizou somente com o cDNA proveniente de tetratirídeos, como esperado. Dessa forma, outros experimentos foram executados para avaliar a qualidade da biblioteca DP2 Direta.

Uma estratégia de validação alternativa também foi empregada. Macroarranjos contendo clones independentes de ambas as bibliotecas foram hibridizados com sondas, marcadas radioativamente, derivadas dos produtos de síntese de cDNA originais (Figuras 2A-D, Capítulo I). Espera-se, nesse experimento, que os clones apresentem sinal de hibridização mais intenso quando hibridizados com a sonda preparada a partir do cDNA utilizado como “tester” na subtração correspondente. De fato, observou-se o padrão esperado com os clones da biblioteca DP2 Reversa: estes clones apresentam um sinal mais intenso quando hibridizados com a sonda gerada a partir do cDNA de tetratirídeos. Os clones da biblioteca DP2 Direta, contudo, apresentaram um padrão de hibridização distinto. Alguns clones, representando não mais do que 10% do conjunto de clones testados, apresentaram um forte sinal de hibridização, distinguindo-se dos demais. Este sinal de hibridização era, aparentemente, ainda mais forte nas hibridizações com a sonda de cDNA de tetratirídeos do que com a sonda de cDNA de vermes segmentados (ver Figuras 2A e 2C, Capítulo I, discriminados com setas pretas). Este padrão de hibridização pode parecer

de difícil interpretação, pois poderia sugerir que a subtração tenha ocorrido no sentido contrário, com seleção de clones preferencialmente expressos em tetratirídeos na biblioteca enriquecida para seqüências diferenciais de vermes segmentados. Contudo, a inspeção visual do perfil eletroforético dos cDNAs utilizados como sondas pode auxiliar na análise desses resultados (ver Figuras 2B e 2D). Distingue-se, claramente, uma banda extremamente abundante em ambos os cDNAs (assinalada com uma seta preta). Na Figura 2.2, também pode ser observada a presença de uma segunda banda majoritária, de menor peso molecular. A banda de maior tamanho é, contudo, ainda mais abundante no produto de síntese de cDNA de vermes segmentados, de tal forma que a aplicação de uma mesma quantidade de cDNA, em massa total, resulta em uma representação desproporcional da grande maioria das espécies de transcritos convertidos em cDNA. Em *Echinococcus granulosus*, outro cestódeo ciclofilídeo, foi detectado que 60% dos clones de uma biblioteca de cDNA convencional de protoescólices correspondem a moléculas de RNA ribossômico mitocondrial da subunidade maior (LSU), que neste organismo sofrem poliadenilação (FERNÁNDEZ *et al.*, 2002). Talvez em *M. corti* também esteja ocorrendo um processo similar. Apesar de algumas tentativas preliminares, esta banda de *M. corti* ainda não foi caracterizada.

Após considerar a distorção causada pela expressão aparentemente diferencial dessa seqüência extremamente abundante, consideramos que os clones que apresentaram forte sinal de hibridização, como acima mencionado, pudessem representar clones não-diferencialmente expressos contaminantes da biblioteca DP2 Direta. A diferença aparente de hibridização detectada para esses clones corresponderia ao desbalanço na representação dos produtos de síntese de cDNA discutido acima. Para testar essa hipótese, foram selecionados 6 clones da biblioteca DP2 Direta, 2 representando esse grupo de clones com

sinal de hibridização forte (Figuras 2A e 2C, setas brancas assinaladas como 1 e 2) e 4 outros clones supostamente de expressão diferencial (Figuras 2A e 2C, setas brancas assinaladas como 3 a 6). Estes clones foram testados em experimentos de northern virtual (Figuras 3A-L). Para estes experimentos, sondas preparadas a partir dos clones individuais foram hibridizadas com as representações geradas por PCR dos produtos de síntese de cDNA SMART clivados com *Sau3AI* e ligados aos adaptadores R. O perfil eletroforético das representações é muito mais homogêneo que o perfil dos produtos de síntese de cDNA SMART (comparar Figuras 2B e 2D com 3A, C, E, G, I e K), uma vez que a banda majoritária é clivada apenas em uma das extremidades com *Sau3AI* (Figura 2.2) e, portanto, não está representada nos amplicons gerados. Os resultados desses experimentos confirmaram as expectativas iniciais, pois os dois clones que, de acordo com a interpretação acima, seriam falsos positivos da biblioteca DP2 Direta apresentaram sinal de hibridização equivalente nas duas condições, ao passo que os demais clones apresentaram sinal de hibridização mais intenso na representação gerada a partir dos transcritos de vermes segmentados (Figuras 3A-L).

Uma das vantagens do cDNA RDA em relação a outras estratégias de subtração consiste na possibilidade de se realizar os experimentos de forma iterativa. Tanto o número de etapas de hibridização subtrativa quanto a relação tester:driver podem ser selecionadas, de acordo com o sistema experimental e com os objetivos específicos. Ainda que seja rotineira a realização de apenas dois ciclos de subtração, estudos contendo até 5 ciclos de subtração podem ser encontrados na literatura (TAXMAN *et al.*, 2000). Além disso, amplas variações na proporção tester:driver podem ser utilizadas, já tendo sido descrito o emprego de proporções de 1:8.000.000 (GREENE *et al.*, 1998). Existe, contudo, um compromisso entre condições mais rigorosas, com a decorrente diminuição de falsos positivos, e

representatividade das bibliotecas. Em nossos experimentos, foram mantidos dois ciclos de subtração e proporções tester:driver de 1:100 e 1:800 na primeira e na segunda subtrações, respectivamente. Buscou-se, dessa forma, obter um panorama mais geral dos transcritos diferenciais das duas fases de *M. corti*. Após a etapa de seqüenciamento dos clones, foi feito um teste de validação *in silico*: as seqüências das duas bibliotecas foram agrupadas conjuntamente. Não foi encontrado nenhum agrupamento contendo seqüências provenientes das duas bibliotecas, o que sugere que, pelo menos, uma das subtrações foi altamente eficiente.

Os testes de validação das bibliotecas discutidos acima sugerem que foram detectadas, efetivamente, diferenças entre os dois produtos de síntese de cDNA. Entretanto, a análise desses dados não permite descartar que ao menos parte dessas diferenças não possa ser resultante de alterações nas proporções relativas das seqüências, introduzidas na etapa de amplificação, pelo método SMART, dos produtos de síntese da 1ª fita de cDNA. Dessa forma, ensaios de validação que corroborem os resultados obtidos, sem incorporar esses produtos de amplificação, seriam úteis na confirmação dos dados. Além disso, a confirmação dos resultados, utilizando amostras biológicas independentes, permitiria descartar seqüências diferencialmente expressas que não estão diretamente associadas ao processo em estudo, mas que consistem em artefatos possivelmente introduzidos por variações na manipulação durante os cultivos ou extração do material.

Tendo em vista estes questionamentos, iniciamos a padronização de um sistema de RT-PCR em tempo real em nosso modelo de estudo. Com a implementação dessa metodologia, será possível obter dados precisos do perfil de expressão gênica de várias seqüências a partir de uma quantidade limitante de RNA total, o que certamente representará um grande avanço em nossos estudos. Apesar de todos esses atrativos, a implementação dessa técnica

não é tarefa fácil. Por envolver uma etapa de amplificação exponencial, alterações relativamente modestas em qualquer parâmetro considerado podem levar a diferenças drásticas nos resultados obtidos. Variações na eficiência de extração dos RNAs, presença de inibidores enzimáticos, estratégia de síntese de cDNA, química de detecção, sequência dos *primers* e tamanho dos amplicons, entre outros fatores, podem comprometer consideravelmente a interpretação dos resultados (para uma revisão, ver BUSTIN, 2002). Considerando-se a diversidade de alternativas metodológicas disponíveis para cada etapa do experimento, uma otimização exaustiva torna-se praticamente inviável. Dessa forma, elaboramos um protocolo experimental que incorpora sugestões recentes baseadas em otimizações realizadas em outros sistemas experimentais (ver Material e Métodos, Capítulo II). Certamente, a etapa de otimização deverá ser continuada no sistema experimental de *M. corti*.

O tratamento analítico dos dados assume importância vital nos experimentos de RT-PCR em tempo real. Variações relativamente baixas, na ordem de 2%, na eficiência de amplificação de um determinado produto a partir de duas amostras de cDNA podem levar a um erro de estimativa de 4 vezes de diferença em relação ao resultado real (RAMAKERS *et al.*, 2003). A própria seleção da metodologia empregada para estimar as eficiências de amplificação pode influenciar os resultados obtidos (PEIRSON *et al.*, 2003). Existem métodos clássicos de estimativa de eficiência baseados em diluições de curvas de calibração (PFAFFL, 2001; RUTLEDGE & CÔTÉ, 2003), no aumento da fluorescência absoluta ao longo da reação (LIU & SAINT, 2002; RAMAKERS *et al.*, 2003) ou em modelos matemáticos que permitem descrever a trajetória de amplificação de cada curva individual (TICHOPAD *et al.*, 2002, 2003). Essas estratégias alternativas que foram e ainda continuam sendo desenvolvidas buscam suprir falhas nos modelos clássicos. Contudo, não

existe um consenso quanto ao método mais eficiente de análise disponível. Em um primeiro momento, utilizamos o método clássico de estimativa de eficiência e cálculo da quantidade de cDNA inicial baseada em curvas de calibração relativas (APPLIED BIOSYSTEMS, 1997). Nesta metodologia, são preparadas diluições seriadas de um cDNA, escolhido como referência. Nos nossos experimentos, foram escolhidos cinco pontos de diluição e, para cada um deles, foram feitas reações de PCR em tempo real em triplicatas. Apenas curvas de calibração com coeficientes de correlação ao quadrado ( $R^2$ ) superiores a 0,99 tem sido utilizadas (por exemplo, RUTLEDGE & CÔTÉ, 2003). Como pode ser observado na Figura 3.4, apenas uma curva de calibração apresentou valor inferior a esse patamar, correspondente ao gene CHD ( $R^2 = 0,9841$ ). Dessa forma, foi construída, para esse gene, uma nova curva de calibração utilizando como molde um produto de cDNA distinto ( $R^2 = 0,9983$ ). Será dada continuidade à análise dos dados utilizando metodologias alternativas para estimar as eficiências de amplificação. A análise comparativa dos resultados poderá ser útil para definir se no nosso sistema experimental a interpretação dos dados obtidos depende, de maneira apreciável, do método de análise e estimativa de eficiência selecionados.

Uma das etapas mais críticas do RT-PCR em tempo real, assim como de outras metodologias envolvendo a análise de expressão diferencial relativa, corresponde à normalização. Uma etapa de normalização dos dados é absolutamente essencial para qualquer análise de expressão gênica comparativa, devido a necessidade de se controlar uma série de variáveis, tais como quantidade do material inicial, eficiências enzimáticas e diferenças entre tecidos ou células em termos de atividade transcricional geral (VANDESOMPELE *et al.*, 2002). Várias estratégias de normalização têm sido aplicadas, incluindo a normalização pelo número de células utilizadas ou pela quantidade de massa de

RNA (BUSTIN, 2002). Estas estratégias de normalização apresentam graves problemas, pois não incorporam as eventuais variações nas eficiências de atividade enzimática das etapas subseqüentes da metodologia, decorrentes de diferenças na qualidade das preparações e presença de inibidores. Essas estratégias são de uso questionável mesmo quando são aplicadas a metodologias que não envolvem etapas de atividade enzimática posteriores, como no Northern blot. Desbalanços no conteúdo de rRNA e mRNA já foram descritos (OLIVEIRA *et al.*, 1999; SOLANAS *et al.*, 2001), podendo levar a erros consideráveis em uma estimativa de expressão gênica diferencial.

A estratégia mais aceita e mais freqüentemente utilizada de normalização consiste na utilização de genes que atuam como controles internos, referidos muitas vezes como genes “housekeeping” ou de referência. Um gene de referência ideal não pode ter sua expressão regulada ou influenciada pelas condições experimentais consideradas. Por “acompanhar” o gene em estudo em todas as etapas da metodologia de quantificação, variações na pureza e qualidade das preparações, distorções nas proporções de rRNA e mRNA, e diferenças nas eficiências das etapas enzimáticas seriam normalizadas. Vários genes têm sido utilizados como referências, incluindo gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (KOMATSU *et al.*, 2004; THOMAS *et al.*, 2005),  $\beta$ -actina (LEDEE-BATAILLE *et al.*, 2005), rRNAs 18S (GRANFAR *et al.*, 2005), hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase (HPRT) (PEINNEQUIN *et al.*, 2004), glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) (NEUMANN *et al.*, 2003), proteína de ligação ao TATA box (TBP) (SPECHT *et al.*, 2004), entre outros. Contudo, muitos estudos têm demonstrado que os genes classicamente utilizados como referências podem ser altamente regulados em diferentes circunstâncias e sistemas experimentais, destacando-se GAPDH (GLARE *et al.*, 2002; ZHONG & SIMONS, 1999).

Aparentemente, tornou-se infrutífera a busca por normalizadores absolutos, que não apresentam nenhum tipo de flutuação no nível de expressão sob diferentes contextos e sistemas biológicos. Cada vez mais está se tornando clara a necessidade de validação de normalizadores para cada modelo experimental estudado.

Além disso, a prática da utilização de apenas um gene de referência encontra-se ainda difundida. Até 1999, mais de 90% dos estudos publicados em periódicos de alto impacto utilizavam somente um gene de referência (SUZUKI *et al.*, 2000) e essa prática ainda continua sendo utilizada. VANDESOMPELE *et al.* (2002) apresentou evidências de que uma estratégia de normalização convencional, baseada em um único gene de referência, leva a erros de normalização de 3 a 6,4 vezes em 25% e 10% dos casos, respectivamente, com casos esporádicos de erros acima de 20 vezes.

A necessidade de validar o padrão de expressão estável de um gene de referência, no modelo de estudo específico, encerra um problema circular: a validação da expressão estável desse gene iria requerer um segundo gene de referência já validado, e assim por diante. Para solucionar este problema, foram desenvolvidos métodos para determinar a estabilidade de expressão de genes de referência com base em níveis de expressão não-normalizados (VANDESOMPELE *et al.*, 2002; PFAFFL *et al.*, 2004). A partir de um conjunto de genes candidatos a referência, é possível, com o uso do software geNorm, identificar quais são os normalizadores mais adequados, com maior estabilidade de expressão, e o número mínimo de genes requerido, no modelo biológico em estudo, para o cálculo de um fator de normalização confiável (VANDESOMPELE *et al.*, 2002). Posteriormente, o software *BestKeeper* foi desenvolvido, possibilitando a análise conjunta de genes candidatos a referência e genes-alvo na construção de um índice de normalização (PFAFFL *et al.*, 2004).



A estratégia de normalização adotada nos experimentos com *M. corti* levou em consideração os aspectos acima mencionados. Genes normalizadores clássicos, como rRNA 18S e 28S, GAPDH e  $\beta$ -actina não foram utilizados, pois não temos nenhuma evidência, até o momento, de que apresentam estabilidade de expressão no nosso sistema experimental. Dessa forma, foram utilizados como normalizadores os genes PDCD4 e PABP, que apresentaram, nos experimentos de Northern virtual, uma intensidade de hibridização com o amplicon de tetratirídeos equivalente a obtida com o amplicon de vermes segmentados (Figuras 3A-D). Um teste adicional foi feito com o gene normalizador PDCD4. Foram construídas duas curvas de calibração, a primeira utilizando uma amostra de cDNA de tetratirídeos e a segunda uma amostra de cDNA de segmentados. O objetivo do teste foi avaliar experimentalmente o efeito da seleção do molde de cDNA utilizado para a construção da curva de calibração nos resultados finais de quantificação. Os resultados foram altamente concordantes, sugerindo que essa variável (seleção do molde de cDNA) não está interferindo nos resultados obtidos (Tabela 3.1). Contudo, para algumas amostras biológicas, foram obtidos resultados de quantificação discordantes dependendo do normalizador utilizado (ver Tabela 3.1). Dessa forma, uma próxima etapa importante desse trabalho consistirá na busca de um conjunto de seqüências de expressão estável no nosso sistema de estudo, que poderá ser utilizado para a geração de um índice de normalização robusto.

A análise proteômica comparativa no modelo de segmentação em *M. corti* já está em andamento no LBMC. Os resultados obtidos dessa análise serão também importantes na confirmação dos resultados obtidos por clonagem subtrativa. A análise comparativa desses dois conjuntos independentes de dados poderá ser útil para o entendimento da importância

de processos como mobilização polissomal e mecanismos de regulação pós-traducionais na definição do complemento de proteínas em tetratirídeos e em vermes segmentados.

#### **4.1.2. Bibliotecas DP2 Direta e DP2Reversa: comparações e perspectivas**

Com o seqüenciamento de clones das bibliotecas DP2 Direta e DP2 Reversa, foram isoladas seqüências que apresentam ortólogos em diferentes categorias funcionais. Foi dada ênfase na análise de seqüências potencialmente envolvidas em mecanismos de regulação da expressão gênica, tais como fatores de transcrição e moduladores da estrutura da cromatina. Entretanto, também foram isoladas seqüências cujos ortólogos estão associados a diferentes vias metabólicas, ou são componentes do citoesqueleto ou, ainda, transportadores. Além disso, proteínas associadas com o processo de tradução, com transporte de vesículas, com o processamento e ligação a RNA também foram identificadas (Tabelas S1 e S2). Certamente, estas seqüências podem estar implicadas em diferentes eventos de diferenciação celular que ocorrem durante a transição do estágio de tetratirídeos para o estágio de verme segmentado.

Mesmo sendo destacada a necessidade, como discutido no item 4.1.1, de se aprimorar os ensaios de validação da expressão gênica diferencial neste sistema, temos, pela primeira vez, um painel de seqüências para iniciarmos estudos pormenorizados envolvendo o processo de segmentação em cestódeos. Dessa forma, a proposta atual do LBMC, para esta linha de pesquisa, consiste em manter duas frentes de estudo: dar continuidade a estratégias de análise em grande escala, mas também focalizar os estudos em seqüências selecionadas.

Além da análise proteômica comparativa, em andamento, o seqüenciamento dos amplicons não-subtraídos de ambas as fases poderá revelar informações importantes sobre estes transcriptomas, servindo também como uma outra forma de validação das clonagens

subtrativas. Estamos, em paralelo, participando de um projeto de seqüenciamento de 12.000 ESTs de *Echinococcus granulosus*, derivadas de bibliotecas de parede cística e de protoescólices (<http://www.nematodes.org/Lopho/LophDB.php>) (manuscrito em preparação). Para algumas das seqüências de *M. corti* obtidas no presente estudo, foram encontrados ortólogos altamente similares nas ESTs de *E. granulosus* (ver Tabelas S1 e S2). O estudo comparativo dessas seqüências nos dois sistemas experimentais pode trazer informações relevantes sobre a biologia dos cestódeos.

A confecção de microarranjos de cDNA para *M. corti* é outro passo importante, pois permitiria o acompanhamento do padrão de expressão de um conjunto de seqüências em paralelo, ao longo do processo de segmentação, e não apenas nas duas situações extremas, tetratirídeos e vermes segmentados. É possível que muitos dos reguladores responsáveis por disparar as cascatas de diferenciação e morfogênese só sejam expressos ao longo de etapas específicas do processo de diferenciação, não sendo detectados nas situações extremas. Contudo, devem existir sistemas que mantenham ativamente o estado diferenciado. Ao contrário de outros organismos-modelo de desenvolvimento bem estudados, como *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans*, vertebrados e ouriços-do-mar, *M. corti* parece manter a capacidade de reverter ao estágio larval sob condições específicas. Foram encontrados tetratirídeos na cavidade peritoneal de camundongos 24h após a injeção experimental de vermes segmentados obtidos de cultivos *in vitro* (VOLKWEISS *et al.*, 2002). Seqüências diferencialmente expressas, isoladas das bibliotecas de cDNA RDA, com padrão de expressão diferencial confirmado, poderão ser utilizadas como marcadores estágio-específicos no estudo desse processo de reversão de diferenciação.

As seqüências discutidas no Capítulo II (manuscrito), envolvidas em processos como remodelamento da estrutura da cromatina, repressão de genes homeóticos e participação em

eventos morfogênicos em outros sistemas, deverão ser os primeiros alvos em estudos dirigidos. O isolamento das seqüências de cDNA completas correspondentes foi iniciado baseando-se nos “transcritos virtuais”: foram projetados *primers* a partir dos fragmentos de cDNA obtidos nos extremos 5’ e 3’ das seqüências “virtuais”, de forma a compreender toda a região interna a esses fragmentos. Contudo, mesmo com o uso dessa estratégia, a construção de bibliotecas de cDNA completo de *M. corti* será imprescindível para a caracterização dos transcritos completos.

A pouca disponibilidade de ferramentas para a análise funcional dessas seqüências continua sendo uma limitação importante para o prosseguimento dos estudos em *M. corti*. Para suprir esta carência, estão sendo desenvolvidos pelo LBMC estudos para o isolamento, manutenção e estabelecimento de uma linhagem de células de *M. corti* (M. M. Markoski *et al.*, manuscrito em preparação). Espera-se que essas células venham a se constituir em uma importante ferramenta para estudos bioquímicos e celulares das seqüências identificadas no presente trabalho.

A tecnologia de interferência de RNA já foi empregada com sucesso em outros helmintos parasitas (ABOUBAKER & BLAXTER, 2004) e em platelmintos de vida-livre (NEWMARK *et al.*, 2003). O estabelecimento dessa tecnologia constitui uma outra perspectiva importante para estudos funcionais no nosso sistema experimental.

#### 4.1. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOUBAKER, A. A. & BLAXTER, M. L. Functional genomics for parasitic nematodes and platyhelminths. *Trends In Parasitology*, 20(4):178-184, 2004.
- ABRAHAMSEN, H. N.; SORENSEN, B. S.; NEXO, E.; HAMILTON-DUTOIT, S. J.; LARSEN, J. & STEINICHE, T. Pathologic assessment of melanoma sentinel nodes: a role for molecular analysis using quantitative real-time reverse transcription-PCR for MART-1 and tyrosinase messenger RNA. *Clinical Cancer Research*, 11(4):1425-1433, 2005.
- ADOUTTE, A.; BALAVOINE, G.; LARTILLOT, N.; LESPINET, O.; PRUD'HOMME, B. & DE ROSA, R. The new animal phylogeny: reliability and implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A*, 97(9):4453-4456, 2000.
- AGUINALDO, A. M.; TURBEVILLE, J. M.; LINFORD, L. S.; RIVERA, M. C.; GAREY, J. R.; RAFF, R. A. & LAKE, J. A. Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature*, 387(6632):489-493, 1997.
- AL-TAHER, A.; BASHEIN, A.; NOLAN, T.; HOLLINGSWORTH, M. & BRADY, G. Global cDNA amplification combined with real-time RT-PCR: accurate quantification of multiple human potassium channel genes at the single cell level. *Yeast*, 17(3):201-210, 2000.
- ALWINE, J. C.; KEMP, D. J. & STARK, G. R. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A*, 74(12):5350-5354, 1977.
- APPLIED BIOSYSTEMS, User Bulletin #2. ABI Prism 7700 Sequence Detection System. December 11, 1997 (updated 10/2001).
- AULEHLA, A.; WEHRLE, C.; BRAND-SABERI, B.; KEMLER, R.; GOSSLER, A.; KANZLER, B. & HERRMANN, B. G. Wnt3a plays a major role in the segmentation clock controlling somitogenesis. *Developmental Cell*, 4(3):395-406, 2003.
- BALAVOINE, G. Are Platyhelminthes coelomates without a coelom? An argument based on the evolution of *Hox* genes. *American Zoologist*, 38:843-858, 1998.
- BALAVOINE, G. & ADOUTTE, A. The segmented Urbilateria: a testable scenario. *Integrative and Comparative Biology*, 43:137-147, 2003.

- BARRETT, N. J.; SMYTH, J. D. & ONG, S. J. Spontaneous sexual differentiation of *Mesocostoides corti* tetrathyridia *in vitro*. *International Journal for Parasitology*, 12(4):315-322, 1982.
- BASSAM, B. J.; CAETANO-ANOLLES, G. & GRESSHOFF, P. M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 196(1):80-83, 1991.
- BIZARRO, C. V. Cultivo *in vitro* e isolamento de genes de expressão diferencial de *Mesocostoides corti* (Platyhelminthes:Cestoda). Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.
- BOONMEE, S.; IMTAWIL, K.; WONGKHAM, C. & WONGKHAM, S. Comparative proteomic analysis of juvenile and adult liver fluke, *Opisthorchis viverrini*. *Acta Tropica*, 88(3):233-238, 2003.
- BUDD, G. E. Why are arthropods segmented? *Evolution & Development*, 3(5):332-342, 2001.
- BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25(2):169-193, 2000.
- BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*, 29(1):23-39, 2002.
- CHA, R. S. & THILLY, W. G. Specificity, efficiency, and fidelity of PCR. *PCR Methods and Applications*, 3(3):S18-29, 1993.
- CHEMALE, G.; VAN ROSSUM, A. J.; JEFFERIES, J. R., BARRETT, J.; BROPHY, P. M.; FERREIRA, H. B. & ZAHA, A. Proteomic analysis of the larval stage of the parasite *Echinococcus granulosus*: causative agent of cystic hydatid disease. *Proteomics*, 3(8):1633-1636, 2003.
- CHITSULO, L.; ENGELS, D.; MONTRESOR, A. & SAVIOLI, L. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Tropica*, 77(1):41-51, 2000.
- CLARK, R. B. The evolution of the coelom and metamerism. In: *The Lower Metazoa*, E. C. Dougherty, ed. (Berkeley, CA: University of California Press), pp. 91-107 apud TAUTZ, D. Segmentation. *Developmental Cell*, 7(3):301-312, 2004.
- COATES, M. I. & COHN, M. J. Fins, limbs and tails: outgrowths and axial patterning in vertebrate evolution. *BioEssays*, 20:371-381, 1998.
- COLLEY, D. G.; LOVERDE, P. T. & SAVIOLI, L. Infectious disease. Medical helminthology in the 21st century. *Science*, 293(5534):1437-1438, 2001.

- CROMPTON, D. W. How much human helminthiasis is there in the world? *Journal of Parasitology*, 85(3):397-403, 1999.
- CURWEN, R. S.; ASHTON, P. D.; JOHNSTON, D. A. & WILSON, R. A. The *Schistosoma mansoni* soluble proteome: a comparison across four life-cycle stages. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 138(1):57-66, 2004.
- CUVIER, G. *Le Règne Animal Distribué Selon son Organisation*. Deterville, Paris, 1817 apud ADOUTTE, A.; BALAVOINE, G.; LARTILLOT, N.; LESPINET, O.; PRUD'HOMME, B. & DE ROSA, R. The new animal phylogeny: reliability and implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A*, 97(9):4453-4456, 2000.
- DE ROBERTIS, E. M. & SASAI, Y. A common plan for dorsoventral patterning in Bilateria. *Nature*, 380(6569):37-40, 1996.
- DIATCHENKO, L.; LAU, Y. F.; CAMPBELL, A. P.; CHENCHIK, A.; MOQADAM, F.; HUANG, B.; LUKYANOV, S.; LUKYANOV, K.; GURSKAYA, N.; SVERDLOV, E. D. & SIEBERT, P. D. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A*, 93(12):6025-6030, 1996.
- ELEAUME, H. & JABBOURI, S. Comparison of two standardisation methods in real-time quantitative RT-PCR to follow *Staphylococcus aureus* genes expression during *in vitro* growth. *Journal of Microbiological Methods*, 59(3):363-370, 2004.
- ERWIN, D. H. & DAVIDSON, E. H. The last common bilaterian ancestor. *Development*, 129(13):3021-3032, 2002.
- ESPINOZA, I.; GALINDO, M.; BIZARRO, C. V.; FERREIRA, H. B.; ZAHA, A. & GALANTI, N. Early post-larval development of the endoparasitic platyhelminth *Mesocestoides corti*: Trypsin provokes reversible tegumental damage leading to serum-induced cell proliferation and growth. *Journal of Cellular Physiology* (no prelo).
- ETGES, F. J. The proliferative tetrathyridium of *Mesocestoides vogae* sp. n. (Cestoda). *Journal of Helminthological Society of Washington*, 58(2):181-185, 1991.
- FERNÁNDEZ, C.; GREGORY, W. F.; LOKE, P. & MAIZELS, R. M. Full-length-enriched cDNA libraries from *Echinococcus granulosus* contain separate populations of oligo-capped and trans-spliced transcripts and a high level of predicted signal peptide sequences. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 122(2):171-180, 2002.
- FITZPATRICK, J. M.; JOHANSEN, M. V.; JOHNSTON, D. A.; DUNNE, D. W. & HOFFMANN, K. F. Gender-associated gene expression in two related strains of *Schistosoma japonicum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 136(2):191-209, 2004.

- FRAZER, J. K.; PASCUAL, V. & CAPRA, J. D. RDA of lymphocyte subsets. *Journal of Immunological Methods*, 207(1):1-12, 1997.
- GLARE, E. M.; DIVJAK, M.; BAILEY, M. J. & WALTERS, E. H. beta-Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels. *Thorax*, 57(9):765-770, 2002.
- GRANFAR, R. M.; DAY, C. J.; KIM, M. S. & MORRISON, N. A. Optimised real-time quantitative PCR assays for RANKL regulated genes. *Molecular and Cellular Probes*, 19(2):119-126, 2005.
- GREEN, C. D.; SIMONS, J. F.; TAILLON, B. E. & LEWIN, D. A. Open systems: panoramic views of gene expression. *Journal of Immunological Methods*, 250(1-2):67-79, 2001.
- GREENE, W. K.; BAHN, S.; MASSON, N. & RABBITS, T. H. The T-cell oncogenic protein HOX11 activates Aldh1 expression in NIH 3T3 cells but represses its expression in mouse spleen development. *Molecular and Cellular Biology*, 18(12):7030-7037, 1998.
- HADJU, V.; STEPHENSON, L. S.; ABADI, K.; MOHAMMED, H. O.; BOWMAN, D. D. & PARKER, R. S. Improvements in appetite and growth in helminth-infected schoolboys three and seven weeks after a single dose of pyrantel pamoate. *Parasitology*, 113(5):497-504, 1996.
- HIGUCHI, R.; DOLLINGER, G.; WALSH, P. S. & GRIFFITH, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/technology*, 10(4):413-417, 1992.
- HOEPLI, R. J. C. *Mesocestoides corti*, a new species of cestode from the mouse. *The Journal of Parasitology*, 12(1):91-97, 1925.
- HOFFMANN, K. F.; JOHNSTON, D. A. & DUNNE, D. W. Identification of *Schistosoma mansoni* gender-associated gene transcripts by cDNA microarray profiling. *Genome Biology*, 3(8):RESEARCH0041, Epub 2002 Jul 25.
- HOLLAND, L. Z. Body-plan evolution in the Bilateria: early antero-posterior patterning and the deuterostome-protostome dichotomy. *Current opinion in genetics & development*, 10(4):434-442, 2000.
- HOLLAND, L. Z. Heads or tails? Amphioxus and the evolution of anterior-posterior patterning in deuterostomes. *Developmental Biology*, 241(2):209-228, 2002.
- HORTON, J. Human gastrointestinal helminth infections: are they now neglected diseases? *Trends In Parasitology*, 19(11):527-531, 2003.



- HUBANK, M. & SCHATZ, D. G. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Research*, 22(25):5640-5648, 1994.
- HYMAN, L. H. The invertebrates: Protozoa through Ctenophora, pp 22-39, McGraw-Hill, New York, 1940 apud BALAVOINE, G. Are Platyhelminthes coelomates without a coelom? An argument based on the evolution of *Hox* genes. *American Zoologist*, 38:843-858, 1998.
- IWAKI, D. D. & LENGYEL, J. A. A Delta-Notch signaling border regulated by Engrailed/Invected repression specifies boundary cells in the *Drosophila* hindgut. *Mechanisms of Development*, 114(1-2):71-84, 2002.
- JEFFERIES, J. R.; CAMPBELL, A. M.; VAN ROSSUM, A. J.; BARRETT, J. & BROPHY, P. M. Proteomic analysis of *Fasciola hepatica* excretory-secretory products. *Proteomics*, 1(9):1128-1132, 2001.
- JIANG, H.; KANG, D. C.; ALEXANDRE, D. & FISHER, P. B. RaSH, a rapid subtraction hybridization approach for identifying and cloning differentially expressed genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A*, 97(23):12684-12689, 2000.
- JURECIC, R. & BELMONT, J. W. Long-distance DD-PCR and cDNA microarrays. *Current Opinion in Microbiology*, 3(3):316-321, 2000.
- KADNER, D. & STOLLEWERK, A. Neurogenesis in the chilopod *Lithobius forficatus* suggests more similarities to chelicerates than to insects. *Development Genes and Evolution*, 214(8):367-379, 2004.
- KAINZ, P. The PCR plateau phase - towards an understanding of its limitations. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1494(1-2):23-27, 2000.
- KIMMEL, C. B. Was Urbilateria segmented? *Trends In Genetics: TIG*, 12(9):329-331, 1996.
- KOMATSU, K.; NAKANISHI, Y.; NEMOTO, N.; HORI, T.; SAWADA, T. & KOBAYASHI, M. Expression and quantitative analysis of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human gliomas. *Brain Tumor Pathology*, 21(3):105-112, 2004.
- KRIEGER, M. A. & GOLDENBERG, S. Representation of differential expression: a new approach to study differential gene expression in Trypanodomatids. *Parasitology Today*, 14 (4): 163-166, 1998.
- LEDEE-BATAILLE, N.; BONNET-CHEA, K.; HOSNY, G.; DUBANCHET, S.; FRYDMAN, R. & CHAOUAT, G. Role of the endometrial tripod interleukin-18, -15, and -12 in inadequate uterine receptivity in patients with a history of repeated *in vitro* fertilization-embryo transfer failure. *Fertility and Sterility*, 83(3):598-605, 2005.

- LEKANNE DEPREZ, R. H.; FIJNVANDRAAT, A. C.; RUIJTER, J. M. & MOORMAN, A. F. Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. *Analytical Biochemistry*, 307(1):63-69, 2002.
- LIANG, P. & PARDEE, A. B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 257(5072):967-971, 1992.
- LISITSYN, N.; LISITSYN, N. & WIGLER, M. Cloning the differences between two complex genomes. *Science*, 259(5097):946-951, 1993.
- LITTLEWOOD, D. T. J.; CRIBB, T. H.; OLSON, P. D. & BRAY, R. A. Platyhelminth phylogenetics - a key to understanding parasitism? *Belgian Journal of Zoology*, 131 (Supplement 1 ): 35-46, 2001.
- LIU, W. & SAINT, D. A. Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294(2):347-353, 2002.
- LOWE, C. J. & WRAY, G. A. Radical alterations in the roles of homeobox genes during echinoderm evolution. *Nature*, 389(6652):718-721, 1997.
- MANIATIS, T.; HARDISON, R. C.; LACY, E.; LAUER, J.; O'CONNELL, C.; QUON, D.; SIM, G. K. & EFSTRATIADIS, A. The isolation of structural genes from libraries of eucaryotic DNA. *Cell*, 15(2):687-701, 1978.
- MARKOSKI, M. M. Estudo do desenvolvimento *in vitro* de *Mesocestoides corti*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.
- MARKOSKI, M. M.; BIZARRO, C. V.; FARIAS, S.; ESPINOZA, I.; GALANTI, N.; ZAHA, A. & FERREIRA, H. B. *In vitro* segmentation induction of *Mesocestoides corti* (Cestoda) tetrathyridia. *Journal for Parasitology*, 89(1):27-34, 2003.
- MARKUS, M. B. Worms and tuberculosis vaccines. *Trends In Microbiology*, 9(10):474, 2001.
- MARKUS, M. B. Helminthiasis: new medical significance. *Trends In Parasitology*, 18(5):205, 2002.
- MARKUS, M. B. & FINCHAM, J. E. Helminthic infection and HIV vaccine trials. *Science*, 291(5501):46-47, 2001.
- MEHLHORN, H.; BECKER, B.; ANDREWS, P. & THOMAS, H. On the nature of the proglottids of cestodes: a light and electron microscopic study on *Taenia*, *Hymenolepis*,

- and *Echinococcus*. *Zeitschrift fur Parasitenkunde (Berlin, Germany)*, 65(3):243-259, 1981.
- MINELLI, A. & FUSCO, G. Evo-devo perspectives on segmentation: model organisms, and beyond. *TRENDS In Ecology and Evolution*, 19(8): 423-429, 2004.
- MULLER, P. Y.; JANOVJAK, H.; MISEREZ, A. R. & DOBBIE, Z. Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *Biotechniques*, 32(6):1372-4, 1376, 1378-1379, 2002.
- NACHER, M. Malaria vaccine trials in a wormy world. *Trends In Parasitology*, 17(12):563-565, 2001.
- NAGY, L. M. & CARROLL, S. Conservation of wingless patterning functions in the short-germ embryos of *Tribolium castaneum*. *Nature*, 367(6462):460-463, 1994.
- NEUMANN, F.; HEROLD, C.; HILDEBRANDT, B.; KOBBE, G.; AIVADO, M.; RONG, A.; FREE, M.; ROSSIG, R.; FENK, R.; SCHNEIDER, P.; GATTERMANN, N.; ROYER-POKORA, B.; HAAS, R. & KRONENWETT, R. Quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction for diagnosis of BCR-ABL positive leukemias and molecular monitoring following allogeneic stem cell transplantation. *European journal of haematology*, 70(1):1-10, 2003.
- NEWMARK, P. A.; REDDIEN, P. W.; CEBRIA, F. & SANCHEZ ALVARADO, A. Ingestion of bacterially expressed double-stranded RNA inhibits gene expression in planarians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A*, 100 Suppl 1:11861-11865, 2003.
- O'HARA, E. F.; WILLIAMS, M. B.; ROTT, L.; ABOLA, P.; HANSEN, N.; JONES, T.; GURJAL, M. R.; FEDERSPIEL, N. & BUTCHER, E. C. Modified representational difference analysis: isolation of differentially expressed mRNAs from rare cell populations. *Analytical Biochemistry*, 336(2):221-230, 2005.
- OLIVEIRA, J. G.; PRADOS, R. Z.; GUEDES, A. C.; FERREIRA, P. C. & KROON, E. G. The housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is inappropriate as internal control in comparative studies between skin tissue and cultured skin fibroblasts using Northern blot analysis. *Archives of dermatological research*, 291(12):659-661, 1999.
- OLSEN, A.; MUBILA, L. & WILLINGHAM, A. L. 3RD. Human helminth infections - future research foci. *Trends In Parasitology*, 17(7):303-305, 2001.
- OLSON, P. D.; LITTLEWOOD, D. T.; BRAY, R. A. & MARIAUX, J. Interrelationships and evolution of the tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 19(3):443-467, 2001.

- OTT, S. J.; MUSFELDT, M.; ULLMANN, U.; HAMPE, J. & SCHREIBER, S. Quantification of intestinal bacterial populations by real-time PCR with a universal primer set and minor groove binder probes: a global approach to the enteric flora. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(6):2566-2572, 2004.
- PEEL, A. & AKAM, M. Evolution of segmentation: rolling back the clock. *Current Biology*, 13(18):R708-10, 2003.
- PEINNEQUIN, A.; MOURET, C.; BIROT, O.; ALONSO, A.; MATHIEU, J.; CLARENCON, D.; AGAY, D.; CHANCERELLE, Y. & MULTON, E. Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. *BMC Immunology*, 5(1):3, 2004.
- PEIRSON, S. N.; BUTLER, J. N. & FOSTER, R. G. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Research*, 31(14):e73, 2003.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9):e45, 2001.
- PFAFFL, M. W. Quantification strategies in real-time PCR. In: A-Z of quantitative PCR (Editor: S A Bustin) International University Line (IUL), La Jolla, CA, USA, 2004.
- PFAFFL, M. W. & HAGELEIT, M. Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotechnology Letters*, 23: 275-282, 2001.
- PFAFFL, M. W.; MEYER, H. H. & SAUERWEIN, H. Quantification of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) mRNA: development and validation of an internally standardised competitive reverse transcription-polymerase chain reaction. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes*, 106(6):506-513, 1998.
- PFAFFL, M. W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C. & NEUVIANS, T. P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, 26(6):509-515, 2004.
- PONCHEL, F.; TOOMES, C.; BRANSFIELD, K.; LEONG, F. T.; DOUGLAS, S. H.; FIELD, S. L.; BELL, S. M.; COMBARET, V.; PUISIEUX, A.; MIGHELL, A. J.; ROBINSON, P. A.; INGLEHEARN, C. F.; ISAACS, J. D. & MARKHAM, A. F. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnology*, 3(1):18, 2003
- POURQUIÉ, O. Vertebrate somitogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17:311-350, 2001.

- RADONIĆ, A.; THULKE, S.; MACKAY, I. M.; LANDT, O.; SIEGERT, W. & NITSCHKE, A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313(4):856-862, 2004.
- RAJEEVAN, M. S.; RANAMUKHAARACHCHI, D. G.; VERNON, S. D. & UNGER, E. R. Use of real-time quantitative PCR to validate the results of cDNA array and differential display PCR technologies. *Methods*, 25(4):443-451, 2001.
- RAMAKERS, C.; RUIJTER, J. M.; DEPREZ, R. H. & MOORMAN, A. F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters*, 39(1):62-66, 2003.
- RESUEHR, D. & SPIESS, A. N. A real-time polymerase chain reaction-based evaluation of cDNA synthesis priming methods. *Analytical Biochemistry*, 322(2):287-291, 2003.
- RUTLEDGE, R. G. & CÔTÉ, C. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Research*, 31(16):e93, 2003.
- SAMBROOK, J. & RUSSELL, D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York, NY USA., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3rd ed., 2001.
- SCHMITTGEN, T. D.; ZAKRAJSEK, B. A.; MILLS, A. G.; GORN, V.; SINGER, M. J. & REED, M. W. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Analytical Biochemistry*, 285(2):194-204, 2000.
- SCHOLTZ, G. The Articulata hypothesis - or what is a segment? *Organisms, Diversity and Evolution*, 2:197-215, 2002.
- SCHUTTEN, M.; VAN DEN HOOGEN, B.; VAN DER ENDE, M. E.; GRUTERS, R. A.; OSTERHAUS, A. D. & NIESTERS, H. G. Development of a real-time quantitative RT-PCR for the detection of HIV-2 RNA in plasma. *Journal of Virological Methods*, 88(1):81-87, 2000.
- SEAVER, E. C. Segmentation: mono- or polyphyletic? *International Journal for Developmental Biology*, 47(7-8):583-595, 2003.
- SHAPSHAK, P.; DUNCAN, R.; MCCOY, C. B. & PAGE, J. B. Quantification of HIV GAG RNA using real time reverse transcriptase PCR. *Frontiers in Bioscience*, 10:135-142, 2005.
- SIMEON, D. T.; GRANTHAM-MCGREGOR, S. M.; CALLENDER, J. E. & WONG, M. S. Treatment of *Trichuris trichiura* infections improves growth, spelling scores and school attendance in some children. *The Journal of Nutrition*, 125(7):1875-1883, 1995.
- SOLANAS, M.; MORAL, R. & ESCRICH, E. Unsuitability of using ribosomal RNA as loading control for Northern blot analyses related to the imbalance between messenger

- and ribosomal RNA content in rat mammary tumors. *Analytical Biochemistry*, 288(1):99-102, 2001.
- SOLDATOVA, A. P. A contribution to the study of the development cycle in the cestode *Mesocestoides lineatus* (Goeze, 1782), parasitic of carnivorous mammals. *Comptes Rendus (Doklady) de l'Académie des Sciences de l'URSS*, 45(7):310-312, 1944.
- SPECHT, D. & VOGEL, M. Asexual multiplication of *Mesocestoides* tetrathyridia in laboratory animals. *Journal of Parasitology*, 51(2):268-272, 1965.
- SPECHT, K.; HARALAMBIEVA, E.; BINK, K.; KREMER, M.; MANDL-WEBER, S.; KOCH, I.; TOMER, R.; HOFER, H.; SCHUURING, E.; KLUIN, P. M.; FEND, F & QUINTANILLA-MARTINEZ, L. Different mechanisms of cyclin D1 overexpression in multiple myeloma revealed by fluorescence in situ hybridization and quantitative analysis of mRNA levels. *Blood*, 104(4):1120-1126, 2004.
- STÅHLBERG, A.; AMAN, P.; RIDELL, B.; MOSTAD, P. & KUBISTA, M. Quantitative real-time PCR method for detection of B-lymphocyte monoclonality by comparison of kappa and lambda immunoglobulin light chain expression. *Clinical Chemistry*, 49(1):51-59, 2003.
- STEPHENSON, L. S.; LATHAM, M. C.; ADAMS, E. J.; KINOTI, S. N. & PERTET, A. Weight gain of Kenyan school children infected with hookworm, *Trichuris trichiura* and *Ascaris lumbricoides* is improved following once- or twice-yearly treatment with albendazole. *The Journal of Nutrition*, 123(4):656-665, 1993.
- STOLLEWERK, A.; SCHOPPEMEIER, M. & DAMEN, W. G. Involvement of Notch and Delta genes in spider segmentation. *Nature*, 423(6942):863-865, 2003.
- SUZUKI, T.; HIGGINS, P. J. & CRAWFORD, D. R. Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques*, 29(2):332-337, 2000.
- SZABO, A.; PEROU, C. M.; KARACA, M.; PERREARD, L.; QUACKENBUSH, J. F. & BERNARD, P. S. Statistical modeling for selecting housekeeper genes. *Genome Biology*, 5(8):R59, Epub, 2004.
- TAUTZ, D. Segmentation. *Developmental Cell*, 7(3):301-312, 2004.
- TAXMAN, D. J.; CRESSMAN, D. E. & TING, J. P. Identification of class II transcriptional activator-induced genes by representational difference analysis: discoordinate regulation of the DN alpha/DO beta heterodimer. *Journal of Immunology*, 165(3):1410-1416, 2000.
- THOMAS, D. G.; GIORDANO, T. J.; SANDERS, D.; BIERMANN, S.; SONDAK, V. K.; TRENT, J. C.; YU, D.; POLLOCK, R. E. & BAKER, L. Expression of receptor tyrosine kinases epidermal growth factor receptor and HER-2/neu in synovial sarcoma. *Cancer*, 103(4):830-838, 2005.

- THOMPSON, R. C.; JUE SUE, L. P. & BUCKLEY, S. J. *In vitro* development of the strobilar stage of *Mesocestoides corti*. *International Journal for Parasitology*, 12(4):303-314, 1982.
- TICHOPAD, A.; DILGER, M.; SCHWARZ, G. & PFAFFL, M. W. Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Research*, 31(20):e122, 2003.
- TICHOPAD, A.; DZIDIC, A. & PFAFFL, M. W. Improving quantitative real-time RT-PCR reproducibility by boosting primer-linked amplification efficiency. *Biotechnology Letters*, 24: 2053 - 2056, 2002.
- VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A. & SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7):RESEARCH0034, Epub, 2002.
- VOGE, M. Development *in vitro* of *Mesocestoides corti* (Cestoda) from oncosphere to young tetrathyridium. *Journal of Parasitology*, 53(1):78-82, 1967.
- VOLKWEISS, A.; BIZARRO, C. V.; RICACHENEVSKY, F. K.; ZAHA, A. & FERREIRA, H. B. Geração de tetratirídeos de *Mesocestoides corti* *in vivo* a partir de indivíduos adultos. In: XIV Salão de Iniciação Científica e XI Feira de Iniciação Científica, PROPESQ, UFRGS. Livro de Resumos, p. 335-336, 2002.
- WANG, S. M.; FEARS, S. C.; ZHANG, L.; CHEN, J. J. & ROWLEY, J. D. Screening poly(dA/dT)- cDNAs for gene identification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A*, 97(8):4162-4167, 2000.
- WELFORD, S. M.; GREGG, J.; CHEN, E.; GARRISON, D.; SORENSEN, P. H.; DENNY, C. T. & NELSON, S. F. Detection of differentially expressed genes in primary tumor tissues using representational differences analysis coupled to microarray hybridization. *Nucleic Acids Research*, 26(12):3059-3065, 1998.
- WILLMER, P., *Invertebrate Relationships - Patterns in animal evolution*. Cambridge University Press. New York, 1990.
- ZHONG, H. & SIMONS, J.W. Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 259(3):523-526, 1999.
- ZHU, Y. Y.; MACHLEDER, E. M.; CHENCHIK, A.; LI, R. & SIEBERT, P. D. Reverse transcriptase template switching: a SMART approach for full-length cDNA library construction. *Biotechniques*, 30(4):892-897, 2001.

Cristiano Valim Bizarro

CURICULUM VITAE

Porto Alegre, 2005



