

Michael Waisberg

Análise da expressão gênica em *Schistosoma mansoni* induzida pelo pareamento sexual e pelo sexo do hospedeiro através da técnica dos microarranjos de DNA

Tese apresentada ao
Programa de Bioinformática
do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG
como requisito parcial para a obtenção
do grau de Doutor em Bioinformática

Orientadora: Prof. Glória Regina Franco

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte – Julho de 2007

“Esse est percipi”

George Berkeley

“O trabalho que fazemos com prazer cura a cansaça que dele mesmo advém”

William Shakespeare

AGRADECIMENTOS

Aqui só cheguei porque muitos me ajudaram. Minha apreciação a todos os que de alguma maneira se esforçaram é infinita. Mesmo temendo esquecer-me de alguém (e desde já pedindo desculpas) aqui humildemente deixo meus agradecimentos.

À professora Glória Regina Franco, agradeço pela orientação, esforço e paciência.

Aos meus pais, que sempre acreditaram em mim e me apoiaram, mesmo nas minhas decisões mais duvidosas. Seu apoio sempre amistoso e confiante não tem preço e a vocês “resta-me dizer isto: mais lhes é devido, por mais que tudo lhes seja pago”.

À Caroline, minha amada esposa e companheira. Sem seu apoio, não sei onde estaria. Seu amor e amizade bastam.

Aos professores Najib El-Sayed e Omar dos Santos Carvalho que gentilmente abriram seus laboratórios, forneceram reagentes, infra-estrutura, conhecimento e ainda por cima me receberam de forma impecável. Esta tese não seria possível sem a vossa ajuda.

À professora Élide Rabelo, que me apoiou nos melhores e piores momentos desta jornada. Sem sua ajuda nunca teria conseguido fazer meus experimentos.

Ao professor Marcelo Santoro, sempre disponível para bate-papos extremamente engrandecedores.

Aos amigos no TIGR em Washington, Gustavo Cerqueira, Mariana Simões, Appolinaire Dijkeng, Flávia Azevedo, Chuong Huyn. Com vocês por perto o tempo passou numa velocidade assustadora.

Ao colega Bryan Frank pela paciência e transparência ao ensinar as nuances do dia-a-dia dos microarranjos de DNA.

À Dr. Liana K. Jannotti-Passos pela ajuda com as infecções unisexuais.

Às técnicas Sueleny Silva Ferreira Teixeira, Delza de Moura Soares Reis, Neuza Antunes Rodrigues, e Kátia Barroso pelo zelo, afeto e suporte habilidoso e amigável com meus experimentos.

Aos meus irmãos Paulo e Marcelo que sempre me incentivaram e respeitaram.

Aos meus amigos de longa data João de Carvalho Ferreira, Lucas de Carvalho Ferreira, Regina Pinto Carvalho, Adelina Martha dos Reis que sempre estiveram disponíveis, tanto nas horas boas quanto nas horas ruins.

Aos colegas do LGB, Francisco Pereira Lobo, Jorge Marcelo de Freitas, Marina Mourão, Rodrigo Richard, Vanessa Faria, Carolina Furtado, Marcela Drummond, Débora Aline, Michelle Barbi, Fernanda Kedy, Luciana e Fernanda Bastos, Carlos Eduardo Calzavara, Alessandra Clarizia, Alessandra Campos, Cláudia Carvalho, Charles Anacleto, Débora Naves, Simone Pires, Paula Ortolani, Carlos Gustavo, Pedro Avelar, Matheus Rajão, Priscila Grynberg e Daiane DeLaat, muito obrigado pela amizade e confiança. As horas despendidas em bate papos na “cozinha” do laboratório com certeza não foram desperdiçadas.

Aos amigos de doutorado, congressos, cervejas etc: Cris, Raquel, Kalouro, Fumega, Tiago, Julio, Wesley, Adriano, Francisco Prosdocimi, Cecille, Caio e Vinícius.

Aos professores Andréia Macedo, Carlos Renato e Sérgio Pena pelas várias sugestões durante as inúmeras reuniões laboratoriais.

Aos meus furões, Brownie e Muffin, companheiros de trabalho, sempre ao meu lado nas longas horas em frente ao computador.

A CAPES pelo suporte financeiro e concessão de bolsas no Brasil e nos EUA.

À FAPEMIG pelo financiamento do projeto.

Índice

Lista de Abreviações	6
Lista de Figuras	9
Lista de Tabelas	12
Resumo	13
Abstract	15
1. Introdução	16
1.1. A esquistossomose e o ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i>	16
1.2 A interação entre vermes machos e fêmeas e o desenvolvimento sexual no parasito	18
1.3. Efeitos do hospedeiro na maturação sexual em esquistossomos	21
1.4. O genoma e transcriptoma do <i>S. mansoni</i>	23
1.5. O uso de microarranjos de DNA para o estudo da expressão gênica em schistosomas	25
2. Objetivos do estudo	29
3. Métodos	30
3.1. Infecções Unisexuais	30
3.2. Infecções Mistas.....	31
3.3. Extração e Amplificação de RNA.....	31
3.4. Marcação e hibridação do RNA.....	34
3.5. Hibridação dos Microarranjos e Design Experimental	34
3.6. qRT-PCR Real-Time	39

3.7. Análise de Imagens	40
3.8. Análise de Dados	40
4. Resultados	44
4.1. Obtenção do material biológico e pré-análise.....	44
4.2. Normalização dos dados	48
4.3. Avaliação da qualidade das hibridizações	54
4.4 Análise estatística.....	59
4.5. Análise de categorias funcionais.....	66
4.6. Confirmação dos dados de microarranjos de DNA por qRT-PCR	73
5. Discussão	78
6. Conclusões	91
ANEXO I – Artigo aceito por BMC Genomics	93
ANEXO II – Artigo submetido para Acta Tropica.....	130
ANEXO III – Listas de genes diferencialmente expressos	162
ANEXO IV - CD	
Referências.....	191

Lista de Abreviações

aaUTP – Amino-alil Uridina Trifosfato

ACAT – Acil-CoA-Colesterol Acil Transferase

ACPB - Proteína Ligadoras de Acyl-CoA

aRNA - RNA antisense

BLAST – *Basic Local Alignment and Search Tool*

BSA – Albumina Sérica Bovina

cDNA – Ácido desoxiribonucléico complementar

CDS – *Coding Sequence* / Sequência Codificadora

Cy3 – Cianina 3

Cy5 – Cianina 5

DAG – Grafo Acíclico Direto

DHEA - Dehidroepiandrosterona

DMSO - Dimetil sulfóxido

DNA – Ácido desoxiribonucléico

EBI – *European Bioinformatics Institute*

EMBOSS - *The European Molecular Biology Open Software Suite*

EST – Etiqueta de Sequência Transcrita

FABP - Proteína Ligadora de Ácidos Graxos

GO – Ontologia Gênica

HDL – Lipoproteína de Alta Densidade

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Performance

LCAT - Lecitina-Colesterol Aciltransferase

MAP – Proteína Ativada por Mitógeno

MIAME – *Minimum Information About a Microarray Experiment*

mRNA - Ácido Ribonucléico mensageiro

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

ncRNA – RNA não-codificante

Oligo(dT) – Oligo Desoxitimidilato

ONSA - *Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis*

ORESTES - *Open Reading Frame ESTs*

PCR – Reação de Cadeia da Polimerase

PMT – Fotomultiplicador

qRT-PCR – Transcrição Reversa em Reação de Cadeia da Polimerase Quantitativa

RNA – Ácido Ribonucléico

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

SSC – Tampão Salina-Sódio Citrato

ssDNA – DNA fita simples

T7 – Bacteriófago T7

TIGR – *The Institute for Genomic Research*

UTP – Uridina Tri-Fosfato

UV/Vis – Ultra Violeta/Visível

VFBCF – Vermes Fêmea Bissexuais provenientes de Camundongos Fêmea

VFUCF – Vermes Fêmea Unisexuais provenientes de Camundongos Fêmea

VFUCM – Vermes Fêmea Unisexuais provenientes de Camundongos Macho

VLDL - Lipoproteína de Densidade Muito Baixa

VMBCF – Vermes Macho Bissexuais provenientes de Camundongos Fêmea

VMUCF – Vermes Macho Unisexuais provenientes de Camundongos Fêmea

VMUCM – Vermes Macho Unisexuais provenientes de Camundongo Macho

WHO – *World Health Organization*

Lista de Figuras

Figura 1: Casal de vermes adultos da espécie <i>Schistosoma mansoni</i> pareados.....	17
Figura 2: Esquema de funcionamento do kit de amplificação de RNA.....	33
Figura 3: Design experimental para verificação do efeito do pareamento sexual na expressão gênica de fêmeas de <i>S. mansoni</i>	36
Figura 4: Distribuição empírica suavizada dos sinais para os canais verde (G) e vermelho (R).....	49
Figura 5: MA <i>plots</i> para as três primeiras lâminas utilizadas.....	50
Figura 6: <i>Boxplot</i> representando os valores de M antes e após a normalização.....	51
Figura 7: <i>Boxplots</i> representando os valores de M para cada agulha de impressão.....	53
Figura 8: <i>Background</i> para os canais verde e vermelho, antes da normalização, para as lâminas 67, 68 e 69.....	56
Figura 9: Gráficos representando a distribuição espacial dos valores de M e A para as lâminas 67, 68 e 69.....	57
Figura 10: Gráficos representando a distribuição espacial dos <i>flags</i> gerados após a seleção dos elementos utilizando o software GenePix Pro®.....	58
Figura 11: Gráficos do tipo <i>Boxplot</i> representando o grau de correlação entre os diversos tipos de réplicas utilizados.....	60
Figura 12: Gráfico do tipo vulcão para os resultados do experimento estudando o efeito do pareamento sexual na expressão gênica em fêmeas de <i>S. mansoni</i>	62
Figura 13: Gráfico do tipo vulcão para os resultados do experimento estudando o efeito do pareamento sexual na expressão gênica em machos de <i>S. mansoni</i>	63

Figura 14: Gráfico do tipo vulcão para os resultados do experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica em fêmeas de <i>S. mansoni</i> .	64
Figura 15: Gráfico do tipo vulcão para os resultados do experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica em machos de <i>S. mansoni</i> .	65
Figura 16: Gráficos de pizza mostrando as ontologias gênicas (GOs) do tipo processo biológico que estão presentes em fêmeas imaturas.	67
Figura 17: Gráficos mostrando as ontologias gênicas (GOs) do tipo processo biológico presentes em machos pareados.	68
Figura 18: Gráficos de pizza mostrando as ontologias gênicas (GOs) do tipo processo biológico e que estão presentes em machos pareados.	69
Figura 19: Gráficos de pizza mostrando as ontologias gênicas (GOs) que estão presentes em machos pareados, usando a anotação fornecida por Fitzpatrick e colaboradores.	70
Figura 20: Gráficos de pizza mostrando as ontologias gênicas (GOs) dos genes diferencialmente expressos em fêmeas não-pareadas e induzidos pelo sexo do hospedeiro.	71
Figura 21: Gráficos de pizza mostrando as ontologias gênicas (GOs) que estão presentes nos genes diferencialmente expressos em machos unisexuais provenientes de camundongos machos ou de camundongos fêmeas.	72
Figura 22: Correlação entre a expressão gênica determinada pela técnica dos microarranjos de DNA versus os resultados determinados por PCR em tempo real para o experimento estudando o efeito do pareamento sexual na expressão gênica em fêmeas de <i>S. mansoni</i> .	74

Figura 23: Correlação entre a expressão gênica determinada pela técnica dos microarranjos de DNA versus os resultados determinados por PCR em tempo real para o experimento estudando o efeito do pareamento sexual na expressão gênica em machos de <i>S. mansoni</i>	75
Figura 24: Correlação entre a expressão gênica determinada pela técnica dos microarranjos de DNA versus os resultados determinados por PCR em tempo real para o experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica em fêmeas de <i>S. mansoni</i>	76
Figura 25: Correlação entre a expressão gênica determinada pela técnica dos microarranjos de DNA versus os resultados determinados por PCR em tempo real para o experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica em machos de <i>S. mansoni</i>	77

Lista de Tabelas

Tabela 1: Quantificação do RNA usado nas hibridações.....	46
Tabela 2: Lista dos genes diferencialmente expressos obtida a partir do estudo do efeito do pareamento sexual na expressão gênica em fêmeas de <i>S. mansoni</i>	163
Tabela 3: Lista dos genes diferencialmente expressos obtida a partir do estudo do efeito do pareamento sexual na expressão gênica em machos de <i>S. mansoni</i>	174
Tabela 4: Lista dos genes diferencialmente expressos no experimento obtida a partir do estudo do efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica em fêmeas de <i>S. mansoni</i>	179
Tabela 5: Lista dos genes diferencialmente expressos no obtida a partir do estudo do efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica em machos de <i>S. mansoni</i>	182

Resumo

O trematódeo parasita *Schistosoma mansoni* é um dos principais agentes causadores da Esquistossomose, uma doença que afeta aproximadamente 200 milhões de pessoas, principalmente em países em desenvolvimento. Uma vez que a maior parte da patologia causada é associada com os ovos produzidos pelas fêmeas, conhecer os mecanismos envolvidos na oogenese e maturação sexual é um passo importante em direção ao descobrimento de novos alvos terapêuticos para tratamento farmacológico efetivo dessa parasitose. Para estudar os transcritos de *S. mansoni* associados com a maturação sexual, ovoposição e efeitos do sexo do hospedeiro, nós comparamos a expressão gênica de parasitos sexualmente maduros e imaturos provenientes de hospedeiros do sexo masculino e do sexo feminino usando microarranjos de DNA. Nossos resultados mostram que 265 transcritos são diferencialmente expressos em fêmeas adultas e 53 em machos adultos quando vermes maduros e imaturos são comparados. Dos genes diferencialmente expressos, 55% são expressos em níveis mais elevados em fêmeas pareadas enquanto os 45% restantes são mais expressos em fêmeas não pareadas, e 56.6% são expressos em níveis mais elevados em machos pareados enquanto os 43.4% são mais expressos em parasitos imaturos. Os resultados também mostram que o sexo do hospedeiro causa expressão gênica diferencial de 11 genes em parasitos fêmeas e de 134 em parasitos machos. Dos genes diferencialmente expressos em fêmeas e relacionados ao sexo do hospedeiro, 10 foram mais expressos em fêmeas provenientes de camundongos machos. Dos 134 genes diferencialmente expressos em parasitos machos, 79 (59%) foram mais expressos em parasitos de camundongos fêmeas, sugerindo que existe uma comunicação entre o hospedeiro e o parasito e que esta é mais frequente quando eles são de sexos

opostos. Uma grande variedade de transcritos associados ao sexo do hospedeiro e à maturação foram identificados, portanto permitindo a aquisição de novas informações sobre a comunicação entre parasitos de sexos opostos, assim como informações sobre a comunicação entre hormônios do hospedeiro e esquistossomas.

Abstract

The parasitic trematode *Schistosoma mansoni* is one of the major causative agents of Schistosomiasis, a disease that affects approximately 200 million people, mostly in developing countries. Since much of the pathology is associated with eggs laid by the female worm, understanding the mechanisms involved in oogenesis and sexual maturation is an important step towards the discovery of new targets for effective drug therapy. In order to study gene transcripts associated with sexual maturation, oviposition and host sex effect we compared the gene expression profiles of sexually mature and immature parasites from both male and female mice using DNA microarrays. Our results show that 265 transcripts are differentially expressed in adult females and 53 in adult males when mature and immature worms from female mice are compared. Of the genes differentially expressed, 55% are expressed at higher levels in paired females while the remaining 45% are more expressed in unpaired ones, and 56.6% are expressed at higher levels in paired male worms while the remaining 43.4% are more expressed in immature parasites. The results also show that host sex causes differential expression of 11 genes in female parasites and of 134 in male parasites. Of the differentially expressed genes in female worms related to host sex, 10 were more expressed in female worms from male mice, while of the 134 differentially expressed genes in male parasites, 79 (59%) were more expressed in worms from female mice suggesting that the communication between hosts and parasites is more frequent when they are from opposite sexes. A myriad of new host sex and maturation associated transcripts were identified, therefore enabling the acquisition of a large body of knowledge about the communication between parasites of opposite sexes, as well as the communication between host hormones and schistosomes.

1. Introdução

1.1. A esquistossomose e o ciclo de vida do Schistosoma mansoni

A esquistossomose mansoni, causada pelo parasito trematódeo digeneico *Schistosoma mansoni*, é uma endemia de extrema relevância sócio-econômica. Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde existem aproximadamente 200 milhões de pessoas contaminadas com schistosomas no mundo, sendo que a maior parte destas pessoas está localizada em países tropicais e sub-tropicais (WHO 1997). Segundo dados da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), a área endêmica brasileira já abrange 19 estados com aproximadamente 26 milhões de habitantes expostos ao risco de contaminação. Estima-se que a doença cause 11.000 mortes/ano no mundo (WHO 1997) e calcula-se que no Brasil entre oito e doze milhões de pessoas estão contaminadas (Filho *et al.* 1994). Apesar de existirem dois tratamentos disponíveis para a doença (praziquantel e oxaminiquina) existem relatos a respeito do surgimento de cepas resistentes a estes tratamentos (Conceição *et al.* 2000; Doenhoff *et al.* 2002).

O ciclo evolutivo do *S. mansoni* é bastante interessante pois este parasito possui seis fases distintas, sendo elas: adulto, ovo, miracídio, esporocisto, cercária e esquistossômulo. No homem (o hospedeiro vertebrado) o verme atinge sua forma adulta podendo viver várias décadas nas vênulas da parede intestinal (Payet *et al.* 2006). A infecção humana ocorre por via de cercárias que saem do caramujo (hospedeiro invertebrado) e penetram ativamente no hospedeiro vertebrado, transformando-se em esquistossômulos e somente após passarem pelo coração, pulmões e fígado, transformam-se no verme adulto. Quando na forma adulta, a fêmea do *S. mansoni* se aloja no canal ginecóforo do macho e estes se mantêm permanentemente pareados (Figura 1).

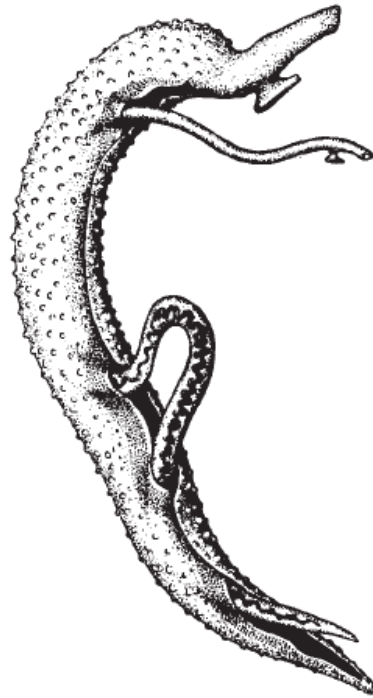


Figura 1: Casal de vermes adultos da espécie *Schistosoma mansoni* pareados (Fonte: LoVerde et al., *Schistosoma mansoni* male-female interactions. Can. J. Zool. 82: 357:374; 2004).

Esta interação contínua com o macho é necessária para que a fêmea possa atingir a maturidade sexual e também para que esta possa migrar até as veias mesentéricas. O pareamento da fêmea com o macho faz com que haja um aumento do comprimento do ovário do parasito e promove a maturação deste e da glândula vitelina (Shaw 1987). Após a maturidade, a fêmea produz e libera aproximadamente 400 ovos por dia na corrente sanguínea (Valadares *et al.* 1980; Valadares *et al.* 1981) e estes ovos são responsáveis pela maior parte das conseqüências patológicas da infecção. Cinquenta por cento dos ovos produzidos pelo parasito fica no organismo e parte destes acabam se alojando no fígado, onde são imobilizados e envolvidos por uma reação inflamatória (granuloma). Esta reação é o elemento anatomopatológico básico do processo esquistossomótico agudo e crônico (Boros 1989). A separação dos vermes pareados promove a regressão da glândula vitelina da fêmea e uma redução no seu tamanho (Popiel & Basch 1984).

1.2 A interação entre vermes machos e fêmeas e o desenvolvimento sexual no parasito

Pouco se sabe da natureza dos estímulos produzidos pelo macho que promovem a maturidade sexual da fêmea e dos mecanismos de controle da maturação desta. Sabe-se porém que o esperma não é o fator estimulante para o desenvolvimento (Erasmus 1973). Três teorias tentam explicar o mecanismo de maturação sexual na fêmea induzida pelo macho. Estas são: teoria nutricional, teoria física/táctil e teoria química/hormonal. A teoria nutricional postula que a involução ocorrida nas fêmeas não pareadas se deve ao fato da fêmea não ser capaz de alimentar-se adequadamente quando isolada do macho. Isto seria explicado pela especialização ocorrida em cada sexo do parasito (Basch 1990).

Segundo esta teoria, os machos são responsáveis pelo suporte físico e nutricional das fêmeas enquanto estas canalizam todos os seus recursos para a produção de ovos. Em suporte a esta teoria, Gupta e Basch mostraram que fêmeas de *S. mansoni* provenientes de infecções unisexuais possuíam musculatura faríngea sub-desenvolvidas, paredes intestinais finas, falta de enzimas digestivas e ingestão de sangue reduzida quando comparadas com fêmeas provenientes de infecções mistas (Gupta & Basch 1987). LoVerde e colaboradores sugerem que a maior musculatura do macho permite que estes ajudem a fêmea a bombear sangue para dentro de seus intestinos através de uma espécie de massagem feita nas paredes musculares do canal ginecóforo (LoVerde *et al.* 2004). Além disso, Cornford e Huot demonstraram que existe transferência de glicose ^{14}C do macho para a fêmea, o que reforça ainda mais esta primeira hipótese (Cornford & Huot 1981). A teoria tátil, por sua vez, sugere que existam receptores ao longo do canal ginecóforo responsáveis pelo engatilhamento da maturação sexual na fêmea. Interessantemente, Michaels mostrou que quando metades de vermes (quando os vermes são divididos em segmentos cranial e caudal) são permitidas de se parearem *in vitro*, metades similares sempre paream-se normalmente enquanto metades dissimilares sempre paream-se anormalmente. Este autor sugeriu que esses possíveis receptores permitem aos vermes determinar suas posições no pareamento (Michaels 1969). Por último, a teoria química e hormonal postula que substâncias secretadas pelo macho e transferidas para a fêmea seriam responsáveis pela maturação. Em suporte à teoria química/hormonal, Shaw e colaboradores mostraram que extratos de acetona ou de éter de vermes macho induziam desenvolvimento das fêmeas *in vitro*. Além disso, mostrou-se que colesterol é transferido dos machos para as fêmeas (Shaw *et al.* 1977), o que reforça esta hipótese.

Apesar dos efeitos do macho sobre a fêmea serem facilmente observáveis, os efeitos das fêmeas sobre os machos costumam ser bem mais discretos e, portanto, recebem muito menos atenção da comunidade científica. Ainda assim, alguns estudos mostram que os machos de *S. mansoni* e de *S. haematobium* provenientes de infecções unisexuais são significativamente menores e têm menos testículos que os vermes de infecções bissexuais correspondentes (Zanotti *et al.* 1982; Khalil & Mansour 1995). Usando dados publicados por Basch e Gupta pode-se observar que o pareamento também estimula uma maior taxa de divisão celular (medida pelo número de núcleos por unidade de área em uma secção) em machos quando vermes adultos pareados são comparados com vermes não pareados (Basch & Gupta 1988). Os efeitos estimulatórios das fêmeas de *Schistosoma* nos vermes macho também foram estudados em nível molecular e bioquímico. Por exemplo, vermes machos de infecções unisexuais têm mais glutatona que vermes de infecções mistas e esta diferença pode ser revertida pela incubação dos machos unisexuais com fêmeas (Siegel & Tracy 1988; Siegel & Tracy 1989). Além disso, vermes fêmea estimulam a incorporação de tirosina, a acumulação de lipídios e a utilização de lipase em machos (Haseeb *et al.* 1989; Haseeb 1998). Talvez seja até mais relevante o fato de que esquistossomos macho pareados expressam uma proteína de 79-KDa no seu canal ginecóforo e que esta proteína não seja expressa na superfície de vermes macho unisexuais (Bostic & Strand 1996). Esta proteína, que tem vasta distribuição na superfície de vermes fêmea adultos, tem homologia com moléculas homotípicas de adesão reguladas durante o desenvolvimento e que são suspeitas de serem essenciais para a interação continuada entre os sexos e desenvolvimento sexual dos esquistossomos.

Vermes macho e fêmea secretam substâncias que induzem mudanças no comportamento do sexo oposto (Haseeb *et al.* 1985; Silveira *et al.* 1986). Já foi mostrado que esquistossomos fêmea secretam um peptídeo de 3 kDa envolvido na atração de machos (Ghaleb *et al.* 2006) e, apesar de que este peptídeo poderia ser puramente um atraente químico, pode-se especular que este também possa engatilhar mudanças na expressão gênica dos machos. É interessante que este peptídeo tenha uma pequena região de identidade com a enzima superóxido dismutase Cu/Zn, pois é sabido que esta é diferencialmente expressa entre machos e fêmeas (Simurda *et al.* 1988; Fitzpatrick *et al.* 2005). O porquê dos machos serem atraídos em direção à fêmea por este peptídeo de 3kDa ainda não se sabe ao certo, mas pode-se especular que seja pela interação entre o peptídeo e seu receptor. Esta estimulação requeriria o engatilhamento da expressão gênica no parasito para coordenar sua mudança de comportamento e, portanto, sugere que de fato exista uma série de eventos no macho que sejam engatilhados pelo contato com a fêmea ou com substâncias secretadas por ela.

1.3. Efeitos do hospedeiro na maturação sexual em esquistossomos

Menos ainda se sabe a respeito dos efeitos do sexo do hospedeiro em esquistossomos. Sabe-se porém que estes parasitos possuem receptores nucleares clássicos para esteróides, hormônios da tireóide e ecdisteróides (de Mendonca *et al.* 2000) e que vermes *S. hematobium* sintetizam uma proteína de 28-kDa capaz de se ligar à testosterona e facilitar seu transporte, metabolismo e ação fisiológica no parasito (Remoue *et al.* 2002). Quando extratos protéicos de *S. mansoni* são incubados com 17- β -estradiol e 20-hidroxicdisona, verifica-se que tanto machos quanto fêmeas apresentam

proteínas capazes de se ligarem a estes hormônios (Giannini *et al.* 1995). Interessantemente, em um ensaio do tipo *band-shift* utilizando fragmentos correspondentes às extremidades 3' e 5' do gene F-10 (que codifica uma proteína sexo específica) e usando extrato de proteínas nucleares, o composto tamoxifeno (um antagonista do estrógeno) foi capaz de tornar o padrão de bandas das fêmeas similar ao padrão de bandas dos machos. Além disso, tamoxifeno injetado em camundongos infectados levou à formação de ovos com morfologia anormal e similar à morfologia de ovos não-viáveis (Giannini *et al.* 1995). Purnell estudou os efeitos do sexo do hospedeiro na recuperação e tamanho de *S. mansoni* e *S. japonicum* em camundongos e hamsters (Purnell 1966), observando que mais vermes macho de ambas as espécies se desenvolvem em hospedeiros (camundongos ou hamsters) do sexo masculino e que estes vermes tornam-se maiores dos que os que vêm a se desenvolver em hospedeiros do sexo feminino. Além disso, tanto para *S. mansoni* quanto para *S. japonicum* de ambos os sexos, os animais macho são mais susceptíveis à infecção (Purnell 1966). Curiosamente, o tratamento de adultos de *S. hematobium* com testosterona diminui sua fertilidade e portanto sua capacidade reprodutiva (Remoue *et al.* 2002). Testosterona também afeta a carga parasitária e longevidade durante infecções experimentais com *S. mansoni*, diminuindo a mortalidade de camundongos macho, e isto parece ser devido à interrupção do desenvolvimento esquistossomular causada pela interação da testosterona com os esquistossomulos (Eloi-Santos *et al.* 1992; Nakazawa *et al.* 1997). Outro dado interessante é que parasitos provenientes de ratos macho apresentam maior diversidade genética do que parasitos infectando ratos fêmea (Caillaud *et al.* 2006). Dado à presença de receptores hormonais e à existência de modificações morfológicas e genéticas em

vermes infectando hospedeiros de sexos diferentes, parece razoável acreditar que o sexo do hospedeiro afete os padrões de expressão gênica nos parasitos e que informações sobre este fenômeno possam ajudar a entender melhor a complexa comunicação entre parasitos e hospedeiros.

Por outro lado, o conhecimento sobre os fatores que regulam a interação entre o macho e a fêmea e que regulam a maturação sexual da fêmea podem potencialmente fornecer ferramentas para se criarem estratégias de tratamento para pacientes infectados pelo *Schistosoma*, evitando assim a liberação dos ovos e as manifestações da doença (Atkinson & Atkinson 1980). Para verificar os fatores envolvidos no amadurecimento sexual da fêmea, vários estudos foram desenvolvidos no passado, mas os métodos utilizados em geral só permitem a avaliação de poucos fatores de cada vez. Apesar disso, esses estudos fornecem informações importantes sobre a biologia conjugal do *S. mansoni* e podem ser utilizados para validar os resultados de experimentos em larga escala.

1.4. O genoma e transcriptoma do S. mansoni

O projeto de descoberta gênica de *S. mansoni* nasceu em 1992 e envolveu o sequenciamento de genes expressos do parasito, ou seja, o conhecimento do transcriptoma do organismo. Esta foi a primeira iniciativa de um projeto deste tipo no Brasil e menos de 100 genes do parasito tinham sido seqüenciados e depositados em bancos de dados antes do início deste programa. Sendo assim, para que fosse possível seqüenciar a porção expressa do genoma de *S. mansoni*, foi necessário adotar uma técnica eficiente e rápida baseada na produção de Etiquetas de Seqüências Transcritas (*Expressed Sequence Tags*- ESTs) (Franco *et al.* 1995). Essa estratégia envolve o sequenciamento em

um único passo de clones de cDNA selecionados aleatoriamente de bibliotecas, para a obtenção das ESTs, que são seqüências pequenas (~400 nt) das extremidades desse cDNA (Adams *et al.* 1991). Essa abordagem tem como vantagem permitir trabalhar apenas com seqüências expressas além de identificar rapidamente uma grande quantidade delas por meio de comparações feitas com seqüências depositadas em bancos de dados via Internet. As ESTs também podem ser aplicadas na construção de mapas físicos, assim como na caracterização de grandes seqüências genômicas (Zweiger & Scott 1997).

O trabalho de sequenciamento do genoma expresso de *S. mansoni* que começou em 1992 foi uma iniciativa do Laboratório de Genética Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG), e do Centro de Pesquisas René Rachou (FIOCRUZ). Em 1994, este projeto se tornou um consórcio internacional, incluindo laboratórios na Europa, Ásia, África, Austrália, América do Sul e América do Norte, sendo parcialmente financiado pela Organização Mundial de Saúde OMS/UNDP/*World Bank Special Program for Research and Training in Tropical Diseases* (TDR) (Franco *et al.* 2000). Em 1995, esse programa gerou a primeira publicação com 607 ESTs (Franco *et al.* 1995).

Outras iniciativas de sequenciamento de transcritos do parasito surgiram tanto em Minas Gerais, quanto em São Paulo. Em 2001 foi criada a Rede Genoma de Minas Gerais financiada pela FAPEMIG/CNPq para montagem de uma rede regional de sequenciamento, tendo como primeira aplicação o sequenciamento do transcriptoma do *S. mansoni* (<http://rmgm.cpqrr.fiocruz.br>). Os objetivos deste projeto foram: gerar bibliotecas de cDNA de cinco estágios do desenvolvimento: miracídio, ovo, cercária, fase pulmonar e vermes adultos por metodologia convencional; produzir 100.000 sequencias

parciais de cDNA a partir das bibliotecas convencionais; identificar os transcritos por homologia com genes depositados em bases de dados não redundantes e criar agrupamentos das seqüências derivadas de um único gene.

O projeto de São Paulo é parte de uma rede de pesquisas envolvendo vários laboratórios, com financiamento da FAPESP, denominado projeto ONSA (*Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis*). Em Outubro de 2003 o grupo publicou aproximadamente 163.000 seqüências parciais de transcritos geradas pela técnica ORESTES (*Open Reading Frame ESTs*), através de amplificação por RT-PCR de baixo rigor do RNA mensageiro de seis estágios do ciclo de vida de *S. mansoni* (Verjovski-Almeida *et al.* 2003). Essas seqüências foram agrupadas em 30.980 *contigs* e estima-se que representem 92% do transcriptoma do parasito.

Já o projeto de sequenciamento do genoma do parasito propriamente dito está sendo desenvolvido nos EUA e na Inglaterra, em colaboração com a Rede do Projeto Genoma de *S. mansoni* da Organização Mundial de Saúde/UNDP/World Bank. O projeto é realizado pelo *The Institute for Genome Research* em Maryland, EUA, e pelo *Wellcome Trust Sanger Institute* em Cambridge, Inglaterra. Este projeto já está em fase final de montagem do genoma e espera-se a publicação de sua primeira versão para breve.

1.5. O uso de microarranjos de DNA para o estudo da expressão gênica em schistosomas

Recentemente, a técnica dos microarranjos de DNA foi utilizada para estudar a expressão gênica em larga escala em esquistossomos. Esta técnica permite o estudo de milhares de genes ao mesmo tempo. Microarranjos de DNA são, geralmente, lâminas de vidro, plástico ou nylon onde se depositam diversos ssDNA (DNA fita

simples) ou cDNAs. Usualmente o DNA fita simples (um oligonucleotídeo de 50 a 70 bases), ou o cDNA é impresso em pontos específicos do espaço (usando agulhas de impressão ou impressão jato-de-tinta) organizados em um padrão regular do tipo grade e a seleção de DNAs a serem depositados depende do objetivo do microarranjo. É possível também fazer síntese *in situ* dos oligos sobre as lâminas, como é o caso das tecnologias Affymetrix e Agilent. O microarranjo é então utilizado para responder uma pergunta relacionada aos DNA impressos na sua superfície. Do ponto de vista prático, esta resposta é obtida através da incubação do microarranjo com uma solução contendo cDNA ou RNA que são gerados/obtidos da amostra biológica particular em estudo. A idéia central por trás do método é de que os DNAs ou RNAs em solução (que contêm sequências complementares às sequências depositadas na superfície do microarranjo) hibridarão à aqueles ssDNA (ou cDNAs) com sequência complementar. Uma vez que os DNAs ou RNAs utilizados para a hibridação no microarranjo são marcados com um corante fluorescente (ou em certos casos, um elemento radioativo), o ponto onde ocorre a hibridação pode ser detectado e quantificado facilmente (Draghici 2003). Quando usados para estudar a expressão gênica, os DNAs a serem hibridados contra a lâmina são obtidos através da transcrição reversa de mRNA extraído de tecidos. Estes DNAs são marcados com corantes fluorescentes através da incorporação de nucleotídeos marcados durante a transcrição reversa (marcação direta) ou através da posterior ligação de moléculas reativas do corante a nucleotídeos modificados (i.e. aminoalil UTP) adicionados à cadeia de DNA durante a transcrição reversa (marcação indireta). Pode-se também utilizar a técnica de marcação indireta de RNA quando se trabalha com RNA amplificado em que foi incorporado aminoalil UTP durante a amplificação. A iluminação do microarranjo de

DNA com um laser apropriado permite a obtenção de uma imagem do arranjo dos elementos (DNAs impressos). A intensidade de cada elemento pode então ser relacionada à quantidade de mRNA presente no tecido e, assim sendo, espera-se que esta intensidade possa ser relacionada à quantidade de proteína produzida pelo gene correspondente a um determinado elemento. Usualmente, duas amostras são marcadas com corantes fluorescentes diferentes (por exemplo, Cy3 e Cy5) e estas são usadas ao mesmo tempo em um processo de hibridação competitiva. Desta maneira, a razão das cores para cada elemento informa sobre as diferenças relativas de expressão gênica entre duas amostras quaisquer.

Experimentos usando microarranjos de DNA foram realizados para estudar diferenças entre machos e fêmeas tanto de *S. mansoni* quanto de *S. japonicum* (Hoffmann *et al.* 2002; Fitzpatrick *et al.* 2004), entre os vários estágios dos parasitas (Dillon *et al.* 2006; Vermeire *et al.* 2006), para estudar adaptações dos parasitos ao meio ambiente (Jolly *et al.* 2007), bem como diferenças entre *S. mansoni* e *S. japonicum* (Gobert *et al.* 2006), expressão gênica em adultos de *S. mansoni* (Verjovski-Almeida *et al.* 2007), efeito de andrógenos na expressão de ncRNAs de *S. mansoni* (Louro *et al.* 2007) e maturação sexual de vermes (Fitzpatrick & Hoffmann 2006). Microarranjos também foram utilizados para investigar a resposta hepática do hospedeiro à infecção com *S. mansoni* (Hoffmann *et al.* 2001). Estes estudos forneceram informações importantes em relação à biologia do parasito e resposta do hospedeiro. Nesta tese estudou-se os efeitos do pareamento sexual e do sexo do hospedeiro na expressão gênica de machos e fêmeas de *S. mansoni*. Para isso comparamos a expressão gênica em vermes adultos provenientes de infecções unisexuais com vermes adultos provenientes de infecções mistas. Além disso,

comparamos a expressão gênica em vermes machos e fêmeas provenientes de camundongos macho com vermes (do mesmo sexo) provenientes de infecções em camundongos fêmea. Acreditamos que os resultados providos por esses experimentos adicionarão informações importantes a respeito dos genes envolvidos na oogênese e maturação sexual de esquistossomos e que podem potencialmente ser utilizados como alvos para tratamento e desenvolvimento de novos fármacos contra este importante parasito.

2. Objetivos do estudo

Esta tese teve como objetivo geral:

Analisar a expressão gênica em *Schistosoma mansoni* induzida pelo pareamento sexual e pelo sexo do hospedeiro através da técnica dos microarranjos de DNA.

Os objetivos específicos foram:

- 1) Identificar alterações causadas pelo pareamento sexual no perfil de expressão gênica de vermes machos provenientes de camundongos fêmeas .
- 2) Identificar alterações causadas pelo pareamento sexual no perfil de expressão gênica de vermes fêmeas provenientes de camundongos fêmeas.
- 3) Identificar alterações causadas pelo do sexo do hospedeiro no perfil de expressão gênica de vermes unisexuais machos.
- 4) Identificar alterações causadas pelo do sexo do hospedeiro no perfil de expressão gênica de vermes unisexuais fêmeas.

3. Métodos

3.1. Infecções Unisexuais

O ciclo de vida do verme *S. mansoni* foi mantido no Instituto de Pesquisa René Rachou, Fiocruz (Belo Horizonte, Brazil). *S. mansoni* foi mantido em hospedeiros intermediários da espécie *Biomphalaria glabrata*. Camundongos Swiss foram usados como hospedeiro definitivo. Para se obter vermes adultos unisexuais, caramujos *B. glabrata* foram expostos a um único miracídio produzido a partir de ovos obtidos de fígado de camundongos infectados (Erasmus 1973). Depois de um mês, os caramujos foram testados e a positividade da infecção confirmada através da verificação da liberação de cercárias após a exposição dos caramujos à luz (Bogea *et al.* 1996). Entre 100 e 200 cercárias de cada caramujo foram então injetadas no peritônio de camundongos Swiss de ambos os sexos.

Os camundongos foram acomodados em gaiolas de polipropileno com tampas de tela de aço inoxidável. Todos os animais receberam ração para camundongo e água *ad libitum*. Os animais foram sacrificados 51 dias após a infecção de acordo com procedimentos éticos e os vermes adultos foram obtidos por perfusão portal (Pellegrino & Siqueira 1956; Smithers & Terry 1965). Os vermes foram lavados em salina fria e conferidos na lupa para excluir possíveis infecções mistas (i.e. bissexuais) indesejáveis. Os vermes adultos unisexuais foram separados em múltiplos *pools* (cada um contendo centenas de vermes originados de múltiplos camundongos) que foram então congelados a -80°C até processamentos adicionais das amostras.

3.2. Infecções Mistas

Para se obter vermes de infecções mistas, caramujos da espécie *B. glabrata* foram expostos a múltiplos miracídios e as cercárias provenientes desses caramujos utilizadas para infectar camundongos Swiss. Cada camundongo recebeu aproximadamente 100 cercárias e os animais foram sacrificados 51 dias após a infecção. A perfusão destes foi feita da mesma maneira que a dos vermes unisexuais. Os vermes foram lavados com solução salina fria e cuidadosamente separados no microscópio de acordo com o sexo. Vermes de cada sexo foram então agrupados em pools e congelados a -80°C até seu processamento posterior.

3.3. Extração e Amplificação de RNA

RNA total foi extraído usando reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies, CAT#15596-026) de acordo com as instruções do fabricante. Os RNAs foram quantificados usando um espectrofotômetro Nanodrop ND-100 UV/Vis (NanoDrop Technologies, USA) e a qualidade dos RNAs avaliada usando gel de agarose desnaturante (Sambrook *et al.* 1989). 2 μg de RNA total de cada amostra foram amplificados através de duas rodadas de amplificação linear usando um kit AminoAllyl MessageAmp II (Ambion, CAT#1753). Este kit é baseado no protocolo de amplificação de James Eberwine (Van Gelder *et al.* 1990) e segundo vários estudos realizados (Feldman *et al.* 2002; Polacek *et al.* 2003; Li *et al.* 2004) não introduz viés de amplificação considerável. Segundo alguns autores a amplificação até melhora a confiabilidade dos resultados dos microarranjos independentemente desta ser necessária para a expansão da quantidade de RNA para a análise das lâminas (Feldman *et al.* 2002;

Gomes *et al.* 2003; Polacek *et al.* 2003). O procedimento de amplificação consiste da transcrição reversa com iniciador oligo dT(18) contendo um promotor T7 e utilizando uma transcriptase reversa modificada para produzir maiores quantidade de cDNA que as enzimas do tipo selvagem (*wild type*). Segundo o fabricante, a enzima utilizada (ArrayScript™) cataliza a síntese the cDNA praticamente com o seu comprimento total (*full-length*). Este cDNA é então utilizado como molde para a síntese da segunda fita e *clean-up*, tornando-se assim molde para a transcrição *in vitro* com RNA polimerase T7. O kit utiliza uma tecnologia patenteada (MEGAscript®) para a transcrição *in vitro* que permite a geração de milhares de cópias de RNA antisense (aRNA) para cada mRNA na amostra. A transcrição reversa é configurada para permitir a incorporação do nucleotídeo modificado 5-(3-aminoalil)-UTP (aaUTP) no aRNA. O aaUTP contém um grupo amino reativo na posição C5 da uracila que permite que este nucleotídeo seja quimicamente conectado a corantes N-hidroxisuccinimidil ester-derivatizados (corantes ester NHS) como, por exemplo, os corantes Cy3 e Cy5. A amplificação foi realizada de acordo com as especificações do fabricante e o aaUTP foi utilizado na segunda rodada de amplificação de forma que o produto final pudesse ser marcado através de marcação indireta (Figura 2).

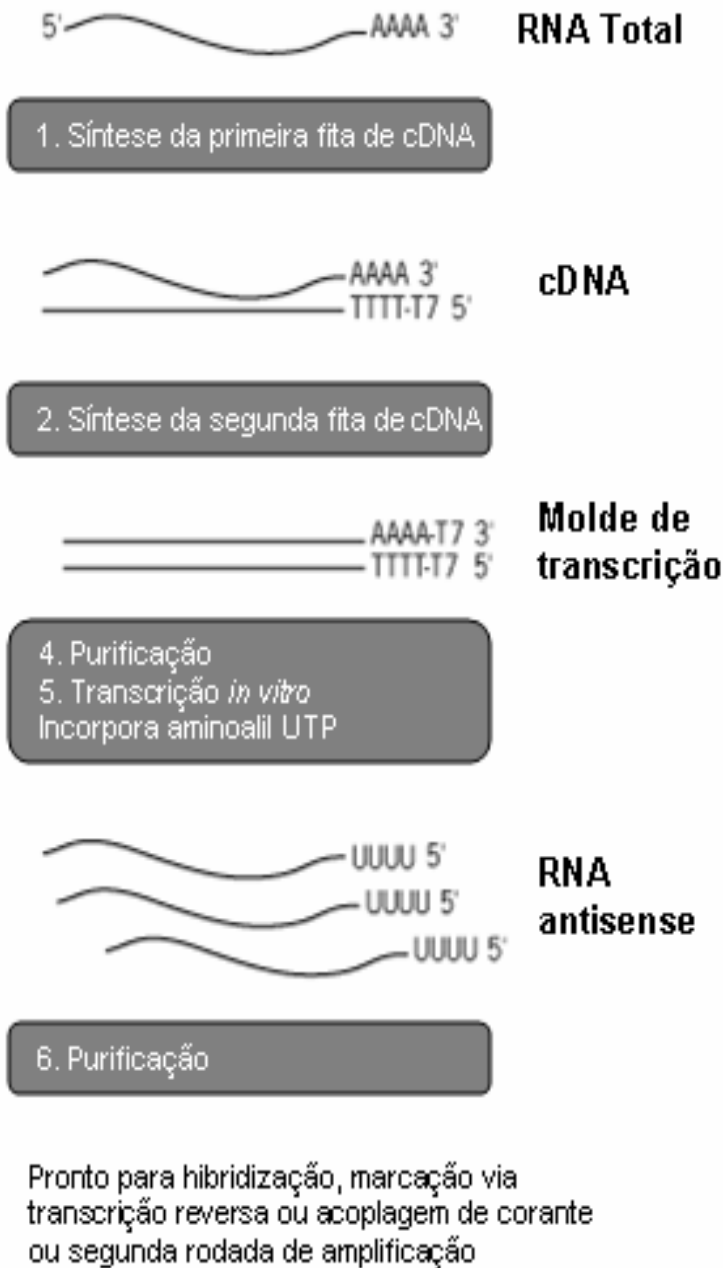


Figura 2: Esquema de funcionamento do kit de amplificação de RNA (Aminoallyl MessageAmp II, Ambion).

3.4. Marcação e hibridação do RNA

RNA amplificado e contendo aminoalil UTP foi marcado usando os corantes fluorescentes Cy3 e Cy5 por marcação indireta de acordo com um versão modificada do procedimento padrão de marcação do TIGR (Hasseman 2002). De maneira abreviada, para cada hibridação, 15 µg de RNA amplificado foram secos por centrifugação sob vácuo, resuspendidos em tampão carbonato pH 9.0 e incubados por 5 min à temperatura ambiente. Depois desta incubação, 4.5 µL de um dos dois corantes previamente dissolvidos em 73 µL de DMSO, foram adicionados à solução e as amostras incubadas no escuro, à temperatura ambiente por uma hora. RNA marcado foi purificado para remover corantes não incorporados usando o kit RNeasy MinElute Cleanup (Quiagen, CAT#74204) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras marcadas com Cy3 e Cy5 foram então combinadas, secadas de novo, e ressuspendidas em 30 µL de tampão de hibridação (formamida 50%, SSC 5X, SDS 0.1%).

3.5. Hibridação dos Microarranjos e Design Experimental

Quatro experimentos foram realizados. Em cada um dos experimentos 6 lâminas foram utilizadas, totalizando assim 24 lâminas no conjunto dos quatro experimentos. O primeiro experimento visava estudar o efeito do pareamento sexual na expressão gênica em vermes adultos do sexo feminino; o segundo objetivava avaliar o efeito do pareamento sexual em vermes adultos do sexo masculino; o terceiro tinha como objetivo estudar o efeito do sexo do hospedeiro vertebrado na expressão gênica de vermes unisexuais do sexo feminino e o quarto estudava o efeito do sexo do hospedeiro vertebrado na expressão gênica de vermes adultos unisexuais do sexo masculino. Todos

os experimentos foram feitos utilizando-se *pools* de vermes adultos devido à escassez de material biológico e de kits de amplificação no momento da realização do experimento. O design utilizado nos três experimentos é similar ao design utilizado por Bengtsson e colaboradores (Bengtsson *et al.* 2001).

No experimento visando estudar o efeito do pareamento sexual na expressão gênica em fêmeas de *S. mansoni*, as três réplicas biológicas (*pools*) de RNA de fêmea provenientes de infecções unisexuais (U1, U2, U3) foram hibridadas contra um pool de RNA de fêmea proveniente de infecções mistas (BI) e o experimento foi realizado em duplicata (replicata técnica) usando um design do tipo *dye swap* (setas verdes e vermelhas) para poder-se levar em conta viéses de marcação (Figura 3). No experimento visando estudar os efeitos do pareamento sexual na expressão gênica de vermes machos, o design foi idêntico ao do experimento realizado para as fêmeas, sendo a única diferença o fato de que foram utilizados vermes macho ao invés de vermes fêmea.

Para os experimentos objetivando estudar o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica em vermes adultos de ambos os sexos, vermes unisexuais de um dos sexos e provenientes de camundongos fêmea foram comparados com vermes unisexuais do mesmo sexo e provenientes de camundongos macho. Três *pools* de vermes provenientes de camundongos fêmea foram comparados com um *pool* de vermes provenientes de camundongos macho.

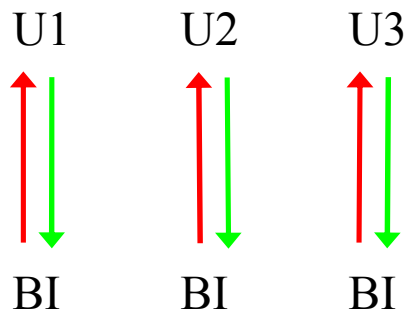


Figura 3: Design experimental para verificação do efeito do pareamento sexual na expressão gênica de fêmeas de *S. mansoni*. Os três pools de RNA de fêmea unisexual foram hibridados contra o pool de RNA de fêmea bissexual. Cada seta representa um microarranjo de dois canais em que a amostra na cauda da seta é marcada com corante vermelho (Cy5), e a amostra na cabeça da seta é marcada com corante verde (Cy3).

As amostras foram hibridadas usando microarranjos de DNA gentilmente fornecidos pelo Dr. Karl Hoffmann (University of Cambridge, UK). Os microarranjos foram inicialmente desenhados para estudar a expressão gênica sexo-específica em adultos de *S. mansoni* e contém 7335 oligonucleotídeos (50meros) impressos em duplicatas (Fitzpatrick *et al.* 2005). Os elementos de DNA de *S. mansoni* escolhidos para o desenho dos oligonucleotídeos foram selecionados a partir de sequências de EST disponíveis de bancos de dados públicos disponíveis em 28 de Junho de 2002, mRNAs completos e sequências genômicas (usando o NCBI) disponíveis em abril de 2003 e de uma sequência completa (AY267032 – *S. mansoni* arginase) identificada pelo laboratório do prof. Karl Hoffman (Fitzpatrick *et al.* 2005). As 16815 sequências de ESTs foram agrupadas usando o programa de montagem CAP3 em 2076 contigs (representando mais de uma sequência de EST) e 5049 singletons (representando apenas uma sequência de EST) totalizando assim 7125 grupos de sequências únicas de DNA. Além destes 7125 grupos não-redundantes de ESTs, 513 mRNAs completos (algo redundantes em relação aos grupos de ESTs) e sequências de gDNA foram incluídos de forma a elevar o número de sequências de DNA usados para o desenho dos oligonucleotídeos a 7638. A homologia provável de cada elemento de DNA foi determinada usando BLASTx (Altschul *et al.* 1990) buscando o banco de dados de proteínas não-redundantes do NCBI (nr). *E-values* menores ou iguais a 10^{-05} foram considerados significativos e a designação da proteína correspondente foi usada para anotar os contigs e singletons de EST. *E-values* maiores do que 10^{-05} não foram considerados significativos e os elementos de DNA de *S. mansoni* correspondentes foram anotados como 'UNKNOWN'. Para tentar melhorar a

anotação, estes elementos foram então comparados contra o banco de dados de ESTs compilado por Verjovski-Almeida e colaboradores (Verjovski-Almeida *et al.* 2003) usando BLASTn, aonde elementos de DNA gerando valores de *bit score* maiores ou iguais a 200 foram considerados como um acerto. Todos os oligonucleotídeos tinham 50 bases de comprimento, modificados por um 5' amino ligado ao 6-C e sintetizados em uma escala de 200nmol. Vários testes hierarquicos foram utilizados para selecionar 50-ameross ótimos representativos de cada singleton/contig/mRNA/gene. As sequências foram então analisadas usando o software EMBOSS (Rice *et al.* 2000) para filtrar sequências menores do que 50 nucleotídeos, buscar regiões com conteúdo de GC entre 30-50%, excluir regiões com estrutura secundária e identificar regiões sem códigos ambiguos. Usando o programa *repeat masker* (www.repeatmasker.org) identificaram-se regiões que não continham secções de baixa complexidade, repetições simples ou retrotransposons SR2. Após seleção dos melhores oligonucleotídeos possíveis preenchendo os critérios acima, aqueles com Tm mais próximo de 72°C foram selecionados.

Resumidamente, as lâminas foram pré-hibridadas através de imersão em solução de pré-hibridação (5X SSC, 0.1% SDS, 1% BSA) por 40 minutos a 42° C. As lâminas foram então lavadas através de 10 imersões em um béquer contendo água destilada; a água foi trocada, e a operação repetida mais uma vez. Depois da lavagem, as lâminas foram secadas por centrifugação usando uma centrífuga de bancada de alta velocidade para microarranjos (TeleChem International Inc., USA). As amostras foram hibridadas overnight sob lamínulas e dentro de câmaras de hibridação Corning® (Corning, USA) mantidas em banho maria a 42° C e no escuro. Após o final das hibridações, as lâminas

foram lavadas duas vezes por 5 minutos cada em solução de lavagem de baixa estringência a 42° C (2X SSC, 0.1% N-lauroysarcosine), seguidas de duas lavagens em solução de média estringência (0.1X SSC, 0.1% N-lauroysarcosine) à temperatura ambiente e 2 lavagens de 5 minutos cada em solução de alta estringência (0.1X SSC). Imediatamente após a lavagem, as lâminas foram secadas por centrifugação e lidas usando um *scanner* à laser de microarranjos com dois canais (GenePix 4000B, Molecular Devices, USA) numa resolução de 10 µm, potência do laser em 100% e PMT ajustado para se obter distribuições similares de sinais verdes e vermelhos.

3.6. *qRT-PCR Real-Time*

Um subgrupo de genes preditos como diferencialmente expressos foi selecionado para validação usando qPCR-RT. RNA total amplificado (2µg) de vermes adultos de ambos os sexos provenientes de infecções mistas e de infecções unisexuais (os mesmos usados para as hibridizações) foram utilizados para fazer transcrição reversa usando Reagentes TaqMan para Transcrição Reversa (Applied Biosystems; Cat# N808-0234). Os produtos foram então amplificados usando o kit Applied SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Cat#4309155) em um termociclador ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) com o seguinte perfil: 50° C por 2 min, 95° C por 10 min; 40 ciclos de 95° C por 15 s e 60° C por 1 min seguidos por um ciclo de dissociação. Cada reação foi realizada usando 1 µl de cDNA da reação de transcrição reversa e usando um volume final de 20 µL (PCR Master Mix 1X, 200 nM de cada primer). Níveis de expressão de alfa-tubulina de *S. mansoni* (accession number [M80214](#)) foram usados como controle endógenos para cada amostra. Níveis relativos de expressão

gênica foram calculados usando o método do $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen 2001). Cada amostra foi analisada visando identificar *primer dimers*, contaminações ou *mispriming* através da inspeção das suas curvas de dissociação.

3.7. Análise de Imagens

Dados brutos para uma lâmina de microarranjo de DNA consistem de duas imagens escaneadas de 16 bits. Durante a leitura (*scanning*) um laser verde (543 nm) e um laser vermelho (633 nm) excitam os corantes fluorescentes Cy3 e Cy5 e a luz emitida é registrada para cada ponto na superfície da lâmina. Das duas imagens obtidas, pelo menos quatro medidas diferentes são obtidas para cada elemento. Estas são os sinais de frente (*foreground*) para os canais verde e vermelho (usualmente a média ou a mediana dos pixels identificados com sendo parte de um determinado elemento) e os valores de fundo (*background*) para os canais verdes e vermelho em cada elemento. Os valores de fundo representam o ruído de fundo nas áreas próximas a cada elemento e este ruído, em geral, é considerado como sendo parte do sinal de frente em cada elemento. Costuma-se considerar que a diferença entre o sinal e o ruído em cada elemento representa o nível de expressão gênica.

3.8. Análise de Dados

Em cada experimento, a análise da expressão gênica envolveu 6 lâminas, incorporando 3 réplicas e *dye swaps*. Os dados, que estão de acordo com as convenções MIAME (*Minimum Information About Microarray Experiments*) (Brazma *et al.* 2001), foram submetidos ao ArrayExpress no EBI (*European Bioinformatics Institute*) usando o

MIAMExpress (Parkinson *et al.* 2005). Os elementos foram analisados usando o software GenePix Pro® e marcados de acordo com a sua qualidade. Dados brutos de intensidade foram analisados usando a linguagem estatística R (Gentleman & Ihaka 1997). Os dados foram inspecionados em busca de vieses espaciais nos canais verde e vermelhos (*background* e sinal), viés de agulha de impressão (*print-tip bias*) e viés intensidade-dependente, usando o pacote marray para R (Gentleman *et al.* 2004). Os dados foram então normalizados por agulha de impressão usando uma versão modificada do método *robust spline* (Smyth & Speed 2003; Boutros 2004; Smyth 2004). A normalização pretende remover das medidas de expressão gênica qualquer tendência sistemática que surja devido à tecnologia de microarranjos e que não seja devida às diferenças entre amostras de RNA hibridizadas aos slides. O método utilizado basicamente normaliza os *log-ratios* para cada slide individualmente, centrando estes valores em zero dentro de cada lâmina ou *sub-array*. A função utilizada (*robust spline*) implementa um idêntico semelhante a normalização do tipo *print-tip loess* mas usa *regression splines* no lugar de curvas loess (loess é uma técnica para se plotar curvas macias através de dados).

A análise estatística foi feita usando um modelo linear que incorporava replicação biológica, técnica e dentro dos slides. A idéia central por trás da análise é de se ajustar um modelo linear aos dados de expressão para cada gene. Os dados de expressão podem ser razões dos logs (*log ratios*) ou, de vez em quando, intensidades dos logs (*log-intensities*) como é o caso das tecnologias monocanal (Affymetrix). Bayes empírico ou outro *shrinkage method* é utilizado para estabilizar a análise, mesmo para experimentos com pequeno número de lâminas. A estatística B foi utilizada em todos os experimentos onde o valor de B (lods ou B) calculado para cada gene é o *log-odds* de um gene ser

diferencialmente expresso. Por exemplo, para $B=1.5$ a chance de expressão gênica diferencial é $\exp(1.5) = 4.48$, i.e, aproximadamente 4.5 para um. A probabilidade que o gene seja diferencialmente expresso é então $4.48/(1+4.48) = 0.82$, i.e. a probabilidade é de 82% que o gene seja diferencialmente expresso. Uma estatística B de zero corresponde a uma chance de 50-50 de que o gene seja diferencialmente expresso. A estatística B é automaticamente ajustada para múltiplos testes através do pressuposto de que 1% dos genes, ou alguma outra percentagem especificada pelo usuário, são esperados como diferencialmente expressos (Bengtsson *et al.* 2001; Smyth 2004). Este tipo de estatística é comumente interpretada mais como um guia geral do que como uma medida rígida de probabilidade de expressão gênica diferencial.

As correlações entre réplicas dentro do slide, *dye swaps* e *pools* foram calculadas usando a função `duplicateCorrelation` do pacote LIMMA (Smyth *et al.* 2005). Uma lista de genes estatisticamente significativos foi gerada através da aplicação de um alisamento Bayesiano (*Bayesian smoothing*) ao resultado da modelagem linear. Os genes que tiveram $\log \text{odds} > 4.6$ (99% de chance de que um gene seja diferencialmente expresso entre as condições sendo comparadas) e valores $M > 1$ ou < -1 (diferenças de pelo menos 2 vezes entre os grupos) foram considerados como diferencialmente expressos. Porque as lâminas foram desenhadas com base na montagem de ESTs de *S. mansoni* e dado que o genoma não estava disponível na época em que as lâminas foram impressas, decidimos testar os genes estatisticamente significativos contra o genoma do parasito (disponível no TIGR para uso interno). Em suma, pares de iniciadores foram desenhados para todos os genes considerados diferencialmente expressos usando uma ferramenta web (GenScript) e então testados contra o genoma e CDSs preditos usando mePCR (Schussler *et al.* 1997)

para verificar se cada par de iniciadores realmente só “amplificava” uma única região do genoma. Pares de iniciadores que amplificavam mais do que uma região foram descartados (mesmo sabendo que isso poderia excluir genes multicópias). Os iniciadores também foram testados para averiguar se dois pares de iniciadores amplificariam o mesmo gene (i.e. CDS predito) para podermos remover genes redundantes (i.e. genes que foram impressos mais do que uma vez na lâmina por causa de problemas de montagem). Uma amostra aleatória dos pares de amplificadores que passaram por estes testes foi utilizada para PCR em tempo real.

Além disso, análise genômica de categorias funcional foi realizada utilizando o *software* Blast2GO (Conesa *et al.* 2005). Este *software* permite a avaliação das diferenças de anotação entre dois conjuntos de dados. A análise da associação de termos de GO em um determinado grupo de sequências é feita através da utilização da função de geração de gráficos combinados (*combined graphs*) e gráficos em tipo pizza disponíveis no programa. Estes gráficos permitem a visualização da anotação combinada de um grupo de sequências e isto pode ser utilizado para se estudar o significado biológico combinado de um subgrupo de sequências. Gráficos combinados são uma boa alternativa para a análise de enriquecimento (*enrichment analysis*) pois não necessitam de um grupo de referência e permitem trabalhar com pequenos números de sequências (IVIA 2005).

4. Resultados

4.1. Obtenção do material biológico e pré-análise

Os RNAs extraídos dos vermes através da técnica do Trizol foram avaliados e quantificados usando espectrofotômetro para que pudéssemos nos certificar que os RNAs estavam em quantidade suficiente e livre de contaminação com proteínas.

Como pode-se observar (Tabela 1), todos os RNAs estavam desprovidos de contaminação por proteínas (relação de absorção $260/280 > 1.8$). Isto indica que a técnica de extração foi apropriada. Para averiguar se houve degradação das amostras, corremos as amostras em gel de agarose 1% desnaturante (foto não incluída). O resultado do gel mostrou para todas as amostras uma banda única de RNA ribossômico (como é usual em RNA de *S. mansoni*) sem presença de rastro típico de degradação. Dado que a qualidade do RNA era boa e visto que não tínhamos RNA em quantidade o suficiente para fazer todos os experimentos que desejávamos, optamos por fazer uso de uma técnica de amplificação linear. O RNA foi amplificado em duas rodadas de amplificação sendo que na última rodada incorporou-se aminoalil-UTP para que o RNA amplificado pudesse ser marcado através da técnica de marcação indireta. O RNA marcado foi então hibridado nas lâminas de microarranjos, as imagens adquiridas inspecionadas e os elementos com

qualidade ruim marcados como tal. Os dados foram extraídos das imagens utilizando o software GenePix Pro® e os resultados exportados na forma de arquivos .gpr para o ambiente estatístico R. Os resultados de cada uma das 6 lâminas (para cada experimento) foram então inspecionados para se procurar presença de viés espacial, viés de intensidade ou *backgrounds* excessivamente altos. Para isso utilizamos os pacotes LIMMA e marray citados anteriormente na seção métodos. As imagens contendo os resultados (imagens e gráficos) do efeito da normalização sobre os dados para todos os experimentos realizados estão no CD em anexo a este manuscrito. Por motivos de espaço e praticidade, daqui por diante utilizaremos apenas alguns exemplos do efeito da normalização nos dados dos experimentos realizados (o restante dos gráficos encontram-se no CD em anexo).

Tabela 1: Quantificação do RNA usado nas hibridações. As amostras foram analisadas para a absorvância nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm. A razão entre os resultados destas análises foi calculada. Em todos os casos, a razão entre as absorvâncias em 260 e 280 nm ficou acima de 1.8 indicando ausência de contaminação por proteínas. VFUCF – vermes fêmea unisexuais provenientes de camundongos fêmea, VFUCM – vermes fêmea unisexuais provenientes de camundongos macho, VMUCF – vermes macho unisexuais provenientes de camundongos fêmea, VMUCM – vermes macho unisexuais provenientes de camundongo macho, VMBCF – vermes macho bissexuais

provenientes de camundongos fêmea, VFBCF – vermes fêmea bissexuais provenientes de camundongos fêmea.

Grupo	Amostra	ng/μL	A260	A280	260/280
VMUCF	3	1481.25	37.031	17.590	2.11
VMUCM	4	1293.21	32.330	15.377	2.10
VMBCF	5	1161.63	29.041	13.797	2.10
VFUCF	6	1824.78	45.619	22.082	2.07
VFUCM	7	1612.79	40.320	19.362	2.08
VFUCF	12	1210.68	30.267	14.578	2.08
VFUCF	13	604,52	15.113	7.487	2.02
VMUCF	14	912.90	22.822	10.704	2.13
VMUCF	19	1176.89	29.422	13.800	2.13
VFBCF	24	3028.23	75.706	38.656	1.96

4.2. Normalização dos dados

Como pode-se observar na figura 4, a distribuição empírica suavizada (*smoothed empirical densities*) para os sinais dos canais verde e vermelho, como exemplificado nas lâminas 67, 68 e 69, são consideravelmente diferentes antes da normalização e tornam-se praticamente iguais após esta, demonstrando a eficácia deste procedimento.

Além disso, ao inspecionarmos os MA *plots* (Figura 5) para as lâminas 67,68 e 69 antes e depois da normalização, pode-se observar que para todas as agulhas (*print tips*), o valor médio da razão entre a intensidade de cada canal torna-se próximo a zero para todo o espectro de intensidades de sinal.

Outra forma interessante de inspecionar a qualidade dos arrays é através de *box plots* dos valores de M (\log_2 da razão entre os sinais de cada canal) para todos os genes nas lâminas 67, 68, 69, 70, 72 e 73 (Figura 6). Um dos pressupostos estatísticos utilizado frequentemente na análise de resultados de microarranjos de DNA é o de que, em média, os genes não são diferencialmente expressos e que portanto o $\log_2(\text{vermelho/verde})$ da maior parte dos genes é igual a 0. Isto se deve ao fato de, geralmente, menos de 5% dos genes serem diferencialmente expressos entre duas condições quaisquer. Um dos objetivos de se normalizar os dados é fazer com que os dados preencham este

pressuposto. Isto é facilmente observável nos *box plots* (Figura 6), nos quais, para cada array o valor de M para cada gene é plotado antes e depois da normalização. Como pode-se ver, após a normalização, o valor mediano de M fica centrado em 0 para todos os arrays.

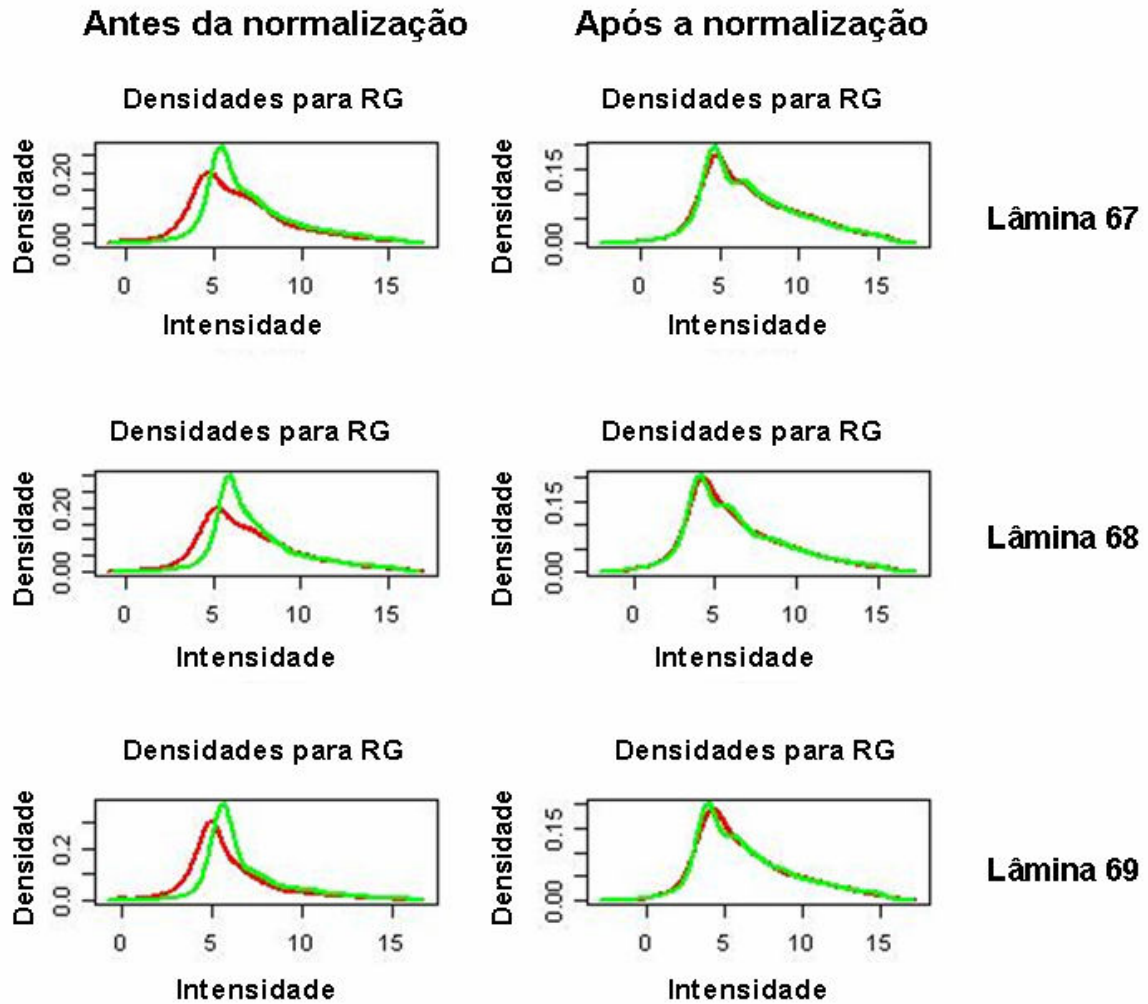


Figura 4: Distribuição empírica suavizada dos sinais para os canais verde (G) e vermelho (R).

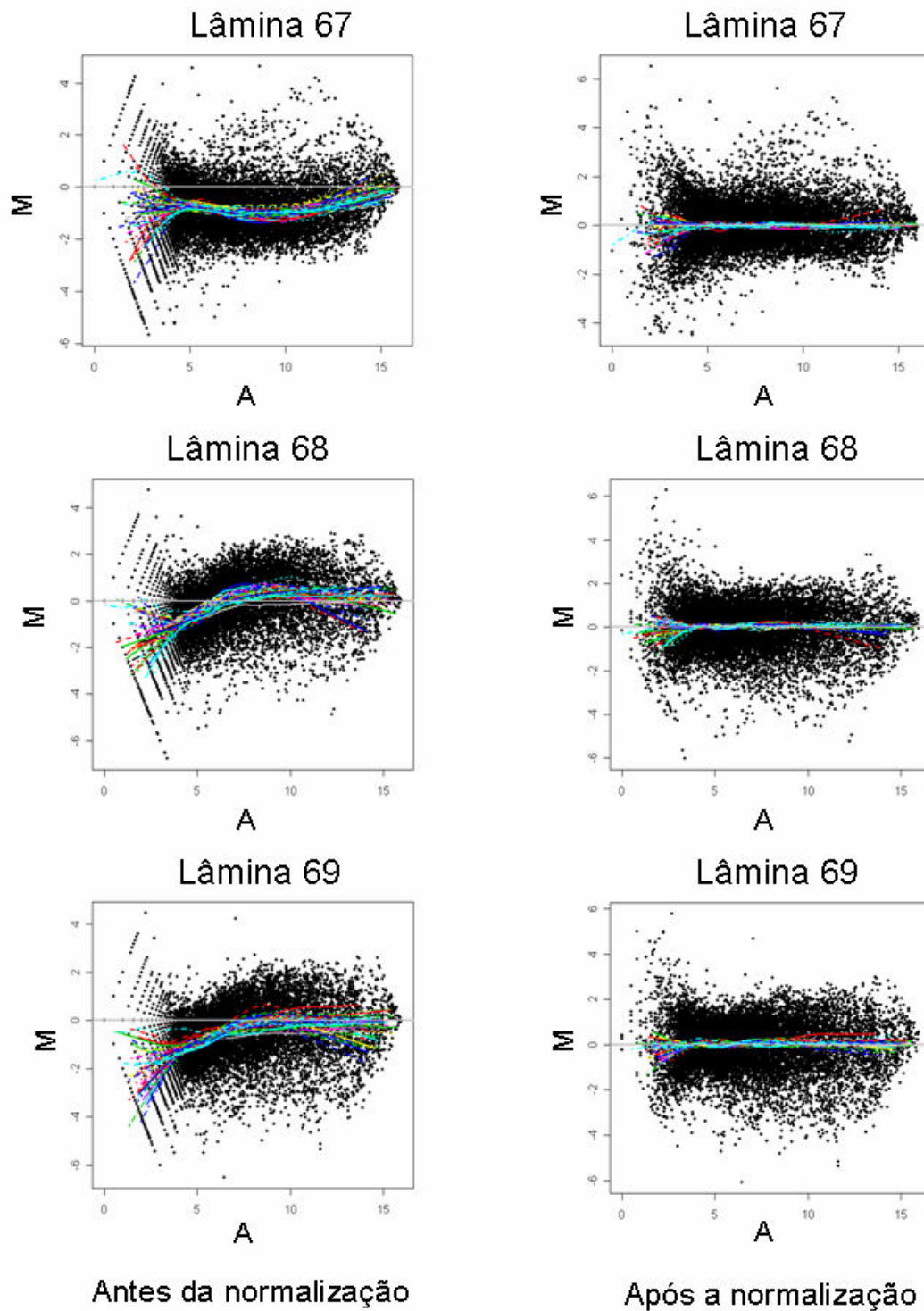


Figura 5: MA *plots* para as três primeiras lâminas utilizadas. O M representa o \log_2 da razão entre os sinais dos canais verde e vermelho e o A representa a média da soma dos \log_2 dos canais verde e vermelhos. À esquerda estão os gráficos antes da normalização dos dados e na direita estão representados os gráficos após normalização.

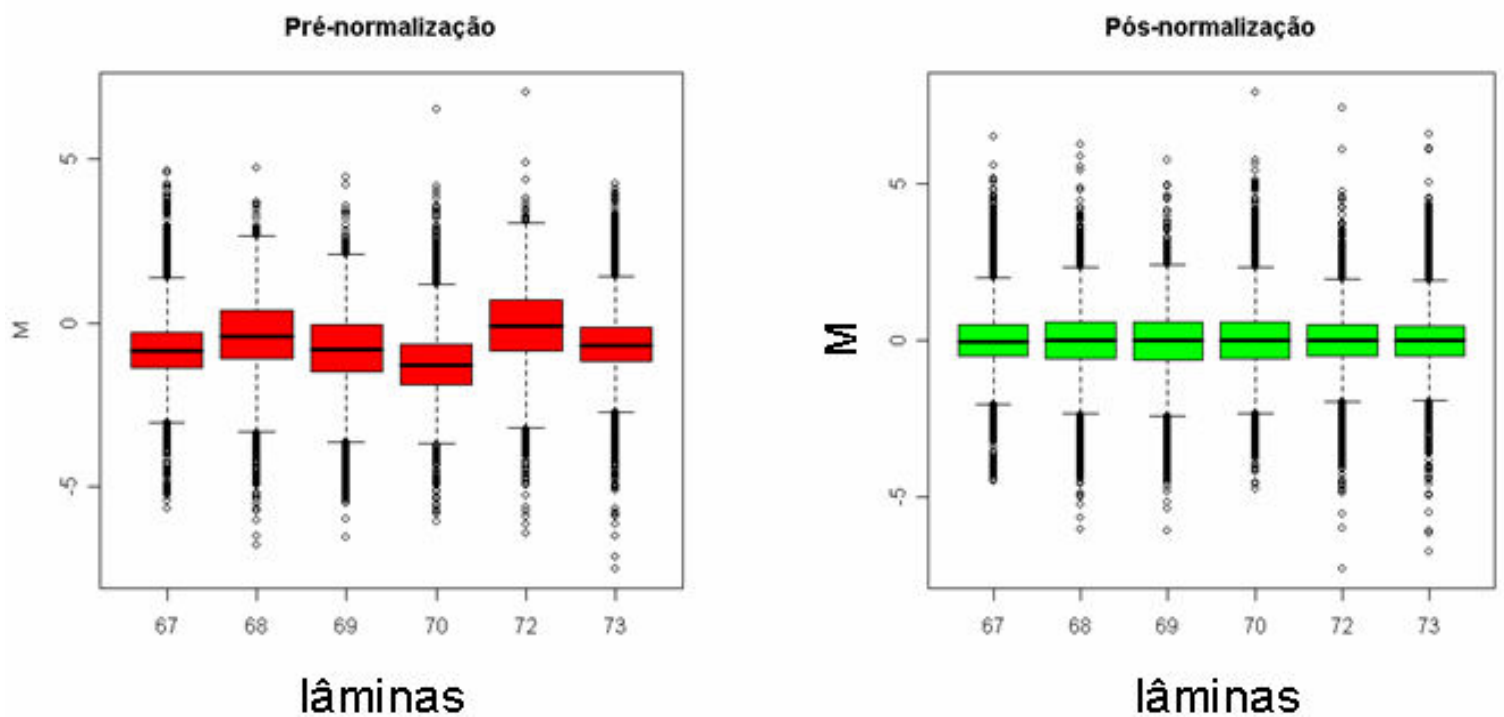


Figura 6: *Boxplot* representando os valores de M antes e após a normalização. A figura da esquerda representa os valores antes da normalização e a figura da direita representa os valores após a normalização pelo método de “robust splines”. O eixo do X representa as várias lâminas utilizadas neste experimento. O eixo do Y representa os valores de M na escala de \log_2 . O valor de $M = 0$ representa uma razão de $R/G = 1$.

Outra característica interessante observável é a compressão das variâncias após a normalização. Isto já foi demonstrado anteriormente através dos gráficos mostrando as distribuições empíricas atenuadas para as intensidades de sinal nos canais verdes e vermelho (Figura 4), no quais a distribuição dos dados torna-se praticamente igual para cada canal após a normalização. Os valores de M podem também ser inspecionados “ao longo” das agulhas de impressão. A Figura 7 mostra um *box plot* por agulha de impressão para a lâmina número 67, antes e depois da normalização.

Pode-se ver também que os valores de M para cada agulha ficam próximos de zero após a normalização. O pressuposto da normalização por agulha de impressão é o de que não existe nenhuma razão biológica para os genes impressos por uma determinada agulha terem expressão média diferente da dos genes impressos por qualquer outra agulha. Na verdade, cada agulha faz uma amostragem aleatória do *pool* de genes do organismo e, como o pressuposto que temos utilizado é o de que em média todos os genes do organismo não são diferencialmente expressos, espera-se que a mediana para os valores de M seja zero para os genes impressos por qualquer agulha.

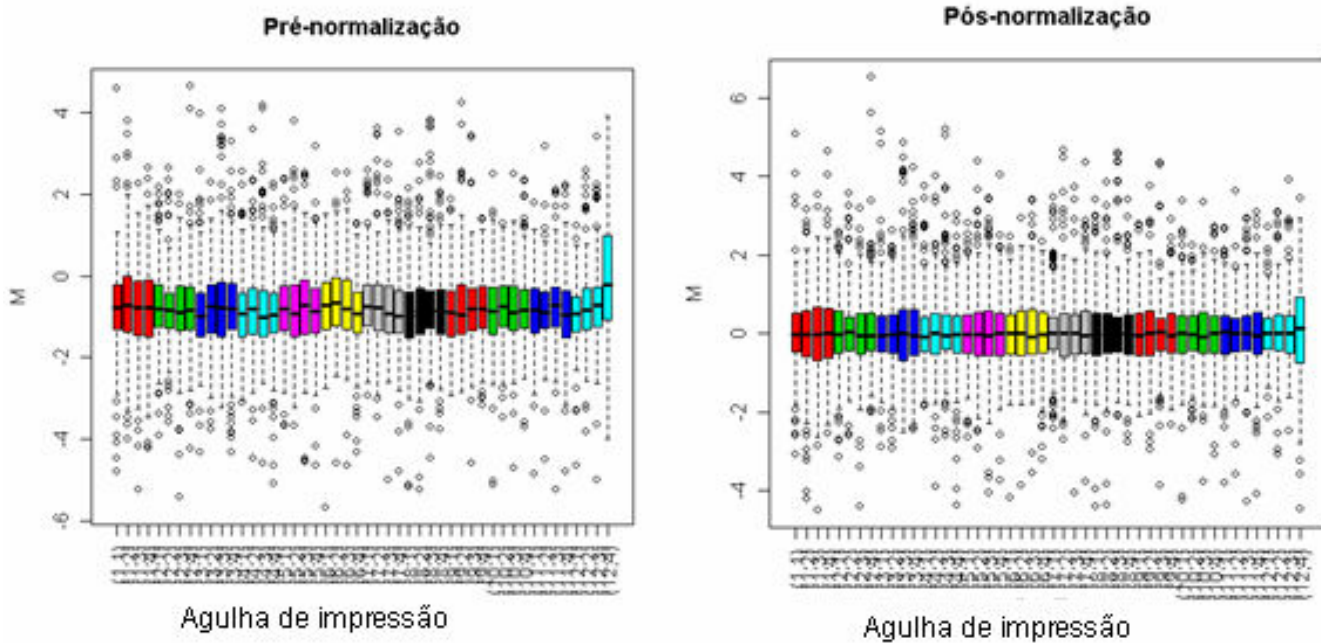


Figura 7: *Boxplots* representando os valores de M para cada agulha de impressão. Valores antes (gráfico à esquerda) e após a normalização (gráfico à direita) da lâmina 67.

4.3. Avaliação da qualidade das hibridizações

Outro tipo de inspeção realizada antes da análise propriamente dita dos dados foi a avaliação qualitativa dos valores de *background* (sinal de fundo) dos dados brutos (antes da normalização) para os canais verdes e vermelhos como exemplificado para as lâminas 66, 67 e 68 (Figura 8). Com isso, esperávamos poder excluir lâminas com vieses espaciais que pudessem vir a prejudicar a análise dos dados. De novo, o pressuposto utilizado é o de que não existe nenhuma razão biológica para que uma determinada parte da lâmina tenha *background* (intensidade do sinal de fundo para ambos os canais) mais alto do que qualquer outra parte da lâmina. Este pressuposto é usualmente válido para os sinais propriamente ditos (intensidade do sinal em ambos os canais dentro dos elementos). Nas figuras 8, 9 e 10 estão representados gráficos em que cada lâmina é subdividida em blocos e os blocos coloridos de acordo com a intensidade do sinal do *background* no respectivo bloco. Isto foi feito para todas as lâminas e para os dois canais. Além disso, analisamos a distribuição dos valores de M e de A ao longo do espaço para averiguar novamente possíveis vieses espaciais na distribuição desses valores (Figura 9).

Por fim, os dados foram inspecionados em relação à distribuição espacial de *flags* (marcações) em cada array (Figura 10). Como um dos blocos (bloco 10/1) em todos os arrays possuía grande quantidade de borrões (elementos com forma irregular) este bloco foi manualmente removido da análise e marcado como ruim. Este tipo de problema na morfologia dos elementos ocorre quando há problema na impressão das lâminas e usualmente é causado por uma agulha danificada. O bloco 12/4, no canto inferior direito possuía grande número de elementos vazios e isto pode ser facilmente percebido neste tipo de análise. Os *flags* utilizados aqui são: -100 (ruim), -50 (não encontrado), 100

(bom).

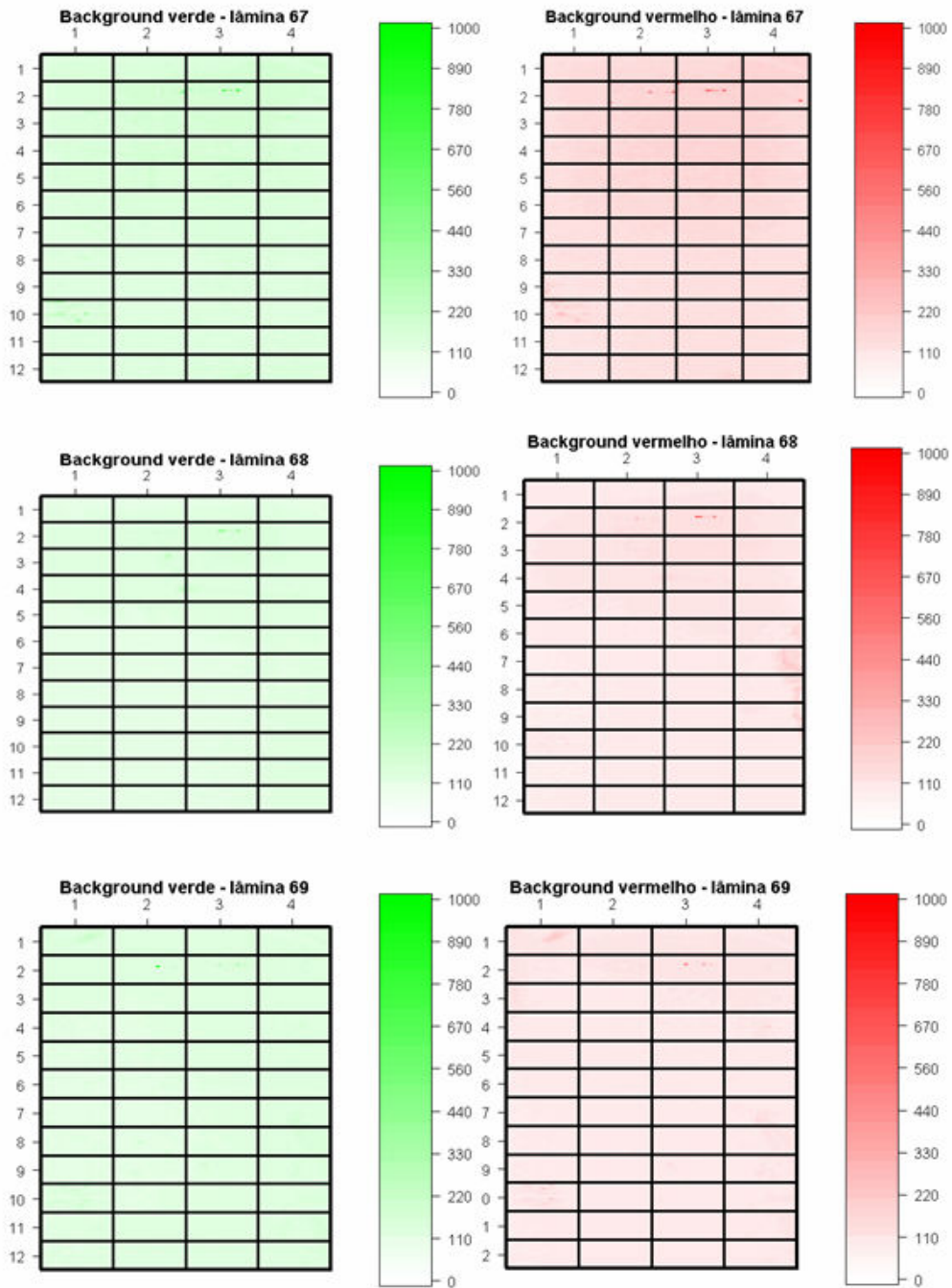


Figura 8: *Background* para os canais verde e vermelho, antes da normalização, para as lâminas 67, 68 e 69. O *background* é representado em uma escala que varia do menor sinal (branco) até o maior sinal (verde ou vermelho). Cada subdivisão da imagem representa um bloco do microarranjo impresso por uma agulha diferente.

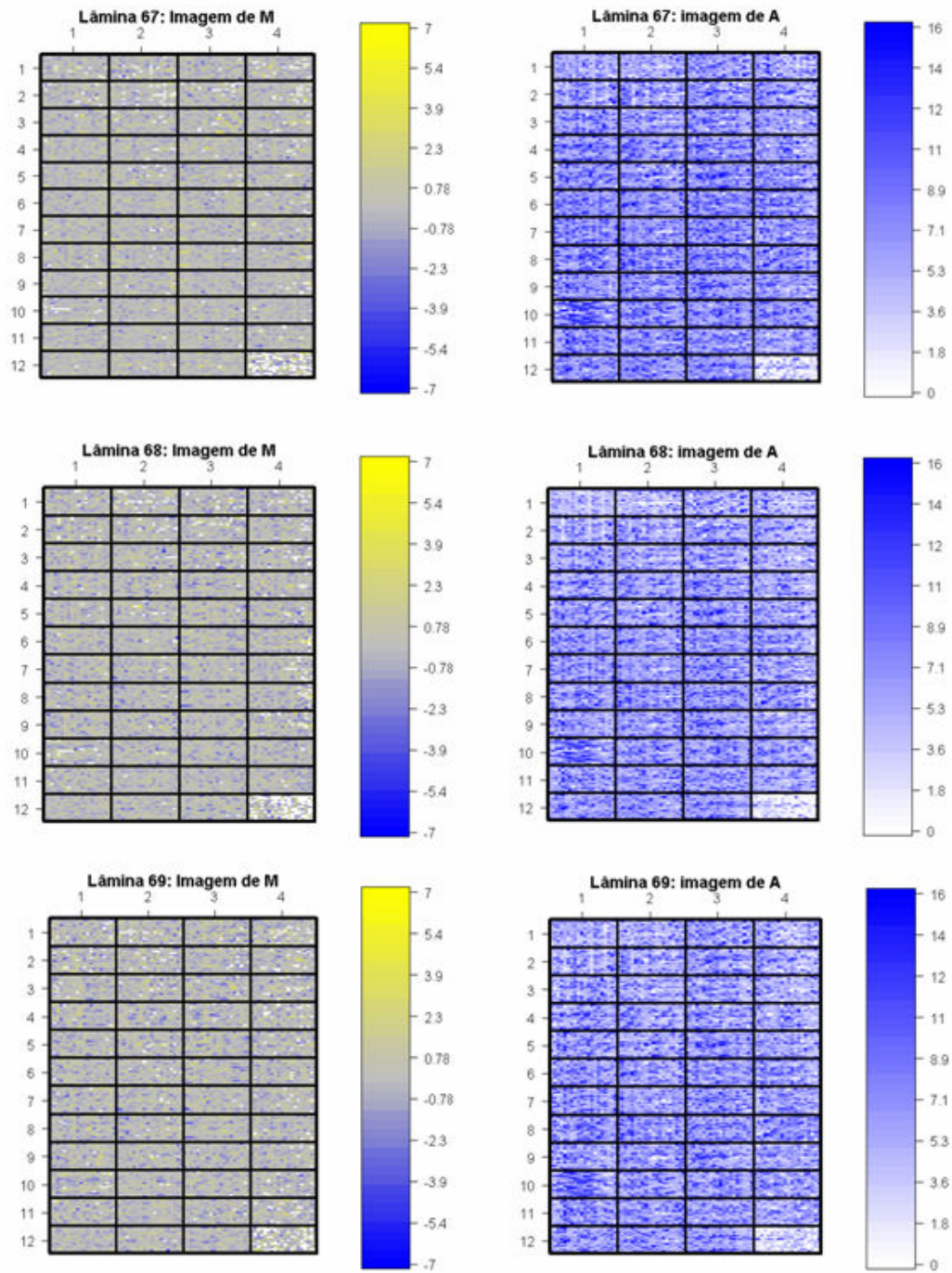


Figura 9: Gráficos representando a distribuição espacial dos valores de M e A para as lâminas 67, 68 e 69.

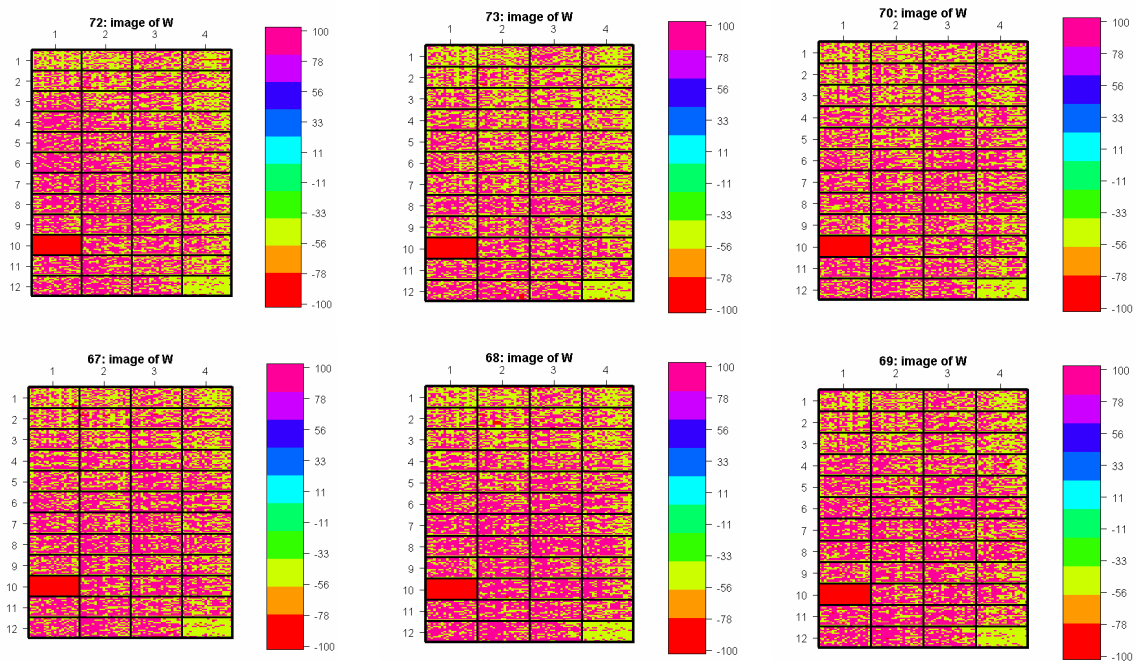


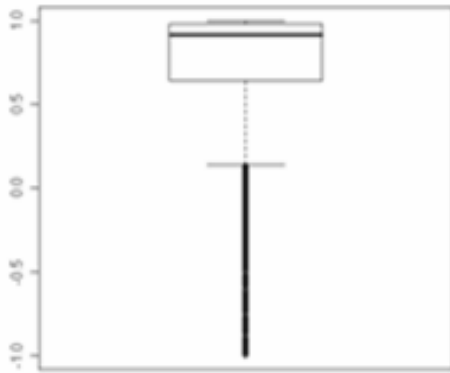
Figura 10: Gráficos representando a distribuição espacial dos *flags* gerados após a seleção dos elementos utilizando o software GenePix Pro®. Foram avaliadas as lâminas 67, 68, 69, 70, 72 e 73. Os valores -50 (verde) representam elementos não encontrados. Os valores 100 (rosa) representam elementos com qualidade boa e os valores -100 (vermelho) representam elementos excluídos da análise. O bloco 10/1 foi completamente excluído da análise devido a um problema de impressão. O bloco 12/4 continha grande quantidades de brancos e controles negativos.

4.4 Análise estatística

Em vista da avaliação qualitativa dos dados, que demonstrou uma boa qualidade dos resultados das hibridações, passamos para a análise estatística propriamente dita dos dados. Para isso utilizamos o pacote LIMMA como descrito anteriormente. Os dados foram analisados inicialmente para se avaliar a correlação entre os diversos tipos de réplicas utilizadas (Figura 11). Como era de se esperar, a correlação entre réplicas dentro de cada lâmina é em geral altíssima (ex: correlação = 0.91) e esta diminui quando avaliada entre *dye swaps* (ex: correlação = -0.89) e réplicas biológicas (ex: correlação = 0.73). A correlação entre as amostras do tipo *dye swaps* tem sinal negativo como era de se esperar visto que os valores de M variam em sentidos opostos.

Após a análise estatística dos dados, obtivemos para cada experimento uma lista de genes estatisticamente significativos que foram ordenados de acordo com seus valores de M e de *log odds* (Tabelas 2, 3, 4 e 5 – Anexo III). Foram considerados diferencialmente expressos todos os genes com diferença maior do que duas vezes entre os grupos (i.e. $-1 > M > 1$) e com *log odds* > 4.6 (99% de chance de serem diferencialmente expressos).

Correlação entre réplicas *in slide*



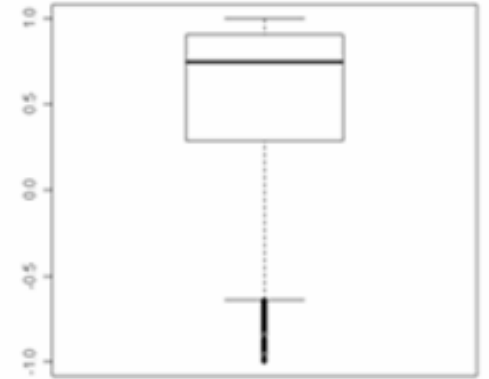
Cor=0.91

Correlação entre réplicas *dye swap*



Cor=-0.89

Correlação entre réplicas biológicas



Cor=0.73

Figura 11: Gráficos do tipo *Boxplot* representando o grau de correlação entre os diversos tipos de réplicas utilizados. A linha no centro da caixa representa a mediana dos valores de correlação. Os pontos fora da barra representam os outliers (valores extremos). O gráfico da esquerda representa os valores de correlação para as réplicas dentro da mesma lâmina. O gráfico no centro representa os valores de correlação para os *dye swaps* e o gráfico da direita representa os valores de correlação para as réplicas dos *pools* para o experimento estudando o efeito do pareamento sexual na expressão gênica em fêmeas de *S. mansoni* (réplicas biológicas).

Os resultados da análise estatística foram resumidos através da utilização de gráficos do tipo vulcão (*volcano plot*). Os gráficos (Figura 12, 13, 14 e 15) mostram os valores da razão da intensidade dos sinais normalizadas por agulha de impressão para todas as replicatas de cada experimento num sistema com dois eixos. O eixo x representa o \log_2 da razão R/G (*fold change*) e o eixo y corresponde ao *log odds* (ou valor B) que é a *odd* (ou probabilidade) que um certo gene seja diferencialmente expresso. Um *log odds* igual a 0 corresponde a uma chance de 50% de um gene ser diferencialmente expresso (e consequentemente 50% de não ser). Quanto mais alto o *log odds* para cada gene, maior a probabilidade de que ele seja diferencialmente expresso e que este não seja um falso positivo. As áreas rosadas nos gráficos mostram genes que foram considerados diferencialmente expressos nestes estudos, i.e. mostraram uma diferença entre os grupos maior ou igual a 2 ($\log_2 R/G \geq 1$ ou ≤ -1) e *log odds* ≥ 4.6 (99% de chance de estar estatisticamente significativo). A área verde representa genes que tiveram *log odds* dentro do limite aceitável mas que não têm diferenças de expressão maior do que duas vezes entre os grupos.

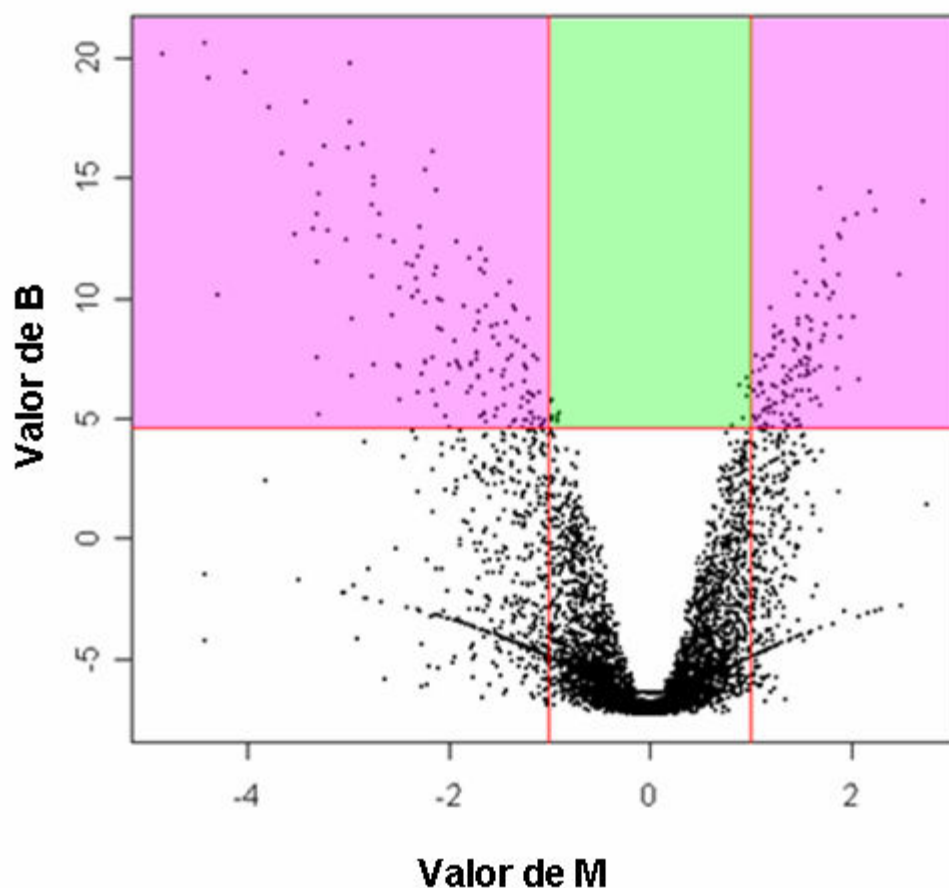


Figura 12: Gráfico do tipo vulcão para os resultados do experimento estudando o efeito do pareamento sexual na expressão gênica em fêmeas de *S. mansoni*. No eixo do X estão representados os valores de M ($\log_2 R/G$) e no eixo Y estão representados os valores de B (log odds). As áreas rosas representam os genes que foram considerados diferencialmente expressos. A área verde representa os genes que apresentaram *log odds* maiores do que 4.6 mas não apresentaram diferenças maiores que duas vezes entre os grupos. As outras áreas representam genes que não foram considerados diferencialmente expressos.

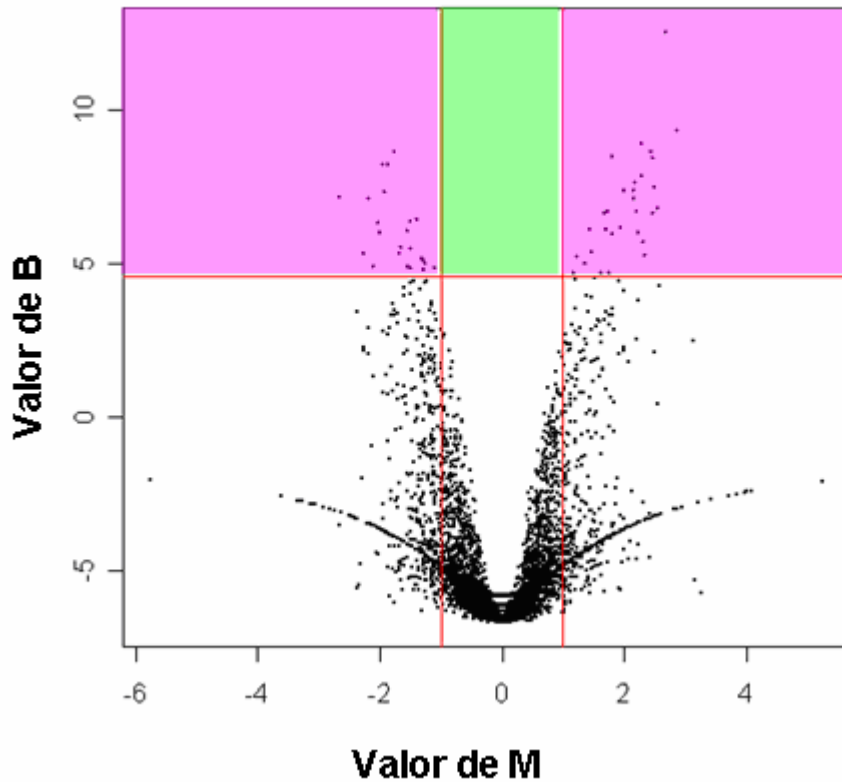


Figura 13: Gráfico do tipo vulcão para os resultados do experimento estudando o efeito do pareamento sexual na expressão gênica em machos de *S. mansoni*. No eixo do X estão representados os valores de M ($\log_2 R/G$) e no eixo Y estão representados os valores de B (log odds). As áreas rosas representam os genes que foram considerados diferencialmente expressos. A área verde representa os genes que apresentaram *log odds* maiores do que 4.6 mas não apresentaram diferenças entre os grupos maiores que duas vezes. As outras áreas representam genes que não foram considerados diferencialmente expressos.

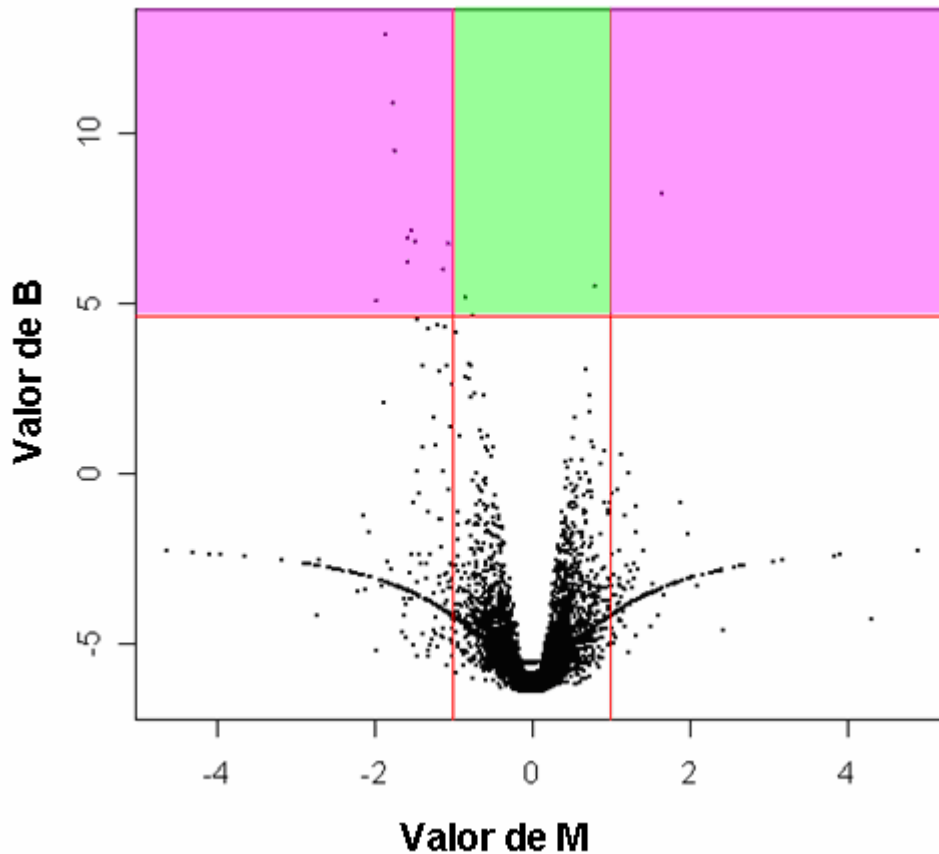


Figura 14: Gráfico do tipo vulcão para os resultados do experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica em fêmeas de *S. mansoni*. No eixo do X estão representados os valores de M ($\log_2 R/G$) e no eixo Y estão representados os valores de B (log odds). As áreas rosas representam os genes que foram considerados diferencialmente expressos. A área verde representa os genes que apresentaram *log odds* maiores do que 4.6 mas não apresentaram diferenças entre os grupos maiores que duas vezes. As outras áreas representam genes que não foram considerados diferencialmente expressos.

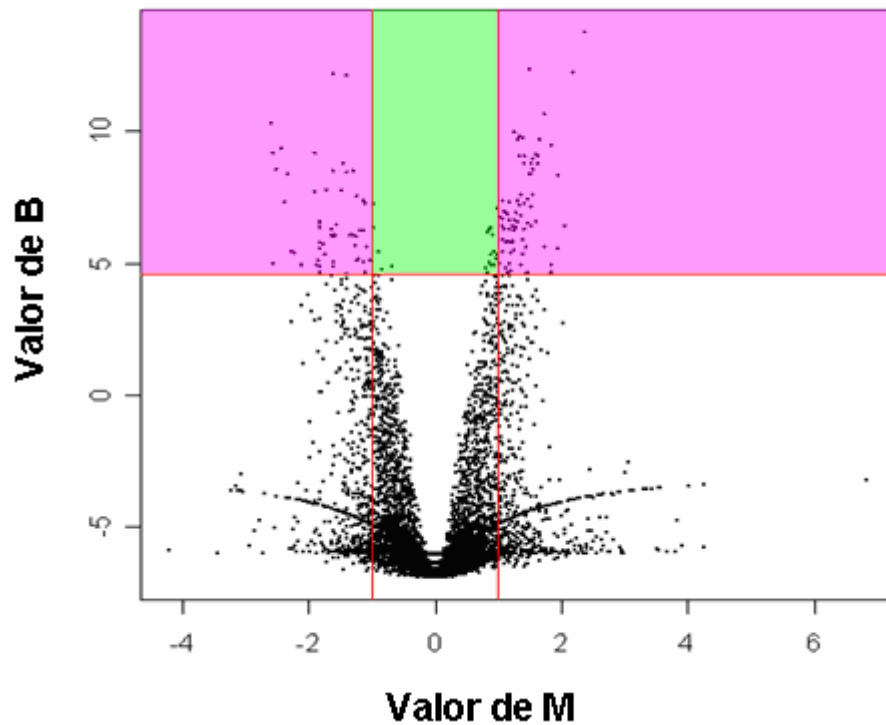


Figura 15: Gráfico do tipo vulcão para os resultados do experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica em machos de *S. mansoni*. No eixo do X estão representados os valores de M ($\log_2 R/G$) e no eixo Y estão representados os valores de B (log odds). As áreas rosas representam os genes que foram considerados diferencialmente expressos. A área verde representa os genes que apresentaram *log odds* maiores do que 4.6 mas não apresentaram diferenças entre os grupos maiores que duas vezes. As outras áreas representam genes que não foram considerados diferencialmente expressos.

4.5. Análise de categorias funcionais

Para podermos entender melhor o significado das listas de genes diferencialmente expressos, as listas geradas à partir da análise de cada um dos experimentos foram analisadas utilizando informações sobre a anotação funcional dos genes presentes nestas. Para isto utilizamos o software Blast2GO que permite visualizar quais são as ontologias gênicas mais comumente presentes em uma determinada lista de genes diferencialmente expressos. Os resultados dos quatro experimentos foram analisados usando as informações sobre ontologias gênicas fornecidas pelo fabricante dos slides e em alguns casos os genes foram re-annotados eletronicamente através do software Blast2GO para tentar tornar a análise mais informativa. Foram gerados vários gráficos resumindo as informações sobre as diferentes categorias de ontologias gênicas (Figuras 16, 17, 18, 19, 20 e 21).

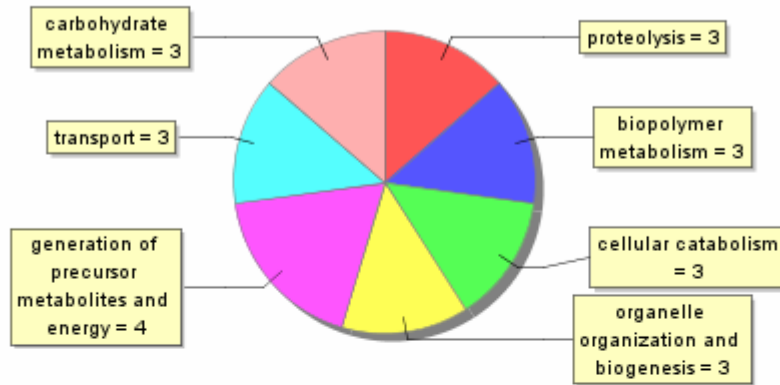
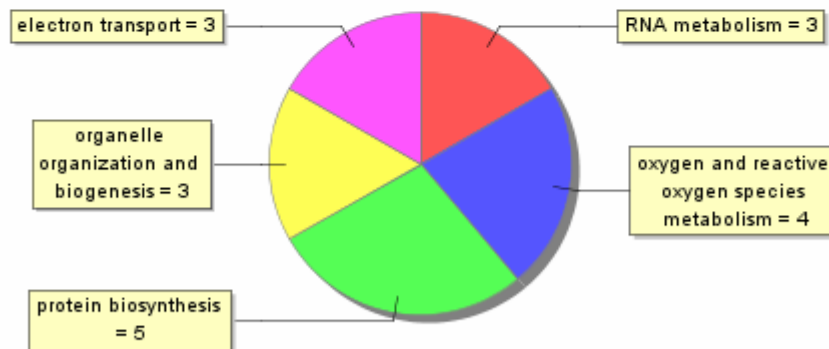
A**B**

Figura 16: Gráficos de pizza mostrando as ontologias gênicas (GOs) do tipo processo biológico que estão presentes em fêmeas imaturas (Figura A) ou em fêmeas maduras (Figura B). Para fins de simplificação, as ontologias gênicas foram colapsadas a partir de um corte no segundo nível do DAG.

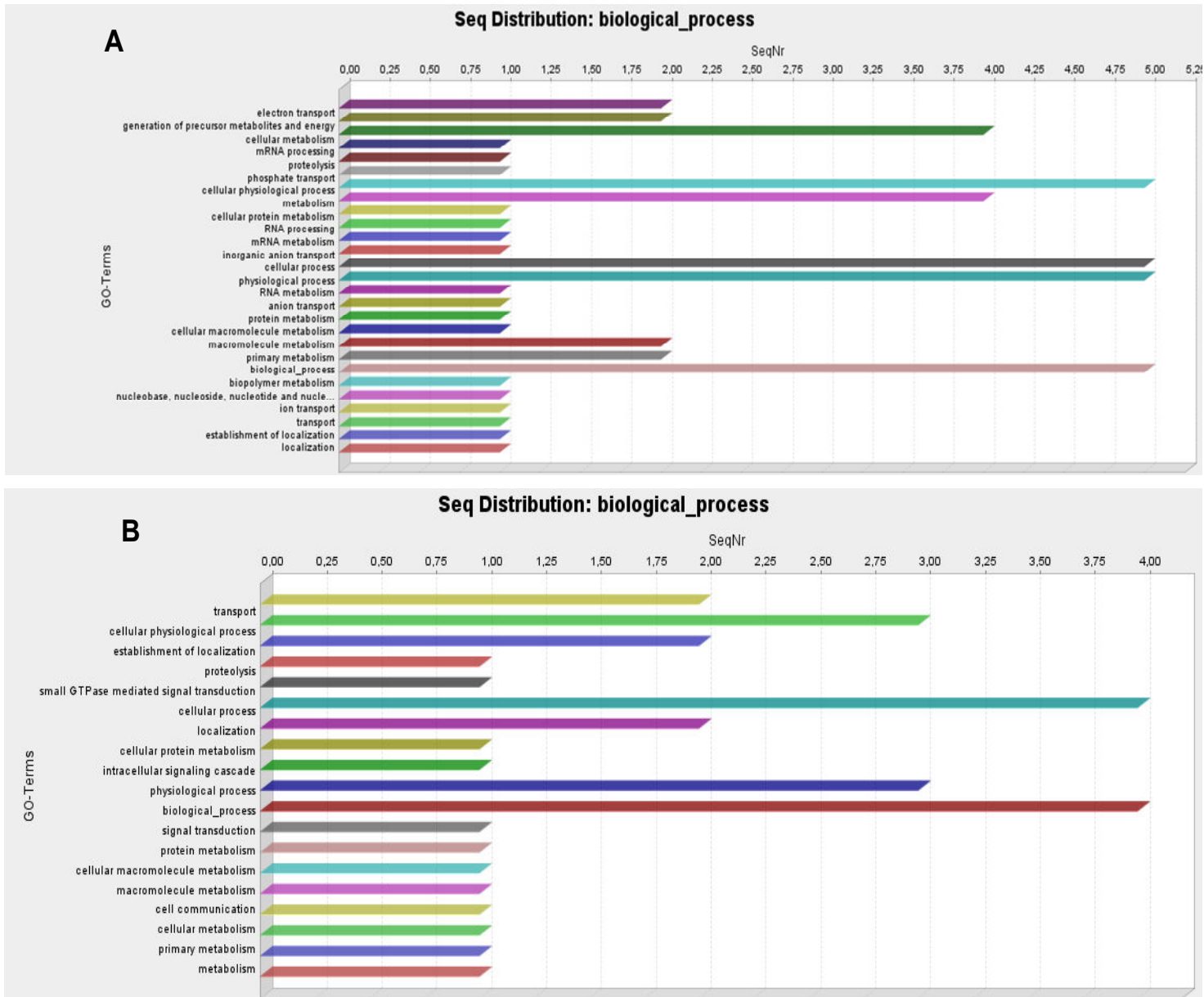


Figura 17: Gráficos mostrando as ontologias gênicas (GOs) do tipo processo biológico presentes em machos pareados (Figura A) ou em machos não-pareados (Figura B). Os gráficos foram gerados para os genes considerados diferencialmente expressos, usando a anotação fornecida por Fitzpatrick e colaboradores.

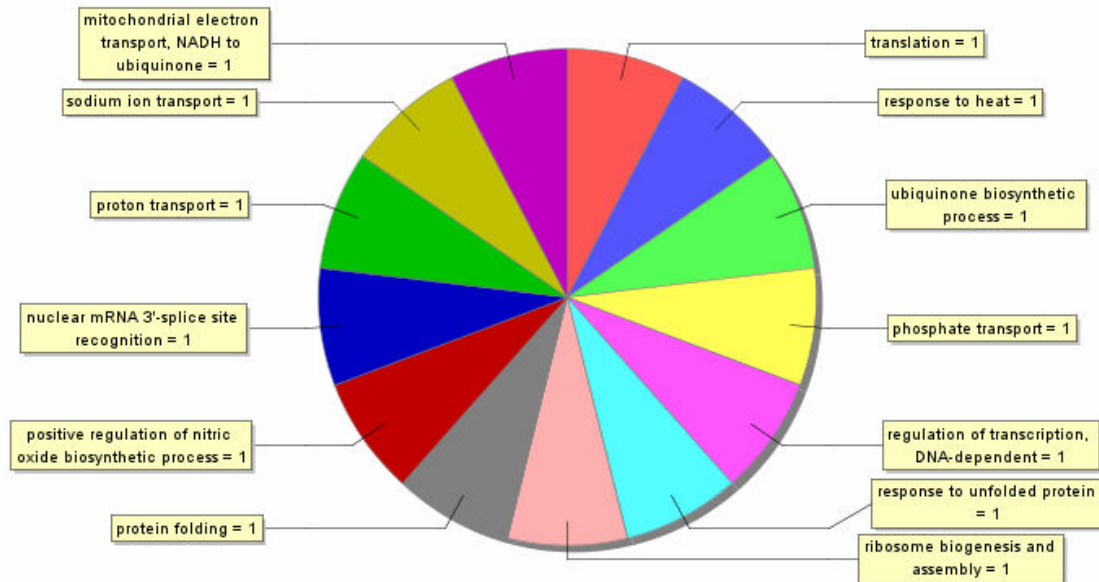
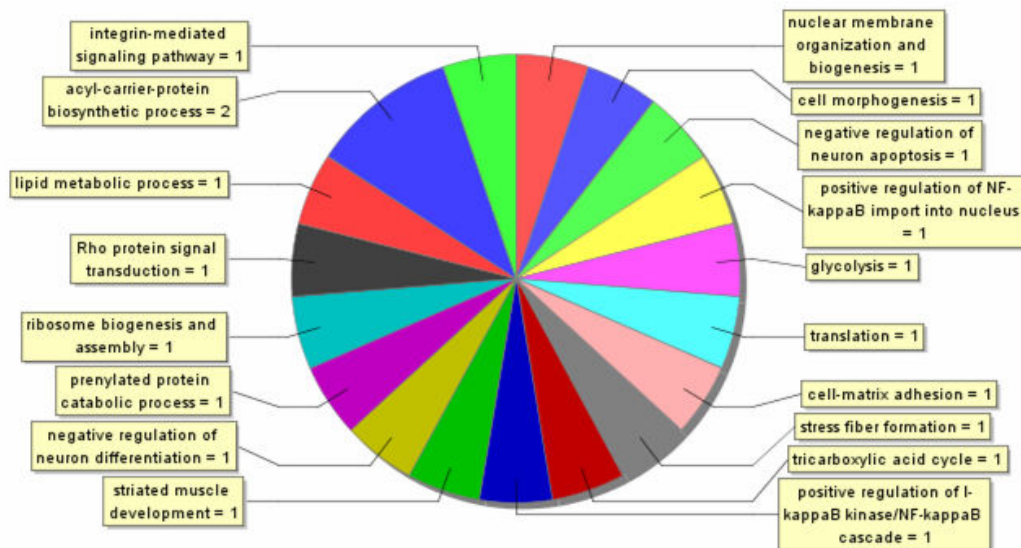
A**B**

Figura 18: Gráficos de pizza mostrando as ontologias gênicas (GOs) do tipo processo biológico e que estão presentes em machos pareados (Figura A) ou em machos não-pareados (Figura B). Os gráficos foram gerados após re-anotação eletrônica dos genes considerados diferencialmente expressos, usando o software blast2GO.

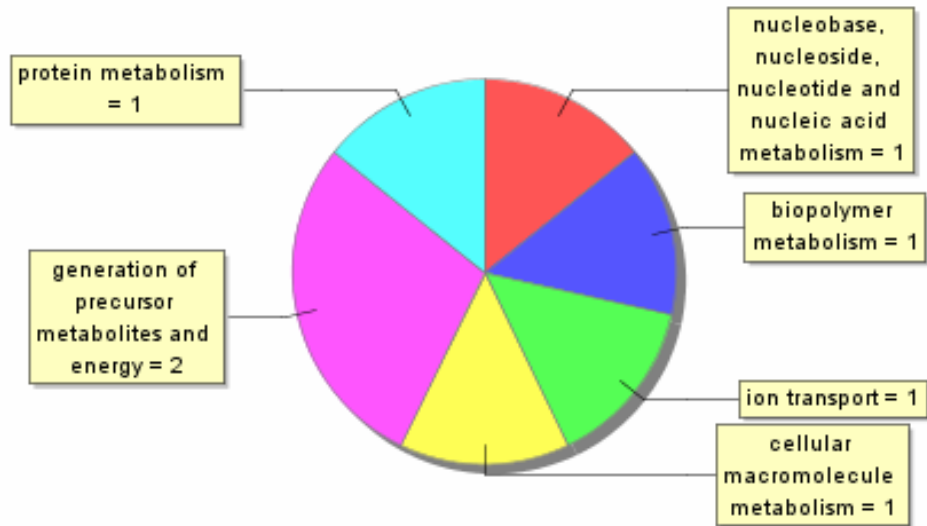
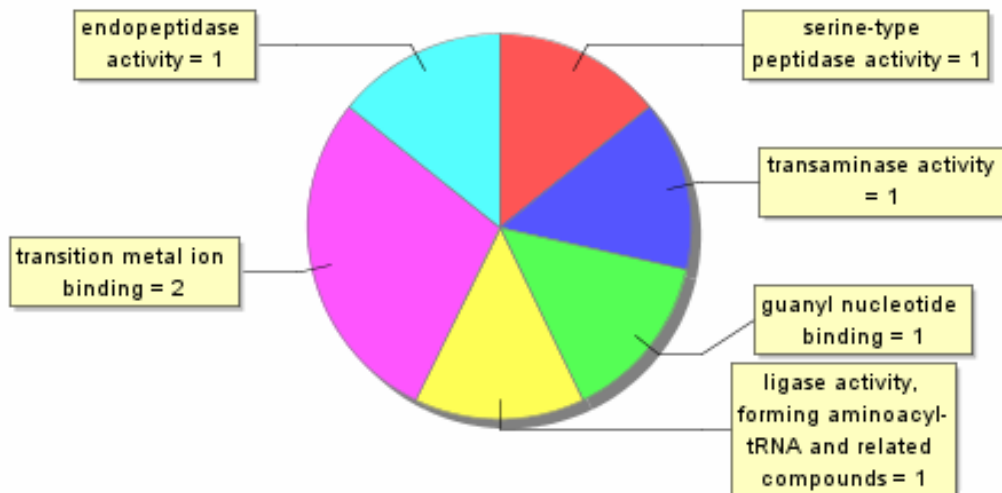
A**B**

Figura 19: Gráficos de pizza mostrando as ontologias gênicas (GOs) que estão presentes em machos pareados, usando a anotação fornecida por Fitzpatrick e colaboradores. A Figura A representa a categoria processos biológicos dos GOs no corte do DAG realizado no quinto nível deste. A Figura B representa as categorias funções moleculares para o mesmo corte no DAG.

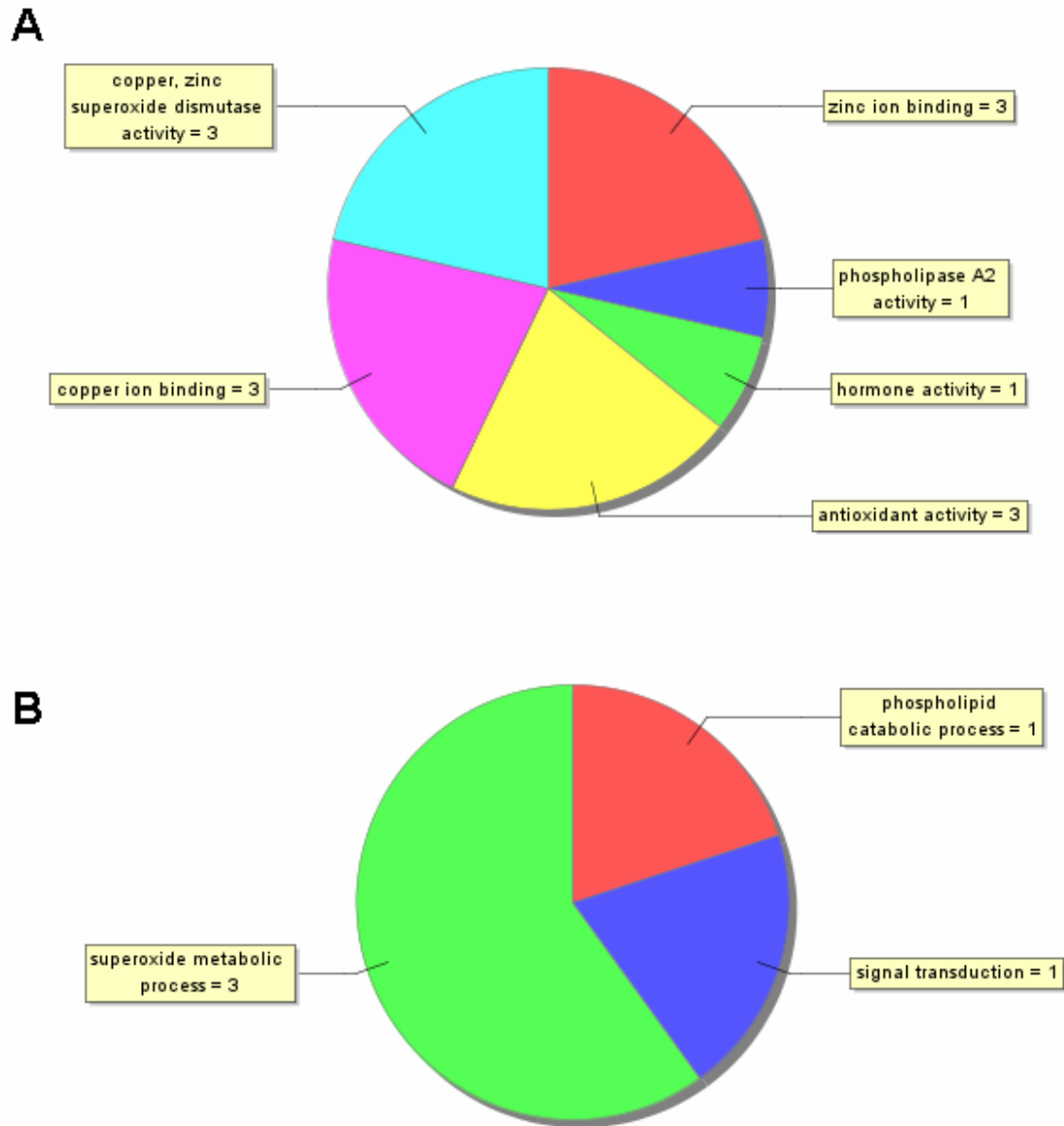


Figura 20: Gráficos de pizza mostrando as ontologias gênicas (GOs) dos genes diferencialmente expressos em fêmeas não-pareadas e induzidos pelo sexo do hospedeiro. Os genes diferencialmente expressos foram re-anotados eletronicamente utilizando o software Blast2GO. Como não foi possível re-anotar o único gene expresso em maior abundância em vermes fêmea provenientes de camundongos fêmea, os gráficos só mostram os GOs do tipo função molecular (A) e processo biológico (B) dos genes mais expressos em vermes fêmea provenientes de camundongos machos.

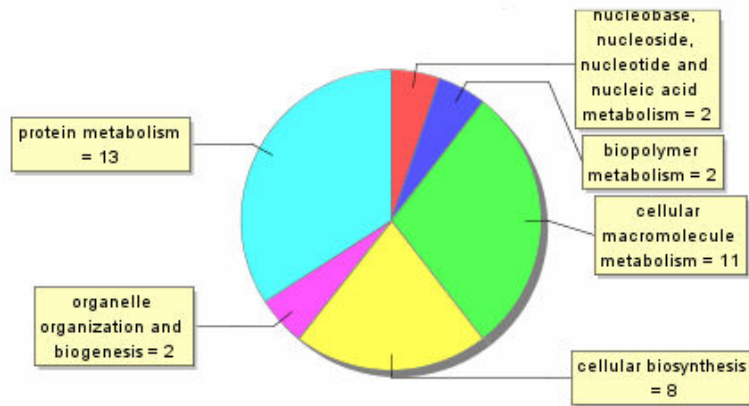
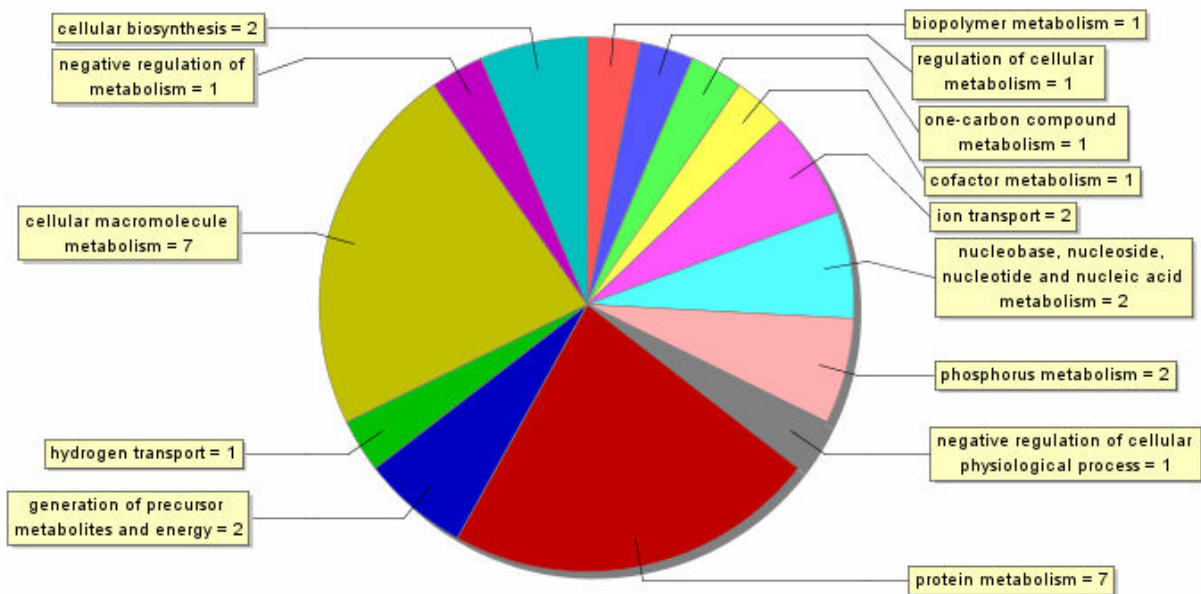
A**B**

Figura 21: Gráficos de pizza mostrando as ontologias gênicas (GOs) que estão presentes nos genes diferencialmente expressos em machos unisexuais provenientes de camundongos machos ou de camundongos fêmeas. A Figura A representa a categoria processos biológicos dos GOs no corte do DAG realizado no quinto nível deste para os genes mais expressos em vermes provenientes de camundongos macho. A Figura B representa as categorias processos biológicos para o mesmo corte no DAG porém para os genes mais expressos em vermes provenientes de camundongos fêmea.

4.6. Confirmação dos dados de microarranjos de DNA por qRT-PCR

Os genes considerados diferencialmente expressos foram então confirmados por qRT-PCR. Para isso, desenhamos pares de iniciadores para a maior quantidade de genes diferencialmente expressos possível. Depois disso, os iniciadores foram testados contra o genoma do parasito usando mePCR para descartar iniciadores que possivelmente se anelariam em locais errados, amplificariam produtos indesejados ou amplificariam múltiplos genes. Após filtrarmos os pares de iniciadores que passaram pela seleção, o número de iniciadores para cada experimento variou em consequência do número de genes diferencialmente expressos variarem de experimento para experimento e devido ao fato de não ser possível desenhar iniciadores para todos os genes.

Com os iniciadores em mãos, confirmamos os resultados dos microarranjos através da técnica do qRT-PCR. Os resultados dos PCRs em tempo real foram então plotados contra os resultados normalizados dos microarranjos de DNA para se calcular a correlação entre os dois métodos (Figuras 22, 23, 24 e 25).

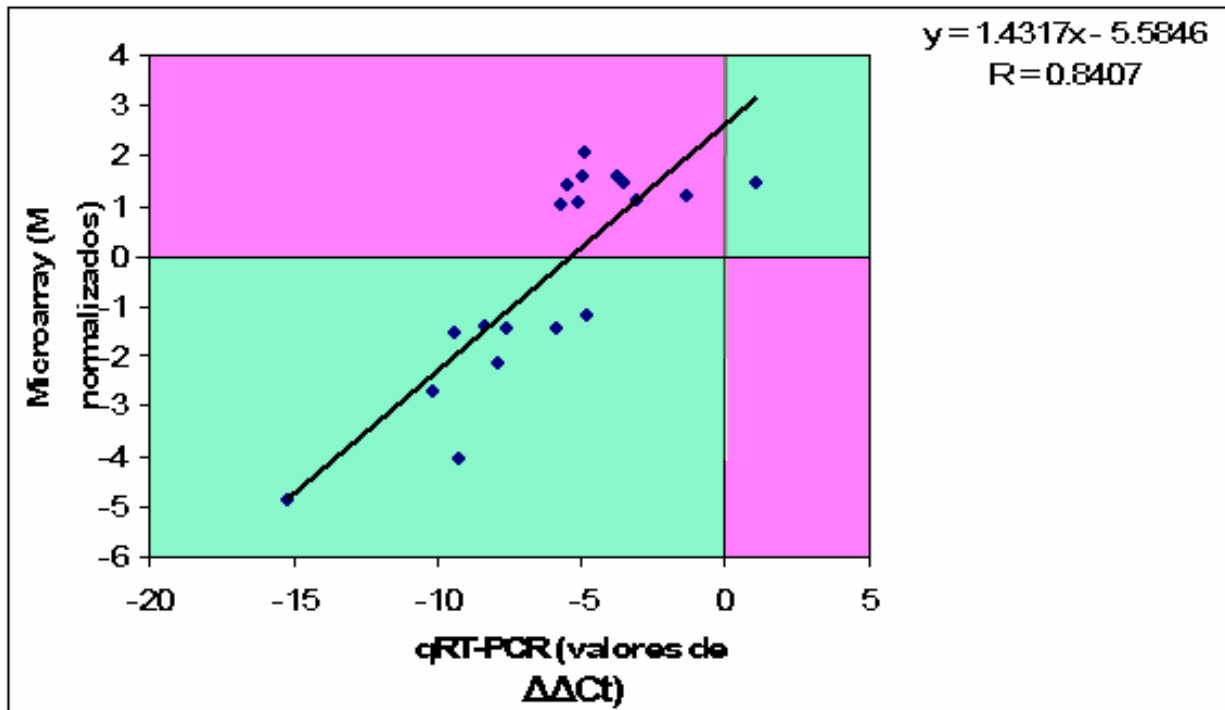


Figura 22: Correlação entre a expressão gênica determinada pela técnica dos microarranjos de DNA versus os resultados determinados por PCR em tempo real para o experimento estudando o efeito do pareamento sexual na expressão gênica em fêmeas de *S. mansoni*. No eixo do X estão representados os valores de $\Delta\Delta Ct$ e no eixo do Y estão representados os valores normalizados de M. Os quadrantes em verde representam os genes que apresentaram correlação positiva entre as duas técnicas utilizadas. Os quadrantes em rosa apresentaram correlação inversa entre os resultados das duas técnicas.

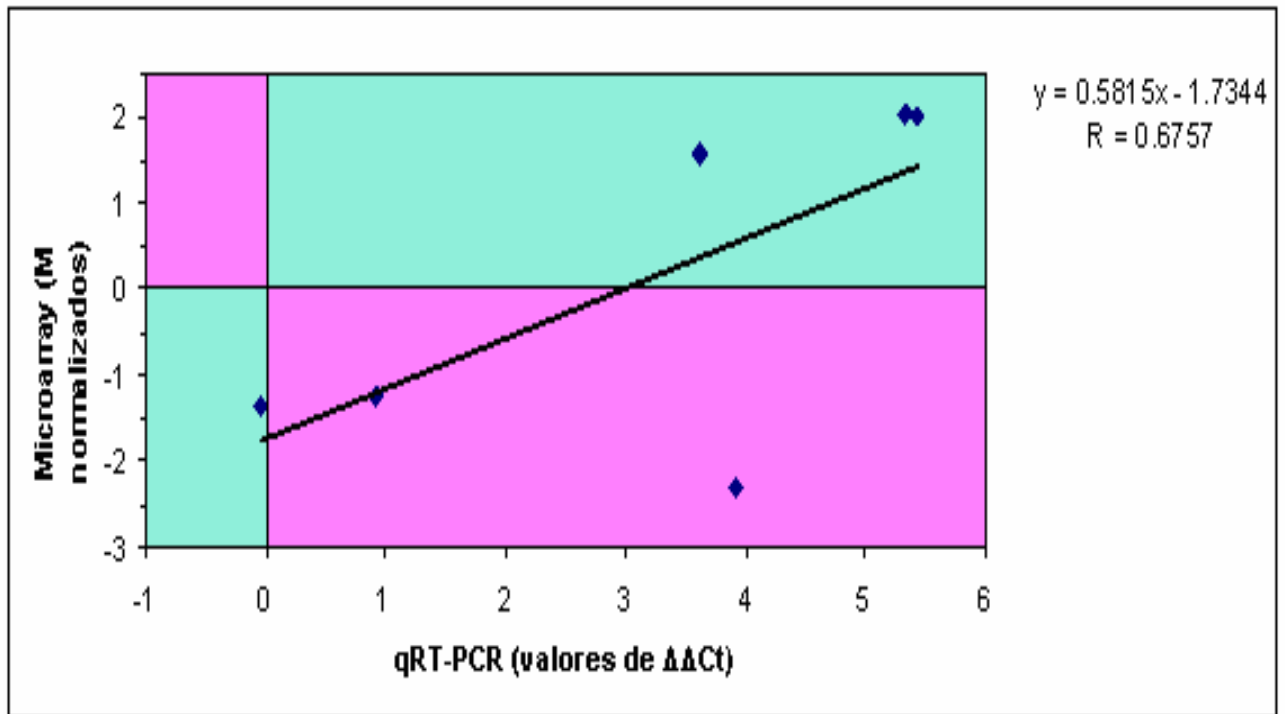


Figura 23: Correlação entre a expressão gênica determinada pela técnica dos microarranjos de DNA versus os resultados determinados por PCR em tempo real para o experimento estudando o efeito do pareamento sexual na expressão gênica em machos de *S. mansoni*. No eixo do X estão representados os valores de $\Delta\Delta Ct$ e no eixo do Y estão representados os valores normalizados de M. Os quadrantes em verde representam os genes que apresentaram correlação positiva entre as duas técnicas utilizadas. Os quadrantes em rosa apresentaram correlação inversa entre os resultados das duas técnicas.

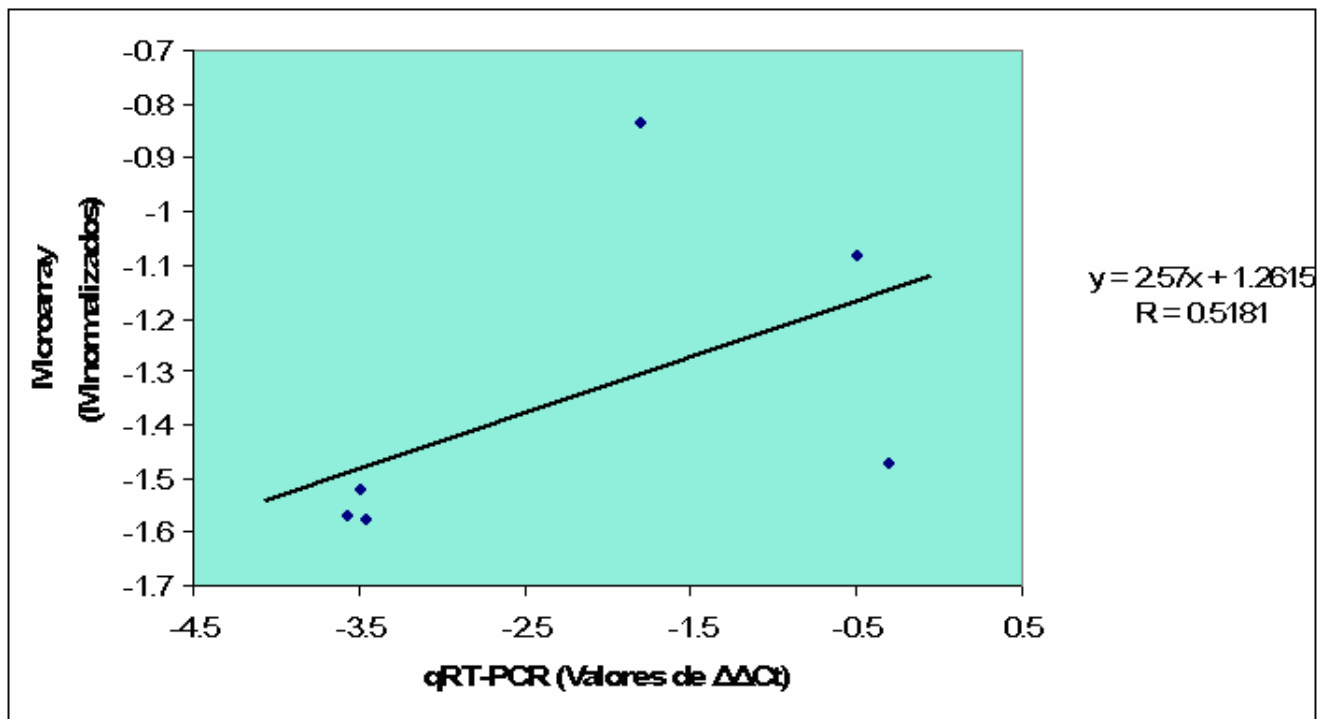


Figura 24: Correlação entre a expressão gênica determinada pela técnica dos microarranjos de DNA versus os resultados determinados por PCR em tempo real para o experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica em fêmeas de *S. mansoni*. No eixo do X estão representados os valores de $\Delta\Delta C_t$ e no eixo do Y estão representados os valores normalizados de M. Os quadrantes em verde representam os genes que apresentaram correlação positiva entre as duas técnicas utilizadas. Os quadrantes em rosa apresentaram correlação inversa entre os resultados das duas técnicas.

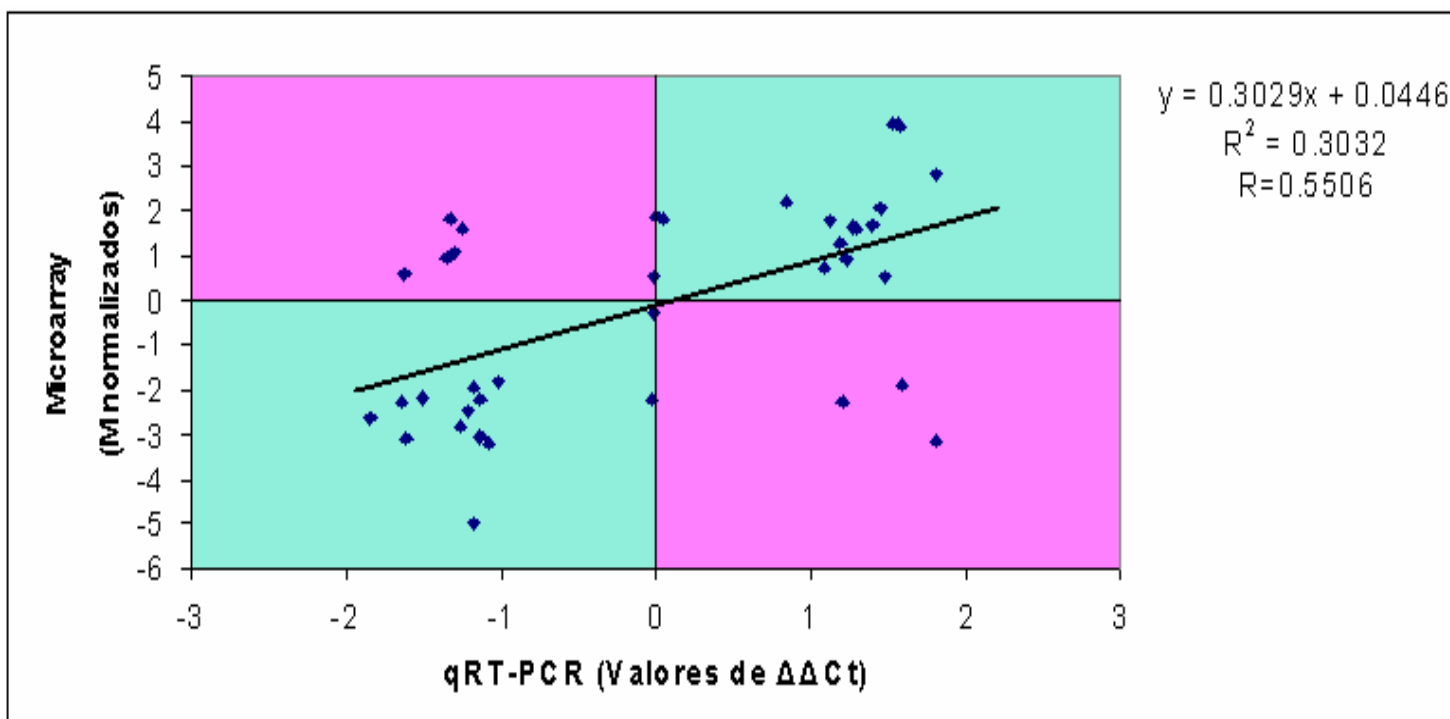


Figura 25: Correlação entre a expressão gênica determinada pela técnica dos microarranjos de DNA versus os resultados determinados por PCR em tempo real para o experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica em machos de *S. mansoni*. No eixo do X estão representados os valores de $\Delta\Delta Ct$ e no eixo do Y estão representados os valores normalizados de M. Os quadrantes em verde representam os genes que apresentaram correlação positiva entre as duas técnicas utilizadas. Os quadrantes em rosa apresentaram correlação inversa entre os resultados das duas técnicas.

5. Discussão

Esquistossomos do sexo feminino são responsáveis pela maior parte da patologia causada por *S. mansoni* uma vez que os ovos são os causadores da doença. Cada fêmea produz em média 300 ovos por dia (aproximadamente um ovo a cada 4.8 minutos), parte dos quais são excretados nas fezes. Os ovos restantes acabam alojando-se no fígado, intestinos e outros órgãos, onde causam reações inflamatórias, resultando em fibrose que pode levar a uma variedade de sintomas dependendo do órgão afetado. Os sintomas usualmente demoram alguns anos para tornarem-se visíveis e podem causar uma variedade de consequências. Por exemplo, ovos alojados na parede intestinal podem causar diarreia sanguinolenta, cólicas, e eventualmente, polipose inflamatória crônica (Behrman 2005). Os ovos que são levados de volta para o sistema porta hepático causam reações granulomatosas no trato portal que podem evoluir para fibrose portal (fibrose de Simmers) e hipertensão portal. É devido às sequelas da hipertensão portal (especialmente os colaterais portosistêmicos) que os ovos vão finalmente alcançar a circulação pulmonar e causar a manifestação mais letal da infecção, i.e. granulomatose pulmonar com subsequente hipertensão pulmonar e *cor pulmonale*.

Por outro lado, os esquistossomos machos são responsáveis pelo engatilhamento e manutenção da maturação sexual da fêmea. Além disso, sem o macho, fêmeas não podem migrar contra o fluxo da circulação portal para a circulação mesentérica, onde os vermes deixam seus ovos (LoVerde *et al.* 2004). Portanto, a sobrevivência dos casais de *S. mansoni* e a manutenção do seu ciclo de vida completo parece ser dependente da existência de uma interação permanente entre os sexos. Estudos feitos por Shaw e Erasmus (1988) sobre a droga praziquantel (droga de escolha para tratamento da

esquistosomose) mostraram evidências de que esta droga perturba o sistema reprodutivo de fêmeas e que doses subcurativas causam regressão duradoura do ovário e glândula vitelina 24 horas após o tratamento (Shaw & Erasmus 1988). Popiel et al. (1984) mostraram que existe um efeito dose-dependente e reversível de oxaminiquina (outra droga utilizada para tratamento de infecção por *S. mansoni*) no sistema reprodutivo da fêmea, mas esse efeito parece ser secundário à separação dos machos das fêmeas causada pela droga (Popiel et al. 1984; Popiel & Erasmus 1984). Na verdade, enquanto oxaminiquina mata preferencialmente machos de *S. mansoni*, praziquantel mata preferencialmente fêmeas do parasito (Delgado et al. 1992). Apesar de os efeitos causados por oxaminiquina serem usualmente reversíveis, estes dados podem sugerir que o sistema reprodutivo da fêmea talvez seja um alvo para agentes terapêuticos contra esses parasitos.

Nossos resultados mostram que 55% dos genes diferencialmente expressos são expressos em maior quantidade em fêmeas maduras (e 45% expressos em maior quantidade nas fêmeas de infecções unisexuais). Os transcritos diferencialmente expressos incluem muitos genes previamente identificados como sendo genes específicos de fêmeas, incluindo o gene de proteína ovo p14 (Contig 1625, SCMESP), outros genes relacionados à proteínas da casca de ovo (Contig 6116, Contig 1557, SMEGGPRO, Contig 867), superóxido dismutase extracelular (Contig 119, SCMSOD2, SEG_SCMOD, SCMSOD3, SCMSODM), tirosinase (Contig 948, Contig 1617), catepsina B (SMA312106), cadeia leve da dineína (SMU55992) e proteína fêmea específica fs800 (SCMFS800) (Reis et al. 1989; Chen et al. 1992; Fitzpatrick et al. 2005). Segundo a literatura, Fs800 só é encontrada em células vitelinas e é expressa em maior quantidade durante a maturação de vermes fêmea, sendo, portanto, provavelmente relacionada a

alguma função reprodutiva ou à manutenção da produção de ovos (Reis *et al.* 1989). Tirosinase é considerada como associada ao processo de esclerotização dos ovos (Hoffmann 2004). Tirosinase, superóxido dismutase extracelular, proteína transportadora de glicose tipo I, proteína similar a diacilglicerol acetiltransferase, aspartato aminotransferase e proteínas de casca de ovo são algumas das proteínas sabidamente diferencialmente expressas entre machos e fêmeas, e que, segundo nossos resultados, também são diferencialmente expressas em fêmeas maduras e imaturas, devendo, portanto, estar relacionadas à determinação sexual, maturação, reprodução ou alguma outra atividade sexo específica. Os dados também concordam com a literatura no que tange à proteína Rho similar a Ras GTPase de baixo peso molecular, uma mediadora de sinal envolvida na cascata de transdução de sinal da MAP cinase que é sabidamente menos expressa em fêmeas imaturas (Schussler *et al.* 1997).

Um grande número de transcritos nunca antes associados à maturação sexual também foram observados. Estes incluem antígenos de membrana, importina beta-1, cadeia pesada da miosina, lecitina-colesterol aciltransferase, apoferritina-2, várias proteínas ribossomais e outras (Tabela 2). Do total de genes identificados como diferencialmente expressos, 142 não possuíam nenhum tipo de anotação, pois não apresentavam similaridade significativa com sequências depositadas no NCBI na época em que as lâminas foram impressas (Fitzpatrick *et al.* 2005). Estes genes representam uma variedade de proteínas ainda inexploradas e que são alvos potenciais para novos agentes terapêuticos. É importante ressaltar que vários transcritos de rRNA também foram observados como sendo diferencialmente expressos (tanto no experimento, estudando maturação sexual de fêmeas, quanto nos outros três experimentos realizados) e

que isto provavelmente se deve à contaminação das amostras de mRNA amplificado com este tipo de transcrito. Apesar de o protocolo de amplificação utilizado amplificar preferencialmente mRNA, pois utiliza iniciadores oligo dT(18) na primeira rodada de amplificação, sabe-se que os rRNAs correspondem a 85% dos RNAs totais da célula e que este é um contaminante muito comum em estudos envolvendo extração e purificação de mRNA deste parasito. Por exemplo, Franco e colaboradores encontraram 3% de contaminação com rRNA em bibliotecas de ESTs construídas à partir de mRNA purificados em colunas de oligo(dT) (Franco *et al.* 1997).

Dos genes que possuíam GO associados, os que foram mais expressos em fêmeas (Figura 16) unisexuais estavam em geral relacionados ao metabolismo de carboidratos, proteólise, geração de metabólitos precursores e de energia, catabolismo celular e organização/biogênese de organelas, enquanto os genes que foram expressos em maior quantidade em fêmeas maduras relacionavam-se principalmente ao metabolismo de RNA, metabolismo de espécies reativas de oxigênio, transporte de elétrons, organização/biogênese de organelas e biosíntese de proteínas.

A quantidade aumentada de transcritos codificando antioxidantes na fêmea madura está de acordo com sua suposta necessidade aumentada de detoxificar subprodutos de hemoglobina associados com o consumo aumentado de hemácias (Lawrence 1973). Por outro lado, poderíamos esperar que fêmeas de infecções mistas expressassem mais genes associados ao metabolismo de carboidratos e proteínas do que fêmeas de infecções unisexuais. O fato de termos encontrado mais destes genes em fêmeas unisexuais pode servir como suporte à teoria do suporte nutricional postulada por Basch (Basch 1990). Se de fato os machos ajudam as fêmeas a se alimentar, isto poderia

permitir que fêmeas maduras direcionassem seu metabolismo para processos mais importantes tais como a produção de ovos e, portanto, genes relacionados à geração de energia realmente deveriam ser expressos em menor quantidade em fêmeas maduras e pareadas. Por outro lado, isto pode ser apenas um artefato proveniente do fato de poucos genes terem anotações (GOs) associadas. Pode-se especular que essas diferenças talvez desapareçam no dia em que todos os genes de *S. mansoni* tenham sido anotados, e somente então poderemos fazer uma análise estatística mais apurada dos resultados aqui apresentados. Entre os genes aparentemente expressos em maior quantidade em fêmeas de infecções bissexuais, existem seis genes associados a proteínas de casca de ovo. Isto era esperado uma vez que fêmeas pareadas são praticamente máquinas de produção de ovos capazes de converter o equivalente ao seu próprio peso seco em ovos todos os dias (Hoffmann 2004) e que consomem aproximadamente 8 milhões de eritrócitos por dia. Dado à alta atividade metabólica das fêmeas maduras, Hoffman propôs que genes fêmea-específicos associados com a maquinaria metabólica de produção de ovos e catabolismo de hemoglobina deveriam ser altamente representados em estudos de biologia molecular estudando sexo (Hoffmann 2004) e os nossos dados concordam com isto. O fato de que genes associados com organização de organelas estarem presentes tanto em fêmeas maduras quanto em imaturas é um pouco mais difícil de explicar. Os transcritos deste tipo mais expressos em fêmeas maduras podem ser parcialmente justificados pelas diferenças na produção de células vitelinas. Já foi demonstrado que fêmeas pareadas produzem milhares de células vitelinas por dia (Erasmus & Davies 1979). Esta atividade mitótica exacerbada pode demandar uma grande necessidade de síntese proteica e a participação de uma grande quantidade de proteínas relacionadas à biogênese e organização de

organelas. O fato de que alguns genes associados à biogênese de organelas também estarem expressos em maior quantidade em fêmeas imaturas é intrigante e difícil de explicar com base nos nossos dados.

Em relação aos genes diferencialmente expressos entre machos maduros e imaturos, nossos resultados demonstram que 56.6% dos genes diferencialmente expressos estão expressos em maior quantidade em machos maduros enquanto que os 43.4% restantes estão mais expressos em machos imaturos. Infelizmente a literatura é muito pobre no que tange genes diferencialmente expressos entre machos maduros e imaturos, o que torna difícil obter-se alguma confirmação – na literatura – para os resultados obtidos. Nossos dados demonstram que vermes machos “maduros” expressam mais genes relacionados com metabolismo de proteínas, nucleotídeos, macromoléculas, transporte de ions e geração de metabólitos e energia do que vermes não pareados, sugerindo que os vermes pareados sejam mais metabolicamente ativos (Figura 17).

Interessantemente, os dados de Khalil e Mansour mostram que vermes machos provenientes de infecções unisexuais são de fato menores do que os vermes provenientes de infecções mistas (Khalil & Mansour 1995). Apesar destes autores não explicarem o fenômeno observado, com base em nossos resultados talvez seja possível especular que esta diferença de tamanho se deva à maior expressão de genes envolvidos no acúmulo e geração de energia. O fato de vermes machos pareados absorverem e fosforilarem glicose mais rapidamente do que vermes separados também reforça esta hipótese (Cornford & Fitzpatrick 1987). Paradoxicalmente, observamos uma maior expressão de Catepsina B Sm31 em vermes machos não-pareados. Gotz e Klinkert demonstraram que esta proteína

é na verdade uma enzima envolvida na degradação de hemoglobina no trato digestivo de esquistossomos (Gotz & Klinkert 1993).

Outra observação interessante é que vermes não-pareados transcrevem mais lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT), proteína ligadora de acyl-CoA (ACPB) e proteína ligadora de ácidos graxos (FABP). A LCAT é responsável pela formação de colesterol ésteres a partir de lecitina e colesterol e é a LCAT na superfície de partículas de HDL nascentes que converte o colesterol e fosfatidilcolina do quilomicron e VLDL em colesterol ésteres (Lehninger *et al.* 1993). O acúmulo de ésteres colesterol em HDL nascentes converte-os em HDL maduros e direciona-os de volta ao fígado, onde o colesterol usualmente é descarregado. As proteínas ligadoras de acyl-CoA são pequenas proteínas que ligam ésteres de acyl-CoA de cadeia longa e média com alta afinidade e que podem agir como carreadores intracelulares de ésteres de acyl-CoA. As FABP, por sua vez, são uma família de proteínas citosólicas ligadoras de lipídeos e que vêm sendo estudadas como possíveis componentes para vacinas (Kennedy *et al.* 2000). Além disso, Gobert e colaboradores demonstraram que a FABP de *S. japonicum* tem localização confinada às gotículas de lipídeos em vermes macho e que estão supostamente envolvidas na nutrição das fêmeas (Gobert *et al.* 1997).

Em estudos com humanos e com saguis (*Callithrix jacchus*) os níveis plásmaticos de colesterol total, colesterol esterificado, triglicerídeo e fosfolipídios foram significativamente reduzidos após a infecção por *S. mansoni* (Chechinell & Owen 1978; Ramos *et al.* 2004). Efeito similar foi observado por Doenhoff e colaboradores que relataram redução da aterosclerose em ratos predispostos ao desenvolvimento de doença cardiovascular (apoE^{-/-}) infectados com *S. mansoni* (Doenhoff *et al.* 2002). Estes autores

sugeriram que esta redução poderia ser devida a um efeito modulador da infecção por *S. mansoni* sobre o metabolismo de lipídeos. Ramos e colaboradores por sua vez propuseram que a redução do colesterol poderia ser devido a alterações na atividade, síntese ou secreção de LCAT e/ou da ACAT (acil-CoA-colesterol acil transferase) produzidas pelo fígado de animais infectados (Ramos *et al.* 2004). Levando em consideração que esquistossomos não são capazes de sintetizar colesterol (Meyer *et al.* 1970; Brouwers *et al.* 1997) o fato de que o pareamento sexual afeta a expressão de tantos genes envolvidos no metabolismo de colesterol e ácidos graxos torna-se ainda mais relevante. Encontramos também a presença de um transcrito específico de fêmea na lista de genes diferencialmente expressos entre machos pareados e não-pareados que, após busca utilizando BLAST, se mostrou ser o gene codificante da proteína P40 (uma proteína de ovo de *S. mansoni*). Este gene foi descrito por vários grupos e sua sequência depositada independentemente e com nomes diferentes várias vezes no banco de sequências do NCBI (Kunz *et al.* 1987; Bobek *et al.* 1988; Rodrigues *et al.* 1989). Como este gene também foi impresso várias vezes na lâmina, usando oligonucleotídeos diferentes (cada oligo impresso em duplicata), e usando identificadores diferentes (ex. SCMFSPA, SCMFSP e Contig1625) esperaria-se que, caso o gene em questão fosse realmente diferencialmente expresso, que os outros *contigs* impressos também apareceriam na lista de genes diferencialmente expressos. O fato disto não ter ocorrido nos leva a crer que tenha havido algum tipo de contaminação ou problema com a síntese de apenas um dos oligos relativos ao gene em questão, e que esta seja a causa do aparecimento deste gene na lista de genes diferencialmente expressos do experimento estudando a maturação sexual de machos de *S. mansoni*. Caso a contaminação tivesse

ocorrido nas amostras de RNA utilizadas para a hibridização, os outros oligos referentes ao gene P40 também constariam da lista de genes diferencialmente expressos.

Por fim, no que tange aos experimentos estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica de esquistossomos não-pareados, pudemos observar que os vermes machos são muito mais afetados por este fator do que as fêmeas, uma vez que encontramos apenas 11 genes diferencialmente expressos em fêmeas, enquanto encontramos 134 em machos. Interessantemente, vermes criados em hospedeiros de sexo oposto ao seu tiveram mais genes diferencialmente expressos do que os criados em hospedeiros do mesmo sexo. No caso das fêmeas, dos 11 genes diferencialmente expressos, 10 foram mais expressos em fêmeas criadas em camundongos machos, enquanto só um gene foi mais expresso em fêmeas criadas em camundongos fêmea. No caso dos vermes machos, dos 134 genes considerados como diferencialmente expressos, 79 (59%) foram mais expressos em vermes de infecções em camundongos fêmea enquanto 55 (41%) foram mais expressos em vermes provenientes de infecções de camundongos machos. Este tipo de diferença sugere que, de fato, exista algum tipo de comunicação entre vermes e hospedeiros e que, aparentemente, a comunicação é maior entre vermes e hospedeiros de sexos opostos.

Devido ao pequeno número de genes diferencialmente expressos em fêmeas imaturas cultivadas em hospedeiros de ambos os sexos, a análise funcional dos genes diferencialmente expressos tornou-se menos informativa. Ainda assim, fazendo uso de gráficos combinados e gráficos tipo pizza gerados pelo programa Blast2GO (Conesa *et al.* 2005), foi possível determinar que a maior parte dos genes diferencialmente expressos em fêmeas são mais expressos naquelas infectando camundongos machos e estão

relacionados à remoção de radicais livres (superóxido dismutase), transdução de sinal e resposta ao estresse (HSP70) (Figura 20). Isto pode ser devido ao fato da testosterona do hospedeiro exercer um efeito negativo no desenvolvimento de esquistossomos (Nakazawa *et al.* 1997), causando diminuição da intensidade de infecções experimentais em hamsters (Barrabes *et al.* 1979). Por outro lado, a expressão gênica em vermes machos sofreu grande influência do sexo do hospedeiro. Apesar de as diferenças no tamanho de vermes machos da espécie *S. hematobium* causadas pelo sexo do hospedeiro (vermes não-pareados de hamsters macho são maiores do que vermes não-pareados provenientes de hamster fêmea) terem sido descritos na literatura (Purnell 1966), nenhum efeito do sexo do hospedeiro no tamanho de *S. mansoni* macho foi descrito anteriormente. Por outro lado, sabe-se que vermes machos induzem respostas inflamatórias mais acentuadas do que vermes fêmeas e que camundongos fêmea produzem resposta inflamatória mais acentuada do que camundongos macho (Boissier *et al.* 2003). Esta combinação de maior indução da resposta inflamatória dos vermes machos com a maior responsividade do sistema imune das fêmeas talvez explicasse o grande número de genes diferencialmente expressos no último experimento (i.e. efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica em vermes machos). Por outro lado, ao analisarmos as categorias funcionais dos genes mais expressos em machos de infecções unisexuais provenientes de camundongos fêmeas, não é possível encontrar evidências que sugiram que estes machos estejam expressando mais genes relacionados a estresse e que estes estejam ativando mecanismos de defesa (Figura 21). Pelo contrário, nossos resultados (Tabela 5) mostram que na verdade são os vermes machos provenientes de camundongos machos que expressam mais proteínas relacionadas a estresse celular, como, por exemplo, proteínas

de choque térmico (Contig 4714, SMHSF3, SCMHSF86 e Contig647). Aparentemente os machos provenientes de camundongos fêmeas estão mais metabolicamente ativos, sintetizando mais proteínas, produzindo mais metabólitos, gerando mais energia e sintetizando mais ácidos nucleicos (Figura 21). O fato de os vermes machos provenientes de infecções em camundongos fêmeas produzirem mais catepsinas (SMA506157, SMA506158 e SMCATHC) e transportador de glicose tipo 2A (SCMGTP2A) do que os vermes provenientes de infecções em camundongos machos, corrobora a hipótese de que estes estejam ingerindo mais hemácias e, portanto, estejam mais ativos. Escobedo e colaboradores sugerem que através de mecanismos genômicos e não-genômicos, os hospedeiros regulam processos importantes dos parasitos tais quais crescimento, diferenciação e reprodução, através de um mecanismo chamado de transregulação. Este mecanismo pode permitir que os parasitos consigam produzir uma infecção mais bem sucedida, ou em alguns casos beneficiar o hospedeiro através da redução do sucesso da infecção (Escobedo *et al.* 2005).

Vários parasitos utilizam-se de moléculas do hospedeiro como fatores de crescimento indiretos para si próprios (Damian 1997). Os hormônios do hospedeiro podem alterar a resposta à infecção, assim como os parasitos podem produzir e alterar as concentrações de hormônios nos seus hospedeiros (Klein 2004). Por exemplo, hormônios esteróides adrenais foram implicados como alguns dos mais importantes fatores do hospedeiro regulando a patogênese da esquistossomose. Cortisol and DHEA (dehidroepiandrosterona) inibem a ovoposição de *S. mansoni in vitro* e *in vivo* (Morales-Montor *et al.* 2001). No caso dos hormônios gonadais, Remoue e colaboradores mostraram que testosterona diminui a fertilidade de *S. haematobium* e que estes parasitos

sintetizam uma proteína capaz de ligar testosterona e facilitar seu transporte, metabolismo e ação fisiológica no parasito (Remoue *et al.* 2002). Outros autores demonstraram que *S. mansoni* possui receptores para 17- β -estradiol, hormônios da tireóide e ecdisteróides, provendo um mecanismo potencial para os efeitos protetores deste hormônio em camundongos infectados (Barrabes *et al.* 1986; de Mendonca *et al.* 2000). Escobedo e colaboradores sugeriram que a habilidade de um parasito de afetar machos ou fêmeas da mesma espécie diferencialmente pode ser mediada pela regulação hormonal da resposta imune do hospedeiro, ou por efeitos hormonais diretamente no parasito e que a compreensão destes efeitos e das moléculas envolvidas pode facilitar a descoberta de novas drogas que contrabalanceiem os efeitos dos hormônios nos parasitos (Escobedo *et al.* 2005). Os resultados aqui apresentados, ainda que limitados pela falta de mais informações confiáveis sobre a anotação dos genes diferencialmente expressos, é muito intrigante e sugere que a comunicação entre vermes e hospedeiros parece ser muito mais complexa do que se imaginava anteriormente, principalmente no que tange a interação de vermes machos e seus hospedeiros. A elucidação dos mecanismos e das consequências deste fenômeno merecem maior atenção no futuro e potencialmente podem ajudar na melhor compreensão das complexas relações entre parasitos e hospedeiros e suas consequências.

Em relação a qualidade dos dados de microarranjos de DNA, em média obtivemos uma correlação entre técnicas de microarranjos e qRT-PCR que condiz com a correlação descrita pela literatura (ou inferior a esta) que descreve um r^2 para a correlação entre microarranjos e qRT-PCR entre 0.71-0.75 (Dallas *et al.* 2005; Wang *et al.* 2006). Apesar disto, alguns dos genes considerados como sendo diferencialmente expressos nos

experimentos com microarrajos de DNA não se correlacionaram bem com os resultados do qRT-PCR. Este tipo de correlação ruim (ou às vezes inversa) é descrita na literatura, em alguns casos ocorrendo em 13-16% dos genes (Dallas *et al.* 2005) e pode ser devida a uma série de razões, dentre elas: diferenças intrínsecas entre os dois métodos utilizados (hibridação x amplificação), baixa confiabilidade dos contigs montados (que foram construídos a partir de dados de sequenciamento de ESTs) e hibridação cruzada (*crosshybridization*).

6. Conclusões

A pesquisa apresentada nesta tese estuda os efeitos do pareamento sexual e do sexo do hospedeiro na expressão gênica em *S. mansoni*. Várias contribuições em direção à melhor compreensão deste fenômeno foram feitas.

- Encontramos 265 transcritos associados à maturação sexual de fêmeas. Destes, 142 são proteínas sem homologia com outras proteínas ou homólogas à proteínas desconhecidas e que requerem mais investigação. A análise das listas de genes diferencialmente expressos pode sugerir que a teoria do suporte nutricional de Basch seria verdadeira.

- Nossos dados confirmam resultados prévios relacionados à expressão aumentada de genes de casca de ovo, proteínas vitelinas e alguns outros transcritos sabidamente expressos diferencialmente em fêmeas maduras.

- Machos adultos apresentaram 53 transcritos, diferencialmente expressos, associados ao pareamento sexual. Análise dos GOs destes transcritos sugere que os machos pareados talvez estejam mais metabolicamente ativos que os machos não-pareados.

- Vários transcritos foram relacionados à maturação de machos, um processo ainda pouco compreendido.

- Sexo do hospedeiro mostrou-se ser um fator capaz de produzir expressão gênica diferencial tanto em machos quanto em fêmeas unisexuais de *S. mansoni*.

- Hospedeiros de sexo contrário ao do verme parecem exercer mais influência na expressão gênica destes últimos.

Uma vez que a maior parte dos genes diferencialmente expressos não têm similaridade com outros genes anotados, novas pesquisas serão necessárias para tentar caracterizar e atribuir funções biológicas a estes. No momento em que o genoma do *S. mansoni* tornar-se disponível e anotado, será possível extrair muito mais informações interessantes destes dados. Ainda assim, acreditamos que a miríade de genes diferencialmente expressos encontrados abre novas portas para o estudo do desenvolvimento e descoberta de novas drogas contra *S. mansoni*.

ANEXO I – Artigo aceito por BMC Genomics

Title

Microarray analysis of gene expression induced by sexual contact in *Schistosoma mansoni*

Authors

^{1,2}Michael Waisberg*; ¹Francisco P Lobo; ^{2,3}Gustavo C Cerqueira; ⁴Liana KJ Passos; ⁴Omar S Carvalho; ¹Glória R Franco*; ^{5,2}Najib M El-Sayed*.

Affiliation

1- Laboratório de Genética Bioquímica, Departamento de Imunologia e Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil; 2 - Department of Parasite Genomics, The Institute for Genomic Research, Rockville, MD, USA; 3 – Laboratório de Genética Molecular de Tripanosomatídeos, Departamento de Imunologia e Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil; 4 – Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Osvaldo Cruz, Belo Horizonte, MG, Brazil; 5 - Department of Cell Biology and Molecular Genetics and Center for Bioinformatics and Computational Biology, University of Maryland, College Park, MD, USA.

Correspondence address

*Michael Waisberg – waisberg@gmail.com

Francisco P Lobo - franciscolobo@gmail.com

*Gloria R Franco – gfranco@icb.ufmg.br

*Najib M. El-Sayed – elsayed@umd.edu

Gustavo Cutinho Cerqueira – cerca@ufmg.br

Omar S Carvalho - omar@cpqrr.fiocruz.br

Liana KJ Passos - passoslk@cpqrr.fiocruz.br

Abstract

Background: The parasitic trematode *Schistosoma mansoni* is one of the major causative agents of Schistosomiasis, a disease that affects approximately 200 million people, mostly in developing countries. Since much of the pathology is associated with eggs laid by the female worm, understanding the mechanisms involved in oogenesis and sexual maturation is an important step towards the discovery of new targets for effective drug therapy. It is known that the adult female worm only develops fully in the presence of a male worm and that the rates of oviposition and maturation of eggs are significantly increased by mating. In order to study gene transcripts associated with sexual maturation and oviposition, we compared the gene expression profiles of sexually mature and immature parasites using DNA microarrays. Results: For each experiment, three amplified RNA microarray hybridizations and their dye swaps were analyzed. Our results show that 265 transcripts are differentially expressed in adult females and 53 in adult males when mature and immature worms are compared. Of the genes differentially expressed, 55% are expressed at higher levels in paired females while the remaining 45% are more expressed in unpaired ones and 56.6% are expressed at higher levels in paired male worms while the remaining 43.4% are more expressed in immature parasites. Real-time RT-PCR analysis validated the microarray results. Several new maturation associated transcripts were identified. Genes that were up-regulated in single-sex females were mostly related to energy generation (i.e. carbohydrate and protein metabolism, generation of precursor metabolites and energy, cellular catabolism, and organelle organization and biogenesis) while genes that were down-regulated related to RNA metabolism, reactive oxygen species metabolism, electron transport, organelle

organization and biogenesis and protein biosynthesis. Conclusions: Our results confirm previous observations related to gene expression induced by sexual maturation in female schistosome worms. They also increase the list of *S. mansoni* maturation associated transcripts considerably, therefore opening new and exciting avenues for the study of the conjugal biology and development of new drugs against schistosomes.

Background

Schistosomiasis is an important public health problem that affects approximately 200 million people, mostly in developing countries, and that poses a risk to another 600 million (TDR 2002). Mortality attributed to schistosomiasis is estimated to be around 11,000 deaths/year with an added economic burden of 1.7 million disability adjusted life-years lost per year (World Health Organization. 2001). The disease is transmitted when parasite eggs in human feces reach fresh water and hatch into miracidia. Upon infection of an appropriate snail species, miracidia transform into sporocysts that asexually reproduce generating hundreds of thousands of cercaria. The cercaria are shed by the snail and swim until they find an appropriate vertebrate host and penetrate through its skin. The worms then undergo differentiation and migrate in the bloodstream until they reach the mesenteric veins where male and female worms pair.

Eggs from paired mature schistosomes are responsible for most of the pathology caused by *S. mansoni*. Each mature female lays on average 300 eggs per day, some of which are excreted in the feces (Loverde & Chen 1991). The remaining eggs end up in the liver, intestine and other organs where they cause an inflammatory reaction, producing significant scarring which leads to a variety of symptoms depending on the

organ where they lodge. For instance, eggs trapped in the bowel wall may cause bloody diarrhea, cramping, and eventually inflammatory colonic polyposis (Behrman 2005). Eggs that are swept back to the hepatic portal system cause granulomatous reaction in the portal tract which can evolve to hepatoportal fibrosis and portal hypertension. More interestingly, although immature worms may lay eggs which are occasionally shaped normally, those eggs are unable to induce the formation of granulomas (Shaw 1987).

Male schistosomes are responsible for triggering and maintaining female maturation. In absence of the male, female worms cannot migrate against the blood flow from the portal sites in the liver to the smaller mesenteric circulation where they lay their eggs (LoVerde *et al.* 2004). Therefore, the survival of *S. mansoni* couples and the maintenance of their complete life-cycle seem to be dependent on the existence of a permanent association between sexes. Studies by Shaw and Erasmus on praziquantel (the drug of choice for treating Schistosomiasis) have shown some evidence that the drug disrupts the reproductive system of females and that subcurative doses cause a long-lasting regression of both ovary and vitelline gland 24 hours post-treatment (Shaw & Erasmus 1988). Popiel *et al.* (1984) have shown that there is a dose-dependent and reversible effect of oxamniquine (another drug which is used for treating *S. mansoni* infections) on the female reproductive system (Popiel *et al.* 1984; Popiel & Erasmus 1984). Although these effects on the reproductive system are usually reversible, these data might suggest that the reproductive system of female schistosomes could provide good targets for therapeutic agents against these parasites.

In contrast to male schistosomes that undergo normal morphological development regardless of their pairing status, females from single sex infection (single-sex females)

show clear differences from those which are paired to males. Virgin females are considerably smaller than paired females (Kunz 2001). When paired females are separated from males they stop laying eggs and regress to an immature state, however if they are allowed to couple they mature again (Shaw 1977; Clough 1981; Popiel & Basch 1984; Popiel *et al.* 1984) showing that the maintenance of sexual maturation in the female is dependent upon the presence of the male partner. The stimulus for female maturation is independent of male sperm, species and fertilization (Armstrong 1965; Michaels 1969; Shaw *et al.* 1977; Basch & Basch 1984). In addition to the morphological modifications present in single-sex females, separation of female worms leads to a large variety of changes in the physiology of the worm, culminating in the atrophy of the ovary and vitelline gland (Shaw 1987). For instance, there is a great increase in DNA synthesis in single-sex females upon pairing with males. Also, paired females utilize more glucose than unpaired ones (Cornford & Fitzpatrick 1987). In spite of their immaturity, single-sex females reach a limited level of development, allowing them to lay eggs, which are usually malformed and non-viable (Armstrong 1965; Shaw 1987). The rates of oviposition and maturation of eggs are significantly increased by pairing of the single-sex female worms with males (Michaels 1969).

Different factors have been proposed to be involved in *S. mansoni* sexual maturation including physical/tactile contact (Armstrong 1965; Michaels 1969; Popiel & Basch 1984), nutrition (Conford & Huot 1981; Gupta & Basch 1987; Basch 1990; LoVerde *et al.* 2004) and chemical stimuli (Shaw *et al.* 1977; Silveira *et al.* 1986; Haseeb 1998). In support to the importance of tactile contact, Michaels showed that when halves of worms (i.e. one of the two segments from worms that were cut in two halves) are

allowed to mate *in vitro*, like halves (either cranial or caudal halves) always mate normally while unlike halves almost always mate abnormally, postulating that both sexes of worms have linear receptors which are used to determine dating and mating position (Michaels 1969). In support to the role of nutrition, *S. mansoni* female worms from single-sex infections have limited pharyngeal musculature, thin intestinal cecal walls, lack of digestive enzymes and reduced intake of red blood cells than females from paired infections (Gupta & Basch 1987). LoVerde and colleagues have suggested that the muscularity of the male worm allows it to assist the weaker females with pumping host blood into their intestine by a massaging effect of the muscular walls of the gynecophoric canal (i.e. a ventral longitudinal groove in the surface of male Schistosomatidae) (LoVerde *et al.* 2004). Also, Cornford and Huot demonstrated that there is transfer of ^{14}C glucose from male worms to females, implying that male schistosomes indeed help feed female worms (Conford & Huot 1981). Chemical stimuli such as acetone or ether extracts of male worms have been shown to induce female development *in vitro* (Shaw *et al.* 1977). Also, an observed cholesterol transfer from males to females may suggest a role for hormonal factors (Haseeb 1998).

On the male parasite side, the effects of sexual pairing on male worms are very subtle and therefore have received little attention in comparison to female worms. Nevertheless, some studies show that male *S. mansoni* and *S. haematobium* worms from single-sex infections are significantly smaller and have a reduction in the number of testes when compared to worms from homologous paired infections (Zanotti *et al.* 1982; Khalil & Mansour 1995). Using the data published by Basch and Gupta it is possible to observe that pairing also stimulates a higher rate of cell division (as measured by the

number of nuclei per section unit area) in males when bisexually paired males and unisexual unpaired males are compared (Basch & Gupta 1988). The stimulatory effect of female schistosomes on male worms has also been studied at the biochemical and molecular level. For instance, worms from single-sex infections have more glutathione than worms from paired-infections and this difference can be reversed by incubation of those worms with females (Siegel & Tracy 1988; Siegel & Tracy 1989). Also, female worms stimulate tyrosine incorporation, lipid accumulation and lipase utilization in males (Haseeb *et al.* 1989; Haseeb 1998). Another interesting fact is that paired male schistosomes express a 79-KDa protein in its gynecophoral canal and that this protein detection is severely limited at the surface of single-sex male worms (Bostic & Strand 1996). This protein, which shows wide distribution on the surface of adult female worms has homology to developmentally-regulated homotypic adhesion molecules and is suspected to be essential for continued interaction between sexes and sexual development of schistosomes.

Several expression analyses were recently performed in schistosomes using microarrays to study gender differences in gene expression of *S. mansoni* and *S. japonicum*, as well as stage specific, strain specific, maturation specific, and species specific differences (Hoffmann *et al.* 2002; Fitzpatrick *et al.* 2004; Chai *et al.* 2006; Dillon *et al.* 2006; Fitzpatrick & Hoffmann 2006; Gobert *et al.* 2006; Moertel *et al.* 2006; Vermeire *et al.* 2006). Microarrays were also used to investigate the vertebrate hepatic host response to infection with *S. mansoni* (Hoffmann *et al.* 2001). These studies have provided important information concerning the biology of the parasite and the host response. In this study, we describe the use of DNA microarrays to study the effect of

sexual pairing of *S. mansoni* (Brazilian LE Strain) in the adult gene expression. To accomplish this objective we compared worms from single-sex infections with worms from paired-infections. Our results reveal novel information of genes putatively involved in oogenesis and sexual maturation of schistosomes and allow the identification of new possible targets for therapeutic intervention.

Results and discussion

Evaluation of replication quality

In order to investigate the quality of our replicates we tested the correlation between different types of replicates using LIMMA (Linear Models for Microarray Data) (Smyth 2004). To generate single-sex worms we exposed multiple *Biomphalaria glabrata* snails each to a single miracidium and harvested the cercariae shed by them after one month. Multiple mice were subsequently infected with either single-sex or mixed-sex cercariae and the worms harvested 51 days post-infection. The experimental design included three types of replicates: biological, technical and in-slide replicates encompassing 6 slides in total for each experiment. In brief, single-sex and paired-infection worms were harvested from multiple mice and pooled separately in pools of 500 worms or more (each pool contained worms from different mice). The RNA from each pool was extracted separately and then hybridized to the slides. Three biological replicates were used for each experiment and each of them was hybridized twice (dye swap). Because each probe was printed in duplicate we computed also the correlation between in-slide replicates.

The approach used was to estimate a common correlation for all the genes within blocks corresponding to each type of replicate. As would be desired, the level of correlation between in slide technical replicates was between 0.90 and 0.92 for male and female experiments respectively. Dye swap replicates displayed a correlation between -0.85 (male experiment) to -0.89 (female experiment), indicating that the fluorescent dyes introduce a very minimal bias in hybridization intensities. The correlation between our biological replicates (using RNA isolated from different pools of worms) was 0.73 for the female experiment and 0.61 for the one investigating sexual pairing on male worms. Our results are in agreement with the data published by Hoffmann and colleagues who found an in-slide replicate correlation of 0.91 and a correlation ranging from 0.81 to 0.90 between slides (biological) (Hoffmann *et al.* 2002; Fitzpatrick *et al.* 2005).

Differentially expressed genes

Statistical analysis of the data using a linear model to assess differential expressed genes revealed a large number of transcripts of gene products putatively related to sexual maturation in both male and female schistosomes (Table 1 and 2). Only genes with at least two-fold difference (\log_2 ratios ≥ 1 or ≤ -1) and \log Odds ≥ 4.6 were considered differentially expressed. Volcano plots, where the magnitude of the gene expression ratio is displayed on the x-axis and the significance of the difference in expression between groups on the y-axis, are shown in (Figure 1). 265 genes were observed to be differentially expressed between mature and immature female parasites and 53 genes between mature and immature male worms.

Our results show that 55% of the genes which are differentially expressed are expressed at higher levels in paired females while the remaining 45% are more abundant in immature female worms. The differentially expressed transcripts (Table 1) in female worms included many previously identified gender related genes including the p14 eggshell protein gene (Contig 1625, SCMESP), other egg shell proteins (Contig 6116, Contig 1557, SMEGGPRO, Contig 867), extracellular superoxide dismutase (Contig 119, SCMSOD2, SEG_SCMOD, SCMSOD3, SCMSODM), tyrosinase (Contig 948, Contig 1617), cathepsin B (SMA312106), dynein light chain (SMU55992), gynecophoral canal protein (SMU47862), aspartate aminotransferase (Contig 1636), diacylglycerol acetyltransferase (Contig1301) and female specific protein fs800 (SCMFS800) (Reis *et al.* 1989; Chen *et al.* 1992; Fitzpatrick *et al.* 2005).

Fs800, has already been shown to be up-regulated in the vitelline cells during maturation of female worms and has been linked to the production and maintenance of eggs (Reis *et al.* 1989). The gynecophoral canal protein (SMU47862), also previously shown to be differentially expressed between male and females, has been implicated in male/female communication or interaction (Aronstein & Strand 1985). Our data showing down regulation of the small G protein Ras in female is also consistent with published observations (Schussler *et al.* 1997). Tyrosinase, extracellular superoxide dismutase, glucose transporter protein I, diacylglycerol acetyltransferase 2-like protein, aspartate aminotrasnferase and egg shell proteins are known to be differentially expressed between male and females suggesting that they might be related either to sexual determination, maturation, reproduction or other sex specific activities (Hoffmann *et al.* 2002; Fitzpatrick *et al.* 2005). Our results show that these genes, in addition to being

differentially expressed between genders, are also differentially expressed in female worms in different sexual maturation stages. A great number of transcripts not previously associated with sexual maturation were also observed. These included membrane antigens, importin beta-1, *S. mansoni* glucose transporter, myosin heavy chain, rho2 gtpase, lecithin-cholesterol acyltransferase, apoferritin-2, various ribosomal proteins and others (Table 1). Of the 265 genes we identified as differentially expressed in females, 142 did not contain any annotation because they did not show significant similarity with sequences contained in the NCBI at the time the array was printed (Fitzpatrick *et al.* 2005). These genes represent a multitude of unexplored proteins which might be potential targets for new therapeutic agents.

Of the genes with an associated gene ontology, genes that were up-regulated in single-sex females were mostly related to energy generation (i.e. carbohydrate and protein metabolism, generation of precursor metabolites and energy, cellular catabolism, and organelle organization and biogenesis) while genes that were down-regulated were related to RNA metabolism, reactive oxygen species metabolism, electron transport, organelle organization and biogenesis and protein biosynthesis (Figure 3). The increased amount of antioxidants in mature female is in agreement with their increased need to detoxify hemoglobin byproducts associated with increased blood cell consumption (Lawrence 1973). On the other hand, one would expect that paired-infection females express more carbohydrate and protein metabolism genes than single-sex worms. The fact that we found more of those genes in single-sex females supports Basch's nutritional theory of sexual maturation. If males do indeed help females to feed, this could allow mature worms to direct their metabolism to the more important egg generation (since the

male is already taking care of energy generation) and therefore genes related to energy generation should be decreased in mature females in relation to immature. Among the genes that are down-regulated there are six genes coding for eggshell proteins. This is expected since paired females are egg-laying machines capable of converting the equivalent of their own body dry weight into eggs (Hoffmann 2004) and consuming about 8 millions erythrocytes per day. In light of this high metabolic activity of mature females, it has been proposed that female-specific gene products associated with the metabolic machinery of egg production and hemoglobin catabolism should be highly represented in molecular biological studies of gender (Hoffmann 2004) which is the case in this study. The fact that genes associated with organelle organization were both up and down regulated in immature females could possibly be explained by differences in vitelline cells production among mature and immature females. It has been shown that paired female schistosomes produce several thousands vitelline cells per day (Erasmus & Davies 1979). This high mitotic activity must demand high amounts of protein synthesis and the participation of an array of proteins related to organelle biogenesis and organization. The fact that some genes related to this process were up-regulated in immature females is more difficult to explain but it could be due to some compensatory mechanism whereby immature females make up for the lack of nutritional support by males by producing new cells.

For male parasites, our results show that 56.6% of the differentially expressed genes were present in larger quantities in mature males while the remaining 43.4% are more expressed in males from single-sex infections. The fact that more genes were differentially expressed between females than between males is consistent with the fact

that immature males present less morphological and biochemical differences than immature females. Nevertheless this data does not agree with a previous study of gene expression induced by sexual maturation which found a similar number of differentially expressed genes in males and females (Fitzpatrick & Hoffmann 2006). This difference might have been caused by differences in the experimental design, data analysis parameters, host characteristics or differences in the parasite strain used. Indeed, results from Moertel and colleagues have shown that more than 600 genes are differentially expressed when different strains *S. japonicum* are compared under identical conditions (Moertel *et al.* 2006). Indeed, when the gene lists of our experiments and Fitzpatrick and Hoffmann (Fitzpatrick & Hoffmann 2006) are compared (See supplemental material) we find less than 10% of genes which are common to the two datasets and in one case (single-sex males) we did not find any genes in common. Our data also shows that mature male worms express more genes related to the metabolism of proteins, nucleotides, macromolecules, ion transport, and metabolite/energy generation than unpaired worms, which suggests that paired worms are more metabolically active. The data agrees with Fitzpatrick and Hoffmann (2006) in that more genes potentially involved in RNA metabolism were differentially expressed between mature and immature male worms (Fitzpatrick & Hoffmann 2006), nevertheless we did not find a greater proportion of genes in the structural molecule activity GO category.

Interestingly, the data from Khalil and Mansour show that male worms from single-sex infections are in fact smaller than worms from paired-infections (Khalil & Mansour 1995). Although the authors do not explain this phenomenon, our results suggest that the difference in size could be linked to the higher expression of genes

involved in energy generation and accumulation (Figure 3). The fact that paired male worms absorb and phosphorylate glucose more rapidly than unpaired worms also reinforces this hypothesis (Cornford & Fitzpatrick 1987). Nevertheless, we observed a higher expression of Cathepsin B Sm31 in paired male worms. Gotz and Klinkert demonstrated that this protein is an enzyme which is involved in the degradation of hemoglobin in the digestive tract of schistosomes (Gotz & Klinkert 1993).

Another interesting observation is that paired male worms synthesize more lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT), acyl-CoA binding proteins (ACPB) and fatty acid binding protein (FABP). LCAT is responsible for the formation of cholesteryl esters starting from lecithin and cholesterol and it is the LCAT on the surface of nascent HDL particles that convert cholesterol and phosphatidylcholine of chylomicron and VLDL in cholesteryl esters. The accumulation of cholesteryl esters in the nascent HDL convert it in mature HDL and directs it back to the liver where the cholesterol is usually unloaded. The acyl-CoA binding proteins are small proteins which bind to long and medium chain acyl-CoA esters with high affinity and which can act as intracellular carriers of acyl-CoA esters. FABPs, are a members of a family of cytosolic lipid binding proteins and that have been investigated as possible vaccine candidates (Kennedy *et al.* 2000). Furthermore, Gobert and colleagues demonstrated that the *S. japonicum* FABP is confined to lipid droplets in male worms that are probably involved with the nurture of female worms (Gobert *et al.* 1997).

In studies with humans and marmosets (*Callithrix jacchus*) the plasmatic levels of total cholesterol, esterified cholesterol, triglycerides and phospholipids were significantly reduced after infection with *S. mansoni* (Chechinell & Owen 1978; Ramos *et al.* 2004).

Similar effect was observed by Doenhoff and colleagues, who reported a reduction in atherosclerosis in rats predisposed to cardiovascular disease (apoE^{-/-}) after infection with *S. mansoni* (Doenhoff *et al.* 2002). They suggested that this reduction could be due to a modulatory effect of the infection by *S. mansoni* on lipid metabolism in the host. On the other hand, Ramos and colleagues proposed that the cholesterol reduction could be caused by changes in the LCAT and/or ACAT (acyl-CoA-cholesterol acyl transferase) activity, synthesis or secretion produced by the liver of infected animals (Ramos *et al.* 2004). Taking into consideration that schistosomes are not capable of synthesizing cholesterol (Meyer *et al.* 1970; Brouwers *et al.* 1997), the fact that sexual pairing has an effect upon so many genes related to fatty acid and cholesterol metabolism becomes even more relevant.

Validation of microarray results using real time quantitative PCR

In order to validate the microarray results we performed real-time RT PCR. Contigs considered to be differentially expressed were first checked against the *S. mansoni* genome to evaluate the validity of the probes printed on the arrays and to remove redundant contigs (i.e. different contigs which represented the same gene).

Primer pairs were designed for all genes considered as differentially expressed and then tested against the genome using electronic PCR (Schuler 1997) and BLAST (Altschul *et al.* 1990) to select only those that amplified a unique region of the genome. 41 female and 20 male primer pairs qualified (Supplemental material), of which approximately 20 of each were randomly selected for real time quantitative PCR. The results from the quantitative PCR for the male and female experiments were compared

against the results of our microarray hybridizations using linear regression analysis (Steel *et al.* 1997) and showed a strong correlation ($R = 0.84$ and $R = 0.67$ respectively).

Conclusions

The results presented on this article confirm previous results related to gene expression induced by sexual maturation in schistosome worms. It also contributes a wealth of information about genes (either characterized or unannotated) that may be involved in this process. Since most of the differentially expressed genes do not have homology to other genes, further work is necessary to characterize these transcripts and assign biological functions to them. Once the *Schistosoma mansoni* genome is fully annotated, it will be possible to extract more interesting information from our data. Nevertheless, we believe that the myriad of up- and down- regulated genes we describe here open new and exciting doors for the study of the conjugal biology and the development of new drugs against schistosomes.

Methods

Unisexual infections

S. mansoni lifecycle was maintained at Instituto de Pesquisa Rene Rachou, FIOCRUZ (Brasil). *S. mansoni* (LE Brazilian strain) is maintained in *Biomphalaria glabrata* as intermediate host. Outbred swiss mice were used as definite hosts. To obtain single-sex adult worms, *B. glabrata* snails were exposed to a single miracidium, which was generated from eggs obtained from the liver of infected mice (Erasmus 1973). After one

month the snails were tested for positive infection by verifying the shedding of cercaria following exposure of the snails to artificial light (Bogea *et al.* 1996). 100-200 cercaria from each snail were injected in the peritoneum of female Swiss mice.

Mice were housed conventionally in polypropylene cages with stainless steel screen covers. All animals received lab mouse chow and water *ad libitum*. The animals were sacrificed at 51 days post-infection according to ethical procedures and adult worms were obtained by portal perfusion (Smithers & Terry 1965). The worms were washed in cold saline solution and checked by microscopy for the presence of possible undesirable mixed-sex infections. We separated the single-sex adult worms in multiple pools (each one containing >500 worms which were originated from multiple mice) which were frozen at -80°C until further processing of the samples.

Paired-infections

To obtain worms from paired-infections, *B. glabrata* snails were exposed to multiple miracidia and the cercaria from these snails used to infect Swiss mice. Each mouse received approximately 100 cercaria and the animals were sacrificed at 51 days post-infection. The perfusion was performed in the same fashion as for single-sex worms. The worms were washed with cold saline solution and carefully separated by their sex with forceps under the microscope. Worms from each sex were pooled separately (>500 worms/pool) and frozen until further processing.

RNA extraction and amplification

Total RNA was extracted using Trizol reagent (Invitrogen Life Technologies, CAT#15596-026) according to the manufacture's instructions. The RNA was quantified using a Nanodrop ND-100 UV/Vis spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA) and the overall RNA quality was assessed using denaturing gel electrophoresis (Sambrook *et al.* 1989). Two μg of total RNA from each sample were amplified by doing two rounds of linear amplification using the Amino Allyl MessageAmp II kit (Ambion, CAT#1753). The amplification was done according to manufacture's specifications and aaUTP was used on the second round of amplification so that the final product could be labeled using indirect labeling.

RNA labeling and hybridization

Aminoallyl amplified RNA was labeled using Cy3 and Cy5 by indirect labeling according to a modified version of the TIGR's standard operational procedure (Hasseman 2002). In brief, for each hybridization 15 μg of amplified RNA was dried in a speed-vac, resuspended in pH 9.0 carbonate buffer and incubated for 5 minutes at RT. After this incubation, 4.5 μL of one of the two dyes dissolved in DMSO (Amersham, CAT#PA23001 and PA25001) was added to the solution and the samples were incubated at RT in the dark for one hour. Labeled RNA was purified away from unincorporated dye using RNeasy MinElute Cleanup Kit (Quiagen, CAT#74204). The Cy3 and Cy5 labeled samples were then combined, dried again, and resuspended in hybridization buffer (50% formamide, 5x SSC, 0.1% SDS).

Microarray hybridization and experimental design

The pools of female or male worm RNA from single-sex infections were hybridized against RNA from paired-infections from worms of the same sex. Each experiment was performed in duplicate (technical replicate) using a dye swap design in order to account for dye biases. The samples were hybridized using oligonucleotide DNA microarrays obtained from the laboratory of Karl Hoffmann at the University of Cambridge, UK. The arrays contained 7335 oligonucleotides (50mers) spotted in duplicate. Each oligonucleotide represented either a singleton (a single EST sequence) or a contig (contiguous sequences of overlapping EST sequences) generated by assembly with CAP3. The oligonucleotides were designed based on transcriptome information available at the time (Fitzpatrick *et al.* 2005). Briefly, the slides were pre-hybridized by placing them in coupling jars containing pre-hybridization solution (5X SSC, 0.1% SDS, 1%BSA) for 40 minutes at 42 °C. The slides were then washed by dipping 10 times in a beaker containing DI water, the water was changed and the operation repeated once. The slides were spun dry using a table-top high speed microarray centrifuge (TeleChem International Inc., USA). The samples (resuspended in hybridization) were hybridized overnight under cover slips inside Corning® hybridization chambers (Corning, USA) which were kept in a water bath at 42°C in the dark. Slides were washed two times for five minutes each in low stringency wash at 42°C (2x SSC, 0.1% N-lauroylsarcosine), followed by two washes for 5 min in medium stringency wash (0.1x SSC, 0.1% N-lauroylsarcosine) at RT and 2 washes for 5 minutes each in high stringency wash solution (0.1X SSC). Slides were spun dry and scanned using a microarray dual channel laser scanner (GenePix 4000B, Molecular Devices, USA) at 10 µm resolution, 100% laser power and PMT levels which were adjusted in order to obtain similar distributions of red and green signal intensities.

Real time RT-PCR

A subset of genes predicted to be differentially expressed was selected for validation using real-time RT-PCR. Total amplified RNA (2 µg) from mixed sex infection and single sex infection was used for reverse transcription using TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems; Cat# N808-0234). Products were amplified using the Applied SYBR Green Masters Mix kit (Applied Biosystems, Cat#4309155) in an ABI Prism 7900HT Sequence Detection (Applied Biosystems) with the following profile: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min; 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. Each reaction was performed using 1µL of cDNA from the RT reaction using a final volume of 20 µL (PCR Master Mix 1X, 200nM of each primer). Expression levels of *S. mansoni* alpha-tubulin (accession number [M80214](#)) were used as endogenous control within each sample. Relative levels of gene expression were calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak & Schmittgen 2001). Each sample was analyzed for primer dimer, contamination or mispriming by inspection of their dissociation curves.

Data analysis

Overall, analysis of sexual pairing induced gene expression encompassed 6 slides (for each experiment), incorporating 3 replicates and dye swaps. The data, which are MIAME compliant (Brazma *et al.* 2001), were submitted to ArrayExpress at EBI using MIAMExpress (Parkinson *et al.* 2005). Elementos were analyzed using GenePix Pro and flagged according to their quality (i.e. elementos were flagged as 'Bad' whenever they were contaminated with particles, were smeared or dilated, had irregular shape or were in

areas of high background; otherwise they were flagged as 'Good'). Raw intensity data were analyzed using the R statistical language (Gentleman & Ihaka 1997). The data were inspected for spatial biases on both the red and green channel (background and signal), for print-tip bias, dye bias and intensity dependent bias using the maArray package (Gentleman *et al.* 2004). The data were then print-tip normalized using a modified version of the robust spline method (Smyth & Speed 2003; Smyth 2004). The statistical analysis was performed using a linear model incorporating replication information. The in-slide, dye swap and pool's replicate correlations were calculated using the duplicate Correlation function of LIMMA (Smyth *et al.* 2005). A list of differentially expressed genes was generated by applying a Bayesian smoothing to the linear model fit. Genes that had log odds > 4.6 (99% probability that the gene is differentially expressed between the conditions being compared) and M values >1 or <-1 (2 fold difference among groups) were considered as significant. Because the slides were designed based on the assembly of ESTs from *S. mansoni* and because the genome wasn't available at the time the slides were printed, we decided to test the differentially expressed genes against the complete genome. In brief, pairs of primers were designed for all differentially expressed genes (M values <1 or <-1 and logOdds > 4.6) using a web tool (Genscript Corp, USA (GenScript)) and then tested against the genome and the predicted complete CDSs using mePCR (Schussler *et al.* 1997) in order to see if each primer pair would theoretically amplify a single region of the genome. Primer pairs that amplified more than one region were discarded. We further tested the primers to see if two primer pairs would amplify the same gene (predicted CDS) in order to remove redundant genes (i.e. genes that were spotted more than one time at the arrays because of assembly problems).

Further analysis was performed using Blast2GO (Conesa *et al.* 2005). This software allows the evaluation of differences in annotation between two groups of data. The analysis of GO terms association for the genes considered differentially expressed in both experimental groups, for the two experiments, was performed by using the *combined graphs* function of the software. These graphs allow the visualization of the combined annotation of a group of sequences and this can be used to study the biological meaning of a subgroup of sequences. Combined graphs are a good alternative to *enrichment analysis* because they don't require a reference group and allow the use of small numbers of sequences (IVIA 2005).

Abbreviations

ACAT – Acyl-CoA-cholesterol acyl transferase

ACBP - Acyl-CoA Binding Protein

BSA – Bovine Serum Albumin

CDS – Coding Sequence

DALY - Disability Adjusted Life Years, the sum of years of potential life lost due to premature mortality and the years of productive life lost due to disability.

EBI – European Bioinformatics Institute

DMSO - Dimethyl sulfoxide

DNA - Deoxyribonucleic acid

EST – Expressed Sequence Tags

FABP – Fatty acid binding protein

GO – Gene Ontology

HDL – High Density Lipoprotein

LCAT – Lecithin-Cholesterol Acyltransferase

LDL – Low Density Lipoprotein

LIMMA - Linear Models for Microarray Data

MIAME – Minimum Information About a Microarray Experiment

PCR – Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

RNA – Ribonucleic acid

RT – Reverse Transcription

SSC - Sodium Chloride Sodium Citrate

VLDL – Very Low Density Lipoprotein

WHO—World Health Organization

Authors' contributions

MW led the design of the study, performed the RNA amplifications, hybridizations, real time PCRs, statistical analysis of the data and drafted the manuscript. LKJP carried out the unisexual and mixed infections of *B. glabrata* and injection of mice. FPL carried out the mouse perfusions, separation of worms and RNA extractions. GCC participated in the data analysis performing the mePCR, real time PCR oligonucleotides design and subsequent data treatment. GF, NES and OSC participated in the design and coordination of the study and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge CAPES, FAPEMIG and NIH for financial support. Work at UFMG was supported by FAPEMIG grant CBB 469/04 to GRF. Work in the El-Sayed laboratory was supported by a NIH grant AI48828 to NES. MW's work at the El-Sayed laboratory was supported by a PDEE scholarship from CAPES and his work at UFMG was supported by a CAPES PhD scholarship. We would like to thank Prof. Karl Hoffman for providing the arrays, Prof. Elida ML Rabelo for thoughtful suggestions, Bryan Frank for technical support and advice concerning the microarray experiments and Delza de Moura Soares Reis and Sueleny Silva Ferreira Texeira for technical assistance with *S. mansoni* life-cycle maintenance and mouse perfusions.

References

1. TDR: **TDR Strategic Direction: Schistosomiasis**. In.: World Health Organization; 2002.
2. World Health Organization.: **The world health report : Mental Health : New Understanding, New Hope**. In. Geneva: World Health Organization; 2001.
3. Loverde PT, Chen L: **Schistosome female reproductive development**. *Parasitol Today* 1991, **7**(11):303-308.
4. **Schistosomiasis** [<http://www.emedicine.com/emerg/topic857.htm>]
5. Shaw MK: **Schistosoma mansoni: vitelline gland development in females from single sex infections**. *J Helminthol* 1987, **61**(3):253-259.
6. LoVerde PT, Niles EG, Osman A, Wu WJ: **Schistosoma mansoni male-female interactions**. *Can J Zool* 2004, **82**(2):357-374.
7. Shaw MK, Erasmus DA: **Schistosoma mansoni: praziquantel-induced changes to the female reproductive system**. *Exp Parasitol* 1988, **65**(1):31-42.
8. Popiel I, Erasmus DA: **Schistosoma mansoni: ultrastructure of adults from mice treated with oxamniquine**. *Exp Parasitol* 1984, **58**(3):254-262.
9. Popiel I, Cioli D, Erasmus DA: **Reversibility of drug-induced regression in female Schistosoma mansoni upon pairing with male worms in vivo**. *Z Parasitenkd* 1984, **70**(3):421-424.
10. Kunz W: **Schistosome male-female interaction: induction of germ-cell differentiation**. *Trends Parasitol* 2001, **17**(5):227-231.
11. Popiel I, Basch PF: **Reproductive development of female Schistosoma mansoni (Digenea: Schistosomatidae) following bisexual pairing of worms and worm segments**. *J Exp Zool* 1984, **232**(1):141-150.
12. Shaw JR: **Schistosoma mansoni: pairing in vitro and development of females from single sex infections**. *Exp Parasitol* 1977, **41**(1):54-65.
13. Clough ER: **Morphology and reproductive organs and oogenesis in bisexual and unisexual transplants of mature Schistosoma mansoni females**. *J Parasitol* 1981, **67**(4):535-539.
14. Armstrong JC: **Mating behavior and development of schistosomes in the mouse**. *J Parasitol* 1965, **51**:605-616.
15. Michaels RM: **Mating of Schistosoma mansoni in vitro**. *Exp Parasitol* 1969, **25**(1):58-71.
16. Shaw JR, Marshall I, Erasmus DA: **Schistosoma mansoni: in vitro stimulation of vitelline cell development by extracts of male worms**. *Exp Parasitol* 1977, **42**(1):14-20.
17. Basch PF, Basch N: **Intergeneric reproductive stimulation and parthenogenesis in Schistosoma mansoni**. *Parasitology* 1984, **89** (Pt 2):369-376.
18. Cornford EA, Fitzpatrick AM: **Comparative glucose utilization rates in separated and mated schistosomes**. *Experimental Parasitology* 1987, **64**:448-457.
19. Basch PF: **Why do schistosomes have separate sexes?** *Parasitol Today* 1990, **6**(5):160-163.

20. Gupta BC, Basch PF: **The role of Schistosoma mansoni males in feeding and development of female worms.** *J Parasitol* 1987, **73**(3):481-486.
21. Conford EM, Huot ME: **Glucose transfer from male to female schistosomes.** *Science* 1981, **213**(4513):1269-1271.
22. Silveira AM, Friche AA, Rumjanek FD: **Transfer of [14C] cholesterol and its metabolites between adult male and female worms of Schistosoma mansoni.** *Comp Biochem Physiol B* 1986, **85**(4):851-857.
23. Haseeb MA: **Schistosoma mansoni: females enhance [C-14]-tyrosine incorporation in males maintained in vitro.** *Journal of Helminthology* 1998, **72**(2):123-126.
24. Khalil SB, Mansour NS: **Worm development in hamsters infected with unisex and cross-mated Schistosoma mansoni and Schistosoma haematobium.** *J Parasitol* 1995, **81**(1):8-11.
25. Zanotti EM, Magalhaes LA, Piedrabuena AE: **[Morphology and development of Schistosoma mansoni Sambon, 1907 in unisexual infections experimentally induced in mice].** *Rev Saude Publica* 1982, **16**(2):114-119.
26. Basch PF, Gupta BC: **Homosexual male pairing in Schistosoma mansoni.** *Int J Parasitol* 1988, **18**(8):1115-1117.
27. Siegel DA, Tracy JW: **Effect of pairing in vitro on the glutathione level of male Schistosoma mansoni.** *J Parasitol* 1988, **74**(4):524-531.
28. Siegel DA, Tracy JW: **Schistosoma mansoni: influence of the female parasite on glutathione biosynthesis in the male.** *Exp Parasitol* 1989, **69**(2):116-124.
29. Haseeb MA, Fried B, Eveland LK: **Schistosoma mansoni: female-dependent lipid secretion in males and corresponding changes in lipase activity.** *Int J Parasitol* 1989, **19**(7):705-709.
30. Bostic JR, Strand M: **Molecular cloning of a Schistosoma mansoni protein expressed in the gynecophoral canal of male worms.** *Mol Biochem Parasitol* 1996, **79**(1):79-89.
31. Hoffmann KF, Johnston DA, Dunne DW: **Identification of Schistosoma mansoni gender-associated gene transcripts by cDNA microarray profiling.** *Genome Biol* 2002, **3**(8):RESEARCH0041.
32. Fitzpatrick JM, Johansen MV, Johnston DA, Dunne DW, Hoffmann KF: **Gender-associated gene expression in two related strains of Schistosoma japonicum.** *Mol Biochem Parasitol* 2004, **136**(2):191-209.
33. Dillon GP, Feltwell T, Skelton JP, Ashton PD, Coulson PS, Quail MA, Nikolaidou-Katsaridou N, Wilson RA, Ivens AC: **Microarray analysis identifies genes preferentially expressed in the lung schistosomulum of Schistosoma mansoni.** *Int J Parasitol* 2006, **36**(1):1-8.
34. Vermeire JJ, Taft AS, Hoffmann KF, Fitzpatrick JM, Yoshino TP: **Schistosoma mansoni: DNA microarray gene expression profiling during the miracidium-to-mother sporocyst transformation.** *Mol Biochem Parasitol* 2006, **147**(1):39-47.
35. Gobert GN, McInnes R, Moertel L, Nelson C, Jones MK, Hu W, McManus DP: **Transcriptomics tool for the human Schistosoma blood flukes using microarray gene expression profiling.** *Exp Parasitol* 2006.

36. Fitzpatrick JM, Hoffmann KF: **Dioecius Schistosoma mansoni express divergent gene repertoires regulated by pairing.** *Int J Parasitol* 2006, **36**:1081-1089.
37. Chai M, McManus DP, McInnes R, Moertel L, Tran M, Loukas A, Jonesa MK, Gobert GN: **Transcriptome profiling of lung schistosomula, in vitro cultured schistosomula and adult Schistosoma japonicum.** *Cell Mol Life Sci* 2006, **63**(7-8):919-929.
38. Moertel L, McManus DP, Piva TJ, Young L, McInnes RL, Gobert GN: **Oligonucleotide microarray analysis of strain- and gender-associated gene expression in the human blood fluke, Schistosoma japonicum.** *Mol Cell Probes* 2006, **20**(5):280-289.
39. Hoffmann KF, McCarty TC, Segal DH, Chiaramonte M, Hesse M, Davis EM, Cheever AW, Meltzer PS, Morse HC, 3rd, Wynn TA: **Disease fingerprinting with cDNA microarrays reveals distinct gene expression profiles in lethal type 1 and type 2 cytokine-mediated inflammatory reactions.** *FASEB J* 2001, **15**(13):2545-2547.
40. Smyth GK: **Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments.** *Stat Appl Genet Mol Biol* 2004, **3**(1):Article 3.
41. Fitzpatrick JM, Johnston DA, Williams GW, Williams DJ, Freeman TC, Dunne DW, Hoffmann KF: **An oligonucleotide microarray for transcriptome analysis of Schistosoma mansoni and its application/use to investigate gender-associated gene expression.** *Mol Biochem Parasitol* 2005, **141**(1):1-13.
42. Reis MG, Kuhns J, Blanton R, Davis AH: **Localization and pattern of expression of a female specific mRNA in Schistosoma mansoni.** *Mol Biochem Parasitol* 1989, **32**(2-3):113-119.
43. Chen LL, Rekosh DM, LoVerde PT: **Schistosoma mansoni p48 eggshell protein gene: characterization, developmentally regulated expression and comparison to the p14 eggshell protein gene.** *Mol Biochem Parasitol* 1992, **52**(1):39-52.
44. Aronstein WS, Strand M: **A glycoprotein antigen of Schistosoma mansoni expressed on the gynecophoral canal of mature male worms.** *Am J Trop Med Hyg* 1985, **34**(3):508-512.
45. Schussler P, Grevelding CG, Kunz W: **Identification of Ras, MAP kinases, and a GAP protein in Schistosoma mansoni by immunoblotting and their putative involvement in male-female interaction.** *Parasitology* 1997, **115** (Pt 6):629-634.
46. Lawrence JD: **The ingestion of red blood cells by Schistosoma mansoni.** *J Parasitol* 1973, **59**(1):60-63.
47. Hoffmann KF: **An historical and genomic view of schistosome conjugal biology with emphasis on sex-specific gene expression.** *Parasitology* 2004, **128** Suppl:S11-22.
48. Erasmus DA, Davies TW: **Schistosoma mansoni and S. haematobium: calcium metabolism of the vitelline cell.** *Exp Parasitol* 1979, **47**(1):91-106.

49. Gotz B, Klinkert MQ: **Expression and partial characterization of a cathepsin B-like enzyme (Sm31) and a proposed 'haemoglobinase' (Sm32) from Schistosoma mansoni.** *Biochem J* 1993, **290** (Pt 3):801-806.
50. Kennedy MW, Scott JC, Lo S, Beauchamp J, McManus DP: **Sj-FABPc fatty-acid-binding protein of the human blood fluke Schistosoma japonicum: structural and functional characterization and unusual solvent exposure of a portal-proximal tryptophan residue.** *Biochem J* 2000, **349**(Pt 1):377-384.
51. Gobert GN, Stenzel DJ, Jones MK, McManus DP: **Immunolocalization of the fatty acid-binding protein Sj-FABPc within adult Schistosoma japonicum.** *Parasitology* 1997, **115** (Pt 1):33-39.
52. Ramos TM, de Vasconcelos AS, de Carvalho VC, Lima VL: **[Alterations in cholesterol, triglyceride and total phospholipid levels in plasma of Callithrix jacchus (sagui) reinfected by Schistosoma mansoni].** *Rev Soc Bras Med Trop* 2004, **37**(1):37-40.
53. Chechinel YMN, Owen JS: **O colesterol plasmático na esquistossomose mansônica.** *Revista Brasileira de Biologia* 1978, **38**:339-343.
54. Doenhoff MJ, Stanley RG, Griffiths K, Jackson CL: **An anti-atherogenic effect of Schistosoma mansoni infections in mice associated with a parasite-induced lowering of blood total cholesterol.** *Parasitology* 2002, **125**(Pt 5):415-421.
55. Brouwers JF, Smeenk IM, van Golde LM, Tielens AG: **The incorporation, modification and turnover of fatty acids in adult Schistosoma mansoni.** *Mol Biochem Parasitol* 1997, **88**(1-2):175-185.
56. Meyer F, Meyer H, Bueding E: **Lipid metabolism in the parasitic and free-living flatworms, Schistosoma mansoni and Dugesia dorotocephala.** *Biochim Biophys Acta* 1970, **210**(2):257-266.
57. Schuler GD: **Sequence mapping by electronic PCR.** *Genome Res* 1997, **7**(5):541-550.
58. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ: **Basic local alignment search tool.** *J Mol Biol* 1990, **215**(3):403-410.
59. Steel RGG, Torrie JH, Dickey DA: **Principles and Procedures of Statistics. A Biometric Approach.**, Third Edition edn: WCB McGraw-Hill; 1997.
60. Erasmus DA: **A comparative study of the reproductive system of mature, immature and "unisexual" female Schistosoma mansoni.** *Parasitology* 1973, **67**(2):165-183.
61. Bogea T, Favre TC, Rotenberg L, Silva HS, Pieri OS: **Circadian pattern of cercarial emergence in Schistosoma mansoni (Platyhelminthes:Digenea) from isolated Biomphalaria glabrata.** *Chronobiol Int* 1996, **13**(2):93-101.
62. Smithers SR, Terry RJ: **The infection of laboratory hosts with cercariae of Schistosoma mansoni and the recovery of the adult worms.** *Parasitology* 1965, **55**(4):695-700.
63. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: **Molecular Cloning, A Laboratory Manual**, Second Edition edn: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
64. **Aminoallyl labelling of RNA for microarrays - SOP #: M004** [http://pga.tigr.org/sop/M004_1a.pdf]

65. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods* 2001, **25**(4):402-408.
66. Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoeckert C, Aach J, Ansorge W, Ball CA, Causton HC *et al*: **Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data.** *Nat Genet* 2001, **29**(4):365-371.
67. Parkinson H, Sarkans U, Shojatalab M, Abeygunawardena N, Contrino S, Coulson R, Farne A, Lara GG, Holloway E, Kapushesky M *et al*: **ArrayExpress-a public repository for microarray gene expression data at the EBI.** *Nucleic Acids Res* 2005, **33**(Database issue):D553-555.
68. Gentleman R, Ihaka R: **The R language.** In: *Proceedings of the 28th Symposium on the Interface: 1997*: The Interface Foundation of North America; 1997.
69. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J *et al*: **Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics.** *Genome Biol* 2004, **5**(10):R80.
70. Smyth GK, Speed TP: **Normalization of cDNA microarray data.** *Methods* 2003, **31**:265-273.
71. Smyth GK, Michaud J, Scott H: **The use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments.** *Bioinformatics* 2005, **21**(9):2067-2075.
72. **Real-Time PCR Primer Design** [<https://www.genscript.com/ssl-bin/app/primer>]
73. Conesa A, Gotz S, Garcia-Gomez JM, Terol J, Talon M, Robles M: **Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research.** *Bioinformatics* 2005, **21**(18):3674-3676.
74. **Blast2Go** **Tutorial**
 [<http://web3.vs160142.vserver.de/b2gdata/blast2goTutorial.pdf#search=%22blast2go%22>]

Figure legends

Figure 1: The volcano plot for the female (A) and male (B) datasets.

Volcano plot identifying genes which are significantly different between mature and immature female (A) and male (B) *S. mansoni* adult worms. The plot displays print-tip normalized fluorescence intensity ratios for all replicates on a two-axis system. The x-axis corresponds to the \log_2 of the fold change between mature and immature worms and the y-axis corresponds to the Log Odds (or B value) which is the odds (or probability) that a certain gene is differentially expressed. A Log Odds value of 0 (horizontal line in each graph) corresponds to a 50-50 chance that the gene is differentially expressed. The higher the Log Odds for each gene, the higher the probability that the gene is differentially expressed and not a false positive. The pink areas show genes that were considered as differentially expressed, i.e. it showed a fold difference greater than or equal to 2 (\log_2 fold change ≥ 1 or ≤ -1) and $\log\text{Odds} \geq 4.6$ (99% of chance of being statistically significant). The green area shows genes that have $\log\text{Odds}$ within the acceptable range but which have fold differences smaller than 2.

Figure 2: Distribution of Gene Ontology terms for the differentially expressed genes in female worms.

A. Pie plot showing the Gene Ontology classification for the genes that were up-regulated in adult single-sex female worms. The graph does not contain all genes that were up-regulated since the majority of those do not have assigned GOs. B. pie plot showing the distribution of GOs for the genes that were down-regulated in adult single-sex female worms. The graph does not contain all genes that were down-regulated since the majority of those do not have assigned GOs.

Figure 3: Distribution of Gene Ontology terms for the differentially expressed genes in male worms.

Bar plot representing the Gene Ontology term distribution for the genes more expressed in: A. paired adult male *S. mansoni*; B. unpaired adult male *S. mansoni*.

Figure 1

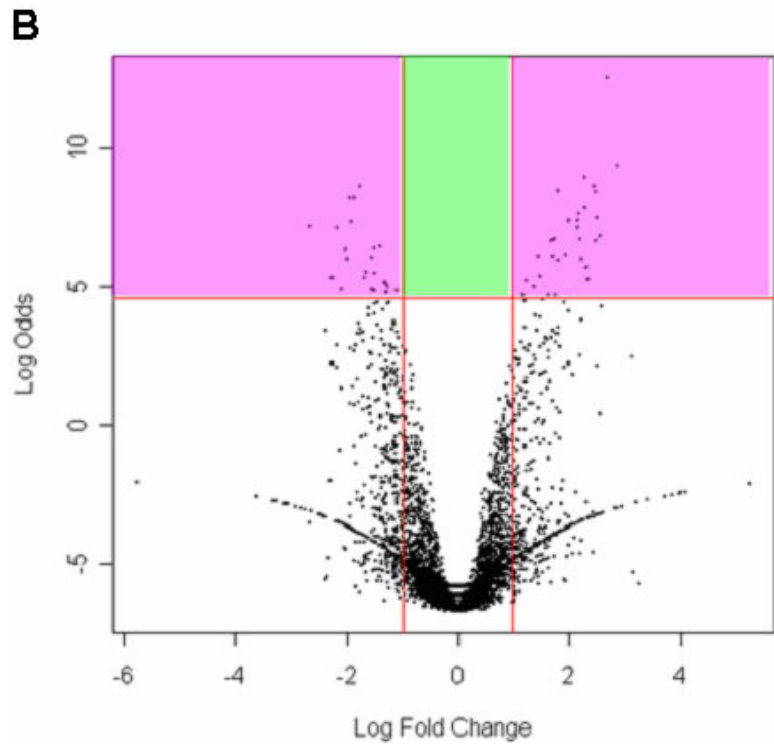
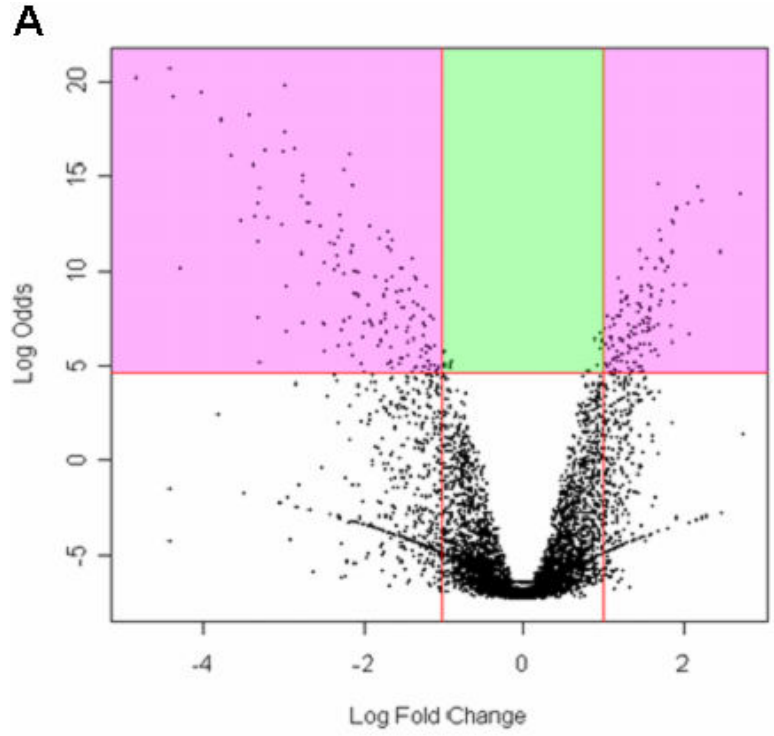
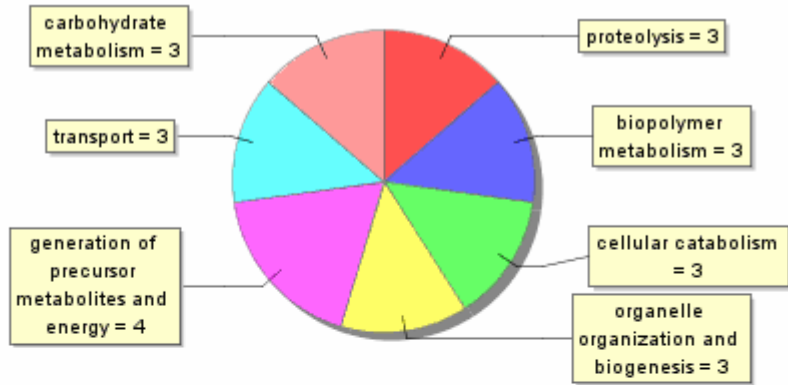


Figure 2

A



B

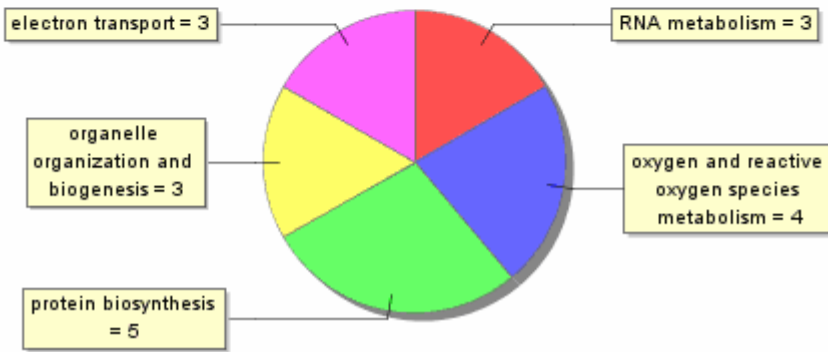


Figure 3

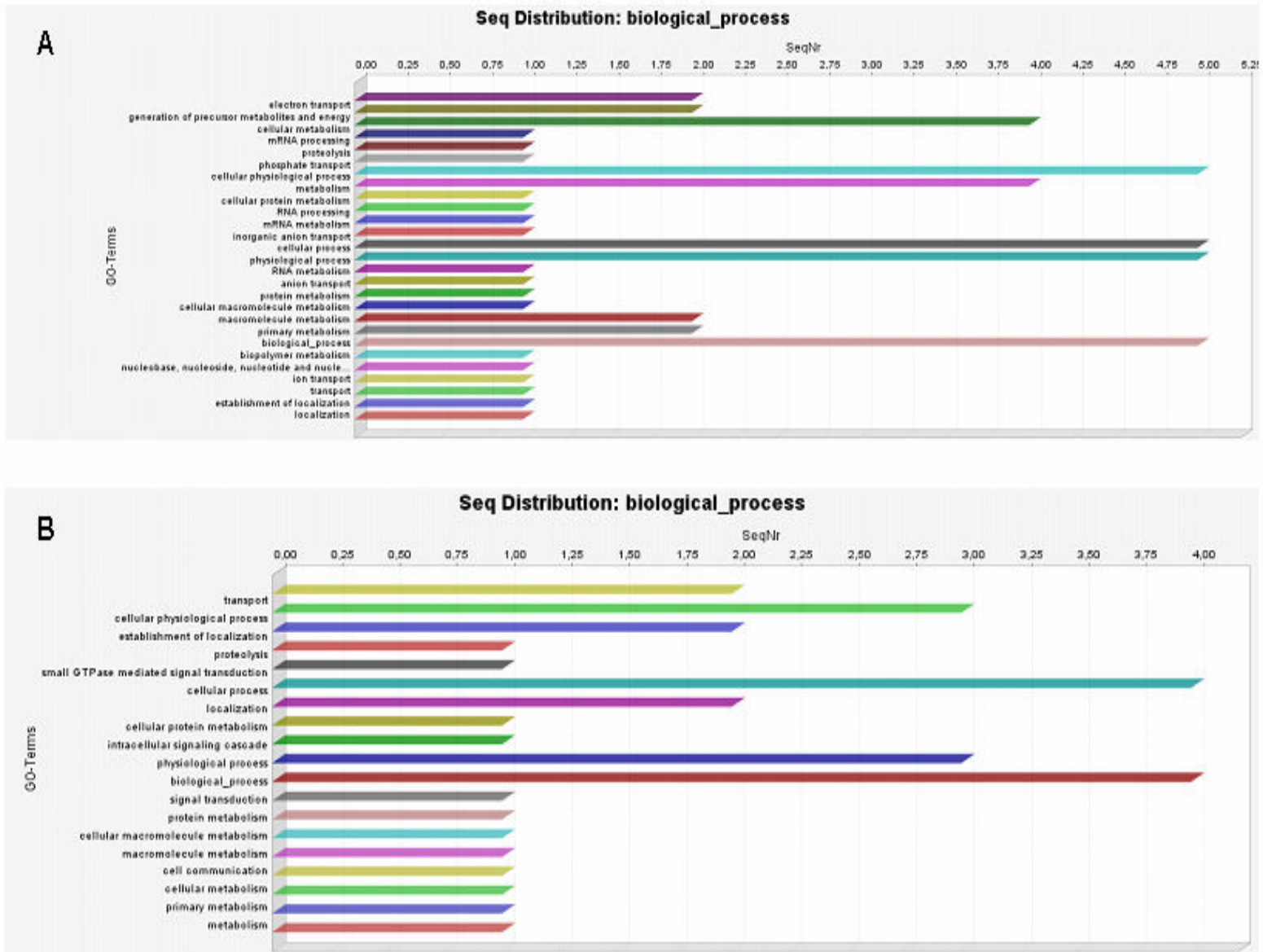


TABLE 1 - Top 30 most differentially expressed genes in adult female schistosomes.

Name	M	A	P Value	B
SIMILAR TO PUTATIVE ATPASE N2B (HFN2B) 5E-05 POSSIBLE ANTISENSE	-4.41895	10.84994	1.35E-09	20.60678
EXTRACELLULAR SUPEROXIDE DISMUTASE [CU-ZN] PRECURSOR (EC1.15.1.1) (EC-SOD) (6E-97)	-4.83772	11.60992	1.35E-09	20.10658
UNKNOWN 2572 POSSIBLE ANTISENSE	-2.97935	9.425281	1.35E-09	19.78673
SIMILAR TO FEMALE SPECIFIC EGG SHELL PROTEIN ORF 2 (1E-144)	-4.00956	10.33001	1.57E-09	19.40354
UNKNOWN 1477	-4.37742	9.800644	1.70E-09	19.13286
UNKNOWN 535 POSSIBLE ANTISENSE	-3.40857	8.462215	4.12E-09	18.16237
UNKNOWN 1495	-3.78529	7.836334	4.60E-09	17.92087
UNKNOWN 926	-2.97584	9.805078	8.07E-09	17.27377
UNKNOWN 778	-2.84958	9.831668	1.72E-08	16.36883
UNKNOWN 2609 POSSIBLE ANTISENSE	-3.23019	9.170634	1.72E-08	16.34812
UNKNOWN 1805 POSSIBLE ANTISENSE	-2.99634	7.133567	1.74E-08	16.24925
S.MANSONI 18S RRNA GENE, COMPLETE SEQUENCE	-2.15136	9.47819	1.87E-08	16.09624
S.MANSONI EGG SHELL PROTEIN MRNA, 3' END	-3.65217	8.873222	1.94E-08	15.98481
SIMILAR TO SCHISTOSOMA MANSONI SMALL SUBUNIT RRNA GENE (DNA LEVEL 0.0)	-3.35601	12.32288	2.74E-08	15.58348
UNKNOWN 3085	-2.23101	10.75529	3.35E-08	15.32323
UNKNOWN 46	-2.74433	7.536724	4.14E-08	15.05545
SCHISTOSOMA MANSONI RIBOSOMAL INTERGENIC SPACER DNA	-2.74253	10.10216	5.38E-08	14.74033
UNKNOWN 398	1.685296	12.69879	6.12E-08	14.54298
SCHISTOSOMA MANSONI SMALL SUBUNIT RRNA GENE	-2.12156	13.00096	6.12E-08	14.50706
SIMILAR TO PLASMA KALLIKREIN PRECURSOR (EC 3.4.21.34) 1E-11	2.181398	12.00887	6.63E-08	14.37559
UNKNOWN 475	-3.28488	8.766573	6.63E-08	14.33036
SIMILAR TO ALDEHYDE DEHYDROGENASE 1 FAMILY, MEMBER B1 (1E-160)	2.708917	13.41307	8.44E-08	14.04777
UNKNOWN 4495	-2.75499	7.45355	9.68E-08	13.86973
UNKNOWN 260 POSSIBLE ANTISENSE	2.245423	13.61931	1.18E-07	13.6361
UNKNOWN 2268	-2.67757	7.592068	1.25E-07	13.51174
SIMILAR TO RAS-LIKE GTP-BINDING PROTEIN RHO (2E-89)	2.059329	12.85641	1.25E-07	13.46496
UNKNOWN 3554	-3.30468	11.33136	1.25E-07	13.45976
UNKNOWN 2741	1.934138	11.25831	1.52E-07	13.22701
SCHISTOSOMA MANSONI 28S RRNA GENE GAP REGION	-2.27931	8.995688	2.01E-07	12.91806
SIMILAR TO EGG SHELL PROTEIN PRECURSOR (CHORION PROTEIN) 2E-12 POSSIBLE ANTISENSE	-3.34778	10.20964	2.04E-07	12.84231

Top 30 most differentially expressed genes in adult female schistosomes. M values are the log-ratio of the two expression intensities. A values are the mean log-expression of the two. Genes with negative M values are down-regulated in immature females (or up in paired-infection worms) and genes with positive M values are up-regulated in immature worms.

TABLE 2 - Top 30 most differentially expressed genes in adult male schistosomes.

Name	M	A	P Value	B
S.MANSONI FEMALE SPECIFIC POLYPEPTIDE MRNA	-2.66936	12.21286	4.91E-06	12.51864
SIMILAR TO PUTATIVE ATPASE N2B (HFN2B) 5E-05 POSSIBLE ANTISENSE	-2.8511	10.52274	6.99E-05	9.333646
SCHISTOSOMA MANSONI SMALL SUBUNIT RRNA GENE	-2.27115	11.68601	6.99E-05	8.885995
UNKNOWN 4206	1.760138	12.02897	6.99E-05	8.616023
SIMILAR TO SCHISTOSOMA MANSONI SMALL SUBUNIT RRNA GENE (DNA LEVEL 0.0)	-2.45433	9.02915	6.99E-05	8.605466
UNKNOWN 3242 POSSIBLE ANTISENSE	-1.80035	11.01702	6.99E-05	8.465827
SIMILAR TO RAT SNRNP-ASSOCIATED POLYPEPTIDE N (8E-33)	-2.46543	11.86099	6.99E-05	8.424534
SCHISTOSOMA MANSONI GLUCOSE TRANSPORTER PROTEIN (SGTP2) MRNA, COMPLETE CDS	1.864996	11.93532	6.99E-05	8.221553
SIMILAR TO ACTIN, CYTOPLASMIC 3 (BETA-ACTIN 3) 9E-79	1.933797	11.65976	6.99E-05	8.206634
SCHISTOSOMA MANSONI 5.8S RIBOSOMAL RNA AND 28S RIBOSOMAL RNA GENES, PARTIAL SEQUENCE, AND INTERNAL TRANSCRIBED SPACER, COMPLETE SEQUENCE	-2.28119	10.0614	9.51E-05	7.819557
UNKNOWN 3085	-2.18385	9.768994	0.000105	7.632409
SIMILAR TO VKG PROTEIN (4E-08) AND COLLAGEN ALPHA I(IV) CHAIN PRECURSOR (8E-08)	-2.50168	8.788424	0.00011	7.456866
UNKNOWN 926	-1.98422	8.257669	0.00011	7.378939
UNKNOWN 1783 POSSIBLE ANTISENSE	-2.15972	11.35038	0.00011	7.344978
SIMILAR TO RAS-LIKE GTP-BINDING PROTEIN RHO (2E-89)	1.921029	10.26005	0.00011	7.295446
UNKNOWN 43	2.663762	12.76366	0.000112	7.151475
UNKNOWN 4470	2.191225	8.598522	0.000112	7.122331
SCHISTOSOMA MANSONI INTERNAL TRANSCRIBED SPACER 2, PARTIAL SEQUENCE	-2.14823	10.26113	0.000112	7.105776
S.MANSONI HEAT SHOCK PROTEIN 86 MRNA, COMPLETE CDS	-2.5539	12.64794	0.000147	6.767502
SIMILAR TO SPLICING FACTOR 3A SUBUNIT 2 (SPLICEOSOME ASSOCIATED PROTEIN 62) 1E-15 POSSIBLE ANTISENSE	-1.73796	10.33214	0.000147	6.674734
SIMILAR TO PUTATIVE SRNP (7E-07)	-2.21174	9.511203	0.000147	6.664802
UNKNOWN 2858	-2.47374	7.487032	0.000147	6.65119
SIMILAR TO NADH DEHYDROGENASE 3 (NADH DEHYDROGENASE SUBUNIT 3) 6E-35 POSSIBLE ANTISENSE	-1.66681	10.67992	0.000147	6.616512
UNKNOWN 70	1.387855	13.84221	0.000173	6.419602
S.MANSONI CATHEPSIN B (SM31) MRNA, COMPLETE CDS	1.506688	12.30752	0.000173	6.379095
UNKNOWN 4275	2.032754	9.699271	0.000182	6.290137
UNKNOWN 971	-1.92642	13.63907	0.000196	6.153524
UNKNOWN 1927 POSSIBLE ANTISENSE	-1.69877	11.13445	0.000196	6.122623
UNKNOWN 312 POSSIBLE ANTISENSE	-1.43402	12.21602	0.000196	6.115432
UNKNOWN 3940	1.553483	13.10834	0.000199	6.070285

Top 30 most differentially expressed genes in adult male schistosomes. M values are the log-ratio of the two expression intensities. A values are the mean log-expression of the two. Genes with negative M values are down-regulated in immature females (or up in paired-infection worms) and genes with positive M values are up-regulated in immature worms.

ANEXO II – Artigo submetido para Acta Tropica

Title

Microarray analysis of host sex effect on gene expression in *Schistosoma mansoni*, Brazilian LE Strain.

Authors

^{1,2}Waisberg, M; ¹Lobo, F.P.; ^{2,3}Cerqueira, G.C.; ⁴Passos, L.K.J.; ⁴Carvalho, O.S; ^{2,5}El-Sayed, N.M.; ¹Franco, G.R.

Affiliation

¹Laboratório de Genética Bioquímica, Departamento de Imunologia e Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil; ²Department of Parasite Genomics, The Institute for Genomic Research, Rockville, MD, USA; ³Laboratório de Genética Molecular de Tripanosomatídeos, Departamento de Imunologia e Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil; ⁴Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Osvaldo Cruz, Belo Horizonte, MG, Brazil; ⁵Department of Cell Biology and Molecular Genetics, Center for Bioinformatics and Computational Biology, University of Maryland, College Park, MD, USA.

Corresponding Author

Prof. Glória Regina Franco, Address: Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Lab. de Genética Bioquímica, Departamento de Imunologia e Bioquímica, Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, tel: +55 31 3499 2546, fax: +55 31 34992984, email: gfranco@icb.ufmg.br

Abstract

Background: *Schistosoma mansoni* is a digenetic trematode and a human parasite responsible for high social and economic costs, mostly in developing countries. These parasites inhabit the mesenteric veins of affected humans where female parasites, upon pairing to male worms, lay on average 300 eggs a day. Although some authors have studied the effect of host hormones on parasites, not much is known about the effects of host sex on gene expression in Schistosomes. In order to study gene transcripts associated with the host sex we compared the gene expression profiles of both male and female unisexual adult *S. mansoni* parasites raised on either male or female hosts, using DNA microarrays containing 7335 *S. mansoni* probes. Results: For each experiment, three amplified RNA microarray hybridizations and their dye swaps were analyzed using LIMMA. Our results show that host sex caused differential expression of 11 genes in female parasites and of 134 in male parasites. Of the differentially expressed genes in female worms, 10 were more expressed in female worms from male mice, while of the 134 differentially expressed genes in male parasites, 79 (59%) were more expressed in worms from female mice suggesting that the communication between hosts and parasites is more frequent when they are from opposite sexes. A myriad of new host sex associated transcripts were identified enabling the acquisition of a large body of knowledge about the communication between host hormones and Schistosomes. Further investigation of the role of each of those genes will help understand better their importance in the pathogenesis of Schistosomiasis.

Keywords: *Schistosoma mansoni*, schistosomiasis, microarray, gene expression, female, male, host sex

Introduction

Schistosoma mansoni are digenetic blood flukes which live in pairs in the mesenteric veins of humans. The parasite has a complex life cycle which alternates between vertebrate (humans) and invertebrate hosts (aquatic snail), reproducing asexually in the snail and sexually in humans. Humans are infected upon contact with contaminated water in which cercariae (a free-swimming form of the parasite) penetrate through the intact skin. After penetration cercariae transform into schistosomulum (another larval form of the parasite) and migrate through skin, blood and lungs. Once the worms reach the liver, male and female parasites pair and the male worms transport the females inside their gynecophoral canal (a groove on the male ventral surface) against the flow of blood, from the portal vein to the smaller mesenteric veins where the couple reaches the mature state and females lay 200-300 eggs per day (LoVerde *et al.* 2004). Part of the eggs cross the intestinal walls and are released in the feces but the rest of them are swept back to the liver, where they lodge in sinusoids causing a granulomatous response. It is this granulomatous response, rather than the direct action of the parasites or the egg antigens which is responsible for the pathological manifestations of the infection (Boros 1989).

Many parasites use host molecules as indirect growth factors for themselves (Damian 1997). Host hormones can modify the response to infection, as well as parasites can synthesize and modify the concentration of hormones in their hosts (Klein 2004). For example, adrenal steroidal hormones were implicated as some of the most important host factors regulating the pathogenesis of Schistosomiasis. Cortisol and DHEA

(dehydroepiandrosterone) inhibit oviposition of *S. mansoni* *in vitro* and *in vivo* (Morales-Montor *et al.* 2001). In relation to gonadal hormones, Remoue and colleagues showed that testosterone reduces the fertility of *S. haematobium* and that these parasites synthesize a protein which is capable of binding testosterone and of facilitating its transport, metabolism and physiological action in the parasite (Remoue *et al.* 2002). Male mice infected with both male and female worms show a reduced pathology when compared to female mice but the factors responsible for a more favorable environment in female hosts is not known (Eloi-Santos *et al.* 1992). The fact that *S. mansoni* have receptors for 17- β -estradiol, thyroid hormones and ecdysteroids, was suggested as a potential mechanism for the protection conferred by some of these hormones in infected mice (Barrabes *et al.* 1986; de Mendonca *et al.* 2000). Escobedo and colleagues suggested that the ability of a parasite to affect male or female hosts of the same species differentially can be mediated by hormonal regulation of the host's immune response or by direct hormonal effects on the parasite and that the comprehension of these effects and the molecules involved can facilitate the discovery of new drugs which counterbalance the hormonal effects on the parasites (Escobedo *et al.* 2005).

Recently several high throughput gene expression analyses were performed in Schistosomes using microarrays to study gender differences in gene expression of *S. mansoni* and *S. japonicum*, as well as stage specific and species specific differences between *S. mansoni* and *S. japonicum* (Hoffmann *et al.* 2002; Fitzpatrick *et al.* 2004; Dillon *et al.* 2006; Gobert *et al.* 2006; Vermeire *et al.* 2006). Microarrays were also used to investigate the vertebrate hepatic host response to infection with *S. mansoni* (Hoffmann *et al.* 2001) and the effects of sexual pairing on gene expression (Fitzpatrick

& Hoffmann 2006). These studies have provided important information concerning the biology of the parasite and the host response. In this study, we describe the use of DNA microarrays to study the effect of host sex on *S. mansoni* gene expression in the adult male and female worm. To accomplish this objective we compared male or female worms from unisexual infection in male mice with unisexual worms of the same sex from female mice infections. Our results reveal novel information of genes putatively involved in the parasite response to the host hormonal milieu and may allow the identification of new possible targets for therapeutic intervention.

Material and Methods

Unisexual infections

S. mansoni lifecycle was maintained at Instituto de Pesquisa Rene Rachou, Fiocruz (Brazil). *S. mansoni* is maintained in *Biomphalaria glabrata* as intermediate host. Outbred male and female Swiss mice were used as definite hosts. To obtain unisexual adult worms, *B. glabrata* snails were exposed to a single miracidium, which was generated from eggs obtained from the liver of infected mice (Erasmus 1973). After one month the snails were tested for positive infections by verifying the shedding of cercaria following exposure of the snails to artificial light (Bogea *et al.* 1996). 100-200 cercaria from each snail were injected in the peritoneum of female or male Swiss mice.

Mice were housed conventionally in polypropylene cages with stainless steel screen covers. All animals received lab mouse chow and water *ad libitum*. The animals were killed at 51 days post-infection according to ethical procedures and adult worms were obtained by portal perfusion (Smithers & Terry 1965). The worms were washed in

cold saline solution and checked on the microscope for the presence of possible undesirable mixed sex infections. We separated the unisexual adult worms in multiple pools (each one containing >500 worms which were originated from multiple mice) which were frozen at -80°C until further processing of the samples.

RNA Extraction and Amplification

Total RNA was extracted using Trizol reagent (Invitrogen Life Technologies, CAT#15596-026) according to the manufacture's instructions. The RNA was quantified using a Nanodrop ND-100 UV/Vis spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA) and the overall RNA quality was assessed using denaturing gel electrophoresis (Sambrook *et al.* 1989). Two µg of total RNA from each sample were amplified by doing two rounds of linear amplification using the Amino Allyl MessageAmp II kit (Ambion, CAT#1753). The amplification was done according to manufacture's specifications and aaUTP was used on the second round of amplification so that the final product could be labeled by indirect labeling.

RNA Labeling and Hybridization

Aminoallyl amplified RNA was labeled using Cy3 and Cy5 using indirect labeling according to a modified version of the TIGR's standard operational procedure (Hasseman 2002). In brief, for each hybridization 15 µg of amplified RNA was dried in a speed-vac, resuspended in pH 9.0 carbonate buffer and incubated in the dark for 5 minutes at RT. After this incubation, 4.5 µL of one of the two dyes (Amersham, CAT#PA23001 and PA25001) dissolved in DMSO was added to the solution and the samples were incubated

at RT in the dark for one hour. Labeled RNA was purified away from unincorporated dye using RNeasy MinElute Cleanup Kit (Quiagen, CAT#74204). The Cy3 and Cy5 labeled samples were then combined, dried again, and resuspended in hybridization buffer (50% formamide, 5x SSC, 0.1% SDS).

Microarray Hybridization and Experimental Design

The pools of RNA from male *S. mansoni* worms raised in male hosts were hybridized against the RNA from worms raised in female hosts. Both male and female worm's RNAs were used in two separate experiments. The experiments were performed in duplicate (technical replicate) using a dye swap design in order to account for dye biases. The samples were hybridized using oligonucleotide DNA microarrays sold by Dr. Karl Hoffmann (University of Cambridge, UK). The arrays contained 7335 oligonucleotides (50mers) spotted in duplicate. Each oligonucleotide represented either a singleton (i.e a single EST sequence) or a contig (i.e. a contiguous sequences of overlapping EST sequences) generated by assembly with CAP3. The oligonucleotides were designed based on transcriptome information available at the time (Fitzpatrick *et al.* 2005). Briefly, the slides were pre-hybridized by placing them in coupling jars containing pre-hybridization solution (5X SSC, 0.1% SDS, 1%BSA) for 40 minutes at 42 °C. The slides were then washed by dipping them 10 times in a beaker containing DI water, the water was changed and the operation repeated once. After washing, the slides were spun dry using a table-top high speed microarray centrifuge (TeleChem International Inc., USA). The samples (resuspended in hybridization) were hybridized overnight under cover slips inside Corning® hybridization chambers (Corning, USA) which were kept in a water bath at

42°C on the dark. After the end of the hybridization, slides were washed two times for five minutes each in low stringency wash at 42°C (2x SSC, 0.1% N-lauroylsarcosine), followed by two washes for 5 min in medium stringency wash (0.1x SSC, 0.1% N-lauroylsarcosine) at room temperature and 2 washes for 5 minutes each in high stringency wash solution (0.1X SSC). Immediately after the last wash, slides were spun dry and scanned using a microarray dual channel laser scanner (GenePix 4000B, Molecular Devices, USA) at 10 µm resolution, 100% laser power and PMT levels which were adjusted in order to obtain similar distributions of red and green signal intensities.

Real Time PCR

A subset of genes predicted to be differentially expressed was selected for validation using real-time qRT-PCR. Total amplified RNA (2 µg) from male infection and female infection was used for reverse transcription using TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems; Cat# N808-0234). Products were amplified using the Applied SYBR Green Masters Mix kit (Applied Biosystems, Cat#4309155) in an ABI Prism 7900HT Sequence Detection (Applied Biosystems) with the following profile: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min; 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. Each reaction was performed using 1 µL of cDNA from the RT reaction using a final volume of 20 µL (PCR Master Mix 1X, 200nM of each primer). Expression levels of *S. mansoni* alpha-tubulin (GenBank accession number [M80214](#)) were used as endogenous control within each sample. Relative levels of gene expression were calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak & Schmittgen 2001). Each sample was analyzed for primer dimer, contamination or mispriming by inspection of their dissociation curves.

Data Analysis

Overall, analysis each experiment analyzing host sex effects on gene expression encompassed 6 slides, incorporating 3 replicates and dye swaps. The data, which is MIAME compliant (Brazma *et al.* 2001), was submitted to ArrayExpress at EBI using MIAMExpress (Parkinson *et al.* 2005). Spots were analyzed using GenePix Pro and flagged according to their quality. Raw intensity data was analyzed using R statistical language (Gentleman & Ihaka 1997). The data was inspected for spatial biases on both the red and green channel (background and signal), for print-tip bias, dye bias and intensity dependent bias using the maArray package (Gentleman *et al.* 2004). The data was print tip normalized using a modified version of the robust spline method (Smyth & Speed 2003; Smyth 2004). The statistical analysis was performed using a linear model incorporating replication information. The in slide, dye swap and pool's replicate correlations were calculated using the duplicate Correlation function of limma (Smyth *et al.* 2005). A list of differentially expressed genes was generated by applying a Bayesian smoothing to the linear model fit. Genes which had log odds > 4.6 (99% probability that the gene is differentially expressed between the conditions being compared) and M values >1 or <-1 (2 fold difference among groups) were considered as significant. Because the slides were designed based on the assembly of ESTs from *S. mansoni* and because the genome wasn't available at the time the slides were printed, we decided to test the differentially expressed genes against the complete genome. In brief, pairs of primers were designed for all differentially expressed genes (M values <1 or <-1 and logOdds > 4.6) using a web tool (GenScript) and then tested against the genome and the

predicted complete CDSs using mePCR (Schussler *et al.* 1997) in order to see if each primer pair would “amplify” a single region of the genome. Primer pairs that amplified more than one region were discarded. We further tested the primers to see if two primer pairs would amplify the same gene (i.e. predicted CDS) in order to remove redundant genes (i.e. genes that were spotted more than one time at the arrays because of assembly problems). 46 pairs of primers passed these tests and from those 20 pairs of primers were used for real time PCR.

Further analysis was done using Blast2GO (Conesa *et al.* 2005). This software allows the evaluation of differences in annotation between two groups of data. The analysis of GO terms association for the 145 genes considered differentially expressed in both experimental groups was performed by using the *combined graphs* function of the software. These graphs allow the visualization of the combined annotation of a group of sequences which can be used to study the biological meaning of a subgroup of sequences. Combined graphs are a good alternative to *enrichment analysis* because they don't require a reference group and allow the use of small numbers of sequences (IVIA 2005).

Results and Discussion

Evaluation of replication quality

In order to investigate the quality of our replicates we tested the correlation between different types of replicates using LIMMA (Linear Models for Microarray Data). To generate unisex worms we exposed multiple *B. glabrata* snails to a single miracidium and harvested the cercariae shed by them after one month. After that, multiple mice were infected with unisex cercariae and the worms harvested 51 days post-infection. Our

design included three types of replicates: biological, technical and in slide replicates encompassing 6 slides in total for each experiment. In brief, unisex worms were harvested from multiple male or female mice and pooled separately in pools of 500 worms or more (each pool contained worms from different mices). The RNA from each pool was extracted separately and then hybridized to the slides. Three biological replicates were used for each experiment and each of them was hybridized twice (dye swap). Because each probe was printed in duplicate we also calculate the correlation between in slide replicates.

Basically the approach used was to estimate a common correlation for all the genes within blocks corresponding to each type of replicate. As would be desired, the level of correlation between in slide technical replicates was between 0.92 and 0.81 for male worm and female worm experiments respectively. Dye swap replicates displayed a correlation between -0.94 (male experiment) to -0.68 (female experiment), indicating that the fluorescent dyes introduce a very minimal bias in hybridization intensities. The correlation between our biological replicates using (RNA isolated from different pools of worms) was 0.25 for the female experiment and 0.62 for the experiment investigating host sex effect on male worms.

Differentially expressed genes

Statistical analysis of the data using a linear model to assess differential expressed genes revealed a large number of transcripts of gene products putatively related to host sex effect on both male and female Schistosomes (Table 1). Only genes with at least two-fold difference (\log_2 ratios ≥ 1 or ≤ -1 and \log Odds ≥ 4.6) were considered differentially

expressed. Volcano plots, where the magnitude of the gene expression ratio is displayed on the x-axis and the significance of the difference in expression between groups on the y-axis are shown in (Figure 1).

In relation to the host sex effect on the gene expression of unpaired unisexual Schistosomes we observed that male worms are much more affected than females. While we found only 11 genes that were differentially expressed in females, 134 were found on males. Interestingly, worms that were raised in host of the opposite sex had more genes differentially expressed than worms raised in host of their same sex. In relation to female worms, of the 11 genes found to be differentially expressed, 10 were more expressed in females raised in male mice, while only one gene was more expressed in female worms raised on female mice. On the male worm side, 134 genes were considered to be differentially expressed 79 (59%) being more expressed in worms from infections in female mice, while 55 (41%) were more expressed in worms from infections in male mice. These differences might suggest that indeed there is some sort of communication between worms and hosts and that, apparently, this communication is more prevalent between worms and hosts of opposite sexes. On the other hand, one might explain the differences in the number of differentially expressed genes between experiments on technical issues concerning the hybridizations, since a lower level of correlation between biological replicates was obtained for the female worm experiment.

Due to the small number of genes differentially expressed in immature females, from both male and female hosts, the analysis of these genes became less informative. Nevertheless, using the combined graph function of the software Blast2GO (Conesa *et al.* 2005) and the GO term association provided by the array manufacturer it was possible to

determine that the majority of the differentially expressed genes in females infecting male hosts are related to free radical scavenging (superoxide dismutase) and stress response (HSP70) (Figure 2). This could be a consequence of the fact that testosterone exerts a negative effect on the development of Schistosomes (Nakazawa *et al.* 1997), causing a reduction on the intensity of experimental infections (Barrabes *et al.* 1979). On the other hand, the gene expression in male worms was greatly affected by the host sex.

Although differences in size of *S. hematobium* male worms are observed when worms are raised in hosts of different sex (unpaired worms from male hamsters are larger than unpaired worms from female hamsters) (Purnell 1966), no effect of the host sex on the size of male *S. mansoni* was previously described. On the other hand, it is known that male worms induce more inflammatory response than female worms and that female mice have a stronger inflammatory response than male mice (Boissier *et al.* 2003). This combination of male worm's higher antigenicity and the increased responsivity of the immune system to females might explain the larger number of differentially expressed genes in the last experiment (i.e. effect of host sex on male gene expression). On the other hand, if we analyze the functional categories of the male's most expressed genes from female mice, it is not possible to find evidences that suggest that these males are expressing more genes related to stress or that they are activating defense mechanisms. On the contrary, our results show that it is the male worms from male mice that are expressing more genes related to cellular stress, as for instance heat shock proteins (Contig 4714, SMHSF3, SCMHSF86 e Contig647). Apparently male worms from female mice are more metabolically active, synthesizing more proteins, producing more metabolites, generating more energy and synthesizing more nucleic acids (Figure 3). The

fact that male worms from female mice express more cathepsins (SMA506157, SMA506158 e SMCATHC) and glucose transporter 2A (SCMGTP2A) than worms from infections in male mice, strengthen the hypothesis that these worms are ingesting more red blood cells and, therefore, are more active. Escobedo and colleagues suggested that through genomic and non-genomic mechanisms, the host regulate important processes in the parasite, as for example, growth, differentiation, and reproduction. These mechanisms could allow the parasite to cause a successful infection and, in certain cases, benefit the host through a reduction in the infection (Escobedo *et al.* 2005).

Validation of microarray results using real time quantitative PCR

In order to validate the microarray results we performed qRT-PCR. The contigs considered to be differentially expressed were previously tested against the *S. mansoni* genome to evaluate the validity of the probes printed on the arrays and to remove redundant contigs (i.e. different contigs which represented the same gene).

After designing primers for the genes considered as being statistically significant and testing them against the genome using electronic PCR (Schuler 1997) and BLAST (Altschul *et al.* 1990) to check that they electronically amplified only one unique region of the genome, 6 male and 40 female primers were left (Supplemental material), and were used for real time quantitative PCR. The results from the quantitative PCR were compared against the results of our microarray hybridizations using linear regression analysis and showed a good correlation ($R = 0.55$).

Conclusion

Our results show that many transcripts of *Schistosoma mansoni* worms are affected by the host sex, and that the immature male worms are more affected than immature females. Also, we have shown that worms infecting hosts from their opposite sex are more affected than worms infecting hosts of the same sex. This study adds a large amount of information concerning new genes (either known or unknown) related to the effect of host sex on *Schistosoma mansoni* parasites and start to shed some light on the still poorly understood host/parasite relationship. Since this article provides a completely new set of information concerning this phenomenon, future works will help us understand better the way the hormonal system of the host affects the host physiology. Since most of the differentially expressed genes don't have homology to other genes, further work is necessary to characterize these transcripts and assign biological functions to them. Once the *Schistosoma mansoni* genome becomes available and annotated, it will be possible to extract more interesting information from our data. Nevertheless, we believe that the myriad of up and down regulated genes we found open new and exciting doors for the study of the host/parasite relationship and possibly to the development of new drugs against Schistosomes.

Author's Contributions

MW led the design of the study, performed the RNA amplifications, hybridizations, real time PCRs, statistical analysis of the data and drafted the manuscript. LKJP carried out the unisexual and mixed infections of *B. glabrata* and injection of mice. FPL carried out the mouse perfusions, separation of worms and RNA extractions. GCC participated in the

data analysis performing the mePCR, real time PCR oligonucleotides design and subsequent data treatment. GF, NES and OSC participated in the design and coordination of the study and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge CAPES, FAPEMIG and NIH for financial support. MW Work at TIGR was supported by NIH grant AI48828 to NES). MW Work at UFMG was supported by FAPEMIG grant CBB 469/04 to GRF. MW work on TIGR was supported by a PDEE scholarship from CAPES and his work at UFMG was supported by a CAPES PhD scholarship. We would like to thank Prof. Karl Hoffman for providing the arrays, Prof. Elida ML Rabelo for thoughtful suggestions, Bryan Frank for technical support with the microarray experiments and Delza de Moura Soares Reis and Sueleny Silva Ferreira Texeira for technical assistance with *S. mansoni* life-cycle maintenance and mouse perfusions.

Figure Legends

Figure 1: Volcano plot identifying genes which are significantly different in female (A) and male (B) worms rose in either male or female hosts. The plot displays print tip normalized fluorescence intensity ratios for all replicates on a two-axis system. The x-axis corresponds to the \log_2 of the fold change between mature and immature worms and the y-axis corresponds to the log Odds (or B value) which is the odds (or probability) that a certain gene is differentially expressed. A log Odds value of 0 (horizontal line in each graph) corresponds to a 50-50 chance that the gene is differentially expressed. The log Odds for each gene is proportional to the probability that it is differentially expressed, therefore not a false positive. The pink areas show genes that were considered as differentially expressed, i.e. it showed a fold difference greater than or equal to 2 (\log_2 fold change ≥ 1 or ≤ -1) and log Odds ≥ 4.6 (99% of chance of being statistically significant). The green area shows genes that have log Odds within the acceptable range but which have fold differences smaller than 2.

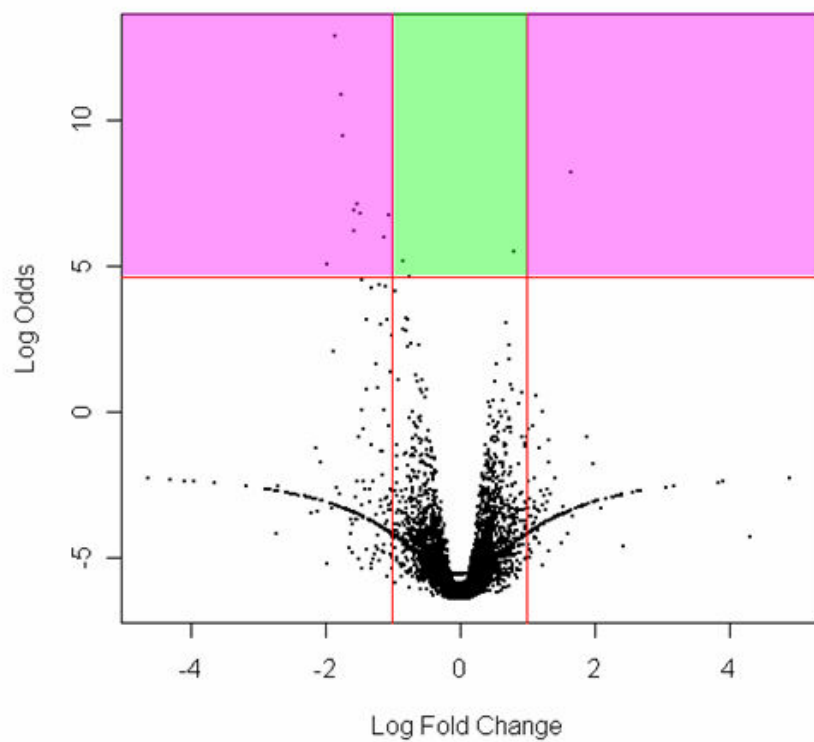
Figure 2: A. combined graph generated using BLAST2GO and representing the sequence distribution of the GO terms (biological process) for the genes differentially expressed in unpaired females and induced by host sex. The direct acyclic graph (DAG) represents the hierarchical structure of the gene ontologies. Rectangles represent non-annotated GO terms and octagons represent annotated GO terms, the arrows show a relation between parent terms where the phrase “is a” show a more specific instance of a parent term while “part of” indicates children which are a constituent of the parent term. The color intensity represents the score calculated by the formula $\sum \text{seq} \times \alpha^{\text{dist}}$, where $\sum \text{seq}$ represents the

number of different annotated sequences in a child GO term, *dist* represents the distance to a node of a child GO term and α is equal to 0.6.

Figure 3: A. Pie plot showing the distribution of GOs for the genes that were present in adult unisex male worms from male or female mice. Figure A represents the biological process category of the GOs in a cross-section of the DAG at its fifth level for the genes more expressed in worms from male mice. Figure B represents the biological process category for the same cross-section in the DAG for the gene more expressed in female mice. The graph does not contain all genes that were up-regulated since the majority of those do not have assigned GOs.

FIGURE 1

A



B

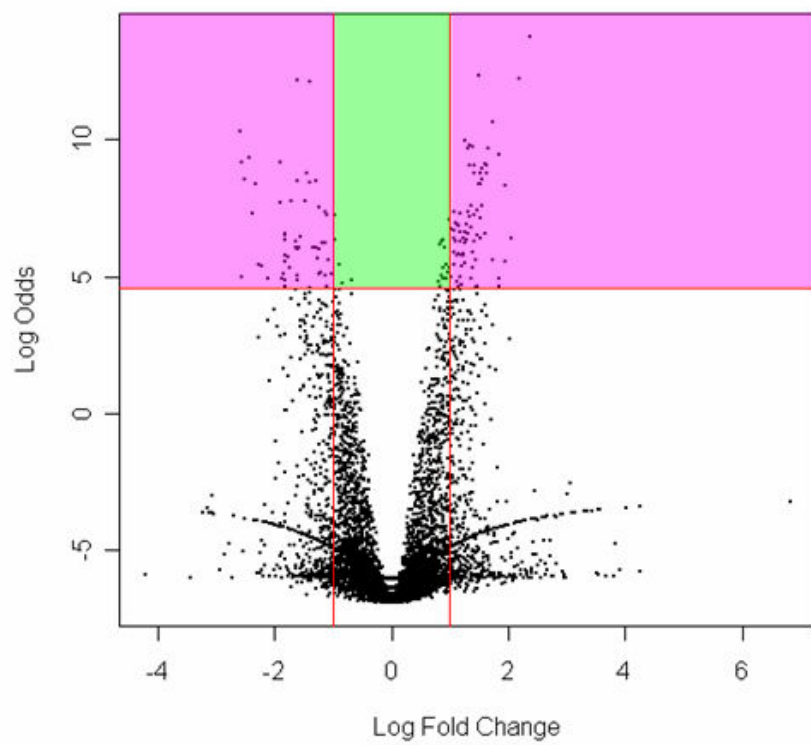
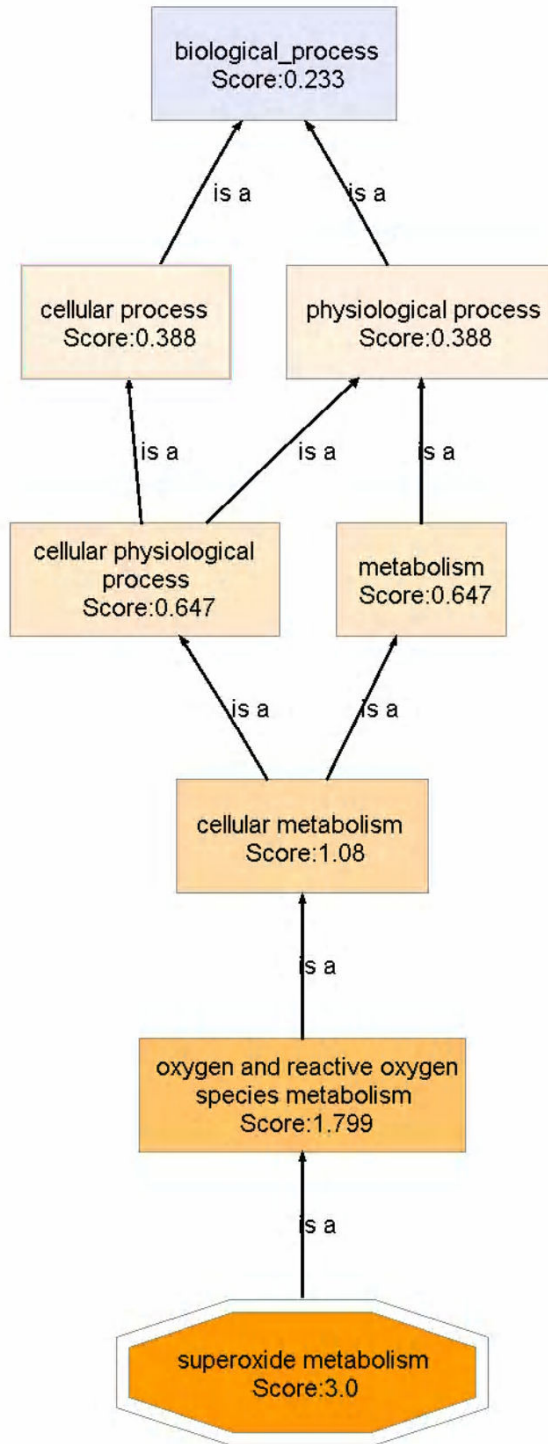


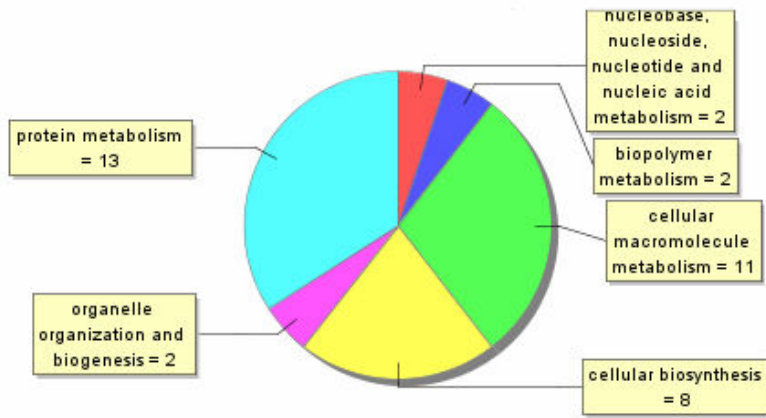
FIGURE 2



biological_process - combined Graph

FIGURE 3

A



B

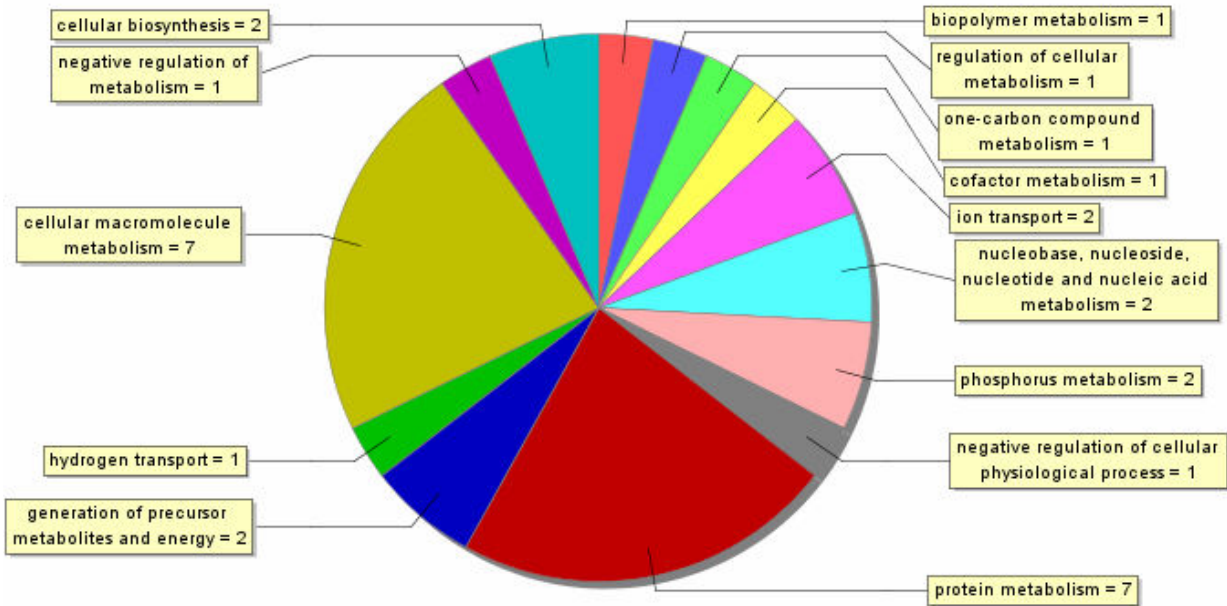


TABLE 1

Name	M	A	P.Value	B
UNKNOWN 3766	-1.8575	9.0344	1.15E-06	12.84184
UNKNOWN 1477	-1.76897	9.106108	8.63E-06	10.86057
SIMILAR TO PUTATIVE ATPASE N2B (HFN2B) 5E-05 POSSIBLE ANTISENSE	-1.74703	8.780119	3.30E-05	9.464698
UNKNOWN 2858	1.659758	9.585481	0.000111	8.201972
S.MANSONI SUPEROXIDE DISMUTASE GENE	-1.51941	10.09884	0.000292	7.115967
S.MANSONI SUPEROXIDE DISMUTASE MRNA, COMPLETE CDS	-1.57503	9.825856	0.000292	6.897044
UNKNOWN 926	-1.46989	8.428688	0.000292	6.794481
SCHISTOSOMA MANSONI 5.8S RIBOSOMAL RNA AND 28S RIBOSOMAL RNA GENES, PARTIAL SEQUENCE, AND INTERNAL TRANSCRIBED SPACER, COMPLETE SEQUENCE	-1.04939	10.79288	0.000292	6.74123
S.MANSONI SUPEROXIDE DISMUTASE GENE, EXON 3, CLONE GT10-38	-1.56705	9.287477	0.000462	6.222483
S.MANSONI MRNA FOR EGG SHELL PROTEIN	-1.11588	10.05405	0.000548	5.972453
UNKNOWN 2443	-1.96128	9.965698	0.001165	5.039006

Table 1: List of the 11 genes differentially expressed in female worms due to host sex effect. M values are the log-ratio of the two expression intensities. A values are the mean log-expression of the two. Genes with negative M values are relatively more expressed in female worms from male mice and genes with positive M values are more expressed in worms from female mice.

TABLE 2

Name	M	A	P.Value	B
UNKNOWN 43	2.362886	13.53064	1.98E-06	13.76335
UNKNOWN 951	1.505898	12.49127	2.71E-06	12.3311
SCHISTOSOMA MANSONI GLUCOSE TRANSPORTER PROTEIN (SGTP2) MRNA, COMPLETE CDS	2.182889	12.96721	2.71E-06	12.22201
UNKNOWN 2474	-1.61066	9.422798	2.71E-06	12.18595
UNKNOWN 1874 POSSIBLE ANTISENSE	-1.38758	10.40621	2.71E-06	12.10012
SIMILAR TO Z-PROTEIN (9E-12)	1.742763	12.89419	1.10E-05	10.65607
SIMILAR TO SCHISTOSOMA MANSONI SMALL SUBUNIT RRNA GENE (DNA LEVEL 0.0)	-2.57929	10.68594	1.34E-05	10.32849
SCHISTOSOMA MANSONI TRANS-SPLICED MRNA, CLONE SL CDNA-22, COMPLETE CDS [POLY-A TAIL REMOVED]	1.250713	9.380706	1.56E-05	9.948117
UNKNOWN 1876 POSSIBLE ANTISENSE	1.345926	9.479259	1.56E-05	9.769874
UNKNOWN 719	1.39899	10.38368	1.56E-05	9.721051
UNKNOWN 651	1.315863	11.50794	1.56E-05	9.680776
MUS MUSCULUS SIMILAR TO CAAX PRENYL PROTEASE 1 HOMOLOG (PRENYL PROTEIN-SPECIFIC ENDOPROTEASE 1) (FARNESYLATED-PROTEINSCONVERTING ENZYME 1) (FACE-1) (ZINC METALLOPROTEINASE STE24 HOMOLOG) (6E-23) (POSSIBLE ANTISENSE)	1.647889	13.66766	1.56E-05	9.680101
SIMILAR TO ECTONUCLEOTIDE PYROPHOSPHATASE/PHOSPHODIESTERASE 4 (9E-11)	1.854054	11.60202	1.79E-05	9.471122
UNKNOWN 1801 POSSIBLE ANTISENSE	-2.43902	9.000921	1.81E-05	9.332329
SIMILAR TO IMPORTIN BETA-1 SUBUNIT (KARYOPHERIN BETA-1 SUBUNIT) (NUCLEAR FACTOR P97) (PORE TARGETING COMPLEX 97 KDA SUBUNIT) 8E-31 POSSIBLE ANTISENSE	-2.57297	9.764081	1.81E-05	9.154893

UNKNOWN 2307	-1.90944	8.121164	1.81E-05	9.143831
SIMILAR TO BAX INHIBITOR-1 (BI-1) (TESTIS ENHANCED GENE TRANSCRIPT) 1E-17 POSSIBLE ANTISENSE	1.612569	14.07474	1.81E-05	9.0873
SIMILAR TO Q9NV64 HYPOTHETICAL PROTEIN FLJ10902 5E-26	1.627432	9.633507	1.81E-05	9.076983
S.MANSONI (LIBERIAN) MRNA FOR CATHEPSIN C	1.337176	12.03883	1.81E-05	9.062362
UNKNOWN 3830	1.408784	11.55577	1.81E-05	9.049954
SIMILAR TO PROBABLE ADENOSYLHOMOCYSTEINASE (EC 3.3.1.1) 1E-92	1.538545	10.60937	1.91E-05	8.952071
SCHISTOSOMA MANSONI NA+/CL- DEPENDENT NEUROTRANSMITTER TRANSPORTER-LIKE PROTEIN (NAT) MRNA, COMPLETE CDS [POLY-A TAIL REMOVED]	1.420444	10.32646	1.95E-05	8.778934
UNKNOWN 1940 POSSIBLE ANTISENSE	-1.44461	10.63516	1.95E-05	8.776532
UNKNOWN 1966	1.516024	11.09016	1.95E-05	8.76891
UNKNOWN 3940	1.636434	13.90436	1.95E-05	8.765622
SIMILAR TO NG, NG-DIMETHYLARGININE DIMETHYLAMINOHYDROLASE 1 (EC 3.5.3.18) 7E-08	1.546974	9.103394	2.17E-05	8.562908
SCHISTOSOMA MANSONI RIBOSOMAL INTERGENIC SPACER DNA	-2.50558	9.173362	2.17E-05	8.545097
SIMILAR TO HYPOTHETICAL PROTEIN CONTAINING RNA RECOGNITION MOTIF (1E-11) POSSIBLE ANTISENSE	-1.29781	10.76493	2.17E-05	8.487014
UNKNOWN 3508	-1.6147	10.98896	2.17E-05	8.46349
UNKNOWN 316 POSSIBLE ANTISENSE	-1.39736	8.571897	2.17E-05	8.432111

Table 2: List of the top 30 most differentially expressed genes in male worms due to host sex effect. M values are the log-ratio of the two expression intensities. A values are the mean log-expression of the two. Genes with negative M values are relatively more expressed in male worms from male mice and genes with positive M values are more expressed in worms from female mice.

Additional Data Files -Table 1

Contig Name	Primer Forward	Primer Reverse
Contig119	AAGAAATCGAGACGAAGGCA	TCATGGTGCACGAAATCCTA
Contig220	CTGGTAAATTTGATCAGACATGG	TGAACGTACAACAACCTCGTTCTG
Contig470	TTCGACAGCCTGCATAGTTG	CCGGGCTAGATTTATTTCCC
Contig481	CTCCATCATGAAAGCACGAA	TAACAGGCCATATGGTGGCT
Contig553	CTCAAGAAGACCCTTGCGTT	CAAGTGCTCAAGGTCCTCTCA
Contig578	CCCTGAAGTCCACCAACAGT	GAGTGCATCAGCCTTGTTGA
Contig800	GGATATCGTGATTGGCCTGT	GCTAAGTTTCCGCCTGTTG
Contig934	TGGGAATTACACGACAAGCA	CAATGGCTGTTGCTTCAAGA
Contig983	GCTTCACCAAGACAACCCAT	TCATTCGGGTCCAAGAAATC
Contig1269	GCACTGATCCTAGTTGTATGGG	GGTCTTGTCATTGTACCTCGAT
Contig1324	GGATGGAGCTTGTGGAAAGA	CGCCAACCTCTACTTGCTTCC
Contig1372	TGAACAATTCCAAGCTGCTG	CTTCAGCACGTTTACGCTTCA
Contig1418	TGCTGAAGTGCTTGAAGTGG	TTCGTCGTTACAAATGGCAA
Contig1443	CACCTGCTGGTTTAGGTGGT	GCCAGTAAGTGCTCGTGGTT
Contig1517	TTTGGCTAATCTCCCTGTCCG	ACCAGACCCTTTGTATGCCA
Contig1536	GCCGCTATTCTGCTCCTAT	TCTGCTCGGATTTCTTGGAT
Contig1617	GGTGGTAGTGGTATTTGTTGTCC	TCTTGATGGCCAATTCATTCT
Contig1625	GGAATTAGTGCAATTACCAGTCG	ACTTGCTGGAATCATCGCTT
Contig1725	TGGATGCTTTCTTGGGTTGT	CTACGCCTGCATAATCCCAT
Contig1741	AAGGGCTCGACTGGGTATTT	CAATCCGGTGACTTTCATTG
Contig1760	TCAAATGGAATTAGAGTCTGGACA	GGAGTCCTGTTGATGACGAC
Contig1834	ATTTCCCTATTTCCGTTGGC	GGACATGAGGAGAAGGTGGA
Contig2027	CGATAGGAGGACTCGTCAGAA	AAGATCACTTATTTTCATCCAGATCG
Contig2670	CGGTCTCCTAATTTATGGATTC	CCACCACTTGGTAGACTACTATCG
Contig2714	GGGTAATGTGCCAGATTGGA	CCATCCACTTCATTGTCATCA

Contig2966	GCCAAGAAACGATCCAGATG	CGGTAGTGCTGTTGGGAAT
Contig3041	TTATCGGTTCCGGTTTGTGT	TGAAGCCCAAAGGAGAAGAG
Contig3086	GGACCATTCCATGCTACACC	ATGCAGTCGTGCATCGTTAG
Contig4238	GGCTGAACACGAAGGAGAAG	GAACCTCCACCGAATCCATA
Contig4483	TTCTCAGTCCTTACCATGTATCTATGA	CCTCAAACGGCCAAGATAGT
Contig4537	AAATTAGAAGAGACAACACCAGTCAA	TAATCCCTGCCACCTTGAAC
Contig4638	AATATTACGTTGGCGTCCCA	ATTTCCCTTTCGCTTTAGCC
Contig5322	CCTGCAATGGCATTCTTCT	TGCTTTC AAGTCATGTGCTG
Contig5587	CAACTAACGCCTCACCAACA	TTCCGGGTTTCGATAAGACTG
Contig5895	CGTTCAGCATAATTGCCCTT	CTGCTCGTGCTGGATTACAA
Contig6875	TTTCTCAATAATAATTGGCCCTT	AGCAGGTGGTCAGTCTACAGG
gi 4090932 gb AF028730.1 AF028730	GCAACAGTATCATTACCGATGAA	TCCATCAGGATCCGAGTTTC
gi 1890610 emb Y11479.1 SM11479	GTTGAGACTTCCGCCAAGAC	TTTCTGATCTCCCGGACAAG
gi 1314717 gb U54586.1 S MU54586	ACCGTCACCTCCATATCCTG	AGTGTGGCCGACCATAATTC
gi 407042 gb L25066.1 S CMGTP2A	TCTACCCGAAACGAAAGGAA	TTTCATGTGCTTCTGTCCCA
gi 161095 gb M28888.1 S CMSMA	TGGAAAGAACTTCAAGAAGATCA	TCTTCGACATCAATTTCTCCA

Supplemental Table 1: Sequence of the oligonucleotides that passed all filtering criteria and that were selected for performing qRT-PCR.

References

- Altschul, S. F., W. Gish, et al. (1990). "Basic local alignment search tool." J Mol Biol **215**(3): 403-10.
- Barrabes, A., T. H. Duong, et al. (1979). "Effect of testosterone or progesterone implants on the intensity of experimental infestation with *Schistosoma mansoni* in the female golden hamster." C R Seances Soc Biol Fil **173**(1): 153-6.
- Barrabes, A., J. Goma-Mouanda, et al. (1986). "17-B estradiol receptors in *Schistosoma mansoni*. Contribution to the explanation of the protective power of this hormone in *Schistosoma mansoni* bilharziasis in the mouse. Preliminary study." Ann Parasitol Hum Comp **61**(6): 637-641.
- Bogea, T., T. C. Favre, et al. (1996). "Circadian pattern of cercarial emergence in *Schistosoma mansoni* (Platyhelminthes:Digenea) from isolated *Biomphalaria glabrata*." Chronobiol Int **13**(2): 93-101.
- Boissier, J., K. Chlichlia, et al. (2003). "Preliminary study on sex-related inflammatory reactions in mice infected with *Schistosoma mansoni*." Parasitol Res **91**(2): 144-50.
- Boros, D. L. (1989). "Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection." Clin Microbiol Rev **2**(3): 250-69.
- Brazma, A., P. Hingamp, et al. (2001). "Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data." Nat Genet **29**(4): 365-71.

- Conesa, A., S. Gotz, et al. (2005). "Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research." Bioinformatics **21**(18): 3674-6.
- Damian, R. T. (1997). "Parasite immune evasion and exploitation: reflections and projections." Parasitology **115**((Suppl.)): S169-S175.
- de Mendonca, R. L., H. Escriva, et al. (2000). "Hormones and nuclear receptors in schistosome development." Parasitol Today **16**(6): 233-40.
- Dillon, G. P., T. Feltwell, et al. (2006). "Microarray analysis identifies genes preferentially expressed in the lung schistosomulum of *Schistosoma mansoni*." Int J Parasitol **36**(1): 1-8.
- Eloi-Santos, S., N. J. Olsen, et al. (1992). "*Schistosoma mansoni*: mortality, pathophysiology, and susceptibility differences in male and female mice." Exp Parasitol **75**(2): 168-75.
- Erasmus, D. A. (1973). "A comparative study of the reproductive system of mature, immature and "unisexual" female *Schistosoma mansoni*." Parasitology **67**(2): 165-83.
- Escobedo, G., C. W. Roberts, et al. (2005). "Parasite regulation by host hormones: an old mechanism of host exploitation?" Trends Parasitol **21**(12): 588-593.
- Fitzpatrick, J. M. and K. F. Hoffmann (2006). "Dioecious *Schistosoma mansoni* express divergent gene repertoires regulated by pairing." Int J Parasitol **36**: 1081-1089.
- Fitzpatrick, J. M., M. V. Johansen, et al. (2004). "Gender-associated gene expression in two related strains of *Schistosoma japonicum*." Mol Biochem Parasitol **136**(2): 191-209.

- Fitzpatrick, J. M., D. A. Johnston, et al. (2005). "An oligonucleotide microarray for transcriptome analysis of *Schistosoma mansoni* and its application/use to investigate gender-associated gene expression." Mol Biochem Parasitol **141**(1): 1-13.
- GenScript, C. (2006). Real-Time PCR Primer Design, GenScript Cooperation.
- Gentleman, R. and R. Ihaka (1997). The R language. Proceedings of the 28th Symposium on the Interface, The Interface Foundation of North America.
- Gentleman, R. C., V. J. Carey, et al. (2004). "Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics." Genome Biol **5**(10): R80.
- Gobert, G. N., R. McInnes, et al. (2006). "Transcriptomics tool for the human *Schistosoma* blood flukes using microarray gene expression profiling." Exp Parasitol.
- Hasseman, J. (2002). Aminoallyl labelling of RNA for microarrays - SOP #: M004, TIGR. **2006**.
- Hoffmann, K. F., D. A. Johnston, et al. (2002). "Identification of *Schistosoma mansoni* gender-associated gene transcripts by cDNA microarray profiling." Genome Biol **3**(8): RESEARCH0041.
- Hoffmann, K. F., T. C. McCarty, et al. (2001). "Disease fingerprinting with cDNA microarrays reveals distinct gene expression profiles in lethal type 1 and type 2 cytokine-mediated inflammatory reactions." FASEB J **15**(13): 2545-7.
- IVIA, C. d. G. (2005). Blast2Go Tutorial, Centro de Genómica IVIA. **2006**.
- Klein, S. L. (2004). "Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection." Parasite Immunology **26**: 246-264.

- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-8.
- LoVerde, P. T., E. G. Niles, et al. (2004). "Schistosoma mansoni male-female interactions." Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie **82**(2): 357-374.
- Morales-Montor, J., F. Mohamed, et al. (2001). "In vitro effects of hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) hormones on *Schistosoma mansoni*." J. Parasitol. **87**(5): 1132-1139.
- Nakazawa, M., M. R. Fantappie, et al. (1997). "Schistosoma mansoni: susceptibility differences between male and female mice can be mediated by testosterone during early infection." Exp Parasitol **85**(3): 233-40.
- Parkinson, H., U. Sarkans, et al. (2005). "ArrayExpress--a public repository for microarray gene expression data at the EBI." Nucleic Acids Res **33**(Database issue): D553-5.
- Purnell, R. E. (1966). "Host-parasite relationships in schistosomiasis. II. The effects of age and sex on the infection of mice and hamsters with cercariae of *Schistosoma mansoni* and of hamsters with cercariae of *Schistosoma haematobium*." Ann Trop Med Parasitol **60**(1): 94-9.
- Remoue, F., J. C. Mani, et al. (2002). "Functional specific binding of testosterone to *Schistosoma haematobium* 28-kilodalton glutathione S-transferase." Infect Immun **70**(2): 601-5.

- Sambrook, J., E. F. Fritsch, et al. (1989). Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schuler, G. D. (1997). "Sequence mapping by electronic PCR." Genome Res **7**(5): 541-50.
- Schussler, P., C. G. Grevelding, et al. (1997). "Identification of Ras, MAP kinases, and a GAP protein in *Schistosoma mansoni* by immunoblotting and their putative involvement in male-female interaction." Parasitology **115 (Pt 6)**: 629-34.
- Smithers, S. R. and R. J. Terry (1965). "The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms." Parasitology **55**(4): 695-700.
- Smyth, G. K. (2004). "Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments." Stat Appl Genet Mol Biol **3**(1): Article 3.
- Smyth, G. K., J. Michaud, et al. (2005). "The use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments." Bioinformatics **21**(9): 2067-2075.
- Smyth, G. K. and T. P. Speed (2003). "Normalization of cDNA microarray data." Methods **31**: 265-273.
- Vermeire, J. J., A. S. Taft, et al. (2006). "Schistosoma mansoni: DNA microarray gene expression profiling during the miracidium-to-mother sporocyst transformation." Mol Biochem Parasitol **147**(1): 39-47.

ANEXO III – Listas de genes diferencialmente expresos

Tabela 2: Lista dos genes diferencialmente expressos obtida a partir do estudo do efeito do pareamento sexual na expressão gênica em fêmeas de *S. mansoni*. A tabela apresenta os valores de M, ($\log_2 R/G$), A ($1/2\log_2 RG$), p (baseado na distribuição t moderada) e de B ($\log_e p/1-p$). O genes estão ordenados dos mais diferencialmente expressos para os menos diferencialmente expressos. Valores negativos de M indicam que o gene esta mais expresso em vermes pareados e vice-versa.

Name	SEQ_NAME	M	A	P.Value	B
UNKNOWN 2572 POSSIBLE ANTISENSE	Contig4619	-2.952	9.425281	1.82E-09	20.28471
EXTRACELLULAR SUPEROXIDE DISMUTASE [CU-ZN] PRECURSOR (EC1.15.1.1) (EC-SOD) (6E-97)	Contig119	-4.87765	11.60992	1.82E-09	19.63774
SIMILAR TO PUTATIVE ATPASE N2B (HFN2B) 5E-05 POSSIBLE ANTISENSE	Contig2624	-4.35533	10.84994	1.82E-09	19.52752
SIMILAR TO FEMALE SPECIFIC EGG SHELL PROTEIN ORF 2 (1E-144)	Contig1625	-4.01426	10.33001	2.50E-09	18.98957
UNKNOWN 1477	Contig2648	-4.33754	9.800644	4.64E-09	18.23096
UNKNOWN 926	Contig1964	-2.98913	9.805078	8.60E-09	17.47801
UNKNOWN 535 POSSIBLE ANTISENSE	Contig1032	-3.40882	8.462215	8.60E-09	17.35275
UNKNOWN 2609 POSSIBLE ANTISENSE	Contig4087	-3.15909	9.170634	1.00E-08	17.08715
UNKNOWN 1495	Contig2670	-3.73336	7.836334	1.30E-08	16.73344
S.MANSONI 18S RRNA GENE, COMPLETE SEQUENCE	SCMESSA	-2.22838	9.47819	2.13E-08	16.09908
UNKNOWN 3085	Contig5242	-2.32362	10.75529	2.13E-08	16.0123
UNKNOWN 1805 POSSIBLE ANTISENSE	Contig3060	-2.98844	7.133567	2.13E-08	15.99013
UNKNOWN 46	Contig86	-2.76549	7.536724	2.28E-08	15.84937
S.MANSONI EGG SHELL PROTEIN MRNA, 3' END	SCMESP	-3.67133	8.873222	2.43E-08	15.71608
UNKNOWN 778	Contig1669	-2.80045	9.831668	2.47E-08	15.63407
SCHISTOSOMA MANSONI RIBOSOMAL INTERGENIC SPACER DNA	SMA223842	-2.75235	10.10216	2.63E-08	15.51265
SCHISTOSOMA MANSONI SMALL SUBUNIT RRNA GENE	SMSSRRNA	-2.24428	13.00096	2.78E-08	15.37668
SIMILAR TO SCHISTOSOMA MANSONI SMALL SUBUNIT RRNA GENE (DNA LEVEL 0.0)	Contig2047	-3.2744	12.32288	2.78E-08	15.34303
UNKNOWN 475	Contig854	-3.24917	8.766573	3.41E-08	15.09577
SIMILAR TO PLASMA KALLIKREIN PRECURSOR (EC 3.4.21.34) 1E-11	Contig2283	2.279732	12.00887	4.23E-08	14.85961
UNKNOWN 398	Contig725	1.681984	12.69879	6.36E-08	14.34951
UNKNOWN 2268	Contig3596	-2.88739	7.592068	6.36E-08	14.3456
SIMILAR TO RAS-LIKE GTP-BINDING PROTEIN RHO (2E-89)	Contig1324	2.132092	12.85641	1.06E-07	13.80212
UNKNOWN 2741	Contig4324	1.964007	11.25831	1.13E-07	13.69066
SIMILAR TO ALDEHYDE DEHYDROGENASE 1 FAMILY, MEMBER B1 (1E-160)	Contig2030	2.657143	13.41307	1.19E-07	13.60106
SIMILAR TO INTEGRAL MEMBRANE TRANSPORTER PROTEIN (2E-06) POSSIBLE ANTISENSE	Contig1662	-2.39694	8.207927	1.27E-07	13.49697
UNKNOWN 260 POSSIBLE ANTISENSE	Contig474	2.167414	13.61931	1.46E-07	13.32216
UNKNOWN 4495	Contig7099	-2.82213	7.45355	1.60E-07	13.17003
UNKNOWN 1207	Contig2353	-3.21405	8.954047	1.60E-07	13.16436

SIMILAR TO CD36 ANTIGEN (MELANOMA-ASSOCIATED ANTIGEN ME491) (LYSOSOME-ASSOCIATED MEMBRANE GLYCOPROTEIN 3) (LAMP-3) 5E-15 POSSIBLE ANTISENSE	Contig1536	-2.20063	11.82818	1.85E-07	12.98693
SCHISTOSOMA MANSONI ANNEXIN MRNA, COMPLETE CDS [POLY-A TAIL REMOVED]	AF065599	1.944505	8.809901	1.92E-07	12.91577
UNKNOWN 3554	Contig5970	-3.26737	11.33136	1.92E-07	12.88167
SCHISTOSOMA MANSONI 28S RRNA GENE GAP REGION	SM28SGAP	-2.27731	8.995688	2.09E-07	12.76697
UNKNOWN 467	Contig841	1.768614	9.305115	2.67E-07	12.48539
S.MANSONI CERCARIAL PROTEASE MRNA, COMPLETE CDS	SCMCPROT	-2.22148	8.4533	2.67E-07	12.44815
S.MANSONI GENE FOR 16S RIBOSOMAL RNA SMALL SUBUNIT	SM16SRSS	-2.02193	10.37825	2.67E-07	12.43185
SIMILAR TO EGG SHELL PROTEIN PRECURSOR (CHORION PROTEIN) 2E-12 POSSIBLE ANTISENSE	Contig6116	-3.37015	10.20964	2.67E-07	12.40895
SCHISTOSOMA MANSONI 18S RIBOSOMAL RNA GENE, COMPLETE SEQUENCE	SMU65657	-2.73232	11.89983	2.99E-07	12.31331
UNKNOWN 1731 POSSIBLE ANTISENSE	Contig2973	-1.70305	8.89865	2.99E-07	12.25426
SCHISTOSOMA MANSONI CLONE SM20 SATELLITE SEQUENCE	AF036756	-1.60787	10.1749	3.10E-07	12.18244
UNKNOWN 410	Contig739	-2.2865	7.672898	3.42E-07	12.05969
SCHISTOSOMA MANSONI TEGUMENT ANTIGEN (I(H)A) MRNA, COMPLETE CDS	SCMANTTEG	1.846365	11.06314	3.76E-07	11.94046
UNKNOWN 692	Contig1457	1.744556	10.4101	4.39E-07	11.7613
S.MANSONI MRNA FOR EGG SHELL PROTEIN	SMEGGPRO	-2.41835	11.18733	4.53E-07	11.70582
SIMILAR TO FIB PROTEIN (4E-55) (POSSIBLE ANTISENSE)	Contig347	-1.76723	10.50951	4.68E-07	11.6499
SIMILAR TO FEMALE SPECIFIC EGG SHELL PROTEIN (ORF-RF2) 2E-32	Contig1557	-3.08479	8.469248	4.78E-07	11.58582
UNKNOWN 4106	Contig6657	-1.64327	10.94892	4.78E-07	11.57232
UNKNOWN 3766	Contig6245	-3.48564	11.90489	4.78E-07	11.56443
S.MANSONI SUPEROXIDE DISMUTASE GENE	SEG_SCMSOD	-2.45629	13.36586	7.61E-07	11.07336
SCHISTOSOMA MANSONI RECEPTOR FOR ACTIVATED PKC MRNA, COMPLETE CDS [POLY-A TAIL REMOVED]	AF422164.1	-1.35532	11.8213	8.19E-07	10.97902
UNKNOWN 41	Contig81	1.509887	7.870918	8.26E-07	10.94886
SIMILAR TO PUTATIVE SRNP (7E-07)	Contig1469	-2.20731	9.06815	8.26E-07	10.93064
UNKNOWN 4053	Contig6581	1.701827	10.2814	8.45E-07	10.88804
S.MANSONI PARTIAL GENE FOR 5.8S RIBOSOMAL RNA	SM58SRRNA	-1.94421	10.27246	8.58E-07	10.88021
UNKNOWN 1943 POSSIBLE ANTISENSE	Contig3238	-2.30348	7.747595	8.51E-07	10.8625
S.MANSONI 20KD CALCIUM-BINDING PROTEIN (SM20) MRNA, 3' END	SCMSMA	1.830265	10.879	8.58E-07	10.82825

SIMILAR TO TYROSINASE (7E-12) DISTINCT FROM CONTIG 948	Contig1617	-1.51264	8.691912	8.58E-07	10.81018
SIMILAR TO MYOSIN HEAVY CHAIN (0.0)	Contig1372	1.388958	12.97842	8.64E-07	10.77401
UNKNOWN 4206	Contig6773	2.474642	13.83213	8.74E-07	10.74591
UNKNOWN 2024	Contig3324	-2.85139	8.364675	9.42E-07	10.71044
UNKNOWN 4391	Contig6983	-3.37118	8.90311	9.10E-07	10.68755
UNKNOWN 359 POSSIBLE ANTISENSE	Contig671	1.829874	11.56745	9.42E-07	10.61912
S.MANSONI (LIBERIA) MRNA FOR TANDEM REPEAT	SMTANREP	-2.13656	13.7598	1.10E-06	10.44866
SIMILAR TO DIACYLGLYCEROL ACYLTRANSFERASE 2-LIKE PROTEIN (3E-54) POSSIBLE ANTISENSE	Contig1301	-2.18265	10.16471	1.16E-06	10.37794
UNKNOWN 764	Contig1638	-2.46053	11.55995	1.17E-06	10.35168
SCHISTOSOMA MANSONI FEMALE-SPECIFIC 800 PROTEIN (FS800) MRNA, COMPLETE CDS	SCMFS800	-2.38312	7.721673	1.19E-06	10.31519
UNKNOWN 1199	Contig2343	1.233815	12.41135	1.20E-06	10.29373
SIMILAR TO UTP-GLUCOSE-1-PHOSPHATE URIDYLTRANSFERASE 2 (EC 2.7.7.9) (UDP-GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE 2) 1E-11 POSSIBLE ANTISENSE	Contig4515	1.475677	12.00253	1.23E-06	10.25304
SIMILAR TO MOLYBDENUM COFACTOR BIOSYNTHESIS PROTEIN C (6E-05) POSSIBLE ANTISENSE	Contig6875	-1.42411	9.624922	1.27E-06	10.20685
S.MANSONI SUPEROXIDE DISMUTASE GENE, EXON 3, CLONE GT10-38	SCMSOD3	-2.36174	12.57934	1.28E-06	10.17524
UNKNOWN 493	Contig906	1.923274	7.572761	1.28E-06	10.16722
SIMILAR TO MUSCLE LIM PROTEIN (5E-26)	Contig4238	1.699382	8.384943	1.30E-06	10.13977
SCHISTOSOMA MANSONI INTERNAL TRANSCRIBED SPACER 2, PARTIAL SEQUENCE	AF503487.1	-1.51557	12.45123	1.44E-06	10.02294
UNKNOWN 3318	Contig5629	-1.51048	10.5088	1.50E-06	9.967169
UNKNOWN 2058	Contig3360	-1.80502	8.776936	1.50E-06	9.941393
SCHISTOSOMA MANSONI 5.8S RIBOSOMAL RNA AND 28S RIBOSOMAL RNA GENES, PARTIAL SEQUENCE, AND INTERNAL TRANSCRIBED SPACER, COMPLETE SEQUENCE	SMU22168	-1.8295	11.84935	1.50E-06	9.933632
S.MANSONI SUPEROXIDE DISMUTASE MRNA, COMPLETE CDS	SCMSODM	-2.4478	13.55374	1.50E-06	9.919414
UNKNOWN 1920 POSSIBLE ANTISENSE	Contig3210	-2.34961	11.07156	1.50E-06	9.910645
UNKNOWN 3019	Contig5171	-2.55364	8.539148	1.51E-06	9.884488
SIMILAR TO 60S ACIDIC RIBOSOMAL PROTEIN P1 (2E-15)	Contig1344	-1.62083	14.4536	1.51E-06	9.881287
UNKNOWN 4112	Contig6665	1.356845	12.26373	1.61E-06	9.801828
SIMILAR TO APOFERRITIN-2 (4E-16) POSSIBLE ANTISENSE	Contig4076	2.024692	12.87308	1.69E-06	9.740303
UNKNOWN 2501 POSSIBLE ANTISENSE	Contig4512	1.607867	10.40688	2.10E-06	9.674965

SCHISTOSOMA MANSONI GYNECOPHORAL CANAL PROTEIN MRNA, COMPLETE CDS	SMU47862	1.34232	11.4874	1.79E-06	9.666478
UNKNOWN 132	Contig220	1.506109	12.40453	1.83E-06	9.632723
UNKNOWN 43	Contig83	1.741004	11.68111	2.35E-06	9.354865
SIMILAR TO FIMBRIN - COMPONENT OF BOTH F-ACTIN PATCHES AND THE F-ACTIN RING (1E-121)	Contig4560	1.675193	10.30709	2.43E-06	9.307041
UNKNOWN 3788	Contig6271	1.753192	9.107862	2.47E-06	9.278273
SIMILAR TO SIGNAL SEQUENCE RECEPTOR, DELTA (9E-17)	Contig1440	-1.20996	10.95174	2.56E-06	9.232538
SIMILAR TO TYROSINASE (EC 1.14.18.1) 6E-33	Contig948	-1.74061	12.53667	2.77E-06	9.133044
UNKNOWN 735	Contig1547	-1.70805	9.222625	2.77E-06	9.129367
SIMILAR TO HCNP PROTEIN, XPA-BINDING PROTEIN 2 (6E-21) POSSIBLE ANTISENSE	Contig5631	-1.31932	10.29708	2.77E-06	9.117285
SIMILAR TO ATP:GUANIDINO KINASE SMC74 (EC 2.7.3.-) (ATP:GUANIDINO PHOSPHOTRANSFERASE) 1E-73	Contig800	1.194024	10.47276	3.13E-06	8.982413
SIMILAR TO IMPORTIN BETA-1 SUBUNIT (KARYOPHERIN BETA-1 SUBUNIT) (NUCLEAR FACTOR P97) (PORE TARGETING COMPLEX 97 KDA SUBUNIT) 8E-31 POSSIBLE ANTISENSE	Contig3046	-2.09242	11.12569	3.17E-06	8.95452
SIMILAR TO NOVEL DNAJ DOMAIN PROTEIN SIMILAR TO DROSOPHILA, C. ELEGANS., AND ARABIDOPSIS PREDICTED PROTEINS (ISOFORM 1) 1E-47	Contig1725	-1.0756	9.983704	3.17E-06	8.947782
UNKNOWN 1367	Contig2525	-1.89664	11.83538	3.29E-06	8.897392
UNKNOWN 3381	Contig5717	-1.2054	9.323749	3.38E-06	8.859459
SIMILAR TO PINHEAD/ZWILLE PROTEIN (2E-43) - OVERLAPPING FUNCTIONS WITH ARGONAUTE 1 POSSIBLE ANTISENSE	Contig1585	-1.23858	8.876383	3.40E-06	8.825396
SIMILAR TO HISTONE H2A (2E-40)	Contig1418	-1.50982	9.664382	3.40E-06	8.825264
UNKNOWN 4175	Contig6733	1.306026	12.2836	3.40E-06	8.822033
UNKNOWN 584 POSSIBLE ANTISENSE	Contig1168	-1.70726	10.97738	3.56E-06	8.759958
SCHISTOSOMA MANSONI DYNEIN LIGHT CHAIN (SMDLC) MRNA, COMPLETE CDS [POLY-A TAIL REMOVED]	SMU55992	1.504301	12.3314	3.56E-06	8.753663
UNKNOWN 1989	Contig3288	1.504747	8.126186	3.68E-06	8.710976
TEGUMENT ANTIGEN (I(H)A) (ANTIGEN SMA22.6) (2E-47)	Contig105	1.643232	8.687452	4.12E-06	8.583899
UNKNOWN 3031	Contig5185	1.530685	12.03535	4.41E-06	8.505355
SIMILAR TO INOSINE 5'-PHOSPHATE DEHYDROGENASE 2 (5E-56)	Contig983	-1.52812	8.160283	4.44E-06	8.487645
UNKNOWN 4007	Contig6531	1.361333	8.974824	4.51E-06	8.461665
UNKNOWN 3137 POSSIBLE ANTISENSE	Contig5327	-1.87041	7.69828	4.53E-06	8.449489

SCHISTOSOMA MANSONI U1 SMALL NUCLEAR RNA	L25919	-2.94305	7.371561	4.80E-06	8.377679
UNKNOWN 1759 POSSIBLE ANTISENSE	Contig3003	-2.11714	10.58189	4.80E-06	8.361573
SIMILAR TO 34 KDA EGG SHELL PROTEIN (3E-34) POSSIBLE ANTISENSE	Contig867	-2.37213	11.22135	4.80E-06	8.360732
UNKNOWN 1698	Contig2934	1.821776	8.449937	5.02E-06	8.304494
UNKNOWN 2096	Contig3404	-1.74581	7.660313	5.08E-06	8.283877
SCHISTOSOMA MANSONI SURFACE MEMBRANE ANTIGEN (SM25) GENE, COMPLETE CDS	AF028730	1.64526	8.59283	5.08E-06	8.274481
UNKNOWN 1649	Contig2881	-4.12361	10.08079	5.18E-06	8.23725
SIMILAR TO NADH-CYTOCHROME B5 REDUCTASE (EC 1.6.2.2) 4E-45	Contig1517	1.652877	13.08227	5.18E-06	8.236837
SIMILAR TO RIBOSOMAL PROTEIN L21 (4E-49)	Contig4367	-1.32774	11.14364	5.42E-06	8.182502
UNKNOWN 553	Contig1074	1.468684	10.72139	5.56E-06	8.145864
SIMILAR TO MANGANESE CONTAINING SUPEROXIDE DISMUTASE PRECURSOR (EC 1.15.1.1) 2E-80 POSSIBLE ANTISENSE	Contig541	1.490571	13.61154	5.64E-06	8.122552
UNKNOWN 3973	Contig6488	1.155597	10.4083	6.25E-06	8.009798
UNKNOWN 2835	Contig4465	-1.97094	6.212684	6.48E-06	7.959652
UNKNOWN 2765	Contig4364	1.838949	7.962564	6.48E-06	7.954948
S.MANSONI (AFRICA, SENEGAL) INTERNAL TRANSCRIBED SPACER, REPETITIVE AND CHI-LIKE DNA	SMCHIITS	-1.97529	11.40059	6.71E-06	7.911089
UNKNOWN 1065	Contig2171	-2.54831	12.73524	7.01E-06	7.85769
UNKNOWN 4020	Contig6545	-1.48278	7.492699	7.07E-06	7.840531
SIMILAR TO TUMOUR DIFFERENTIALLY EXPRESSED 1 (DIFF33), ISOFORM 2) 3E-14 POSSIBLE ANTISENSE	Contig3887	1.462801	9.080742	7.09E-06	7.82902
SIMILAR TO 6230429P13RIK PROTEIN (2E-04)	Contig804	-1.76936	6.519889	7.18E-06	7.807759
S.MANSONI SUPEROXIDE DISMUTASE GENE, EXON 2, CLONE GT10-38	SCMSOD2	-3.36472	8.589725	9.42E-06	7.76061
SIMILAR TO ADP-RIBOSYL CYCLASE 1 (EC 3.2.2.5) (CYCLIC ADP-RIBOSE HYDROLASE 1) (NIM-R5 ANTIGEN) 4E-14 POSSIBLE ANTISENSE	Contig1415	1.412428	11.75281	7.91E-06	7.700211
SIMILAR TO ASPARTYL-TRNA SYNTHETASE (EC 6.1.1.12) 6E-64 POSSIBLE ANTISENSE	Contig530	-1.59133	11.00156	7.92E-06	7.690521
UNKNOWN 4243	Contig6817	1.187173	9.821172	8.23E-06	7.643508
SIMILAR TO VITELLINE PROTEIN B2 PRECURSOR (0.27)	Contig819	-2.73289	7.316002	8.71E-06	7.637724
SCHISTOSOMA MANSONI CALCIUM BINDING PROTEIN (SM20) MRNA, COMPLETE CDS	SCMSM20	1.642458	13.086	8.33E-06	7.623415
SIMILAR TO TYROSINASE PRECURSOR (EC 1.14.18.1) 1E-05 POSSIBLE ANTISENSE	Contig4000	-3.79236	6.068089	8.61E-06	7.580518
SCHISTOSOMA MANSONI SERPIN (SPI) GENE, 3' END	SCMSPIB	1.477778	10.74744	8.62E-06	7.571705

UNKNOWN 1880 POSSIBLE ANTISENSE	Contig3163	-1.66201	12.39764	8.71E-06	7.547963
UNKNOWN 933	Contig1971	1.568393	7.307831	8.76E-06	7.531998
SIMILAR TO PUTATIVE RIBOSOMAL PROTEIN S27 AND PUTATIVE ZINC FINGER PROTEIN (5E-21)	Contig2279	-1.31256	12.67482	8.94E-06	7.503983
UNKNOWN 3694 POSSIBLE ANTISENSE	Contig6163	-1.92097	13.60409	9.38E-06	7.447358
UNKNOWN 2440 POSSIBLE ANTISENSE	Contig3800	1.127447	11.85129	9.60E-06	7.408226
SCHISTOSOMA MANSONI (CLONE SMP50) IMMUNOPHILIN MRNA, COMPLETE CDS	SCMIMM	1.512969	11.22059	9.82E-06	7.378045
UNKNOWN 2487 POSSIBLE ANTISENSE	Contig3882	1.52849	9.344718	1.07E-05	7.285776
SIMILAR TO PROTEASOME SUBUNIT ALPHA TYPE 5 (EC 3.4.25.1) (PROTEASOME ZETA CHAIN) 1E-85	Contig2070	1.124866	10.16777	1.08E-05	7.269299
UNKNOWN 825	Contig1760	-1.46917	11.42383	1.09E-05	7.248545
UNKNOWN 2112	Contig3423	-1.45493	9.603339	1.13E-05	7.193914
UNKNOWN 2602 POSSIBLE ANTISENSE	Contig4667	1.182123	10.07887	1.13E-05	7.193384
UNKNOWN 608	Contig1234	1.155983	13.44875	1.13E-05	7.188989
UNKNOWN 3923	Contig6430	1.41877	9.533805	1.16E-05	7.153208
UNKNOWN 3747	Contig6225	1.727317	7.727054	1.17E-05	7.142315
UNKNOWN 974	Contig2027	1.432722	10.348	1.19E-05	7.08407
UNKNOWN 2624	Contig4707	-1.9449	6.168442	1.19E-05	7.082669
UNKNOWN 2084	Contig3389	-1.95381	6.133431	1.19E-05	7.081766
UNKNOWN 616	Contig1257	-1.2968	12.00302	1.19E-05	7.077263
SIMILAR TO PAS1 PROTEIN (NUCLEAR DNA-BINDING PROTEIN) 2E-31	Contig1741	-1.54325	10.05592	1.19E-05	7.072663
UNKNOWN 1752 POSSIBLE ANTISENSE	Contig2995	-1.28124	9.694568	1.19E-05	7.072139
UNKNOWN 3650	Contig6104	1.543426	11.5783	1.20E-05	7.061688
SIMILAR TO SCHISTOSOMA MANSONI SM29 (1E-113) POSSIBLE ANTISENSE	Contig2026	1.665318	13.09531	1.24E-05	7.013664
SIMILAR TO AAM33216 CG5792 PROTEIN (7E-06) POSSIBLE ANTISENSE	Contig4488	-2.16158	12.1021	1.25E-05	6.997616
SIMILAR TO RIBOSOMAL PROTEIN L15 (1E-24) POSSIBLE ANTISENSE	Contig3066	-1.1143	13.53904	1.27E-05	6.97527
UNKNOWN 1785 POSSIBLE ANTISENSE	Contig3033	-1.64117	12.73507	1.27E-05	6.971901
SIMILAR TO LECITHIN-CHOLESTEROL ACYLTRANSFERASE LCAT (2E-25)	Contig5322	1.850618	10.2481	1.28E-05	6.952692
UNKNOWN 3806	Contig6295	-2.1173	11.19209	1.38E-05	6.866982
UNKNOWN 4242	Contig6816	1.404435	9.105883	1.39E-05	6.853335
UNKNOWN 2785	Contig4390	1.515819	11.05133	1.48E-05	6.783573
UNKNOWN 665	Contig1369	1.259439	9.278049	1.48E-05	6.771078
UNKNOWN 863	Contig1852	1.704268	10.72312	1.48E-05	6.765512
UNKNOWN 1825 POSSIBLE ANTISENSE	Contig3086	-2.19878	11.50868	1.48E-05	6.765501
UNKNOWN 280 POSSIBLE ANTISENSE	Contig521	-1.41135	13.31535	1.54E-05	6.714881

SCHISTOSOMA MANSONI ADENYLOSUCCINATE LYASE (ASL) GENE, EXONS 6, 7, 8, AND COMPLETE CDS; LONG TERMINAL REPEAT RETROTRANSPOSON, COMPLETE SEQUENCE	AF448819S3	-1.76123	10.04412	1.54E-05	6.713918
UNKNOWN 746	Contig1579	-2.31392	6.853146	1.54E-05	6.709312
UNKNOWN 2839 POSSIBLE ANTISENSE	Contig4471	1.292075	13.73646	1.54E-05	6.703146
UNKNOWN 32	Contig66	1.068071	12.59328	1.54E-05	6.696859
UNKNOWN 1849 POSSIBLE ANTISENSE	Contig3120	1.080538	11.16876	1.59E-05	6.652522
UNKNOWN 924	Contig1962	-1.28754	7.774246	1.59E-05	6.650563
SCHISTOSOMA MANSONI U6 SMALL NUCLEAR RNA	SCMU6RNAA	-1.40328	7.523747	1.67E-05	6.647763
SIMILAR TO EUKARYOTIC PEPTIDE CHAIN RELEASE FACTOR SUBUNIT 1 (ERF1) (EUKARYOTIC RELEASE FACTOR 1) 2E-10 POSSIBLE ANTISENSE	Contig2955	-1.29397	8.87929	1.60E-05	6.634349
UNKNOWN 4057	Contig6587	-1.13255	9.918341	1.60E-05	6.626137
NADH DEHYDROGENASE SUBUNIT 2	Contig6457	-2.15512	7.201273	1.60E-05	6.62423
SIMILAR TO Z-PROTEIN (9E-12)	Contig6800	1.241387	11.25435	1.60E-05	6.622953
SCHISTOSOMA MANSONI CLONE P43F4 CD63-LIKE PROTEIN MRNA, COMPLETE CDS	AF521091.1	1.416123	12.18172	1.64E-05	6.585578
UNKNOWN 2014	Contig3314	1.315213	9.466808	1.64E-05	6.583676
SIMILAR TO CALPONIN (BLASTN) POSSIBLE ANTISENSE	Contig650	2.095948	13.55037	1.69E-05	6.537178
SIMILAR TO PROTEIN TRANSLOCATION COMPLEX BETA 8E-13	Contig1034	-1.38442	11.56425	2.07E-05	6.504826
UNKNOWN 35	Contig71	1.002645	13.16686	1.76E-05	6.484881
UNKNOWN 243 POSSIBLE ANTISENSE	Contig445	1.5071	12.33287	1.76E-05	6.482767
UNKNOWN 3977	Contig6492	-1.30352	9.046134	1.78E-05	6.464953
SIMILAR TO MITOCHONDRIAL RIBOSOMAL PROTEIN L16 (L16MT) 1E-08 POSSIBLE ANTISENSE	Contig470	1.033614	9.855246	1.96E-05	6.359959
SIMILAR TO GLYCEROL-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE [NAD+], CYTOPLASMIC (EC 1.1.1.8) 1E-11 POSSIBLE ANTISENSE	Contig553	1.189983	9.971835	1.99E-05	6.340476
UNKNOWN 2665	Contig4774	1.363581	9.946588	2.00E-05	6.329277
UNKNOWN 754 POSSIBLE ANTISENSE	Contig1600	1.113847	11.26352	2.00E-05	6.325762
SIMILAR TO NG, NG-DIMETHYLARGININE DIMETHYLAMINOHYDROLASE 1 (EC 3.5.3.18) 7E-08	Contig5254	1.31755	8.667706	2.01E-05	6.312408
SIMILAR TO RNA POLYMERASE COMMON SUBUNIT RBP6 (1E-28) POSSIBLE ANTISENSE	Contig3034	-1.09276	11.42441	2.03E-05	6.296233
UNKNOWN 3988	Contig6505	1.105136	11.41481	2.15E-05	6.225347
SCHISTOSOMA MANSONI ADENYLOSUCCINATE LYASE (ASL) GENE, COMPLETE CDS	SEG_AF448819S	-1.6559	11.27133	2.19E-05	6.20114
UNKNOWN 3976	Contig6491	1.053934	9.188742	2.23E-05	6.170788

UNKNOWN 2523	Contig4549	-1.55152	7.063295	2.23E-05	6.169075
SIMILAR TO PUTATIVE PHOSPHATIDE PHOSPHATASE (EC 3.1.3.4) 6E-07 (WUNEN PROTEIN)	Contig4483	1.219647	9.838573	2.24E-05	6.154673
SCHISTOSOMA MANSONI ESSENTIAL MYOSIN LIGHT CHAIN MRNA, COMPLETE CDS	SCMEMLC	1.803027	12.30581	2.24E-05	6.152574
SIMILAR TO HYPOTHETICAL PROTEIN (4E-10) POSSIBLE ANTISENSE	Contig477	-1.35569	9.49272	2.28E-05	6.130881
UNKNOWN 2050	Contig3352	1.566004	13.50033	2.35E-05	6.093409
UNKNOWN 1725 POSSIBLE ANTISENSE	Contig2966	-1.23358	10.42342	2.35E-05	6.087771
UNKNOWN 2856	Contig4984	1.588751	11.36084	2.40E-05	6.061772
SIMILAR TO MEMBRANE-BOUND TRANSCRIPTION FACTOR SITE 2 PROTEASE (EC 3.4.24.-) (SITE-2 PROTEASE) 1E-11	Contig1826	-2.01473	12.8124	2.42E-05	6.046602
SIMILAR TO A6 RELATED PROTEIN (PROTEIN TYROSYL KINASE 9-LIKE) (A6-RELATED PROTEIN) 3E-09	Contig4340	1.366082	6.926451	2.42E-05	6.040873
SIMILAR TO TETRASPAN TE736 (2E-13)	Contig4711	1.233178	9.531552	2.42E-05	6.0407
SIMILAR TO HYPOTHETICAL PROTEIN (DJ1009E24.4) 2E-22	Contig3685	-2.45642	6.383665	2.63E-05	6.026557
SIMILAR TO Q9VEB3 HYPOTHETICAL PROTEIN CG7993 (9E-13) POSSIBLE ANTISENSE	Contig5318	-1.11269	10.81659	2.58E-05	5.962128
SCHISTOSOMA MANSONI (CLONE C5-1B3) PHOSPHOGLYCERATE KINASE (PGK) GENE, COMPLETE CDS	SCMPGK	1.117431	9.445103	2.68E-05	5.908868
SCHISTOSOMA MANSONI RHO2 GTPASE (RHO2) MRNA, PARTIAL CDS	AY158214.1	1.749436	14.37289	2.74E-05	5.879394
UNKNOWN 2515	Contig3927	1.523566	8.495608	2.96E-05	5.79439
SIMILAR TO 60S RIBOSOMAL PROTEIN L7A (1E-78)	Contig342	-1.0638	11.01229	3.03E-05	5.768497
UNKNOWN 2705	Contig4819	1.500615	6.239575	3.15E-05	5.722726
SIMILAR TO H4 HISTONE FAMILY, MEMBER K (6E-40) POSSIBLE ANTISENSE	Contig5926	-1.64996	8.95795	3.27E-05	5.678839
UNKNOWN 386	Contig709	1.316534	10.36232	3.32E-05	5.658317
UNKNOWN 3809	Contig6302	1.068026	13.88153	3.34E-05	5.648157
SIMILAR TO RAT SNRNP-ASSOCIATED POLYPEPTIDE N (8E-33)	Contig1443	-1.40314	11.42583	3.36E-05	5.634992
SIMILAR TO PRESENILIN HOMOLOG (DPS) 2E-24	Contig934	1.375788	9.996289	3.51E-05	5.581262
SIMILAR TO DJ-1 BETA PROTEIN (7E-41) POSSIBLE ANTISENSE	Contig578	1.585627	13.80773	3.54E-05	5.568822
UNKNOWN 2079	Contig3383	-1.6186	7.567145	3.54E-05	5.56107
UNKNOWN 1096	Contig2212	1.39972	8.329178	3.54E-05	5.559339
UNKNOWN 913	Contig1945	1.469895	13.01278	3.55E-05	5.547102
SIMILAR TO TRANSCRIPTION FACTOR LIMPET (LD46723P) 1E-82	Contig209	1.024977	8.713137	3.55E-05	5.546835

UNKNOWN 973	Contig2025	1.356939	8.482407	3.61E-05	5.526862
SCHISTOSOMA MANSONI THIOREDOXIN PEROXIDASE (TPX-2) MRNA, COMPLETE CDS	AF157561	1.208841	12.24475	3.61E-05	5.520217
UNKNOWN 1814 POSSIBLE ANTISENSE	Contig3074	-1.30287	10.78755	3.64E-05	5.503506
UNKNOWN 304 POSSIBLE ANTISENSE	Contig559	-1.90787	8.418489	3.64E-05	5.502569
SCHISTOSOMA MANSONI TRIOSE PHOSPHATE ISOMERASE (SGTPI) GENE, EXON 3	SCMSGTPI02	1.514376	10.68444	3.71E-05	5.478225
SCHISTOSOMA MANSONI GLUCOSE TRANSPORTER PROTEIN (SGTP2) MRNA, COMPLETE CDS	SCMGTP2A	1.227639	12.26909	3.71E-05	5.474358
UNKNOWN 3928	Contig6435	-2.39917	6.502255	3.87E-05	5.425915
UNKNOWN 3974	Contig6489	-1.17427	10.49859	3.90E-05	5.414701
UNKNOWN 73	Contig121	1.237908	9.494036	4.10E-05	5.358557
UNKNOWN 3111 POSSIBLE ANTISENSE	Contig5284	-1.10038	9.659861	4.12E-05	5.349082
UNKNOWN 1945 POSSIBLE ANTISENSE	Contig3240	-1.28779	9.752787	4.21E-05	5.321193
SCHISTOSOMA MANSONI CLONE PSMF6 SR2 SUBFAMILY A NON-LTR RETROTRANSPOSON UNKNOWN GENE AND POL PSEUDOGENE, COMPLETE SEQUENCE	AF025681	-1.20373	11.99063	4.33E-05	5.289102
UNKNOWN 2363	Contig3707	1.21274	9.874804	4.60E-05	5.21741
SIMILAR TO SJ-TS1 (2E-24)	Contig139	1.195246	10.81109	4.69E-05	5.191134
UNKNOWN 1252	Contig2403	1.106408	11.84519	4.78E-05	5.165542
UNKNOWN 135	Contig223	-1.3951	12.45964	4.78E-05	5.158976
SIMILAR TO C80RF2 PROTEIN (2E-63)	Contig4099	1.381636	8.615656	4.78E-05	5.155827
UNKNOWN 194	Contig366	-1.53396	12.09146	5.03E-05	5.096028
UNKNOWN 387	Contig710	-1.1668	10.06596	5.08E-05	5.078422
SIMILAR TO SENESCENCE-ASSOCIATED PROTEIN (2E-51)	Contig1113	-1.69711	6.111602	5.08E-05	5.075926
SIMILAR TO MYOSIN HEAVY CHAIN (1E-150)	Contig1839	1.298574	8.807619	5.13E-05	5.054129
UNKNOWN 944	Contig1988	1.245565	6.887877	5.17E-05	5.038506
SIMILAR TO TRANSITIONAL ENDOPLASMIC RETICULUM ATPASE (TER ATPASE) (VALOSIN CONTAINING PROTEIN) 1E-111 POSSIBLE ANTISENSE	Contig1789	-2.08637	7.151737	5.30E-05	5.00906
UNKNOWN 855	Contig1834	-1.10154	8.959274	5.41E-05	4.982694
UNKNOWN 3894	Contig6399	-1.2459	8.716848	5.46E-05	4.970091
SIMILAR TO PUTATIVE SERINE/THREONINE PROTEIN PHOSPHATASE (EC 3.1.3.16) 2E-50	Contig4638	1.046808	12.0053	5.46E-05	4.965469
SIMILAR TO LEUKOCYTE RECEPTOR CLUSTER (LRC MEMBER 5) 5E-04 POSSIBLE ANTISENSE	Contig891	-1.43295	8.311006	5.53E-05	4.949018
SIMILAR TO ATP SYNTHASE GAMMA CHAIN (EC 3.6.3.14) 6E-47	Contig1017	1.101934	9.144565	5.94E-05	4.940538
SIMILAR TO A.1.12/9 ANTIGEN (1E-09) POSSIBLE ANTISENSE	Contig1859	-1.07693	8.076361	5.57E-05	4.937084

SIMILAR TO ASPARTATE AMINOTRANSFERASE, CYTOPLASMIC (EC 2.6.1.1) (TRANSAMINASE A) 2E-64	Contig1636	-1.66472	6.455818	6.06E-05	4.911996
UNKNOWN 4063	Contig6593	1.042877	10.33944	5.79E-05	4.892404
UNKNOWN 1761 POSSIBLE ANTISENSE	Contig3006	-1.05717	12.10968	5.92E-05	4.86596
SCHISTOSOMA MANSONI MAK16-LIKE PROTEIN MRNA, PARTIAL CDS [POLY-A TAIL REMOVED]	SCMGST	-1.19276	9.498337	5.94E-05	4.858617
SCHISTOSOMA MANSONI THIOREDOXIN PEROXIDASE 2 (TPX2) GENE, COMPLETE CDS	AF301003	-1.08495	8.440217	6.01E-05	4.837809
UNKNOWN 1230	Contig2378	-2.42297	5.521493	0.0001	4.829613
SIMILAR TO HYPOTHETICAL PROTEIN KIAA0033 (Q15055) 1E-35	Contig1374	-2.16875	8.07726	6.13E-05	4.806286
UNKNOWN 1669	Contig2903	-2.96809	5.626083	9.37E-05	4.761298
UNKNOWN 214	Contig392	1.478394	9.447605	6.56E-05	4.727618
UNKNOWN 2523	Contig4549	-2.40835	9.309271	6.56E-05	4.72475
UNKNOWN 561	Contig1095	1.428118	8.772199	6.69E-05	4.700782
UNKNOWN 1790 POSSIBLE ANTISENSE	Contig3039	1.306657	9.499989	6.75E-05	4.6871
UNKNOWN 2102	Contig3412	-1.36593	9.154839	6.80E-05	4.676262
SCHISTOSOMA MANSONI CLONE SM7 SATELLITE SEQUENCE	AF036744	-1.34489	7.431576	6.84E-05	4.665722
SIMILAR TO ESSENTIAL MYOSIN LIGHT CHAIN 2E-78	Contig1264	1.474692	9.683769	6.86E-05	4.659636
UNKNOWN 2063	Contig3367	1.097767	9.605962	6.96E-05	4.636524
SIMILAR TO PYRUVATE KINASE (EC 2.7.1.40) 8E-35 POSSIBLE ANTISENSE	Contig939	1.054831	14.01325	7.09E-05	4.606355
UNKNOWN 2421	Contig3774	-1.14411	7.282931	7.09E-05	4.606327
UNKNOWN 85	Contig142	1.558989	10.82227	7.44E-05	4.606022

Tabela 3: Lista dos genes diferencialmente expressos obtida a partir do estudo do efeito do pareamento sexual na expressão gênica em machos de *S. mansoni*. A tabela apresenta os valores de M, ($\log_2 R/G$), A ($1/2\log_2 RG$), p (baseado na distribuição t moderada) e de B ($\log_e p/1-p$). O genes estão ordenados dos mais diferencialmente expressos para os menos diferencialmente expressos. Valores negativos de M indicam que o gene esta mais expresso em vermes pareados e vice-versa.

Name	SEQ_NAME	M	A	P.Value	B
S.MANSONI FEMALE SPECIFIC POLYPEPTIDE MRNA	SCMFSP	-2.66936	12.21286	4.91E-06	12.51864
SIMILAR TO PUTATIVE ATPASE N2B (HFN2B) 5E-05 POSSIBLE ANTISENSE	Contig2624	-2.8511	10.52274	6.99E-05	9.333646
SCHISTOSOMA MANSONI SMALL SUBUNIT RRNA GENE	SMSSRRNA	-2.27115	11.68601	6.99E-05	8.885995
UNKNOWN 4206	Contig6773	1.760138	12.02897	6.99E-05	8.616023
SIMILAR TO SCHISTOSOMA MANSONI SMALL SUBUNIT RRNA GENE (DNA LEVEL 0.0)	Contig2047	-2.45433	9.02915	6.99E-05	8.605466
UNKNOWN 3242 POSSIBLE ANTISENSE	Contig5513	-1.80035	11.01702	6.99E-05	8.465827
SIMILAR TO RAT SNRNP-ASSOCIATED POLYPEPTIDE N (8E-33)	Contig1443	-2.46543	11.86099	6.99E-05	8.424534
SCHISTOSOMA MANSONI GLUCOSE TRANSPORTER PROTEIN (SGTP2) MRNA, COMPLETE CDS	SCMGTP2A	1.864996	11.93532	6.99E-05	8.221553
SILAR TO ACTIN, CYTOPLASMIC 3 (BETA-ACTIN 3) 9E-79	Contig1883	1.933797	11.65976	6.99E-05	8.206634
SCHISTOSOMA MANSONI 5.8S RIBOSOMAL RNA AND 28S RIBOSOMAL RNA GENES, PARTIAL SEQUENCE, AND INTERNAL TRANSCRIBED SPACER, COMPLETE SEQUENCE	SMU22168	-2.28119	10.0614	9.51E-05	7.819557
UNKNOWN 3085	Contig5242	-2.18385	9.768994	0.000105	7.632409
SIMILAR TO VKG PROTEIN (4E-08) AND COLLAGEN ALPHA I(IV) CHAIN PRECURSOR (8E-08)	Contig4526	-2.50168	8.788424	0.00011	7.456866
UNKNOWN 926	Contig1964	-1.98422	8.257669	0.00011	7.378939
UNKNOWN 1783 POSSIBLE ANTISENSE	Contig3031	-2.15972	11.35038	0.00011	7.344978

SIMILAR TO RAS-LIKE GTP-BINDING PROTEIN RHO (2E-89)	Contig1324	1.921029	10.26005	0.00011	7.295446
UNKNOWN 43	Contig83	2.663762	12.76366	0.000112	7.151475
UNKNOWN 4470	Contig7064	2.191225	8.598522	0.000112	7.122331
SCHISTOSOMA MANSONI INTERNAL TRANSCRIBED SPACER 2, PARTIAL SEQUENCE	AF503487.1	-2.14823	10.26113	0.000112	7.105776
S.MANSONI HEAT SHOCK PROTEIN 86 MRNA, COMPLETE CDS	SCMHSP86	-2.5539	12.64794	0.000147	6.767502
SIMILAR TO SPLICING FACTOR 3A SUBUNIT 2 (SPLICEOSOME ASSOCIATED PROTEIN 62) 1E-15 POSSIBLE ANTISENSE	Contig3221	-1.73796	10.33214	0.000147	6.674734
SIMILAR TO PUTATIVE SRNP (7E-07)	Contig1469	-2.21174	9.511203	0.000147	6.664802
UNKNOWN 2858	Contig4986	-2.47374	7.487032	0.000147	6.65119
SIMILAR TO NADH DEHYDROGENASE 3 (NADH DEHYDROGENASE SUBUNIT 3) 6E-35 POSSIBLE ANTISENSE	Contig1497	-1.66681	10.67992	0.000147	6.616512
UNKNOWN 70	Contig114	1.387855	13.84221	0.000173	6.419602
S.MANSONI CATHEPSIN B (SM31) MRNA, COMPLETE CDS	SCMCTSB	1.506688	12.30752	0.000173	6.379095
UNKNOWN 4275	Contig6849	2.032754	9.699271	0.000182	6.290137
UNKNOWN 971	Contig2022	-1.92642	13.63907	0.000196	6.153524
UNKNOWN 1927 POSSIBLE ANTISENSE	Contig3218	-1.69877	11.13445	0.000196	6.122623
UNKNOWN 312 POSSIBLE ANTISENSE	Contig577	-1.43402	12.21602	0.000196	6.115432
UNKNOWN 3940	Contig6449	1.553483	13.10834	0.000199	6.070285
UNKNOWN 951	Contig1996	2.005724	10.4109	0.000207	5.999386
UNKNOWN 2390	Contig3739	-2.23082	10.35708	0.000207	5.997125
UNKNOWN 3837	Contig6332	-1.81253	11.01405	0.000207	5.938754

SCHISTOSOMA MANSONI 18S RIBOSOMAL RNA GENE, COMPLETE SEQUENCE	SMU65657	-2.31934	12.61556	0.000265	5.671353
SIMILAR TO ACYL-COA BINDING PROTEIN (1E-17)	Contig2289	1.651612	9.446116	0.000306	5.504634
SIMILAR TO 2-OXOGLUTARATE DEHYDROGENASE E1 COMPONENT, MITOCHONDRIAL PRECURSOR (EC 1.2.4.2) (ALPHA-KETOGLUTARATE DEHYDROGENASE) 1E-62	Contig713	1.49186	11.30386	0.000313	5.453858
SCHISTOSOMA MANSONI CLONE SM20 SATELLITE SEQUENCE	AF036756	-1.47566	8.236253	0.000334	5.36632
UNKNOWN 485	Contig884	1.671902	12.39942	0.000338	5.302523
SIMILAR TO Z-PROTEIN (9E-12)	Contig6800	2.2715	10.51526	0.000338	5.301812
UNKNOWN 1649	Contig2881	-2.34124	8.571988	0.000346	5.28855
UNKNOWN 755	Contig1602	-1.21827	12.58058	0.000346	5.231353
SIMILAR TO N-TERMINAL ACETYLTRANSFERASE COMPLEX ARD1 SUBUNIT (6E-50) POSSIBLE ANTISENSE	Contig425	1.322133	9.277661	0.000358	5.173802
SIMILAR TO 14 KDA FATTY ACID BINDING PROTEIN HOMOLOG (SM14) 3E-71	Contig1230	1.27829	12.69972	0.000366	5.128916
UNKNOWN 1933 POSSIBLE ANTISENSE	Contig3228	-1.37065	11.49458	0.000403	4.994894
SIMILAR TO TYRA PROTEIN 7E-33	Contig1016	1.270765	9.791412	0.000403	4.99289
SIMILAR TO Q9NV64 HYPOTHETICAL PROTEIN FLJ10902 5E-26	Contig986	2.108732	8.483796	0.000423	4.922794
SIMILAR TO LECITHIN-CHOLESTEROL ACYLTRANSFERASE LCAT (2E-25)	Contig5322	1.540629	11.10815	0.000435	4.875225
UNKNOWN 2573 POSSIBLE ANTISENSE	Contig4620	1.089211	11.9965	0.000437	4.850227

MUS MUSCULUS SIMILAR TO CAAX PRENYL PROTEASE 1 HOMOLOG (PRENYL PROTEIN-SPECIFIC ENDOPROTEASE 1) (FARNESYLATED- PROTEINSCONVERTING ENZYME 1) (FACE-1) (ZINC METALLOPROTEINASE STE24 HOMOLOG) (6E-23) (POSSIBLE ANTISENSE)	Contig9	1.503858	13.36094	0.000439	4.824657
UNKNOWN 1208	Contig2356	1.295113	12.08466	0.000455	4.771441
S.MANSONI GENE FOR 16S RIBOSOMAL RNA SMALL SUBUNIT	SM16SRSS	-1.6152	9.295948	0.000466	4.713228
SIMILAR TO ORF-RF2 (1E-28) POSSIBLE ANTISENSE	Contig855	-1.74256	10.44358	0.000466	4.704719
SIMILAR TO RIBOSOMAL PROTEIN L15 (1E-24) POSSIBLE ANTISENSE	Contig3066	-1.16458	11.20216	0.000466	4.689577

Tabela 4: Lista dos genes diferencialmente expressos no experimento obtida a partir do estudo do efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica em fêmeas de *S. mansoni*. A tabela apresenta os valores de M, ($\log_2 R/G$), A ($1/2\log_2 RG$), p (baseado na distribuição t moderada) e de B ($\log_e p/1-p$). O genes estão ordenados dos mais diferencialmente expressos para os menos diferencialmente expressos. Valores negativos de M indicam que o gene esta mais expresso em vermes provenientes de camundongos machos e vice-versa.

Name	SEQ_NAME	M	A	P.Value	B
UNKNOWN 3766	Contig6245	-1.8575	9.0344	1.15E-06	12.84184
UNKNOWN 1477	Contig2648	-1.76897	9.106108	8.63E-06	10.86057
SIMILAR TO PUTATIVE ATPASE N2B (HFN2B) 5E-05 POSSIBLE ANTISENSE	Contig2624	-1.74703	8.780119	3.30E-05	9.464698
UNKNOWN 2858	Contig4986	1.659758	9.585481	0.000111	8.201972
S.MANSONI SUPEROXIDE DISMUTASE GENE	SEG_SCMSOD	-1.51941	10.09884	0.000292	7.115967
S.MANSONI SUPEROXIDE DISMUTASE MRNA, COMPLETE CDS	SCMSODM	-1.57503	9.825856	0.000292	6.897044
UNKNOWN 926	Contig1964	-1.46989	8.428688	0.000292	6.794481
SCHISTOSOMA MANSONI 5.8S RIBOSOMAL RNA AND 28S RIBOSOMAL RNA GENES, PARTIAL SEQUENCE, AND INTERNAL TRANSCRIBED SPACER, COMPLETE SEQUENCE	SMU22168	-1.04939	10.79288	0.000292	6.74123
S.MANSONI SUPEROXIDE DISMUTASE GENE, EXON 3, CLONE GT10-38	SCMSOD3	-1.56705	9.287477	0.000462	6.222483
S.MANSONI MRNA FOR EGGSHELL PROTEIN	SMEGGPRO	-1.11588	10.05405	0.000548	5.972453
SCHISTOSOMA MANSONI PEPTIDYLGLYCINE ALPHA HYDROXYLATING MONO-OXYGENASE MRNA, COMPLETE CDS [POLY-A TAIL REMOVED]	AY172995.2	0.801592	11.15738	0.000859	5.473483

SCHISTOSOMA MANSONI INTERNAL TRANSCRIBED SPACER 2, PARTIAL SEQUENCE	AF503487.1	-0.83628	11.81287	0.001084	5.179295
UNKNOWN 2443	Contig3805	-1.96128	9.965698	0.001165	5.039006
SCHISTOSOMA MANSONI MRNA FOR ANTIGEN HOMOLOGOUS TO HSP70 (70,000 MOL WT ANTIGEN; HSP = HEAT SHOCK PROTEIN) [POLY-A TAIL REMOVED]	SMANT70	-0.75326	13.23398	0.001708	4.614375

Tabela 5: Lista dos genes diferencialmente expressos no obtida a partir do estudo do efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica em machos de *S. mansoni*. A tabela apresenta os valores de M, ($\log_2 R/G$), A ($1/2\log_2RG$), p (baseado na distribuição t moderada) e de B ($\log_e p/1-p$). O genes estão ordenados dos mais diferencialmente expressos para os menos diferencialmente expressos. Valores negativos de M indicam que o gene esta mais expresso em vermes provenientes de camundongos machos e vice-versa.

Name	SEQ_NAME	M	A	P.Value	B
UNKNOWN 43	Contig83	2.362886	13.53064	1.98E-06	13.76335
UNKNOWN 951	Contig1996	1.505898	12.49127	2.71E-06	12.3311
SCHISTOSOMA MANSONI GLUCOSE TRANSPORTER PROTEIN (SGTP2) MRNA, COMPLETE CDS	SCMGTP2A	2.182889	12.96721	2.71E-06	12.22201
UNKNOWN 2474	Contig3858	-1.61066	9.422798	2.71E-06	12.18595
UNKNOWN 1874 POSSIBLE ANTISENSE	Contig3153	-1.38758	10.40621	2.71E-06	12.10012
SIMILAR TO Z-PROTEIN (9E-12)	Contig6800	1.742763	12.89419	1.10E-05	10.65607
SIMILAR TO SCHISTOSOMA MANSONI SMALL SUBUNIT RRNA GENE (DNA LEVEL 0.0)	Contig2047	-2.57929	10.68594	1.34E-05	10.32849
SCHISTOSOMA MANSONI TRANS-SPLICED MRNA, CLONE SL CDNA-22, COMPLETE CDS [POLY-A TAIL REMOVED]	SMU30260	1.250713	9.380706	1.56E-05	9.948117
UNKNOWN 1876 POSSIBLE ANTISENSE	Contig3155	1.345926	9.479259	1.56E-05	9.769874
UNKNOWN 719	Contig1509	1.39899	10.38368	1.56E-05	9.721051
UNKNOWN 651	Contig1332	1.315863	11.50794	1.56E-05	9.680776
MUS MUSCULUS SIMILAR TO CAAX PRENYL PROTEASE 1 HOMOLOG (PRENYL PROTEIN- SPECIFIC ENDOPTERASE 1) (FARNESYLATED-PROTEIN CONVERTING ENZYME 1) (FACE-1) (ZINC METALLOPROTEINASE STE24 HOMOLOG) (6E-23) (POSSIBLE ANTISENSE)	Contig9	1.647889	13.66766	1.56E-05	9.680101
SIMILAR TO ECTONUCLEOTIDE PYROPHOSPHATASE/PHOSPHODIESTERASE 4 (9E-11)	Contig5606	1.854054	11.60202	1.79E-05	9.471122
UNKNOWN 1801 POSSIBLE ANTISENSE	Contig3056	-2.43902	9.000921	1.81E-05	9.332329
SIMILAR TO IMPORTIN BETA-1 SUBUNIT (KARYOPHERIN BETA-1 SUBUNIT) (NUCLEAR FACTOR P97) (PORE TARGETING COMPLEX 97 KDA SUBUNIT) 8E-31 POSSIBLE ANTISENSE	Contig3046	-2.57297	9.764081	1.81E-05	9.154893
UNKNOWN 2307	Contig3644	-1.90944	8.121164	1.81E-05	9.143831

SIMILAR TO BAX INHIBITOR-1 (BI-1) (TESTIS ENHANCED GENE TRANSCRIPT) 1E-17 POSSIBLE ANTISENSE	Contig5910	1.612569	14.07474	1.81E-05	9.0873
SIMILAR TO Q9NV64 HYPOTHETICAL PROTEIN FLJ10902 5E-26	Contig986	1.627432	9.633507	1.81E-05	9.076983
S.MANSONI (LIBERIAN) MRNA FOR CATHEPSIN C	SMCATHC	1.337176	12.03883	1.81E-05	9.062362
UNKNOWN 3830	Contig6325	1.408784	11.55577	1.81E-05	9.049954
SIMILAR TO PROBABLE ADENOSYLHOMOCYSTEINASE (EC 3.3.1.1) 1E- 92	Contig1875	1.538545	10.60937	1.91E-05	8.952071
SCHISTOSOMA MANSONI NA+/CL- DEPENDENT NEUROTRANSMITTER TRANSPORTER-LIKE PROTEIN (NAT) MRNA, COMPLETE CDS [POLY-A TAIL REMOVED]	AY090636.1	1.420444	10.32646	1.95E-05	8.778934
UNKNOWN 1940 POSSIBLE ANTISENSE	Contig3235	-1.44461	10.63516	1.95E-05	8.776532
UNKNOWN 1966	Contig3264	1.516024	11.09016	1.95E-05	8.76891
UNKNOWN 3940	Contig6449	1.636434	13.90436	1.95E-05	8.765622
SIMILAR TO NG, NG-DIMETHYLARGININE DIMETHYLAMINOHYDROLASE 1 (EC 3.5.3.18) 7E-08	Contig5254	1.546974	9.103394	2.17E-05	8.562908
SCHISTOSOMA MANSONI RIBOSOMAL INTERGENIC SPACER DNA	SMA223842	-2.50558	9.173362	2.17E-05	8.545097
SIMILAR TO HYPOTHETICAL PROTEIN CONTAINING RNA RECOGNITION MOTIF (1E- 11) POSSIBLE ANTISENSE	Contig410	-1.29781	10.76493	2.17E-05	8.487014
UNKNOWN 3508	Contig5903	-1.6147	10.98896	2.17E-05	8.46349
UNKNOWN 316 POSSIBLE ANTISENSE	Contig587	-1.39736	8.571897	2.17E-05	8.432111
UNKNOWN 2522	Contig3944	-1.38192	10.25574	2.17E-05	8.406333
UNKNOWN 649	Contig1329	1.50677	11.47774	2.17E-05	8.385372
UNKNOWN 3837	Contig6332	-2.33261	13.08817	2.17E-05	8.358552
UNKNOWN 629	Contig1287	1.515598	10.38081	2.17E-05	8.348438
SILAR TO ACTIN, CYTOPLASMIC 3 (BETA- ACTIN 3) 9E-79	Contig1883	1.945184	13.63796	2.17E-05	8.334097

SIMILAR TO NADH DEHYDROGENASE 3 (NADH DEHYDROGENASE SUBUNIT 3) 6E-35 POSSIBLE ANTISENSE	Contig1497	-1.69921	12.75796	3.83E-05	7.734351
UNKNOWN 3982	Contig6499	-1.46852	12.00775	3.83E-05	7.726229
UNKNOWN 1728 POSSIBLE ANTISENSE	Contig2970	-1.90691	11.46799	3.84E-05	7.696897
UNKNOWN 3923	Contig6430	1.541019	10.67659	4.20E-05	7.584183
UNKNOWN 2501 POSSIBLE ANTISENSE	Contig4512	1.366104	11.59701	4.21E-05	7.554793
UNKNOWN 632	Contig1292	-1.24698	10.43255	4.21E-05	7.532784
UNKNOWN 1130	Contig2253	1.46173	11.15997	4.67E-05	7.389221
SCHISTOSOMA MANSONI G PROTEIN BETA SUBUNIT-LIKE PROTEIN TRANS-SPLICED MRNA, COMPLETE CDS [POLY-A TAIL REMOVED]	SMU30261	1.303242	9.055161	4.67E-05	7.368956
SIMILAR TO HEAT SHOCK PROTEIN 60 (2E-48) POSSIBLE ANTISENSE	Contig647	-1.11796	14.19348	4.67E-05	7.352051
SIMILAR TO NADH-CYTOCHROME B5 REDUCTASE (EC 1.6.2.2) 4E-45	Contig1517	1.080928	14.22967	4.67E-05	7.328408
UNKNOWN 1785 POSSIBLE ANTISENSE	Contig3033	-2.38358	11.61466	4.67E-05	7.303843
SIMILAR TO TYRA PROTEIN 7E-33	Contig1016	1.179175	12.02415	4.67E-05	7.297242
UNKNOWN 262 POSSIBLE ANTISENSE	Contig486	-1.11039	11.61379	4.72E-05	7.237745
UNKNOWN 4112	Contig6665	1.40693	12.62814	4.72E-05	7.22834
SIMILAR TO SRRP35 REGULATOR OF ALTERNATIVE SPLICING PROTEIN (5E-23) POSSIBLE ANTISENSE	Contig1953	-0.95836	12.77383	4.72E-05	7.22447
SIMILAR TO WD-REPEAT PROTEIN AN11 HOMOLOG (2E-09) POSSIBLE ANTISENSE	Contig3166	1.341558	8.968004	4.74E-05	7.20195
PRO-X CARBOXYPEPTIDASE PRECURSOR (EC 3.4.16.2) (PROLYLCARBOXYPEPTIDASE) (PRCP) (LYSOSOMAL CARBOXYPEPTIDASE C) 9E-18 POSSIBLE ANTISENSE	Contig1153	1.532715	11.18348	5.07E-05	7.107568
SIMILAR TO P87137 HYPOTHETICAL PROTEIN C57A7.06 IN CHROMOSOME I (1E-08)	Contig6110	0.986029	10.91673	5.07E-05	7.096
SIMILAR TO SORCIN (PROGRAMMED CELL DEATH PROTEASE) 3E-53	Contig1180	1.106969	11.01319	5.64E-05	6.972649

UNKNOWN 3136	Contig5326	1.139719	10.56113	5.82E-05	6.923673
UNKNOWN 3662	Contig6127	1.277986	10.12638	5.94E-05	6.885958
SIMILAR TO NADH DEHYDROGENASE SUBUNIT 2 (3E-98) (POSSIBLE ANTISENSE)	Contig355	1.159758	12.96222	6.07E-05	6.846138
SIMILAR TO ATP SYNTHASE OLIGOMYCIN SENSITIVITY CONFERRAL PROTEIN, MITOCHONDRIAL PRECURSOR (EC 3.6.3.14) 9E-44	Contig1424	1.371908	11.12917	6.32E-05	6.789775
SIMILAR TO Q20720 F53F4.11 PROTEIN (1E-23)	Contig935	1.023678	11.37165	6.75E-05	6.708093
UNKNOWN 531 POSSIBLE ANTISENSE	Contig1022	1.08634	10.46685	6.97E-05	6.654276
UNKNOWN 833	Contig1782	1.182122	11.95254	6.97E-05	6.627422
UNKNOWN 359 POSSIBLE ANTISENSE	Contig671	1.269153	11.5225	6.97E-05	6.626779
UNKNOWN 1783 POSSIBLE ANTISENSE	Contig3031	-1.82294	13.13391	7.05E-05	6.586569
UNKNOWN 4212	Contig6782	1.605255	10.37233	7.05E-05	6.582937
UNKNOWN 2424 POSSIBLE ANTISENSE	Contig3781	1.309703	8.84355	7.07E-05	6.552488
UNKNOWN 1128	Contig2251	1.610999	9.062926	7.07E-05	6.550846
SIMILAR TO 60S RIBOSOMAL PROTEIN L19 (2E-58) POSSIBLE ANTISENSE	Contig923	-1.81717	14.02073	7.35E-05	6.482287
UNKNOWN 1047	Contig2143	1.467006	10.3238	7.35E-05	6.482217
UNKNOWN 584 POSSIBLE ANTISENSE	Contig1168	-1.56324	11.12472	7.36E-05	6.466597
SCHISTOSOMA MANSONI CB1.1 GENE FOR CATHEPSIN B1 ISOTYPE 1	SMA506157	1.228532	13.25732	7.45E-05	6.40165
UNKNOWN 979	Contig2037	1.063484	11.74056	7.45E-05	6.400616
UNKNOWN 260 POSSIBLE ANTISENSE	Contig474	1.533076	13.09904	7.45E-05	6.376628
SIMILAR TO TUMOUR DIFFERENTIALLY EXPRESSED 1 (DIFF33), ISOFORM 2) 3E-14 POSSIBLE ANTISENSE	Contig3887	2.049166	8.309248	7.45E-05	6.374894
SIMILAR TO CASPASE-3 (6E-27)	Contig285	1.272969	10.09569	7.45E-05	6.346344
SCHISTOSOMA MANSONI CB1.2 GENE FOR CATHEPSIN B1 ISOTYPE 2	SMA506158	1.29717	13.30962	7.45E-05	6.342186
SIMILAR TO Y76A2B.5 PROTEIN (7E-18) POSSIBLE ANTISENSE	Contig916	-0.97076	11.14891	7.45E-05	6.334208
SIMILAR TO Y60A3A.9 PROTEIN (5E-18)	Contig1910	0.886999	11.72018	7.45E-05	6.321862

SIMILAR TO 40S RIBOSOMAL PROTEIN S28 (7E-16)	Contig1136	-1.81259	12.15322	7.45E-05	6.312615
SIMILAR TO ALDEHYDE DEHYDROGENASE (1E-23) POSSIBLE ANTISENSE	Contig4307	1.171757	11.35188	7.45E-05	6.286417
SCHISTOSOMA MANSONI CLONE P43F4 CD63-LIKE PROTEIN MRNA, COMPLETE CDS	AF521091.1	1.42121	12.35646	7.45E-05	6.262978
SIMILAR TO RIBOSOMAL PROTEIN S8 (4E-60) POSSIBLE ANTISENSE	Contig2029	0.860096	14.26617	7.45E-05	6.260827
UNKNOWN 4052	Contig6580	-1.62564	8.651333	7.45E-05	6.25484
UNKNOWN 1298	Contig2450	1.090139	10.15366	7.45E-05	6.253609
SIMILAR TO 60S RIBOSOMAL PROTEIN L7A (1E-78)	Contig342	-1.19193	9.844104	7.45E-05	6.246614
UNKNOWN 3497	Contig5889	-1.1377	7.79125	7.45E-05	6.245954
SCHISTOSOMA MANSONI SM14 FATTY ACID- BINDING PROTEIN DELTA E3 VARIANT MRNA, COMPLETE CDS; ALTERNATIVELY SPLICED	AF492390.1	1.260099	12.51734	7.57E-05	6.218693
UNKNOWN 352 POSSIBLE ANTISENSE	Contig656	0.836462	12.62869	7.75E-05	6.183841
SIMILAR TO MEMBRANE-BOUND TRANSCRIPTION FACTOR SITE 2 PROTEASE (EC 3.4.24.-) (SITE-2 PROTEASE) 1E-11	Contig1826	-1.63761	13.03801	8.44E-05	6.075277
SIMILAR TO PROTEASOME INHIBITOR SUBUNIT 1 (PI31) 1E-08 POSSIBLE ANTISENSE	Contig3114	-1.33202	9.176588	8.44E-05	6.072126
UNKNOWN 1743 POSSIBLE ANTISENSE	Contig2985	0.922514	8.185406	8.44E-05	6.054688
UNKNOWN 2631 POSSIBLE ANTISENSE	Contig4717	-1.29127	10.72456	8.44E-05	6.044085
SIMILAR TO H4 HISTONE FAMILY, MEMBER K (6E-40) POSSIBLE ANTISENSE	Contig5926	-1.28841	10.73131	8.44E-05	6.036827
SIMILAR TO 60S RIBOSOMAL PROTEIN L9 (2E- 53)	Contig1813	-1.58641	12.55822	8.44E-05	6.025759
SIMILAR TO CLEAVAGE STIMULATION FACTOR, 3' PRE-MRNA SUBUNIT 2, 64 KDA, TAU (2E-08) POSSIBLE ANTISENSE	Contig3251	-1.61234	10.18017	8.44E-05	6.021971
UNKNOWN 1945 POSSIBLE ANTISENSE	Contig3240	-1.23404	9.450605	8.75E-05	5.974402
UNKNOWN 1287	Contig2439	1.084308	11.6772	9.40E-05	5.892336
SIMILAR TO ALPHA-ENDOSULFINE (3E-08)	Contig1490	1.384401	11.055	9.53E-05	5.86861

SIMILAR TO ACETYLTRANSFERASE (1E-37) POSSIBLE ANTISENSE	Contig1582	1.154812	10.52963	9.74E-05	5.836171
UNKNOWN 2548	Contig4588	1.22535	10.8622	9.87E-05	5.813341
UNKNOWN 1208	Contig2356	1.211191	13.19265	9.95E-05	5.794887
SIMILAR TO RIBOSOMAL PROTEIN L32 (3E-26)	Contig1484	-1.82266	12.29575	0.0001	5.776451
UNKNOWN 2630 POSSIBLE ANTISENSE	Contig4715	1.115937	12.01766	0.000101	5.762575
SIMILAR TO TETRASPANIN TE736 (1E-11)	Contig6455	1.229948	9.041175	0.000101	5.746434
S.MANSONI MRNA FOR ELONGATION FACTOR 1-ALPHA [POLY-A TAIL REMOVED]	SMEF1ALPH	-1.77174	11.53474	0.000103	5.722763
SIMILAR TO HEAT SHOCK PROTEIN HSP60 (4E-47) POSSIBLE ANTISENSE	Contig4714	-1.2725	13.05436	0.000111	5.63418
SCHISTOSOMA MANSONI SERPIN (SPI) GENE, 3' END	SCMSPIB	1.43407	13.40881	0.000111	5.625101
UNKNOWN 996	Contig2058	1.740922	10.92069	0.000111	5.610851
SCHISTOSOMA MANSONI HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR, EXONS 5 AND 5A- 5C	SMHSF3	-1.07845	9.201069	0.000111	5.610015
SIMILAR TO SPLICING FACTOR 3A SUBUNIT 2 (SPLICEOSOME ASSOCIATED PROTEIN 62) 1E-15 POSSIBLE ANTISENSE	Contig3221	-1.82177	11.83477	0.000117	5.544902
UNKNOWN 33	Contig67	1.952073	7.541467	0.000119	5.516817
UNKNOWN 705	Contig1474	1.265938	12.27774	0.00012	5.501445
UNKNOWN 2573 POSSIBLE ANTISENSE	Contig4027	0.953095	11.95926	0.000124	5.455006
UNKNOWN 1953 POSSIBLE ANTISENSE	Contig3249	-0.89061	9.588097	0.000124	5.453305
SIMILAR TO SERINE/THREONINE KINASE 16 (4E-15) (POSSIBLE ANTISENSE)	Contig132	1.080423	11.64554	0.000124	5.440385
UNKNOWN 1775 POSSIBLE ANTISENSE	Contig3023	-2.27266	11.42238	0.000124	5.431045
SIMILAR TO CG8314 PROTEIN (7E-06)	Contig695	1.075698	8.946438	0.000132	5.410505
S.MANSONI HEAT SHOCK PROTEIN 86 MRNA, COMPLETE CDS	SCMHSP86	-2.20966	13.99547	0.00013	5.379244
SIMILAR TO UNKNOWN PROTEIN (MGC:7185) (6E-08)	Contig3937	1.216674	8.256168	0.000132	5.354572

SIMILAR TO RAGA (RAS-RELATED, ALTERNATIVELY SPLICED GTPASE A) 1E-16 POSSIBLE ANTISENSE	Contig4670	0.885668	10.48539	0.000132	5.33962
SCHISTOSOMA MANSONI ESSENTIAL MYOSIN LIGHT CHAIN MRNA, COMPLETE CDS	SCMEMLC	1.402696	12.9779	0.000134	5.3111
UNKNOWN 280 POSSIBLE ANTISENSE	Contig521	-1.74843	11.17782	0.000135	5.294027
UNKNOWN 2442 POSSIBLE ANTISENSE	Contig3802	0.992112	11.61326	0.000135	5.29227
UNKNOWN 903	Contig1924	0.956726	14.20487	0.000151	5.166935
SCHISTOSOMA MANSONI FIBRILLIN 2 MRNA, PARTIAL CDS	SMU54588	-1.19866	13.85725	0.000156	5.130187
UNKNOWN 756 POSSIBLE ANTISENSE	Contig1608	-1.22533	12.45301	0.000156	5.112413
UNKNOWN 1815 POSSIBLE ANTISENSE	Contig3075	-1.03132	10.81982	0.000156	5.110433
SIMILAR TO 60S RIBOSOMAL PROTEIN L37A (7E-26)	Contig2036	-1.84843	11.11754	0.000162	5.063406
SIMILAR TO NIFU-LIKE PROTEIN (4E-10)	Contig683	0.866144	15.1343	0.000165	5.033864
UNKNOWN 217	Contig396	-1.59882	12.29531	0.000165	5.031311
UNKNOWN 330 POSSIBLE ANTISENSE	Contig610	-1.11961	10.70962	0.000167	5.01462
UNKNOWN 3491	Contig5878	1.182065	12.30464	0.000167	4.99942
SIMILAR TO PUTATIVE PHOSPHATIDE PHOSPHATASE (EC 3.1.3.4) 6E-07 (WUNEN PROTEIN)	Contig4483	1.02421	11.95471	0.000167	4.995846
UNKNOWN 2443	Contig3805	-2.55553	8.251402	0.000172	4.958252
SIMILAR TO LECITHIN-CHOLESTEROL ACYLTRANSFERASE LCAT (2E-25)	Contig5322	1.353519	12.17885	0.000174	4.940397
SIMILAR TO PUTATIVE SRNP (7E-07)	Contig1469	-2.10731	11.47929	0.000174	4.930916
SIMILAR TO UDP-SUGAR TRANSPORTER SQV-7 (2E-14)	Contig180	1.849824	11.88494	0.000174	4.917255
UNKNOWN 4312	Contig6894	0.891808	11.69823	0.000174	4.915092
UNKNOWN 3242 POSSIBLE ANTISENSE	Contig5513	-1.87244	13.05077	0.000174	4.912346
SIMILAR TO NADH DEHYDROGENASE 4 (NADH DEHYDROGENASE SUBUNIT 4) 1E-169	Contig1376	0.951844	13.88345	0.000176	4.893981
UNKNOWN 1813 POSSIBLE ANTISENSE	Contig3073	-1.82461	8.725859	0.000176	4.881663
UNKNOWN 799	Contig1715	-0.68874	12.75002	0.000178	4.864663

UNKNOWN 2734	Contig4852	-1.6092	7.889625	0.000181	4.839607
UNKNOWN 2573 POSSIBLE ANTISENSE	Contig4620	0.816945	13.16092	0.000186	4.80582
UNKNOWN 641	Contig1316	1.133504	9.461889	0.000188	4.790054
TUBULIN, BETA, 2 POSSIBLE ANTISENSE	Contig1249	-0.8331	13.86274	0.000198	4.727753
UNKNOWN 727	Contig1525	1.200551	9.709406	0.000205	4.686082
UNKNOWN 70	Contig114	1.840831	13.62111	0.000209	4.656148
UNKNOWN 3573	Contig5997	-1.10111	11.5765	0.000209	4.653866
UNKNOWN 2727 POSSIBLE ANTISENSE	Contig4300	0.835384	12.17167	0.00021	4.644399
SIMILAR TO PLASMA KALLIKREIN PRECURSOR (EC 3.4.21.34) 1E-11	Contig2283	1.461255	11.23394	0.000223	4.618851
SIMILAR TO 60S ACIDIC RIBOSOMAL PROTEIN P1 (2E-15)	Contig1344	-1.80652	13.71608	0.000214	4.618013
SIMILAR TO CDC91 CELL DIVISION CYCLE 91- LIKE 1 (5E-14)	Contig1935	1.151497	12.04101	0.000214	4.610783
SIMILAR TO SODIUM/POTASSIUM- TRANSPORTING ATPASE BETA-2 CHAIN(SODIUM/POTASSIUM- DEPENDENT ATPASE BETA-2 SUBUNIT) (BETA-B1 CHAIN) (1E-15).	Contig60	1.441415	8.70058	0.000215	4.600335

Referências

- Adams, M. D., J. M. Kelley, et al. (1991). "Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project." Science **252**(5013): 1651-6.
- Altschul, S. F., W. Gish, et al. (1990). "Basic local alignment search tool." J Mol Biol **215**(3): 403-10.
- Armstrong, J. C. (1965). "Mating behavior and development of schistosomes in the mouse." J Parasitol **51**: 605-16.
- Aronstein, W. S. and M. Strand (1985). "A glycoprotein antigen of *Schistosoma mansoni* expressed on the gynecophoral canal of mature male worms." Am J Trop Med Hyg **34**(3): 508-12.
- Atkinson, K. H. and B. G. Atkinson (1980). "Biochemical basis for the continuous copulation of female *Schistosoma mansoni*." Nature **283**(5746): 478-9.
- Barrabes, A., T. H. Duong, et al. (1979). "Effect of testosterone or progesterone implants on the intensity of experimental infestation with *Schistosoma mansoni* in the female golden hamster." C R Seances Soc Biol Fil **173**(1): 153-6.
- Barrabes, A., J. Goma-Mouanda, et al. (1986). "17-B estradiol receptors in *Schistosoma mansoni*. Contribution to the explanation of the protective power of this hormone in *Schistosoma mansoni* bilharziasis in the mouse. Preliminary study." Ann Parasitol Hum Comp **61**(6): 637-641.
- Basch, P. F. (1990). "Why do schistosomes have separate sexes?" Parasitol Today **6**(5): 160-3.
- Basch, P. F. and N. Basch (1984). "Intergeneric reproductive stimulation and parthenogenesis in *Schistosoma mansoni*." Parasitology **89** (Pt 2): 369-76.
- Basch, P. F. and B. C. Gupta (1988). "Homosexual male pairing in *Schistosoma mansoni*." Int J Parasitol **18**(8): 1115-7.
- Behrman, A. J. (2005). Schistosomiasis. eMedicine, WebMD. **2006**.
- Bengtsson, H., B. Calder, et al. (2001). "Identifying differentially expressed genes in cDNA microarray experiments authors." Sci Aging Knowledge Environ **2001**(12): vp8.

- Bobek, L. A., D. M. Rekosh, et al. (1988). "Small gene family encoding an eggshell (chorion) protein of the human parasite *Schistosoma mansoni*." Mol Cell Biol **8**(8): 3008-16.
- Bogea, T., T. C. Favre, et al. (1996). "Circadian pattern of cercarial emergence in *Schistosoma mansoni* (Platyhelminthes:Digenea) from isolated *Biomphalaria glabrata*." Chronobiol Int **13**(2): 93-101.
- Boissier, J., K. Chlichlia, et al. (2003). "Preliminary study on sex-related inflammatory reactions in mice infected with *Schistosoma mansoni*." Parasitol Res **91**(2): 144-50.
- Boros, D. L. (1989). "Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection." Clin Microbiol Rev **2**(3): 250-69.
- Bostic, J. R. and M. Strand (1996). "Molecular cloning of a *Schistosoma mansoni* protein expressed in the gynecophoral canal of male worms." Mol Biochem Parasitol **79**(1): 79-89.
- Boutros, P. (2004). Increasing rlm iterations for convergence in limma's normalizeRobustSpline, BioC. **2006**.
- Brazma, A., P. Hingamp, et al. (2001). "Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data." Nat Genet **29**(4): 365-71.
- Brouwers, J. F., I. M. Smeenk, et al. (1997). "The incorporation, modification and turnover of fatty acids in adult *Schistosoma mansoni*." Mol Biochem Parasitol **88**(1-2): 175-85.
- Caillaud, D., F. Prugnolle, et al. (2006). "Host sex and parasite genetic diversity." Microbes Infect **8**(9-10): 2477-83.
- Chai, M., D. P. McManus, et al. (2006). "Transcriptome profiling of lung schistosomula, in vitro cultured schistosomula and adult *Schistosoma japonicum*." Cell Mol Life Sci **63**(7-8): 919-29.
- Chechinel, Y. M. N. and J. S. Owen (1978). "O colesterol plasmático na esquistossomose mansônica. ." Revista Brasileira de Biologia **38**: 339-343.

- Chen, L. L., D. M. Rekosh, et al. (1992). "Schistosoma mansoni p48 eggshell protein gene: characterization, developmentally regulated expression and comparison to the p14 eggshell protein gene." Mol Biochem Parasitol **52**(1): 39-52.
- Clough, E. R. (1981). "Morphology and reproductive organs and oogenesis in bisexual and unisexual transplants of mature Schistosoma mansoni females." J Parasitol **67**(4): 535-9.
- Conceição, M. J., C. A. Argento, et al. (2000). "Study of Schistosoma mansoni isolates from patients with failure of treatment with oxamniquine." Mem Inst Oswaldo Cruz **95**(3): 375-80.
- Conesa, A., S. Gotz, et al. (2005). "Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research." Bioinformatics **21**(18): 3674-6.
- Conford, E. M. and M. E. Huot (1981). "Glucose transfer from male to female schistosomes." Science **213**(4513): 1269-71.
- Cornford, E. A. and A. M. Fitzpatrick (1987). "Comparative glucose utilization rates in separated and mated schistosomes." Experimental Parasitology **64**: 448-457.
- Dallas, P. B., N. G. Gottardo, et al. (2005). "Gene expression levels assessed by oligonucleotide microarray analysis and quantitative real-time RT-PCR -- how well do they correlate?" BMC Genomics **6**(1): 59.
- Damian, R. T. (1997). "Parasite immune evasion and exploitation: reflections and projections." Parasitology **115**((Suppl.)): S169-S175.
- de Mendonca, R. L., H. Escriva, et al. (2000). "Hormones and nuclear receptors in schistosome development." Parasitol Today **16**(6): 233-40.
- Delgado, V. S., D. P. Suarez, et al. (1992). "Experimental chemotherapy of Schistosoma mansoni with praziquantel and oxamniquine: differential effect of single or combined formulations of drugs on various strains and on both sexes of the parasite." Parasitol Res **78**(8): 648-54.
- Dillon, G. P., T. Feltwell, et al. (2006). "Microarray analysis identifies genes preferentially expressed in the lung schistosomulum of Schistosoma mansoni." Int J Parasitol **36**(1): 1-8.

- Doenhoff, M. J., R. G. Stanley, et al. (2002). "An anti-atherogenic effect of *Schistosoma mansoni* infections in mice associated with a parasite-induced lowering of blood total cholesterol." Parasitology **125**(Pt 5): 415-21.
- Draghici, S. (2003). Data Analysis Tools for DNA Microarrays, Chapman & Hall/CRC.
- Eloi-Santos, S., N. J. Olsen, et al. (1992). "Schistosoma mansoni: mortality, pathophysiology, and susceptibility differences in male and female mice." Exp Parasitol **75**(2): 168-75.
- Erasmus, D. A. (1973). "A comparative study of the reproductive system of mature, immature and "unisexual" female *Schistosoma mansoni*." Parasitology **67**(2): 165-83.
- Erasmus, D. A. and T. W. Davies (1979). "Schistosoma mansoni and *S. haematobium*: calcium metabolism of the vitelline cell." Exp Parasitol **47**(1): 91-106.
- Escobedo, G., C. W. Roberts, et al. (2005). "Parasite regulation by host hormones: an old mechanism of host exploitation?" Trends Parasitol **21**(12): 588-593.
- Feldman, A. L., N. G. Costouros, et al. (2002). "Advantages of mRNA amplification for microarray analysis." Biotechniques **33**(4): 906-12, 914.
- Filho, G., J. Pittella, et al. (1994). Bogliolo Patologia. Rio de Janeiro.
- Fitzpatrick, J. M. and K. F. Hoffmann (2006). "Dioecious *Schistosoma mansoni* express divergent gene repertoires regulated by pairing." Int J Parasitol **36**: 1081-1089.
- Fitzpatrick, J. M., M. V. Johansen, et al. (2004). "Gender-associated gene expression in two related strains of *Schistosoma japonicum*." Mol Biochem Parasitol **136**(2): 191-209.
- Fitzpatrick, J. M., D. A. Johnston, et al. (2005). "An oligonucleotide microarray for transcriptome analysis of *Schistosoma mansoni* and its application/use to investigate gender-associated gene expression." Mol Biochem Parasitol **141**(1): 1-13.
- Franco, G. R., M. D. Adams, et al. (1995). "Identification of new *Schistosoma mansoni* genes by the EST strategy using a directional cDNA library." Gene **152**(2): 141-7.
- Franco, G. R., E. M. Rabelo, et al. (1997). "Evaluation of cDNA libraries from different developmental stages of *Schistosoma mansoni* for production of expressed sequence tags (ESTs)." DNA Res **4**(3): 231-40.

- Franco, G. R., A. F. Valadao, et al. (2000). "The Schistosoma gene discovery program: state of the art." Int J Parasitol **30**(4): 453-63.
- GenScript, C. (2006). Real-Time PCR Primer Design, GenScript Cooperation.
- Gentleman, R. and R. Ihaka (1997). The R language. Proceedings of the 28th Symposium on the Interface, The Interface Foundation of North America.
- Gentleman, R. C., V. J. Carey, et al. (2004). "Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics." Genome Biol **5**(10): R80.
- Ghaleb, A. M., J. Atwood, 3rd, et al. (2006). "A 3kDa peptide is involved in the chemoattraction in vitro of the male Schistosoma mansoni to the female." Microbes Infect.
- Giannini, A. L., S. V. Linhares, et al. (1995). "Molecular aspects of Schistosoma mansoni female maturation." Mem Inst Oswaldo Cruz **90**(2): 179-84.
- Gobert, G. N., R. McInnes, et al. (2006). "Transcriptomics tool for the human Schistosoma blood flukes using microarray gene expression profiling." Exp Parasitol.
- Gobert, G. N., D. J. Stenzel, et al. (1997). "Immunolocalization of the fatty acid-binding protein Sj-FABPc within adult Schistosoma japonicum." Parasitology **115 (Pt 1)**: 33-9.
- Gomes, L. I., R. L. Silva, et al. (2003). "Comparative analysis of amplified and nonamplified RNA for hybridization in cDNA microarray." Anal Biochem **321**(2): 244-51.
- Gotz, B. and M. Q. Klinkert (1993). "Expression and partial characterization of a cathepsin B-like enzyme (Sm31) and a proposed 'haemoglobinase' (Sm32) from Schistosoma mansoni." Biochem J **290 (Pt 3)**: 801-6.
- Gupta, B. C. and P. F. Basch (1987). "The role of Schistosoma mansoni males in feeding and development of female worms." J Parasitol **73**(3): 481-6.
- Haseeb, M. A. (1998). "Schistosoma mansoni: females enhance [C-14]-tyrosine incorporation in males maintained in vitro." Journal of Helminthology **72**(2): 123-126.

- Haseeb, M. A., L. K. Eveland, et al. (1985). "The uptake, localization and transfer of [4-¹⁴C]cholesterol in *Schistosoma mansoni* males and females maintained in vitro." Comp Biochem Physiol A **82**(2): 421-3.
- Haseeb, M. A., B. Fried, et al. (1989). "Schistosoma mansoni: female-dependent lipid secretion in males and corresponding changes in lipase activity." Int J Parasitol **19**(7): 705-9.
- Hasseman, J. (2002). Aminoallyl labelling of RNA for microarrays - SOP #: M004, TIGR. **2006**.
- Hoffmann, K. F. (2004). "An historical and genomic view of schistosome conjugal biology with emphasis on sex-specific gene expression." Parasitology **128 Suppl**: S11-22.
- Hoffmann, K. F., D. A. Johnston, et al. (2002). "Identification of *Schistosoma mansoni* gender-associated gene transcripts by cDNA microarray profiling." Genome Biol **3**(8): RESEARCH0041.
- Hoffmann, K. F., T. C. McCarty, et al. (2001). "Disease fingerprinting with cDNA microarrays reveals distinct gene expression profiles in lethal type 1 and type 2 cytokine-mediated inflammatory reactions." FASEB J **15**(13): 2545-7.
- IVIA, C. d. G. (2005). Blast2Go Tutorial, Centro de Genómica IVIA. **2006**.
- Jolly, E. R., C. S. Chin, et al. (2007). "Gene expression patterns during adaptation of a helminth parasite to different environmental niches." Genome Biol **8**(4): R65.
- Kennedy, M. W., J. C. Scott, et al. (2000). "Sj-FABPc fatty-acid-binding protein of the human blood fluke *Schistosoma japonicum*: structural and functional characterization and unusual solvent exposure of a portal-proximal tryptophan residue." Biochem J **349**(Pt 1): 377-84.
- Khalil, S. B. and N. S. Mansour (1995). "Worm development in hamsters infected with unisex and cross-mated *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium*." J Parasitol **81**(1): 8-11.
- Klein, S. L. (2004). "Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection." Parasite Immunology **26**: 246-264.
- Kunz, W. (2001). "Schistosome male-female interaction: induction of germ-cell differentiation." Trends Parasitol **17**(5): 227-31.

- Kunz, W., K. Opatz, et al. (1987). "Sequences of two genomic fragments containing an identical coding region for a putative egg-shell precursor protein of *Schistosoma mansoni*." Nucleic Acids Res **15**(14): 5894.
- Lawrence, J. D. (1973). "The ingestion of red blood cells by *Schistosoma mansoni*." J Parasitol **59**(1): 60-3.
- Lehninger, A. L., D. L. Nelson, et al. (1993). Principles of Biochemistry. New York, NY, Worth Publishers.
- Li, Y., T. Li, et al. (2004). "Systematic comparison of the fidelity of aRNA, mRNA and T-RNA on gene expression profiling using cDNA microarray." J Biotechnol **107**(1): 19-28.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-8.
- Louro, R., H. I. Nakaya, et al. (2007). "Androgen responsive intronic non-coding RNAs." BMC Biol **5**: 4.
- Loverde, P. T. and L. Chen (1991). "Schistosome female reproductive development." Parasitol Today **7**(11): 303-8.
- LoVerde, P. T., E. G. Niles, et al. (2004). "*Schistosoma mansoni* male-female interactions." Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie **82**(2): 357-374.
- Meyer, F., H. Meyer, et al. (1970). "Lipid metabolism in the parasitic and free-living flatworms, *Schistosoma mansoni* and *Dugesia dorotocephala*." Biochim Biophys Acta **210**(2): 257-66.
- Michaels, R. M. (1969). "Mating of *Schistosoma mansoni* in vitro." Exp Parasitol **25**(1): 58-71.
- Moertel, L., D. P. McManus, et al. (2006). "Oligonucleotide microarray analysis of strain- and gender-associated gene expression in the human blood fluke, *Schistosoma japonicum*." Mol Cell Probes **20**(5): 280-9.
- Morales-Montor, J., F. Mohamed, et al. (2001). "In vitro effects of hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) hormones on *Schistosoma mansoni*." J. Parasitol. **87**(5): 1132-1139.

- Nakazawa, M., M. R. Fantappie, et al. (1997). "Schistosoma mansoni: susceptibility differences between male and female mice can be mediated by testosterone during early infection." Exp Parasitol **85**(3): 233-40.
- Parkinson, H., U. Sarkans, et al. (2005). "ArrayExpress--a public repository for microarray gene expression data at the EBI." Nucleic Acids Res **33**(Database issue): D553-5.
- Payet, B., G. Chaumentin, et al. (2006). "Prolonged latent schistosomiasis diagnosed 38 years after infestation in a HIV patient." Scand J Infect Dis **38**(6): 572-5.
- Pellegrino, J. and A. F. Siqueira (1956). "[A perfusion technic for recovery of Schistosoma mansoni from experimentally infected guinea pigs]." Rev Bras Malariol Doencas Trop **8**(4): 589-97.
- Polacek, D. C., A. G. Passerini, et al. (2003). "Fidelity and enhanced sensitivity of differential transcription profiles following linear amplification of nanogram amounts of endothelial mRNA." Physiol Genomics **13**(2): 147-56.
- Popiel, I. and P. F. Basch (1984). "Reproductive development of female Schistosoma mansoni (Digenea: Schistosomatidae) following bisexual pairing of worms and worm segments." J Exp Zool **232**(1): 141-50.
- Popiel, I., D. Cioli, et al. (1984). "Reversibility of drug-induced regression in female Schistosoma mansoni upon pairing with male worms in vivo." Z Parasitenkd **70**(3): 421-4.
- Popiel, I. and D. A. Erasmus (1984). "Schistosoma mansoni: ultrastructure of adults from mice treated with oxamniquine." Exp Parasitol **58**(3): 254-62.
- Purnell, R. E. (1966). "Host-parasite relationships in schistosomiasis. II. The effects of age and sex on the infection of mice and hamsters with cercariae of Schistosoma mansoni and of hamsters with cercariae of Schistosoma haematobium." Ann Trop Med Parasitol **60**(1): 94-9.
- Ramos, T. M., A. S. de Vasconcelos, et al. (2004). "[Alterations in cholesterol, triglyceride and total phospholipid levels in plasma of Callithrix jacchus (sagui) reinfected by Schistosoma mansoni]." Rev Soc Bras Med Trop **37**(1): 37-40.
- Reis, M. G., J. Kuhns, et al. (1989). "Localization and pattern of expression of a female specific mRNA in Schistosoma mansoni." Mol Biochem Parasitol **32**(2-3): 113-9.

- Remoue, F., J. C. Mani, et al. (2002). "Functional specific binding of testosterone to *Schistosoma haematobium* 28-kilodalton glutathione S-transferase." Infect Immun **70**(2): 601-5.
- Rice, P., I. Longden, et al. (2000). "EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite." Trends Genet **16**(6): 276-7.
- Rodrigues, V., M. Chaudhri, et al. (1989). "Predicted structure of a major *Schistosoma mansoni* eggshell protein." Mol Biochem Parasitol **32**(1): 7-13.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, et al. (1989). Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schuler, G. D. (1997). "Sequence mapping by electronic PCR." Genome Res **7**(5): 541-50.
- Schussler, P., C. G. Grevelding, et al. (1997). "Identification of Ras, MAP kinases, and a GAP protein in *Schistosoma mansoni* by immunoblotting and their putative involvement in male-female interaction." Parasitology **115 (Pt 6)**: 629-34.
- Shaw, J. R. (1977). "*Schistosoma mansoni*: pairing in vitro and development of females from single sex infections." Exp Parasitol **41**(1): 54-65.
- Shaw, J. R., I. Marshall, et al. (1977). "*Schistosoma mansoni*: in vitro stimulation of vitelline cell development by extracts of male worms." Exp Parasitol **42**(1): 14-20.
- Shaw, M. K. (1987). "*Schistosoma mansoni*: vitelline gland development in females from single sex infections." J Helminthol **61**(3): 253-9.
- Shaw, M. K. and D. A. Erasmus (1988). "*Schistosoma mansoni*: praziquantel-induced changes to the female reproductive system." Exp Parasitol **65**(1): 31-42.
- Siegel, D. A. and J. W. Tracy (1988). "Effect of pairing in vitro on the glutathione level of male *Schistosoma mansoni*." J Parasitol **74**(4): 524-31.
- Siegel, D. A. and J. W. Tracy (1989). "*Schistosoma mansoni*: influence of the female parasite on glutathione biosynthesis in the male." Exp Parasitol **69**(2): 116-24.
- Silveira, A. M., A. A. Friche, et al. (1986). "Transfer of [¹⁴C] cholesterol and its metabolites between adult male and female worms of *Schistosoma mansoni*." Comp Biochem Physiol B **85**(4): 851-7.

- Simurda, M. C., H. van Keulen, et al. (1988). "Schistosoma mansoni: identification and analysis of an mRNA and a gene encoding superoxide dismutase (Cu/Zn)." Exp Parasitol **67**(1): 73-84.
- Smithers, S. R. and R. J. Terry (1965). "The infection of laboratory hosts with cercariae of Schistosoma mansoni and the recovery of the adult worms." Parasitology **55**(4): 695-700.
- Smyth, G. K. (2004). "Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments." Stat Appl Genet Mol Biol **3**(1): Article 3.
- Smyth, G. K., J. Michaud, et al. (2005). "The use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments." Bioinformatics **21**(9): 2067-2075.
- Smyth, G. K. and T. P. Speed (2003). "Normalization of cDNA microarray data." Methods **31**: 265-273.
- Steel, R. G. G., J. H. Torrie, et al. (1997). Principles and Procedures of Statistics. A Biometric Approach., WCB McGraw-Hill.
- TDR (2002). TDR Strategic Direction: Schistosomiasis, World Health Organization.
- Valadares, T. E., P. M. Coelho, et al. (1981). "[Schistosoma mansoni: aspects of the oviposition of the LE' strain in mice infected with a couple of worms]." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **23**(1): 6-11.
- Valadares, T. E., P. M. Coelho, et al. (1980). "[Schistosoma mansoni: aspects of oviposition (distribution of the eggs in the intestines and liver of mice and the elimination of these eggs via the feces) in the LE and CA strains]." Rev Bras Malariol Doencas Trop **32**: 53-9.
- Van Gelder, R. N., M. E. von Zastrow, et al. (1990). "Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(5): 1663-7.
- Verjovski-Almeida, S., R. DeMarco, et al. (2003). "Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite Schistosoma mansoni." Nat Genet **35**(2): 148-57.
- Verjovski-Almeida, S., T. M. Venancio, et al. (2007). "Use of a 44k oligoarray to explore the transcriptome of Schistosoma mansoni adult worms." Exp Parasitol.

- Vermeire, J. J., A. S. Taft, et al. (2006). "Schistosoma mansoni: DNA microarray gene expression profiling during the miracidium-to-mother sporocyst transformation." Mol Biochem Parasitol **147**(1): 39-47.
- Wang, Y., C. Barbacioru, et al. (2006). "Large scale real-time PCR validation on gene expression measurements from two commercial long-oligonucleotide microarrays." BMC Genomics **7**: 59.
- WHO, W. H. O. (1997). Vector Control - Methods for Use by Individuals and Communities, WHO. **2006**.
- World Health Organization. (2001). The world health report : Mental Health : New Understanding, New Hope. Geneva, World Health Organization: v.
- Zanotti, E. M., L. A. Magalhaes, et al. (1982). "[Morphology and development of Schistosoma mansoni Sambon, 1907 in unisexual infections experimentally induced in mice]." Rev Saude Publica **16**(2): 114-9.
- Zweiger, G. and R. W. Scott (1997). "From expressed sequence tags to 'epigenomics': an understanding of disease processes." Curr Opin Biotechnol **8**(6): 684-7.

Lista de Figuras do Anexo

Figura 1 - Distribuição empírica suavizada para os canais verde e vermelho nas lâminas utilizadas para o experimento estudando o efeito do pareamento sexual na expressão gênica de fêmeas de <i>S. mansoni</i>	208
Figura 2 - Distribuição empírica suavizada para os canais verde e vermelho nas lâminas utilizadas para o experimento estudando o efeito do pareamento sexual na expressão gênica de machos de <i>S. mansoni</i>	211
Figura 3 - Distribuição empírica suavizada para os canais verde e vermelho nas lâminas utilizadas para o experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica de fêmeas de <i>S. mansoni</i>	213
Figura 4 - Distribuição empírica suavizada para os canais verde e vermelho nas lâminas utilizadas para o experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica de machos de <i>S. mansoni</i>	215
Figura 5 – <i>Boxplots</i> representando os valores de M para cada agulha de impressão, na escala log ₂ , antes (gráfico à esquerda) e depois da normalização (gráfico à direita) para as três primeiras lâminas utilizadas para o experimento estudando o efeito do pareamento sexual na expressão gênica de fêmeas de <i>S. mansoni</i>	217
Figura 6 – <i>Boxplots</i> representando os valores de M para cada agulha de impressão, na escala log ₂ , antes (gráfico à esquerda) e depois da normalização (gráfico à direita) para as lâminas restantes utilizadas para o experimento estudando o efeito do pareamento sexual na expressão gênica de fêmeas de <i>S. mansoni</i>	219
Figura 7 – <i>Boxplots</i> representando os valores de M para cada agulha de impressão, na escala log ₂ , antes (gráfico à esquerda) e depois da normalização (gráfico à direita) para as	

três primeiras lâminas utilizadas para o experimento estudando o efeito do paramento sexual na expressão gênica de machos de <i>S. mansoni</i>	221
Figura 9 – <i>Boxplots</i> representando os valores de M para cada agulha de impressão, na escala log2, antes (gráfico à esquerda) e depois da normalização (gráfico à direita) para as três primeiras lâminas utilizadas para o experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica de machos de <i>S. mansoni</i>	225
Figura 10 – <i>Boxplots</i> representando os valores de M para cada agulha de impressão, na escala log2, antes (gráfico à esquerda) e depois da normalização (gráfico à direita) para as lâminas restantes utilizadas para o experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica de machos de <i>S. mansoni</i>	227
Figura 11 – <i>Boxplots</i> representando os valores de M para cada agulha de impressão, na escala log2, antes (gráfico à esquerda) e depois da normalização (gráfico à direita) para as três primeiras lâminas utilizadas para o experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica de fêmeas de <i>S. mansoni</i>	229
Figura 12 – <i>Boxplots</i> representando os valores de M para cada agulha de impressão, na escala log2, antes (gráfico à esquerda) e depois da normalização (gráfico à direita) para as lâminas restantes utilizadas para o experimento estudando o efeito do sexo dos hospedeiro na expressão gênica de fêmeas de <i>S. mansoni</i>	231
Figura 13 - <i>Boxplot</i> representando os valores de M antes e após a normalização para as lâminas utilizadas no experimento estudando o efeito do pareamento sexual na expressão gênica em fêmeas de <i>S. mansoni</i>	233

Figura 14 - <i>Boxplot</i> representando os valores de M antes e após a normalização para as lâminas utilizadas no experimento estudando o efeito do pareamento sexual na expressão gênica em machos de <i>S. mansoni</i>	234
Figura 15 - <i>Boxplot</i> representando os valores de M antes e após a normalização para as lâminas utilizadas no experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica em machos de <i>S. mansoni</i>	235
Figura 16 - <i>Boxplot</i> representando os valores de M antes e após a normalização para as lâminas utilizadas no experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica em fêmeas de <i>S. mansoni</i>	236
Figura 17 - MA plots para as três primeiras lâminas utilizadas no experimento estudando o efeito do pareamento sexual na expressão gênica em fêmeas de <i>S. mansoni</i>	237
Figura 18 - MA plots para as lâminas restantes utilizadas no experimento estudando o efeito do pareamento sexual na expressão gênica em fêmeas de <i>S. mansoni</i>	239
Figura 19 - MA plots para as três primeiras lâminas utilizadas no experimento estudando o efeito do pareamento sexual na expressão gênica em machos de <i>S. mansoni</i>	241
Figura 20 - MA plots para as três lâminas restantes utilizadas no experimento estudando o efeito do pareamento sexual na expressão gênica em machos de <i>S. mansoni</i>	243
Figura 21 - MA plots para as três primeiras lâminas utilizadas no experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica em fêmeas de <i>S. mansoni</i>	245
Figura 22 - MA plots para as lâminas restantes utilizadas no experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica em fêmeas de <i>S. mansoni</i>	247
Figura 23 - MA plots para as três primeiras lâminas utilizadas no experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica em machos de <i>S. mansoni</i>	249

Figura 24 - MA plots para as três lâminas restantes utilizadas no experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica em machos de <i>S. mansoni</i>	251
Figura 25 - <i>Background</i> para os canais verde e vermelho para as três primeiras lâminas utilizadas no experimento estudando o efeito do pareamento sexual na expressão gênica em fêmeas de <i>S. mansoni</i>	253
Figura 26 - <i>Background</i> para os canais verde e vermelho para as lâminas restantes utilizadas no experimento estudando o efeito do pareamento sexual na expressão gênica em fêmeas de <i>S. mansoni</i>	255
Figura 27 - <i>Background</i> para os canais verde e vermelho para as três primeiras lâminas utilizadas no experimento estudando o efeito do pareamento sexual na expressão gênica em machos de <i>S. mansoni</i>	257
Figura 28 - <i>Background</i> para os canais verde e vermelho para as três primeiras lâminas utilizadas no experimento estudando o efeito do pareamento sexual na expressão gênica em machos de <i>S. mansoni</i>	259
Figura 29 - <i>Background</i> para os canais verde e vermelho para as três primeiras lâminas utilizadas no experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica em fêmeas de <i>S. mansoni</i>	261
Figura 30 - <i>Background</i> para os canais verde e vermelho para as três lâminas restantes utilizadas no experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica em fêmeas de <i>S. mansoni</i>	263
Figura 31 - <i>Background</i> para os canais verde e vermelho para as três primeiras lâminas utilizadas no experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica em machos de <i>S. mansoni</i>	265

Figura 32 - <i>Background</i> para os canais verde e vermelho para as lâminas restantes utilizadas no experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica em machos de <i>S. mansoni</i> .	267
Figura 33 - Gráficos representando a distribuição espacial dos valores de M e A para as três primeiras lâminas utilizadas no experimento estudando o efeito do pareamento sexual na expressão gênica em fêmeas de <i>S. mansoni</i> .	269
Figura 34 - Gráficos representando a distribuição espacial dos valores de M e A para as lâminas restantes utilizadas no experimento estudando o efeito do pareamento sexual na expressão gênica em fêmeas de <i>S. mansoni</i> .	271
Figura 36 - Gráficos representando a distribuição espacial dos valores de M e A para as lâminas restantes utilizadas no experimento estudando o efeito do pareamento sexual na expressão gênica em machos de <i>S. mansoni</i> .	275
Figura 37 - Gráficos representando a distribuição espacial dos valores de M e A para as três primeiras lâminas utilizadas no experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica em fêmeas de <i>S. mansoni</i> .	277
Figura 38 - Gráficos representando a distribuição espacial dos valores de M e A para as lâminas restantes utilizadas no experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica em fêmeas de <i>S. mansoni</i> .	279
Figura 39 - Gráficos representando a distribuição espacial dos valores de M e A para as três primeiras lâminas utilizadas no experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica em machos de <i>S. mansoni</i> .	281

Figura 40 - Gráficos representando a distribuição espacial dos valores de M e A para as lâminas restantes utilizadas no experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica em machos de *S. mansoni*. 283

ANEXO III– Figuras adicionais (controle de qualidade das lâminas)

Figura 1 - Distribuição empírica suavizada para os canais verde e vermelho nas lâminas utilizadas para o experimento estudando o efeito do pareamento sexual na expressão gênica de fêmeas de *S. mansoni*. Na coluna da esquerda estão representadas as distribuições para os canais verde e vermelho antes de qualquer normalização. Na coluna da direita estão as respectivas distribuições após normalização usando robust spline. As distribuições estão ordenadas de cima para baixo na seguinte ordem: lâminas número 67, 68, 69, 70, 72, 73.

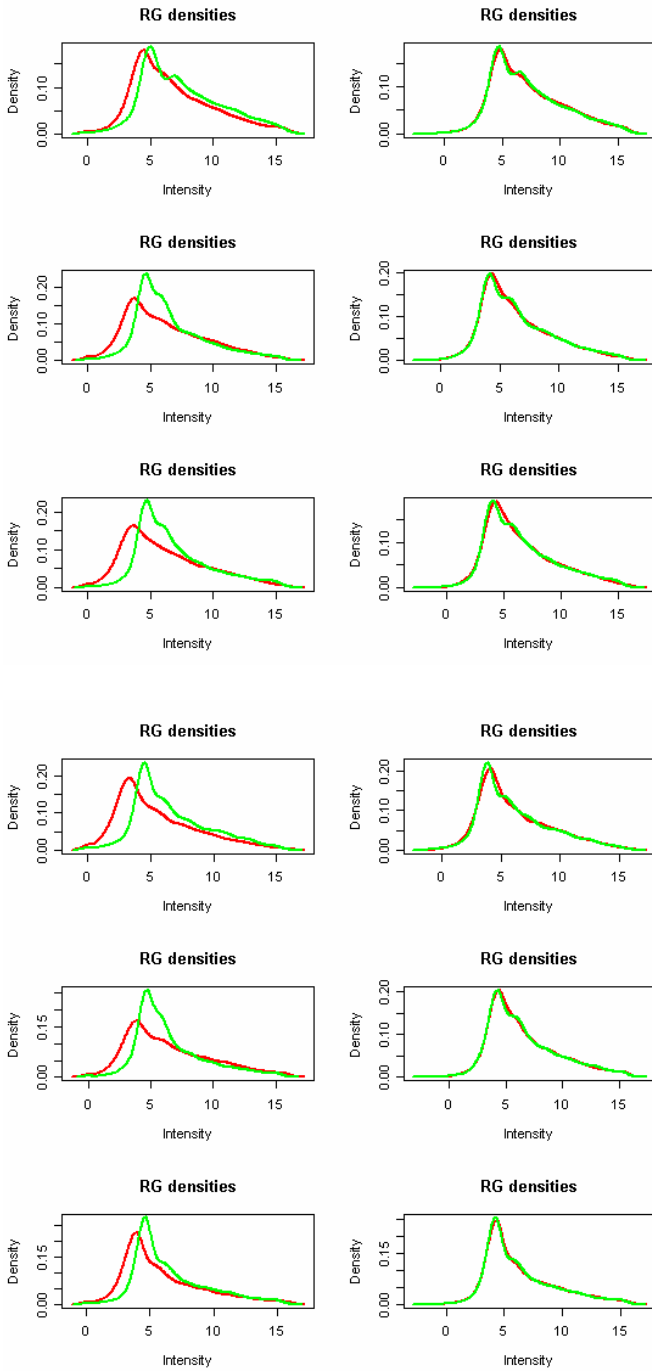


Figura 2 - Distribuição empírica suavizada para os canais verde e vermelho nas lâminas utilizadas para o experimento estudando o efeito do pareamento sexual na expressão gênica de machos de *S. mansoni*. Na coluna da esquerda estão representadas as distribuições para os canais verde e vermelho antes de qualquer normalização. Na coluna da direita estão as respectivas distribuições após normalização usando robust spline. As distribuições estão ordenadas de cima para baixo na seguinte ordem: lâminas número 76, 77, 78, 79, 80, 81.

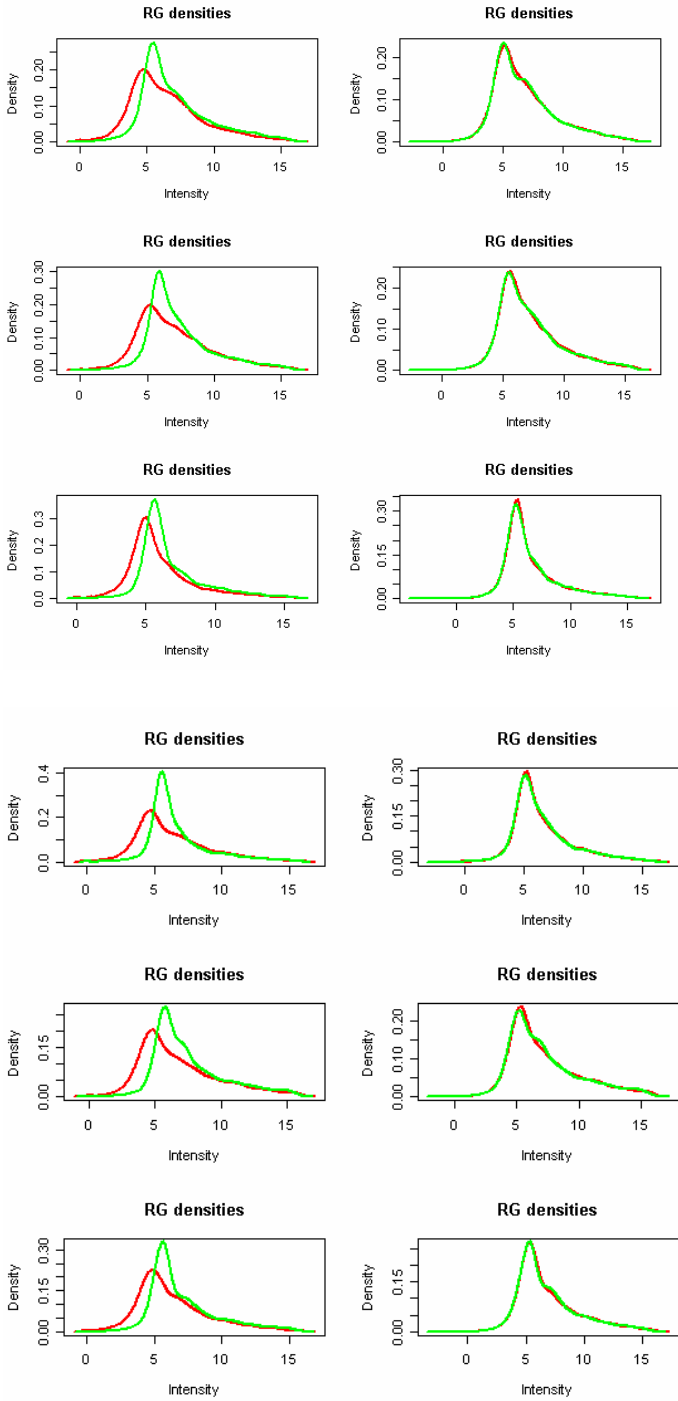


Figura 3 - Distribuição empírica suavizada para os canais verde e vermelho nas lâminas utilizadas para o experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica de fêmeas de *S. mansoni*. Na coluna da esquerda estão representadas as distribuições para os canais verde e vermelho antes de qualquer normalização. Na coluna da direita estão as respectivas distribuições após normalização usando robust spline. As distribuições estão ordenadas de cima para baixo na seguinte ordem: lâminas número 55, 54, 57, 58, 59, 53.

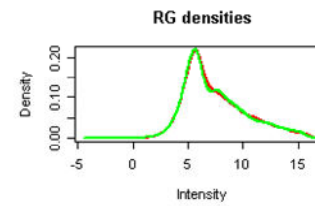
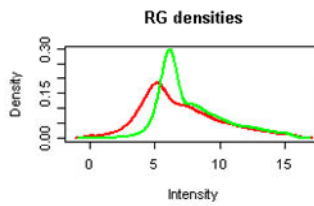
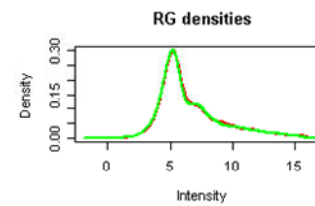
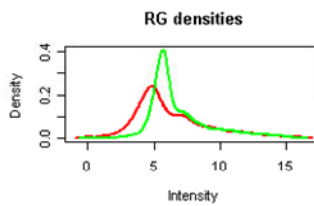
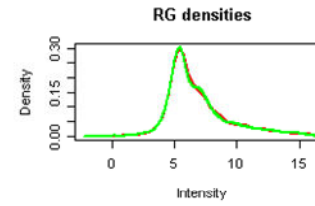
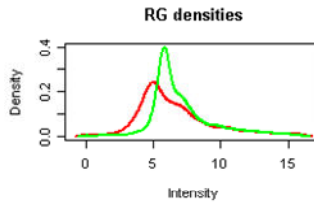
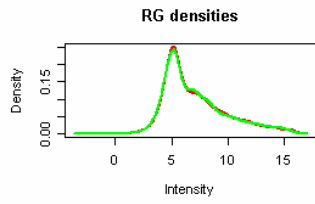
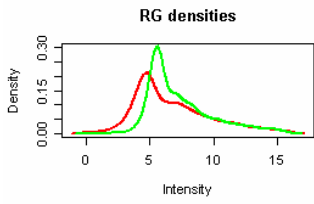
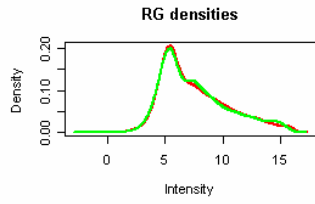
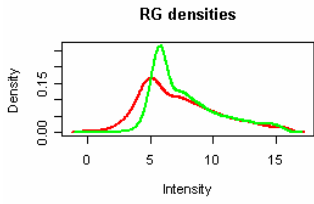
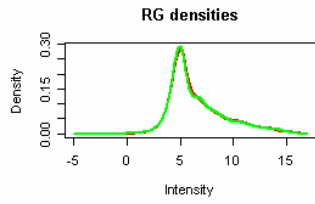
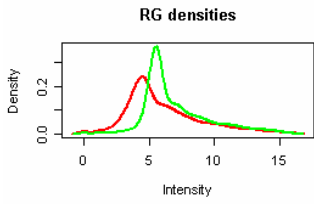


Figura 4 - Distribuição empírica suavizada para os canais verde e vermelho nas lâminas utilizadas para o experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica de machos de *S. mansoni*. Na coluna da esquerda estão representadas as distribuições para os canais verde e vermelho antes de qualquer normalização. Na coluna da direita estão as respectivas distribuições após normalização usando robust spline. As distribuições estão ordenadas de cima para baixo na seguinte ordem: lâminas número 82, 83, 84, 85, 86, 87.

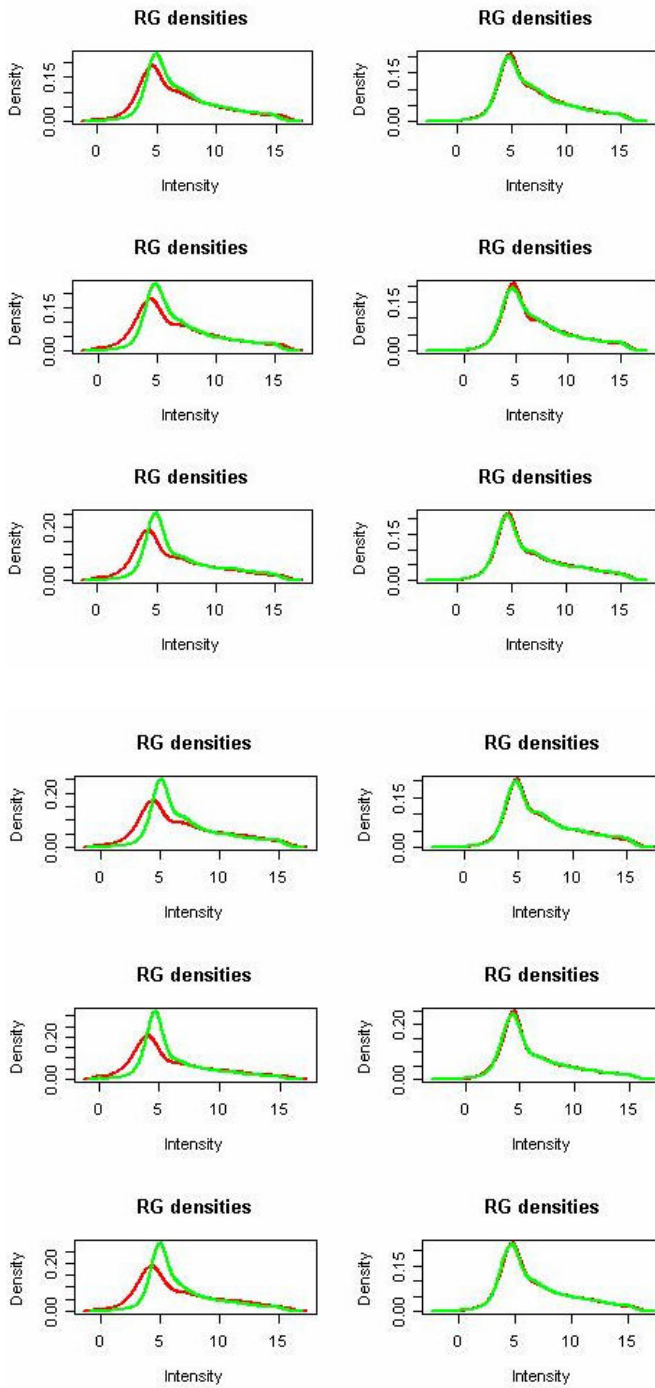
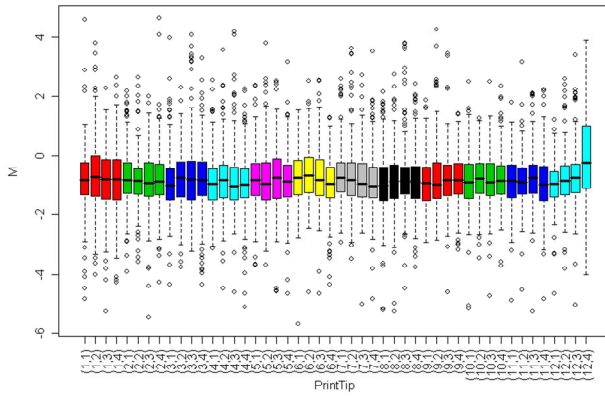
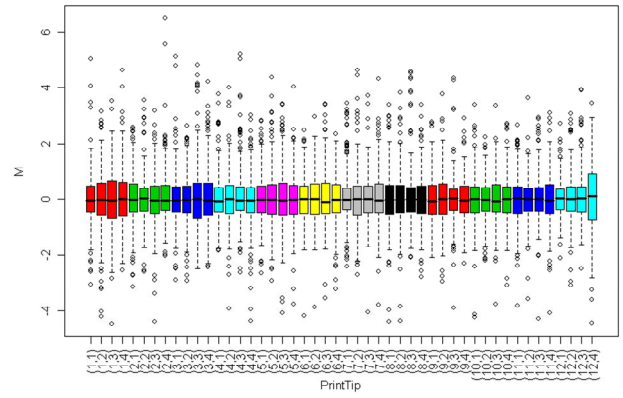


Figura 5 – *Boxplots* representando os valores de M para cada agulha de impressão, na escala log₂, antes (gráfico à esquerda) e depois da normalização (gráfico à direita) para as três primeiras lâminas utilizadas para o experimento estudando o efeito do paramento sexual na expressão gênica de fêmeas de *S. mansoni*. Na coluna da esquerda estão representados os valores de M na escala log₂, para cada agulha de impressão, antes de qualquer normalização e, na direita, estão os valores de M depois da normalização.

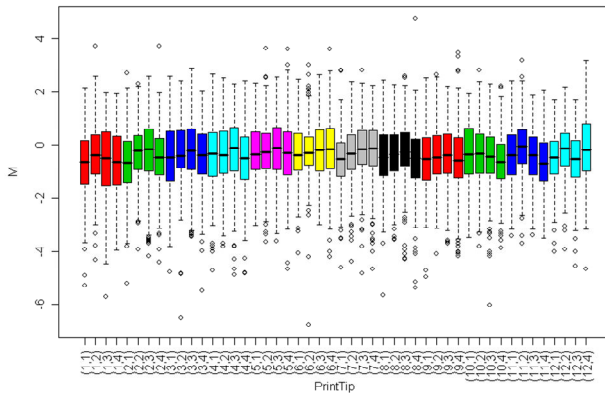
Lâmina 67: Pré-normalização



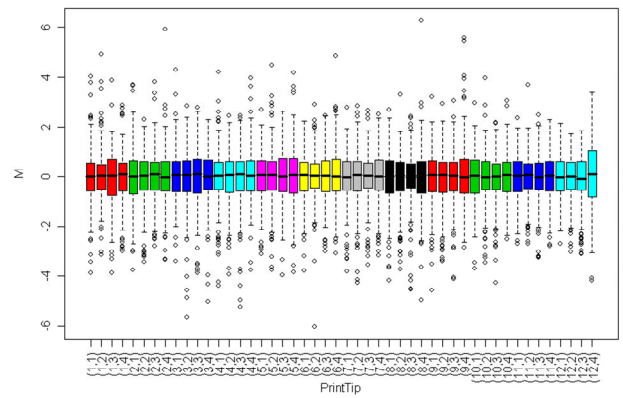
Lâmina 67: Normalizada



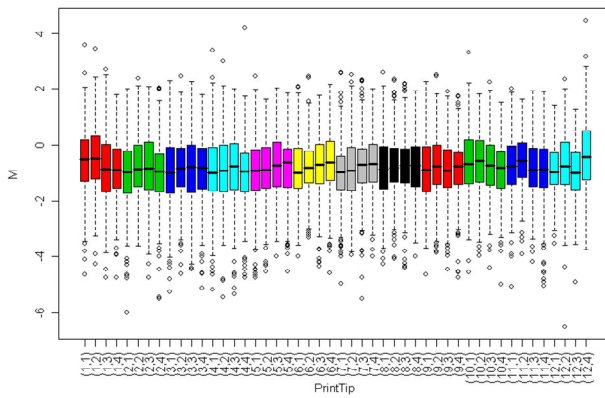
Lâmina 68: Pré-normalização



Lâmina 68: Normalizada



Lâmina 69: Pré-normalização



Lâmina 69: Normalizada

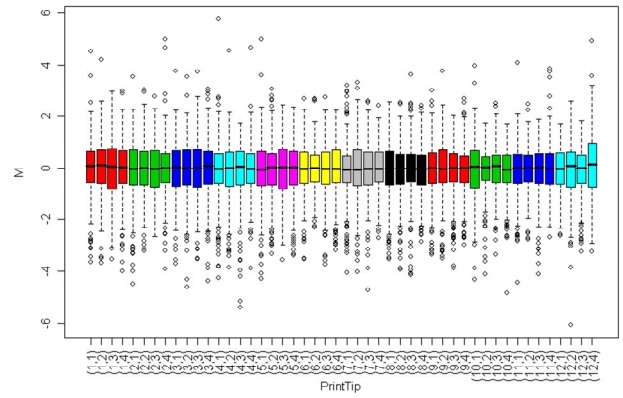
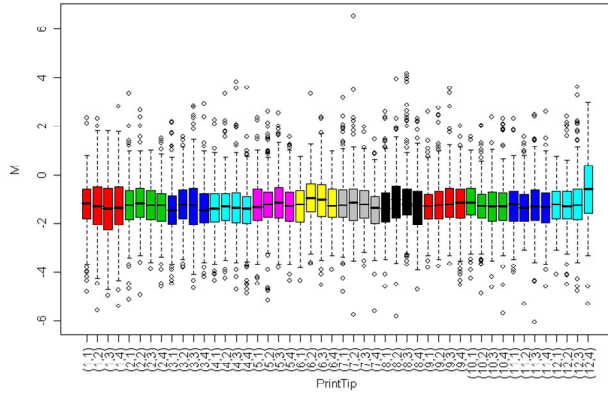
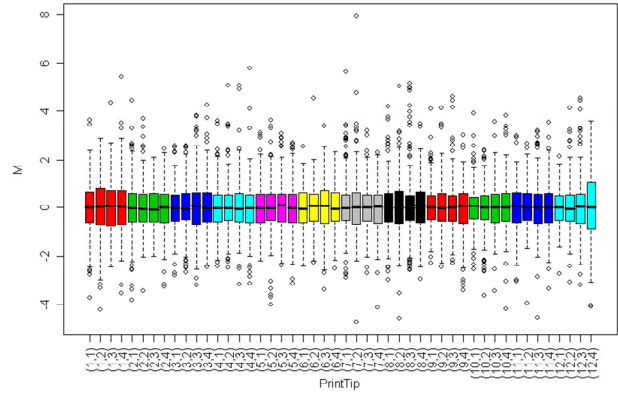


Figura 6 – *Boxplots* representando os valores de M para cada agulha de impressão, na escala log2, antes (gráfico à esquerda) e depois da normalização (gráfico à direita) para as lâminas restantes utilizadas para o experimento estudando o efeito do paramento sexual na expressão gênica de fêmeas de *S. mansoni*. Na coluna da esquerda estão representados os valores de M na escala log2, para cada agulha de impressão, antes de qualquer normalização e, na direita, estão os valores de M depois da normalização.

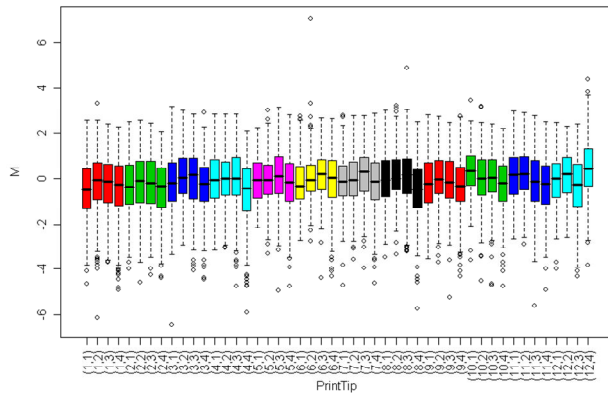
Lâmina 70: Pré-normalização



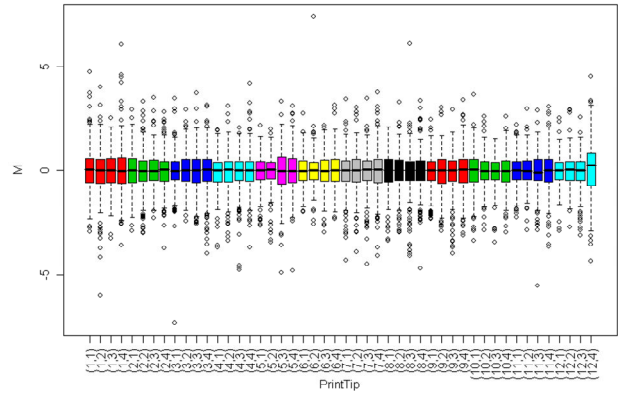
Lâmina 70: Normalizada



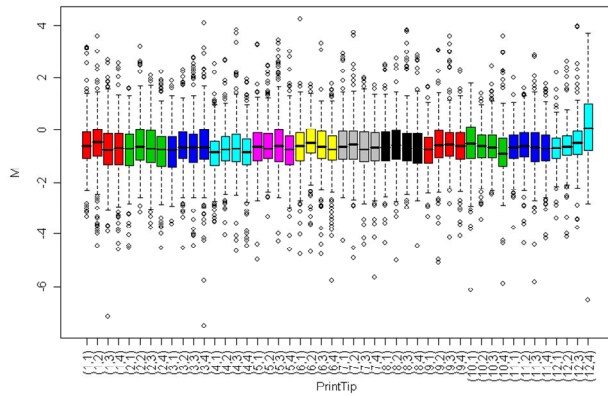
Lâmina 72: Pré-normalização



Lâmina 72: Normalizada



Lâmina 73: Pré-normalização



Lâmina 73: Normalizada

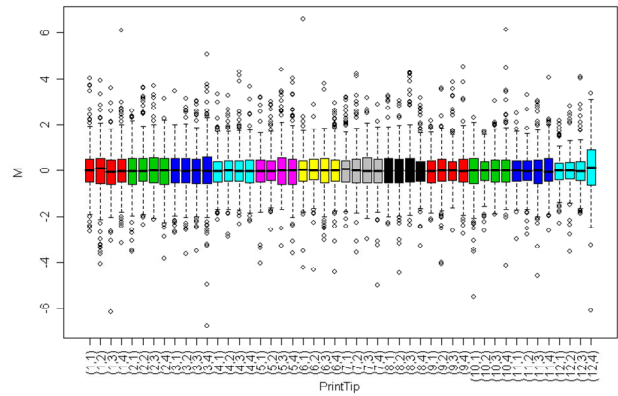
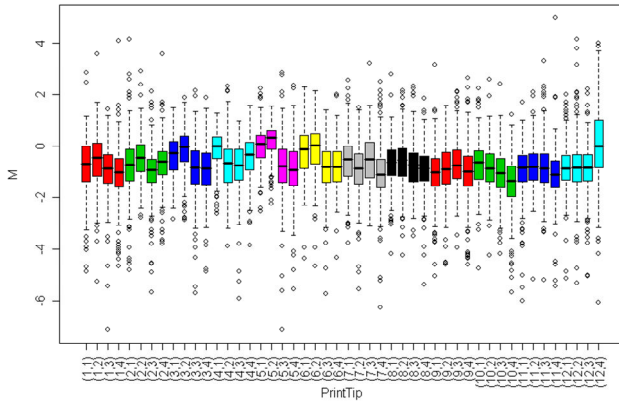
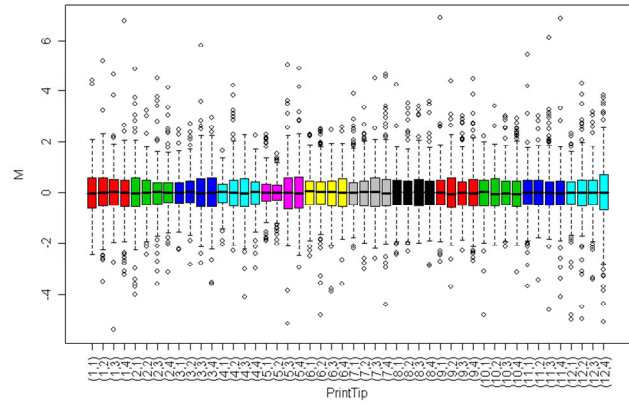


Figura 7 – *Boxplots* representando os valores de M para cada agulha de impressão, na escala log2, antes (gráfico à esquerda) e depois da normalização (gráfico à direita) para as três primeiras lâminas utilizadas para o experimento estudando o efeito do paramento sexual na expressão gênica de machos de *S. mansoni*. Na coluna da esquerda estão representados os valores de M na escala log2, para cada agulha de impressão, antes de qualquer normalização e, na direita, estão os valores de M depois da normalização.

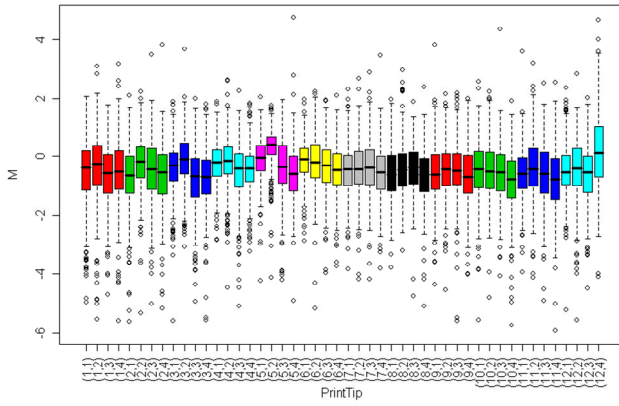
Lâmina 61: Pré-normalização



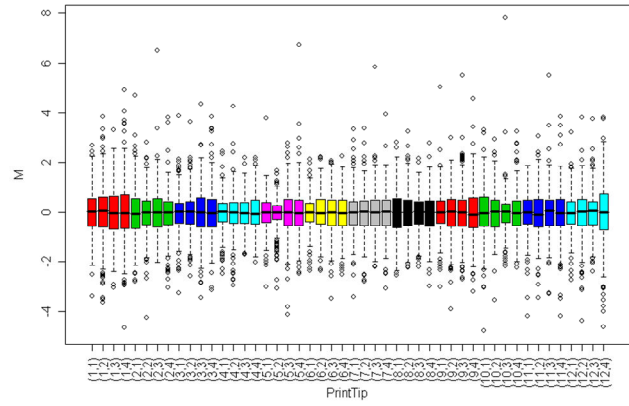
Lâmina 61: Normalizada



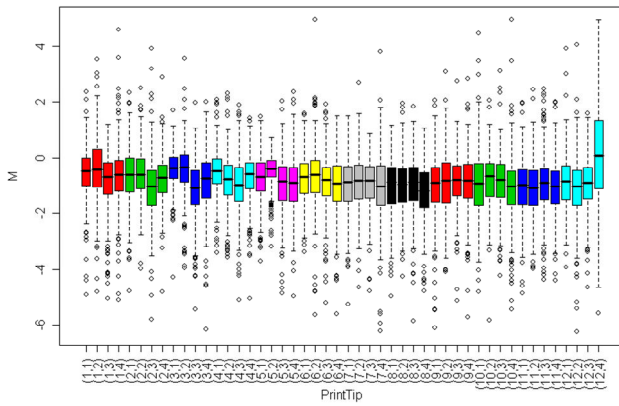
Lâmina 62: Pré-normalização



Lâmina 62: Normalizada



Lâmina 63: Pré-normalização



Lâmina 63: Normalizada

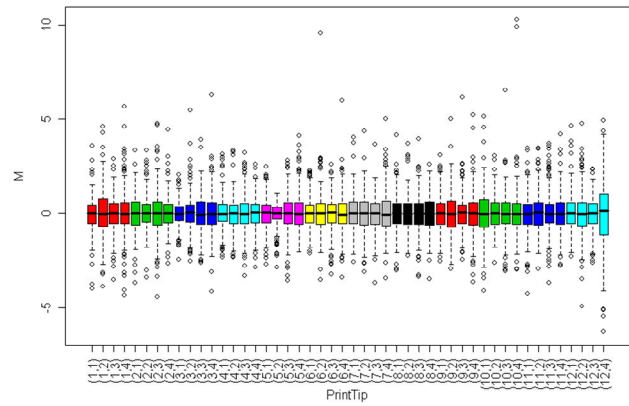
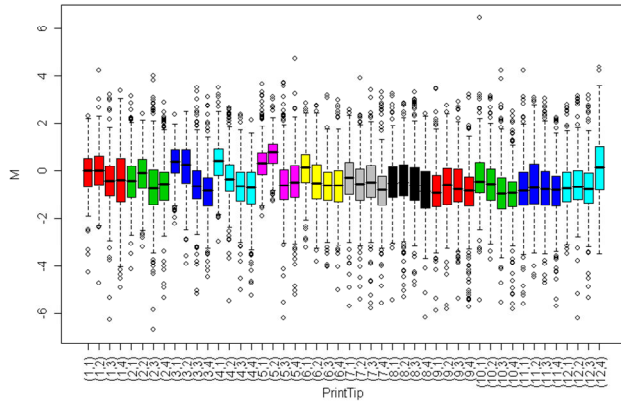
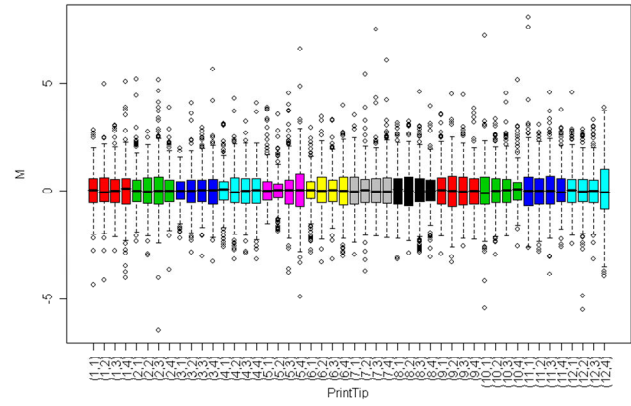


Figura 8 – *Boxplots* representando os valores de M para cada agulha de impressão, na escala \log_2 , antes (gráfico à esquerda) e depois da normalização (gráfico à direita) para as lâminas restantes utilizadas para o experimento estudando o efeito do paramento sexual na expressão gênica de machos de *S. mansoni*. Na coluna da esquerda estão representados os valores de M na escala \log_2 , para cada agulha de impressão, antes de qualquer normalização e, na direita, estão os valores de M depois da normalização.

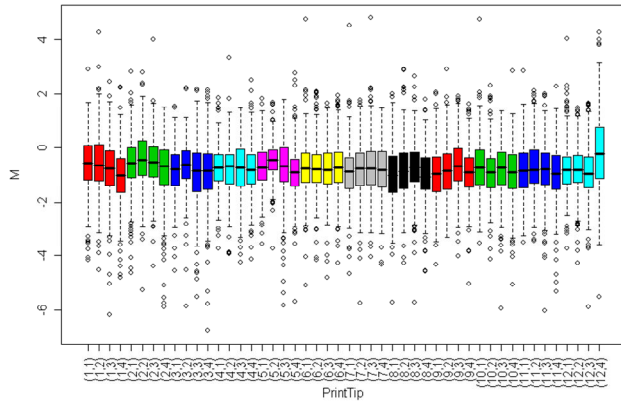
Lâmina 64: Pré-normalização



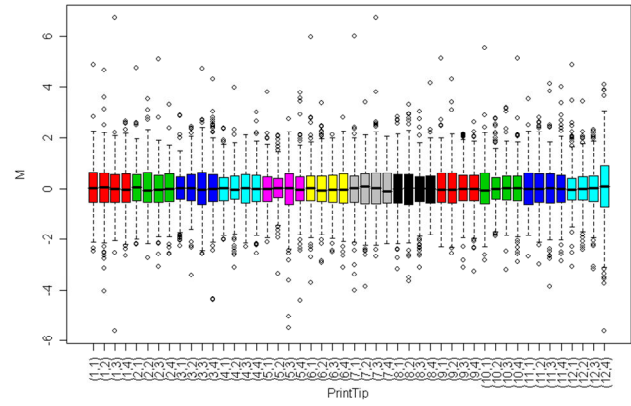
Lâmina 64: Normalizada



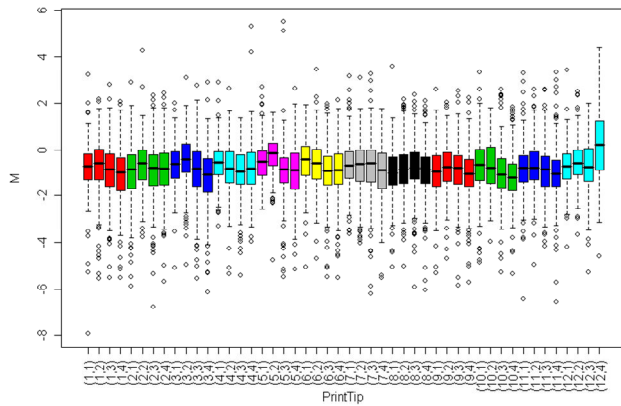
Lâmina 65: Pré-normalização



Lâmina 65: Normalizada



Lâmina 66: Pré-normalização



Lâmina 66: Normalizada

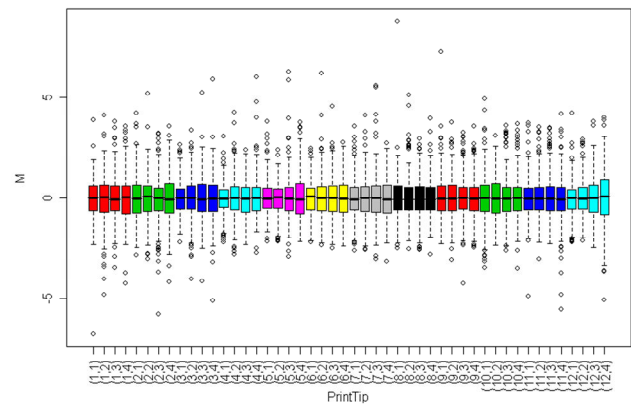
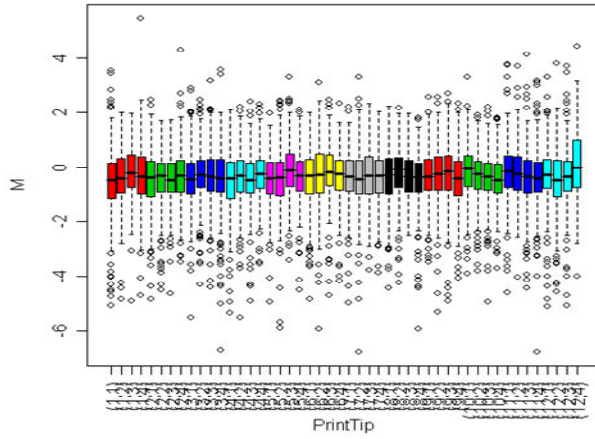
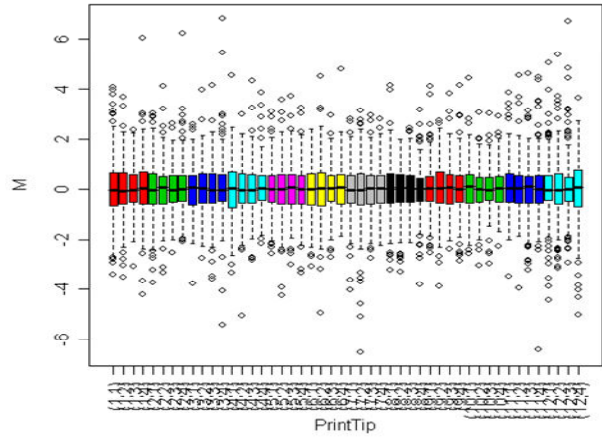


Figura 9 – *Boxplots* representando os valores de M para cada agulha de impressão, na escala log2, antes (gráfico à esquerda) e depois da normalização (gráfico à direita) para as três primeiras lâminas utilizadas para o experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica de machos de *S. mansoni*. Na coluna da esquerda estão representados os valores de M na escala log2, para cada agulha de impressão, antes de qualquer normalização e, na direita, estão os valores de M depois da normalização.

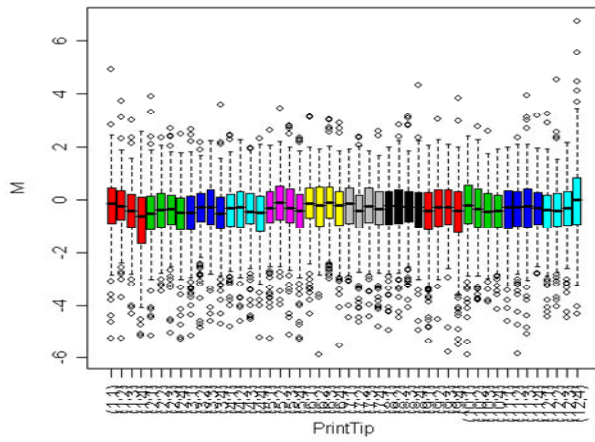
Lâmina 82 : Pré-Normalização



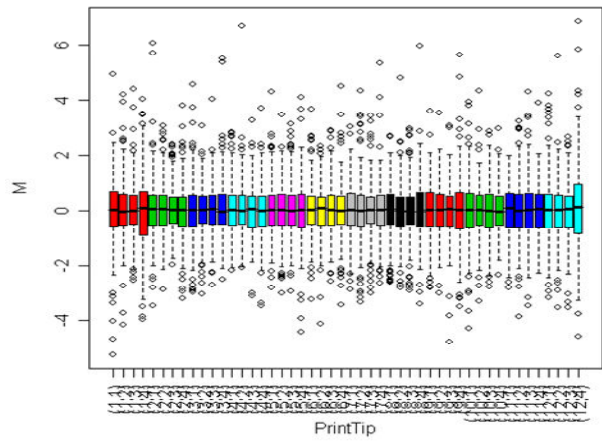
Lâmina 82 : Normalizada



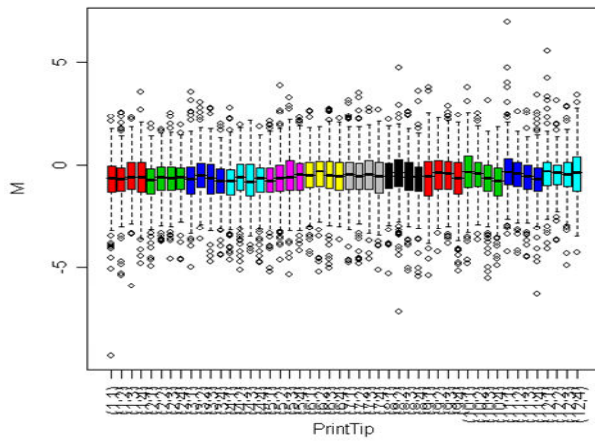
Lâmina 83 : Pré-Normalização



Lâmina 83 : Normalizada



Lâmina 84 : Pré-Normalização



Lâmina 84 : Normalizada

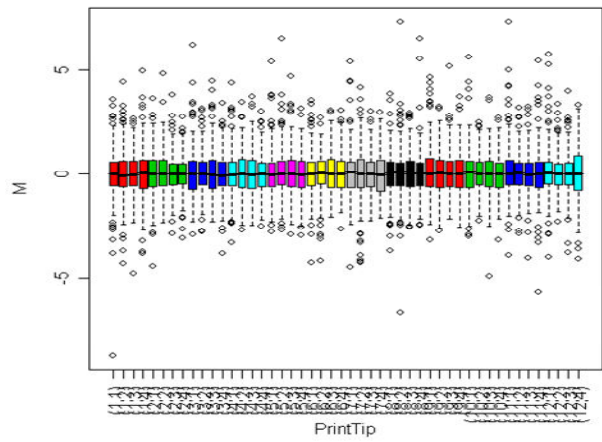
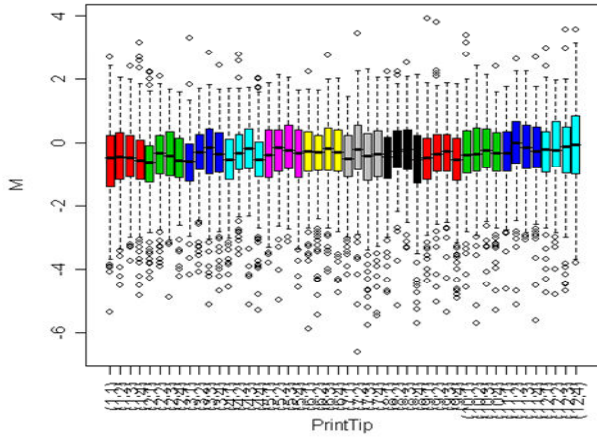
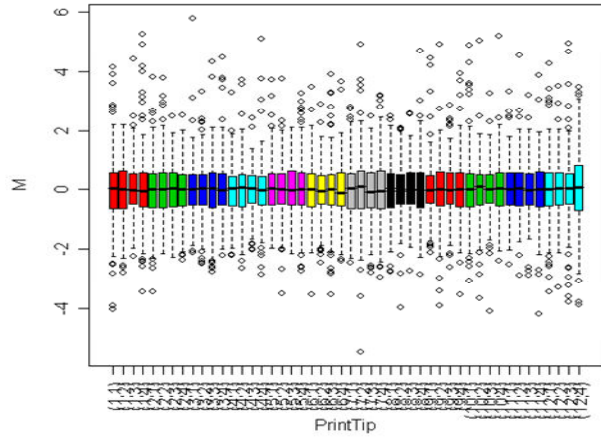


Figura 10 – *Boxplots* representando os valores de M para cada agulha de impressão, na escala log2, antes (gráfico à esquerda) e depois da normalização (gráfico à direita) para as lâminas restantes utilizadas para o experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica de machos de *S. mansoni*. Na coluna da esquerda estão representados os valores de M na escala log2, para cada agulha de impressão, antes de qualquer normalização e, na direita, estão os valores de M depois da normalização.

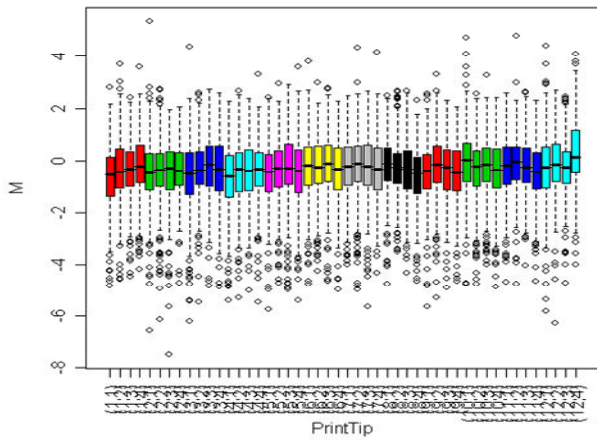
Lâmina 85 : Pré-Normalização



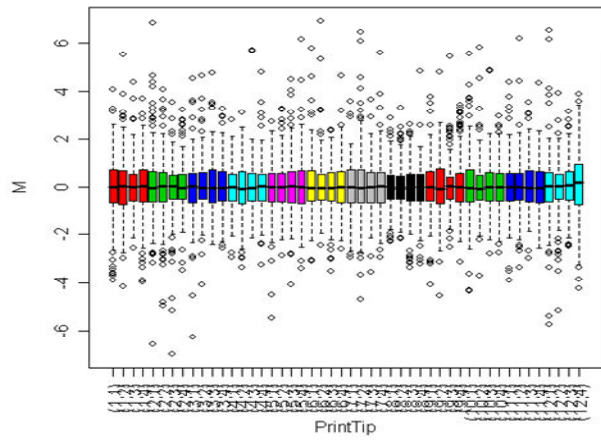
Lâmina 85 : Normalizada



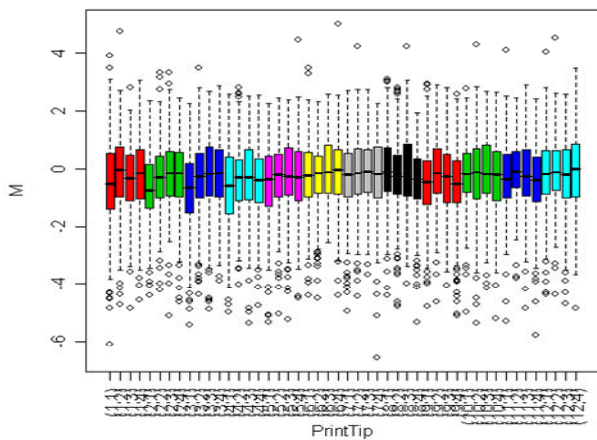
Lâmina 86 : Pré-Normalização



Lâmina 86 : Normalizada



Lâmina 87 : Pré-Normalização



Lâmina 87 : Normalizada

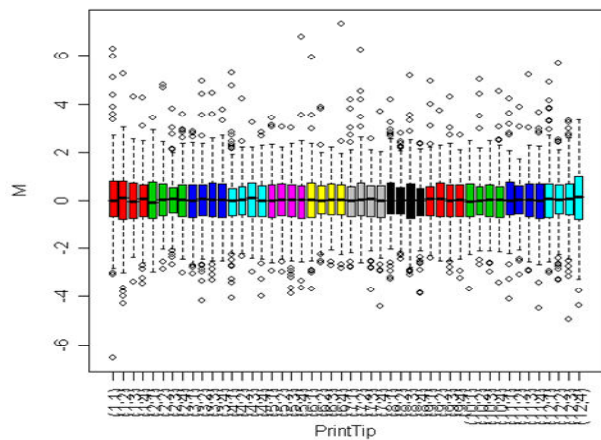
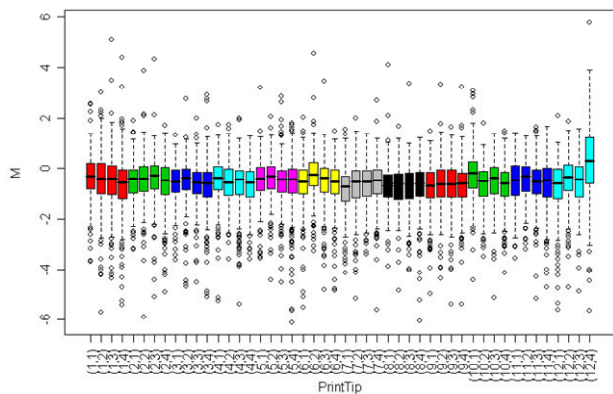
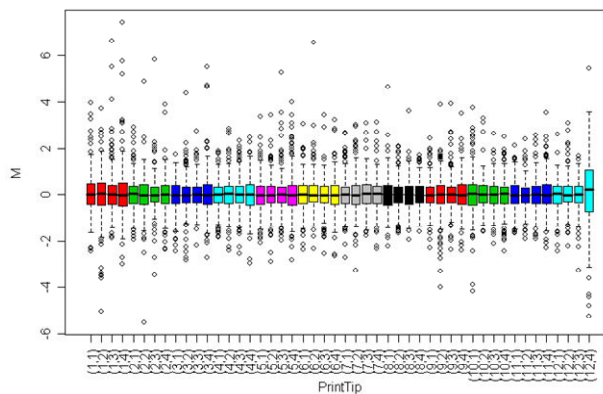


Figura 11 – *Boxplots* representando os valores de M para cada agulha de impressão, na escala log₂, antes (gráfico à esquerda) e depois da normalização (gráfico à direita) para as três primeiras lâminas utilizadas para o experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica de fêmeas de *S. mansoni*. Na coluna da esquerda estão representados os valores de M na escala log₂, para cada agulha de impressão, antes de qualquer normalização e, na direita, estão os valores de M depois da normalização.

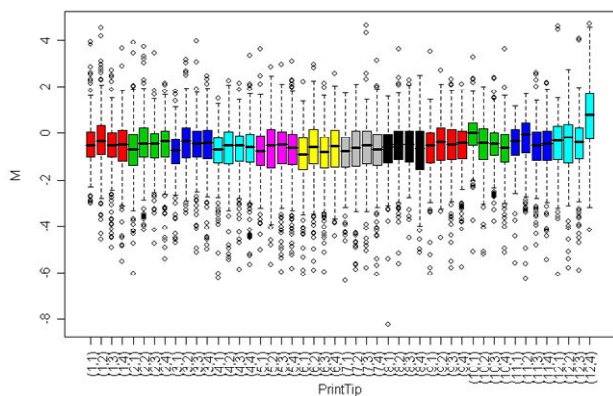
Lâmina 53 : Pré-normalização



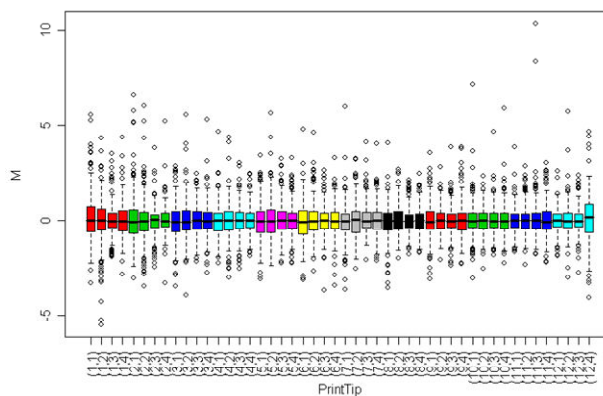
Lâmina 53 : Normalizada



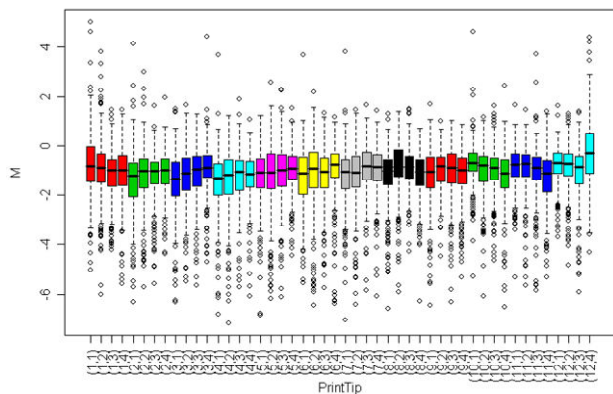
Lâmina 54 : Pré-normalização



Lâmina 54 : Normalizada



Lâmina 55 : Pré-normalização



Lâmina 55 : Normalizada

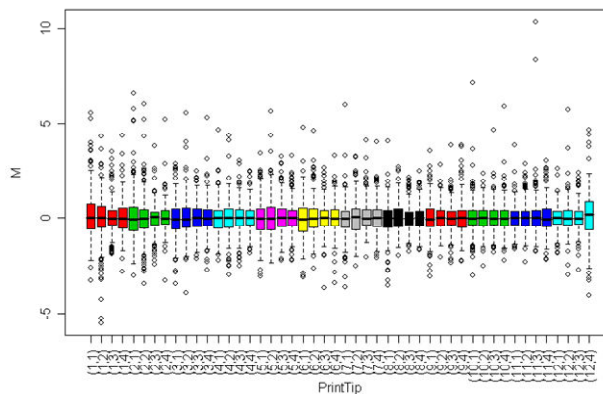
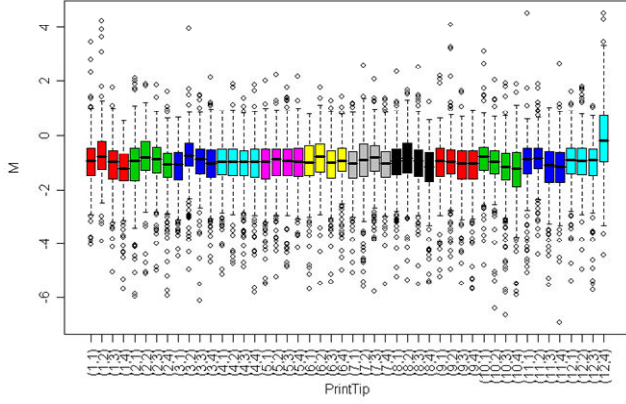
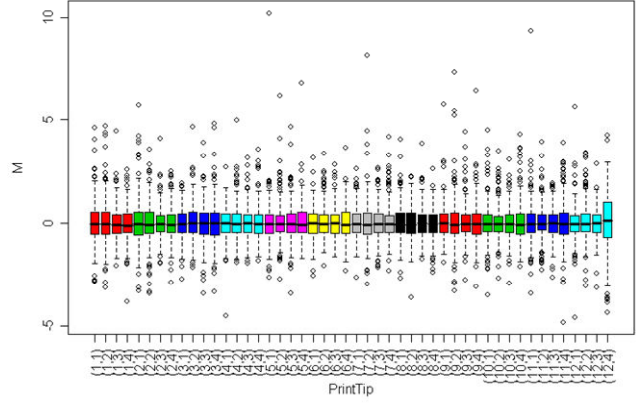


Figura 12 – *Boxplots* representando os valores de M para cada agulha de impressão, na escala log₂, antes (gráfico à esquerda) e depois da normalização (gráfico à direita) para as lâminas restantes utilizadas para o experimento estudando o efeito do sexo dos hospedeiro na expressão gênica de fêmeas de *S. mansoni*. Na coluna da esquerda estão representados os valores de M na escala log₂, para cada agulha de impressão, antes de qualquer normalização e, na direita, estão os valores de M depois da normalização.

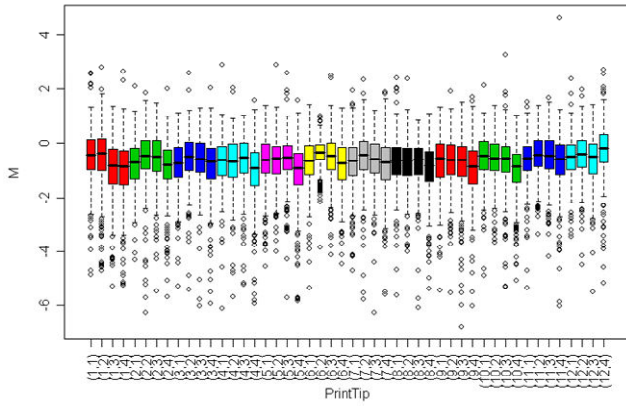
Lâmina 57 : Pré-normalização



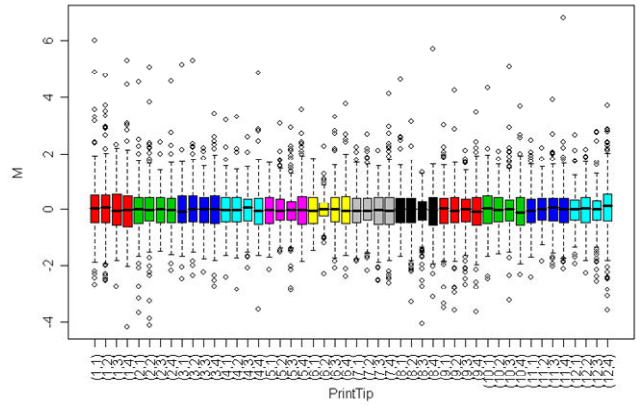
Lâmina 57 : Normalizada



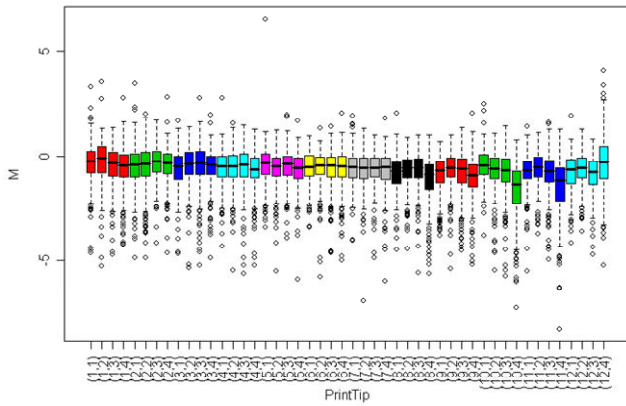
Lâmina 58 : Pré-normalização



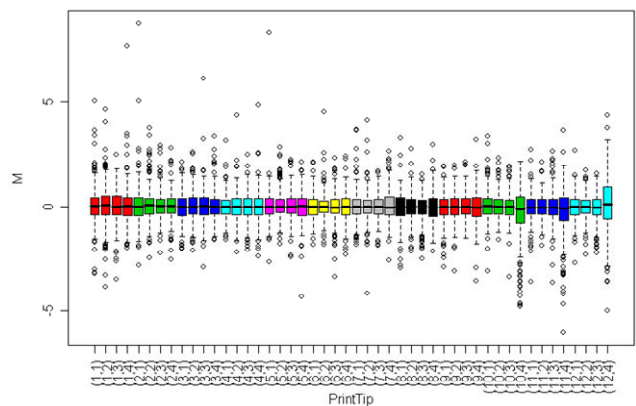
Lâmina 58 : Normalizada



Lâmina 59 : Pré-normalização



Lâmina 59 : Normalizada



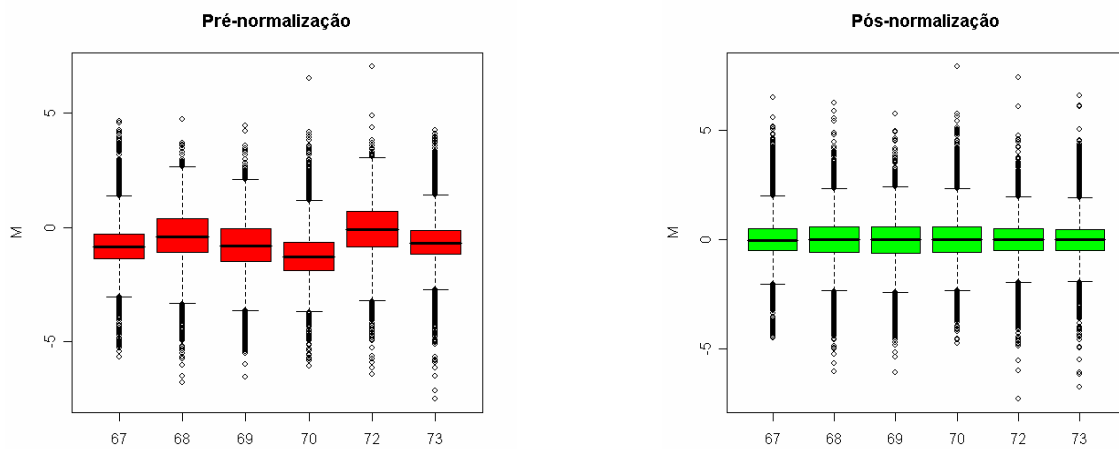


Figura 13 - *Boxplot* representando os valores de M antes e após a normalização para as lâminas utilizadas no experimento estudando o efeito do pareamento sexual na expressão gênica em fêmeas de *S. mansoni*. A figura da esquerda representa os valores antes da normalização e a figura da direita representa os valores após a normalização pelo método de “robust splines”. O eixo do X representa as várias lâminas utilizadas neste experimento. O eixo do Y representa os valores de M na escala de \log_2 . O valor de $M = 0$ representa uma razão de $R/G = 1$.

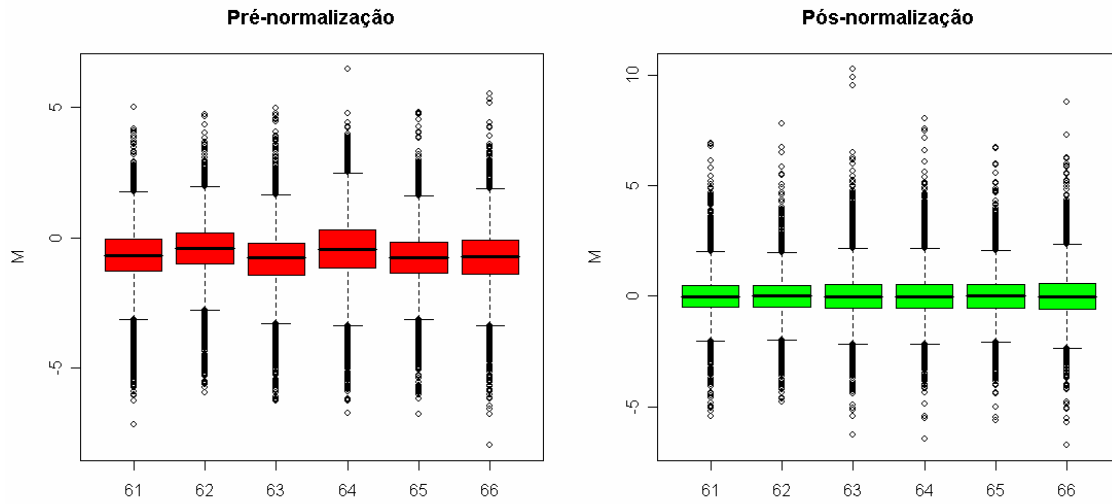


Figura 14 - *Boxplot* representando os valores de M antes e após a normalização para as lâminas utilizadas no experimento estudando o efeito do pareamento sexual na expressão gênica em machos de *S. mansoni*. A figura da esquerda representa os valores antes da normalização e a figura da direita representa os valores após a normalização pelo método de “robust splines”. O eixo do X representa as várias lâminas utilizadas neste experimento. O eixo do Y representa os valores de M na escala de \log_2 . O valor de $M = 0$ representa uma razão de $R/G = 1$.

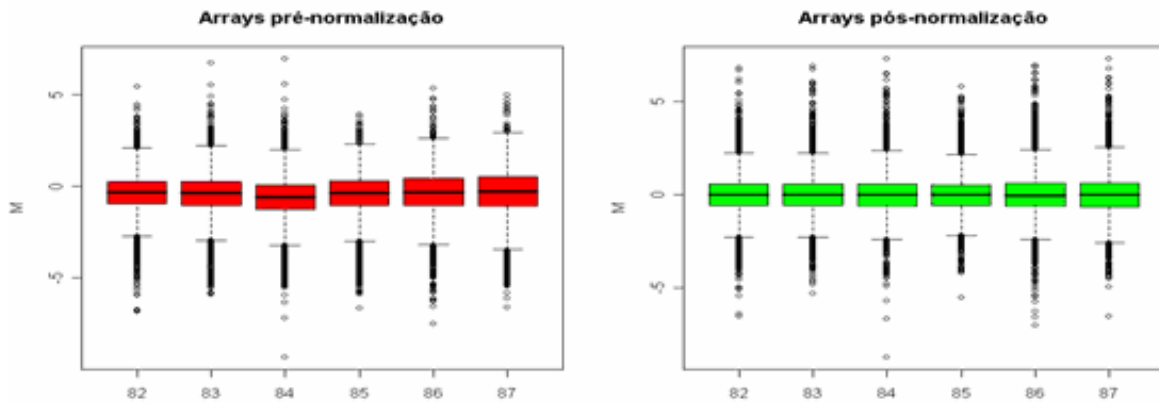


Figura 15 - *Boxplot* representando os valores de M antes e após a normalização para as lâminas utilizadas no experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica em machos de *S. mansoni*. A figura da esquerda representa os valores antes da normalização e a figura da direita representa os valores após a normalização pelo método de “robust splines”. O eixo do X representa as várias lâminas utilizadas neste experimento. O eixo do Y representa os valores de M na escala de log2. O valor de M = 0 representa uma razão de R/G = 1.

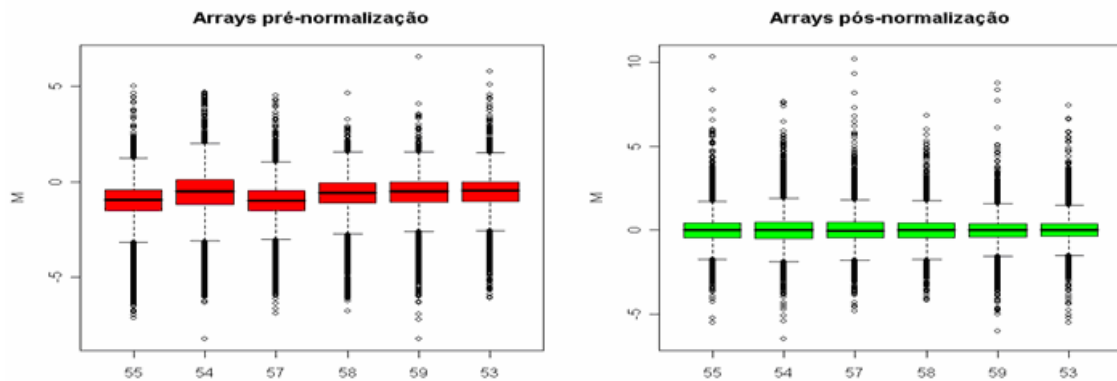


Figura 16 - *Boxplot* representando os valores de M antes e após a normalização para as lâminas utilizadas no experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica em fêmeas de *S. mansoni*. A figura da esquerda representa os valores antes da normalização e a figura da direita representa os valores após a normalização pelo método de “robust splines”. O eixo do X representa as várias lâminas utilizadas neste experimento. O eixo do Y representa os valores de M na escala de log2. O valor de $M = 0$ representa uma razão de $R/G = 1$.

Figura 17 - MA plots para as três primeiras lâminas utilizadas no experimento estudando o efeito do pareamento sexual na expressão gênica em fêmeas de *S. mansoni*. O M representa o \log_2 da razão entre os sinais dos canais verde e vermelho e o A representa a média da soma dos \log_2 dos canais verde e vermelhos.

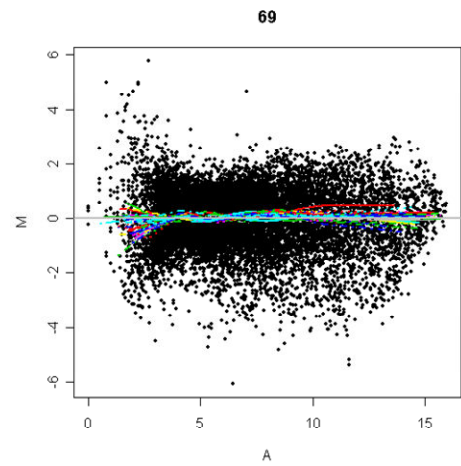
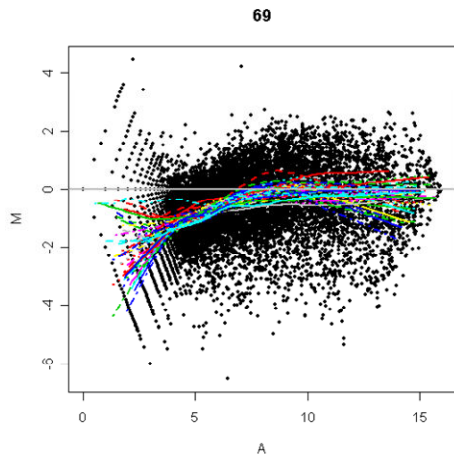
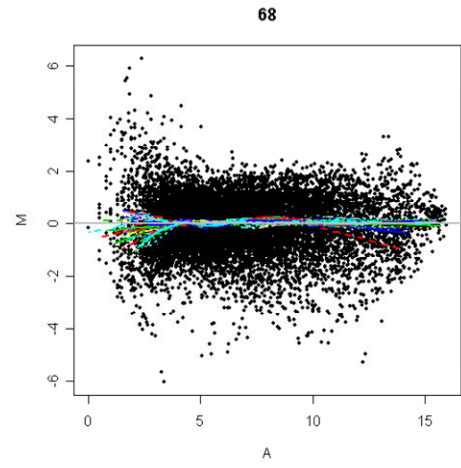
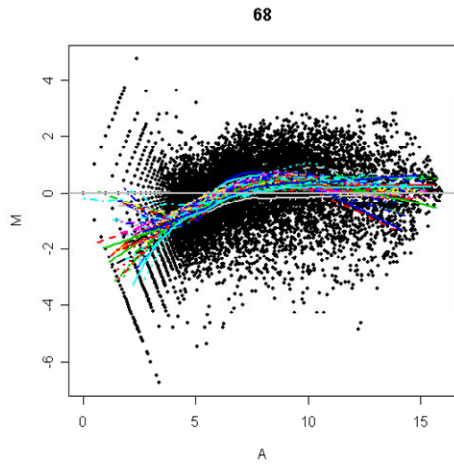
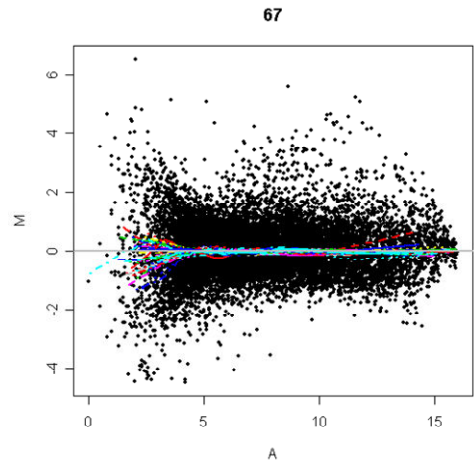
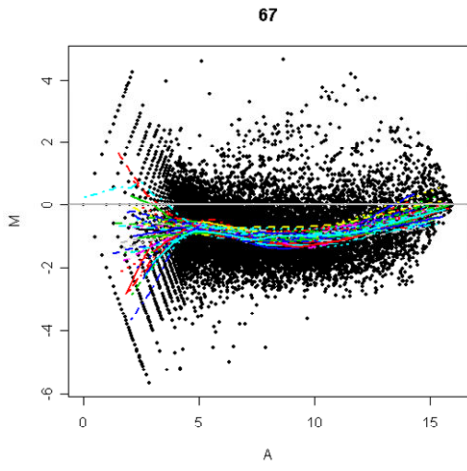


Figura 18 - MA plots para as lâminas restantes utilizadas no experimento estudando o efeito do pareamento sexual na expressão gênica em fêmeas de *S. mansoni*. O M representa o \log_2 da razão entre os sinais dos canais verde e vermelho e o A representa a média da soma dos \log_2 dos canais verde e vermelhos.

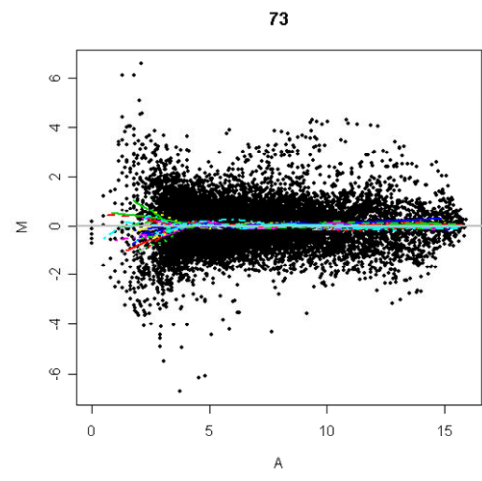
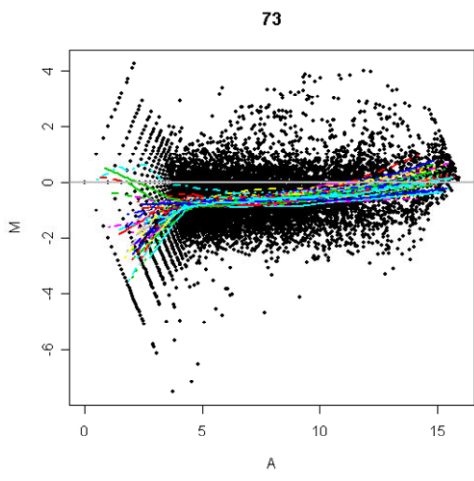
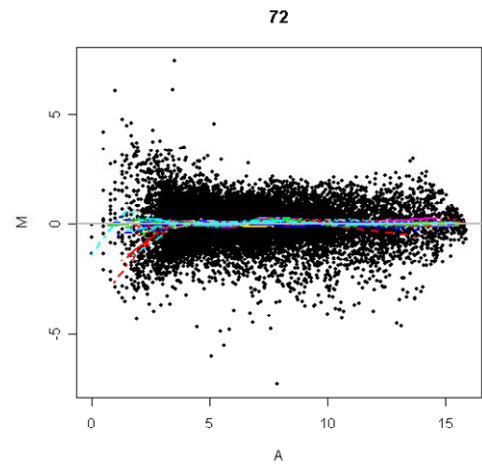
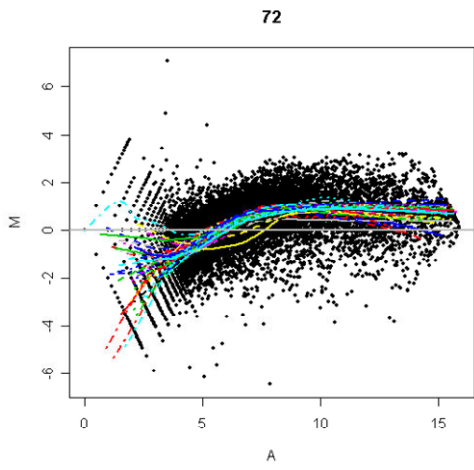
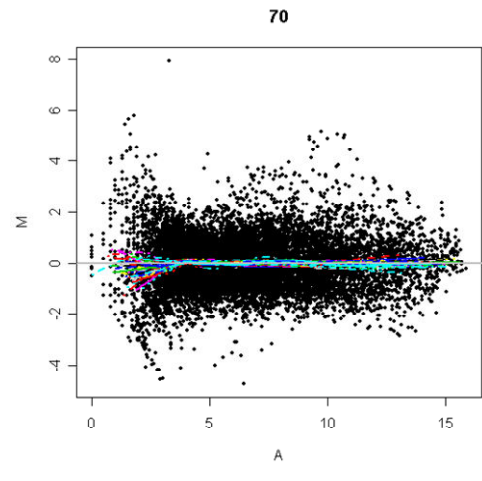
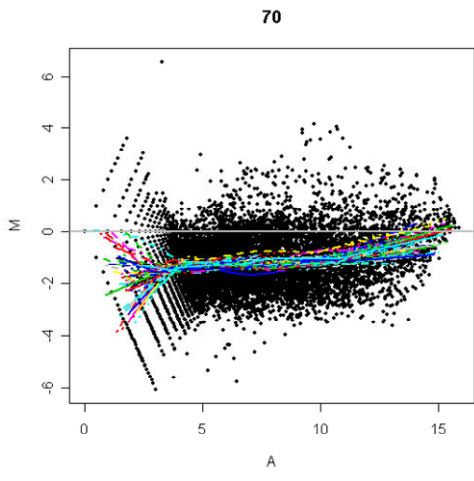


Figura 19 - MA plots para as três primeiras lâminas utilizadas no experimento estudando o efeito do pareamento sexual na expressão gênica em machos de *S. mansoni*. O M representa o log₂ da razão entre os sinais dos canais verde e vermelho e o A representa a média da soma dos log₂ dos canais verde e vermelhos.

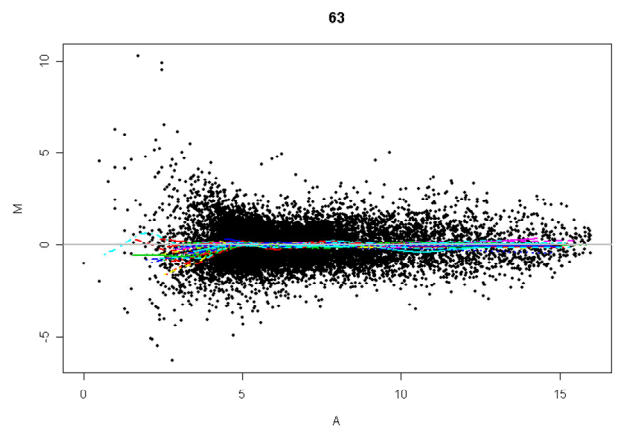
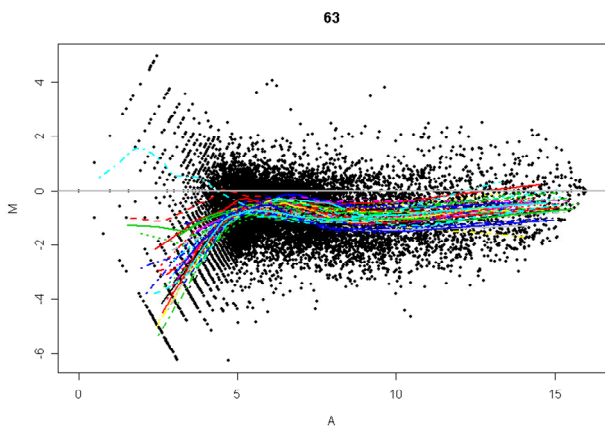
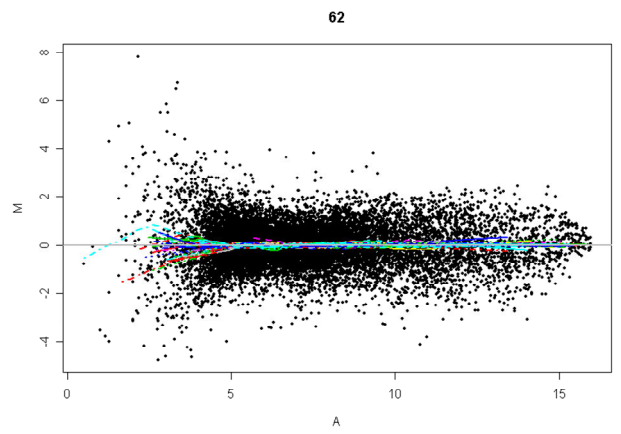
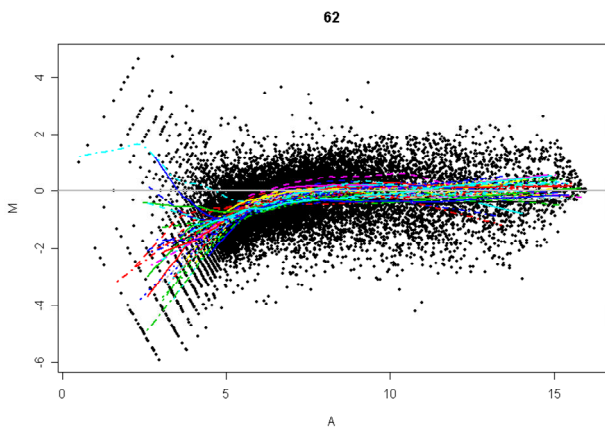
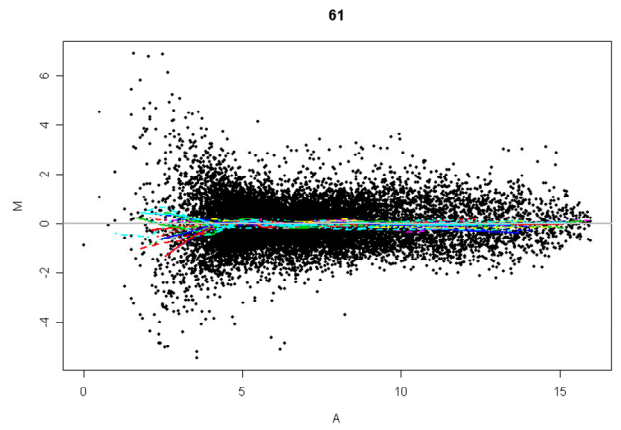
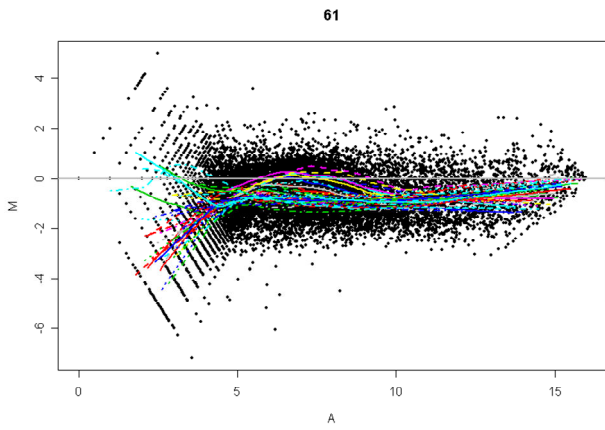


Figura 20 - MA plots para as três lâminas restantes utilizadas no experimento estudando o efeito do pareamento sexual na expressão gênica em machos de *S. mansoni*. O M representa o log₂ da razão entre os sinais dos canais verde e vermelho e o A representa a média da soma dos log₂ dos canais verde e vermelhos.

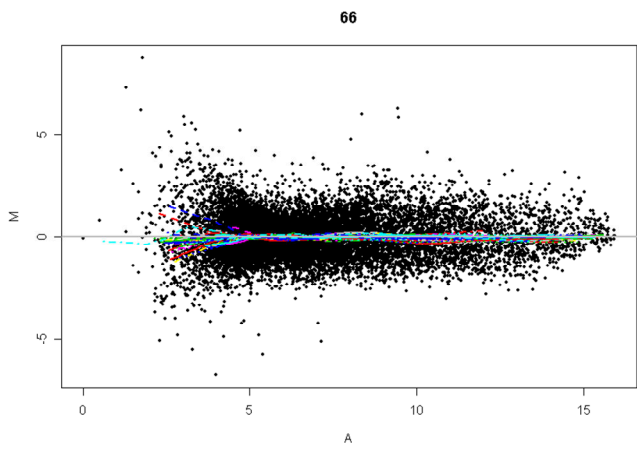
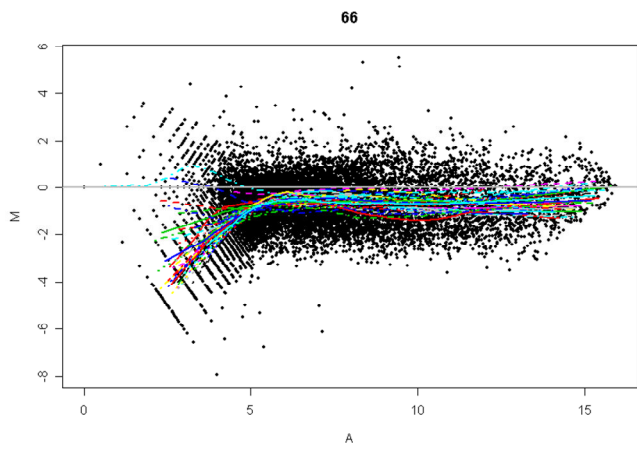
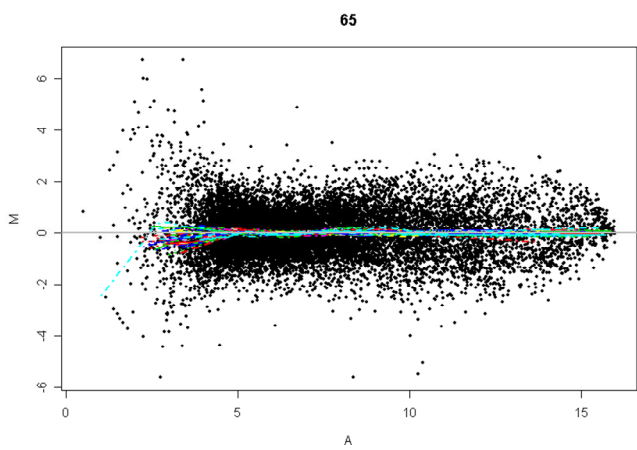
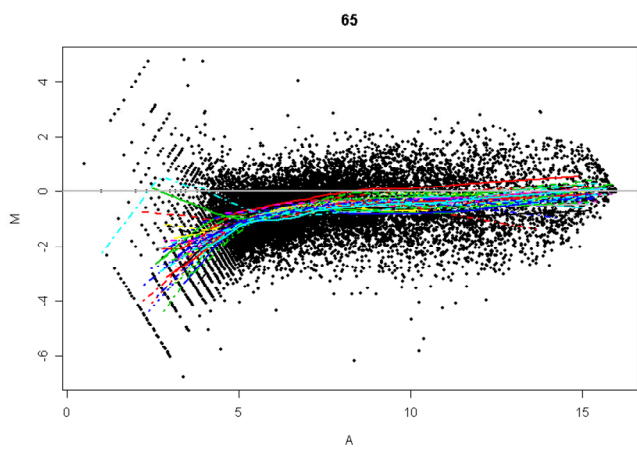
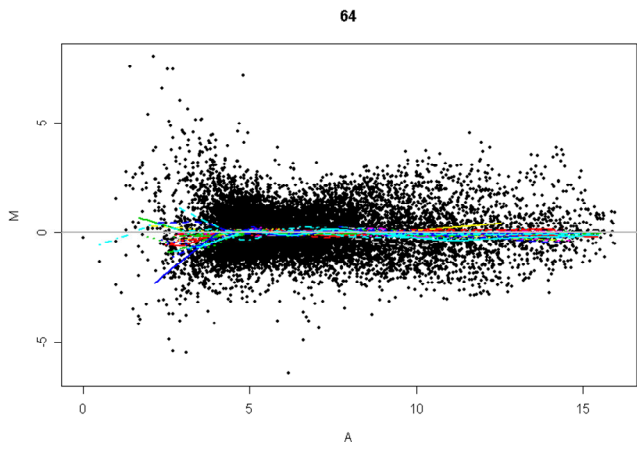
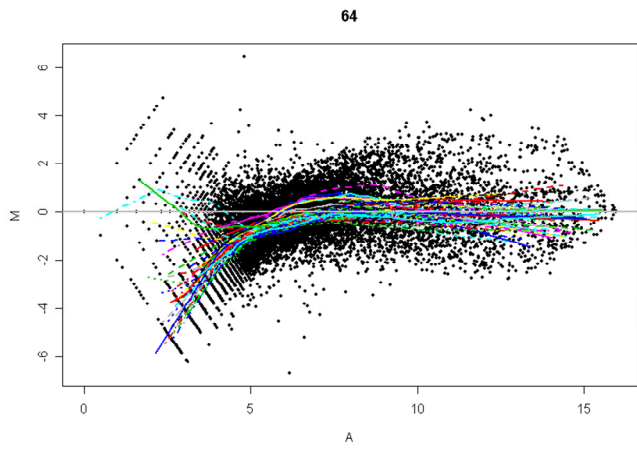


Figura 21 - MA plots para as três primeiras lâminas utilizadas no experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica em fêmeas de *S. mansoni*. O M representa o log2 da razão entre os sinais dos canais verde e vermelho e o A representa a média da soma dos log2 dos canais verde e vermelhos.

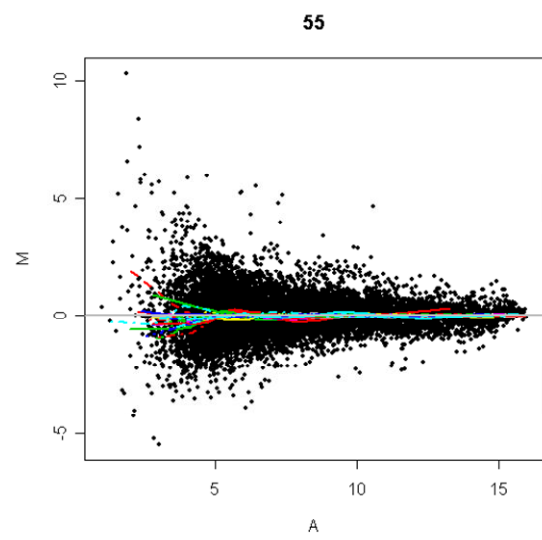
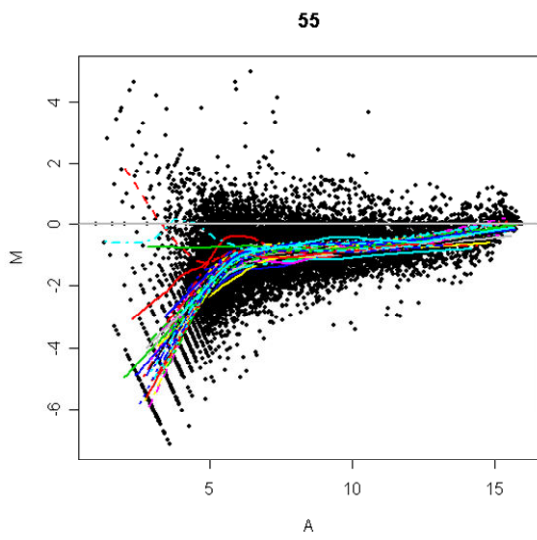
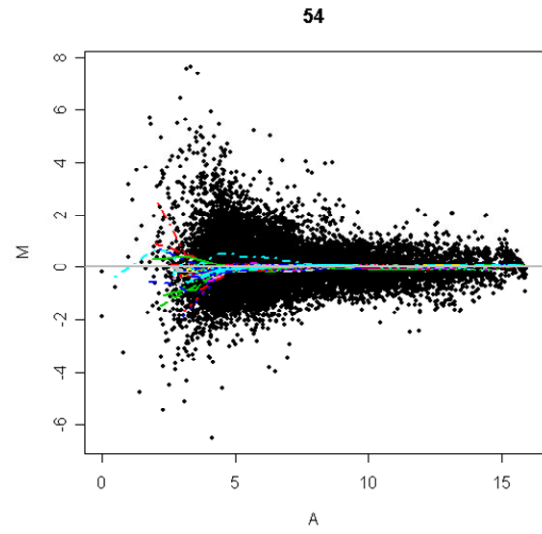
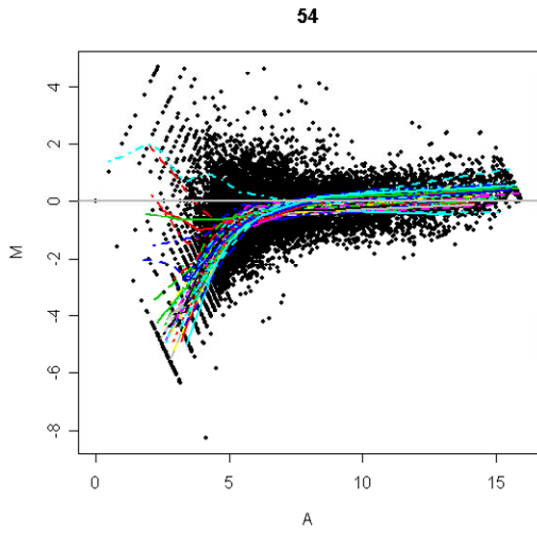
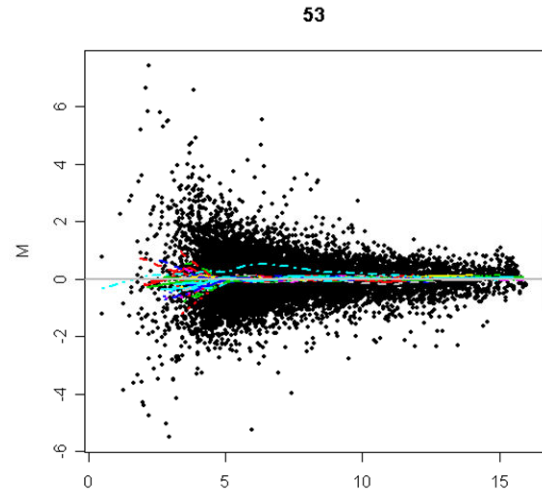
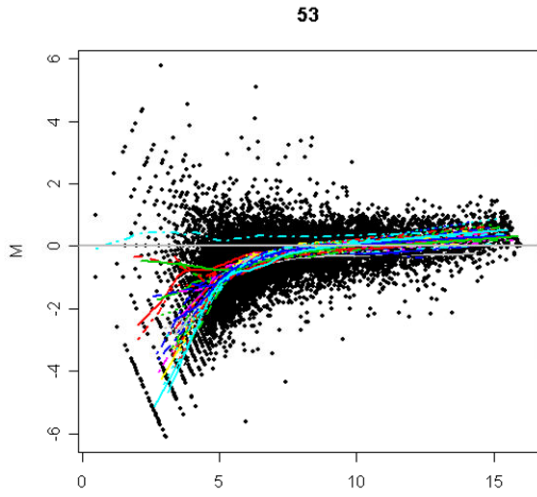
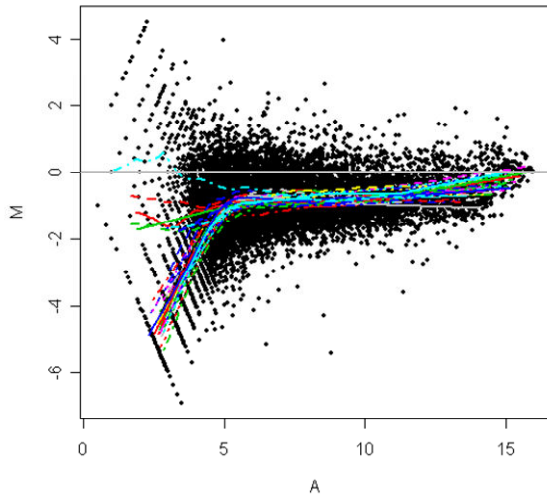
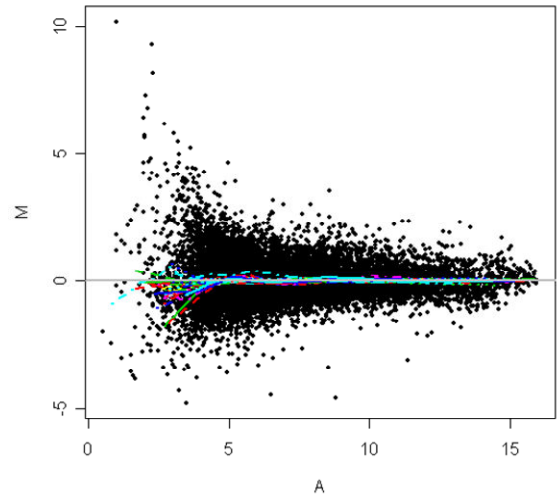


Figura 22 - MA plots para as lâminas restantes utilizadas no experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica em fêmeas de *S. mansoni*. O M representa o log2 da razão entre os sinais dos canais verde e vermelho e o A representa a média da soma dos log2 dos canais verde e vermelhos.

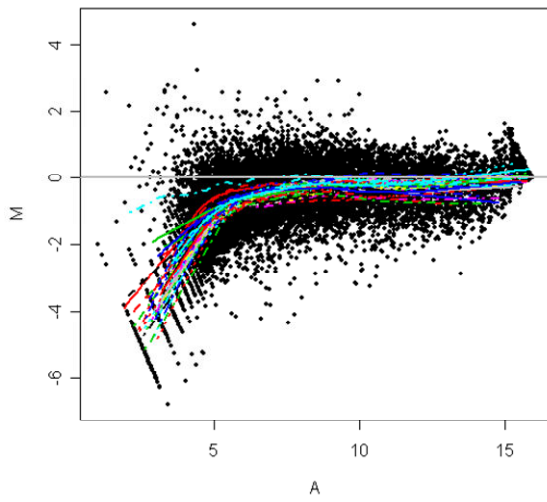
57



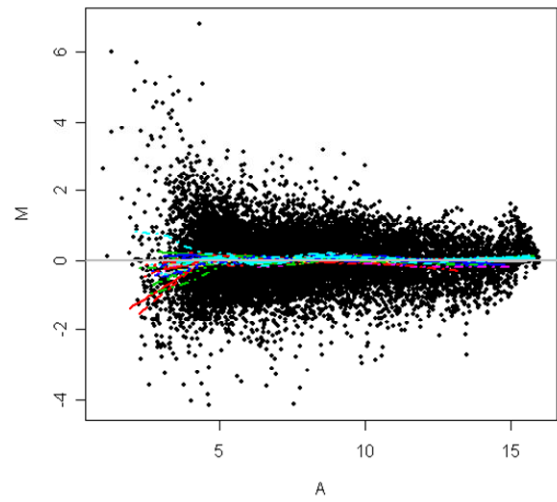
57



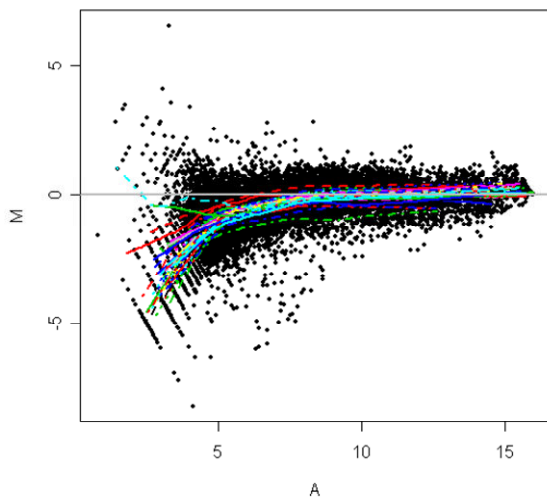
58



58



59



59

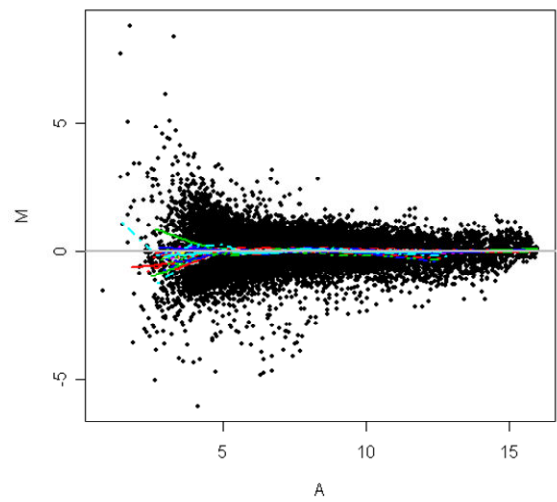


Figura 23 - MA plots para as três primeiras lâminas utilizadas no experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica em machos de *S. mansoni*. O M representa o log₂ da razão entre os sinais dos canais verde e vermelho e o A representa a média da soma dos log₂ dos canais verde e vermelhos.

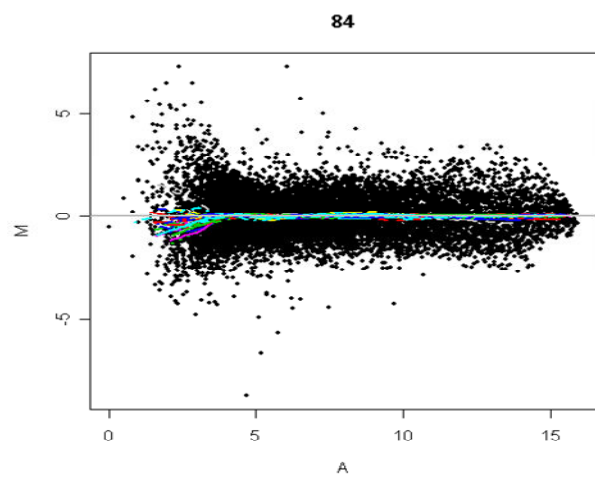
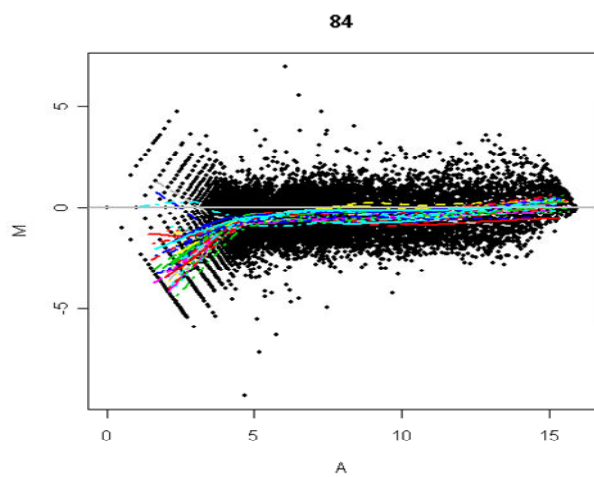
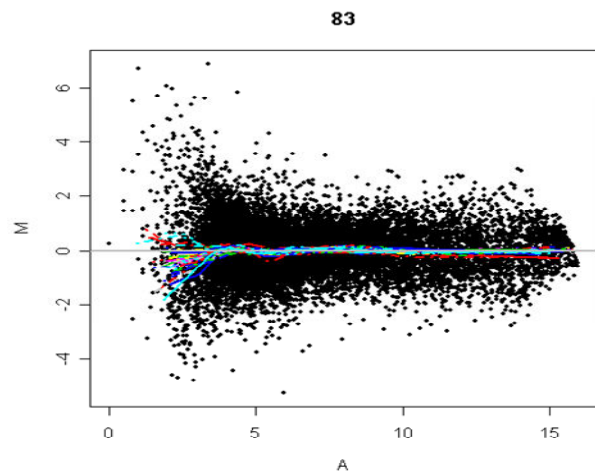
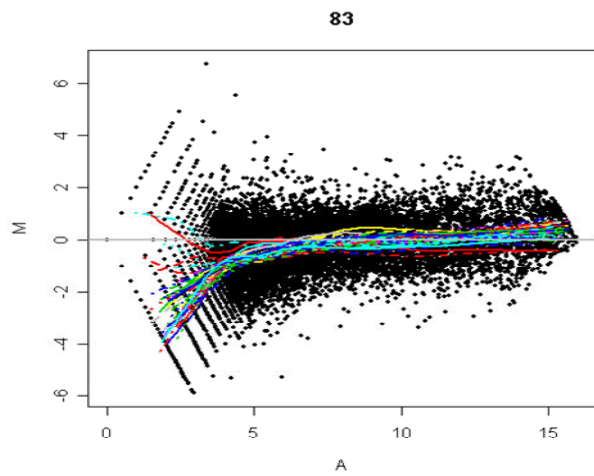
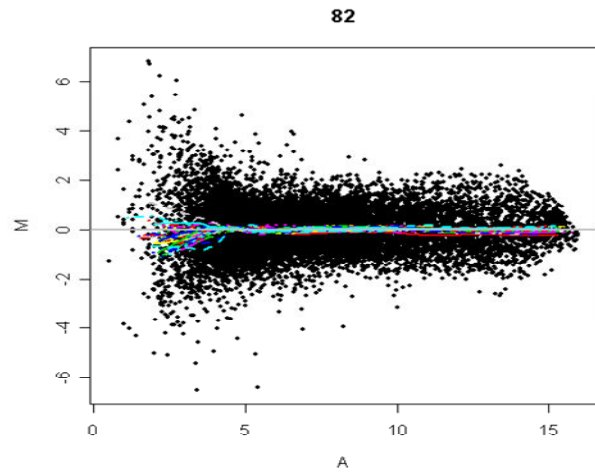
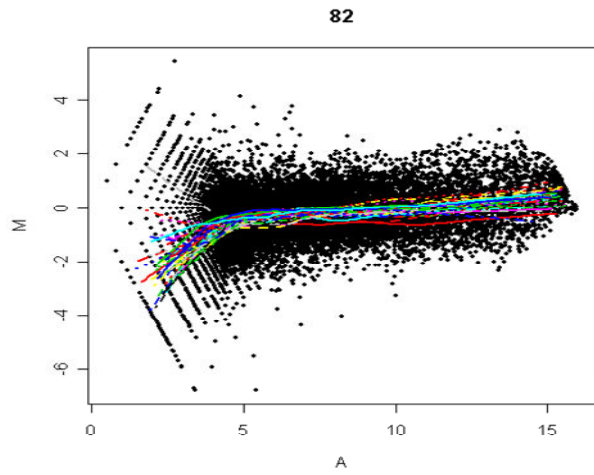


Figura 24 - MA plots para as três lâminas restantes utilizadas no experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica em machos de *S. mansoni*. O M representa o \log_2 da razão entre os sinais dos canais verde e vermelho e o A representa a média da soma dos \log_2 dos canais verde e vermelhos.

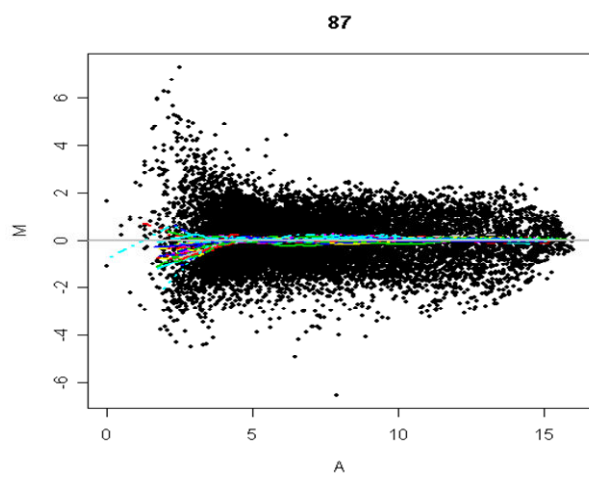
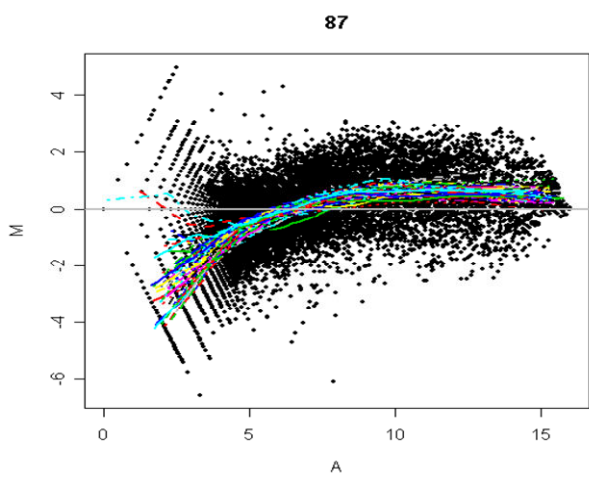
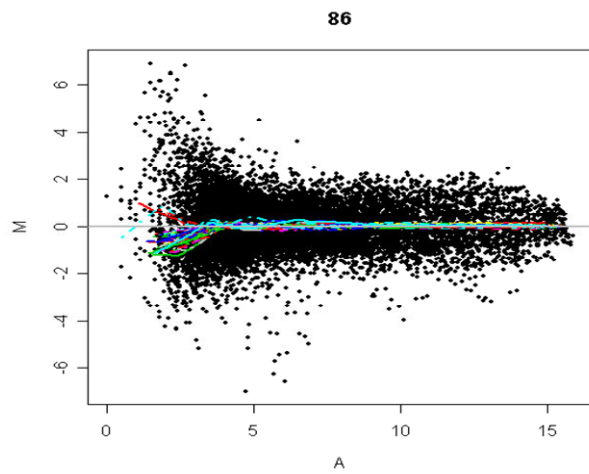
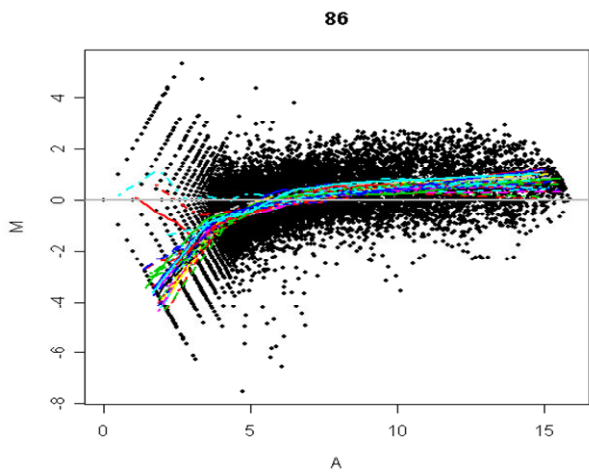
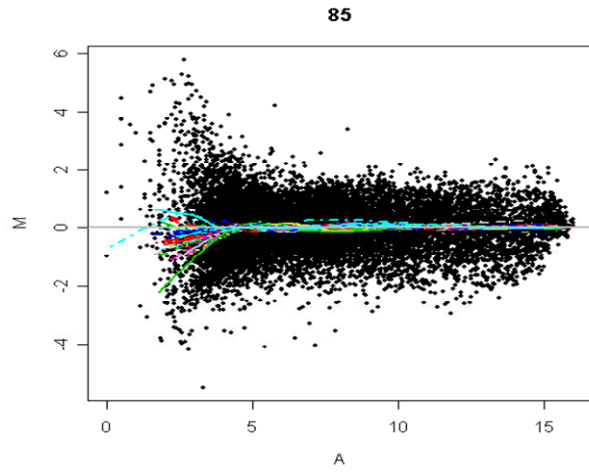
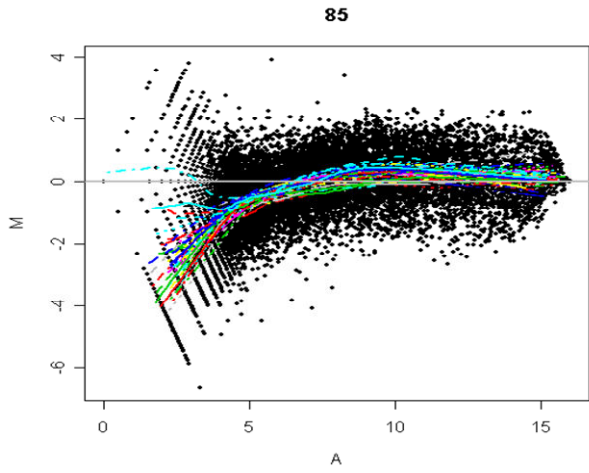


Figura 25 - *Background* para os canais verde e vermelho para as três primeiras lâminas utilizadas no experimento estudando o efeito do pareamento sexual na expressão gênica em fêmeas de *S. mansoni*. O *Background* é representado em uma escala que varia do menor sinal (branco) até o maior sinal (verde ou vermelho). Cada subdivisão da imagem representa um bloco do microarranjo impresso por uma agulha diferente.

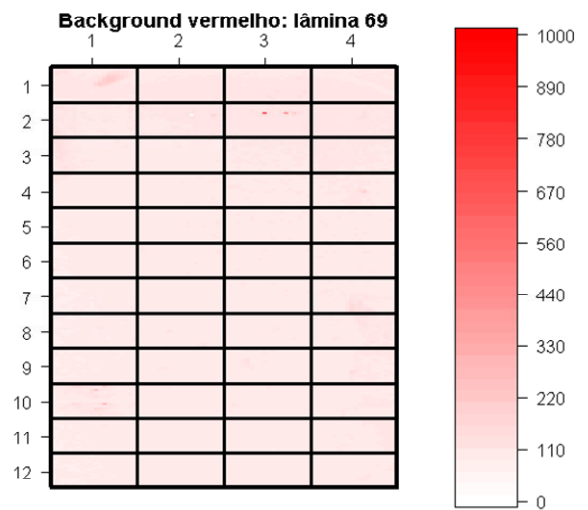
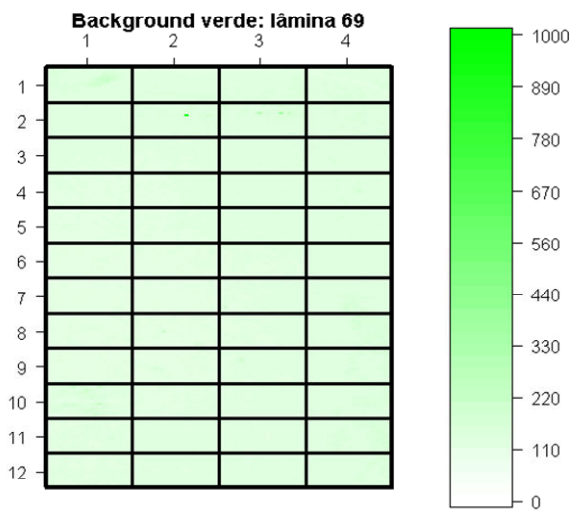
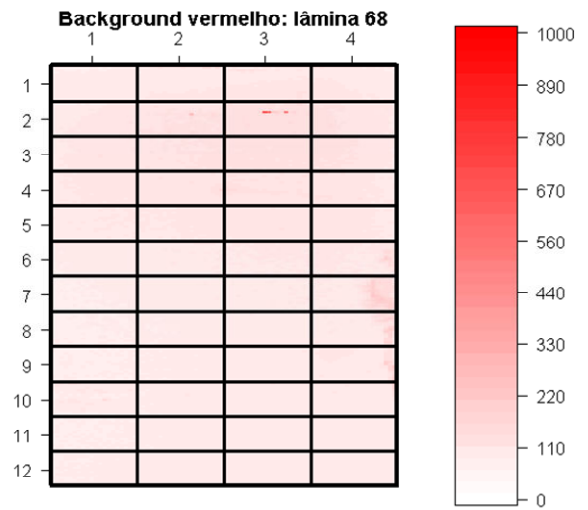
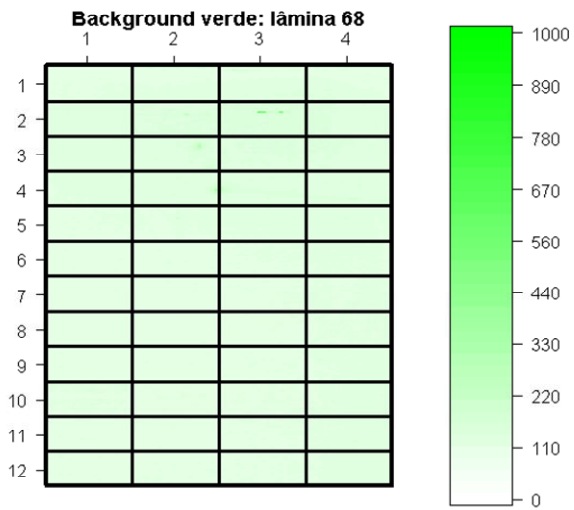
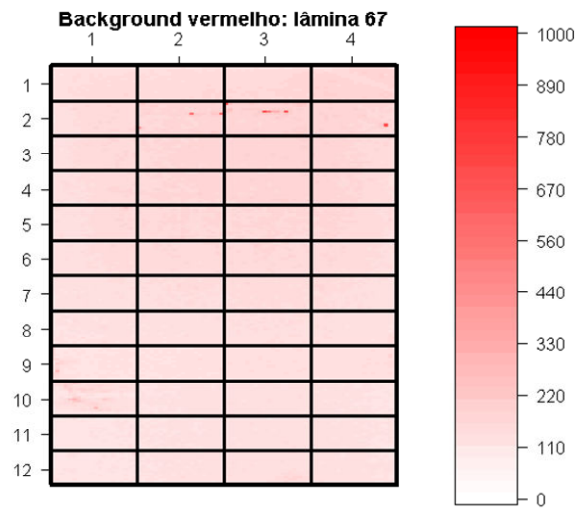
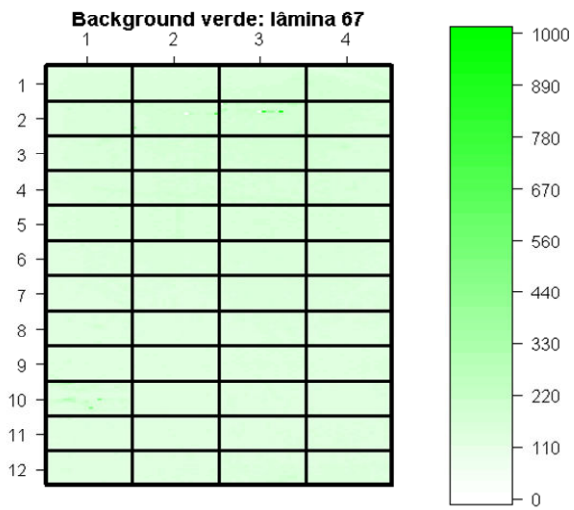


Figura 26 - *Background* para os canais verde e vermelho para as lâminas restantes utilizadas no experimento estudando o efeito do pareamento sexual na expressão gênica em fêmeas de *S. mansoni*. O *Background* é representado em uma escala que varia do menor sinal (branco) até o maior sinal (verde ou vermelho). Cada subdivisão da imagem representa um bloco do microarranjo impresso por uma agulha diferente.

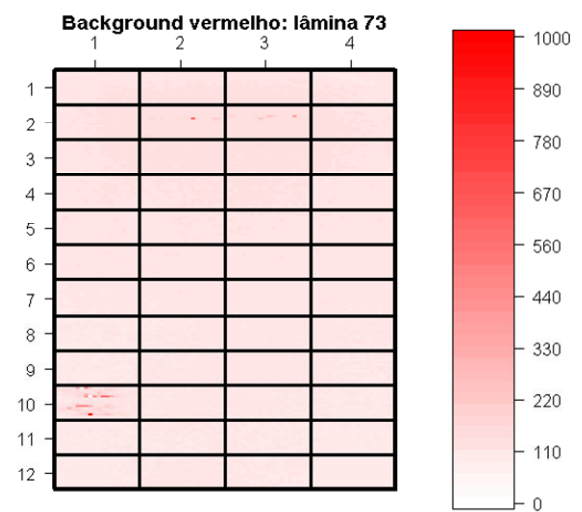
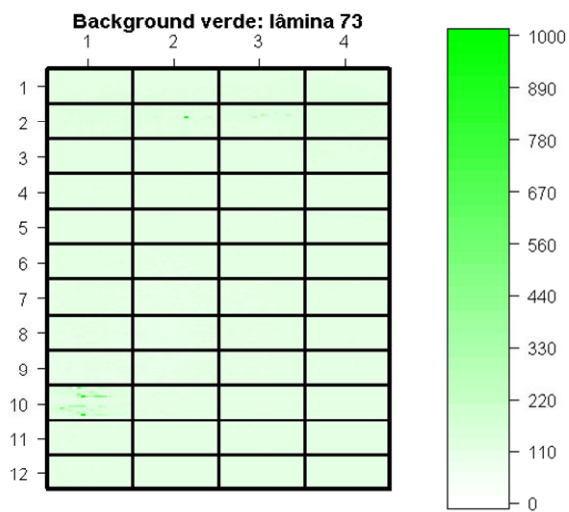
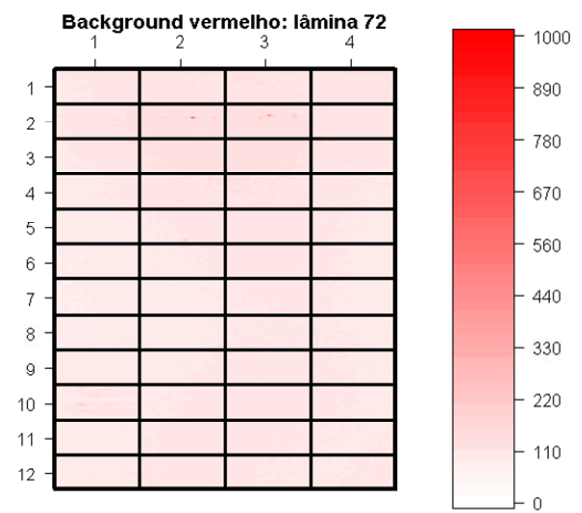
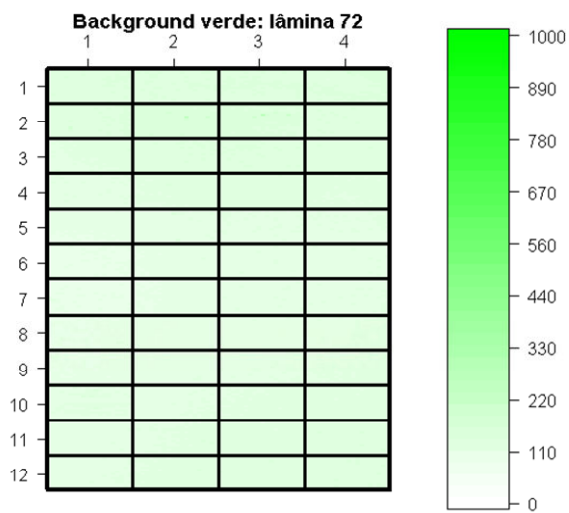
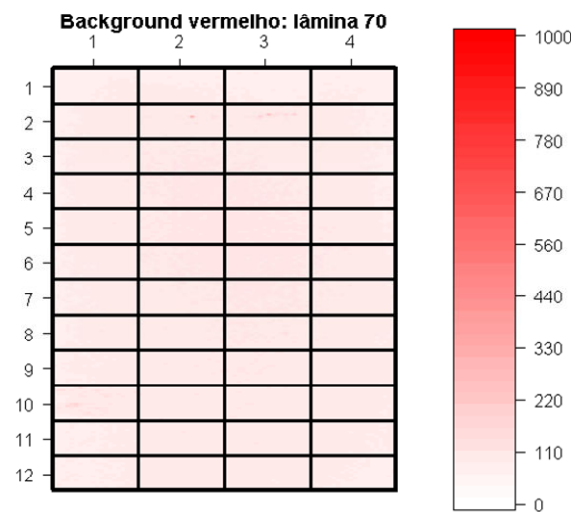
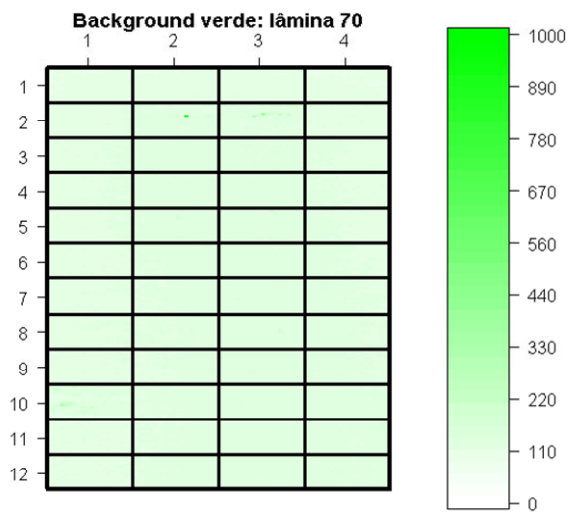


Figura 27 - *Background* para os canais verde e vermelho para as três primeiras lâminas utilizadas no experimento estudando o efeito do pareamento sexual na expressão gênica em machos de *S. mansoni*. O *Background* é representado em uma escala que varia do menor sinal (branco) até o maior sinal (verde ou vermelho). Cada subdivisão da imagem representa um bloco do microarranjo impresso por uma agulha diferente.

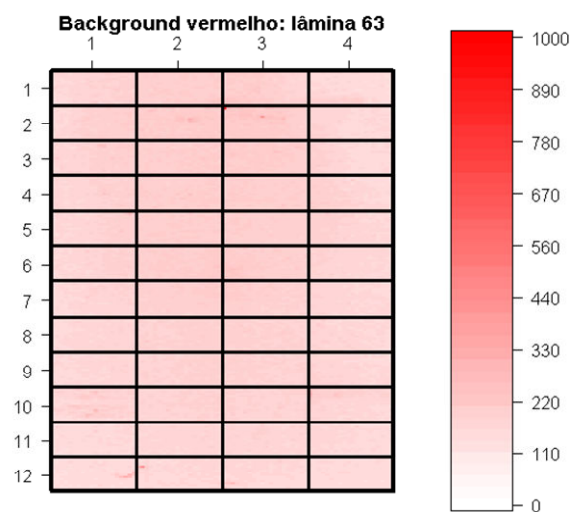
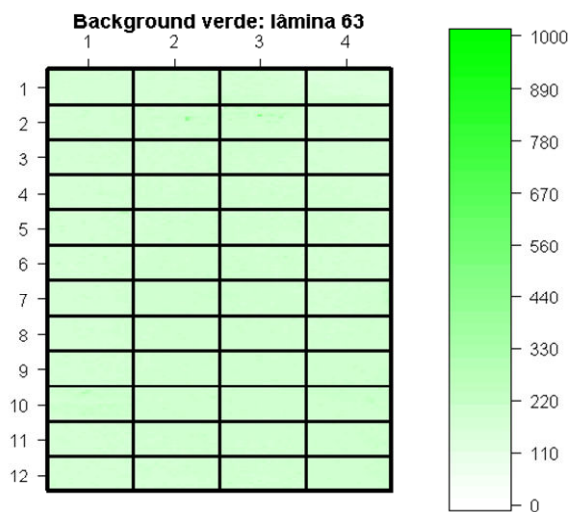
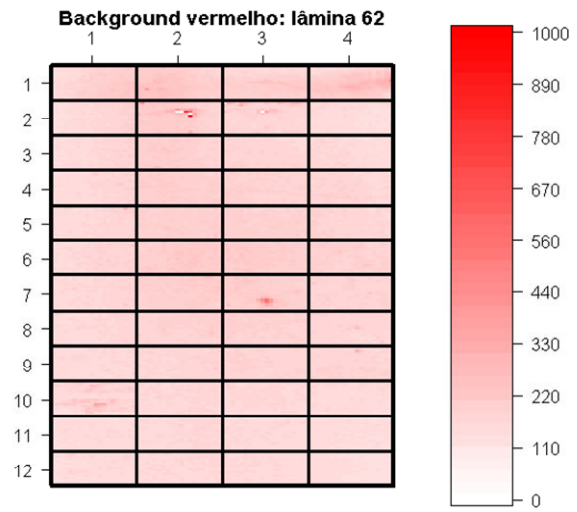
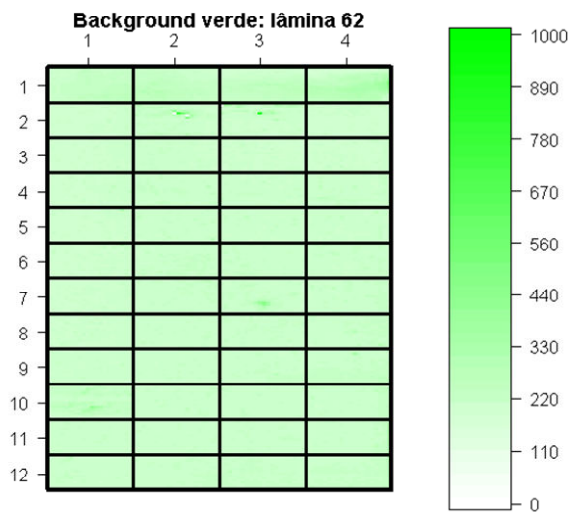
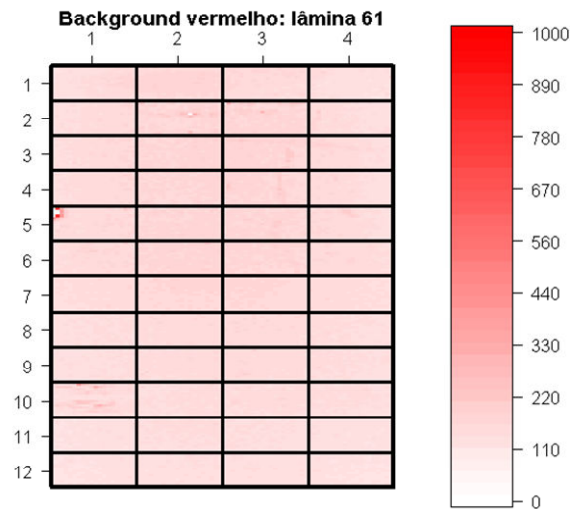
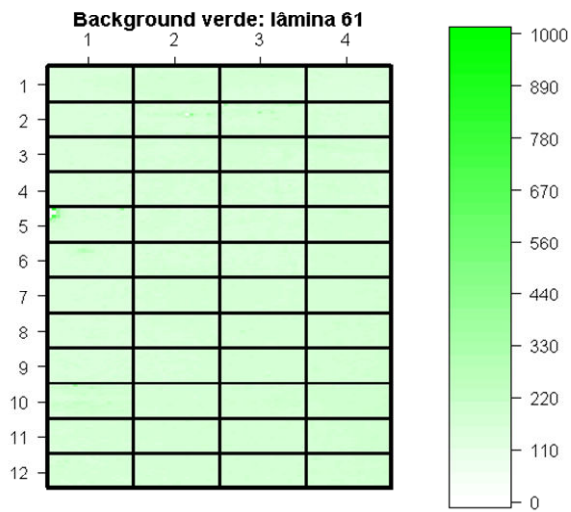


Figura 28 - *Background* para os canais verde e vermelho para as três primeiras lâminas utilizadas no experimento estudando o efeito do pareamento sexual na expressão gênica em machos de *S. mansoni*. O *Background* é representado em uma escala que varia do menor sinal (branco) até o maior sinal (verde ou vermelho). Cada subdivisão da imagem representa um bloco do microarranjo impresso por uma agulha diferente.

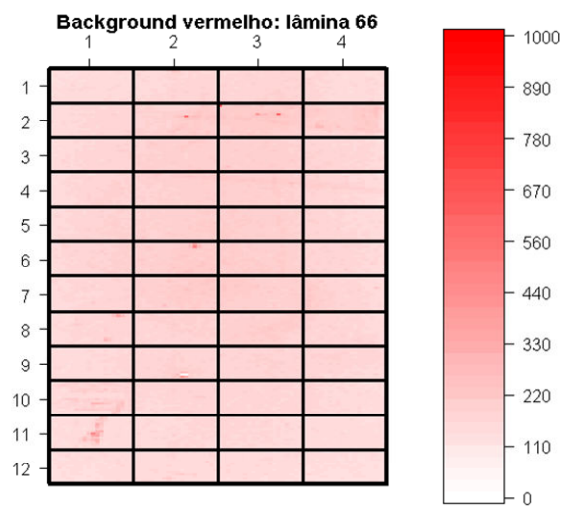
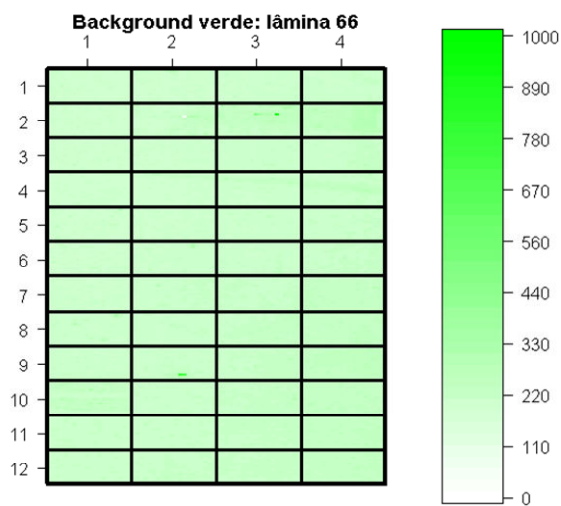
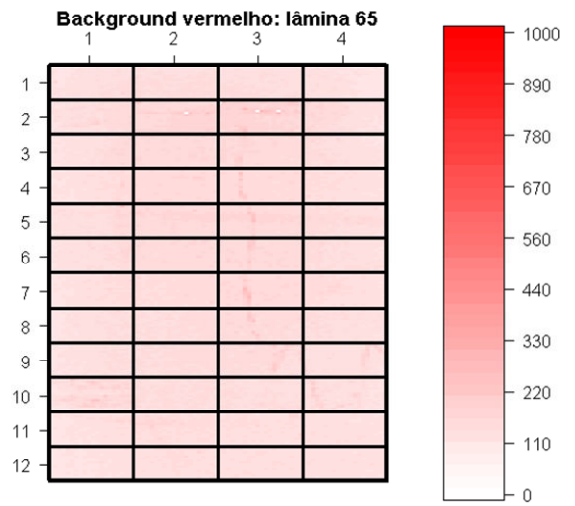
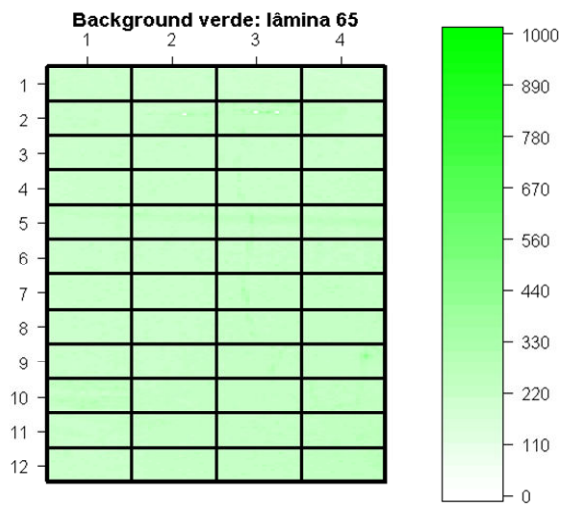
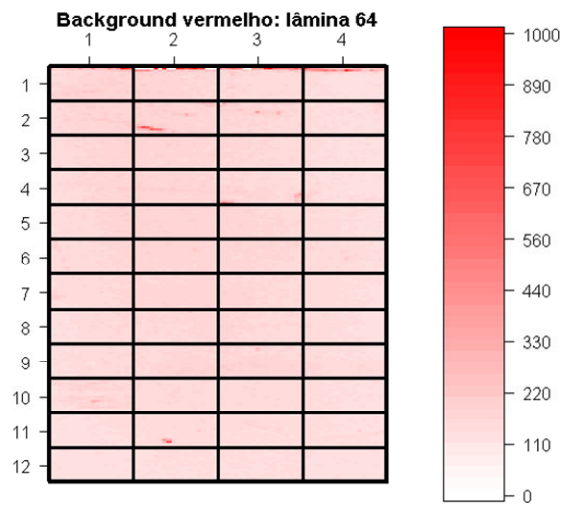
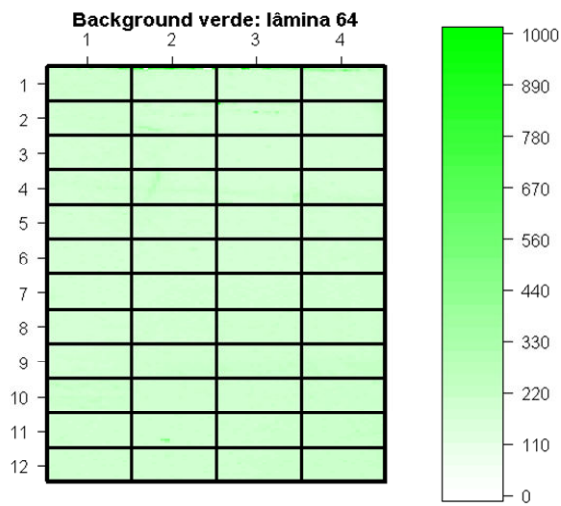


Figura 29 - *Background* para os canais verde e vermelho para as três primeiras lâminas utilizadas no experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica em fêmeas de *S. mansoni*. O *Background* é representado em uma escala que varia do menor sinal (branco) até o maior sinal (verde ou vermelho). Cada subdivisão da imagem representa um bloco do microarranjo impresso por uma agulha diferente.

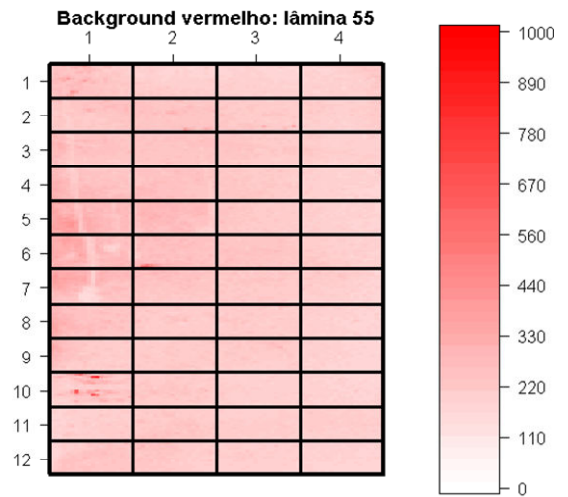
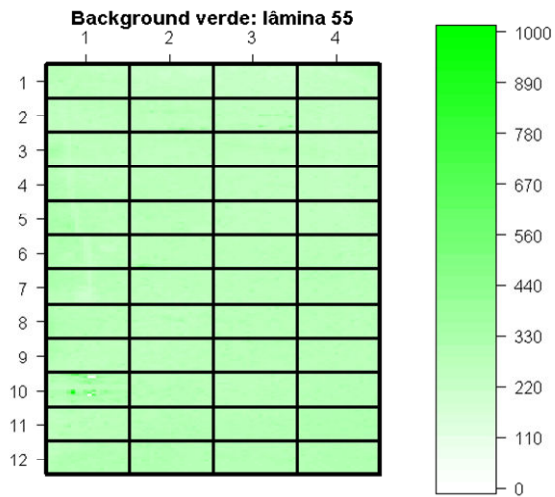
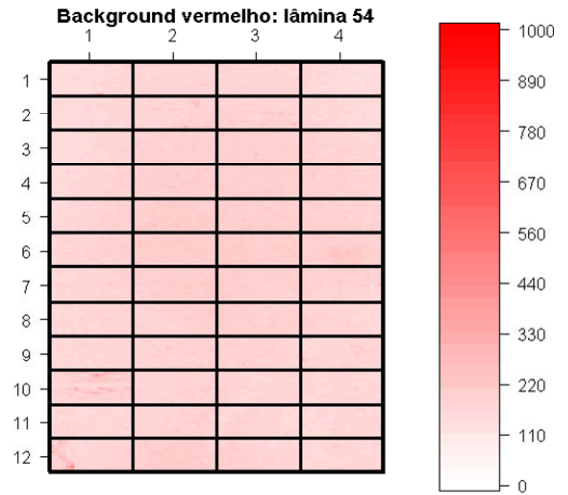
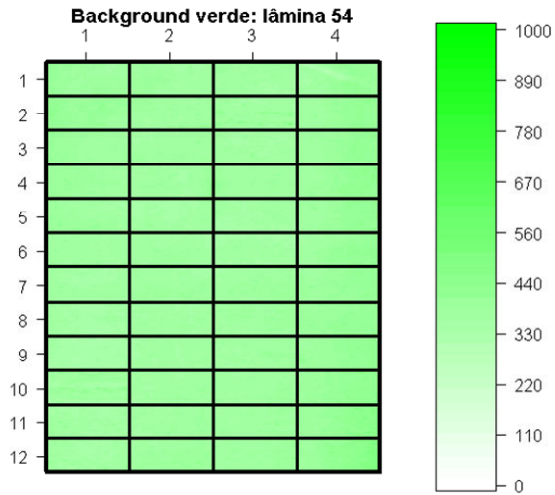
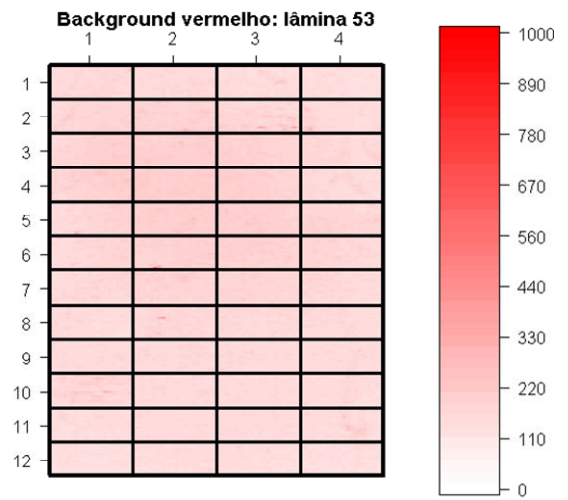
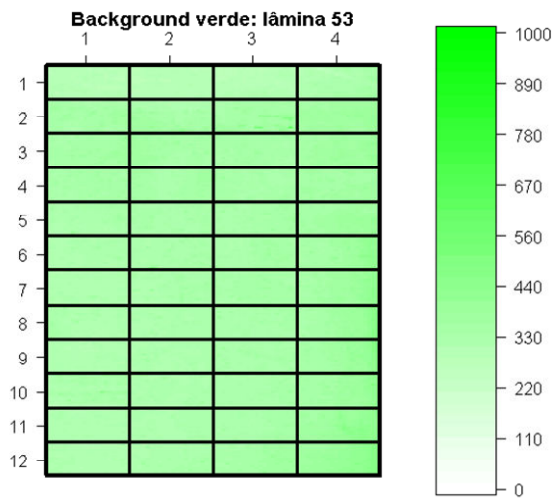


Figura 30 - *Background* para os canais verde e vermelho para as três lâminas restantes utilizadas no experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica em fêmeas de *S. mansoni*. O *Background* é representado em uma escala que varia do menor sinal (branco) até o maior sinal (verde ou vermelho). Cada subdivisão da imagem representa um bloco do microarranjo impresso por uma agulha diferente.

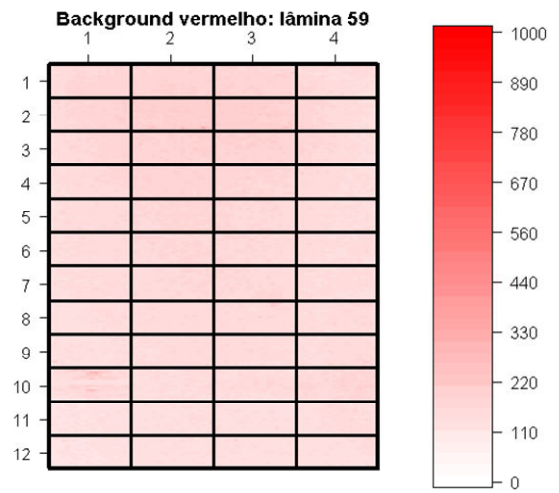
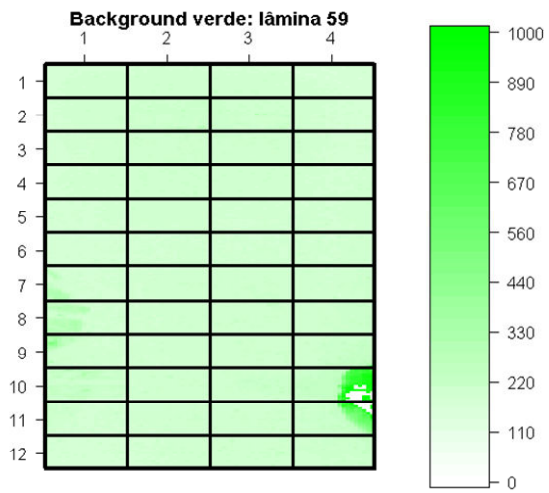
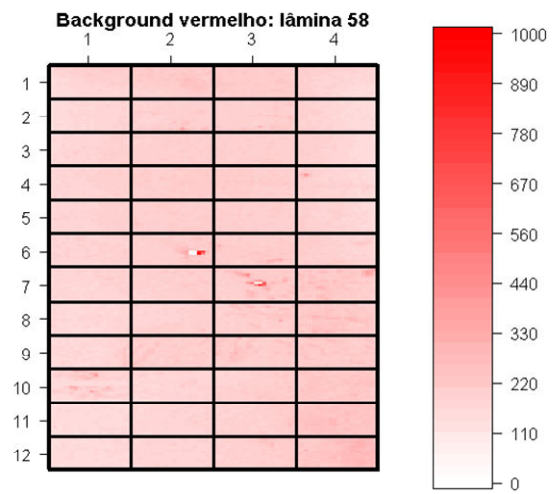
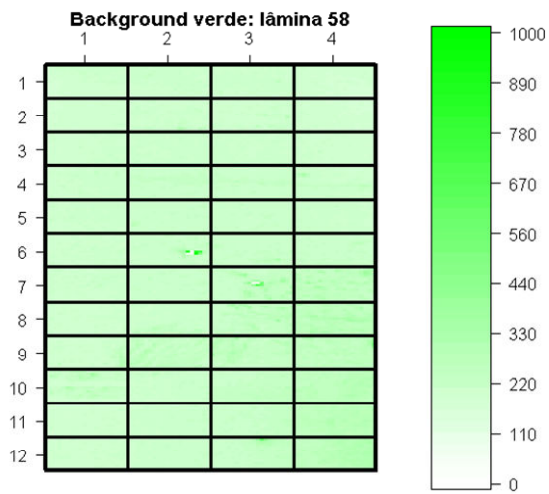
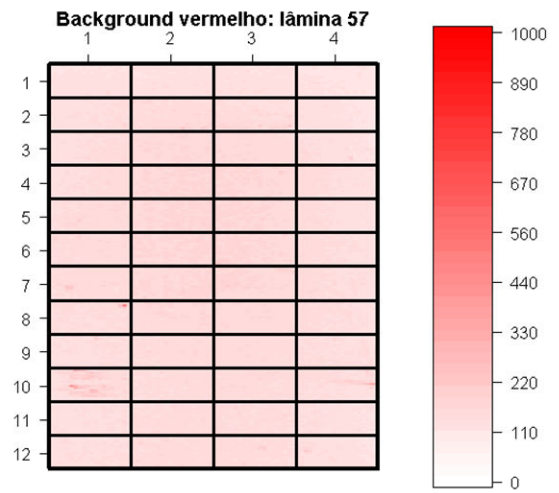
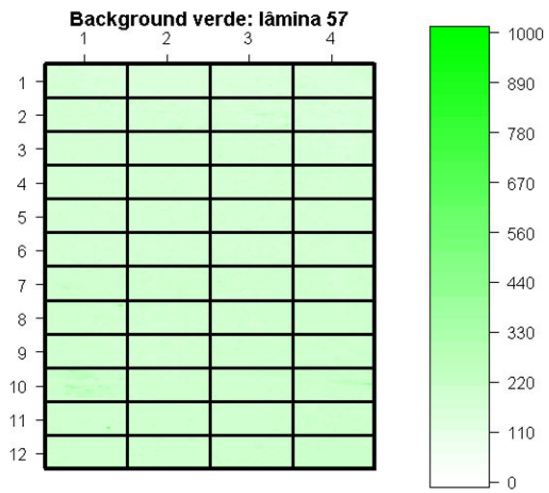


Figura 31 - *Background* para os canais verde e vermelho para as três primeiras lâminas utilizadas no experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica em machos de *S. mansoni*. O *Background* é representado em uma escala que varia do menor sinal (branco) até o maior sinal (verde ou vermelho). Cada subdivisão da imagem representa um bloco do microarranjo impresso por uma agulha diferente.

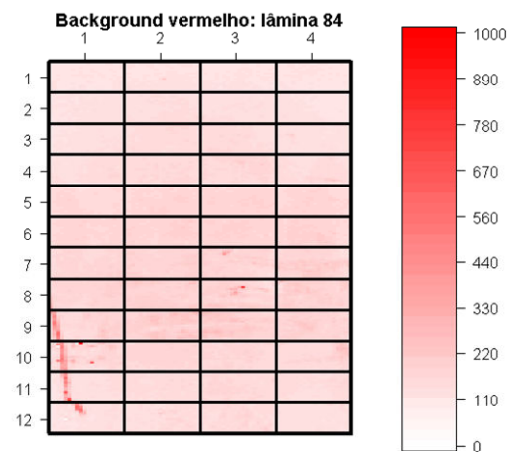
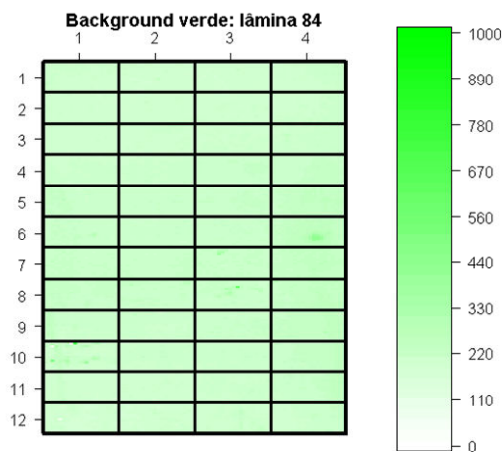
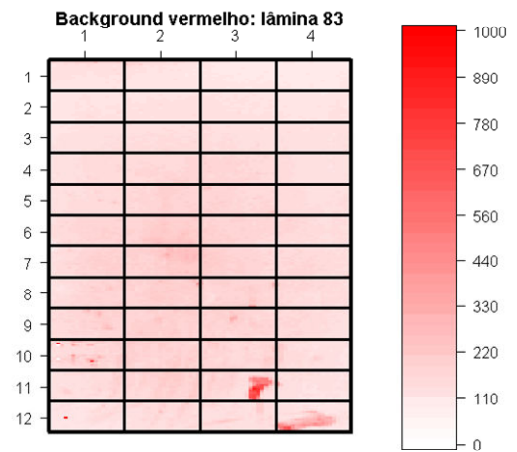
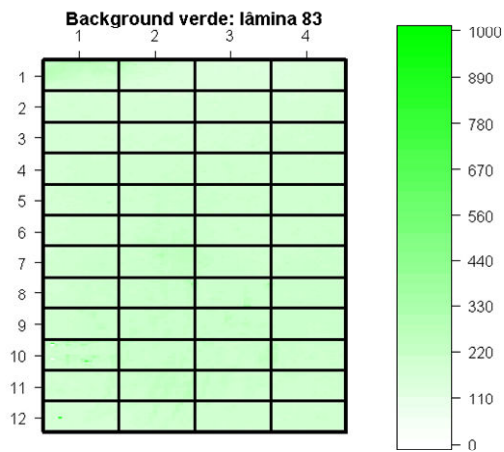
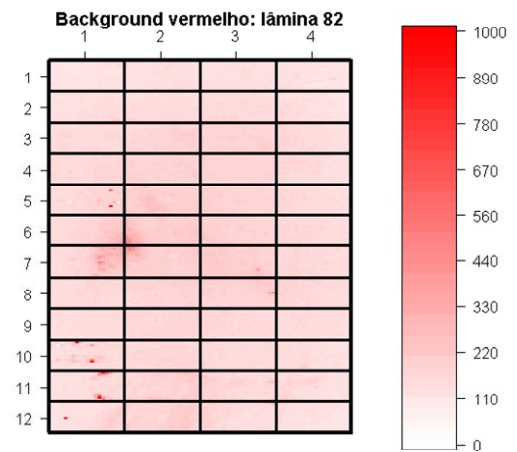
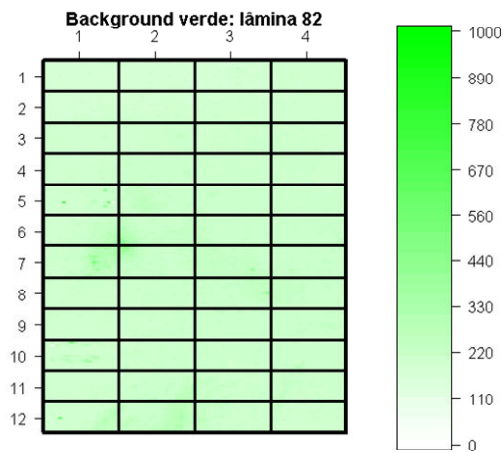


Figura 32 - *Background* para os canais verde e vermelho para as lâminas restantes utilizadas no experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica em machos de *S. mansoni*. O *Background* é representado em uma escala que varia do menor sinal (branco) até o maior sinal (verde ou vermelho). Cada subdivisão da imagem representa um bloco do microarranjo impresso por uma agulha diferente.

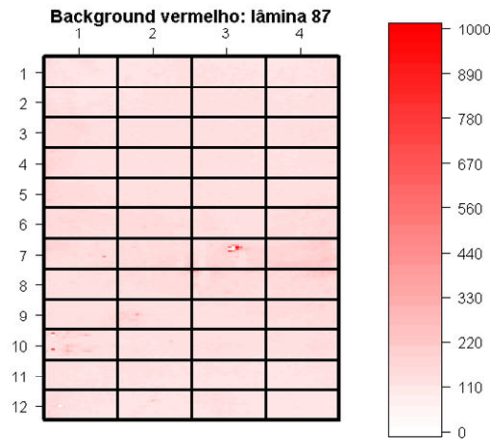
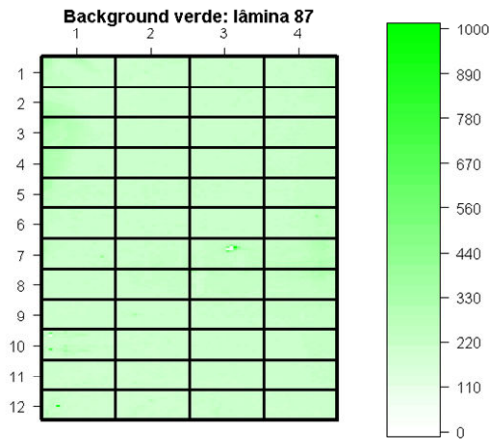
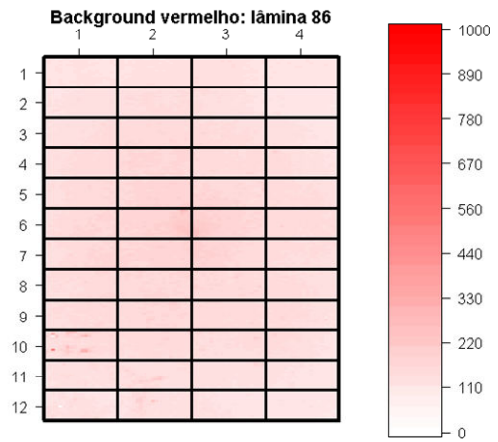
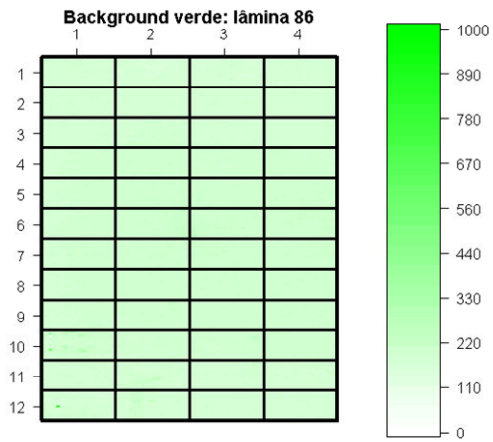
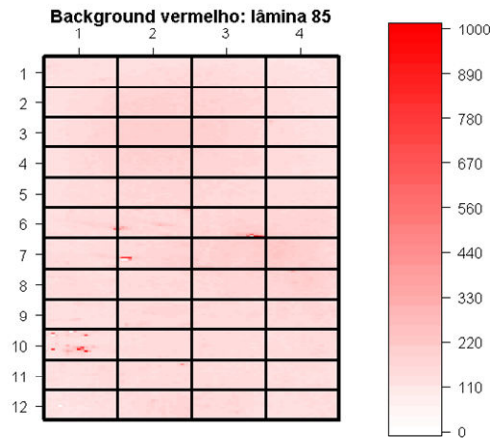
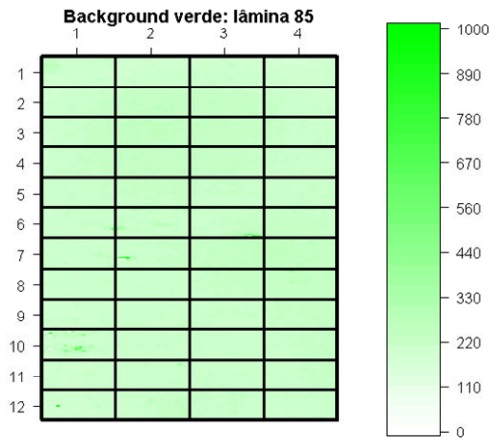


Figura 33 - Gráficos representando a distribuição espacial dos valores de M e A para as três primeiras lâminas utilizadas no experimento estudando o efeito do pareamento sexual na expressão gênica em fêmeas de *S. mansoni*.

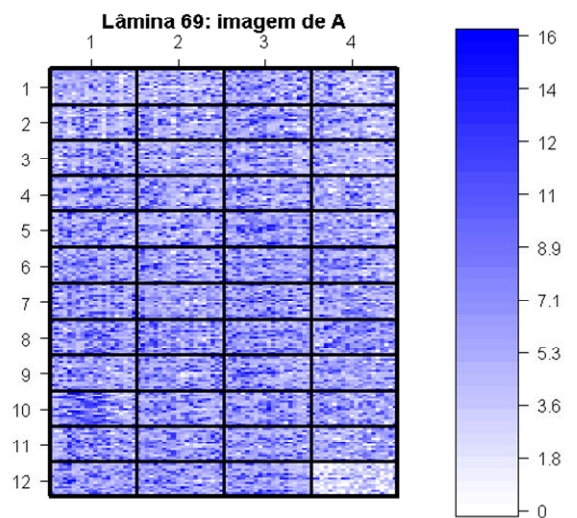
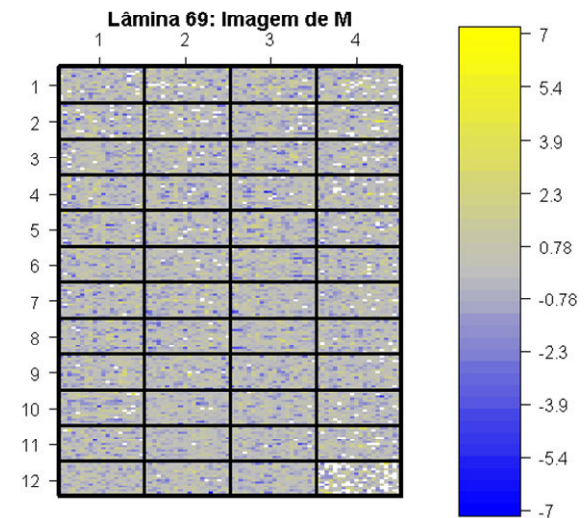
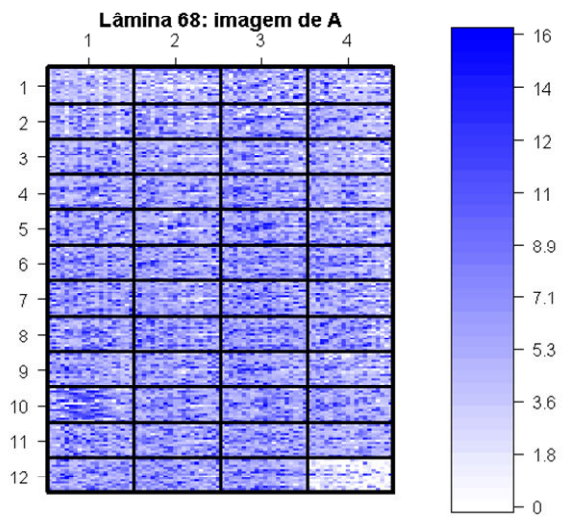
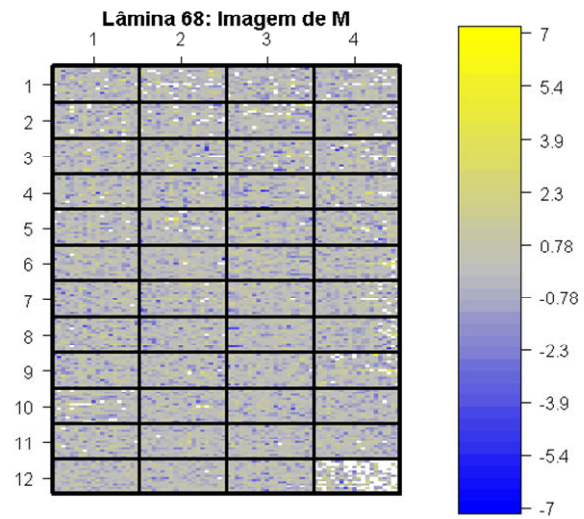
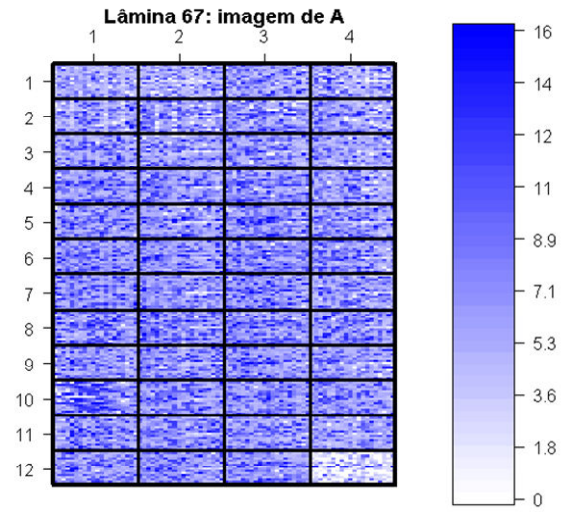
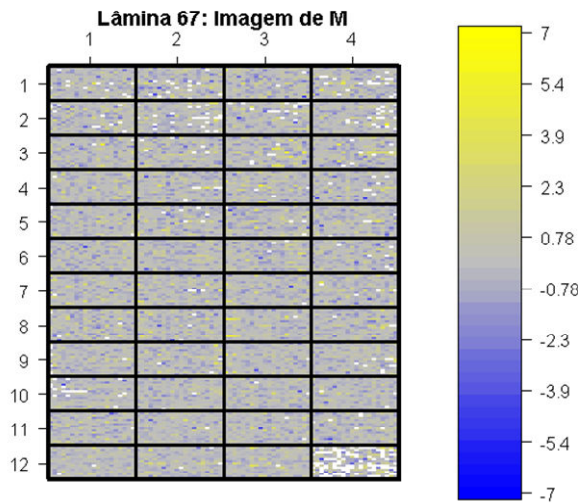


Figura 34 - Gráficos representando a distribuição espacial dos valores de M e A para as lâminas restantes utilizadas no experimento estudando o efeito do pareamento sexual na expressão gênica em fêmeas de *S. mansoni*.

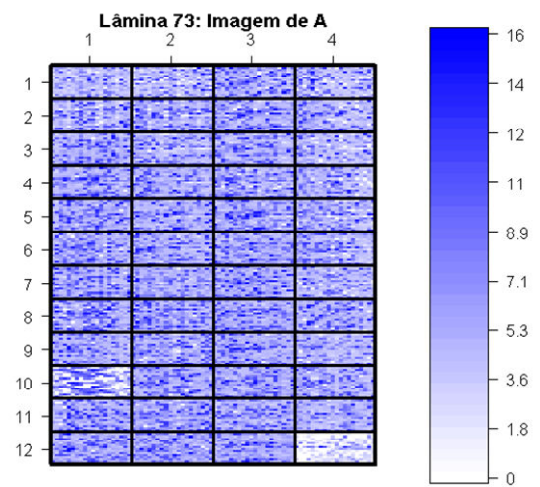
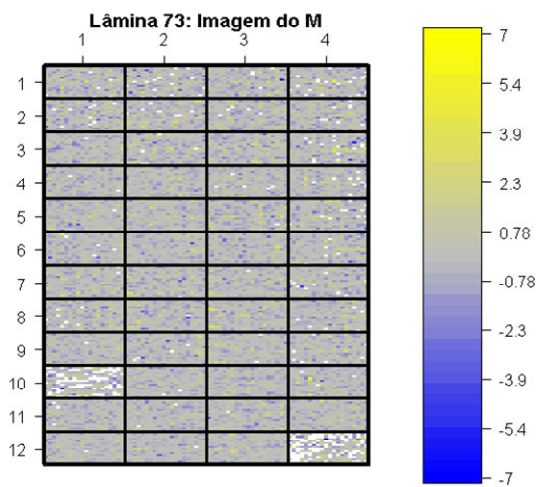
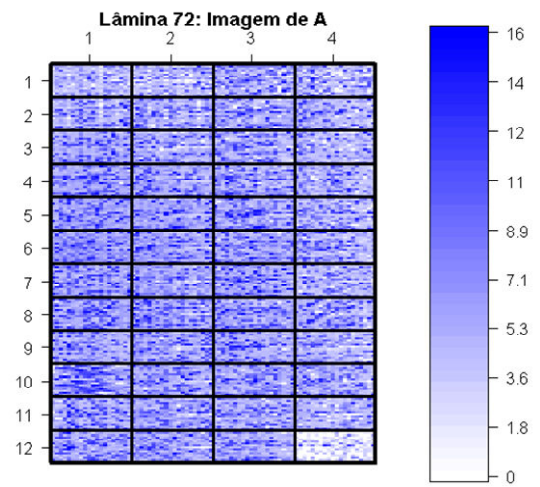
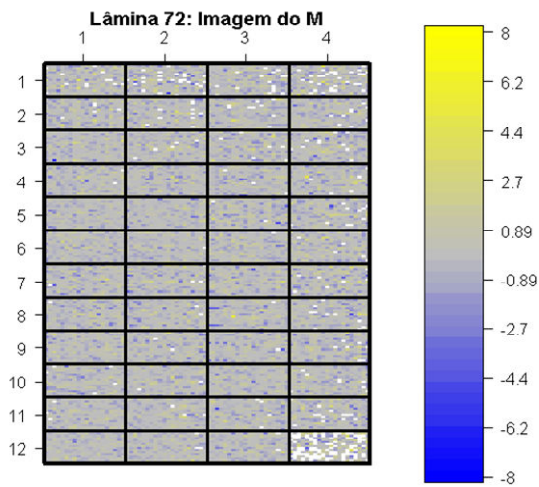
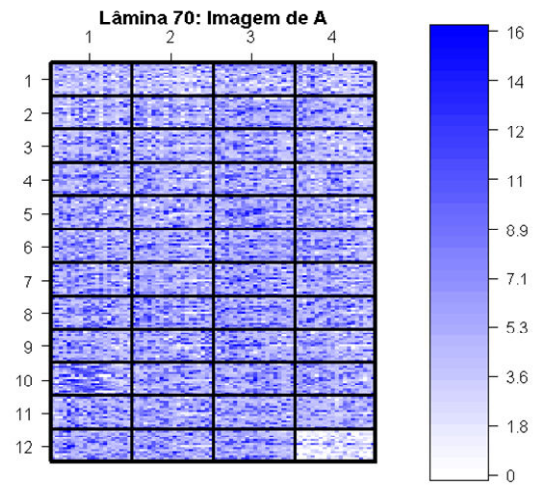
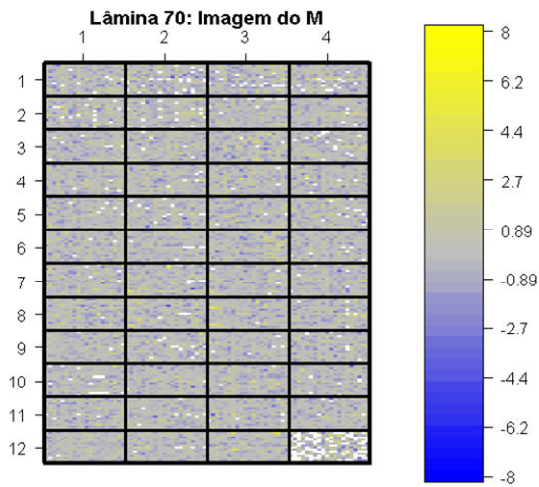


Figura 35 - Gráficos representando a distribuição espacial dos valores de M e A para as três primeiras lâminas utilizadas no experimento estudando o efeito do pareamento sexual na expressão gênica em machos de *S. mansoni*.

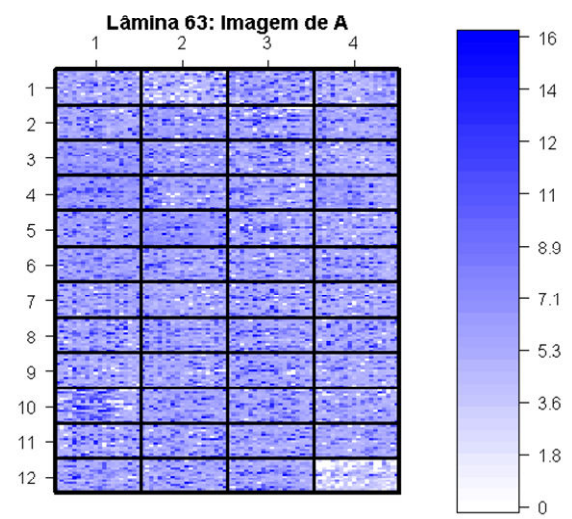
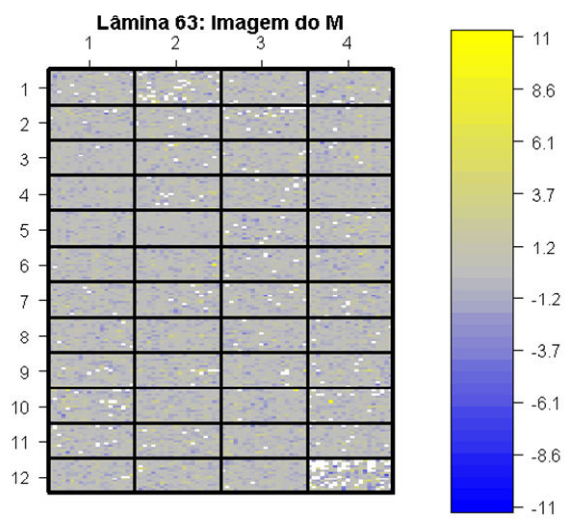
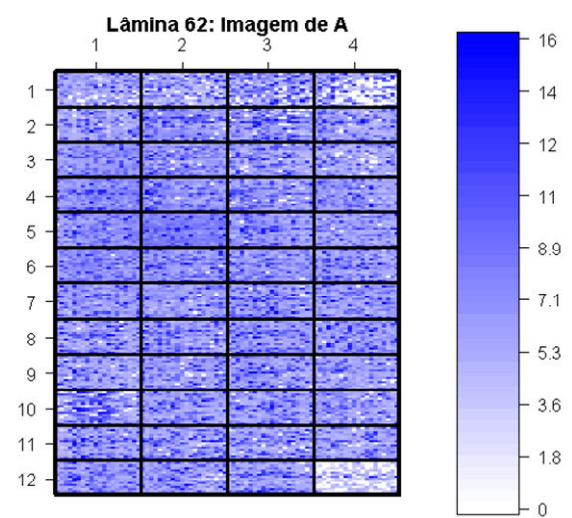
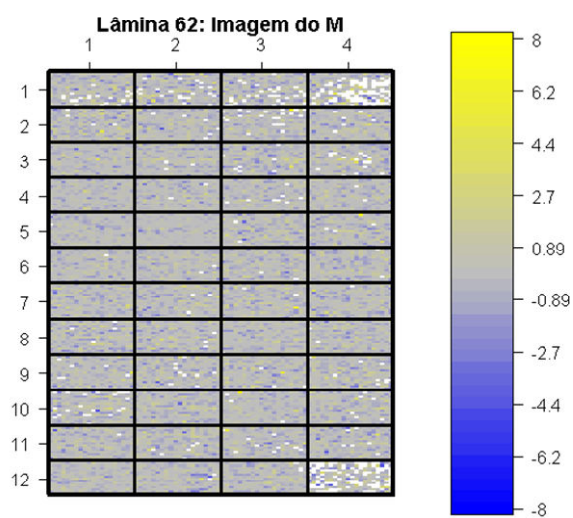
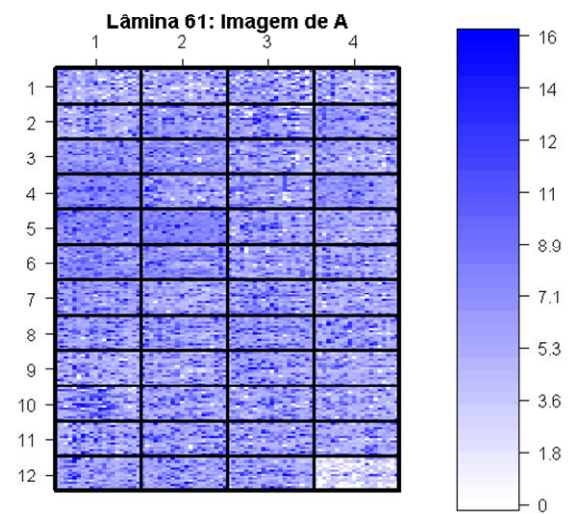
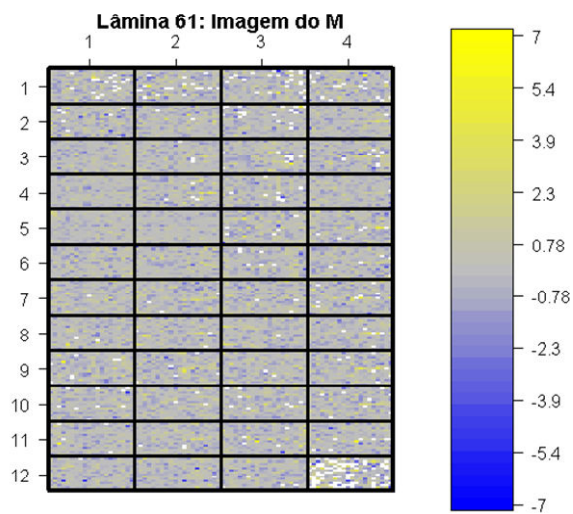


Figura 36 - Gráficos representando a distribuição espacial dos valores de M e A para as lâminas restantes utilizadas no experimento estudando o efeito do pareamento sexual na expressão gênica em machos de *S. mansoni*.

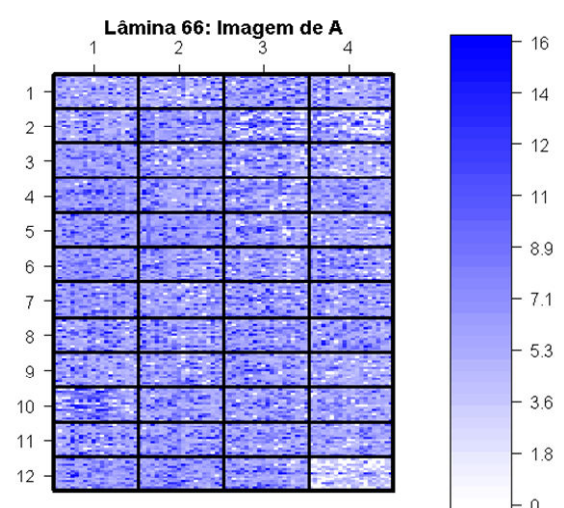
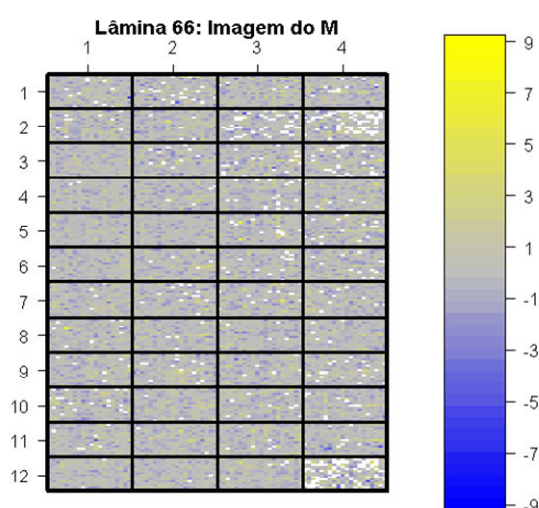
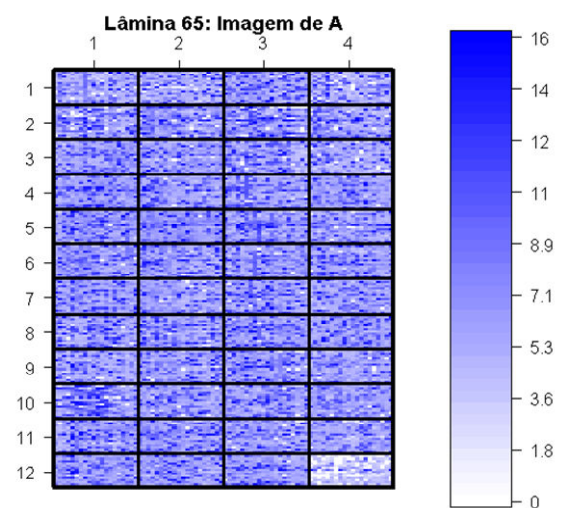
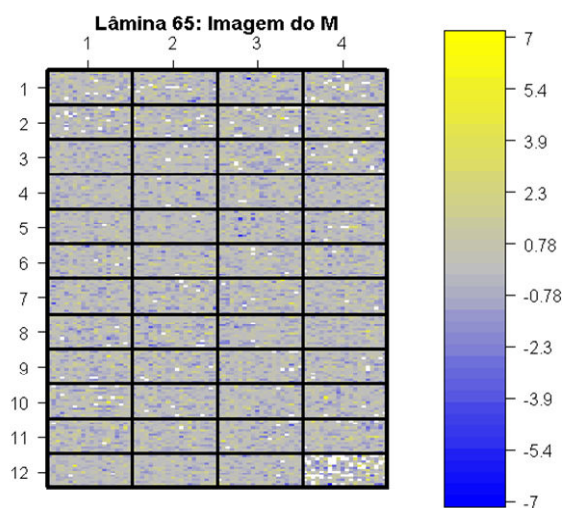
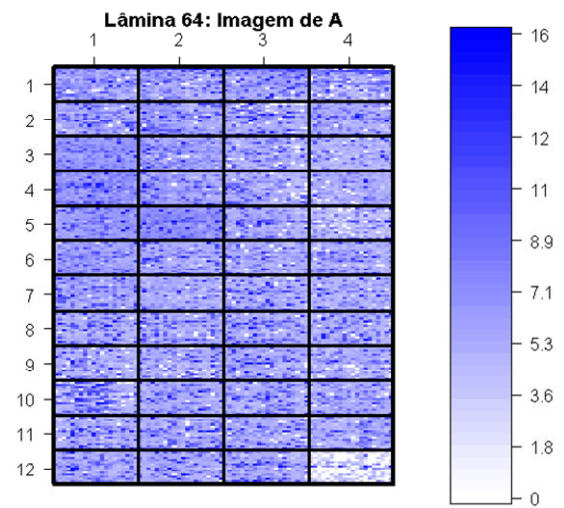
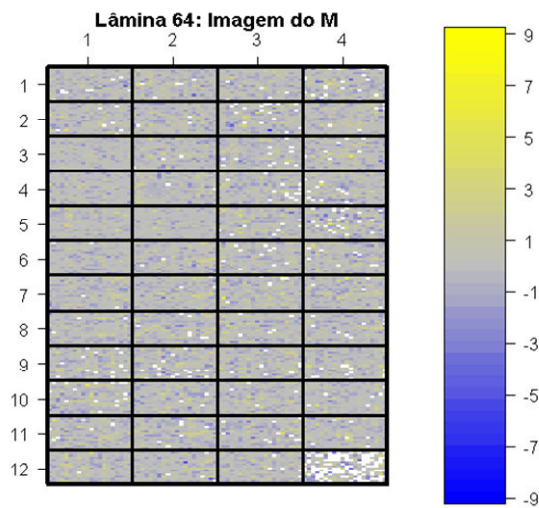


Figura 37 - Gráficos representando a distribuição espacial dos valores de M e A para as três primeiras lâminas utilizadas no experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica em fêmeas de *S. mansoni*.

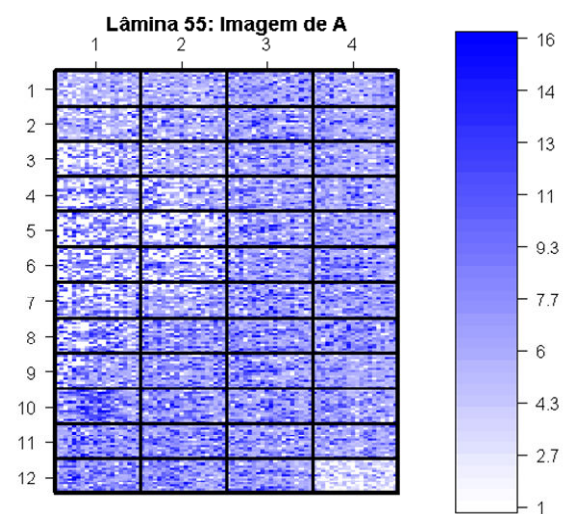
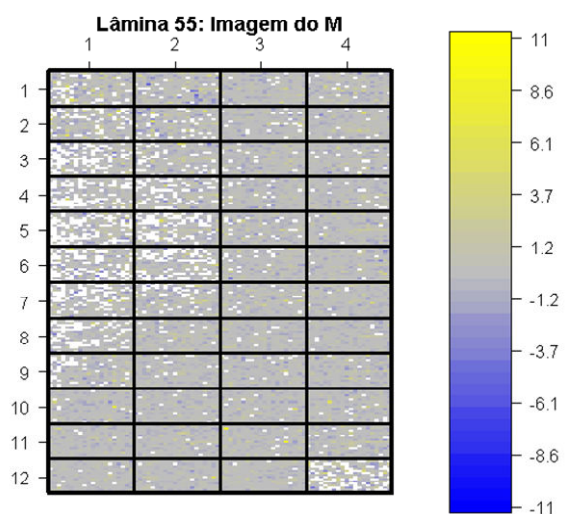
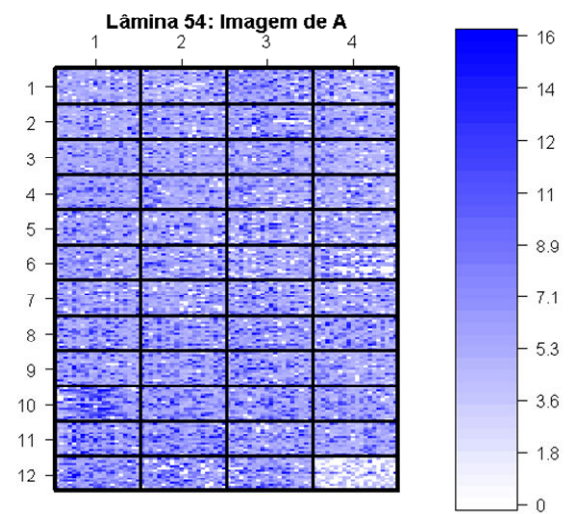
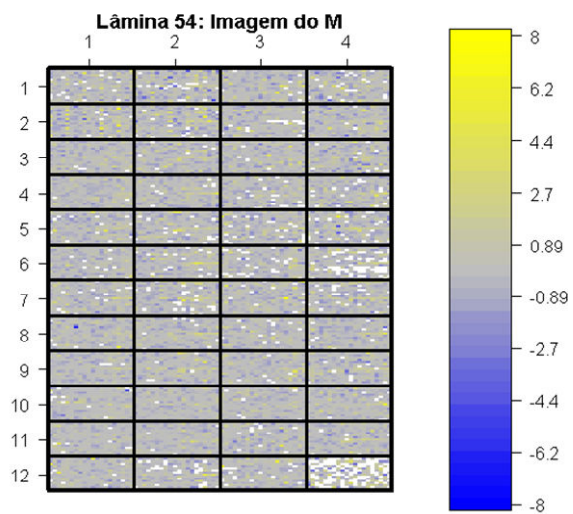
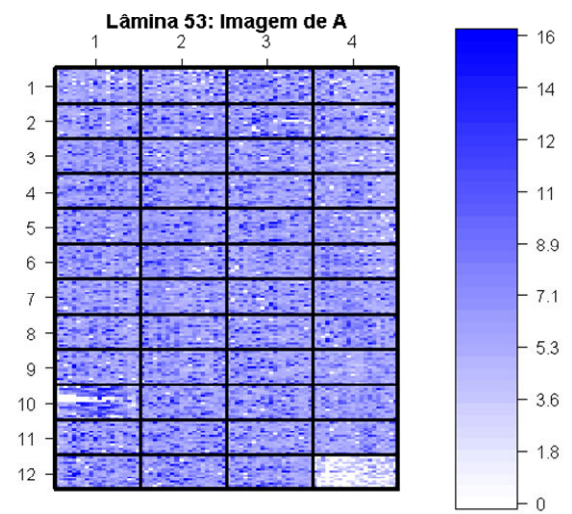
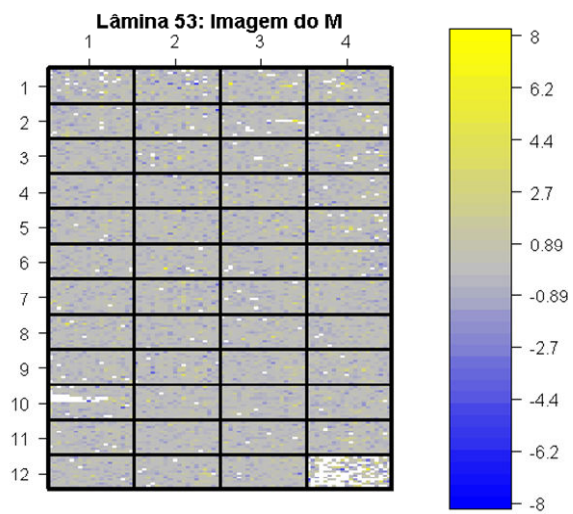


Figura 38 - Gráficos representando a distribuição espacial dos valores de M e A para as lâminas restantes utilizadas no experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica em fêmeas de *S. mansoni*.

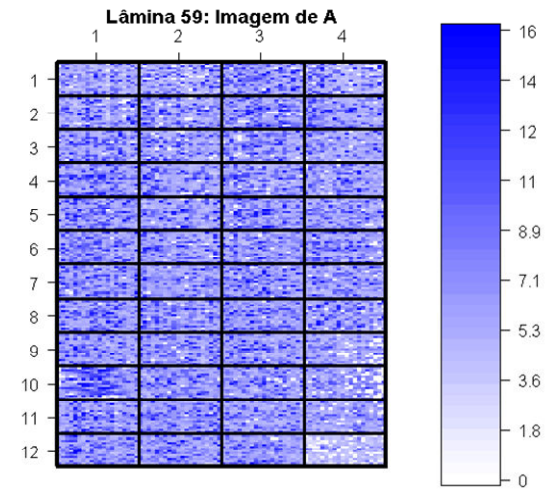
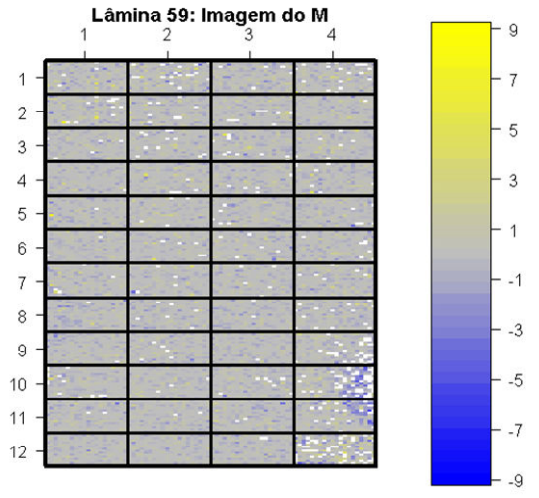
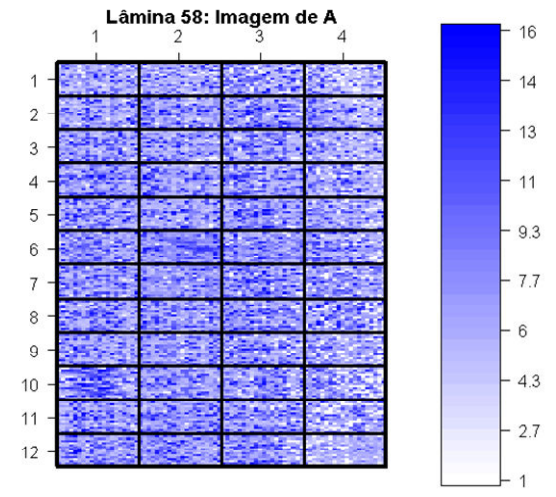
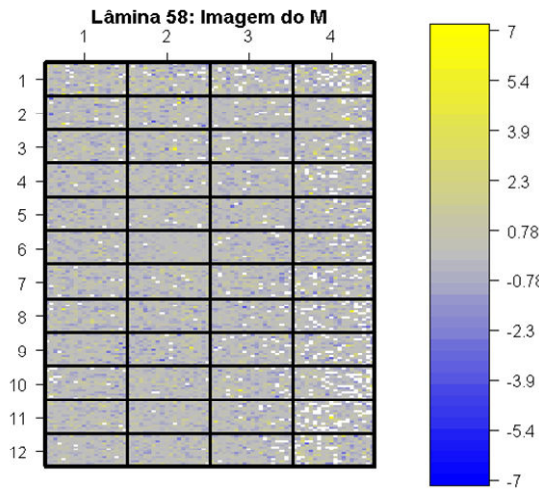
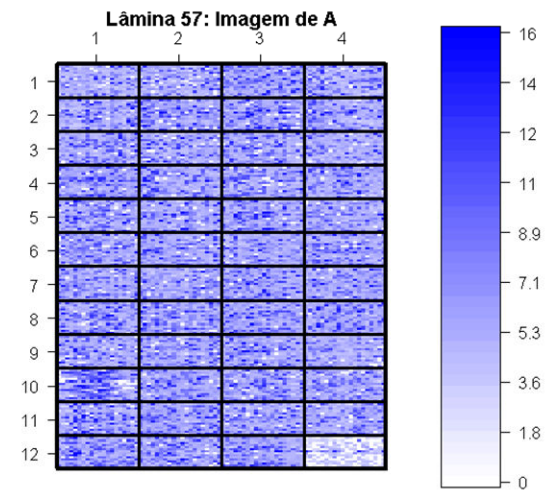
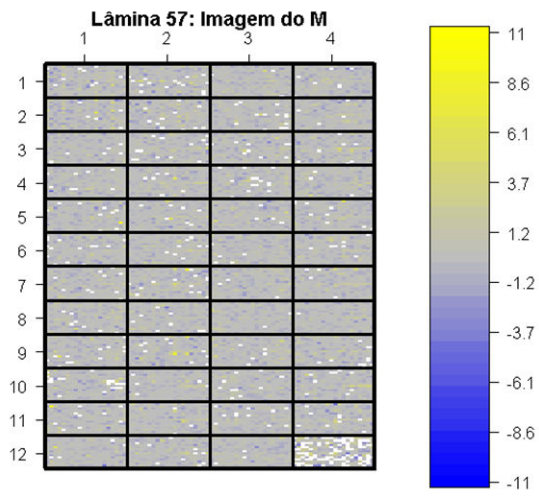


Figura 39 - Gráficos representando a distribuição espacial dos valores de M e A para as três primeiras lâminas utilizadas no experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica em machos de *S. mansoni*.

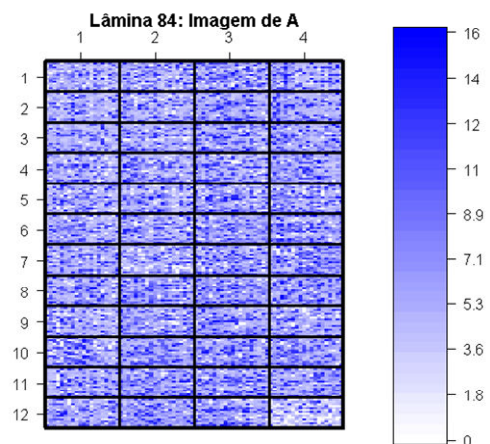
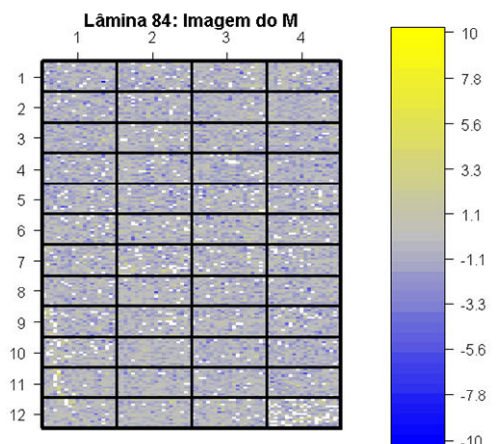
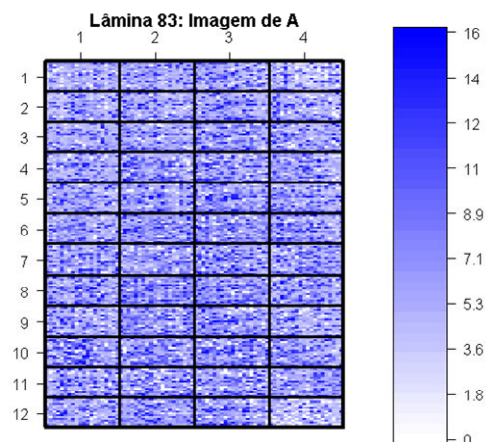
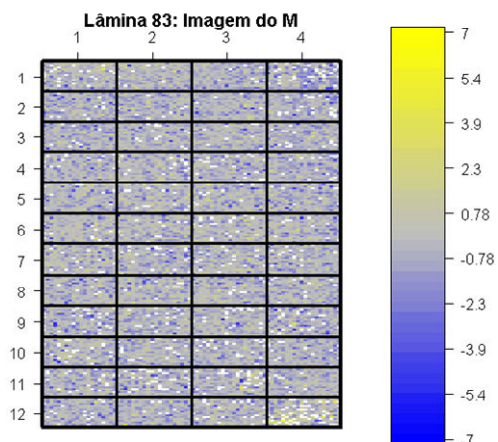
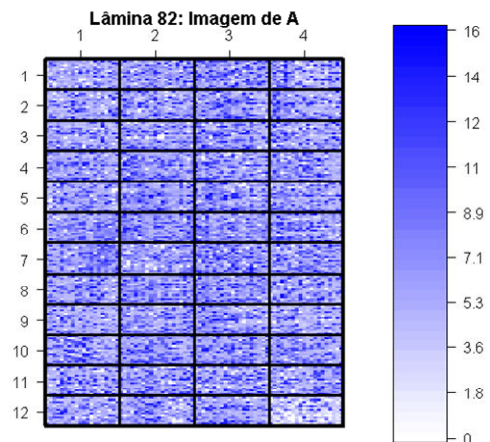
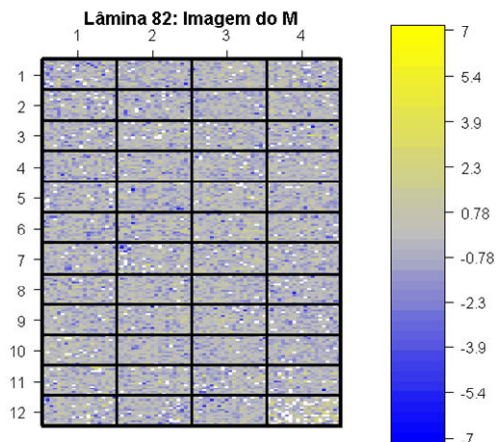


Figura 40 - Gráficos representando a distribuição espacial dos valores de M e A para as lâminas restantes utilizadas no experimento estudando o efeito do sexo do hospedeiro na expressão gênica em machos de *S. mansoni*.

