



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOINFORMÁTICA



Vias de sinalização de proteínas MAPKs em *Schistosoma mansoni*

Sandra Grossi Gava

BELO HORIZONTE
2017

Universidade Federal de Minas Gerais
Programa de Pós-Graduação em Bioinformática

Vias de sinalização de proteínas MAPKs em *Schistosoma mansoni*

Sandra Grossi Gava

Tese apresentada ao Programa Interunidades de Pós-Graduação em Bioinformática do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Bioinformática.

Orientador: Dr. Guilherme Corrêa de Oliveira
Coorientadora: Dra. Marina de Moraes Mourão

Belo Horizonte
2017

Dedico à minha família, por
todo amor e suporte.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus, pela força, paciência e sabedoria concedidas para a realização desta conquista. Agradeço pelas pessoas especiais que sempre colocou em meu caminho, sem elas eu não chegaria até aqui.

À minha orientadora, Marina Mourão agradeço pela orientação, confiança, pelas oportunidades, por todo apoio e amizade que tem me dedicado e por tudo que tem contribuído para minha formação.

Ao meu orientador, Guilherme Oliveira agradeço pelas oportunidades e pela orientação durante a execução deste trabalho.

À Roberta Caldeira e Rosiane Pereira, pelo incentivo e orientação durante os experimentos.

Aos colegas e amigos do HMM, Omar Carvalho, Cristiano Massara, Cristiane Lafeté, Núbia Fernandes, Naiara Tavares, Fernanda Sales, Cryslaine Aguiar, Amanda Domingues, Sílvia Mesquita, Felipe Lunkes, Juliano Araújo, Pedro Aguiar, João Sanches e Isabela Dutra por todo incentivo e torcida. À Lídia Ferreira e Cíntia Santana, por toda ajuda e pela organização do laboratório. Obrigada por terem me recebido tão bem, é um privilégio conviver com vocês e compartilhar de sua amizade.

Aos que passaram pelo LPCM: Rafael Assis, Luiza Andrade, Lívia Avelar, Assmaa El Khal, Erick Eidy, Fernanda Ludolf, Maíra Pucci, Rafael Palhares, Elisângela Cóser, Renata Oliveira, Mariana Eduarda Lopes, Silvane Murta, Juvana Moreira, Douglas Moreira, Maísa Santos, Policarpo Junior, Kênia Regina, Rosana Alves e Michele Lima, agradeço pelos ensinamentos e bons momentos compartilhados.

Ao CEBio pela infraestrutura computacional e aos seus colaboradores, Ângela Volpini, Julliane Dutra, Larissa Scholte, Eliane Moreira, Laila Nahum, Juliana Assis, Luis Villegas, Wagner Moreira, Sara Cuadros, Laura Leite, Izinara Rossi, Yesid Astroz, Mariana Oliveira, Mariana Magalhães, em especial ao Gabriel Fernandes e ao Fabiano Pais por toda ajuda e disponibilidade, e ao Anderson Dunitini, Fausto Santos e Francislon Oliveira pelo suporte técnico.

Às queridas Naiara Tavares e Larissa Jardim, minhas primeiras alunas, por toda ajuda com os experimentos e por terem me dado uma oportunidade única de ensinar e, principalmente, aprender.

À Anna Salim e Flávio Araújo da Plataforma de Sequenciamento Genômica e Transcriptoma NGS do CPqRR, pelo auxílio no delineamento experimental e construção das bibliotecas de RNASeq.

Ao Fábio Passetti e Ricardo Junqueira da Plataforma de Sequenciamento de Alto Desempenho do IOC pelo sequenciamento das bibliotecas de RNASeq.

À Fernanda Raad e Isabela Cerávolo da Plataforma PDTIS de PCR em Tempo Real do CPqRR, pelos serviços prestados.

Ao Moluscário Lobato Paraense do CPqRR, pelo fornecimento dos parasitos.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ pelo suporte técnico-científico e financeiro e pela disponibilidade de espaço para execução deste trabalho.

À Coordenadoria, aos professores e colegas da Pós-Graduação em Bioinformática da UFMG pelo aprendizado e apoio durante o curso.

Às secretárias, Sheila Santana e Natália, pela disponibilidade e boa vontade de ajudar a todos.

Às Agências Financiadoras: Comissão Europeia, FAPEMIG e CAPES, pelo suporte financeiro e pela bolsa concedida.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem o nosso convite para avaliar e finalizar esse trabalho.

Agradeço ainda às “amiguinhas” (Paola, Núbia, Fê e Karina) e aos amigos do EPIC, pela amizade e os bons momentos de descontração durante essa jornada.

À família Silva Marques Vilela, por terem me acolhido com tanto carinho.

À minha família, pela confiança e por tornarem mais um sonho possível. Obrigada por todo exemplo, apoio e presença apesar da distância. É por vocês que

eu busco o meu melhor, sempre. E ao Lucas, por ser o motivo de tantos sorrisos desde que chegou em nossas vidas.

Ao Daniel, pelo amor, paciência, admiração e, principalmente, por sonhar junto comigo. “Porque sonhos precisam de asas.”

O meu sincero agradecimento a todos que de alguma forma tornaram possível a realização deste trabalho.

*"In science, there is no certainty, only a
provisional best explanation."*

(<https://www.coursera.org/learn/quantitative-methods/>)

RESUMO

Gava, S. G. **Vias de sinalização de proteínas MAPKs em *Schistosoma mansoni***. 170 p. Tese (Doutorado) - Programa Interunidades de Pós-Graduação em Bioinformática. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017.

A identificação e caracterização dos mecanismos e moléculas envolvidos em sinalização celular são essenciais para o entendimento da biologia parasitária de *S. mansoni*. Proteínas quinases desempenham papel chave em vias de sinalização e têm sido propostas como potenciais alvos para o desenvolvimento de novas drogas. O genoma de *S. mansoni* codifica 252 proteínas quinases eucarióticas (ePKs), entretanto, apenas 32 possuem alguma evidência funcional experimental. Nosso grupo demonstrou por estudos funcionais que MAPKs estão envolvidas no desenvolvimento, reprodução e/ou sobrevivência do parasito e podem, portanto, serem consideradas alvos potenciais para o desenvolvimento de novas drogas. Em virtude da escassez de dados sobre a função das ePKs em *S. mansoni*, o presente trabalho tem como motivação principal contribuir para sua caracterização experimental correlacionando dados de expressão com o desenvolvimento e reprodução de *S. mansoni*. Para isso, as ePKs SmCaMK2, SmERK-1, SmERK-2, SmJNK e Smp38 foram silenciadas em esquistossômulos por RNA de interferência, incluindo três réplicas biológicas. Após dois dias foi realizada a extração de RNA total e a avaliação dos níveis de transcrição por RT-qPCR. Para todos os genes, com exceção de SmERK-2, foi observada uma redução média de 75 % nos níveis de transcrito dos alvos silenciados. O RNA extraído foi utilizado para construção de bibliotecas do tipo fragmento, sequenciadas na plataforma Illumina HiSeq 2500. As sequências obtidas foram mapeadas na última versão do genoma de referência de *S. mansoni* e os genes diferencialmente expressos (DEGs) foram identificados pela comparação das amostras de parasitos expostos aos dsRNAs específicos em relação aos parasitos não tratados. Foram identificados 606 DEGs em esquistossômulos SmJNK *knockdown* e 1154 DEGs em esquistossômulos Smp38 *knockdown*. Grande parte dos DEGs (505) encontrados codificam proteínas ainda sem função conhecida. O silenciamento de SmJNK promove diminuição da expressão de genes relacionados à defesa antioxidante, à composição estrutural de ribossomos e do citoesqueleto e dos spliceossomos. O silenciamento de Smp38 MAPK promove diminuição da expressão de genes relacionados à composição estrutural de ribossomos, do citoesqueleto, dos spliceossomos e dos fagossomos, além da diminuição da expressão de genes das vias de fosforilação oxidativa e metabolismo de purinas. Este trabalho possibilitou uma melhor compreensão das vias de sinalização de SmJNK e Smp38, elucidando papéis funcionais dessas MAPKs e dos alvos por elas regulados.

ABSTRACT

Gava, S. G. ***Schistosoma mansoni* MAPKs signaling pathways**. 170 p. PhD Thesis – Interinstitutional Grad Program on Bioinformatics. Biological Sciences Institute, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017.

The identification and characterization of mechanisms and molecules involved in cell signaling are essential to the understanding of the *Schistosoma mansoni* parasite's biology. The *S. mansoni* genome encodes 252 eukaryotic protein kinases (ePKs), however, only 32 have some experimental functional evidence. Our group has demonstrated through functional studies that MAPKs are involved in parasite development, reproduction and/or survival and may therefore be considered potential targets for the development of new drugs. Due to the data scarcity on the *S. mansoni* ePKs function, this work has the main motivation to contribute to their experimental characterization by correlating expression data with *S. mansoni* development and reproduction. For this, SmCaMK2, SmERK-1, SmERK-2, SmJNK and Smp38 ePKs were knockdown in schistosomula by RNA interference, including three biological replicates. After two days, extraction of total RNA and evaluation of transcript levels by RT-qPCR were performed. For all genes selected, we observed approximately 75 % reduction on transcript levels, except for SmERK-2. The extracted RNA was used to construct paired-end libraries sequenced on Illumina HiSeq 2500 platform. The reads obtained were mapped to the latest version of the *S. mansoni* reference genome and differentially expressed genes (DEGs) were identified by comparing the samples from parasites exposed to the specific dsRNAs relative to the untreated parasites. We identified 606 DEGs in SmJNK knockdown schistosomula and 1154 DEGs in Smp38 knockdown schistosomula. A substantial proportion of the DEGs (505) found encode proteins without known function. SmJNK knockdown promotes decreased in gene expression related to antioxidant defense, structural composition of ribosomes, cytoskeleton and spliceosomes. Smp38 MAPK knockdown promotes decreased expression of genes related to the structural composition of ribosomes, cytoskeleton, spliceosomes and phagosomes, as well as the reduction of gene expression in the oxidative phosphorylation and purine metabolism pathways. This work allowed a better understanding of SmJNK and Smp38 signaling pathways, elucidating the functional roles of these MAPKs and the targets they regulate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição global da esquistossomose..	18
Figura 2 – Ciclo de vida de <i>S. mansoni</i>	21
Figura 3 - Mecanismo de RNAi por dsRNA.....	23
Figura 4 - <i>S. mansoni</i> e sinalização celular.....	24
Figura 5 – Esquema representativo do fluxo de trabalho utilizado na obtenção das amostras biológicas.....	36
Figura 6 – Esquema representativo do <i>pipeline</i> desenvolvido para a análise do transcriptoma.....	40
Figura 7 – Exemplo da amplificação dos fragmentos dos genes de PKs alvos de silenciamento..	41
Figura 8 – Exemplo da síntese de dsRNAs das PKs alvo de silenciamento.	42
Figura 9 – Exemplo do perfil eletroforético dos RNAs extraídos de <i>Schistosoma mansoni</i>	43
Figura 10 - Média dos níveis de transcritos dos genes alvos em relação aos controles, não tratado e inespecífico (dsRNA GFP), após tratamento com dsRNA durante 2 dias.	45
Figura 11 – Exemplo de gráfico dos valores de qualidade por base.	47
Figura 12 – Exemplo de gráfico dos valores de qualidade média por sequência.	48
Figura 13 – Exemplo de gráfico do conteúdo de bases ao longo da sequência.	49
Figura 14 – Exemplo de gráfico do conteúdo GC por sequência.	50
Figura 15 – Exemplo de gráfico de número de sequências duplicadas.	51
Figura 16 – Relação entre as bibliotecas de RNASeq de <i>S. mansoni</i> geradas.....	54
Figura 17 – Agrupamento das bibliotecas de RNASeq geradas.	55
Figura 18 – <i>Heatmap</i> das amostras biológicas de <i>S. mansoni</i> tratadas com dsRNA e controle A não tratado.....	57
Figura 19 – Análise de Componentes Principais das amostras biológicas de <i>S. mansoni</i> tratadas com dsRNA e controle A não tratado.....	58

Figura 20 – Análise das amostras biológicas de <i>S. mansoni</i> tratadas com dsRNA-GFP e controle não tratado.	60
Figura 21 – Análise das amostras biológicas de <i>S. mansoni</i> tratadas com dsRNA-mCherry e controle não tratado.....	60
Figura 22 – Análise dos DEGs nos controles inespecíficos utilizando o pacote edgeR.	61
Figura 23 - Análise dos DEGs nos controles inespecíficos utilizando o pacote DESeq2.....	62
Figura 24 – Distribuição dos valores de <i>p-value</i>	62
Figura 25 – Análise das amostras biológicas de <i>S. mansoni</i> de controles não tratados.	65
Figura 26 – Análise dos DEGs entre os controles não tratados utilizando os programas DESeq2 e edgeR.	66
Figura 27 – Análise dos DEGs de SmJNK utilizando o programa DESeq2.	69
Figura 28 – Distribuição dos valores de <i>p-value</i> dos DEGs de SmJNK.	69
Figura 29 – Volcano plot dos DEGs de SmJNK. Volcano plot com os DEGs entre controle A versus dsRNA-SmJNK pelo pacote DESeq2.	70
Figura 30 – Validação da abordagem RNASeq utilizando RT-qPCR para os DEGs em esquistossômulos tratados com SmJNK-dsRNA.....	71
Figura 31 – Enriquecimento dos termos GO-Slim associados aos DEGs encontrados em esquistossômulos tratados com dsRNA-SmJNK em relação ao controle.	73
Figura 32 – Mapeamento dos genes que apresentaram diminuição de expressão pela ausência de SmJNK no KEGG <i>pathway</i> de ribossomos.	75
Figura 33 – Mapeamento dos genes que apresentaram diminuição de expressão pela ausência de SmJNK no KEGG <i>pathway</i> de spliceossomos.	78
Figura 34 – Análise dos DEGs de Smp38 utilizando o programa DESeq2.	81
Figura 35 – Distribuição dos valores de <i>p-value</i> dos DEGs de Smp38.	81
Figura 36 – Volcano plot dos DEGs de Smp38. Volcano plot com os DEGs entre controle A versus dsRNA-Smp38 pelo pacote DESeq2.	82
Figura 37 – Validação da abordagem RNASeq utilizando RT-qPCR para os DEGs em esquistossômulos tratados com Smp38-dsRNA.	83

Figura 38 – Enriquecimento dos termos GO-Slim associados aos DEGs encontrados em esquistossômulos tratados com dsRNA-Smp38 em relação ao controle.85

Figura 39 - Mapeamento dos genes que apresentaram diminuição de expressão pela ausência de Smp38 MAPK no KEGG *pathway* de ribossomos.....86

Figura 40 - Mapeamento dos genes que apresentaram diminuição de expressão pela ausência de Smp38 MAPK no KEGG *pathway* de fosforilação oxidativa.....88

Figura 41 - Mapeamento dos genes que apresentaram diminuição de expressão pela ausência de Smp38 MAPK no KEGG *pathway* de fagossomo.....89

Figura 42 - Mapeamento dos genes que apresentaram diminuição de expressão pela ausência de Smp38 MAPK no KEGG *pathway* de metabolismo de purinas.91

Figura 43 - Mapeamento dos genes que apresentaram diminuição de expressão na ausência de Smp38 MAPK no KEGG *pathway* de spliceossomo.92

Figura 44 – Análise dos DEGs de SmCaMK2 utilizando os programas DESeq2 e edgeR.....93

Figura 45 – Análise dos DEGs em parasitos silenciados para SmERK-1 e SmERK-2 utilizando os programas DESeq2 e edgeR.97

Figura 46 - Diagrama de Venn do número de DEGs regulados em comum em parasitos silenciados para SmJNK e Smp38.102

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Iniciadores específicos para proteínas quinases utilizados na síntese de dsRNA e tamanho do fragmento amplificado por PCR.	30
Quadro 2 - Iniciadores específicos para proteínas quinases utilizados na PCR quantitativa em tempo real.	35
Quadro 3 - Iniciadores específicos para os DEGs utilizados na validação por PCR quantitativa em tempo real.	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quantificação do RNAs extraídos dos esquistossômulos expostos por 2 dias aos dsRNAs de proteínas quinases.	43
Tabela 2 – Dados gerados na plataforma Illumina HiSeq 2500.	46
Tabela 3 – Dados gerados após alinhamento pelo programa STAR.	53
Tabela 4 – DEGs em esquistossômulos expostos ao dsRNA-GFP ou mCherry quando comparado ao controle não tratado utilizando o pacote edgeR (FDR < 0,05).	63
Tabela 5 – DEG em esquistossômulos expostos ao dsRNA-GFP quando comparado ao controle não tratado utilizando o pacote DESeq2 ($p_{adj} < 0,01$).	63
Tabela 6 – DEGs encontrados entre os diferentes esquistossômulos controle não tratados utilizando o pacote edgeR ($p\text{-value} < 0,01$; FDR < 0,05).	67
Tabela 7 – DEGs encontrados entre os diferentes esquistossômulos controle não tratados utilizando o pacote DESeq2 ($p_{adj} < 0,01$).	67
Tabela 8 – DEGs em esquistossômulos expostos ao dsRNA-SmCaMK2 quando comparado ao controle não tratado utilizando o pacote edgeR ($p\text{-value} < 0,01$ e FDR < 0,05).	95
Tabela 9 - DEGs em esquistossômulos expostos aos dsRNAs de SmERK-1 e SmERK-2 quando comparado ao controle não tratado utilizando os pacotes edgeR ($p\text{-value} < 0,01$ e FDR < 0,05) e DESeq2 ($p\text{-value} < 0,01$).	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- Akt – Proteína quinase B
- BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*
- CaMK2 – *Calcium/calmodulin dependent protein kinase*
- cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar
- CDS – *Coding DNA sequence*
- C_t – *Cycle threshold*
- dATP – Desoxiadenosina trifosfato
- DEGs – Genes Diferencialmente Expressos (*Differentially Expressed Genes*)
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- dNTP – Deoxinucleosídeo trifosfato
- ER – Retículo endoplasmático
- ERK-1 – *Extracellular signal regulated-kinase 1*
- ERK-2 – *Extracellular signal regulated-kinase 2*
- ESTs – Etiquetas de Sequências Expressas (*Expressed Sequence Tags*)
- FDR – Fração de Falsos Positivos (*False Discovery Rate*)
- g – Força centrífuga
- GO – *Gene Ontology*
- ILK – *Integrin-linked protein kinase*
- JNK - *c-Jun N-terminal kinase*
- Kb – Kilobases
- KEGG – *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*
- MAPK - *Mitogen-Activated Protein Kinases*
- Mb – Megabase
- Mg - Magnésio
- mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro
- NCBI - *National Center for Biotechnology Information*
- NGS – Sequenciamento de Nova Geração (*Next Generation Sequencing*)
- nt – Nucleotídeos
- oligo-d(T) – Oligonucleotídeo de deoxitimina
- pb – Pares de bases
- PAI-1 – Inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1
- PCA – Análise de componentes principais (*Principal Component Analysis*)

PCR – Reação em cadeia da polimerase
PERK – *Protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase*
pH – Potencial de hidrogênio
PKs – Proteínas quinases
PTKs – Proteínas tirosina quinases
qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RNA – Ácido ribonucleico
RNase – Ribonuclease
RNaseH – Ribonuclease H
RNASeq – Sequenciamento em massa de cDNA (*RNA Sequencing*)
ROS – *Reactive Oxygen Species*
RT – Transcrição reversa
SmCaMK2 – *Calcium/calmodulin dependent protein kinase* de *S. mansoni*
SmERK-1 – *Extracellular signal regulated-kinase 1* de *S. mansoni*
SmERK-2 – *Extracellular signal regulated-kinase 2* de *S. mansoni*
SmILK – *Integrin-linked protein kinase* de *S. mansoni*
SmJNK – *c-Jun N-terminal kinase* de *S. mansoni*
Smp38 – p38 MAPK de *S. mansoni*
TBE – Tris-borato de EDTA
UTR – *Untranslated region*
WHO – *World Health Organization*

SUMÁRIO

1	Introdução	18
1.1	<i>Aspectos gerais da esquistossomose</i>	18
1.2	<i>O parasito Schistosoma mansoni</i>	19
1.2.1	<i>O genoma de Schistosoma</i>	21
1.2.2	<i>Manipulação gênica em Schistosoma mansoni</i>	22
1.3	<i>Schistosoma mansoni e sinalização celular</i>	24
1.3.1	<i>Proteínas quinases</i>	25
2	Justificativa	27
3	Objetivos	28
3.1	<i>Objetivo Geral</i>	28
3.2	<i>Objetivos específicos</i>	28
4	Metodologia.....	29
4.1	<i>Seleção de alvos</i>	29
4.2	<i>Amplificação dos genes codificadores das MAPKs selecionadas por PCR</i>	29
4.3	<i>Purificação dos produtos de PCR</i>	30
4.4	<i>Síntese in vitro de dsRNA</i>	31
4.5	<i>Obtenção de esquistossômulos</i>	31
4.6	<i>Exposição de esquistossômulos aos dsRNAs</i>	33
4.7	<i>Extração do RNA de esquistossômulos</i>	33
4.8	<i>Tratamento do RNA extraído com DNase</i>	34
4.9	<i>Síntese de cDNA</i>	34
4.10	<i>PCR quantitativa em tempo real</i>	35
4.11	<i>Construção das bibliotecas para sequenciamento na plataforma Illumina</i>	36
4.12	<i>Análise do RNASeq</i>	37
4.12.1	<i>Processamento dos dados e análise inicial das bibliotecas</i>	37
4.12.2	<i>Mapeamento e contagem dos transcritos</i>	37
4.12.3	<i>Análise da expressão diferencial de genes</i>	37
4.12.4	<i>Anotação funcional dos genes diferencialmente expressos</i>	38
4.13	<i>Validação dos genes diferencialmente expressos por RT-qPCR</i>	38
5	Resultados e discussão.....	41
5.1	<i>Amplificação das PKs alvo de silenciamento</i>	41

5.2 Síntese de dsRNA.....	42
5.3 Silenciamento e extração do RNA de esquistossômulos	42
5.4 Níveis de transcritos das MAPKs após tratamento com os dsRNAs.....	44
5.5 Dados de sequenciamento	45
5.6 Mapeamento das reads no genoma de referência.....	51
5.7 Avaliação geral das bibliotecas geradas	54
5.8 Análise da expressão diferencial de genes nos controles inespecíficos	59
5.9 Análise da expressão diferencial de genes em esquistossômulos expostos aos dsRNAs de quinases.....	68
5.9.1 SmJNK.....	68
5.9.2 Smp38	79
5.9.3 SmCaMK2	92
5.9.4 SmERK-1 e SmERK-2	96
5.10 Considerações finais.....	99
6 Conclusão	104
7 Perspectivas.....	105
8 Referências bibliográficas	106
ANEXOS	118
Anexo 1 – Gráficos de valores de qualidade por base.....	118
Anexo 2 – Gráficos de valores de qualidade média por sequência.	118
Anexo 3 – Gráficos do conteúdo de base ao longo da sequência.	118
Anexo 4 – Gráficos do conteúdo GC por sequência.	118
Anexo 5 – Gráficos do grau de duplicação das sequências.....	118
Anexo 6 – Scripts.....	119
Anexo 7 – Padronização dos iniciadores utilizados na validação dos DEGs por qPCR.	121
Anexo 8 – Produção científica	122
Anexo 8.1 Capítulo de livro publicado.....	122
Anexo 8.2 – Artigo publicado	151
Anexo 8.3 – Artigo publicado	158
Anexo 8.4 – Artigo em preparação.....	170
Anexo 8.5 – Artigo em preparação.....	170

1 Introdução

1.1 Aspectos gerais da esquistossomose

A esquistossomose é uma doença causada por trematódeos digenéticos que pertencem à família *Schistosomatidae*. Cinco espécies do gênero *Schistosoma* estão envolvidas na infecção humana, sendo três as principais espécies: *Schistosoma mansoni* e *Schistosoma japonicum*, causadores da esquistossomose intestinal, e *Schistosoma haematobium*, agente etiológico da esquistossomose urinária (GRYSEELS, 2012). As espécies apresentam distribuição geográfica e topográfica distintas, bem como diferente tropismo no organismo do hospedeiro vertebrado, além de características morfológicas e fisiológicas particulares (ROLLINSON; SIMPSON, 1987)

Dentre as doenças tropicais causadas por parasitos, a esquistossomose é uma das mais importantes em termos de saúde pública, com número de casos inferior apenas à malária (WAKNINE-GRINBERG *et al.*, 2010). Segundo a Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization - WHO*), estima-se que mais de 700 milhões de pessoas vivam em áreas endêmicas, sob o risco de infecção, e aproximadamente 258 milhões de pessoas requereram tratamento preventivo no ano de 2014. A esquistossomose é endêmica em 78 países e a terapia preventiva em massa é requerida em apenas 52 desses países os quais apresentam moderada a alta taxa de transmissão (DONADEU *et al.*, 2016; WHO, 2016) (Figura 1).

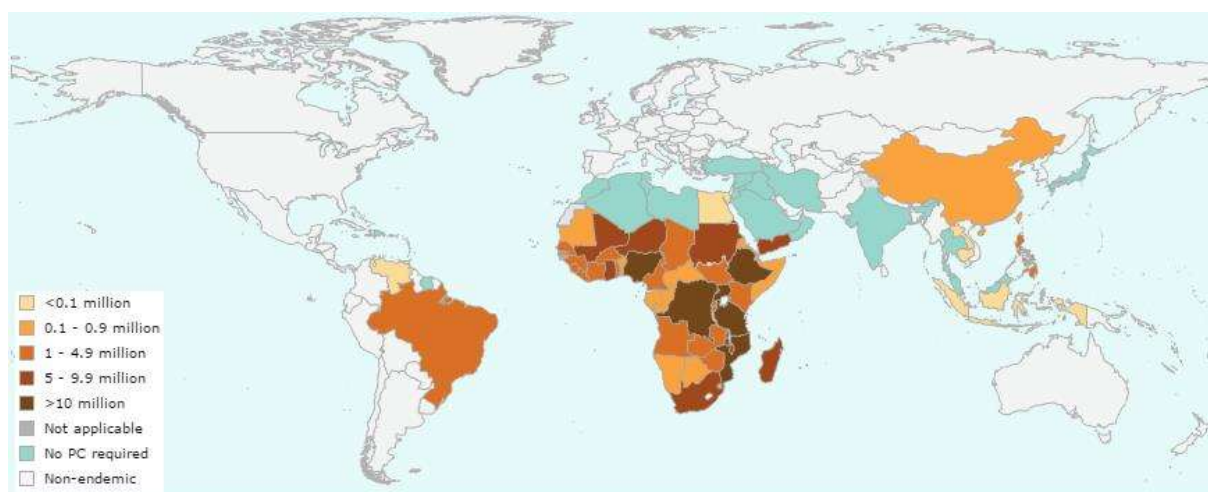


Figura 1 - Distribuição global da esquistossomose. Número estimado de indivíduos que necessitaram de quimioterapia preventiva para a esquistossomose no ano de 2014 (WHO, 2016).

A transmissão da esquistossomose ocorre em fluxos de água doce onde há caramujos infestados com cercárias. Os caramujos pertencentes aos gêneros *Bulinus*, *Biomphalaria* e *Onchomelania* são os vetores de *S. haematobium*, *S. mansoni* e *S. japonicum*, respectivamente (GRYSEELS, 2012).

A esquistossomose se manifesta clinicamente sob as formas aguda e crônica. A esquistossomose aguda é uma reação de hipersensibilidade sistêmica contra os esquistossômulos que migram, que ocorre algumas semanas ou até meses após a infecção pelas cercárias (BOTTIEAU *et al.*, 2006; LAMBERTUCCI, 1993). No entanto, os principais danos ao hospedeiro estão relacionados à esquistossomose crônica. Os ovos depositados pelas fêmeas adultas podem ficar retidos no fígado, intestinos e outros tecidos do hospedeiro, provocando inflamações e reações granulomatosas no fígado, que são progressivamente substituídas por tecidos fibróticos (CHEEVER; HOFFMANN; WYNN, 2000).

Atualmente, o controle da esquistossomose visa a redução da morbidade e mortalidade. Os métodos disponíveis consistem em melhorias no tratamento de água, implementação de saneamento básico, controle dos hospedeiros intermediários e quimioterapia contra as infecções no hospedeiro humano (FENWICK; WEBSTER; JOANNE, 2006). A quimioterapia consiste no tratamento de pacientes infectados, utilizando a única droga disponível, o Praziquantel® (PZQ) (BRUUN; AAGAARD-HANSEN, 2008; DOENHOFF *et al.*, 2009). O PZQ é uma droga de baixo custo, administrada em dose única e que pode ser utilizada no tratamento contra todas as espécies de *Schistosoma*. Entretanto, esta droga não previne a reinfeção e sua eficácia é variável dependendo do sexo do parasito, estágio de desenvolvimento e período de infecção. Além disso, já há relatos de parasitos resistentes a esta droga em laboratório e no campo (BOTROS; BENNETT, 2007; COELI *et al.*, 2013; LIANG *et al.*, 2003; MELMAN *et al.*, 2009; PICA-MATTOCCIA; CIOLI, 2004).

1.2 O parasito *Schistosoma mansoni*

A única espécie do gênero *Schistosoma* encontrada no Brasil é *S. mansoni*, devido à ocorrência do hospedeiro intermediário apenas para essa espécie (NEVES, 2001; SOUZA *et al.*, 2011). O parasito se desenvolve por um ciclo de vida que apresenta diversas fases bem adaptadas ao seu ambiente ou hospedeiros. O ciclo

inclui estágios aquáticos de vida livre, além de estágios parasitários que requerem a presença de hospedeiros intermediários e hospedeiros vertebrados definitivos, dentre eles, o homem (HAN *et al.*, 2009) (Figura 2).

O ciclo de vida do parasito tem início quando ovos são liberados nas fezes do hospedeiro definitivo infectado. Os ovos são excretados nas fezes e quando em contato com a água, em condições ambientais favoráveis, liberam os miracídios. Os miracídios buscam o hospedeiro intermediário utilizando estímulos químicos e luminosos. Após penetrarem no hospedeiro intermediário, os miracídios se multiplicam assexuadamente em esporocistos multicelulares e, mais tarde, em larvas cercárias com ventosas embrionárias e cauda bifurcada característica (HAN *et al.*, 2009). As cercárias são liberadas em ambientes aquáticos a partir de um hospedeiro intermediário infectado, o caramujo, e utilizam uma variedade de estímulos ambientais, como contraste claro-escuro e gradientes térmicos e químicos, para encontrar seu hospedeiro definitivo (HAAS *et al.*, 1997). Subsequentemente, para iniciar a infecção humana, as cercárias penetram na pele do hospedeiro, perdem suas caudas transformando-se em vermes jovens denominados esquistossômulos, que migram, através do sangue, dos pulmões até o fígado. Os esquistossômulos amadurecem em 4-6 semanas na veia porta onde se acasalam e em seguida migram para as vênulas mesentéricas. Vermes adultos são dióicos, apresentam dimorfismo sexual, possuem trato digestivo cego e ingerem sangue e globulinas do hospedeiro para sua nutrição (BOAG; NEWTON; GASSER, 2001; MORAND; MÜLLER-GRAF, 2000). As fêmeas produzem um grande número de ovos com larvas ciliadas denominadas miracídios e secretam enzimas proteolíticas que facilitam a migração dos ovos no lúmen do intestino. Cerca de 60 % desses ovos são liberados nas fezes do hospedeiro definitivo reiniciando o ciclo (SOUZA *et al.*, 2011).

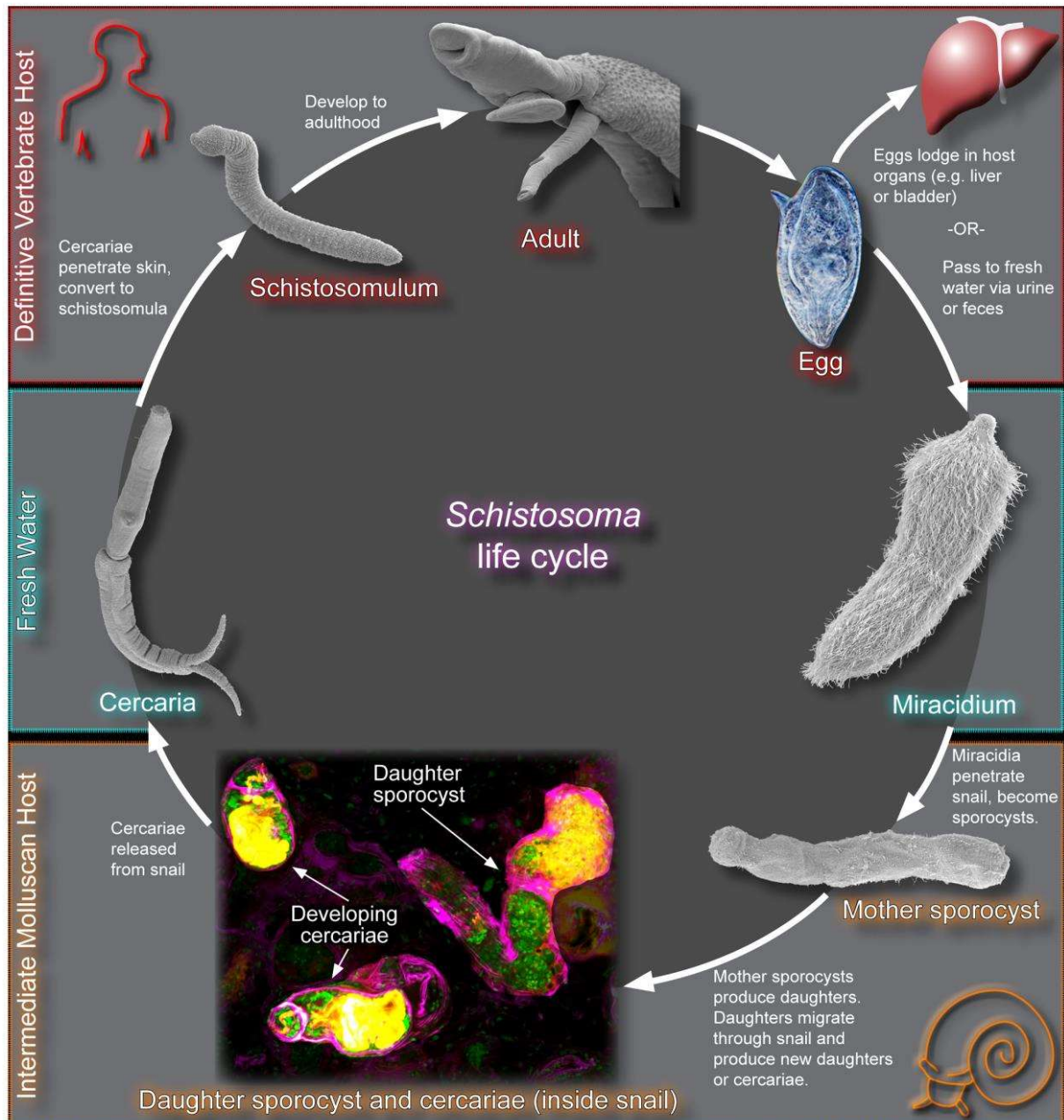


Figura 2 – Ciclo de vida de *S. mansoni*. As várias fases do ciclo de vida de *S. mansoni* estão retratadas utilizando microscopia de fluorescência (esporocistos e cercárias no hospedeiro invertebrado), microscopia de campo brilhante (ovo), ou microscopia eletrônica de varredura (fases restantes). As imagens não estão em escala (COLLINS; NEWMARK, 2013).

1.2.1 O genoma de *Schistosoma*

S. mansoni, *S. japonicum* e *S. haematobium* já tiveram seus genomas completos sequenciados (BERRIMAN *et al.*, 2009; CONSORTIUM *et al.*, 2009; YOUNG *et al.*, 2012). Uma nova versão do genoma de *S. mansoni* foi liberada em 2012, nesta, o genoma contém 364,5 megabases (Mb) e está fragmentado em 885 *scaffolds*, com 81 % das sequências ordenadas em cromossomos. Um total de 10.852 genes foram

identificados, codificando cerca de 11.000 proteínas, das quais 45 % permanecem sem função conhecida ou predita (PROTASIO *et al.*, 2012; ZERLOTINI *et al.*, 2013).

Atualmente encontram-se disponíveis dados de transcriptoma de *S. mansoni* e *S. japonicum*, derivados do sequenciamento de EST e ORESTs (do inglês, *Expressed Sequence Tag*), SAGE (do inglês, *Serial Analysis of Genes Expression*), cDNA e microarranjo e RNASeq que demonstram os padrões globais de expressão entre estágios do ciclo de vida, entre sexos, ou aqueles em resposta a calor, óxido nítrico e estresse oxidativo. Esta ampla quantidade de dados de genoma, transcriptoma e proteoma vem contribuindo para um melhor entendimento sobre a evolução e desenvolvimento de *Schistosoma*, bem como da sua interação com os hospedeiros, evasão do sistema imune e patogênese da esquistossomose. Desta forma, espera-se facilitar o desenvolvimento de novas estratégias de intervenção, incluindo a busca por novos alvos de drogas e vacinas (HAN *et al.*, 2009; WALKER, 2011).

1.2.2 Manipulação gênica em *Schistosoma mansoni*

Ferramentas moleculares são necessárias para elucidar a função e importância dos genes identificados. Entretanto, poucas ferramentas de genômica funcional estão disponíveis para *Schistosoma*, dentre elas, a transgenia e mutagênese insercional ainda se encontram em uma fase insipiente de padronização (HAGEN; SCHEERLINCK; GASSER, 2015; MANN *et al.*, 2011), permanecendo a técnica de RNA de interferência (RNAi) a mais utilizada e bem estabelecida para o estudo de função gênica neste organismo.

O mecanismo de interferência por RNA (RNAi) foi descrito e utilizado como ferramenta molecular *in vitro* primeiramente no nematódeo *Caenorhabditis elegans*, em 1998 (FIRE *et al.*, 1998). A técnica de RNAi é um mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional que atua sobre o RNA mensageiro (mRNA). Esse mecanismo é disparado pela presença de pequenos RNAs de fita dupla que, juntamente com complexos proteicos são capazes de mediar a clivagem de mRNA complementares, reprimindo, assim sua tradução (revisado em HANNON, 2002; ZAMORE, 2002) (Figura 3).

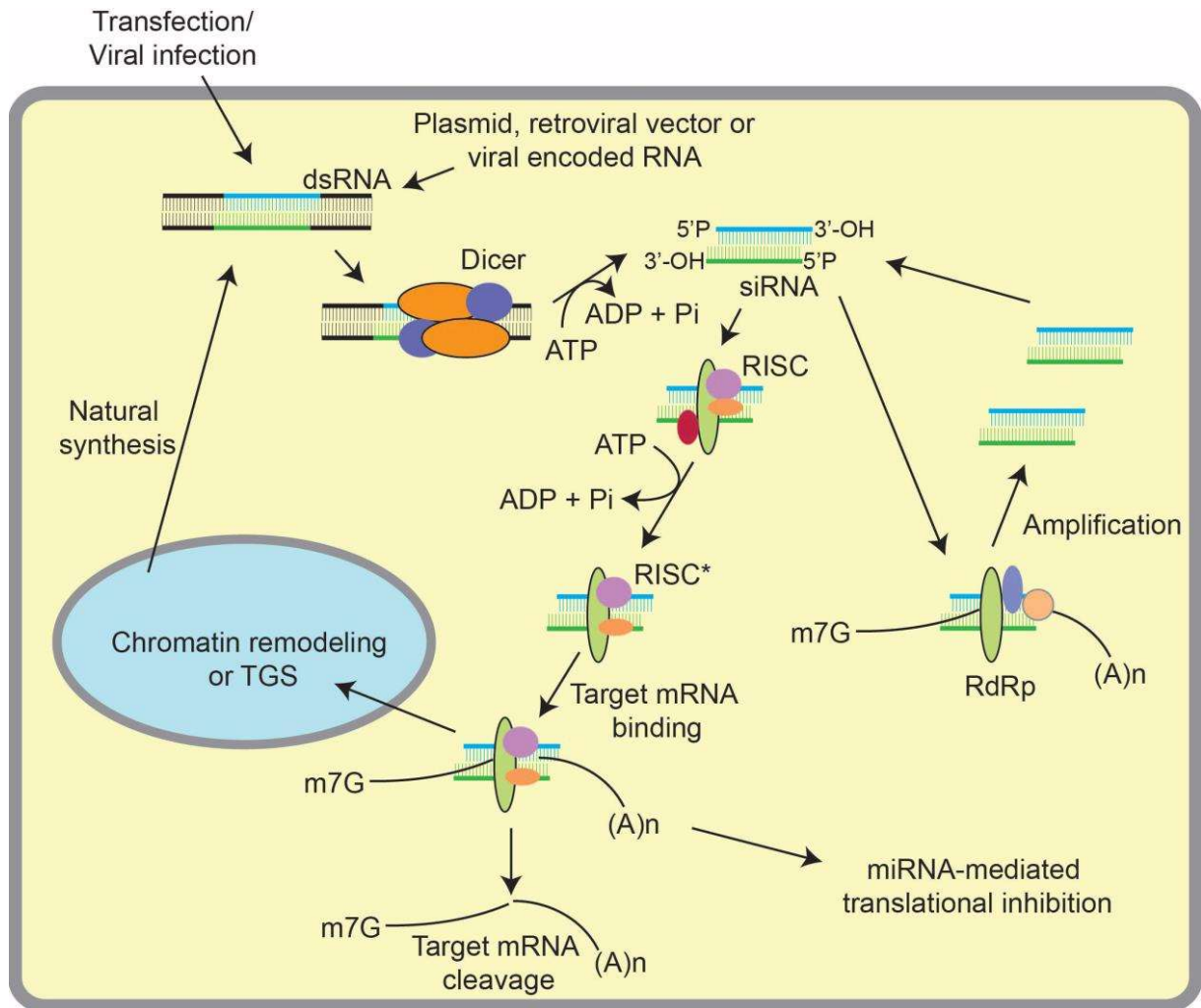


Figura 3 - Mecanismo de RNAi por dsRNA. Longos RNAs dupla fita (dsRNA) são clivados pelo complexo proteico DICER, em pequenos fragmentos de RNA de fita dupla (siRNAs). Esses siRNAs são então direcionados ao complexo RISC, no qual uma das fitas do siRNA fica retida. O novo complexo formado se liga ao mRNA complementar alvo que é então clivado pela endonuclease Argonata 2 (SINGH *et al.*, 2016).

Virtualmente, qualquer gene pode ser silenciado por RNAi sendo esta uma poderosa ferramenta de caracterização funcional. O sucesso da técnica está diretamente relacionado à estabilidade da proteína-alvo, ao organismo no qual a técnica está sendo aplicada, à forma de distribuição e à sequência utilizada para síntese do RNA de dupla fita.

Desde os primeiros trabalhos publicados (BOYLE *et al.*, 2003; SKELLY; DA'DARA; HARN, 2003), a função de diversos genes que codificam quinases, proteases, enzimas modificadoras de histonas, transportadores e receptores já foi elucidada pelo silenciamento ou da diminuição da expressão destes genes em *S. mansoni*. Além disso, a técnica já se mostrou eficiente em diversas fases do parasito,

como miracídios, esporocistos, esquistossômulos e vermes adultos (ANDRADE *et al.*, 2014; LONG *et al.*, 2016; MACDONALD *et al.*, 2015; MAREK *et al.*, 2013; MOURÃO *et al.*, 2009; PATOCKA; RIBEIRO, 2007).

1.3 *Schistosoma mansoni* e sinalização celular

O ciclo de vida de *Schistosoma* implica em uma sofisticada coordenação dos seus sistemas fisiológicos nas diferentes fases do desenvolvimento do parasito de forma a garantir que a infecção ocorra ativamente, bem como a migração e a sobrevivência nos diferentes hospedeiros e ambientes. Durante seu desenvolvimento, portanto, existem sinais do ambiente que estimulam mudanças fisiológicas, morfológicas e bioquímicas, a fim de garantir sua adaptação e o estabelecimento da infecção (LOVERDE *et al.*, 2004) (Figura 4).

O parasito é inclusive capaz de subverter a resposta ao estresse do hospedeiro para garantir parasitismo (KNIGHT *et al.*, 2016). Na relação com o hospedeiro humano, *Schistosoma* é capaz de sobreviver por décadas utilizando-se de suas moléculas como fonte energia e como moléculas sinalizadoras. Por exemplo, o TNF- α do hospedeiro é requerido para a produção e liberação de ovos (AMIRI *et al.*, 1992), IL-7 está relacionada ao crescimento e fecundação dos vermes adultos (WOLOWCZUK *et al.*, 1999) e a presença do receptor de TGF- β expresso na superfície do tegumento indica uma provável função em transdução de sinais através da membrana de superfície do parasito (DAVIES; SHOEMAKER; PEARCE, 1998). Assim, *Schistosoma* está tão adaptado ao meio em que está inserido, que utiliza proteínas imunorreguladoras do hospedeiro como sinais para sua replicação celular (AMIRI *et al.*, 1992).

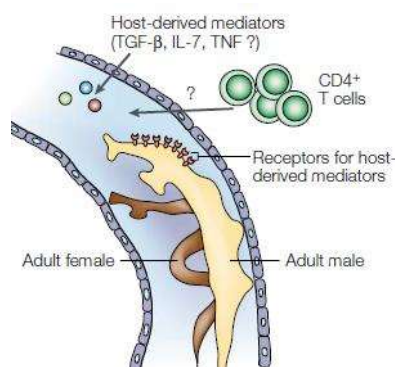


Figura 4 - *S. mansoni* e sinalização celular. *S. mansoni* e sua interação com o hospedeiro definitivo (adaptado de PEARCE; MACDONALD, 2002).

Em parte, estas comunicações moleculares são mediadas por processos de transdução de sinal, os quais envolvem redes integradas não lineares que interagem principalmente por mudança de status de atividade pela fosforilação (por proteínas quinases - PKs) e desfosforilação (por fosfatases) de resíduos de aminoácidos, ou pela incorporação de GTP (HANKS; QUINN; HUNTER, 1988). Estas cascatas de sinalização culminam com a ativação de fatores de transcrição que regulam a expressão de genes específicos ativando ou bloqueando sua transcrição. Além disso, o status de fosforilação de uma proteína pode alterar sua atividade enzimática, interação com outras proteínas e moléculas, localização celular e propensão à degradação por proteases (JOHNSON *et al.*, 2002).

Aproximadamente 2 % do proteoma predito de *S. mansoni* corresponde à ePKs, totalizando 252 proteínas, das quais apenas cerca de 30 possuem alguma evidência experimental (ANDRADE *et al.*, 2011). A escassez de dados sobre a função das ePKs de *S. mansoni* nos motiva a aprofundarmos em níveis cada vez mais detalhados os estudos que visam contribuir para o entendimento da participação desta família de proteínas no desenvolvimento do parasito.

1.3.1 Proteínas quinases

PKs estão entre as maiores famílias gênicas em eucariotos e têm sido extensivamente estudadas. Estas enzimas são consideradas potenciais alvos de drogas do ponto de vista médico e químico com um número crescente de inibidores de PKs sendo desenvolvidos e aprovados para o tratamento de diversas doenças humanas (BOYLE; KOLESKE, 2007). Além disso, PKs ganharam interesse como alvos para combater muitos parasitos, incluindo *S. mansoni* (ANDRADE *et al.*, 2014; BECKMANN; GREVELDING, 2010; BURO *et al.*, 2014; DISSOUS; AHIER; KHAYATH, 2007; NAULA; PARSONS; MOTTRAM, 2005; WARD *et al.*, 2004).

As MAPKs (do inglês, *Mitogen-Activated Protein Kinases*) compreendem uma família de ePKs cuja função e regulação foi conservada durante a evolução desde organismos unicelulares, como leveduras, até organismos complexos, incluindo humanos (WIDMANN *et al.*, 1999), sendo um dos sistemas de sinalização mais bem caracterizados em diversos organismos. MAPKs fosforilam resíduos específicos de serina ou treonina na proteína alvo e regulam atividades celulares diversas como

expressão gênica, mitose, movimento, metabolismo e apoptose (JOHNSON; LAPADAT, 2002).

MAPKs catalisam a fosforilação reversível de proteínas resultando em sua ativação ou inativação. Entre seus substratos estão outras proteínas quinases, fosfolipases, fatores de transcrição e proteínas do citoesqueleto (WIDMANN et al., 1999). Os fosfatos adicionados pelas MAPKs podem ser removidos por proteínas fosfatases e, dessa forma a ação de MAPKs e fosfatases podem rapidamente alterar as condições celulares em resposta às mudanças do ambiente (JOHNSON; LAPADAT, 2002). Mamíferos possuem pelo menos cinco vias descritas, dentre elas as vias de ERK (do inglês, *extracellular signal regulated-kinase*), JNK/SAPK (do inglês, *c-Jun N-terminal kinase / stress-activated protein kinase*) e p38 MAPK (ANDRADE, 2012).

Recentemente, nosso grupo empregou RNAi para elucidar os papéis funcionais das proteínas MAPK SmERK-1, SmERK-2, SmJNK e Smp38, além da quinase SmCaMK2 (*calcium/calmodulin-dependent protein kinase*) que, em *C. elegans*, está envolvida na ativação da via de sinalização de JNK (SAGASTI et al., 2001; SUNDARAM, 2006). Foi demonstrado que SmJNK participa da maturação e sobrevivência do parasito, associada ao dano no tegumento. SmERK-1 e SmERK-2 estão envolvidas na reprodução, tendo o silenciamento causado efeito sobre a produção de ovos e desenvolvimento de ovários e oócitos (ANDRADE et al., 2014). Já Smp38 exerce um importante papel no desenvolvimento das estruturas reprodutoras e na sobrevivência dos parasitos. A inibição da atividade de Smp38 interfere também na proteção do parasito contra espécies reativas de oxigênio (AVELAR, 2013). Portanto, proteínas MAPKs desempenham papéis importantes na sobrevivência do parasito *in vivo*, sendo essenciais para seu desenvolvimento, sobrevivência e/ou reprodução.

2 Justificativa

Em virtude dos registros de resistência ao Praziquantel®, do insucesso dos programas de controle em áreas de alta prevalência e da ausência de medicamentos alternativos de alta eficácia, a esquistossomose continua sendo uma das doenças infecciosas e parasitárias mais prevalentes no mundo, responsável por altos índices de morbidade e mortalidade, e gerando perdas econômicas significativas, especialmente em países em desenvolvimento.

A descoberta de alvos alternativos para o desenho de novas drogas e vacina contra a esquistossomose é considerada uma demanda urgente pela comunidade científica e Organização Mundial de Saúde. Nesse sentido, a identificação e caracterização dos mecanismos e moléculas envolvidas em processos de sinalização que regulam funções celulares são essenciais para compreensão da biologia parasitária de *S. mansoni*, tendo o potencial de identificar e validar alvos moleculares para uso na terapia anti-*Schistosoma*. As ePKs de *S. mansoni*, *S. japonicum* e *S. haematobium* foram previamente identificadas pelo nosso grupo. A partir de informações funcionais de ortólogos identificados foi possível selecionar um grupo de ePKs cuja função predita é essencial para o desenvolvimento e sobrevivência dos organismos.

O alvo de estudo desse trabalho são ePKs envolvidas na via de sinalização de MAPKs. Em estudos prévios, o nosso grupo realizou com sucesso o silenciamento gênico por RNAi das quinases SmCaMK2, SmERK-1/2, SmJNK e Smp38 MAPK. Os resultados obtidos apontam para a participação dessas proteínas no desenvolvimento e reprodução dos parasitos (ANDRADE *et al.*, 2014; AVELAR, 2013). Neste trabalho, realizamos o estudo do transcriptoma (RNASeq) de esquistossômulos, dois dias após sua transformação mecânica, em que as proteínas quinases supracitadas apresentavam maior diminuição nos níveis de transcritos, elucidando assim os genes regulados pelas quinases SmJNK e Smp38 MAPK, contribuindo para o melhor entendimento dessas vias em *S. mansoni* e aprimorando o conhecimento sobre o potencial dessas quinases e dos alvos por elas regulados como alvos terapêuticos.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar o transcriptoma de esquistossômulos do parasito *S. mansoni* em que as proteínas quinases SmCaMK2, SmERK-1 e SmERK-2, SmJNK e Smp38 MAPKs foram depletadas por RNA de interferência, visando identificar prováveis alvos regulados pela via das MAPKs.

3.2 Objetivos específicos

- Construir e sequenciar bibliotecas de RNASeq de esquistossômulos do parasito *S. mansoni* em que as quinases (SmCaMK2, SmERK-1, SmERK-2, SmJNK e Smp38) foram silenciadas por RNA de interferência, ou expostos aos dsRNAs (GFP e mCherry);
- Verificar possíveis efeitos de *off-target* em esquistossômulos expostos a dsRNAs inespecíficos (GFP ou mCherry);
- Identificar genes diferencialmente expressos no transcriptoma de *S. mansoni* após o silenciamento de proteínas da via das MAPKs, visando elucidar seus prováveis alvos de regulação;
- Descrever processos fisiológicos regulados por essas MAPKs.

4 Metodologia

4.1 Seleção de alvos

Para o silenciamento gênico por RNA de interferência foram selecionadas ePKs envolvidas na via de sinalização de MAPKs: SmCaMK2 (Smp_011660.2), SmJNK (Smp_172240), SmERK-1 (Smp_142050), SmERK-2 (Smp_047900) e Smp38 (Smp_133020). A escolha foi guiada por resultados previamente obtidos por nosso grupo que sugerem estes alvos como importantes para o desenvolvimento e/ou reprodução do parasito e, conseqüentemente, no sucesso da infecção e postura de ovos no hospedeiro.

4.2 Amplificação dos genes codificadores das MAPKs selecionadas por PCR

Fragmentos dos genes selecionados (SmCaMK2, SmJNK, SmERK-1 e SmERK-2, Smp38), previamente clonados em vetor *pGEM-T Easy* (Promega) foram amplificados pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Os tamanhos dos fragmentos amplificados estão listados no Quadro 1. Adicionalmente, foram amplificados por PCR, fragmentos dos genes utilizados como controles inespecíficos: GFP (vetor pCRII-GFP) e mCherry (GenBank AY678264).

Visando a posterior síntese de dsRNAs, a amplificação foi realizada utilizando iniciadores contendo uma cauda com a sequência do promotor de T7 (TAATACGACTCACTATAGGG), específicos para cada um dos transcritos clonados. Os iniciadores (Quadro 1) foram desenhados anteriormente por membros do nosso grupo utilizando o programa *PRIMER3* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) com base nas sequências preditas dos genes de interesse que estão depositadas no banco de dados de *Schistosoma*, o SchistoDB (<http://schistodb.net/schistodb20/>).

A reação foi feita em um volume final de 50 μ L, consistindo do seguinte protocolo: 2,5 μ L de tampão de PCR 10X sem Mg, 1,0 μ L de MgCl₂ (50 mM), 0,5 de dNTP (10 mM), 0,2 μ L de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen - 5 U/ μ L), 1 μ L de cada iniciador (*forward* e *reverse* - 10 nM) (Quadro 1) e 1 μ L do plasmídeo purificado. Foi utilizado o seguinte programa de ciclagem para amplificação: desnaturação inicial a 97 °C por 2 minutos e 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos (desnaturação); 55 °C por 30 segundos

(pareamento dos iniciadores) e 72 °C por 1 minuto (extensão). A finalização da reação foi feita a 72 °C por 10 minutos para extensão final.

Quadro 1 - Iniciadores específicos para proteínas quinases utilizados na síntese de dsRNA e tamanho do fragmento amplificado por PCR.

Iniciadores dsRNA				Fragmento amplificado (pb)
Alvo	Gene ID	Forward	Reverse	
SmCaMK2	Smp_011660.2	taatacgactcactatagggGATGA CATTGAGGACGAAGG	taatacgactcactatagggTCGCAGG ACTGACTGTTAG	504
SmERK-1	Smp_142050	taatacgactcactatagggTTGGT CAATTGGTTGTATTATGG	taatacgactcactatagggGGAACAA TGGCACCAGGAAT	566
SmERK-2	Smp_047900	taatacgactcactatagggTCTGC CAGCGAACATATCG	taatacgactcactatagggGGATCAC CAAGTCGTGAAGA	538
SmJNK	Smp_172240	taatacgactcactatagggACATG CAGCCGGTATAATCC	taatacgactcactatagggTACTTC AGAGTCTTCATACCATACG	570
Smp38	Smp_133020	taatacgactcactatagggGTTGC AACTCGTTGGTATCG	taatacgactcactatagggTCGCGAA TAAATCCACATGC	236
Controles inespecíficos		Forward	Reverse	
GFP	pCRII-GFP	taatacgactcactatagggTCTTC AAGTCCGCCATG	taatacgactcactatagggTGCTCAG GTAGTGGTTGTC	360
mCherry	GenBank AY678264	taatacgactcactatagggTGGTG AGCAAGGGCGA	taatacgactcactatagggTACTTG TACAGCTCGTCC	711

* Em letras minúsculas estão as sequências do promotor de T7 e em letras maiúsculas as sequências específicas para cada gene.

Após a amplificação, os produtos da reação de PCR foram aplicados em gel de agarose 1 % para separação e posterior visualização no aparelho *ImageQuant LAS 4000* (GE Healthcare Life Sciences).

4.3 Purificação dos produtos de PCR

Após a análise da amplificação em gel de agarose os produtos amplificados foram purificados utilizando o *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN), segundo orientações do fabricante.

As bandas correspondentes aos fragmentos de interesse foram extraídas do gel, foram acrescentados a cada fragmento 3 volumes (de acordo com o peso do fragmento de gel) do tampão QG, e as amostras foram incubadas a 50°C durante 10 minutos, ou até o gel estar completamente dissolvido. Em seguida, foi adicionado 1 volume de isopropanol 100 % e as amostras foram aplicadas nas colunas do kit. As amostras foram então centrifugadas a 13.000 rpm por 1 minuto e os eluatos descartados. Foram adicionados 500 µL de tampão QG e as amostras foram centrifugadas por 1 minuto a 13.000 rpm. Foram acrescentados 750 µL de tampão PE

para a lavagem e as amostras foram centrifugadas por 1 minuto a 13.000 rpm. O eluato foi descartado e as amostras centrifugadas por mais 1 minuto a 13.000 rpm para secagem das colunas. As colunas foram transferidas para novos tubos de 1,5 mL e o DNA eluído utilizando 30 µL de água. Os produtos de PCR purificados obtidos foram quantificados utilizando o *NanoDrop 1000 Spectrophotometer* (Thermo-Scientific).

4.4 Síntese *in vitro* de dsRNA

Para a síntese dos dsRNAs foi utilizado o kit *T7 RiboMAX Express RNAi Systems* (Promega), segundo o protocolo do fornecedor. Brevemente, foram adicionados 10 µL de tampão *RiboMAX Express T7 2X*, 2 µL de enzima *T7 Express* e 8 µL de DNA (produto de PCR purificado com concentração mínima de 80 ng/µL). A reação foi misturada gentilmente e incubada a 37 °C por 16 horas. Para degradar os moldes de DNA presentes nas reações foi adicionado 1 µL de *RQ1 RNase-Free DNase* e as amostras incubadas a 37 °C por 30 minutos. Foram adicionados 0,1 volumes de acetato de sódio 3 M e 1 volume de isopropanol 100 % para precipitação dos dsRNAs. As amostras foram incubadas por 10 minutos no gelo e em seguida centrifugadas a 13.000 rpm por 15 minutos. O eluato foi descartado e foram acrescentados 500 µL de etanol 75 % gelado para a lavagem dos precipitados. Os tubos permaneceram abertos por 15 minutos para secagem completa do precipitado. Foram adicionados 40 µL de água livre de nucleases para ressuspensão dos dsRNAs. Posteriormente, as amostras foram quantificadas utilizando o *NanoDrop 1000 Spectrophotometer* (Thermo-Scientific) e a integridade analisada em gel agarose 1 % não desnaturante.

4.5 Obtenção de esquistossômulos

Nesse projeto foram utilizados esquistossômulos obtidos pela transformação mecânica de cercárias do parasito da espécie *S. mansoni* da cepa LE gentilmente cedidas pelo Moluscário Lobato Paraense do Centro de Pesquisa René Rachou (CPqRR-FIOCRUZ/MG). O ciclo do parasito é mantido rotineiramente pelo moluscário do CPqRR-FIOCRUZ/MG, por passagens em *Biomphalaria glabrata*, seguido de camundongo ou hamsters e retornando a *B. glabrata*.

O volume de cercárias obtidas do moluscário foi distribuído em tubos de 50 mL e incubado por 60 minutos em gelo para que as cercárias perdessem a motilidade. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 1.000 rpm, por 3 minutos a 4 °C.

O sobrenadante foi descartado em água fervente e o precipitado ressuscitado em 2 mL de meio *Glasgow Minimum Essential Medium* (GMEM - Sigma-Aldrich) com 1 % de penicilina/estreptomicina (Gibco) utilizando pipetas Pasteur descartáveis. O conteúdo de cada três tubos foi transferido para um tubo de 15 mL e os tubos de 50 mL utilizados anteriormente foram lavados com mais 2 mL de meio e o conteúdo transferido para os tubos de 15 mL. O conteúdo foi passado 3-4 vezes por seringa com agulha 22G para a quebra das caudas das cercárias.

Os tubos foram incubados à temperatura ambiente por 7 minutos e o sobrenadante removido para que as caudas e as cercárias intactas fossem retiradas. O sedimento foi incubado em garrafas de cultura com 10 mL de meio GMEM e 1 % de penicilina/estreptomicina em estufa de CO₂ a 37 °C por 1 hora. Os parasitos foram transferidos para tubos de 15 mL, a garrafinha foi lavada com 3 mL de meio GMEM suplementado e deixados à temperatura ambiente para sedimentar, por 7 minutos.

Novamente, com uma pipeta Pasteur, o sobrenadante foi removido e as caudas retiradas. Este processo de lavagem foi repetido por 8 vezes, em ambiente estéril (capela de fluxo laminar), sendo que, na última lavagem, o sedimento foi ressuscitado em meio GMEM suplementado com 0,2 µM de triiodotironina (Sigma-Aldrich); 0,1 % de glicose; 0,1 % de lactoalbumina (Sigma-Aldrich); 20 mM de HEPES (Sigma-Aldrich); 0,5 % de MEM vitamina (Gibco); 5 % de meio Schneider (Gibco) previamente preparado; 0,5 µM de hipoxantina (Sigma-Aldrich), 1 µM de hidrocortisona (Sigma-Aldrich), 1 % de penicilina/estreptomicina (Gibco) e 2 % de soro fetal bovino inativado por calor (Gibco).

A eficiência da transformação foi verificada pela observação em microscópio invertido da ausência de caudas. Os esquistossômulos foram então contados e a quantidade de 500 mil parasitos foi estimada.

4.6 Exposição de esquistossômulos aos dsRNAs

Cerca de 500 mil esquistossômulos foram expostos aos dsRNAs em garrafas de cultura, contendo 10 mL de meio GMEM suplementado como descrito anteriormente. Os dsRNAs foram adicionados logo após a transformação, no primeiro dia de cultura, na concentração de 100 nM e as culturas foram mantidas em B.O.D. a 37 °C, 5 % de CO₂ e 95 % de umidade. O dsRNA-SmERK-1 foi utilizado em combinação com o dsRNA-SmERK-2, pois nosso grupo já havia relatado o silenciamento de SmERK-2 após a exposição ao dsRNA-SmERK-1, assim pretendíamos gerar parasitos com diminuição de expressão de ambas. O controle inespecífico continha parasitos expostos ao dsRNA-GFP na concentração de 100 nM. O controle não tratado continha apenas meio e parasitos (Controle A). Foram realizadas três réplicas biológicas, utilizando sempre a mesma preparação de dsRNAs.

Posteriormente, foi realizado um segundo experimento, também em três réplicas biológicas com parasitos expostos ao dsRNA-mCherry na concentração de 100 nM (controle inespecífico) e parasitos não tratados (Controle B).

4.7 Extração do RNA de esquistossômulos

A extração de RNA total foi realizada 2 dias após a exposição dos esquistossômulos aos dsRNAs, tempo em que foi observada a maior diminuição dos transcritos (ANDRADE *et al.*, 2014; AVELAR, 2013). Para extração do RNA, foi utilizado o método do *TRizol Reagent* (Invitrogen) associado ao *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN) segundo orientações do fabricante.

Os esquistossômulos foram transferidos para tubos de 1,5 mL e centrifugados a 1.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados ao precipitado 50 µL de *TRizol Reagent* (Fischer Scientific). Com auxílio de um pistilo e motor para pistilo, o precipitado foi macerado por 3 minutos. Foram acrescentados 950 µL de *TRizol* e as amostras foram então congeladas a -70 °C. No dia seguinte, 500 µL de clorofórmio foram acrescentados e as amostras agitadas em vortex por 15 segundos, ficando 3 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos a 4 °C e a fase aquosa transferida para um novo tubo. Foram adicionados 280 µL de etanol 70 %, homogeneizando com a

pipeta e o conteúdo transferido para colunas do *kit RNeasy Mini Kit* (QIAGEN), centrifugadas por 15 segundos a 10.000 rpm e o eluato descartado. Foram adicionados 700 µL de tampão *RW1* e as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 segundos. Em seguida, 500 µL de tampão *RPE* foram adicionados e as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 segundos. Mais 500 µL de tampão *RPE* foram adicionados e as amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 10.000 rpm. As colunas foram transferidas para novos tubos e o RNA eluído em 60 µL de água livre de RNase pré-aquecida a 37 °C, centrifugando por 1 minuto. O eluato foi colocado novamente na coluna para mais uma passagem. O RNA obtido foi imediatamente tratado com DNase.

4.8 Tratamento do RNA extraído com DNase

Para a remoção de possíveis contaminações de DNA genômico, as amostras de RNA foram tratadas com DNase – *Turbo DNase* (Ambion). Foram adicionados às amostras 0,1 volume do tampão *10X TURBO DNase* tampão e 2U da enzima *TURBO DNase*. As amostras foram incubadas a 37 °C por 30 minutos. Foram adicionados 0,1 volume do reagente de inativação da DNase e as amostras foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 1,5 minutos e o RNA transferido para um novo tubo. Os RNAs obtidos foram quantificados utilizando o *Qubit 2.0 Fluorometer* (Invitrogen), a integridade foi verificada pelo *Bioanalyzer* (Agilent Technologies) e então armazenadas a -70 °C para posterior utilização.

4.9 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA foi utilizado o *kit* para transcrição reversa *SuperScript III Rnase H* (Invitrogen) e o iniciador oligo (dT)₁₈ *reverse*, seguindo as orientações do fabricante. Assim, 400 ng de RNA foram misturados a 1 µL de oligo(dT) (500 µg/mL) e 1 µL de dNTPs (10 mM) para um volume final de 10 µL. As amostras foram incubadas a 65 °C por 5 minutos e colocadas imediatamente no gelo. Foram acrescentados 4 µL de tampão de síntese de primeira fita 5X (250 mM Tris-HCl, pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂), 2 µL de DTT (0,1 mM) e 1 µL de *RNase-OUT* (40 µg/mL). As amostras foram incubadas a 42 °C por 2 minutos e, em seguida, foram colocadas no gelo para o acréscimo de 1 µL de *SuperScript III* (200 U/mL). A reação

foi, então, incubada a 42 °C por 50 minutos e, em seguida, incubada a 70 °C por 15 minutos. Os cDNAs obtidos foram tratados com 1 µL de *RNase H*, incubando a 37 °C por 20 minutos, para remoção de RNA do híbrido cDNA:RNA. Os cDNAs foram então, armazenados a -20 °C para posterior utilização.

4.10 PCR quantitativa em tempo real

Para a confirmação do silenciamento foi realizada a PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) com os cDNAs sintetizados e oligonucleotídeos previamente desenhados e padronizados conforme os padrões descritos por Bustin e colaboradores (2009) (Quadro 2).

A reação de qPCR foi realizada em triplicata no aparelho *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems). Para cada amostra utilizou-se 12,5 µL de *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 0,5 µL de iniciadores senso e anti-senso (Quadro 2) (200 nM concentração final por reação) e 1 µL de cDNA (aproximadamente 100 ng/µL) em um volume final de 25 µL. Como normalizador foi utilizado o gene que codifica a proteína Citocromo Oxidase I (COXI) de *S. mansoni* (Smp_90000) e as reações foram realizadas em placas ópticas de 96 poços (Applied Biosystems).

Quadro 2 - Iniciadores específicos para proteínas quinases utilizados na PCR quantitativa em tempo real.

Iniciadores qPCR			
Alvo	Gene ID	Forward	Reverse
SmCaMK2	Smp_011660.2	ACGACTATGCTAGCCACACG	CAGACGATTCCCTTAATACCATCG
SmERK-1	Smp_142050	TGCAACATCTTGTTGAATGC	GCACGATACCAACGTGTAGC
SmERK-2	Smp_047900	TTATCCTTCGGCGGATGC	AGCAACAGGCTCATCACTAGG
SmJNK	Smp_172240	TCCTCCTGGGTATCATGTGCG	GCTACAACAAAGCCCTGAGC
Smp38	Smp_133020	GCCCACGATAACAAATTAACC	AAGGCATCAATCAAACAAACG
SmCOXI	Smp_900000	TACGGTTGGTGGTGTACACAG	ACGGCCATCACCATACTAGC

Os resultados foram normalizados e os níveis de expressão de cada gene em parasitos silenciados foi comparado com o nível de expressão dos transcritos do mesmo gene em parasitos tratados com dsRNA-GFP (controle inespecífico) ou com o controle não tratado. A expressão relativa foi analisada pelo método do $\Delta\Delta C_t$ onde os valores C_t de cada amostra foram subtraídos do C_t do normalizador (ΔC_t). Em seguida, os valores correspondentes ao ΔC_t encontrados para cada amostra foram subtraídos do ΔC_t normalizado ($\Delta\Delta C_t$) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Assim, os níveis

de expressão de cada gene nas amostras tratadas com dsRNAs específicos foram comparados com os níveis de expressão do gene nas amostras controle ou tratada com dsRNA-GFP.

4.11 Construção das bibliotecas para sequenciamento na plataforma Illumina.

Para verificar globalmente as alterações no transcriptoma dos esquistossômulos após a exposição aos dsRNAs, aproximadamente 2 µg dos RNAs totais extraídos anteriormente foram utilizados para a construção de bibliotecas do tipo *paired-end* indexadas com *barcodes* utilizando o kit *TruSeq stranded mRNA* (Illumina) de acordo com as orientações do fabricante. As bibliotecas foram então colocadas em quantidades equimolares em *flowcells*, clusterizadas utilizando o kit *HiSeq® Rapid PE Cluster Kit v2* (Illumina) e sequenciadas utilizando o kit *HiSeq® Rapid SBS Kit v2* (Illumina) em um sequenciador HiSeq 2500 (Illumina). Os dados foram pré-processados seguindo o *pipeline* padrão da Illumina para separar as *reads* de cada amostra.

Uma descrição geral da metodologia utilizada para obtenção das amostras biológicas está disposta na Figura 5.

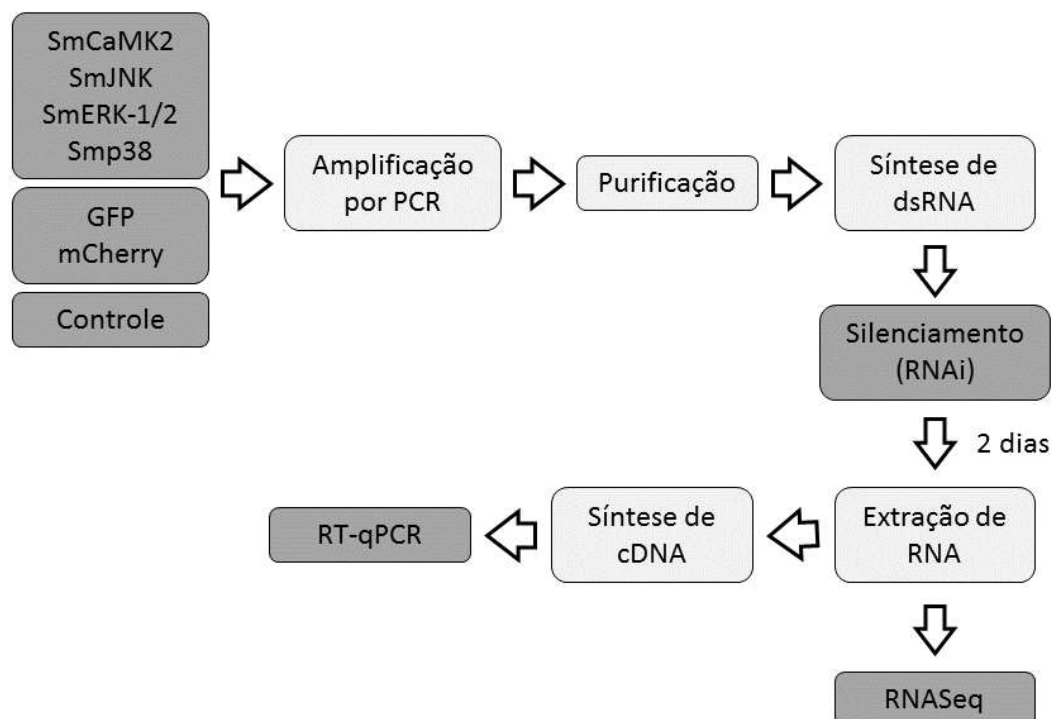


Figura 5 – Esquema representativo do fluxo de trabalho utilizado na obtenção das amostras biológicas. Foram selecionadas as proteínas quinases SmCaMK2, SmERK-1, SmERK-2, SmJNK e Smp38. Os alvos selecionados foram silenciados em culturas de

esquistossômulos por RNAi. Após dois dias de cultivo foi realizada a extração do RNA e síntese de cDNA e os níveis de transcritos dos genes silenciados foram avaliados por qPCR. O RNA extraído foi utilizado para construção de bibliotecas do tipo fragmento, para sequenciamento utilizando a plataforma HiSeq 2500 (Illumina).

4.12 Análise do RNASeq

4.12.1 Processamento dos dados e análise inicial das bibliotecas

Para análise inicial de qualidade das *reads* geradas, os arquivos FastQ de cada biblioteca foram submetidos ao programa FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). Todas as *reads* geradas estão depositadas no banco de dados *Sequence Read Archive* (SRA; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>), sob número de acesso: PRJNA354932.

4.12.2 Mapeamento e contagem dos transcritos

As *reads* foram então mapeadas na última versão disponível do genoma de referência de *S. mansoni* (versão 5.0) (PROTASIO *et al.*, 2012) utilizando o programa STAR (v. 2.5.0a) (DOBIN *et al.*, 2013), com os seguintes parâmetros: `--runMode alignReads --outSJfilterReads Unique --sjdbOverhang 99 --runThreadN 6 --genomeLoad NoSharedMemory --outFilterType BySJout --outFilterMultimapNmax 20 --outFilterMismatchNmax 999 --alignSJoverhangMin 8 --alignIntronMin 25 --outSAMattributes All --quantMode TranscriptomeSAM --sjdbGTFfeatureExon CDS`.

A contagem do número de *reads* alinhadas foi realizada com o sub-comando *multicov* do programa bedtools (versão 2.15.0), utilizando as anotações do genoma (versão *Smansoni_gff_21032013.gff*, de 21 de março de 2013) disponíveis no GeneDB (<ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/pathogens/Schistosoma/mansoni/genome/GFF/>).

4.12.3 Análise da expressão diferencial de genes

A busca por genes diferencialmente expressos (DEGs) foi realizada comparando amostras controle com as amostras em que as proteínas quinases selecionadas foram silenciadas, utilizando os programas DESeq2 (versão 1.12.4) e/ou edgeR (versão 3.14.0) implementados em R (versão 3.3.2) (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014; R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011; ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2009) (Anexo 6).

4.12.4 Anotação funcional dos genes diferencialmente expressos

Os bancos de dados do UniProt, Gene Ontology (GO) e KEGG foram utilizados para classificar as funções dos DEGs encontrados (ASHBURNER *et al.*, 2000; UNIPROT CONSORTIUM, 2009). O enriquecimento de termo GO atribuídos aos DEGs foi realizado utilizando o programa PANTHER (MI *et al.*, 2013; THOMAS *et al.*, 2003, 2006).

As sequências codificadas pelos DEGs foram utilizadas para buscas por similaridade no banco de dados do KEGG (KANEHISA *et al.*, 2004) usando o programa BLASTp (ALTSCHUL *et al.*, 1990) com cobertura de pelo menos 50 %. Os identificadores do KEGG *Orthology* (KOs) representam conjuntos de genes manualmente curados que codificam alguma função metabólica específica. Posteriormente, os KOs foram associados às vias metabólicas e regulatórias do parasito *S. mansoni* disponíveis no banco de dados KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>).

A ferramenta PANTHER (versão 12.0) (MI *et al.*, 2013; THOMAS *et al.*, 2003, 2006) foi utilizada para realizar a análise de enriquecimento de termos GO e de vias do KEGG. Foi utilizado o teste estatístico de superrepresentação (versão 20170413) com correção de Bonferroni.

4.13 Validação dos genes diferencialmente expressos por RT-qPCR

A expressão relativa de um subconjunto de DEGs entre o controle não tratado e esquistossômulos tratados com dsRNAs de SmJNK ou Smp38 foi avaliada por qPCR. Para a validação, foram selecionados os DEGs com expressão maior ou menor que 1 *log fold change*.

Os iniciadores foram desenhados como previamente descrito (Quadro 3). As reações de amplificação foram padronizadas para verificar a eficiência da amplificação e definição das concentrações. Como normalizador foi utilizado o gene que codifica a proteína Citocromo Oxidase I (COXI) de *S. mansoni* (Smp_900000) e as reações foram realizadas no aparelho *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems) em placas *96-Well Optical Reaction Plate* (Applied Biosystems). Os valores C_t (*Cycle threshold*) foram plotados em função da diluição do cDNA. A eficiência dos iniciadores

foi medida pela análise das inclinações das curvas (entre -3,5 e -3,1) combinada aos cálculos dos coeficientes R^2 (foram considerados valores maiores que 0,98) indicando reprodutibilidade entre as triplicatas.

Para a validação dos DEGs foi realizada a qPCR com cDNAs sintetizados a partir de RNA extraído de esquistossômulos em que as quinases SmJNK e Smp38 foram silenciadas em comparação com o controle não tratado. A expressão relativa dos DEGs selecionados foi analisada como descrito anteriormente.

Uma descrição geral das análises de bioinformática realizadas está disposta na Figura 6.

Quadro 3 - Iniciadores específicos para os DEGs utilizados na validação por PCR quantitativa em tempo real.

Iniciadores qPCR - DEGs regulados por SmJNK e Smp38		
DEG (Gene ID)	Forward	Reverse
Smp_029820	AGGCTTGACATCTGCTTGC	CCACAACCTGATTGCTGAAGG
Smp_171900	CTAAACCTGTTGTTGCACTTTCC	CTTGCGGATACGTTCCCTATGG
Smp_202770	CGGAATACCTGCATCTTGACG	CAGTCAACGTGTTTGTGTTGG
Smp_096750	CATTCTGCCTAAGTGTTTACG	CGCATTCTGAAGTCCAAAGG
Smp_153580	AGTGACTGATGAATCGACTAACTG	CTTATGGAAGACCAAGAAAGAAGC
Smp_118560	CACCTGTTTTTAAAATTTGTCCCTA	AAATGCTCCATGAATATCGGTTA
Iniciadores qPCR - DEGs regulados por SmJNK		
Smp_009580	CTGGTAAGCAGCTAGAAGATGG	GCTCAACTTCCAAAGTGATCG
Smp_043650	CACGATCTTCTGGGCATACA	TGCCGAAAGTACCGATGATA
Smp_052880	TGGATCATTTGACAGTTGTGC	TTTCCCACCATCATCATCAG
Smp_053390	GCGACGAATAGCAGGCTTAG	AAAGGTGGGAAAGGTCTTGG
Smp_058480	CTGGATGGCATGAATTTCTTC	GATGATGTTGACGACGACGA
Smp_126230	CAGTCTCAGGCTGACATGTTT	AACGGCGAACAAGAAAAGAA
Smp_161920	CACCAGAGTCCAACACAATACC	GCCAATCGTGAGAAGATGACC
Smp_200120	TCACCAAACATTCAAACACCA	GCGTAGTCGTGTTCCATTTTC
Smp_200280	TTCAGGTTGGTTGGTGTGG	CACACATCCTATGCTGTACTATCC
Smp_205010	CCAAATCCCAGTCTCCTGAA	TTTGACACCGACACAAGGAA
Iniciadores qPCR - DEGs regulados por Smp38		
Smp_081430	CGATGCAATAACAATCACACG	TGGTATGATGGCTACTAGTTATATGG
Smp_185680	CTTGAAATGTACCTTGCCATCC	AGAGAGAATGGGCTCAATGG
Smp_022560	CGATTATTCCAACAGCATGAGG	TCGGTTTATATGCGAGTGTATCG
Smp_041650	AACGTTTGGTTCCTCACC	TGACATAGAATTCGGTCACATCC
Smp_200840	CGCCTCCTTTACCATCACC	CCACTACCAACAACAACAAGC
Smp_175300	TGATTCATTTGGATCAATTAGGA	TTTGGAATGTATTTGTTTGTATTG
Smp_061980	GTCGTGAGCCTCTGTTCG	ACATCCCTATTGTCACTATTACTACC
Smp_180920	CCCTCTCCCTACCAAGTTT	GACTGACTGATTGAATAAGGGAATA

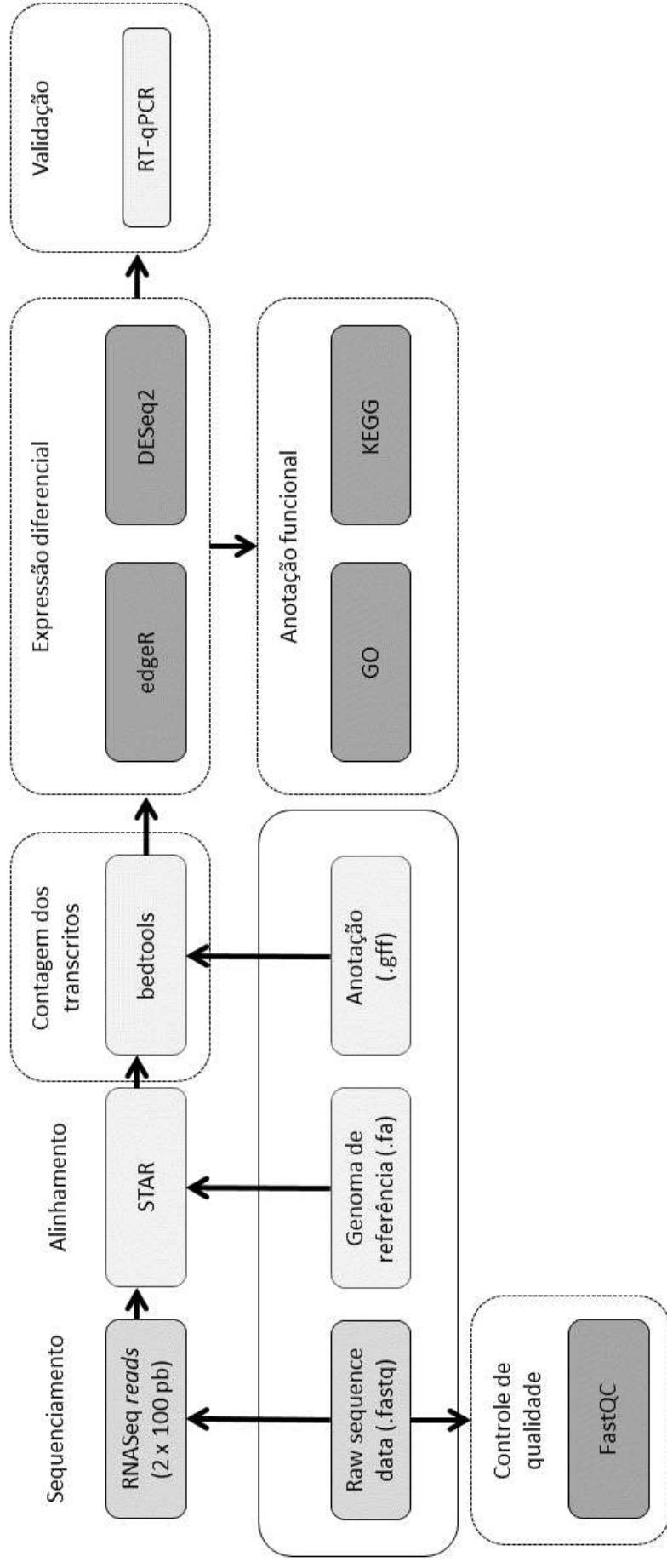


Figura 6 – Esquema representativo do pipeline desenvolvido para a análise do transcriptoma. Um controle de qualidade das reads geradas foi inicialmente realizado utilizando o programa FastQC. As reads foram então mapeadas ao genoma de referência utilizando o programa STAR. A contagem do número de reads mapeadas em genes foi realizada utilizando a função *multicov* do programa bedtools. A busca por DEGs foi realizada utilizando os pacotes edgeR e DESeq2 no software R. Os DEGs foram validados por qPCR e classificados em diferentes processos biológicos.

5 Resultados e discussão

Nesse trabalho buscou-se uma melhor caracterização das vias de sinalização do parasito *Schistosoma mansoni* nas quais proteínas pertencentes à família das *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPK) estão envolvidas visando identificar prováveis alvos regulados pela mesma em busca de maior conhecimento sobre a atuação dessa via na biologia do parasito e identificação de possíveis alvos terapêuticos contra a esquistossomose. Assim, foi realizado o silenciamento gênico por RNA de interferência dos alvos SmCaMK2 (Smp_011660.2), SmJNK (Smp_172240), SmERK-1 (Smp_142050), SmERK-2 (Smp_047900) e Smp38 (Smp_133020) em esquistossômulos e, após confirmação do silenciamento, obteve-se o material para posterior realização de sequenciamento massivo de RNA (RNASeq).

5.1 Amplificação das PKs alvo de silenciamento

Após a amplificação das PKs a partir de plasmídeos contendo fragmentos dos transcritos de SmCaMK2, SmERK-1, SmERK-2, SmJNK e Smp38, previamente clonados e sequenciados para confirmação, os produtos obtidos foram aplicados em gel de agarose 1 % não desnaturante. Todos os alvos foram amplificados eficientemente, apresentando o tamanho de fragmentos esperado e boa integridade (Figura 7).

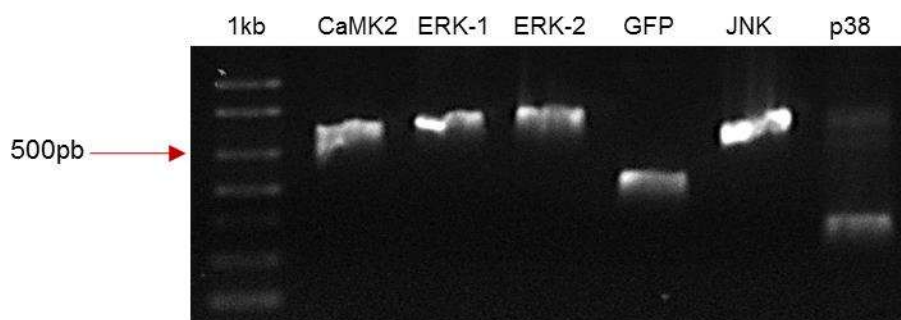


Figura 7 – Exemplo da amplificação dos fragmentos dos genes de PKs alvos de silenciamento. Exemplo do perfil eletroforético e integridade dos produtos de PCR amplificados. Gel de agarose não desnaturante 1 % corado com brometo de etídio. A primeira canaleta mostra o padrão de peso molecular 1kb (Promega). Na sequência: SmCaMK2 (504 pb), SmERK-1 (566 pb), SmERK-2 (538 pb), GFP (360 pb), SmJNK (570 pb), Smp38 (236 pb).

5.2 Síntese de dsRNA

Após a purificação da PCR foi feita a síntese de dsRNA para cada um dos alvos. Ao final, as amostras foram quantificadas e aplicadas em gel de agarose não desnaturante 1 % para a confirmação da síntese, pureza e da integridade. Foi possível sintetizar dsRNAs para todos os alvos incluídos neste trabalho. Pode ser observado que não há resquício de RNA de fita simples abaixo da banda de dsRNA, indicando que o anelamento ocorreu de forma efetiva. As bandas presentes no gel estão em conformidade com o tamanho esperado para cada dsRNA, demonstrando que foram sintetizados dsRNA específicos para cada alvo (Figura 8).

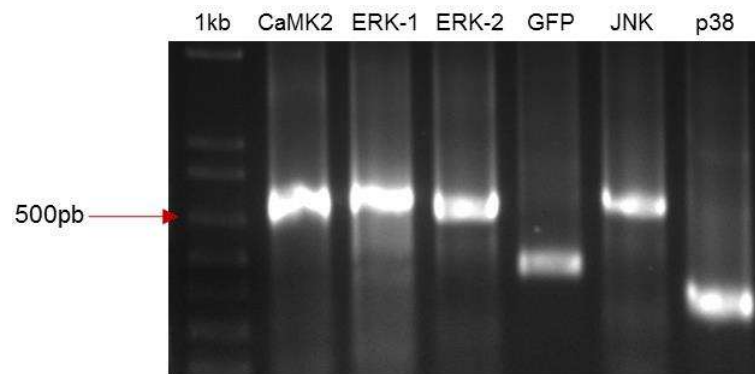


Figura 8 – Exemplo da síntese de dsRNAs das PKs alvo de silenciamento. Exemplo do perfil eletroforético e integridade dos dsRNA sintetizados. Gel de agarose não desnaturante 1% corado com o brometo de etídeo. A primeira canaleta mostra o padrão de peso molecular 1kb (*Promega*). A banda correspondente ao fragmento de 500pb (tamanho médio dos dsRNAs sintetizados) está destacada pela seta vermelha. Na sequência: SmCaMK2 (504 pb), SmERK-1 (566 pb), SmERK-2 (538 pb), GFP (360 pb), SmJNK (570 pb), Smp38 (236 pb).

5.3 Silenciamento e extração do RNA de esquistossômulos

Primeiramente, cercárias foram devidamente transformadas mecanicamente em esquistossômulos, método que já demonstrado alterar minimamente a assinatura de expressão gênica dos parasitos em relação a parasitos transformados por infecção natural pela pele (PROTASIO; DUNNE; BERRIMAN, 2013). Os esquistossômulos foram expostos à concentração de 100 nM de dsRNAs de SmCaMK2, SmJNK, SmERK-1/2 e Smp38, além do controle inespecífico (GFP) e de controle apenas com o meio de cultura (branco). Foram realizados três experimentos independentes (réplicas biológicas). As culturas foram observadas diariamente e, como previamente observado (ANDRADE *et al.*, 2014), não houve fenótipo observável durante o cultivo *in vitro*. Após 2 dias de cultura, dia previamente estabelecido como dia de maior

diminuição de transcritos dos genes em questão (ANDRADE et al., 2014; AVELAR, 2013), foi realizada a extração, purificação e dosagem do RNA dos parasitos silenciados. Os valores de pureza e quantificação obtidos encontram-se dentro do padrão ideal para a posterior construção de bibliotecas para sequenciamento por RNASeq (Tabela 1).

Tabela 1 – Quantificação do RNAs extraídos dos esquistossômulos expostos por 2 dias aos dsRNAs de proteínas quinases.

Tratamento	[RNA] (ng/ μ L)		
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
Controle A	380	252	262
GFP dsRNA	318	276	410
SmCaMK2-dsRNA	444	89,2	548
SmERK-dsRNA	442	282	290
SmJNK-dsRNA	386	284	514
Smp38-dsRNA	298	444	374
Controle B	210	220	205
mCherry-dsRNA	240	208	120

A integridade dos RNAs obtidos foi analisada em eletroforese capilar pelo *BioAnalyzer*. Todos os RNAs extraídos apresentaram pureza, boa integridade e quantificação suficiente para construir bibliotecas para a etapa de sequenciamento de nova geração (Figura 9).

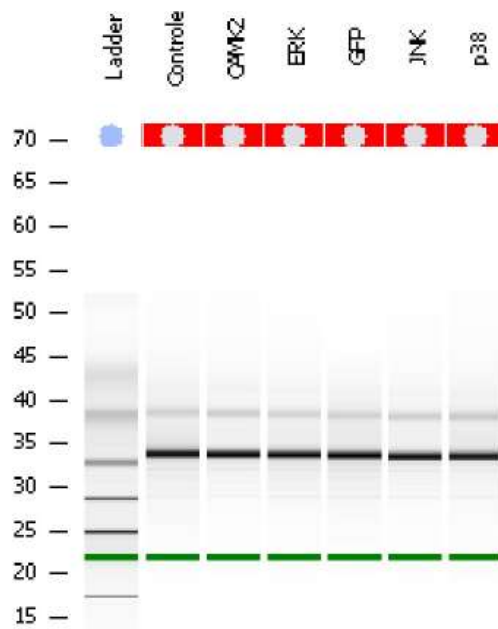


Figura 9 – Exemplo do perfil eletroforético dos RNAs extraídos de *Schistosoma mansoni*. Exemplo do perfil eletroforético digital após análise dos RNAs totais derivados de esquistossômulos controle e tratados com dsRNA-SmCaMK2, SmERK-1/2, GFP (controle inespecífico), SmJNK e Smp38 no Bioanalyzer.

5.4 Níveis de transcritos das MAPKs após tratamento com os dsRNAs

Para analisarmos se o tratamento com dsRNA havia sido efetivo, ou seja, se havia redução no nível de transcritos específicos dos genes estudados nos esquistossômulos, foram realizados ensaios de RT-qPCR para a quantificação dos níveis de mRNA de cada um dos tratamentos. A quantidade de RNA total nas diferentes amostras foi normalizada utilizando o gene COX.

No experimento de RT-qPCR cada amostra foi testada em triplicata e o $\Delta\Delta C_t$ calculado. Os níveis de cada transcrito foram expressos em relação aos níveis dos transcritos nos controles não tratados e inespecíficos, tratados com dsRNA GFP. De forma geral, houve uma grande variação nos níveis de transcritos detectados entre as réplicas biológicas (Figura 10), fato previamente descrito após o silenciamento gênico em larga escala para esporocistos e esquistossômulos de *S. mansoni* (ANDRADE *et al.*, 2014; MOURÃO *et al.*, 2009). Ainda, variações em experimentos de silenciamento gênico utilizando a técnica de RNA de interferência, já foram amplamente descritos na literatura, especialmente em experimentos envolvendo helmintos parasitos (GELDHOF *et al.*, 2007; MOURÃO *et al.*, 2009).

Na primeira e segunda réplicas, com exceção de ERK-2, todas as PKs apresentaram redução do nível de transcritos, esse fato difere de resultados obtidos anteriormente em nosso grupo (ANDRADE *et al.*, 2014), em que o silenciamento de 50% de ERK-2 foi observado em vários experimentos. Na primeira réplica, a média de silenciamento de aproximadamente 75 %, e a maior redução foi observada para JNK (78,2 %) e não foi observada redução de ERK-2. Na segunda réplica, a média de silenciamento de aproximadamente 63 %. A maior redução foi observada para JNK (82,5 %) e novamente não foi observada redução dos níveis de transcritos de ERK-2. Na terceira réplica, todas as PKs apresentaram redução do nível de transcritos, sendo a média de silenciamento de aproximadamente 63%. A maior redução foi observada para ERK-1 (81,3 %) e a menor redução para CaMK2 (53,5 %). Ao contrário das duas primeiras réplicas, nesse experimento ERK-2 foi silenciado, sendo a porcentagem de redução dos níveis de transcritos para esse gene de 53,8 %. As variações observadas podem ser atribuídas à mudança de escala nos experimentos. No trabalho de Andrade (2014), a exposição dos parasitos aos dsRNAs foi executada em placas de 12 poços com uma menor densidade de parasitos, enquanto neste trabalho, devido à

necessidade de maior quantidade de material biológico, os experimentos foram realizados em larga escala em garrafas de cultura de 10 mL de meio e maior densidade de parasitos.

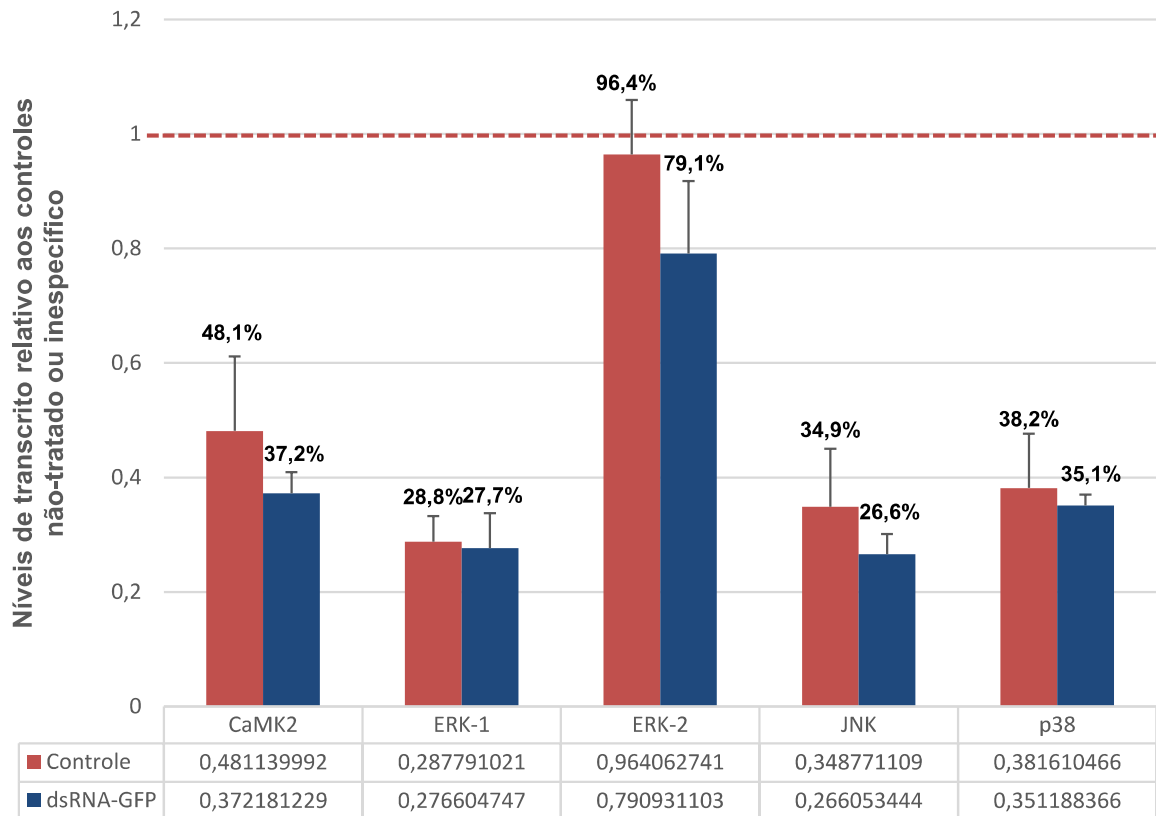


Figura 10 - Média dos níveis de transcritos dos genes alvo em relação aos controles, não tratado e inespecífico (dsRNA GFP), após tratamento com dsRNA durante 2 dias. Gráfico mostrando a média dos níveis dos transcritos dos genes alvo silenciados nas três réplicas biológicas. Os níveis dos transcritos foram comparados com aqueles dos parasitos não tratados ou tratados com dsRNA GFP (controle inespecífico). A linha pontilhada representa o nível normalizado dos transcritos nos grupos controle. A porcentagem média de inibição para cada gene está descrita acima das barras. As barras verticais representam o erro-padrão.

5.5 Dados de sequenciamento

Foram sequenciadas na plataforma Illumina HiSeq 2500 três réplicas biológicas de cada uma das oito condições experimentais (Controle A, GFP-dsRNA, SmCaMK2-dsRNA, SmERK-dsRNA, JNK dsRNA e Smp38-dsRNA, Controle B e mCherry-dsRNA). Foram geradas 24 bibliotecas do tipo *paired-end* rendendo um total de 287 Gb de dados com mais de 5,7 Gb de dados por amostra. As *reads* tem em média 100 pb de comprimento e conteúdo de GC variando de 38 a 40 % (Tabela 2).

Tabela 2 – Dados gerados na plataforma Illumina HiSeq 2500.

Amostra	Réplica	Flowchip	Barcode	Tamanho dos arquivos	Nº de reads	%GC
Controle A	1	1	12	11,9 G	46650550	40
	2	1	7	8,7 G	36448982	39
	3	1	6	14,9 G	58555610	40
GFP-dsRNA	1	2	2	22 G	92306838	39
	2	1	5	18 G	72501192	39
	3	1	14	11,6 G	45446734	39
SmCaMK2-dsRNA	1	1	4	13 G	50988268	40
	2	1	2	7,5 G	31351759	39
	3	1	5	12,5 G	49191850	40
SmERK-dsRNA	1	1	13	12,8 G	50131778	40
	2	1	19	6,2 G	25989918	38
	3	2	15	13 G	52994531	39
SmJNK-dsRNA	1	2	7	7,0 G	29013869	38
	2	1	6	19 G	78030949	39
	3	2	16	5,7 G	23856371	38
Smp38-dsRNA	1	1	19	9 G	35140673	39
	2	1	15	18 G	72310827	39
	3	2	18	21 G	85264772	39
Controle B	1	2	2	9 G	35273759	39
	2	2	16	9 G	34941297	38
	3	2	13	9,6 G	37784648	39
mCherry-dsRNA	1	2	4	9,7 G	38277481	39
	2	2	7	9,1 G	35788115	39
	3	2	14	8,9 G	34816966	40
Total				287,1 G	1153057737	

A análise criteriosa dos dados mostrou que a porcentagem de GC identificada neste trabalho é um pouco maior do que o descrito para *S. mansoni*, que apresenta conteúdo de GC de 35.3 % em seu genoma e 36.3 % em regiões codificantes (BERRIMAN *et al.*, 2009). A porcentagem de GC no genoma varia entre espécies e entre as diferentes regiões de cada genoma. Minoche e colaboradores (2011) já relataram um conteúdo de GC mais alto que o esperado em *reads* provenientes do sequenciador HiSeq (MINOCHE; DOHM; HIMMELBAUER, 2011). Outros autores também já mostraram um efeito de conteúdo de GC específico por amostra e propuseram uma normalização por conteúdo de GC para remover tal viés (HANSEN; IRIZARRY; WU, 2012; PICKRELL *et al.*, 2010). Neste trabalho, optamos por realizar apenas a etapa de normalização dos pacotes edgeR e DESeq2.

A Figura 11 mostra um exemplo dos valores de qualidade das bases em cada posição nos arquivos FastQ da biblioteca Controle A da réplica 1, gerados após o sequenciamento das bibliotecas. Em geral, um score de qualidade é considerado aceitável quando é superior ao valor 20 na escala *Phred*, o que indica a probabilidade de ocorrência de 1 erro a cada 100 pb. Para as bibliotecas sequenciadas na plataforma Illumina HiSeq 2500, a média da qualidade por base foi em torno de 38 na escala *Phred*.

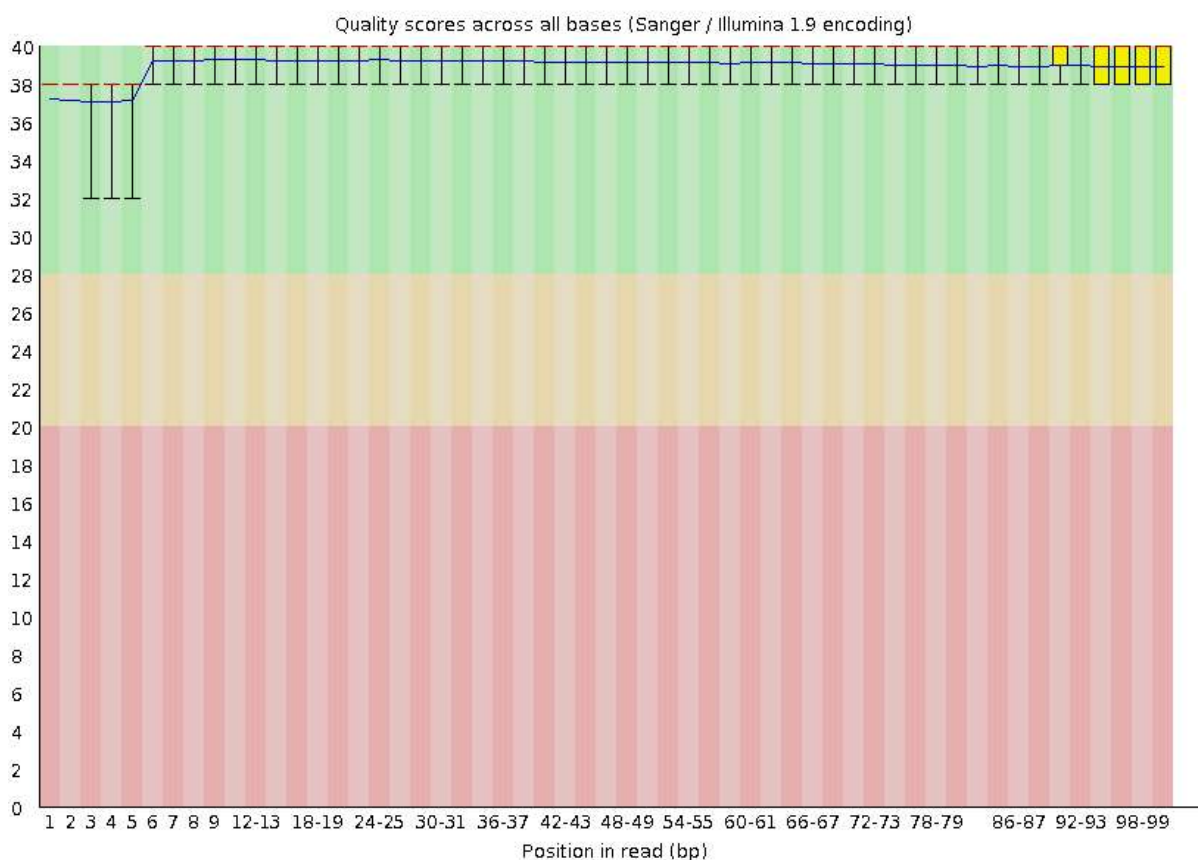


Figura 11 – Exemplo de gráfico dos valores de qualidade por base. A linha vermelha central corresponde ao valor da mediana; as caixas amarelas representam o intervalo interquartil (25-75 %); as barras superior e inferior representam os 10 % e 90 % dos pontos; a linha azul representa a qualidade média das bases na biblioteca Controle A da réplica 1.

Quanto ao valor de qualidade média por sequência, esta análise permite verificar se um subconjunto das sequências tem valores de qualidade muito baixos, levando-se em consideração a média de qualidade por base de cada sequência. Caso seja essa a realidade, ao invés de realizar uma corte das sequências, o melhor a fazer seria descartar as sequências de qualidade baixa. Na Figura 12, é possível observar

uma distribuição unimodal do valor de qualidade para a biblioteca Controle A da réplica 1, e o mesmo foi verificado para todas as bibliotecas.

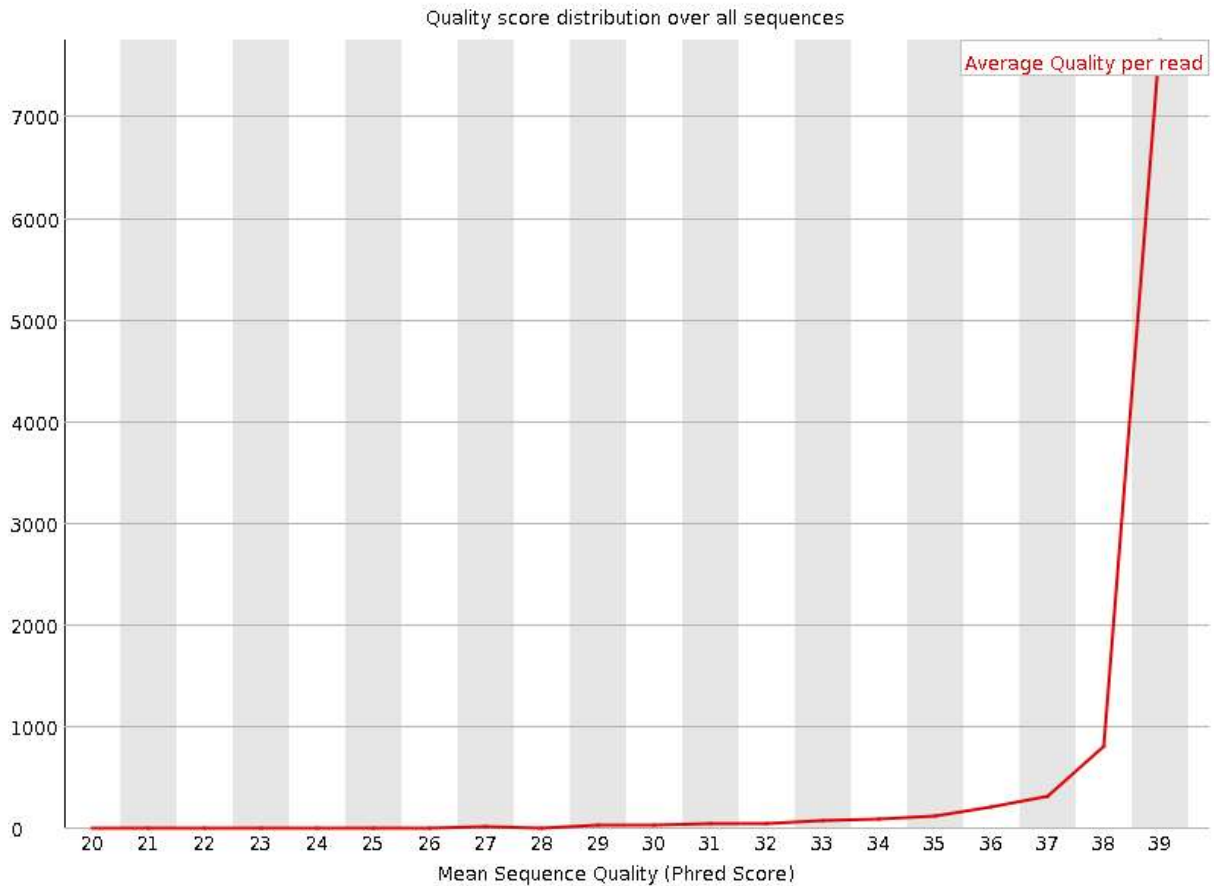


Figura 12 – Exemplo de gráfico dos valores de qualidade média por sequência. A figura mostra a média de qualidade nas sequências da biblioteca Controle A da réplica 1.

Com relação ao conteúdo de bases nas sequências, em uma biblioteca aleatória seria esperado pouca ou nenhuma diferença na proporção (conteúdo) de bases por posição na sequência, de modo que as linhas no gráfico a seguir (Figura 13) devem ficar paralelas ao eixo das abscissas. É possível observar um pequeno grau de oscilação para cada uma das bases em todas as bibliotecas, mas nada que indique um grande viés para uma posição em específico das leituras. Além disso, as sequências analisadas apresentam um conteúdo de A e T maior do que G e C, o que é esperado considerando que a medida do conteúdo de bases costuma ser espécie-específico, e em *S. mansoni* o conteúdo GC é de 36 % (BERRIMAN *et al.*, 2009).

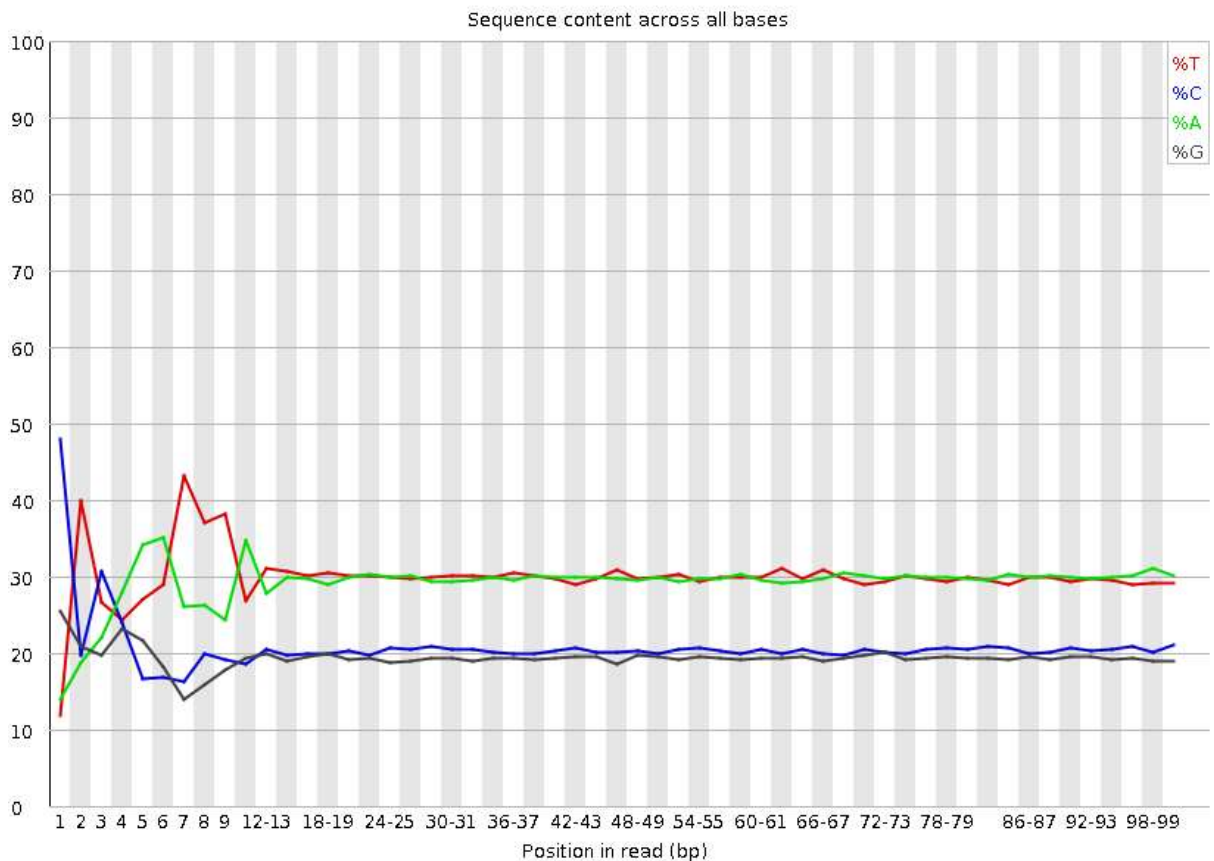


Figura 13 – Exemplo de gráfico do conteúdo de bases ao longo da sequência. A figura mostra a proporção de cada base por posição nas sequências da biblioteca Controle A da réplica 1.

O modelo de distribuição do conteúdo GC por sequência é uma curva normal onde o valor central correspondente ao teor global médio de GC do genoma. Observou-se que o conteúdo de GC por sequência é comparado à distribuição normal modelada a partir do conteúdo de GC do genoma para todas as bibliotecas geradas (Figura 14).

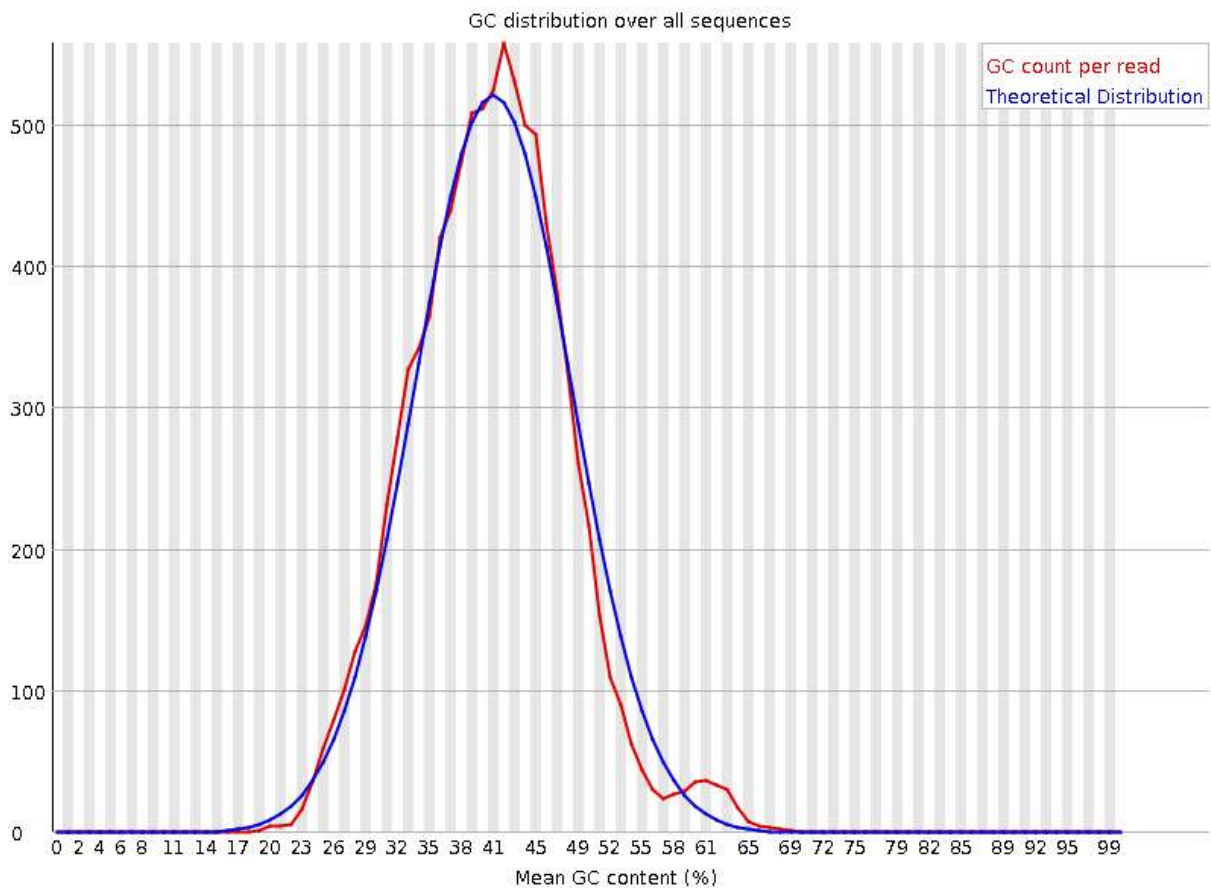


Figura 14 – Exemplo de gráfico do conteúdo GC por sequência. O gráfico representa a média do conteúdo de GC por *read* da biblioteca Controle A da réplica 1 comparado com uma distribuição normal modelada a partir do conteúdo de GC do genoma.

A análise de sequências duplicadas é feita com um pequeno subconjunto dos dados representativo do conjunto de todos os dados gerados. Espera-se que nesse subconjunto apenas uma pequena porção das sequências apresente sequências duplicadas (redundantes). O aumento do valor observado na porção final do gráfico seguinte (Figura 15) nos permite inferir o grau de redundância, como exemplo da biblioteca Controle A da réplica 1.

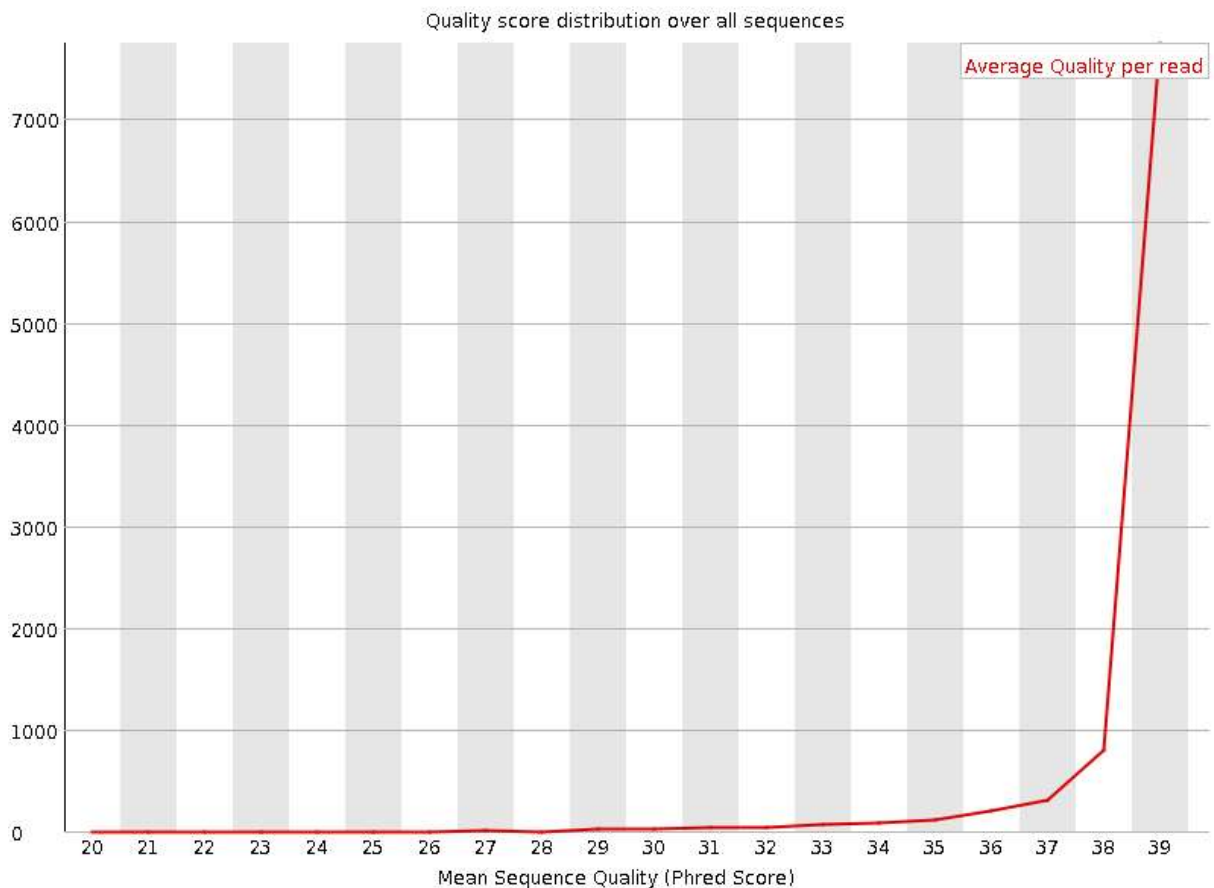


Figura 15 – Exemplo de gráfico de número de sequências duplicadas. O gráfico reporta o grau de duplicação (redundância) em um pequeno subconjunto de dados, mostrando o número relativo de sequências com diferentes graus de duplicação na biblioteca Controle A da réplica 1.

Como as sequências geradas neste trabalho apresentaram excelente qualidade, decidiu-se por não realizar a trimagem nem filtrar por sequências de baixa qualidade. O passo seguinte consistiu do alinhamento das sequências ao genoma de referência de *S. mansoni*.

5.6 Mapeamento das *reads* no genoma de referência

As *reads* de cada uma das bibliotecas foram mapeadas no genoma de referência de *S. mansoni* (versão 5.0). Atualmente, existe um grande número de programas que realizam o alinhamento de *reads* a um genoma de referência. O programa STAR (do inglês, *Spliced Transcripts Alignment to a Reference*), utilizado neste trabalho, foi criado para alinhar os dados de RNASeq do projeto ENCODE. O programa é baseado em um algoritmo de alinhamento que utiliza busca sequencial máxima de *seeds* mapeáveis em matrizes de sufixo descompactadas, seguido por procedimentos de

agrupamento e junção das *seeds*. É uma ferramenta ultrarrápida, capaz de detectar junções canônicas, não-canônicas e quiméricas em sequências (DOBIN *et al.*, 2013).

Primeiramente, o genoma de referência foi indexado utilizando o programa o programa STAR (v. 2.5.0a) (DOBIN *et al.*, 2013) e então utilizado para o mapeamento das *reads* também pelo programa STAR. O mapeamento das *reads* resultou em uma média de 88,4 % de mapeamentos únicos e 6,4 % de alinhamentos múltiplos, o que demonstra uma boa taxa de alinhamento (Tabela 3).

O programa STAR, juntamente com os programas GSNAP, GSTRUCT e MapSplice, supera outros métodos com relação à precisão de alinhamento das bases em dados simulados, sendo que apresentam de 96,3 a 98,4 % das *reads* mapeadas nos locais corretos e apenas de 0,9 a 2,9 % de *reads* mapeadas em posições alternativas (ENGSTRÖM *et al.*, 2013; GRANT *et al.*, 2011). Já foi demonstrado também que o programa STAR é cerca de 180 vezes mais rápido do que os programas GSNAP e MapSplice (DOBIN *et al.*, 2013). Além disso, após comparação de diversos alinhadores para verificar seu impacto na estimativa da expressão gênica, Yang e colaboradores (2015) sugerem a utilização dos alinhadores STAR, PASSION e GSNAP_spliced que superam outros alinhadores pois produzem porcentagens de *reads* alinhadas e de *reads* alinhadas com zero *mismatch* superiores (YANG *et al.*, 2015).

Posteriormente, a contagem do número de *reads* alinhadas a cada região codificante (CDS) foi realizada com o sub-comando *multicov* do programa bedtools, utilizando as anotações do genoma disponíveis no GeneDB. Esta tabela de contagens foi então utilizada como entrada nas análises posteriores utilizando o software R.

Tabela 3 – Dados gerados após alinhamento pelo programa STAR.

Amostra	Réplica	Nº de reads dos arquivos R1 e R2	Número de reads com mapeamentos únicos	% reads com mapeamentos únicos	Tamanho médio do alinhamento	Número de reads com mapeamentos múltiplos	% reads com mapeamentos múltiplos
Controle A	1	46650550	42272737	90.62%	197.50	2944089	6.31%
	2	36448982	31191699	85.58%	198.79	2363311	6.48%
	3	58555610	44470698	90.40%	197.52	3049483	6.20%
GFP-dsRNA	1	92306838	80413999	87.12%	198.78	6039370	6.54%
	2	72501192	62464039	86.16%	198.79	4444986	6.13%
	3	45446734	41286470	90.85%	197.54	2791421	6.14%
SmCaMK2-dsRNA	1	50988268	46399671	91.00%	197.64	3106232	6.09%
	2	31351759	26157933	83.43%	198.91	2460995	7.85%
	3	49191850	44470698	90.40%	197.52	3049483	6.20%
SmERK-dsRNA	1	50131778	45646588	91.05%	197.40	3066385	6.12%
	2	25989918	22321509	85.89%	198.89	1544321	5.94%
	3	52994531	45793872	86.41%	198.56	3498139	6.60%
SmJNK-dsRNA	1	29013869	25468357	87.78%	198.59	1606336	5.54%
	2	78030949	67302780	86.25%	198.86	4828330	6.19%
	3	23856371	21426959	89.82%	199.01	1333412	5.59%
Smp38-dsRNA	1	35140673	32022985	91.13%	197.99	1949968	5.55%
	2	72310827	62351731	86.23%	198.78	4564240	6.31%
	3	85264772	75741630	88.83%	198.88	4921795	5.77%
Controle B	1	35273759	31562001	89.48%	197.34	2287255	6.48%
	2	34941297	30805208	88.16%	197.22	2304576	6.60%
	3	37784648	33779527	89.40%	197.51	2543765	6.73%
mCherry-dsRNA	1	38277481	34284392	89.57%	197.26	2560795	6.69%
	2	35788115	31890001	89.11%	197.00	2470702	6.90%
	3	34816966	30198839	86.74%	197.29	3129462	8.99%

5.7 Avaliação geral das bibliotecas geradas

Como os experimentos foram realizados de forma independente, primeiramente foram analisadas as bibliotecas Controle A, GFP-dsRNA, CaMK2 dsRNA, ERK dsRNA, JNK dsRNA e p38 dsRNA (Figura 16 e Figura 17). As bibliotecas Controle B e mCherry-dsRNA, foram analisadas posteriormente (Item 5.8). Para investigar a relação entre as amostras, uma clusterização hierárquica foi realizada utilizando a função *heatmap* do pacote DESeq2. O *heatmap* foi calculado por uma matriz de distâncias euclidianas a partir das contagens de leitura mapeadas para todos os genes (Figura 16). Adicionalmente, uma Análise de Componentes Principais (PCA) também foi realizada por escalonamento multidimensional da matriz de dados (Figura 17).

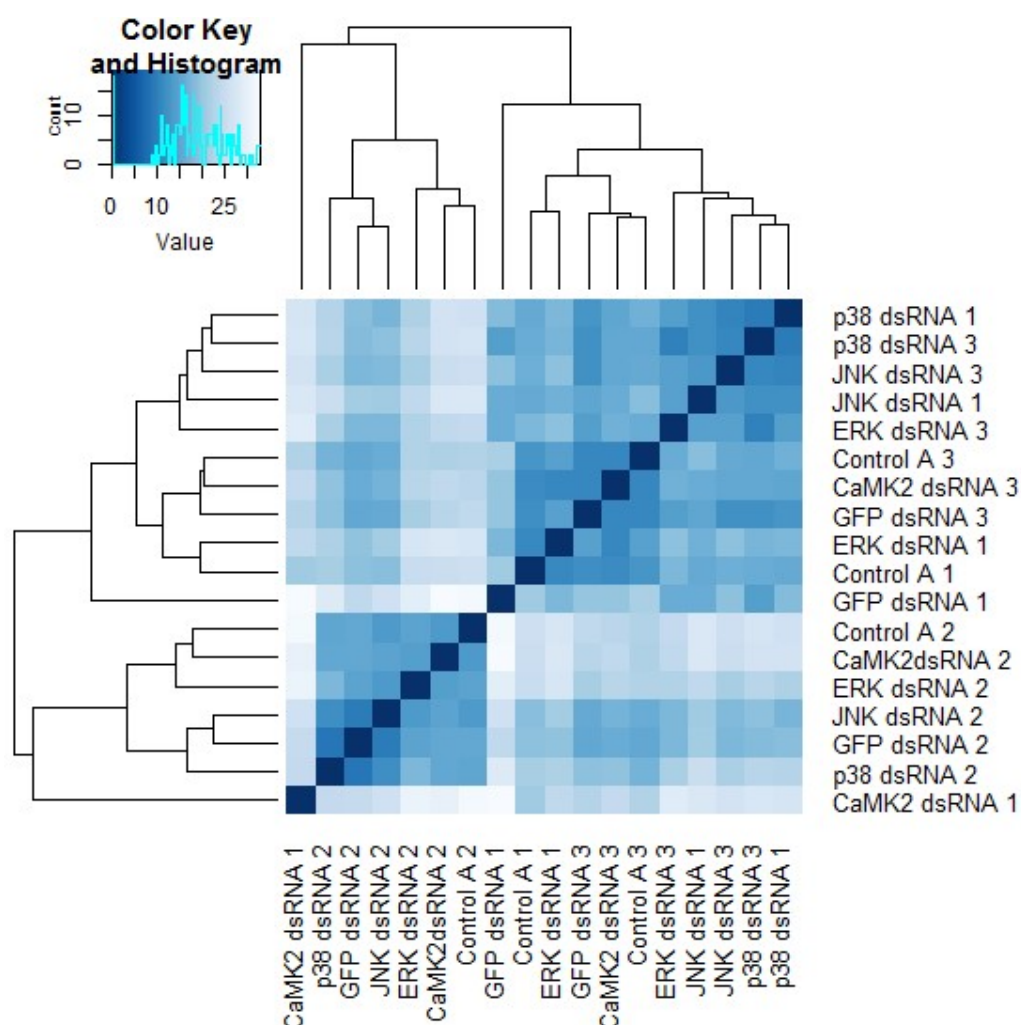


Figura 16 – Relação entre as bibliotecas de RNASeq de *S. mansoni* geradas. *Heatmap* mostrando as distâncias euclidianas entre as bibliotecas geradas: Controle A, GFP-dsRNA, SmCaMK2-dsRNA, SmERK-dsRNA, SmJNK-dsRNA e Smp38-dsRNA, cada uma com três réplicas biológicas.

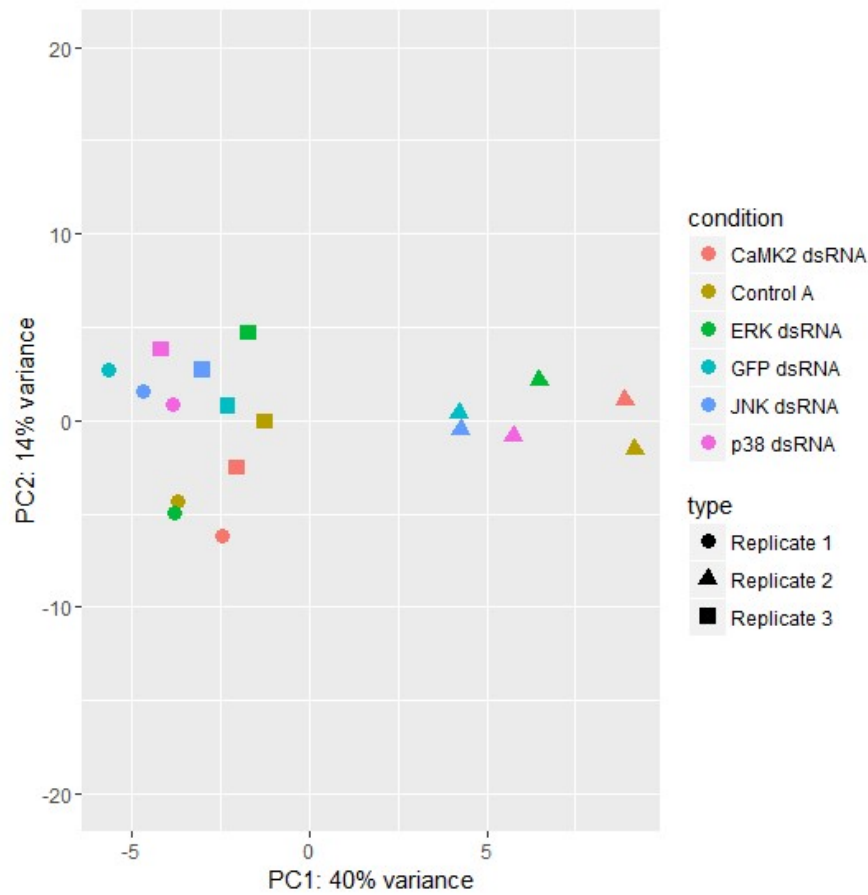


Figura 17 – Agrupamento das bibliotecas de RNASeq geradas. Gráfico dos dois primeiros componentes principais (PCA) para todas as amostras de *S. mansoni* geradas, cada uma com três réplicas biológicas. A legenda mostra as cores para cada um dos tratamentos: Controle A (mostrada), GFP-dsRNA (azul claro), SmCaMK2-dsRNA (laranja), SmERK-dsRNA (verde), SmJNK-dsRNA (azul escuro) e Smp38-dsRNA (rosa), e os formatos que representam cada uma das três réplicas biológicas: réplica 1 (círculo), réplica 2 (triângulo) e réplica 3 (quadrado).

Como observado nas análises de agrupamento nos *heatmaps*, as amostras da réplica 2 se agrupam separadamente indicando uma maior variabilidade para esta réplica. O gráfico PCA dos dois primeiros componentes mostra uma separação clara das amostras da réplica 2 através da 1ª dimensão, mesmo que esta réplica tenha apresentado níveis de diminuição na expressão dos transcritos dos genes alvo muito similar aos da primeira réplica, demonstrando que o fator que levou a alteração na expressão gênica global da réplica 2 não está relacionado ao silenciamento. As amostras da réplica 2 foram descartadas das análises posteriores envolvendo o silenciamento de esquistossômulos para as quinases SmCaMK2, SmERK, SmJNK e Smp38. Diferenças no número de esquistossômulos por garrafa de cultura, acidificação acentuada do meio de cultura ou problemas durante a extração do RNA

ou construção das bibliotecas de RNASeq estão entre os possíveis problemas que justificariam as diferenças observadas para esta réplica biológica.

As análises das distâncias euclidianas entre as amostras das réplicas 1 e 3 foram então visualizadas por um *heatmap* (Figura 18) e clusterização por PCA (Figura 19), a fim de verificar o grau de correlação entre as bibliotecas dessas réplicas. Assim como observado para os controles inespecíficos, as bibliotecas SmCaMK2 e SmERK apresentaram uma baixa correlação entre as amostras do mesmo tratamento, e maior correlação entre os diferentes tratamentos de uma mesma réplica biológica. Já para as bibliotecas de SmJNK e Smp38, foi verificado pelos *heatmaps* que as amostras agrupavam de acordo com a condição de tratamento. Além disso, os gráficos de PCA dos dois primeiros componentes mostraram uma separação clara das amostras controle em relação às tratadas com dsRNA-SmJNK ou Smp38 através da 1ª dimensão.

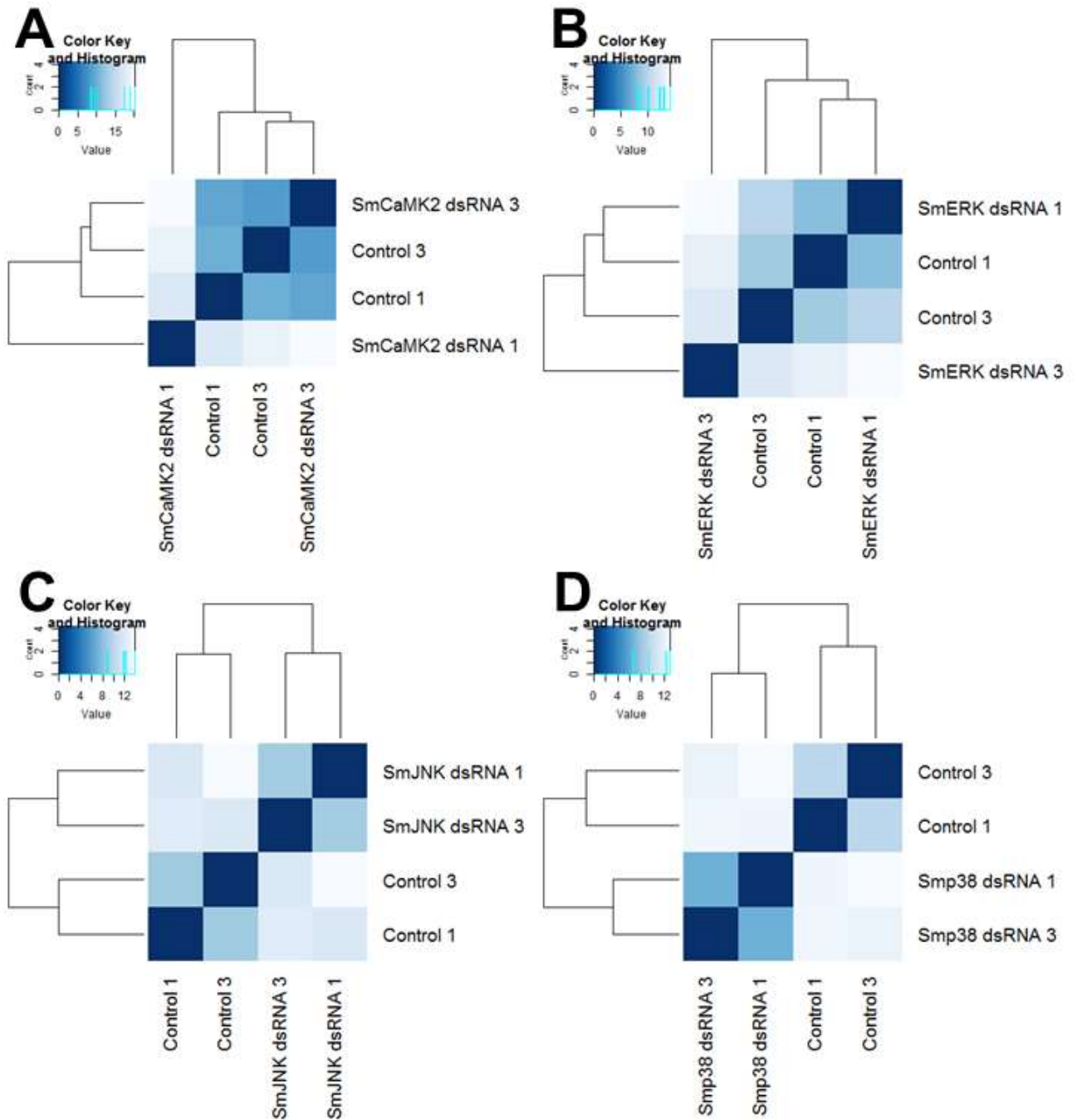


Figura 18 – *Heatmap* das amostras biológicas de *S. mansoni* tratadas com dsRNA e controle A não tratado. *Heatmap* mostrando as distâncias euclidianas entre as amostras de RNaseq de *S. mansoni* tratado com dsRNA-SmCaMK2 (A), SmERK (B), SmJNK (C) ou Smp38 (D) em relação ao controle A não tratado.

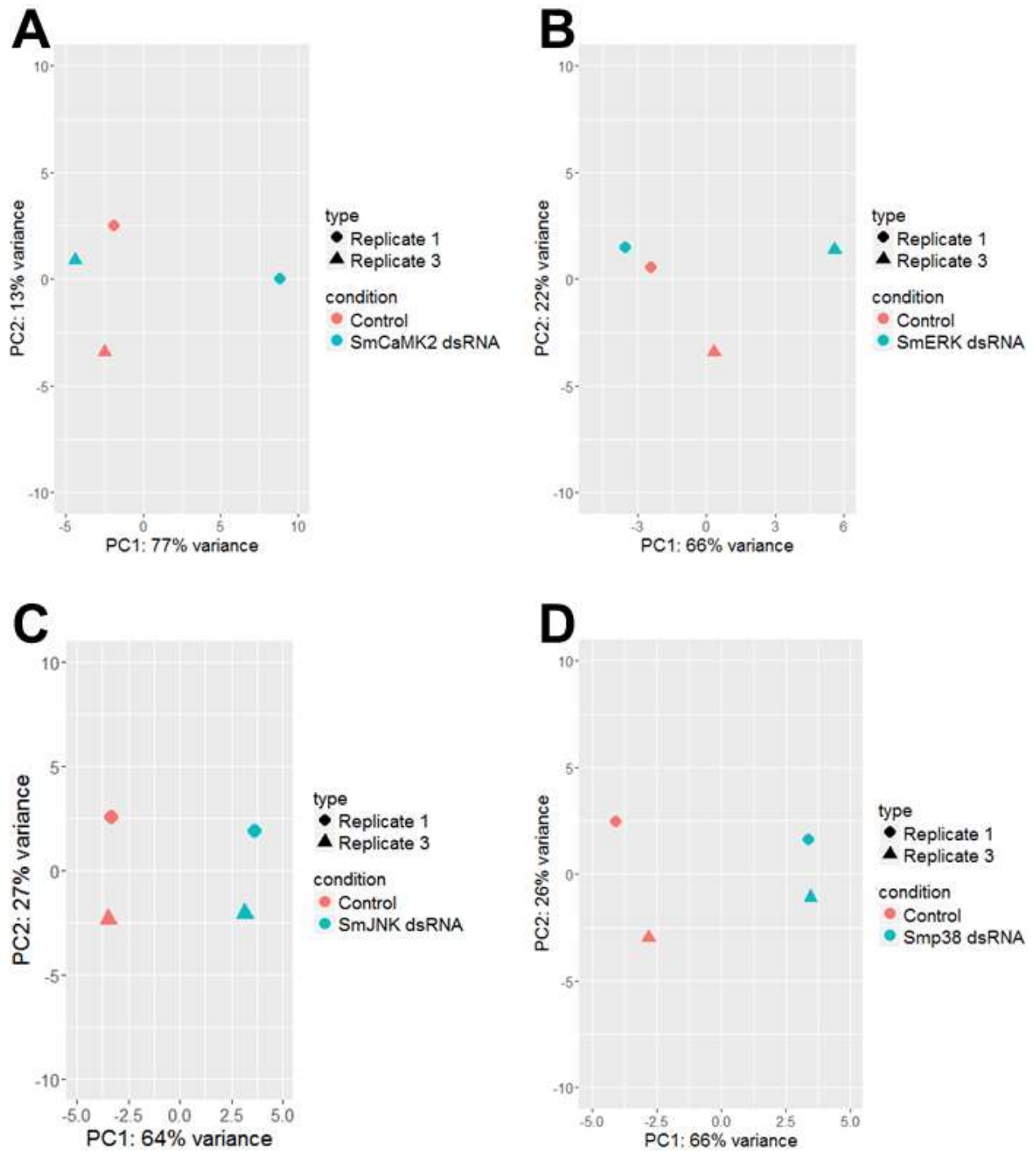


Figura 19 – Análise de Componentes Principais das amostras biológicas de *S. mansoni* tratadas com dsRNA e controle A não tratado. Gráfico dos dois primeiros componentes principais (PCA) dos padrões de expressão do transcriptoma de *S. mansoni* tratado com dsRNA-SmCaMK2 (A), SmERK (B), SmJNK (C) ou Smp38 (D) em comparação ao controle A não tratado. A legenda mostra as cores para cada um dos tratamentos: Controle (laranja) e tratado com dsRNA (azul), e os formatos que representam cada uma das duas réplicas biológica: réplica 1 (círculo), réplica 3 (triângulo).

5.8 Análise da expressão diferencial de genes nos controles inespecíficos

Uma das principais preocupações dos estudos envolvendo a análise funcional de genes por RNAi é a ocorrência de alterações na expressão de genes não relacionados ou homólogos ao alvo específico, fenômeno conhecido como *off-target*. O efeito de *off-target* tem sido uma preocupação em experimentos de RNAi em *Schistosoma* e outros helmintos, assim como as questões relacionadas à reprodutibilidade dos diferentes métodos utilizados para a entrada do dsRNA (GELDHOF *et al.*, 2007; MOURÃO *et al.*, 2009; STEFANIĆ *et al.*, 2010). Além disso, já foi descrito que o dsRNA por si só pode ter efeito sobre os parasitos, o que ressalta a necessidade de controles adequados. Para alguns genes, os níveis de expressão dos transcritos do gene alvo no controle tratado com dsRNA inespecífico diverge dos níveis no controle não tratado. Com base nas questões acima mencionadas e levando em conta as discrepâncias observadas em nossa experiência trabalhando há anos com a análise funcional de diversos genes de *S. mansoni* utilizando RNAi, decidimos investigar globalmente os efeitos de dois dos controles de dsRNA inespecíficos mais utilizados: GFP e mCherry. Utilizamos os dados de RNASeq para verificar globalmente possíveis genes afetados pela exposição dos esquistossômulos aos dsRNA inespecíficos (GFP ou mCherry) na concentração de 100 nM, em comparação a esquistossômulos não tratados.

Primeiramente, as distâncias entre amostras foram visualizadas por um *heatmap* e PCA (Figura 20 e Figura 21). Foi verificado que réplicas biológicas são mais prováveis de agrupar entre si do que as condições de tratamento (não tratado ou tratado com dsRNA inespecífico).

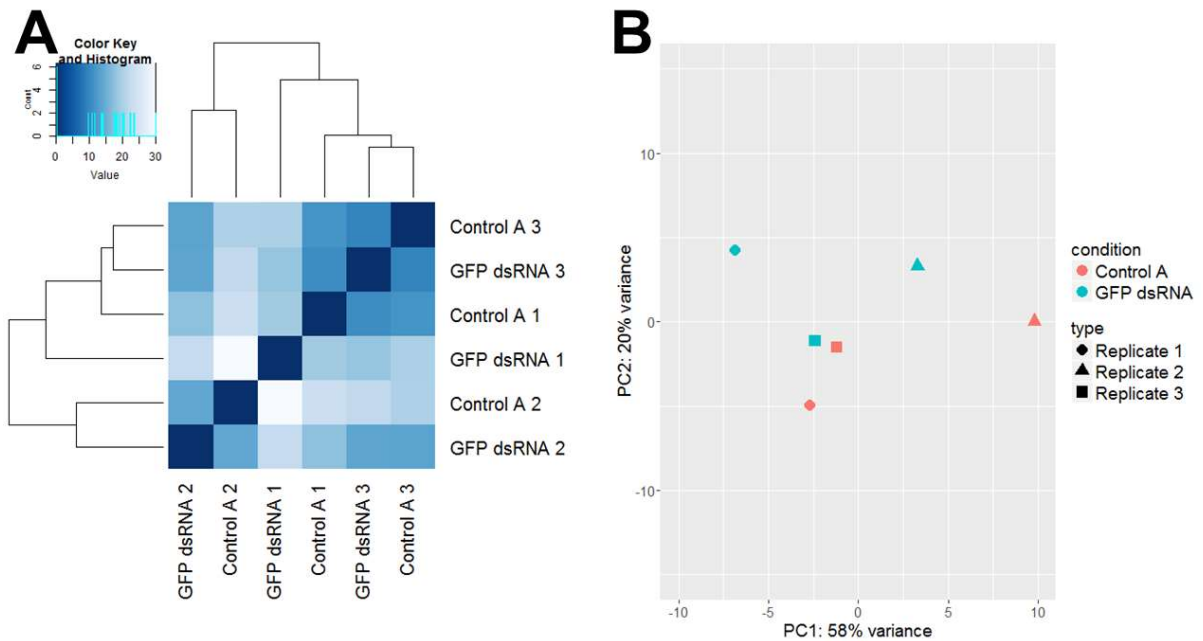


Figura 20 – Análise das amostras biológicas de *S. mansoni* tratadas com dsRNA-GFP e controle não tratado. (A) Heatmap mostrando as distâncias euclidianas entre as amostras de RNASEq de *S. mansoni* tratado com dsRNA-GFP (controle inespecífico) e o controle não tratado. (B) Gráfico dos dois primeiros componentes principais (PCA) dos padrões de expressão do transcriptoma de *S. mansoni* tratado com dsRNA-GFP (controle inespecífico) em comparação ao controle não tratado. A legenda mostra as cores para cada um dos tratamentos: Controle A (laranja) e GFP-dsRNA (azul claro), e os formatos que representam cada uma das três réplicas biológicas: réplica 1 (círculo), réplica 2 (triângulo) e réplica 3 (quadrado).

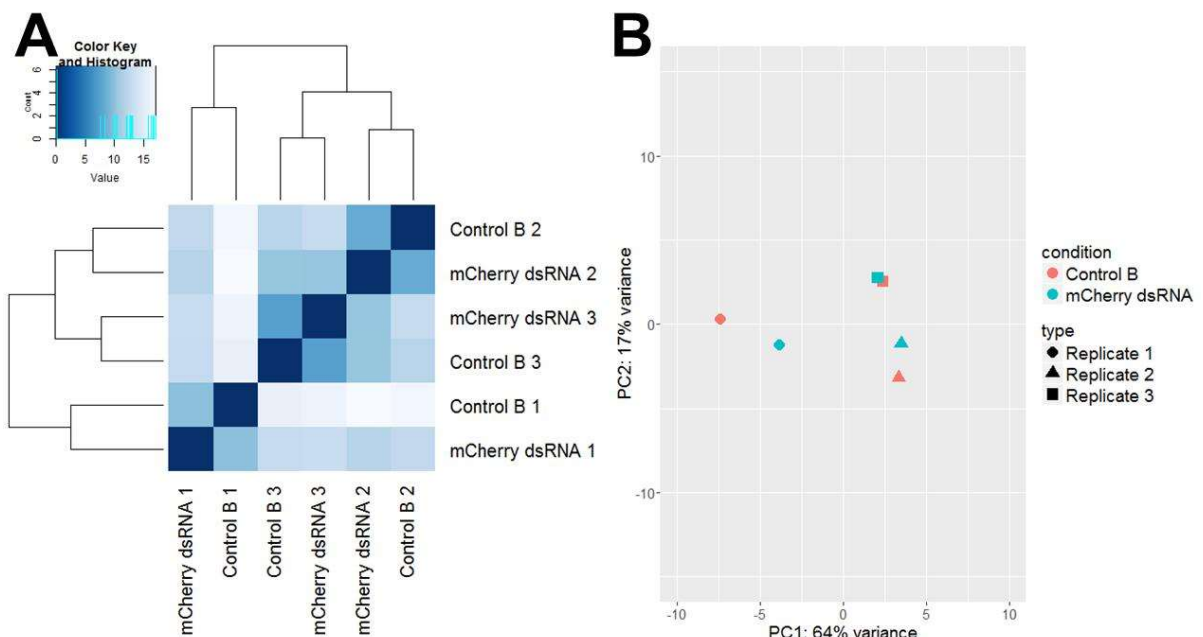


Figura 21 – Análise das amostras biológicas de *S. mansoni* tratadas com dsRNA-mCherry e controle não tratado. (A) Heatmap mostrando as distâncias euclidianas entre as

amostras de RNASeq de *S. mansoni* tratado com dsRNA-mCherry (controle inespecífico) e o controle não tratado. (B) Gráfico dos dois primeiros componentes principais (PCA) dos padrões de expressão do transcriptoma de *S. mansoni* tratado com dsRNA-mCherry (controle inespecífico) em comparação ao controle não tratado. A legenda mostra as cores para cada um dos tratamentos: Controle B (laranja) e mCherry-dsRNA (azul claro), e os formatos que representam cada uma das três réplicas biológica: réplica 1 (círculo), réplica 2 (triângulo) e réplica 3 (quadrado).

Para buscar por DEGs em esquistossômulos expostos aos dsRNAs de GFP ou mCherry, os perfis transcricionais após a exposição aos dsRNAs foram comparados aos perfis transcricionais de esquistossômulos controle não tratados utilizando os programas edgeR e DESeq2 (Figura 22 e Figura 23).

Foram identificados 6 DEGs nos esquistossômulos tratados com dsRNA-GFP e 3 DEGs nos esquistossômulos tratados com dsRNA-mCherry utilizando o pacote edgeR (Figura 22 e Tabela 4). Já utilizando o pacote DESeq2, foi encontrado apenas 1 DEG nos esquistossômulos tratados com dsRNA-GFP e nenhum DEG nos esquistossômulos tratados com dsRNA-mCherry (Figura 23 e Tabela 5). A distribuição dos valores de *p-value* para os DEGs obtidos pelo pacote DESeq2 está demonstrada na Figura 24.

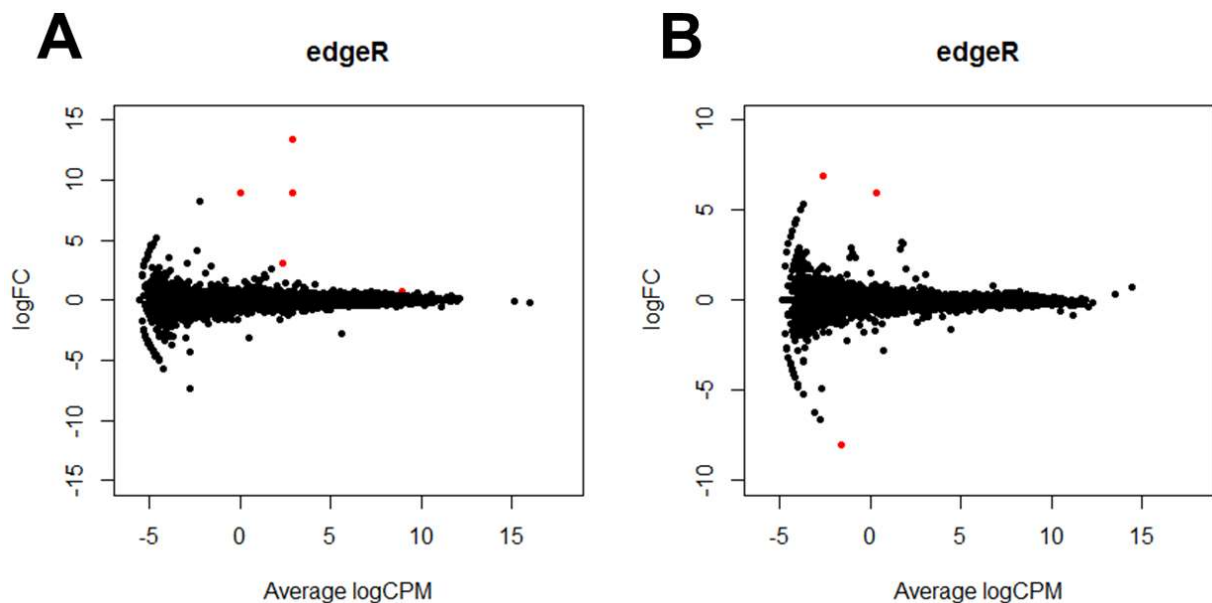


Figura 22 – Análise dos DEGs nos controles inespecíficos utilizando o pacote edgeR. DEGs entre o controle tratado com dsRNA-GFP comparado ao controle não tratado A (A) e o controle tratado com dsRNA-mCherry comparado ao controle não tratado B (B) mostrados em um *smear plot*. O valor de *log-fold change* (logFC) para cada gene está plotado contra o valor médio de abundância do gene (logCPM). Cada ponto corresponde a um gene. Os DEGs considerados significativos estão destacados em vermelho (*p-value* < 0,01; FDR<0,05).

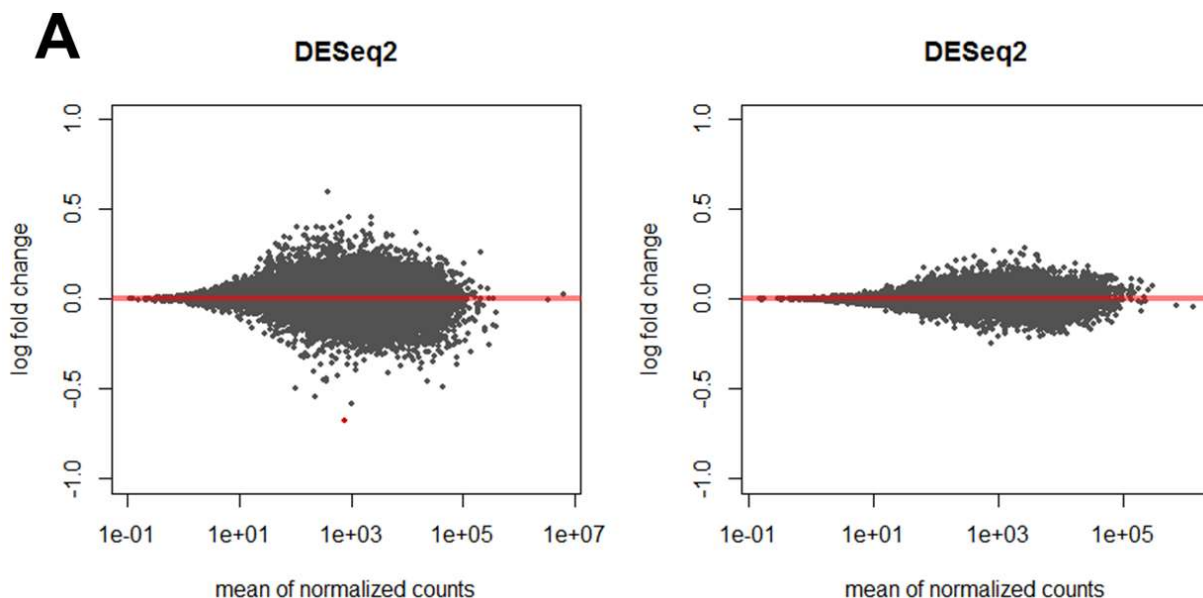


Figura 23 - Análise dos DEGs nos controles inespecíficos utilizando o pacote DESeq2. DEGs entre o controle tratado com dsRNA-GFP comparado ao controle não tratado A (A) e o controle tratado com dsRNA-mCherry comparado ao controle não tratado B (B) mostrados em um *MA plot* onde estão plotados os valores de *log fold change* estimado versus a média de expressão. Cada ponto corresponde a um gene. DEGs considerados significativos estão destacados em vermelho ($padj < 0,01$).

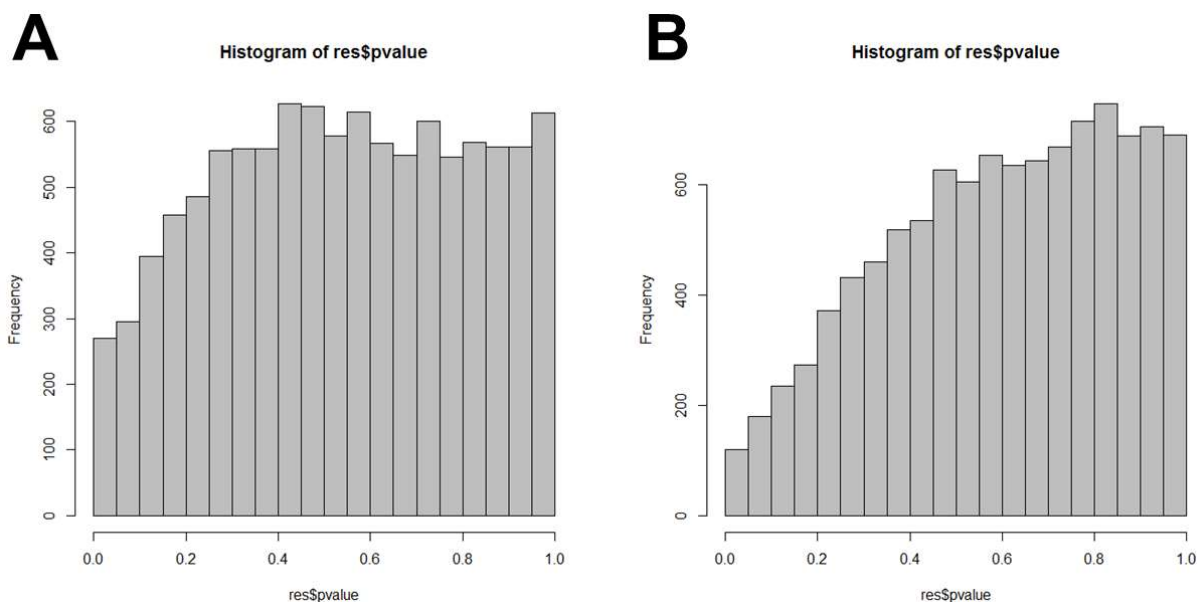


Figura 24 – Distribuição dos valores de *p-value*. Histograma mostrando a distribuição dos valores de *p-value* dos DEGs entre o controle tratado com dsRNA-GFP comparado ao controle não tratado A (A) e o controle tratado com dsRNA-mCherry comparado ao controle não tratado B (B).

Tabela 4 – DEGs em esquistossômulos expostos ao dsRNA-GFP ou mCherry quando comparado ao controle não tratado utilizando o pacote edgeR (FDR < 0,05).

GFP-dsRNA versus Controle A						
Gene_ID	logFC	p-value	FDR	Entry	Protein.names	KO term
Smp_101720	8,93934E+14	151.436.945.998.832	0.00327679263752273	G4VGG9	Uncharacterized protein	Length (aa) 119
Smp_178030	1,3465E+14	453.542.080.674.766	2,45E+09	G4VAH3	Putative uncharacterized protein	120
Smp_180620	0.736917213912487	108.340.754.776.395	0.0195356437654303	G4LVF0	Putative uncharacterized protein	65
Smp_185310	893.225.594.599.758	5,59E+06	0.000201551055411758	G4VAH1	Putative uncharacterized protein	71
Smp_190340	134.650.331.007.341	4,54E+05	2,45E+09	G4VAH1	Putative uncharacterized protein	71
Smp_192030	3,12091E+14	101.934.618.631.318	0.000275707659743057	G4VGG8	Uncharacterized protein	121
mCherry-dsRNA versus Controle B						
Gene_ID	logFC	p-value	FDR	Entry	Protein.names	KO
Smp_089920	6,00427E+14	174.120.869.007.864	0.0091345014770806	G4VCW7	Putative uncharacterized protein (Fragment)	Length (aa) 177
Smp_174330	6,88568E+14	253.290.548.398.575	0.0091345014770806	G4VRM0	Uncharacterized protein	91 K12818
Smp_201260	-8,0314E+14	144.852.028.031.818	0.00156715409127624	G4LUX3	Putative uncharacterized protein Smp_201260	82

Tabela 5 – DEG em esquistossômulos expostos ao dsRNA-GFP quando comparado ao controle não tratado utilizando o pacote DESeq2 (padj < 0,01).

GFP-dsRNA versus Controle A							
Gene_ID	log2FoldChange	pvalue	padj	Entry	Protein.names	Length (aa)	GO term
Smp_081430	0.674939005451366	9,27E+07	0.00981480645083286	G4LV77	Short chain dehydrogenase, putative	255	GO:0016491

A maioria dos DEGs codifica para proteínas não caracterizadas e nenhum deles é rotineiramente utilizado como controle endógeno na normalização de experimentos de qPCR (Tabela 4 e Tabela 5). Também foi verificado que nenhum dos DEGs codifica proteínas relacionadas ao mecanismo pós-transcricional de silenciamento gênico por RNAi. Além disso, utilizando o programa BLASTN, não foi encontrada qualquer similaridade entre as sequências dos DEGs e as sequências dos dsRNAs de GFP ou mCherry.

Vale ressaltar ainda que, para a análise dos dados excluindo a réplica 2, foram obtidos resultados semelhantes aos observados pela análise das três réplicas biológicas, sendo que as amostras agrupavam por réplica e não por tratamento e apenas poucos DEGs significantes foram detectados pelos pacotes edgeR e DESeq2 (dados não mostrados).

Portanto, GFP e mCherry são bons controles para os experimentos de RNAi em *S. mansoni*. Existem poucos genes cuja expressão é alterada em *Schistosoma* quando expostos a estes dsRNAs inespecíficos a uma concentração de 100 nM após 2 dias de cultura, quando comparados aos controles não tratados.

Diante disso, foi realizada também a busca por genes diferencialmente expressos entre os controles não tratados A e B que são derivados de culturas de parasitos realizadas em momentos diferente e corridas de sequenciamento independentes (Figura 25).

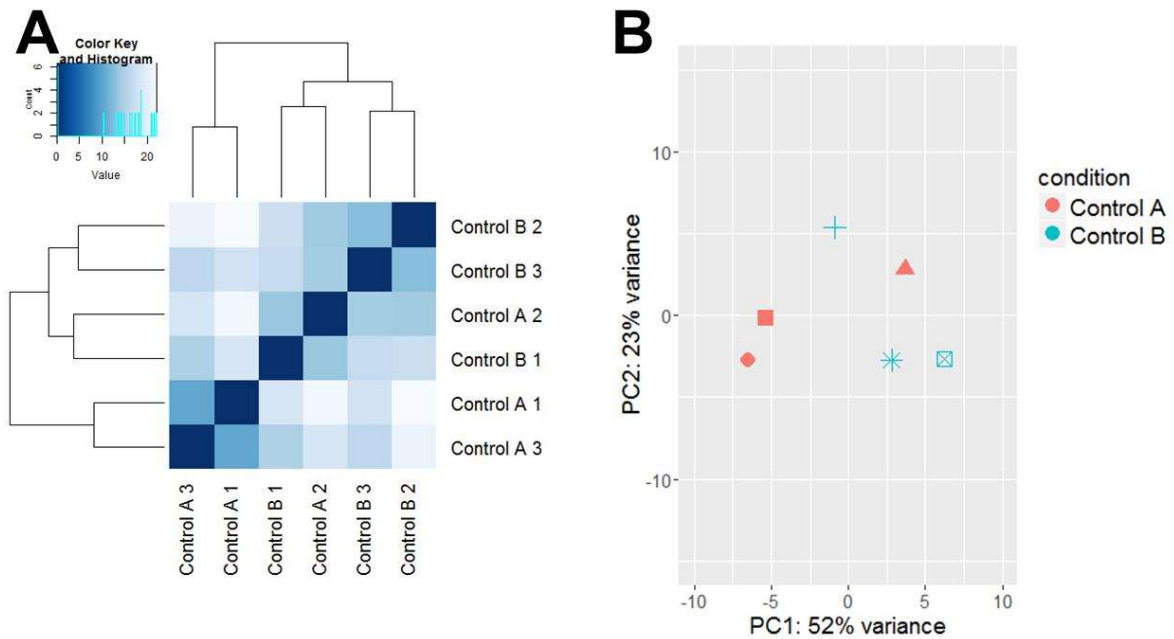


Figura 25 – Análise das amostras biológicas de *S. mansoni* de controles não tratados. (A) Heatmap mostrando as distâncias euclidianas entre as amostras de RNASeq entre os controles não tratados. (B) Gráfico dos dois primeiros componentes principais (PCA) dos padrões de expressão do transcriptoma de *S. mansoni* entre os controles não tratados. A legenda mostra as cores para cada um dos tratamentos: Controle A (laranja) e Controle B (azul claro), e os formatos que representam cada uma das três réplicas biológica: réplica 1 (círculo), réplica 2 (triângulo) e réplica 3 (quadrado).

Foram identificados 8 DEGs entre os esquistossômulos controle não tratados utilizando o pacote edgeR (Figura 26 e Tabela 6). Já utilizando o pacote DESeq2 foram encontrados 4 DEGs entre os esquistossômulos controle não tratados (Figura 26 e Tabela 7).

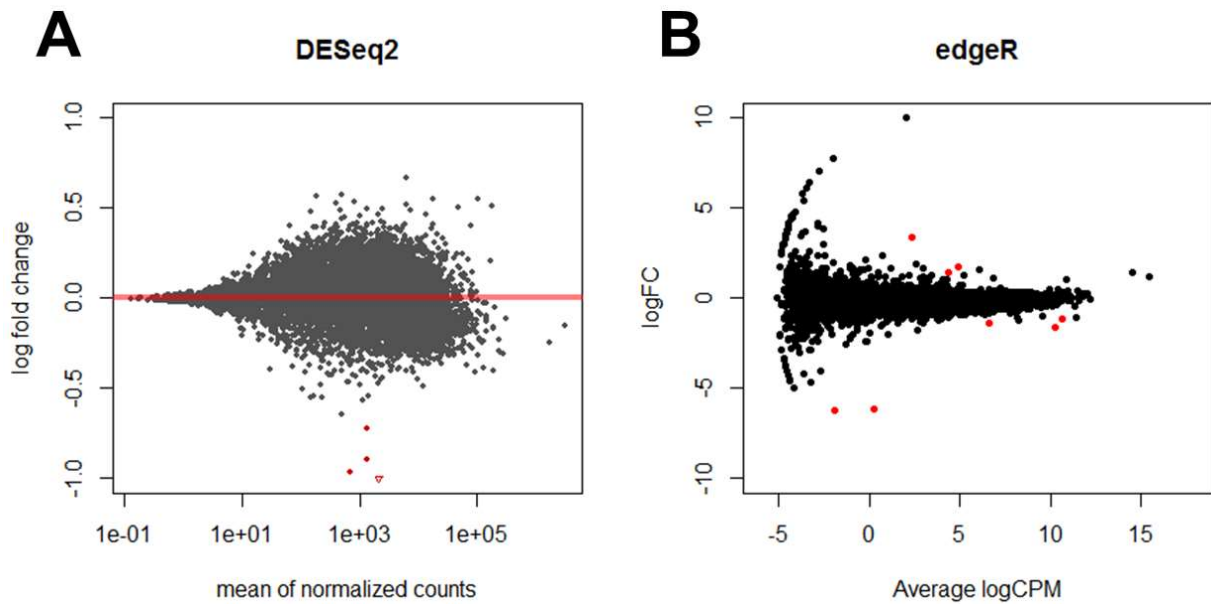


Figura 26 – Análise dos DEGs entre os controles não tratados utilizando os programas DESeq2 e edgeR. MA plot (*log fold change* estimado versus a média de expressão), onde cada ponto corresponde a um gene. DEGs considerados significativos estão destacados em vermelho ($p_{adj} < 0,01$) (A). Smear plot (valor de *log-fold change* versus valor médio de abundância do gene). DEGs considerados significativos estão destacados em vermelho ($p\text{-value} < 0,01$; $FDR < 0,05$) (B).

O número de DEGs encontrados nas amostras tratadas com dsRNAs inespecíficos é ainda menor do que o observado entre controles não tratados derivados de duas corridas de sequenciamento diferentes incluindo três réplicas biológicas. Reforçando este resultado, as réplicas biológicas tendem a agrupar mais do que as condições dos tratamentos, o que indica que há mais variação entre as réplicas biológicas do que aquelas desencadeadas pela exposição a dois diferentes dsRNAs inespecíficos. Apesar das variações experimentais discutidas e das inconsistências nos ensaios de RNAi, nossos resultados confirmam que GFP e mCherry-dsRNAs podem continuar sendo utilizados como controles em experimentos de RNAi em *S. mansoni*, tendo em vista o baixo impacto que sua presença causa na expressão gênica global do parasito.

Tabela 6 – DEGs encontrados entre os diferentes esquistossômulos controle não tratados utilizando o pacote edgeR (p -value < 0,01; FDR < 0,05).

Control A versus Control B							
Gene_ID	logFC	p-value	FDR	Entry	Protein.names	Length (aa)	KO term GO term
Smp_089920	175.820.159.427.256	3,85E+05	0,0451589356896681	G4VCW7	Putative uncharacterized protein (Fragment)	177	
Smp_138070	-623.286.059.418.465	2,94E+06	0,0319760185368912	G4LZU0	MEG-3 (Grail) family (Fragment)	117	GO:0001588; GO:0001963; GO:0007191; GO:0007612; GO:0016021; GO:0035240; GO:0060158
Smp_145520	337.922.382.214.497	1,38E+07	0,0474989522973106	G4VIY3	Putative adrenoreceptor	379	K04163 GO:0007017; GO:0030286
Smp_169190	-1.598.233.884.555	2,15E+08	4,175E+08	C1M053	Putative tegumental protein (Tegumental allergen-like protein)	176	
Smp_180620	-135.299.074.655.598	3,84E+08	0,00581379598174796	G4LVF0	Putative uncharacterized protein	65	GO:0016021
Smp_183600	-117.189.737.226.587	1,77E+09	0,000158856109980954	G4VDW9	Jagged (Fragment)	146	
Smp_192030	-612.666.235.298.031	2,92E+09	0,000498671425697683	G4VGG8	Uncharacterized protein	121	
Smp_205590	145.721.440.496.927	3,51E+08	0,00830752482154586	G4IM211	Putative uncharacterized protein Smp_205590	50	

Tabela 7 – DEGs encontrados entre os diferentes esquistossômulos controle não tratados utilizando o pacote DESeq2 (padj < 0,01).

Control A versus Control B							
Gene_ID	log2FoldChange	pvalue	padj	Entry	Protein.names	Length (aa)	GO term
Smp_014610	-0,967592892161396	1,21E+03	1,28E+07	G4VBU7	Putative uncharacterized protein	837	GO:0005739; GO:0016020; GO:0016021; GO:0043065
Smp_169190	-10,283.793.382.259	2,59E+03	1,36E+07	C1M053	Putative tegumental protein	176	GO:0007017; GO:0030286 GO:0001588; GO:0001963;
Smp_145520	-0,893614236115739	4,89E+05	1,72E+09	G4VIY3	Putative adrenoreceptor	379	GO:0007191; GO:0007612; GO:0016021; GO:0035240; GO:0060158
Smp_114870	-0,720956303895358	2,20E+08	0,00578372132955233	C4QSB3	Putative uncharacterized protein	473	

5.9 Análise da expressão diferencial de genes em esquistossômulos expostos aos dsRNAs de quinases

5.9.1 SmJNK

A via de sinalização de JNK está envolvida na regulação do desenvolvimento de diversos organismos. Por exemplo, já foi demonstrado seu papel na maturação ovocitária e embriogênese de *Xenopus laevis* (BAGOWSKI; XIONG; FERRELL, 2001), e na montagem do fuso durante a maturação meiótica de oócitos de rato (HUANG *et al.*, 2011). Em *S. mansoni*, foi demonstrado que SmJNK participa da maturação e desenvolvimento do parasito, sendo que o silenciamento desta proteína causa danos no tegumento de vermes adultos e impede a maturação de órgãos vitelínicos, resultando em uma menor ovoposição e maior suscetibilidade ao sistema imune do hospedeiro (ANDRADE *et al.*, 2014) indicando o potencial desta proteína como alvo terapêutico contra a esquistossomose.

A elucidação dos alvos de regulação, além de contribuir para um melhor entendimento da via de sinalização de JNK no parasito *S. mansoni*, visa também a busca por alvos parasito-específicos. Proteínas quinases são altamente conservadas entre organismos (WIDMANN *et al.*, 1999). Portanto, a busca por inibidores que possam ser utilizados como drogas deve levar em consideração as diferenças estruturais entre as proteínas do parasito e do hospedeiro, de forma a evitar potenciais efeitos colaterais. Assim, a descoberta de alvos parasito-específicos, essenciais e que estejam relacionados aos fenótipos anteriormente observados, é altamente desejável para o desenho de novos fármacos anti-*Schistosoma*.

Após a verificação da consistência dos dados e da qualidade das amostras, as bibliotecas de esquistossômulos expostos ao dsRNA-SmJNK foram então analisadas para verificar a presença de DEGs em relação ao controle não tratado com dsRNAs, buscando identificar os prováveis alvos de regulação de SmJNK. O perfil transcricional de esquistossômulos 2 dias após a exposição ao dsRNA-SmJNK foi comparado ao perfil transcricional de esquistossômulos controle não tratados para buscar DEGs utilizando o programa DESeq2 (Figura 27). A distribuição dos valores de *p-value* obtidos para os DEGs encontrados pelo pacote DESeq2 está demonstrada na Figura 28.

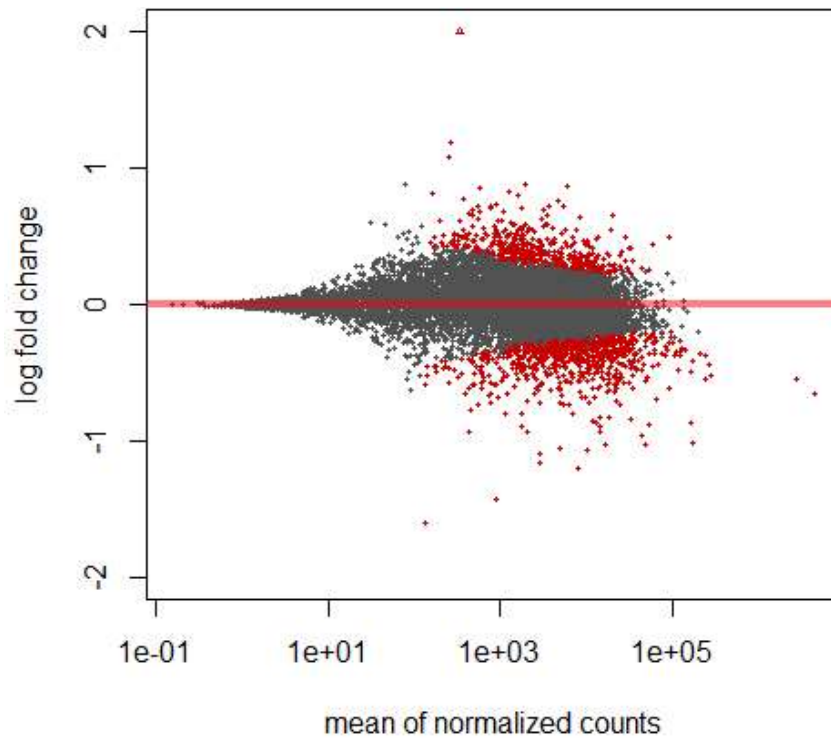


Figura 27 – Análise dos DEGs de SmJNK utilizando o programa DESeq2. DEGs entre controle A versus dsRNA-SmJNK pelo programa DESeq2. *MA plot* (*log fold change* estimado versus a média de expressão), onde cada ponto corresponde a um gene. DEGs considerados significativos estão destacados em vermelho ($p_{adj} < 0,01$).

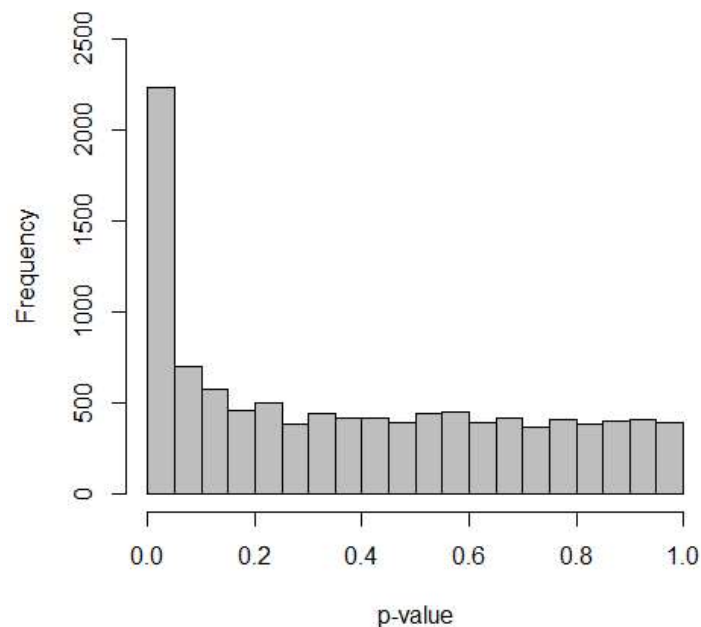


Figura 28 – Distribuição dos valores de p -value dos DEGs de SmJNK. Histograma mostrando a distribuição dos valores de p -value dos DEGs entre controle A versus dsRNA-SmJNK.

Foram encontrados 606 DEGs pelo programa DESeq2 ($p_{adj} < 0,01$). Entre os DEGs que apresentaram maiores diferenças em expressão (Figura 29) foram selecionados 16 genes para validação por RT-qPCR (Figura 30). Durante a fase de padronização dos iniciadores, apenas os iniciadores que amplificariam o gene Smp_126230 não funcionaram nas reações de RT-qPCR e foram descartados (Anexo 7). Todos os demais genes analisados exibiram padrões de expressão consistentes entre as análises de RNASeq e de RT-qPCR. Uma correlação positiva (coeficiente de correlação de *Spearman* de 0,7549, $p < 0,01$) entre os dados de RNASeq e RT-qPCR, confirma a precisão dos resultados obtidos com os dados RNASeq.

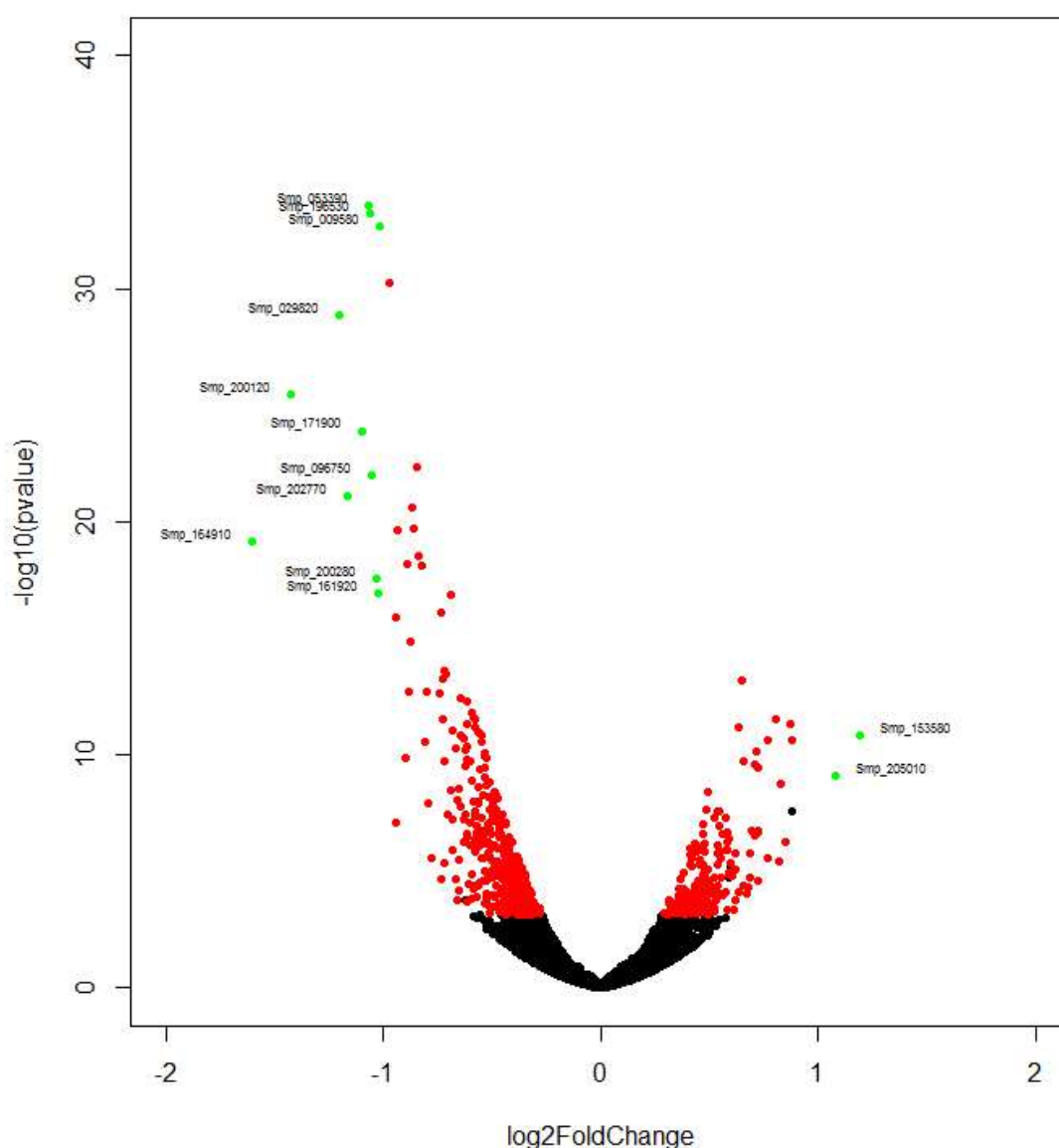


Figura 29 – Volcano plot dos DEGs de SmJNK. Volcano plot com os DEGs entre controle A versus dsRNA-SmJNK pelo pacote DESeq2. Os DEGs considerados significativos estão

destacados em vermelho. Em verde estão os DEGs que apresentam p -value ajustado menor que 0,01 e logFC maior que 1, os quais foram selecionados para validação por qPCR.

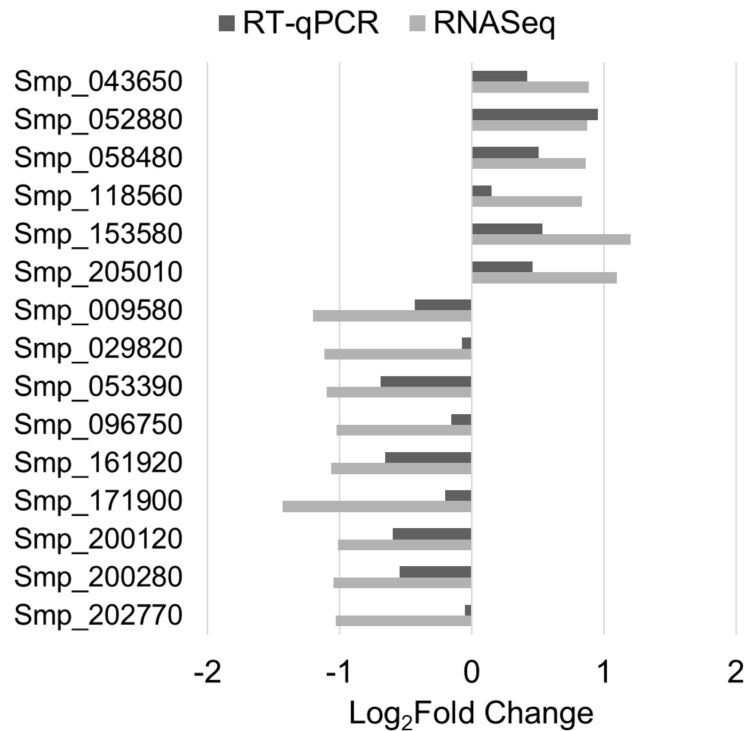


Figura 30 – Validação da abordagem RNASeq utilizando RT-qPCR para os DEGs em esquistossômulos tratados com SmJNK-dsRNA. Os níveis de expressão de DEGs selecionados foram quantificados por RT-qPCR e os resultados foram comparados aos obtidos pela abordagem RNASeq. A variação de log2fold na expressão dos genes pelas abordagens de RT-qPCR e RNASeq foram bem correlacionadas (coeficiente de correlação de Spearman de 0,7409, $p < 0,01$), indicando uma boa precisão das análises de RNASeq.

Dos 606 DEGs detectados pelo pacote DESeq2 nas amostras em que a expressão de SmJNK foi reduzida, 425 apresentaram diminuição e 181 apresentam aumento da expressão em relação ao controle. No endereço eletrônico: https://drive.google.com/file/d/1RkoSfwRVDJZHqwrInEuz0I4v4Ej6M_E/view?usp=sharing encontra-se a tabela com todos os DEGs em parasitos tratados com dsRNA-SmJNK, detectados pelo pacote DESeq2.

Os bancos de dados do UniProt, GO e KEGG foram utilizados em busca das anotações funcionais dos DEGs encontrados. Dos 606 DEGs, 407, apresentam anotação no banco de dados do UniProt, sendo 199 anotados como proteínas não caracterizadas. Estes genes ainda sem função caracterizada, bem como aqueles ainda não anotados, podem ser genes parasito-específicos e podem estar relacionados aos fenótipos anteriormente observados, sendo, portanto, bons candidatos para o desenvolvimento de novas drogas anti-*Schistosoma*.

A seguir a ferramenta PANTHER foi utilizada para elucidar os papéis funcionais dos DEGs encontrados. Os DEGs foram categorizados nas três principais categorias de GO: Função Molecular, Componente Celular e Processo Biológico. As subcategorias do GO-Slim significativamente enriquecidas encontradas para os DEGs que apresentaram diminuição da expressão são mostradas na Figura 31. Para os DEGs que apresentaram aumento da expressão em relação ao controle, apenas a subcategoria “sem classificação” apresentou enriquecimento significativo.

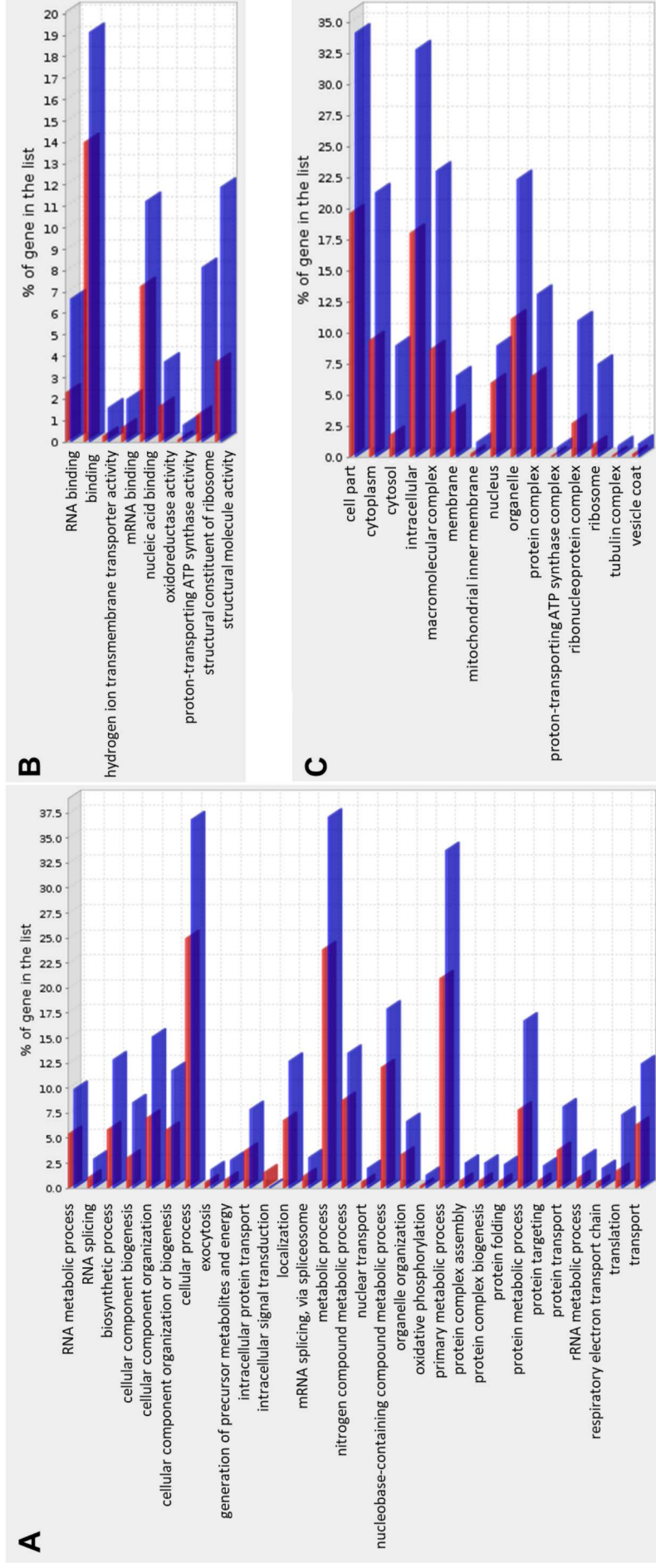


Figura 31 – Enriquecimento dos termos GO-Slim associados aos DEGs encontrados em esquistossômulos tratados com dsRNA-SmJNK em relação ao controle. O enriquecimento de genes que apresentaram diminuição significativa de expressão em esquistossômulos tratados com dsRNA SmJNK é descrito separadamente em três categorias: (A) Processo Biológico, (B) Função Molecular e (C) Componente Celular. Em vermelho estão representados a proporção de genes no proteoma predito de *S. mansoni* para cada subcategoria; em azul, a proporção de DEGs em cada subcategoria.

Observamos a diminuição da expressão de genes relacionados à composição estrutural de ribossomos e à síntese de polipeptídeos em amostras tratadas com dsRNA-SmJNK. Proteínas ribossomais são componentes principais dos ribossomos e desempenham papéis críticos na biossíntese proteica. Em condições normais, proteínas e RNAs ribossomais são sintetizados em quantidades estequiométricas (MAGER, 1988). No entanto, já foi descrito que a transcrição de genes que codificam proteínas ribossomais é específica em diferentes tecidos humanos, incluindo cérebro, fígado e retina (BORTOLUZZI *et al.*, 2001). Além disso, proteínas ribossomais podem também atuar em diferentes processos celulares, denominados funções extra-ribossomais (WOOL; CHAN; GLÜCK, 1995) e a expressão diferencial de proteínas ribossomais específicas já foi reportada em diversas condições patológicas (BÉVORT; LEFFERS, 2000; KREUNIN *et al.*, 2007; RINKER *et al.*, 2015).

Já foi relatado também que a composição dos ribossomos é alterada de maneira específica em condições de estresse em adaptação à deficiência de fosfato e ferro em raízes de *Arabidopsis*, provavelmente influenciando a tradução de proteínas (WANG *et al.*, 2013). Soumana e colaboradores (2014) também relataram a expressão diferencial de genes ribossomais e questionaram seu envolvimento na adaptação da mosca tsé-tsé ao estresse ocasionado pela invasão de *Trypanosoma sp.* (HAMIDOU SOUMANA *et al.*, 2014). A Figura 32 destaca os genes que codificam proteínas ribossomais que apresentaram diminuição de expressão em esquistossômulos em que SmJNK está silenciada.

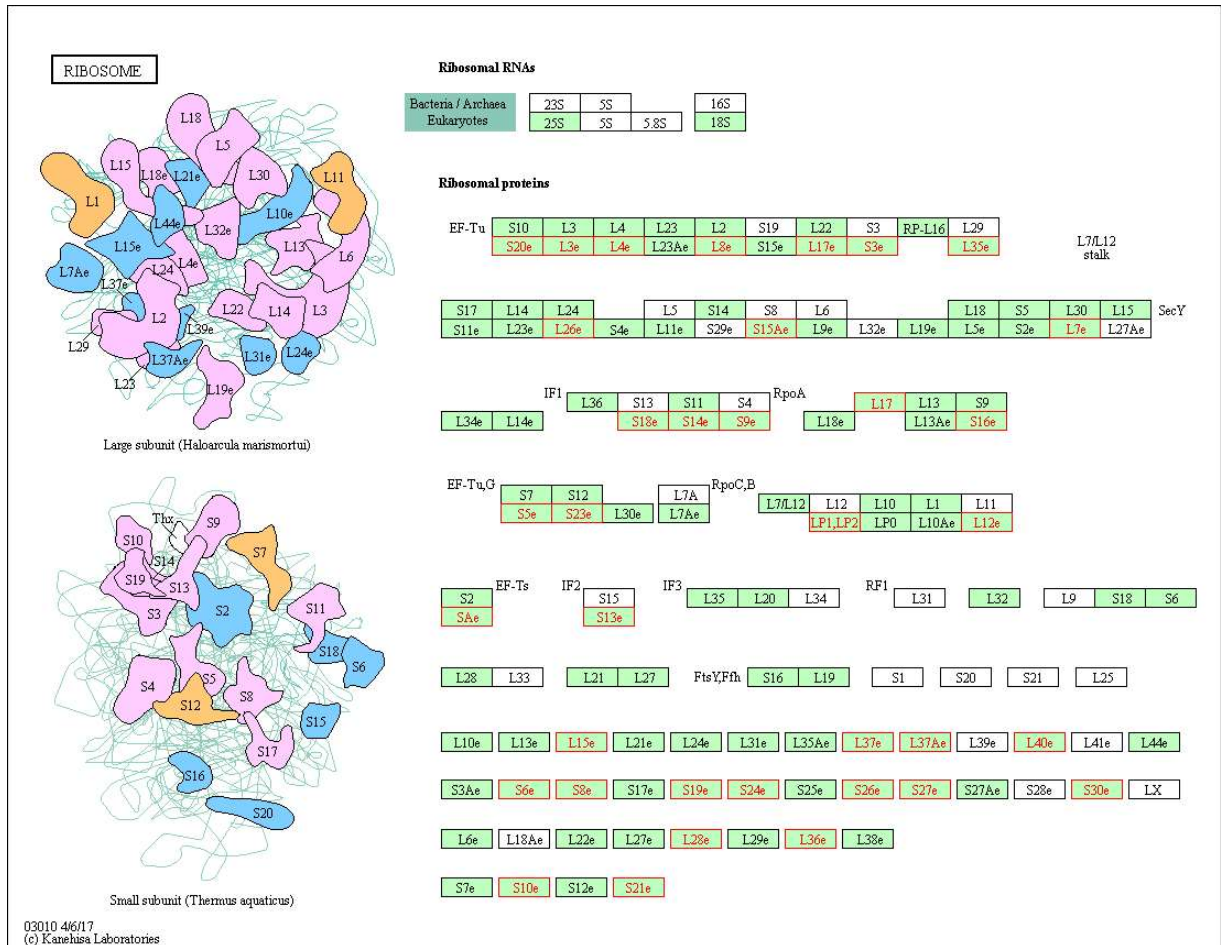


Figura 32 – Mapeamento dos genes que apresentaram diminuição de expressão pela ausência de SmJNK no KEGG pathway de ribossomos. Os genes regulados negativamente pela ausência de SmJNK que foram mapeados ao KEGG pathway de ribossomos (smm03010) estão destacados em vermelho.

Genes relacionados ao citoesqueleto e aos microtúbulos apresentaram diminuição de expressão quando SmJNK foi silenciada. A proteína ILK, uma ativadora das vias de SmJNK, SmERK e Akt, está envolvida na reorganização do citoesqueleto e na sobrevivência celular, e sua desregulação pode contribuir para erros na divisão celular e na instabilidade genômica (FIELDING; DEDHAR, 2009; GELMEDIN *et al.*, 2017). A via de sinalização de ILK tem influência na produção de ovos, na estrutura dos ovários e na integridade dos oócitos em fêmeas de *S. mansoni* (GELMEDIN *et al.*, 2017), fenótipos estes semelhantes aos observados para o silenciamento de SmJNK (ANDRADE *et al.*, 2014).

Observou-se uma diminuição da expressão de proteínas com função antioxidante, além de uma diminuição da expressão de genes relacionados à resposta ao estresse. Já foi demonstrado que espécies reativas de oxigênio (ROS) podem

ativar as vias de JNK e p38 MAPK, as quais estão associadas à apoptose (LI *et al.*, 2010). Corroborando nossos resultados, a ativação da via de JNK em resposta ao estresse oxidativo promove um aumento da expressão de genes que codificam proteínas com função antioxidante em *Drosophila* (LEE *et al.*, 2009), e a inibição da via promove o efeito contrário, como observado em nosso trabalho. Ao longo do desenvolvimento no hospedeiro, o parasito acumula defesas antioxidantes, como aumento na capacidade de desintoxicação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e resistência à múltiplas fontes de ROS (MEI; LOVERDE, 1997; MKOJI; SMITH; PRICHARD, 1988a, 1988b; OLIVEIRA; CORREA SOARES; OLIVEIRA, 2016). A diminuição da expressão de proteínas envolvidas nestes processos pode culminar com uma maior susceptibilidade à morte celular desencadeada pelo sistema imune do hospedeiro.

Há ainda genes relacionados ao dobramento de proteínas, como chaperonas e HSPs, que tiveram sua expressão diminuída. Chaperonas celulares tais como HSPs conferem resistência ao estresse, promovendo a sobrevivência celular. O estresse oxidativo prolongado provoca aumento de proteínas mal enoveladas que se agregam no retículo endoplasmático (ER). O objetivo da resposta ao estresse no ER é inibir ou retardar a síntese proteica e esta repressão da tradução é alcançada pela fosforilação do fator de iniciação eucariótico 2a (eIF2a) pela proteína quinase JNK ou por PERK (do inglês, *protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase*) (NAGIAH; PHULUKDAREE; CHUTURGOON, 2016). O silenciamento de SmJNK pode ter inibido esta resposta ao estresse, resultando na diminuição da expressão de genes de chaperonas e HSPs observada.

Ainda, a regulação positiva das vias de sinalização de p38 e JNK promove aumento da expressão da proteína de ligação ao RNA do inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1). Já foi demonstrado que tanto p38 quanto JNK regulam positivamente a expressão de PAI-1 em fibroblastos (NUTTER; HAYLOR; KHWAJA, 2015). Ainda, o aumento da expressão de PAI-1 via JNK modula a patologia amilóide neurodegenerativa observada na doença de Alzheimer (GERENU *et al.*, 2017), já a inibição de JNK atenua significativamente a indução de PAI-1 (EURLINGS *et al.*, 2017). Em concordância com estes dados, o silenciamento de SmJNK, promoveu diminuição da expressão de PAI-1. É sabido que *S. mansoni* inibe a coagulação do

hospedeiro durante a infecção, sendo que os esquistossômulos podem reduzir a formação de coágulos através da estimulação de vias fibrinolíticas (MEBIUS *et al.*, 2013). A interação entre parasitos e o sistema fibrinolítico dos seus hospedeiros, resulta na regulação de diversas funções relacionadas com os mecanismos de sobrevivência de parasitos, como a degradação de imunoglobulinas e de componentes do complemento, a ativação de metaloproteinases de matriz, a estimulação de adesão e invasão, bem como a degradação de proteínas para a nutrição, tem sido sugerido como resultado da interação entre patógenos e o sistema fibrinolítico de seus hospedeiros (GONZÁLEZ-MIGUEL *et al.*, 2016). A diminuição de PAI-1, portanto, deve interferir no processo de coagulação, podendo dificultar a alimentação e/ou mobilidade do verme no hospedeiro e, assim, estar relacionado ao fenótipo de diminuição da sobrevivência do parasito frente ao hospedeiro mamífero (ANDRADE *et al.*, 2014; AVELAR, 2013).

Outra via do KEGG que apresentou diversos genes regulados negativamente por SmJNK foi o KEGG *pathway* de spliceossomos (Figura 33). O padrão de expressão de fatores de *splicing* reflete os padrões específicos de *splicing* alternativo nos diferentes tipos de células e tecidos (GROSSO *et al.*, 2008) e já foi demonstrado que a via de sinalização de JNK atua no controle dos eventos de *splicing* em células T humanas (MARTINEZ *et al.*, 2015). O controle do *splicing* alternativo é tão complexo e relevante quanto o controle transcricional, e JNK parece atuar na regulação de *splicing* alternativo em resposta a estímulos extracelulares, promovendo alterações nos padrões de *splicing* (PELISCH *et al.*, 2005).

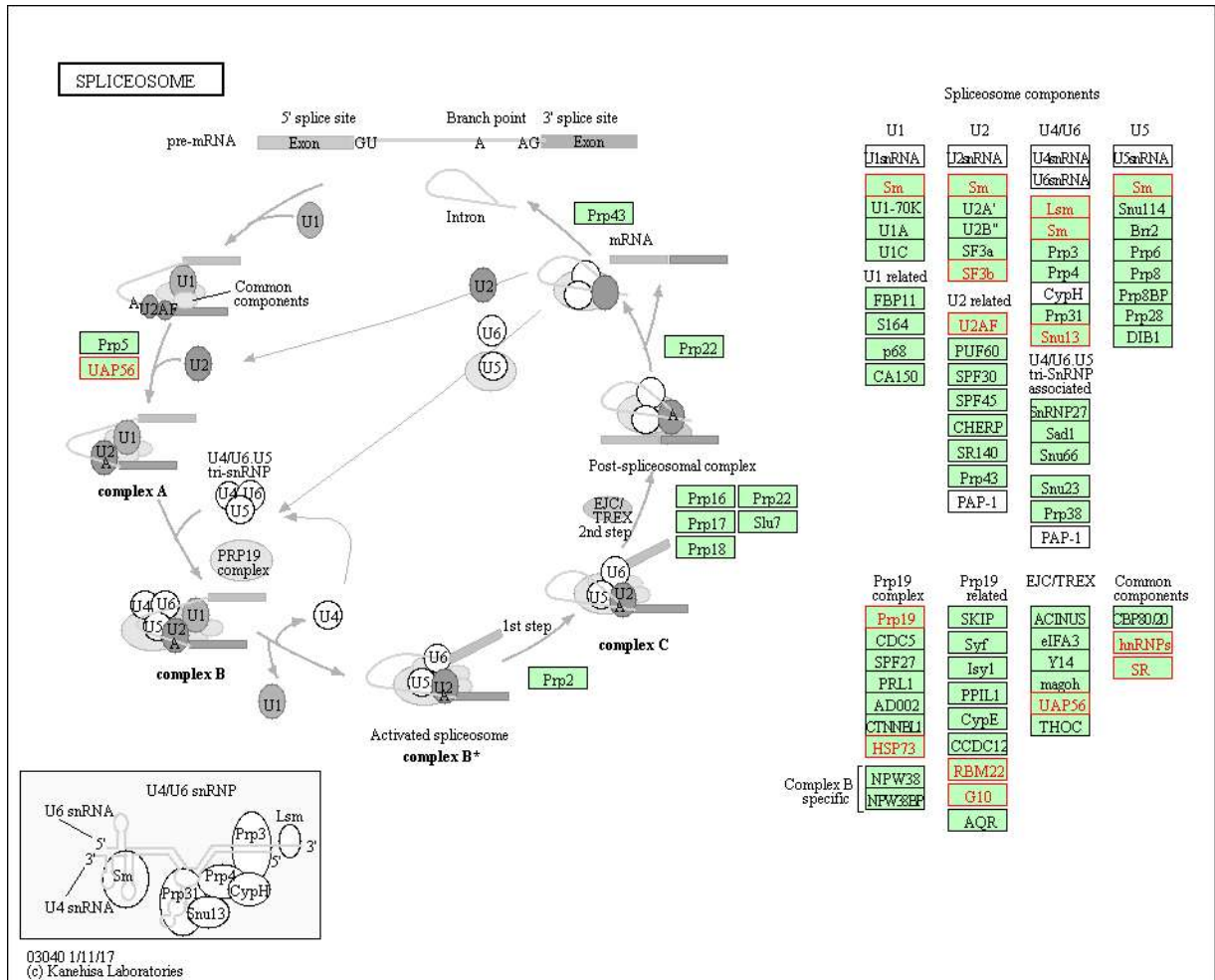


Figura 33 – Mapeamento dos genes que apresentaram diminuição de expressão pela ausência de SmJNK no KEGG pathway de spliceossomos. Os genes regulados negativamente pela ausência de SmJNK que fazem parte do KEGG pathway de spliceossomos (smm03040) estão destacados em vermelho.

Entre os genes que apresentaram aumento de expressão em amostras em que SmJNK foi silenciada, encontramos a enzima Citocromo c Oxidase subunidade II (COX-2) que apresenta atividade de oxirredutase. É sabido que JNK é requerida para a indução da expressão do microRNA miR-26a em macrófagos (CHEN *et al.*, 2015). A superexpressão de miR-26a, por sua vez, aumenta a apoptose pela diminuição da expressão de COX-2, enquanto a inibição de miR-26a tem o efeito oposto, ou seja, aumenta a expressão de COX-2, mesmo efeito observado em nossos experimentos (ZHANG; LIANG; HUANG, 2016).

A reação da Citocromo c Oxidase, último passo da cadeia de transporte de elétrons, é irreversível e um dos sítios reguladores importantes dessa via. A atividade de COX afeta todos os aspectos da função mitocondrial, e sua disfunção promove estresse oxidativo em muitas doenças. A disfunção mitocondrial é um efeito

cumulativo de falhas em mais de um complexo da cadeia de transporte de elétrons, entre eles, defeitos de montagem, modificações covalentes e perda de subunidades, desmontagem da organização supercomplexa e inibição direta da atividade enzimática. Podendo resultar em crise energética devido à menor produção de ATP, acidose láctica e aumento da formação de ROS na mitocôndria (SRINIVASAN; AVADHANI, 2012).

O equilíbrio entre as defesas antioxidantes e a produção de ROS pode ser interrompido por deficiências nos sistemas de defesa antioxidantes ou pela inibição do fluxo de elétrons. Este desequilíbrio é comum em vários processos patológicos em que o estresse oxidativo resulta em danos aos tecidos e, eventualmente, morte celular (TURRENS, 2003). Quando silenciemos SmJNK em esquistossômulos, observamos ao mesmo tempo, uma diminuição de enzimas antioxidantes e um desbalanço de proteínas da cadeia de fosforilação oxidativa na mitocôndria. Em conjunto estes dados indicam uma maior susceptibilidade dos vermes ao estresse oxidativo, resultando também numa maior susceptibilidade às defesas do sistema imune do hospedeiro e refletindo na menor recuperação de vermes em camundongos infectados com esquistossômulos silenciados para SmJNK.

5.9.2 Smp38

A p38 MAPK desempenha um papel importante no controle da apoptose e do ciclo celular, e na inibição do crescimento e diferenciação (DEACON, 2003). Após a ativação, p38 pode translocar do citosol para o núcleo onde é responsável por mediar respostas celulares através da fosforilação de fatores de transcrição. Evidências crescentes apontam que p38 tem ação como supressor tumoral, e sua ativação aumenta a apoptose em resposta a agentes quimioterapêuticos (CUADRADO; NEBREDA, 2010). Em *S. mansoni*, já foi demonstrado que Smp38 MAPK participa do desenvolvimento de miracídios em esporocistos, e na regulação do batimento ciliar de miracídios (RESSURREIÇÃO *et al.*, 2011a, 2011b). Também já foi demonstrado que Smp38 desempenha um papel importante no desenvolvimento de esquistossômulos e seu silenciamento afeta o crescimento e a sobrevivência de parasitos *in vitro* (GUIDI *et al.*, 2015).

Em cercárias, a atividade de Smp38 MAPK é afetada pela luz, temperatura e exposição ao ácido linoleico. A ativação de Smp38, bem como de SmPKC e SmERK,

foi associada à estruturas sensoriais e neurais. A atenuação de sua atividade reduz a libertação do conteúdo da glândula acetabular demonstrando a importância destas vias de sinalização nos mecanismos de penetração do hospedeiro. Ainda, a ativação termossensorial destas quinases pode levar às alterações transcricionais necessárias para a transformação e sobrevivência de esquistossômulos no hospedeiro definitivo (RESSURREIÇÃO *et al.*, 2014).

Trabalhos de nosso grupo demonstraram que Smp38 MAPK exerce um importante papel no desenvolvimento e sobrevivência dos parasitos *in vivo*, sendo que o silenciamento desta proteína provoca danos no tegumento dos vermes, diminuindo sua sobrevivência frente ao sistema imune do hospedeiro definitivo. Smp38 também participa da reprodução de *S. mansoni*, visto que seu silenciamento interfere na formação das estruturas reprodutoras dos vermes. Além disso, a inibição da atividade de Smp38 MAPK pelo inibidor SB203580 interfere na proteção do parasito contra espécies reativas de oxigênio (AVELAR, 2013).

Após a verificação da consistência dos dados e da qualidade das amostras, as bibliotecas de esquistossômulos expostos ao dsRNA-Smp38 MAPK foram analisadas para verificar a presença de DEGs em relação ao controle não tratado com dsRNAs. O perfil transcricional de esquistossômulos 2 dias após a exposição ao dsRNA-Smp38 foi comparado ao perfil transcricional de esquistossômulos controle não tratados para buscar DEGs utilizando o programa DESeq2 (Figura 34). A distribuição dos valores de *p-value* obtidos para os DEGs encontrados pelo pacote DESeq2 está demonstrada na Figura 35.

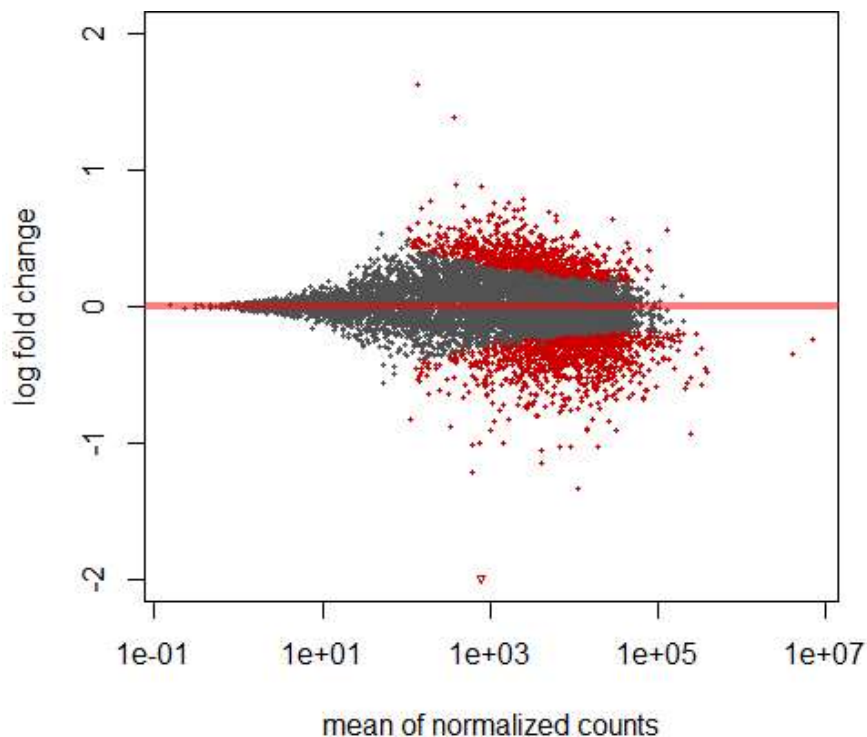


Figura 34 – Análise dos DEGs de Smp38 utilizando o programa DESeq2. DEGs entre controle A versus dsRNA-Smp38 pelo programa DESeq2. *MA plot* (*log fold change* estimado versus a média de expressão), onde cada ponto corresponde a um gene. DEGs considerados significativos estão destacados em vermelho ($p_{adj} < 0,01$).

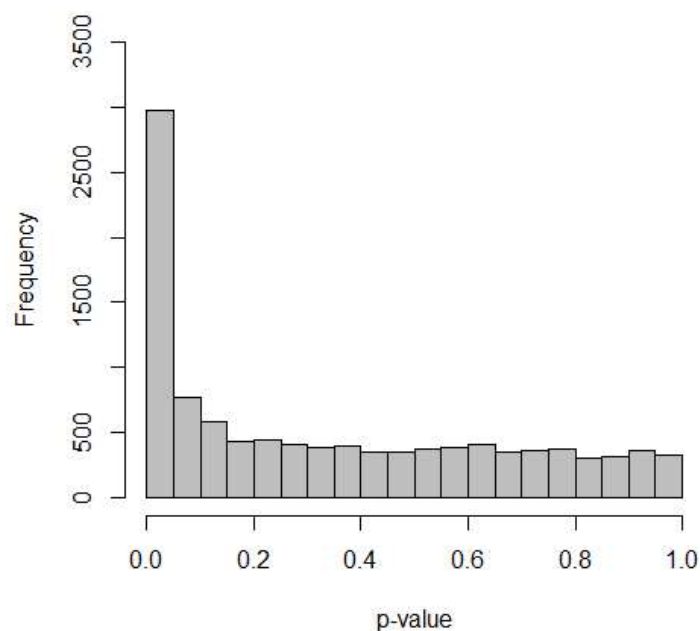


Figura 35 – Distribuição dos valores de p -value dos DEGs de Smp38. Histograma mostrando a distribuição dos valores de p -value dos DEGs entre controle A versus dsRNA-Smp38.

Foram encontrados 1154 DEGs pelo programa DESeq2 ($p_{adj} < 0,01$). Dentre os DEGs que apresentaram maiores diferenças em expressão (Figura 36) foram selecionados 14 genes para validação por RT-qPCR (Figura 37). Com exceção dos genes Smp_096750 e Smp_202770, os demais genes analisados mostraram padrões de expressão consistentes entre as análises de RNASeq e de RT-qPCR. Uma correlação positiva (coeficiente de correlação de *Spearman* de 0,7273, $p < 0,01$) entre os dados de RNASeq e RT-qPCR foi observada, indicando uma boa precisão dos resultados obtidos com os dados RNASeq.

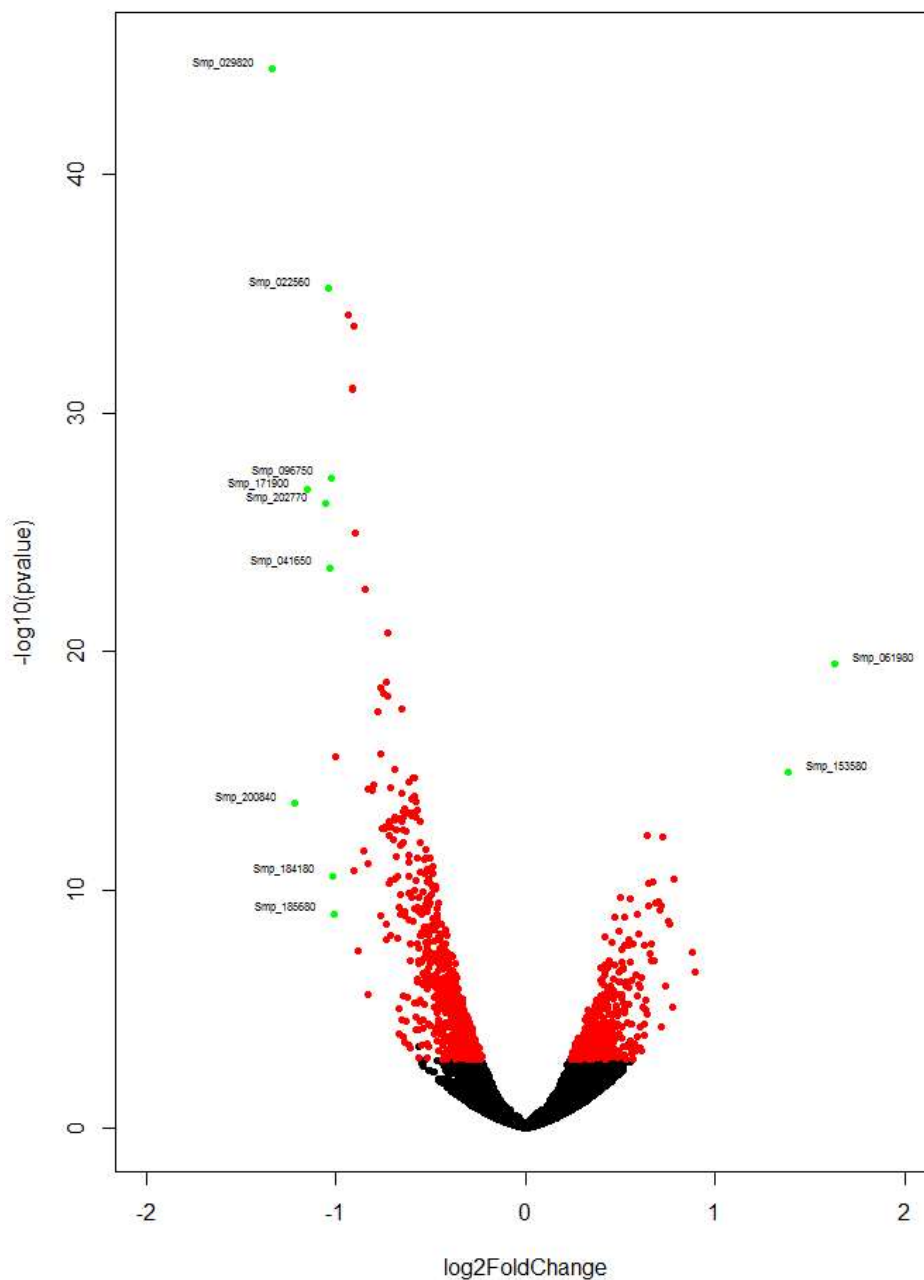


Figura 36 – Volcano plot dos DEGs de Smp38. Volcano plot com os DEGs entre controle A versus dsRNA-Smp38 pelo pacote DESeq2. Os DEGs considerados significativos estão

destacados em vermelho. Em verde estão os DEGs que apresentam p -value ajustado menor que 0,01 e logFC maior que 1, os quais foram selecionados para validação por RT-qPCR.

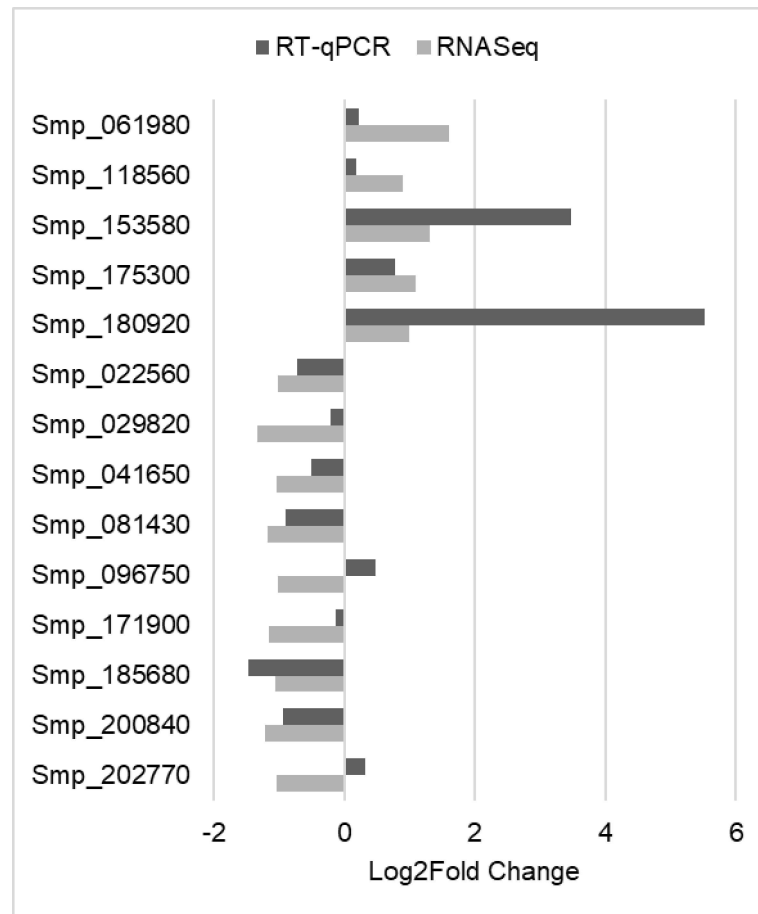


Figura 37 – Validação da abordagem RNASeq utilizando RT-qPCR para os DEGs em esquistossômulos tratados com Smp38-dsRNA. Os níveis de expressão de DEGs selecionados foram quantificados por RT-qPCR e os resultados foram comparados aos obtidos pela abordagem RNASeq. A variação de log2fold na expressão dos genes pelas abordagens de RT-qPCR e RNASeq foram bem correlacionadas (coeficiente de correlação de Spearman de 0,7273, $p < 0,01$), indicando uma boa precisão das análises de RNASeq.

Dos 1154 DEGs detectados pelo pacote DESeq2 nas amostras em que a expressão de Smp38 foi silenciada, 766 apresentaram diminuição e 388 apresentam aumento da expressão em relação ao controle. No endereço eletrônico: <https://drive.google.com/file/d/1C0O2xsDYa4MFqnipwGNRR3U6k2DEGo1i/view?usp=sharing> encontra-se a tabela com todos os DEGs em parasitos tratados com dsRNA-Smp38, detectados pelo pacote DESeq2.

Os bancos de dados do UniProt, GO e KEGG foram utilizados para elucidar as anotações funcionais dos DEGs encontrados. Dos 1154 DEGs, 1133, apresentam anotação no banco de dados do UniProt. Assim como para SmJNK, um grande número de genes (408) está anotado como proteínas não caracterizadas.

A seguir a ferramenta PANTHER foi utilizada para elucidar os papéis funcionais dos DEGs encontrados. Os DEGs foram categorizados nas três principais categorias de GO: Função Molecular, Componente Celular e Processo Biológico. As subcategorias do GO-Slim significativamente enriquecidas encontradas para os DEGs que apresentaram diminuição e aumento da expressão são mostradas na Figura 38.

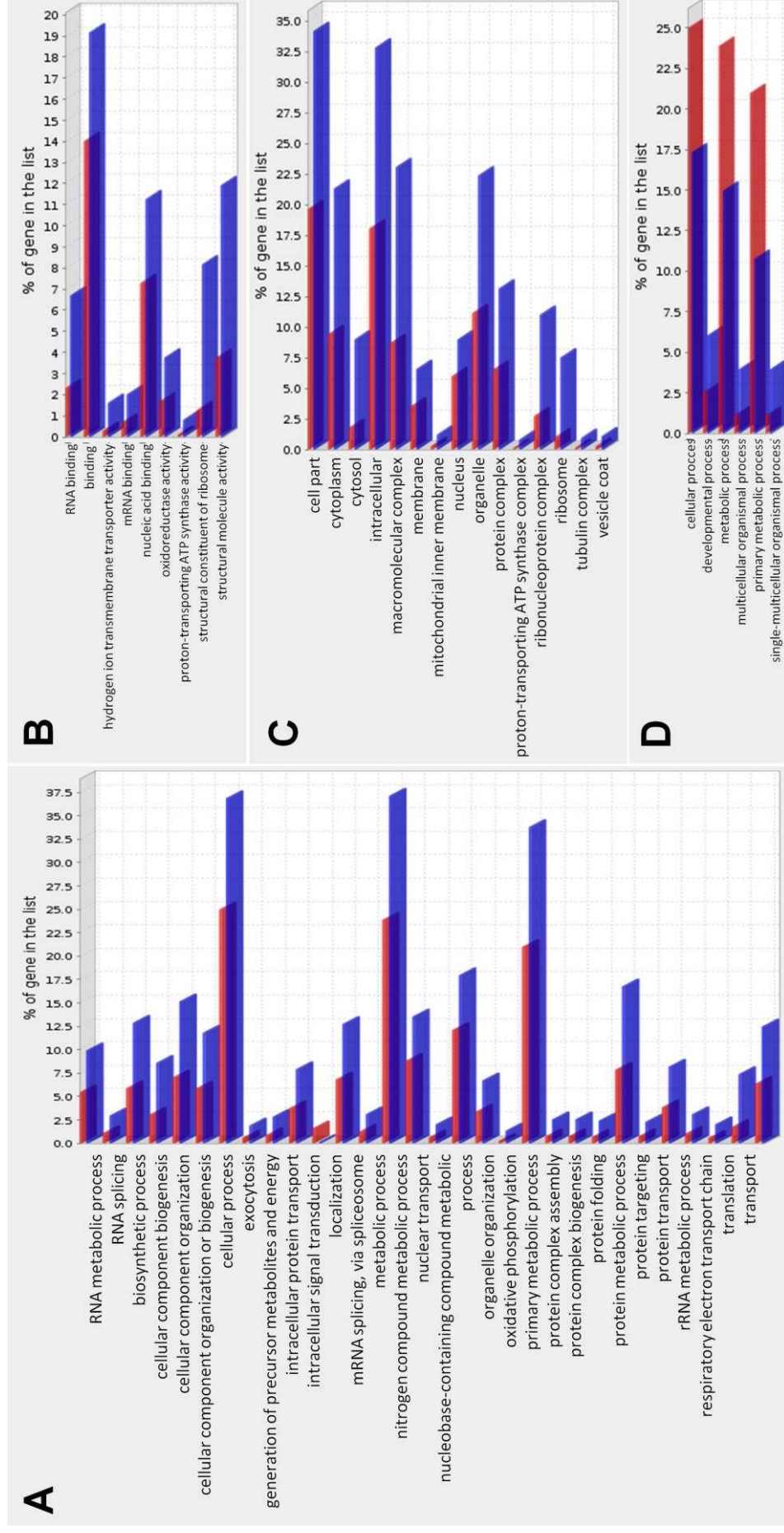


Figura 38 – Enriquecimento dos termos GO-Slim associados aos DEGs encontrados em esquistossômulos tratados com dsRNA-Smp38 em relação ao controle. O enriquecimento de genes que apresentaram diminuição significativa de expressão em esquistossômulos tratados com dsRNA Smp38 é descrito separadamente em três categorias: (A) Processo Biológico, (B) Função Molecular e (C) Componente Celular. O enriquecimento de genes que apresentaram aumento significativo de expressão em esquistossômulos tratados com dsRNA Smp38 apresentou apenas a categoria Processo Biológico com subcategorias enriquecidas (D). Em vermelho estão representados a proporção de genes no proteoma predito de *S. mansoni* para cada subcategoria; em azul, a proporção de DEGs em cada subcategoria.

Assim como para SmJNK, observou-se uma diminuição da expressão de proteínas relacionadas à constituição estrutural dos ribossomos, reforçando o provável papel dessas proteínas na resposta ao estresse desencadeada por p38 MAPK. A Figura 39 destaca os genes que codificam proteínas ribossomais que apresentaram diminuição de expressão em esquistossômulos em que Smp38 MAPK foi silenciada.

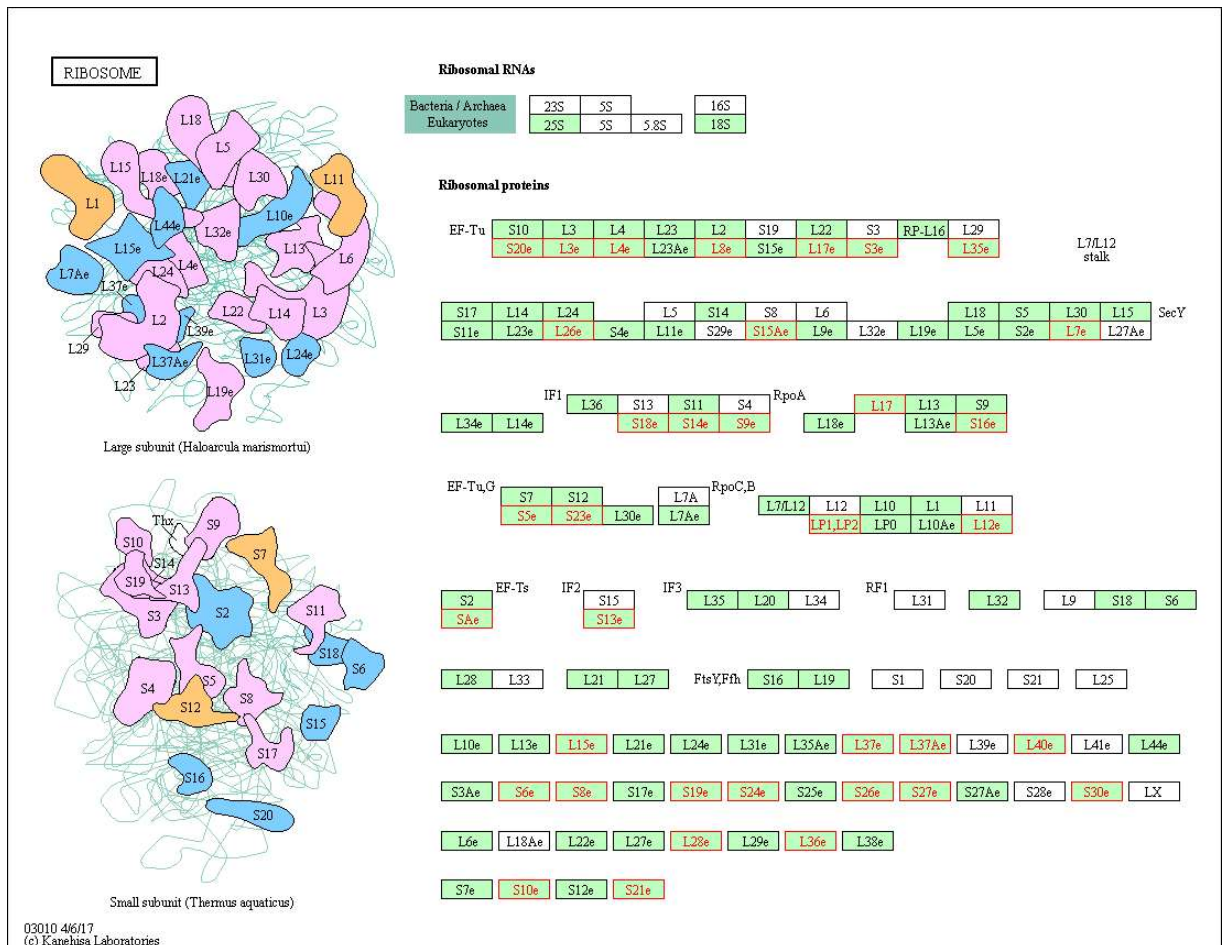


Figura 39 - Mapeamento dos genes que apresentaram diminuição de expressão pela ausência de Smp38 MAPK no KEGG pathway de ribossomos. Os genes regulados negativamente pela ausência de Smp38 MAPK que foram mapeados ao KEGG pathway de ribossomos (smm03010) estão destacados em vermelho.

Observamos também a diminuição da expressão de outros genes com função estrutural, como os que codificam as proteínas tubulina e colágeno tipo 1. Em concordância, já foi demonstrado que a inibição das vias de sinalização de p38 MAPK e Smad2/3 reduz a expressão de colágeno tipo 1 em células hepáticas, sendo que a inibição de ambas as vias resulta no completo bloqueio da expressão do gene de colágeno tipo 1 (TSUKADA, 2005). O bloqueio da ativação de p38 MAPK em células

epiteliais humanas também inibe a expressão e síntese de colágeno tipo 1 induzida por TGF β -2 (KIMOTO *et al.*, 2004).

O tegumento de trematódeos é composto por diferentes proteínas e glicoproteínas (tubulina, colágeno, queratina, paramiosina, actina), fosfolípidos e glicolípidos cerebrosídeos (ALVAREZ; MOTTIER; LANUSSE, 2007). A diminuição da expressão desses genes pode contribuir para uma desorganização generalizada de seus tecidos, resultando nos danos no tegumento e nas estruturas reprodutoras observados nos vermes e diminuindo assim sua proteção frente ao sistema imune do hospedeiro.

Dentre os DEGs com expressão diminuída quando Smp38 MAPK foi silenciada, 10 genes pertencem à via de fosforilação oxidativa (Figura 40). p38 MAPK desempenha um papel importante na diferenciação celular miogênica, sendo ativada após a contração muscular ou execução de exercícios em roedores e humanos (ZETSER; GREDINGER; BENGAL, 1999). Os camundongos transgênicos que expressam p38 MAPK no músculo esquelético apresentam uma expressão aumentada de PGC-1 α e de proteínas mitocondriais (AKIMOTO, 2005), estes resultados indicam que p38 MAPK pode desempenhar um papel importante na regulação da biogênese de proteínas mitocondriais (JORNAYVAZ; SHULMAN, 2010).

Ainda, o sistema de fosforilação oxidativa mitocondrial desempenha um papel fundamental na produção de energia, na geração de radicais livres e na apoptose (HÜTTEMANN *et al.*, 2007). O desbalanço dessas proteínas pode alterar o funcionamento da cadeia de transporte de elétrons e a manutenção do potencial de membrana mitocondrial, levando a um acúmulo de radicais livres e desencadeando uma maior susceptibilidade ao estresse oxidativo. Assim como já descrito para SmJNK, o silenciamento de Smp38 MAPK em esquistossômulos também resultou em uma menor recuperação de vermes em camundongos infectados, reforçando a importância de Smp38 na manutenção dos mecanismos de defesa antioxidante em *S. mansoni*.

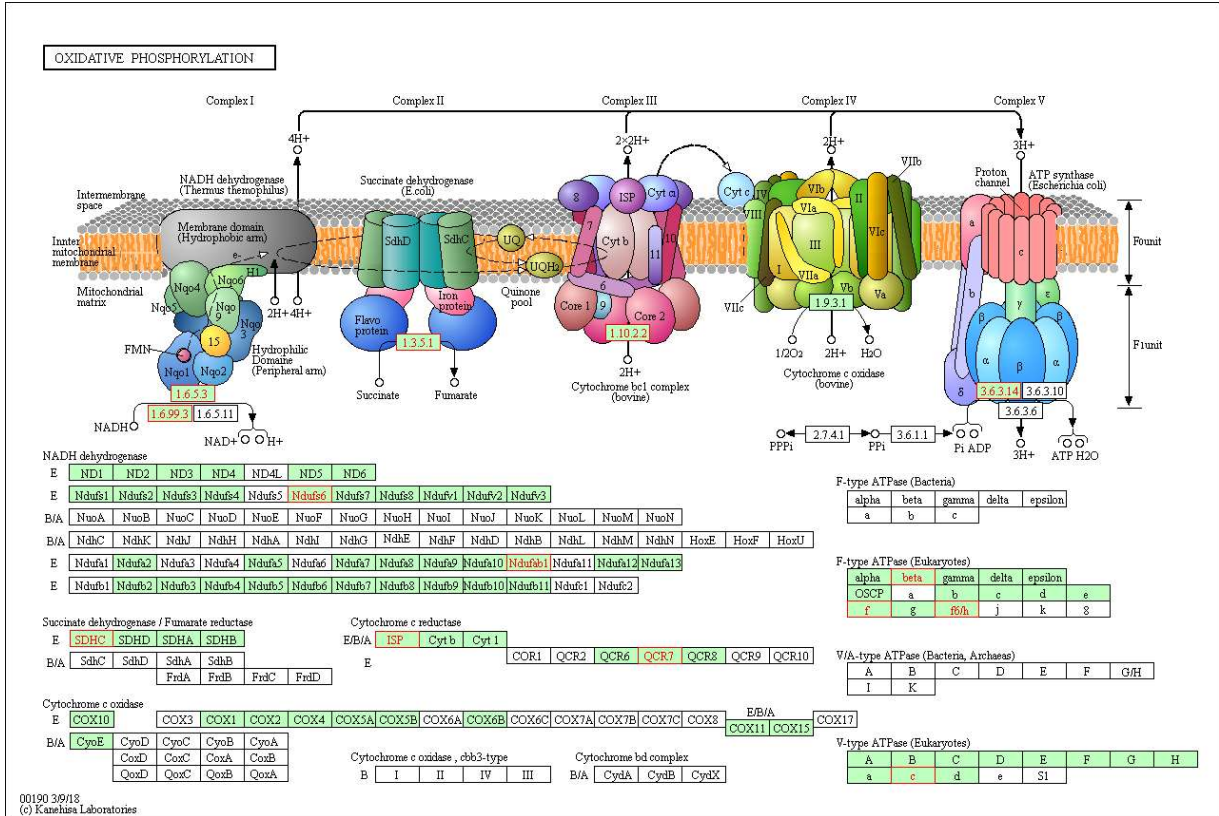


Figura 40 - Mapeamento dos genes que apresentaram diminuição de expressão pela ausência de Smp38 MAPK no KEGG pathway de fosforilação oxidativa. Os genes regulados negativamente pela ausência de Smp38 MAPK que foram mapeados ao KEGG pathway de fosforilação oxidativa (smm00190) estão destacados em vermelho.

Observamos também uma diminuição da expressão de genes que codificam H⁺-ATPases vacuolares (v-ATPases) (Figura 40 e Figura 41). A diminuição da expressão de v-ATPases está relacionada à maior sensibilidade ao estresse oxidativo por H₂O₂ em leveduras (HÜTTEMANN *et al.*, 2007). Além disso, v-ATPases atuam na acidificação de endossomos, lisossomos e fagossomos (HOLLIDAY, 2014) e algumas subunidades de v-ATPases podem ter uma função adicional durante a maturação do fagossomo (KISSING *et al.*, 2015) e sua fusão com lisossomos durante a fagocitose (HOLLIDAY, 2014).

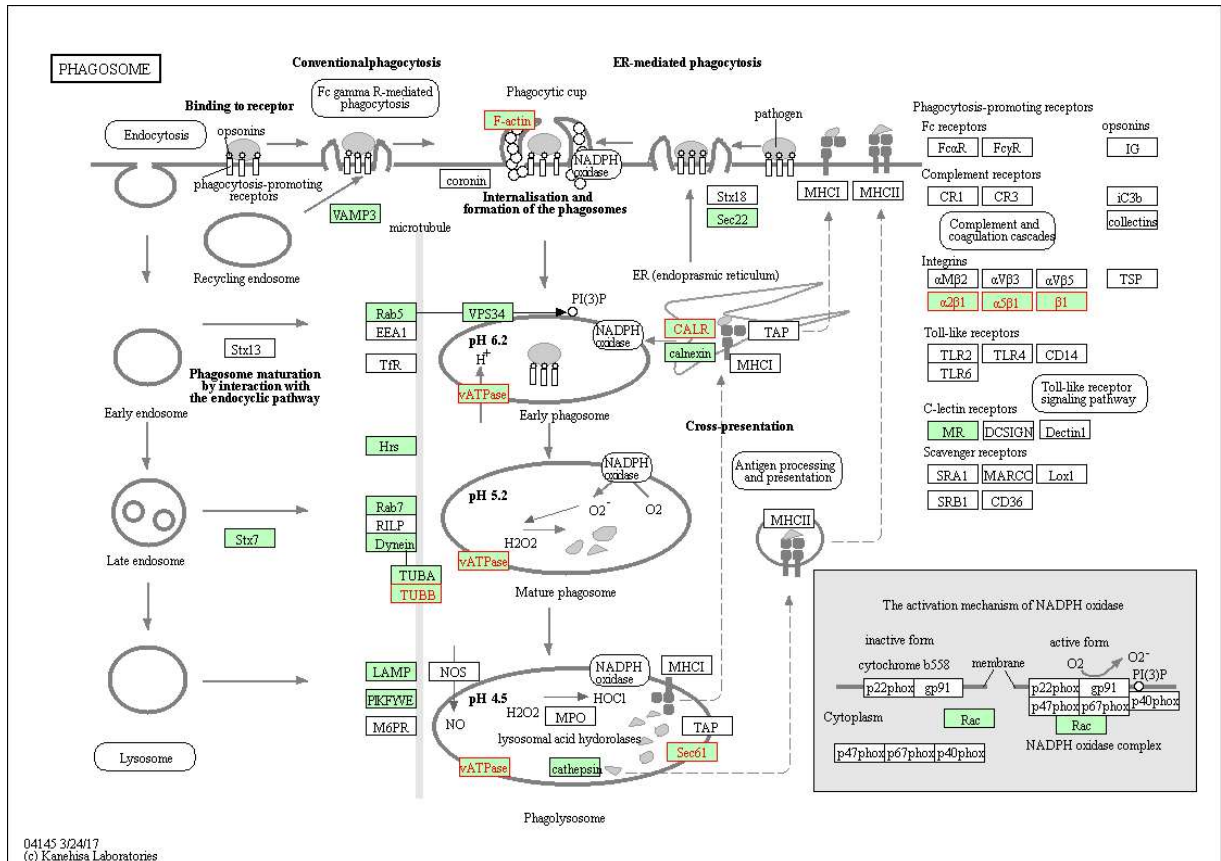


Figura 41 - Mapeamento dos genes que apresentaram diminuição de expressão pela ausência de Smp38 MAPK no KEGG pathway de fagossomo. Os genes regulados negativamente pela ausência de Smp38 MAPK que foram mapeados ao KEGG pathway de fagossomo (smm04145) estão destacados em vermelho.

Quando Smp38 MAPK está silenciada, também foi observada uma diminuição da expressão de genes das vias relacionadas aos fagossomos (Figura 41) e endossomos. Já foi demonstrado que p38 MAPK é a principal molécula de sinalização que induz a atividade leishmanicida em macrófagos pela modulação da biogênese fago-lisossômica, atuando no processo de acidificação e maturação do fagossomo (BANERJEE *et al.*, 2016).

Vermes adultos absorvem nutrientes de duas maneiras distintas: diretamente através da superfície de seu corpo e pela ingestão de sangue no intestino (SKELLY *et al.*, 2014). Além disso, foi sugerido que os lisossomos no sincício gastrodérmico secretam os seus conteúdos, contendo enzimas digestivas, diretamente para o lúmen para auxiliar na digestão dos componentes sanguíneos (HALL *et al.*, 2011). Genes associados com o tráfico de membranas através de compartimentos endocíticos e lisossomos também são expressos nos tecidos da gastroderme, refletindo sua natureza absorptiva (NAWARATNA *et al.*, 2011).

Avelar e colaboradores (2013) verificaram que o silenciamento de Smp38 MAPK em esquistossômulos era persistente nos vermes adultos recuperados após a perfusão de camundongos (AVELAR, 2013). A redução da expressão de proteínas relacionadas aos fagossomos e endossomos pela ausência de Smp38 pode ter promovido alterações nesses compartimentos celulares, que resultaram em dificuldade na alimentação e absorção de nutrientes pelos vermes em que Smp38 foi silenciada e, conseqüentemente, prejudicaram seu desenvolvimento.

Genes relacionados ao metabolismo de purinas também apresentaram expressão diminuída como resultado do silenciamento de Smp38 MAPK (Figura 42). As vias envolvidas no metabolismo de purinas são extremamente reguladas. p38 MAPK, quando ativada promove a proliferação de células progenitoras hematopoiéticas em resposta a estresse em camundongos, ativando o metabolismo de purinas e levando a alterações nos níveis de aminoácidos e metabolitos relacionados às purinas (KARIGANE *et al.*, 2016). *Schistosoma* não utiliza a via *de novo* para a síntese de nucleotídeos (SENFT *et al.*, 1972).

A produção de ovos é um aspecto altamente significativo do parasitismo de *S. mansoni* e a principal causa da patologia da esquistossomose. A capacidade de produção de ovos necessita da síntese de proteínas, RNA e DNA, e conseqüentemente, requer um metabolismo de nucleotídeos de purina ativo tanto como fonte de energia (ATP) como para o fornecimento das bases de purina (SENFT *et al.*, 1972). A diminuição da expressão de genes relacionados ao metabolismo de purinas na ausência de Smp38 MAPK pode, portanto, explicar a redução na ovoposição observada em parasitos silenciados para Smp38 MAPK (AVELAR, 2013).

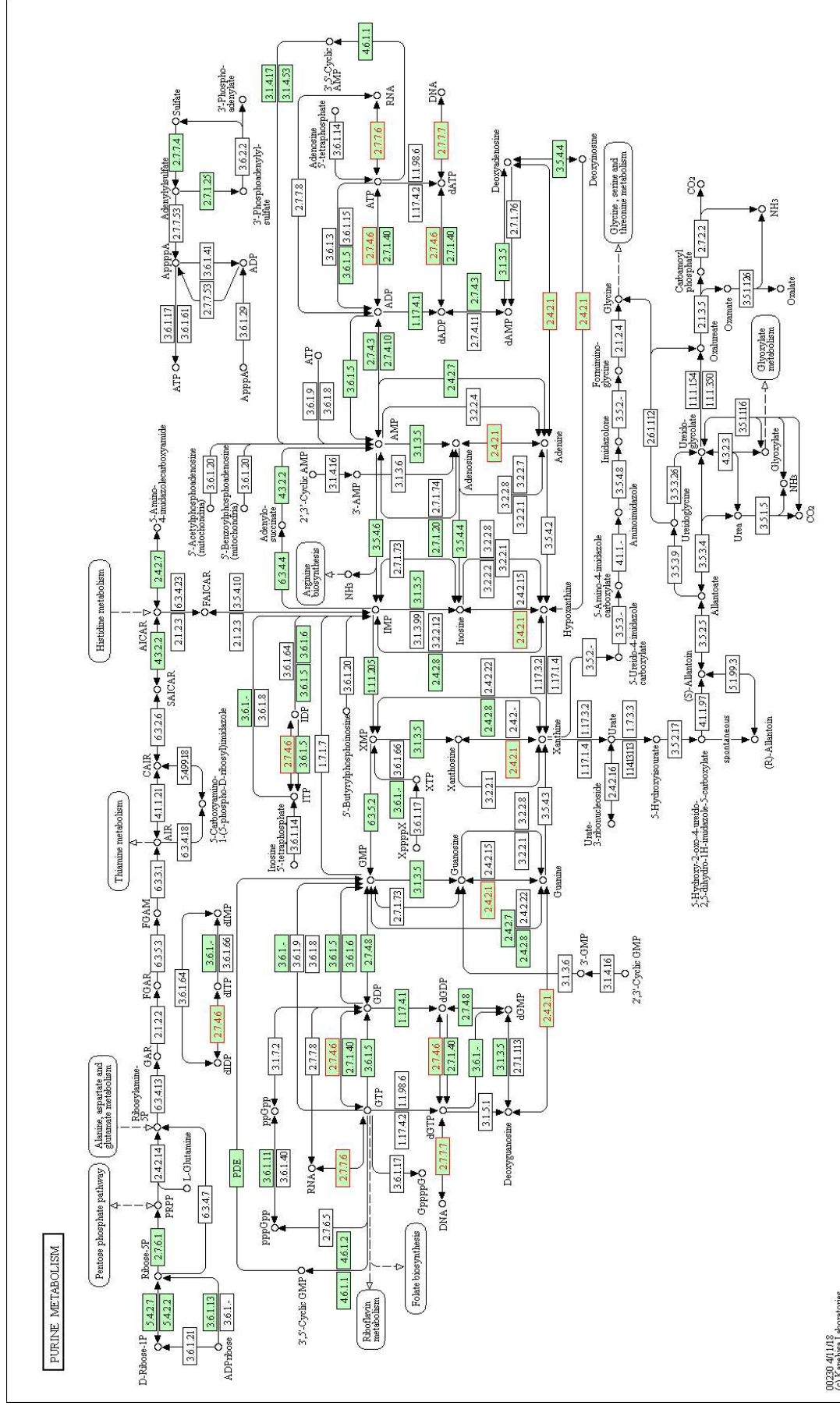


Figura 42 - Mapeamento dos genes que apresentaram diminuição de expressão de Smp38 MAPK no KEGG pathway de metabolismo de purinas. Os genes regulados negativamente pela ausência de Smp38 MAPK que foram mapeados ao KEGG pathway de metabolismo de purinas (smm00230) estão destacados em vermelho.

A via relacionada aos spliceossomos, assim como no silenciamento de SmJNK, também apresentou diversos genes com expressão diminuída em parasitos silenciados para Smp38 (Figura 43), indicando um provável envolvimento também da via de p38 MAPK na regulação dos eventos de *splicing*.

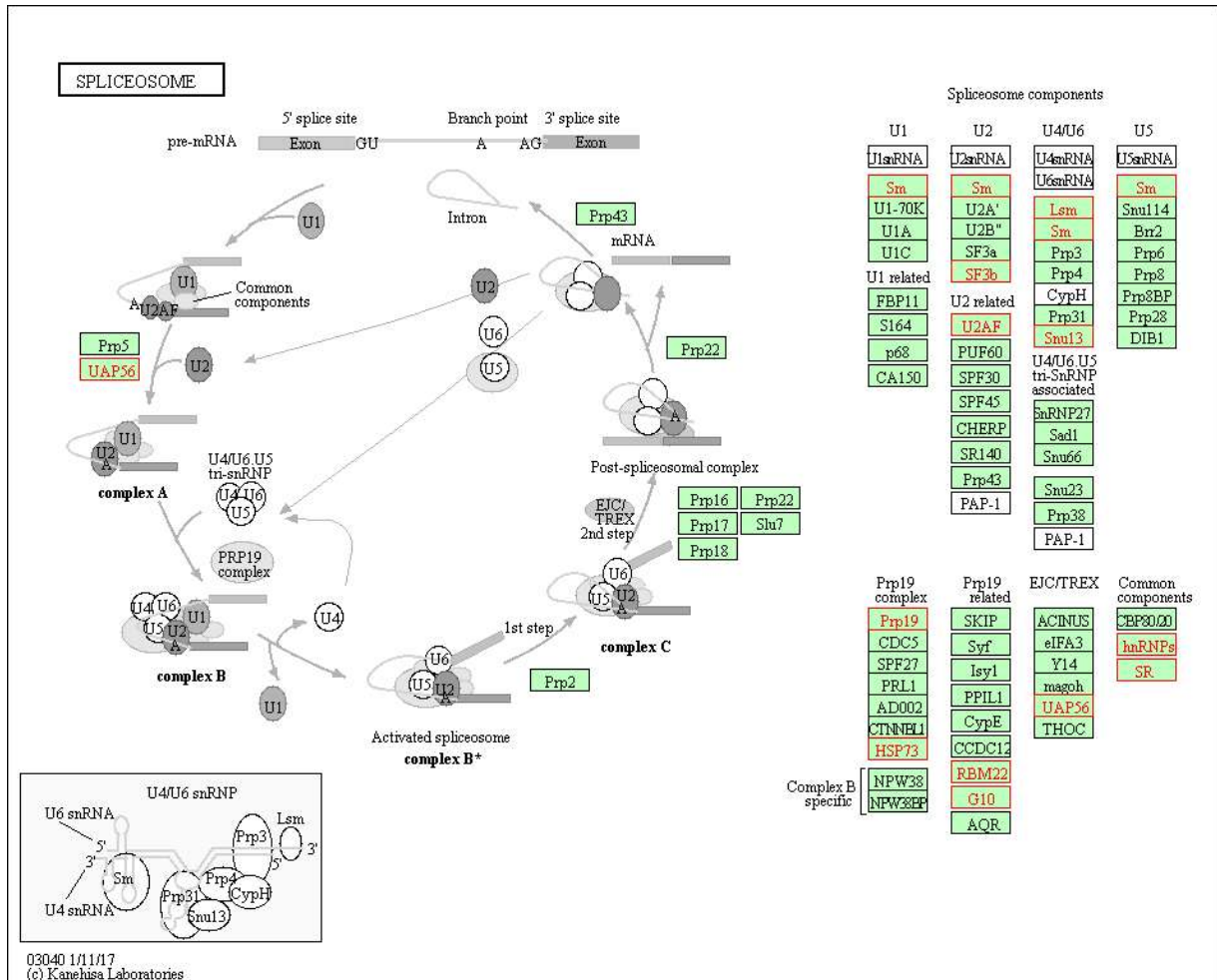


Figura 43 - Mapeamento dos genes que apresentaram diminuição de expressão na ausência de Smp38 MAPK no KEGG *pathway* de spliceossomo. Os genes regulados negativamente pela ausência de Smp38 MAPK que foram mapeados ao KEGG *pathway* de spliceossomo (smm03040) estão destacados em vermelho.

5.9.3 SmCaMK2

As bibliotecas de esquistossômulos expostos ao dsRNA-SmCaMK2 foram analisadas para verificar a presença de DEGs em relação ao controle não tratado com dsRNAs. Para buscar por DEGs em esquistossômulos expostos ao dsRNA-SmCaMK2, o perfil transcricional de esquistossômulos 2 dias após a exposição ao dsRNA-SmCaMK2 foi comparado ao perfil transcricional de esquistossômulos controle não tratados utilizando os programas edgeR e DESeq2. Conforme esperado,

visto a baixa correlação que as bibliotecas apresentavam, foram encontrados apenas 5 DEGs utilizando o pacote edgeR (Figura 44 e Tabela 8) e nenhuma diferença significativa de expressão utilizando o pacote DESeq2 (Figura 44).

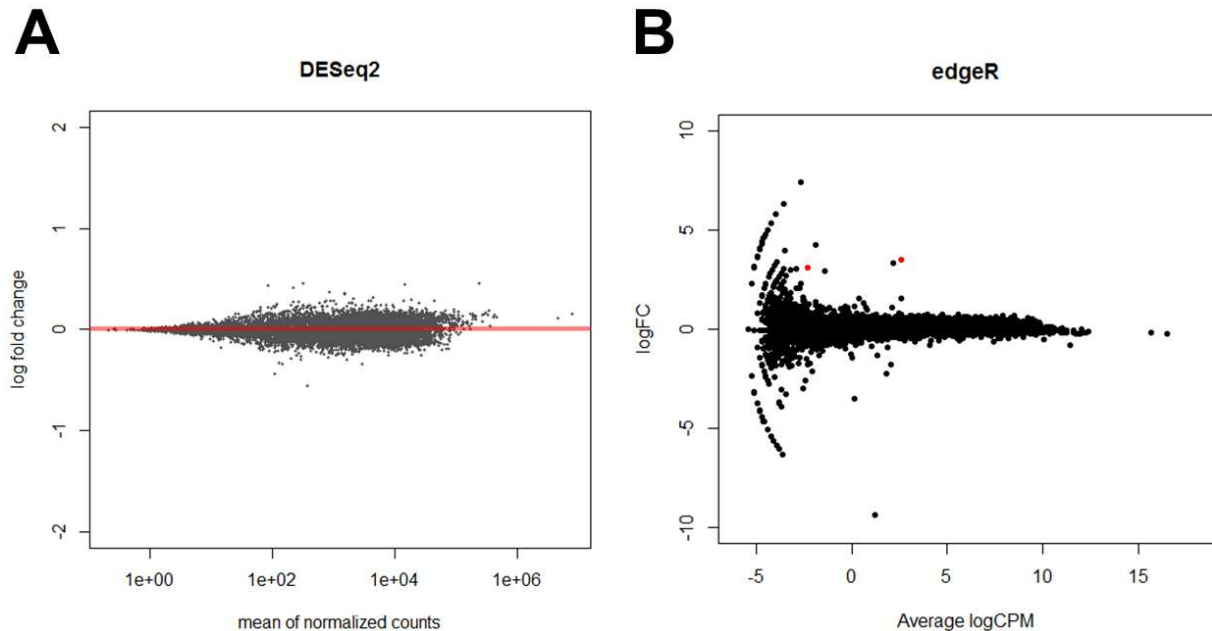


Figura 44 – Análise dos DEGs de SmCaMK2 utilizando os programas DESeq2 e edgeR. DEGs entre controle A versus dsRNA-SmCaMK2 pelo programa DESeq2 (A) e pelo programa edgeR (B) mostrados em um *smear plot*. No *smear plot*, o valor de *log-fold change* para cada gene está plotado contra o valor médio de abundância do gene (logCPM). DEGs considerados significativos estão destacados em vermelho (p -value < 0,01).

Vale ressaltar que a análise dos dados utilizando as três réplicas biológicas, também não detectou nenhuma diferença significativa de expressão utilizando os pacotes edgeR e DESeq2, sendo que as amostras agrupavam por réplica e não por tratamento (dados não mostrados).

Em *C. elegans*, a proteína quinase CaMK2 ativa a via de JNK. Já em *S. mansoni*, foi verificado que CaMK2 não ativa ou não é o único ativador da via JNK. O silenciamento de SmCaMK2 não causa alteração significativa no desenvolvimento dos vermes frente ao sistema imune do hospedeiro definitivo e os vermes adultos recuperados de camundongos infectados com esquistossômulos em que o gene SmCaMK2 foi silenciado apresentam estruturas reprodutivas normais e viáveis, diferentemente do que foi observado para o silenciamento de SmJNK (ANDRADE *et al.*, 2014). A ausência de fenótipo observada, bem como a ausência de DEGs após o tratamento com dsRNA-CaMK2 pode indicar que a função desta proteína está sendo exercida por outras proteínas. Ainda, a ausência de DEGs pode indicar que neste

tempo de exposição (2 dias) os efeitos do RNAi na diminuição de transcritos de SmCaMK2 não refletem uma diminuição nos níveis proteicos de SmCaMK2, e, portanto, as proteínas ainda presentes neste tempo continuam exercendo suas funções de ativação e/ou repressão da expressão. O estabelecimento do tempo em que há diminuição significativa dos níveis desta proteína pode ser realizado por análises de *western blot* utilizando anticorpos específicos. Outra hipótese é de que o turnover dessa proteína seja mais rápido do que os de SmJNK ou Smp38 tornando necessário o knockout do gene ou a utilização de inibidores proteicos específicos para o estudo da função de SmCaMK2 em *S. mansoni*.

Tabela 8 – DEGs em esquistossômulos expostos ao dsRNA-SmCaMK2 quando comparado ao controle não tratado utilizando o pacote edgeR ($p\text{-value} < 0,01$ e $FDR < 0,05$).

SmCaMK2-dsRNA versus Controle									
Gene_ID	logFC	p-value	FDR	Entry	Protein.names	Length (aa)	GO term		
Smp_192030	351.804.031.387.361	1,56E+07	0.00168643952520206	G4VGG8	Uncharacterized protein	121			
Smp_181910	307.756.463.506.365	7,68E+08	0.0415622504199529	C4QQE1	Putative uncharacterized protein	226	GO:0005975; GO:0008422		
Smp_161200	-116.217.715.197.708	1,28E+09	0.0462622309205016	G4VCY2	Putative uncharacterized protein	16			
Smp_150330	-936.905.210.583.987	3,79E+09	0.102393378140296	G4VCY3	Putative uncharacterized protein	16			
Smp_026440	334.609.487.333.976	0.000102427402032092	0.22163241251704	G4VT64	Dpy30-related	90	GO:0000781; GO:0006348; GO:0048188; GO:0051568		

5.9.4 SmERK-1 e SmERK-2

A via de sinalização de ERK representa um potencial alvo de drogas nas terapias contra o câncer e diversos inibidores desta via tem sido testados (SANTARPIA; LIPPMAN; EL-NAGGAR, 2012). Além disso, o receptor de insulina que é um dos ativadores das vias de ERK e PKC, já foi proposto como candidato vacinal contra a esquistossomose (YOU *et al.*, 2009, 2012).

O silenciamento de SmERK-1 e SmERK-2 está relacionado ao desenvolvimento dos órgãos reprodutores e/ou ao acasalamento dos parasitos, visto a diminuição significativa do número de ovos encontrados em fígados de camundongos infectados com esquistossômulos em que esses genes foram silenciados quando comparado ao controle (ANDRADE *et al.*, 2014). Além disso, a modulação da atividade de SmERK pelo inibidor U0126 afeta a motilidade e reduz a sobrevivência de esquistossômulos (RESSURREIÇÃO *et al.*, 2014, 2016). Dado o efeito global da inibição de ERK na homeostase e na produção de ovos de *S. mansoni* seu potencial como alvo de drogas contra *Schistosoma* tem sido destacado.

Andrade e colaboradores (2014) demonstraram que o dsRNA SmERK-1 silenciava os dois genes da subfamília ERK-1 de *S. mansoni* (SmERK-1 e SmERK-2) e foi proposto que as alterações fenotípicas observadas nos parasitos tratados com dsRNA SmERK-1 seriam um efeito do silenciamento dos dois genes da subfamília ERK (ANDRADE *et al.*, 2014). Por este motivo, os dsRNAs de SmERK-1 e SmERK-2 foram utilizados em associação nos experimentos de RNASeq. As bibliotecas de esquistossômulos expostos aos dsRNA-SmERK-1 e SmERK-2 foram analisadas para verificar a presença de DEGs em relação ao controle não tratado com dsRNAs. Para buscar por DEGs em esquistossômulos expostos aos dsRNA-SmERK-1 e SmERK-2, o perfil transcricional de esquistossômulos 2 dias após a exposição aos dsRNA-SmERK-1 e SmERK-2 foi comparado ao perfil transcricional de esquistossômulos controle não tratados utilizando os programas edgeR e DESeq2. Conforme esperado, visto a baixa correlação que as amostras apresentaram, foram encontrados apenas 6 DEGs utilizando o pacote edgeR e apenas 1 DEG utilizando o pacote DESeq2 (Figura 45 e Tabela 9).

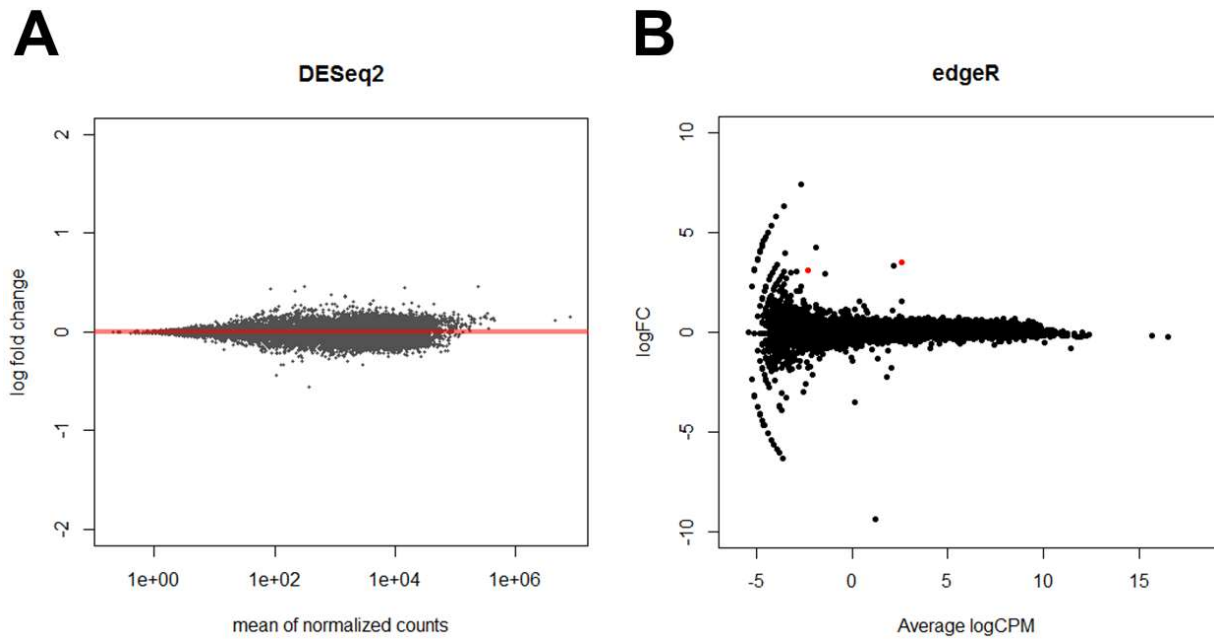


Figura 45 – Análise dos DEGs em parasitos silenciados para SmERK-1 e SmERK-2 utilizando os programas DESeq2 e edgeR. DEGs entre controle A versus dsRNA-SmERK-1 e SmERK-2 pelo programa DESeq2 (A) e pelo programa edgeR (B) mostrados em um *smear plot*. No *smear plot*, o valor de *log-fold change* para cada gene está plotado contra o valor médio de abundância do gene (logCPM). DEGs considerados significativos estão destacados em vermelho ($p\text{-value} < 0,01$).

A análise de DEGs utilizando as três réplicas biológicas também não detectou nenhuma diferença significativa de expressão utilizando os pacotes edgeR e DESeq2 (dados não mostrados).

Diferentemente do que foi previamente visto por nosso grupo em experimentos em menor escala, praticamente não foi observado o silenciamento de SmERK-2 nestes experimentos (Figura 10). A ausência de silenciamento observada para um dos membros da subfamília ERK (SmERK-2) pode justificar a não detecção de DEGs nos experimentos de RNASeq. Os níveis destas proteínas serão posteriormente avaliados por análises de *western blot* utilizando o anticorpo Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2).

Tabela 9 - DEGs em esquistossômulos expostos aos dsRNAs de SmERK-1 e SmERK-2 quando comparado ao controle não tratado utilizando os pacotes edgeR ($p\text{-value} < 0,01$ e $FDR < 0,05$) e DESeq2 ($p\text{-value} < 0,01$).

SmERK- e SmERK-2 dsRNA versus Controle - edgeR									
Gene_ID	logFC	p-value	FDR	Entry	Protein.names	Length (aa)	GO term		
Smp_139580	-831.068.595.373.467	5,11E+06	0.000552992666914554	G4LYM9	Putative uncharacterized protein	261	GO:0016021		
Smp_192030	303.266.248.258.907	3,31E+08	0.0179019377504636	G4VGG8	Uncharacterized protein	121			
Smp_161200	-116.843.330.601.329	7,97E+08	0.0287475310737861	G4VCY2	Putative uncharacterized protein	16			
Smp_197380	778.717.547.143.686	1,15E+07	0.0309717353808222	G4VEK0	Abhydrolase domain-containing protein 4 (S33 family)	60	GO:0016021; GO:0016787		
Smp_165510	225.343.211.271.119	1,52E+09	0.0329961090690753	G4V9H9	Putative uncharacterized protein	111	GO:0016021		
SmERK- e SmERK-2 dsRNA versus Controle – DESeq2									
Gene_ID	log2FoldChange	pvalue	padj	Entry	Protein.names	Length (aa)	GO term		
Smp_081430	-0.625167935336048	2,53E+06	0.000266644522790043	G4LV77	Short chain dehydrogenase, putative	255	GO:0016491		

5.10 Considerações finais

A ocorrência de variações e inconsistências nos experimentos de RNAi em *S. mansoni* e outros helmintos tem sido amplamente observada e discutida na literatura (GELDHOF *et al.*, 2007). Estas discrepâncias podem estar relacionadas diretamente à técnica de RNAi, por exemplo, sequências dos dsRNAs ou aos diferentes métodos de entrega dos dsRNAs. Podem ainda estar relacionadas aos métodos de cultivo, como a acidificação do meio, a temperatura e a quantidade de parasitos. Além disso, é importante ressaltar que cada gene responde ao tratamento com dsRNAs de forma diferente, dependendo do *turnover* do mRNA e de seus produtos (GELDHOF *et al.*, 2007; MOURÃO *et al.*, 2009; STEFANIĆ *et al.*, 2010). Estas variações já foram observadas em nosso laboratório, no qual um experimento com os dsRNAs e as condições de cultivo exatamente iguais quando realizados em larga escala apresentam resultados diferentes dos obtidos em menor escala. Estes resultados enfatizam a importância de se realizar uma cinética de silenciamento utilizando estritamente os mesmos parâmetros e controles experimentais, além de, sempre que possível, verificar se os níveis de proteína também se encontram alterados.

Ainda, as diferenças na absorção individual do dsRNA pela população de parasitos estudada é um dos fatores que pode explicar a grande variabilidade nos dados de RNASeq obtidos (MOURÃO *et al.*, 2009). O número de réplicas é um dos fatores mais importantes no design de um experimento de RNASeq visando estudar a expressão diferencial de genes entre duas ou mais condições. Sendo que o número de repetições a serem realizadas depende tanto da variabilidade técnica dos métodos utilizados como da variabilidade biológica do sistema em estudo, bem como do poder estatístico desejado. Este fato aponta para a necessidade de realização de um número maior de réplicas biológicas para garantir maior poder estatístico na detecção dos DEGs (CONESA *et al.*, 2016). Rajkumar e colaboradores documentaram que existe um viés em experimentos de RNASeq que utilizam agrupamento de amostras com altas taxas de falsos positivos e baixos valores preditivos positivos, indicando uma utilidade limitada da estratégia de agrupamento de amostras e reforçando a necessidade do aumento do número de réplicas biológicas em experimentos de RNASeq (RAJKUMAR *et al.*, 2015).

Além disso, é também importante avaliar a qualidade global dos dados de RNASeq gerados, verificando se há reprodutibilidade entre réplicas e possíveis efeitos de *batch*. A reprodutibilidade entre repetições técnicas deve ser alta, mas não existe um padrão para as repetições biológicas, pois isso depende da heterogeneidade do sistema experimental em estudo. Entretanto, repetições biológicas de uma mesma condição devem se agrupar em análises de componentes principais (PCA) e de correlação (CONESA *et al.*, 2016).

Após avaliação das amostras a detecção de DEGs foi realizada pelos pacotes DESeq2 e/ou edgeR, que são métodos para análise de leituras quantitativas (sob a forma de contagens) a partir de experimentos de *high-throughput*: tais como RNASeq e baseiam-se na distribuição binomial negativa. Durante o alinhamento, as *reads* são atribuídas a uma determinada *feature* que representa um transcrito, no caso do RNASeq. A contagem do número de *reads* que alinha em cada *feature* é uma aproximação da abundância de transcrição daquele determinado transcrito. Os pacotes DESeq2 e edgeR estimam a dispersão de cada gene e analisam se há expressão diferencial entre as condições definidas, que neste trabalho foi a comparação entre amostra tratada com dsRNA e o controle não tratado. O resultado final desta etapa é a listagem dos genes que se encontram diferencialmente expressos entre as duas condições que estão sendo comparadas (ZHANG *et al.*, 2014). Rajkumar e colaboradores também destacaram a necessidade do uso combinado de métodos de análise e da validação dos DEGs identificados em experimentos de RNASeq (RAJKUMAR *et al.*, 2015).

O pacote DESeq2 utiliza tabelas de contagem de *reads*, com as linhas correspondentes a genes e as colunas a cada uma das bibliotecas geradas. As contagens representam o número total de *reads* alinhadas em cada *locus* genômico. Uma característica particular do pacote edgeR é a possibilidade de estimar a variação biológica específica, mesmo em experimentos com múltiplos fatores, mas com um pequeno número de réplicas. O pacote edgeR tem habilidade de modelar a variação específica de um transcrito, mesmo em amostras pequenas, uma capacidade essencial para priorizar os genes que têm variações consistentes entre as réplicas (CHEN; LUN; SMYTH, 2014). Adicionalmente, já foi descrito que o pacote edgeR apresenta maior sensibilidade e especificidade na detecção de DEGs quando

comparado aos métodos de análise Cuffdiff2, DESeq2 e TSPM (RAJKUMAR *et al.*, 2015). O pacote DESeq2 fornece métodos para testar a expressão diferencial utilizando redução de estimativa para dispersões e *fold change* apurando a estabilidade e a interpretação das estimativas, o que permite uma análise mais quantitativa, focada na força e não na mera presença de expressão diferencial (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014).

Para uma melhor compreensão dos processos regulados pelas proteínas quinases SmJNK e Smp38, os bancos de dados do UniProt, GO e KEGG foram utilizados para atribuir funções biológicas aos DEGs encontrados. Observou-se que grande parte dos DEGs codificam proteínas putativas, hipotéticas ou com função ainda desconhecida. Além dos vários DEGs anotados e potencialmente correlacionados aos fenótipos previamente descritos para parasitos silenciados para MAPKs, várias proteínas ainda sem função determinada podem, ainda, ter um papel fundamental nos processos biológicos regulados pelas proteínas quinases SmJNK e Smp38, podendo, inclusive, ser parasito-específicas e, portanto, potenciais alvos para o desenvolvimento de novas drogas.

Uma vez que as proteínas MAPKs foram identificadas como bons alvos para o tratamento da esquistossomose e que os domínios catalíticos das quinases são conservados, a identificação de genes parasito-específicos regulados por estas enzimas torna-se extremamente importante. SmJNK, por exemplo, é o único membro da subfamília JNK codificado pelo genoma de *S. mansoni*. Esta proteína possui três potenciais homólogos em humanos formando um clado monofilético, com alto valor de apoio, com a proteína SmJNK o que deve ser levado em consideração durante o desenvolvimento de uma possível droga anti-JNK de *S. mansoni* (GAVA, 2013).

Os genes sem função descrita identificados podem estar relacionados ou serem os responsáveis pelos fenótipos anteriormente observados quando foi realizado o silenciamento das MAPKs e exposição dos parasitos frente ao sistema imune do hospedeiro: danos no tegumento dos vermes, sistema reprodutor imaturo e diminuição da postura de ovos (ANDRADE *et al.*, 2014; AVELAR, 2013). Assim, a caracterização funcional dos alvos de regulação dessas proteínas quinases pode revelar novas estratégias de combate a estes parasitos, além de contribuir para o melhor entendimento dos processos de desenvolvimento e reprodução do parasito.

Observamos ainda DEGs em comum para o silenciamento de SmJNK e Smp38 MAPK, sendo 365 genes com expressão diminuída e 140 com expressão aumentada (Figura 46). Lidar com condições ambientais adversas é uma necessidade fundamental para todos os organismos. Portanto, não é surpreendente que vias de proteína quinases ativadas por estresse estejam entre os módulos de sinalização mais antigos e conservados em metazoários. As vias de JNK e p38 são ativadas por uma variedade de condições ambientais adversas, resultando na modificação da atividade de diversos e numerosos alvos (TWUMASI-BOATENG *et al.*, 2012). Há diversos trabalhos que demonstram que as vias de sinalização de ERK, JNK e p38 MAPK atuam de forma cooperativa, amplificando e integrando sinais de diversos estímulos e promovendo a resposta fisiológica apropriada, incluindo proliferação celular, diferenciação, desenvolvimento, respostas inflamatórias e apoptose em células de mamíferos (ZHANG; LIU, 2002).

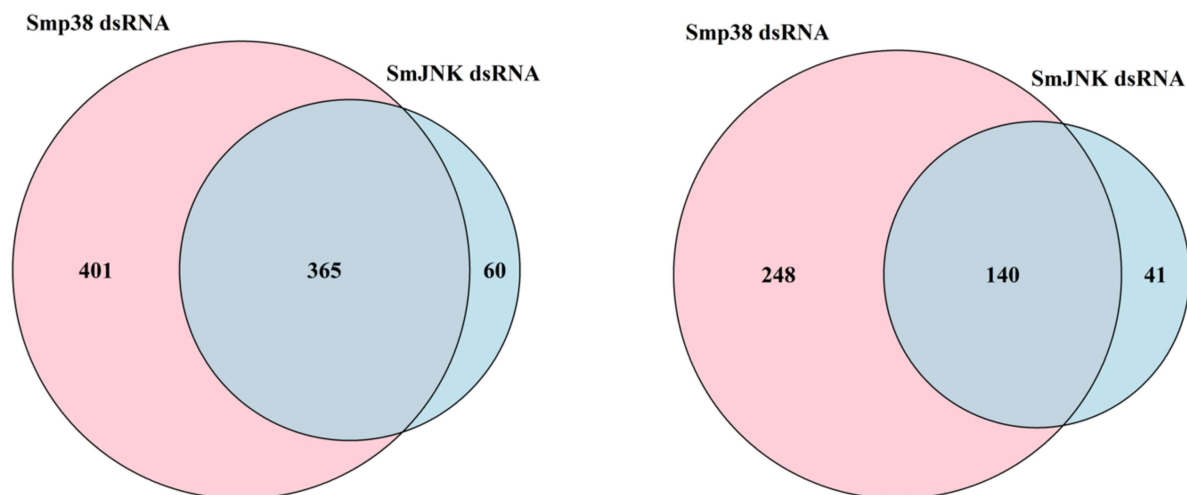


Figura 46 - Diagrama de Venn do número de DEGs regulados em comum em parasitos silenciados para SmJNK e Smp38. Diagrama de Venn representando o número de genes com diminuição (A) e aumento (B) de expressão após a exposição aos dsRNAs de SmJNK e Smp38 MAPK.

As vias de JNK e p38 MAPK compartilham vários reguladores à montante e, conseqüentemente, existem múltiplos estímulos que ativam simultaneamente ambas as vias (WAGNER; NEBRED, 2009). Neste contexto, Huang e colaboradores (2009) já sugeriram que, uma vez que JNK e p38 são ativados por um grande número de receptores, a inibição específica de uma das vias de sinalização ou de um dos alvos regulados por JNK ou p38, provavelmente consistirá de uma estratégia anti-inflamatória mais eficaz e seletiva. O mesmo racional pode ser estendido para o

desenvolvimento de novas drogas antiparasitárias, portanto, um estudo aprofundado dos DEGs identificados neste trabalho pode revelar novos alvos para o combate da esquistossomose (HUANG; SHI; CHI, 2009).

Ainda, após a resolução estrutural destas MAPKs pode ser possível a identificação de características exclusivas das enzimas do parasito, assim como previamente descrito para o potencial alvo para tratamento da esquistossomose, SmHDAC8. A estrutura de SmHDAC8 revelou alterações estruturais específicas em seu sítio catalítico que a difere das HDAC humanas (MAREK *et al.*, 2013). Estas diferenças estruturais permitiram o desenvolvimento de uma série de inibidores específicos para a enzima do parasito que estão sendo testados como potenciais drogas anti-*Schistosoma*. Atualmente, estamos envolvidos na caracterização estrutural das proteínas MAPKs SmERK-1, SmERK-2, SmJNK e Smp38 e na triagem de compostos que possam ser seletivos para essas enzimas do parasito.

6 Conclusão

- O sistema em estudo apresentou grande variabilidade entre réplicas biológicas, portanto, a avaliação criteriosa da qualidade das bibliotecas geradas é um passo essencial para as análises posteriores;
- É recomendada a utilização de mais de uma ferramenta para a análise de DEGs;
- Fatores extrínsecos geram maior variabilidade experimental do que a maioria dos controles inespecíficos utilizados em RNAi; portanto GFP e mCherry são controles adequados para ensaios de RNAi em esquistossômulos;
- É necessário ter conhecimento sobre a biologia do parasito em estudo, pois nem sempre os genes com expressão mais alterada são os genes biologicamente mais responsivos e responsáveis pelos fenótipos observados;
- Grande parte dos DEGs identificados, 140 e 297 DEGs regulados pela ausência de SmJNK e Smp38, respectivamente, codificam proteínas putativas, hipotéticas ou com função ainda desconhecida;

7 Perspectivas

- Verificar por *western blot*, o tempo de maior diminuição dos níveis proteicos de SmERK após o silenciamento por RNAi em esquistossômulos;
- Gerar, sequenciar e analisar bibliotecas de RNASeq visando elucidar os genes alvo de regulação da via de SmERK-1e SmERK-2 em *S. mansoni*;
- Gerar e analisar o fosfoproteoma de esquistossômulos em que as proteínas quinases SmERK-1/2, SmJNK e Smp38 foram silenciadas por RNAi (projeto em fase de padronização em parceria com o grupo do Dr. Fabricio Marchini da Plataforma de Proteômica do Instituto Carlos Chagas - FIOCRUZ/PR);
- Realizar a integração dos dados de RNASeq com os dados do fosfoproteoma, o que possibilitará uma melhor compreensão dessas vias e a busca das possíveis funções desses alvos de regulação na sobrevivência, reprodução e adaptação do parasito;
- Analisar dentre os DEGs identificados, fenótipos já descritos para os ortólogos em *C. elegans* no banco de dados RNAiDB;
- Realizar um *screening* de RNAi com DEGs identificados, buscando genes que possam estar relacionados com os fenótipos anteriormente observados;
- Expressar e purificar as proteínas quinases SmERK-1, SmERK-2, SmJNK e Smp38 MAPK para a resolução das estruturas dessas proteínas por cristalografia, afim de identificar diferenças estruturais entre as proteínas do parasito e do hospedeiro humano, possibilitando assim o desenho racional de drogas (projeto em andamento em parceria com a Universidade de Nottingham, desenvolvido pelas doutorandas Naiara Tavares e Izabella Batista);
- Utilizar o banco de dados do Pubchem/ChEMBL, que fornece informações sobre as atividades biológicas de pequenas moléculas, para priorizar os inibidores a serem triados para as quinases em estudo;
- Expressar e purificar as proteínas quinases SmERK-1, SmERK-2, SmJNK e Smp38 MAPK para a triagem de uma biblioteca de inibidores de quinases (projeto em andamento em parceria com a Universidade de Nottingham, desenvolvido pelas doutorandas Naiara Tavares e Izabella Batista).

8 Referências bibliográficas

- AKIMOTO, T. Exercise Stimulates Pgc-1 Transcription in Skeletal Muscle through Activation of the p38 MAPK Pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 20, p. 19587–19593, 17 mar. 2005.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403–10, 5 out. 1990.
- ALVAREZ, L. I.; MOTTIER, M. L.; LANUSSE, C. E. Drug transfer into target helminth parasites. **Trends in Parasitology**, v. 23, n. 3, p. 97–104, mar. 2007.
- AMIRI, P. et al. Tumour necrosis factor alpha restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice. **Nature**, v. 356, n. 6370, p. 604–7, 16 abr. 1992.
- ANDRADE, L. F. DE et al. Regulation of *Schistosoma mansoni* Development and Reproduction by the Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 6, p. e2949, jun. 2014.
- ANDRADE, L. F. et al. Eukaryotic Protein Kinases (ePKs) of the Helminth Parasite *Schistosoma mansoni*. **BMC Genomics**, v. 12, n. 1, p. 215, 6 dez. 2011.
- ANDRADE, L. F. **Proteínas quinase eucarióticas (ePKs) de *Schistosoma* spp: identificação, anotação funcional e seleção de alvos para o desenvolvimento de droga.** [s.l.] Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, MG, 2012.
- ASHBURNER, M. et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. **Nature genetics**, v. 25, n. 1, p. 25–9, maio 2000.
- AVELAR, L. DAS G. A. **O papel da via de sinalização p38 MAPK no desenvolvimento do *Schistosoma mansoni* (Platyhelminthes:Trematoda) e na proteção contra o estresse oxidativo.** [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.
- BAGOWSKI, C. P.; XIONG, W.; FERRELL, J. E. c-Jun N-terminal kinase activation in *Xenopus laevis* eggs and embryos. A possible non-genomic role for the JNK signaling pathway. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 2, p. 1459–65, 12 jan. 2001.
- BANERJEE, S. et al. Attenuated *Leishmania* induce pro-inflammatory mediators and influence leishmanicidal activity by p38 MAPK dependent phagosome maturation in *Leishmania donovani* co-infected macrophages. **Scientific Reports**, v. 6, n. September 2015, p. 1–14, 1 abr. 2016.
- BECKMANN, S.; GREVELDING, C. G. Imatinib has a fatal impact on morphology, pairing stability and survival of adult *Schistosoma mansoni* in vitro. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 5, p. 521–526, abr. 2010.

- BERRIMAN, M. et al. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. **Nature**, v. 460, n. 7253, p. 352–8, jul. 2009.
- BÉVORT, M.; LEFFERS, H. Down regulation of ribosomal protein mRNAs during neuronal differentiation of human NTERA2 cells. **Differentiation**, v. 66, n. 2–3, p. 81–92, out. 2000.
- BOAG, P. R.; NEWTON, S. E.; GASSER, R. B. Molecular aspects of sexual development and reproduction in nematodes and schistosomes. **Advances in parasitology**, v. 50, p. 153–98, jan. 2001.
- BORTOLUZZI, S. et al. Differential expression of genes coding for ribosomal proteins in different human tissues. **Bioinformatics**, v. 17, n. 12, p. 1152–1157, 2001.
- BOTROS, S. S.; BENNETT, J. L. Praziquantel resistance. **Expert opinion on drug discovery**, v. 2, n. s1, p. S35–40, out. 2007.
- BOTTIEAU, E. et al. Imported Katayama fever: clinical and biological features at presentation and during treatment. **The Journal of infection**, v. 52, n. 5, p. 339–45, maio 2006.
- BOYLE, J. P. et al. Using RNA interference to manipulate endogenous gene expression in *Schistosoma mansoni* sporocysts. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 128, n. 2, p. 205–215, maio 2003.
- BOYLE, S. N.; KOLESKE, A. J. Dissecting kinase signaling pathways. **Drug Discovery Today**, v. 12, n. 17–18, p. 717–24, 2007.
- BRUUN, B.; AAGAARD-HANSEN, J. **The social context of schistosomiasis and its control: an introduction and annotated bibliography.**
- BURO, C. et al. Imatinib treatment causes substantial transcriptional changes in adult *Schistosoma mansoni* in vitro exhibiting pleiotropic effects. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 6, p. e2923, jun. 2014.
- BUSTIN, S. A et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 1 abr. 2009.
- CHEEVER, A. W.; HOFFMANN, K. F.; WYNN, T. A. Immunopathology of schistosomiasis mansoni in mice and men. **Immunology today**, v. 21, n. 9, p. 465–6, set. 2000.
- CHEN, X. et al. Identification of miR-26a as a Target Gene of Bile Acid Receptor GPBAR-1/TGR5. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0131294, 24 jun. 2015.
- CHEN, Y.; LUN, A. T. L.; SMYTH, G. K. Differential expression analysis of complex RNA-seq experiments using edgeR. In: DATTA, S.; NETTLETON, D. S. (Eds.). **Statistical Analysis of Next Generation Sequence Data**. New York, NY: Springer, 2014. p. 51–74.

- COELI, R. et al. Praziquantel Treatment Decreases *Schistosoma mansoni* Genetic Diversity in Experimental Infections. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 12, p. e2596, jan. 2013.
- COLLINS, J. J.; NEWMARK, P. A. It's No Fluke: The Planarian as a Model for Understanding Schistosomes. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 7, p. 1–5, 2013.
- CONESA, A. et al. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. **Genome Biol**, v. 17, n. 1, p. 13, 26 dez. 2016.
- CONSORTIUM, F. A. et al. The *Schistosoma japonicum* genome reveals features of host-parasite interplay. **Nature**, v. 460, n. 7253, p. 345–51, 16 jul. 2009.
- CUADRADO, A.; NEBREDÁ, A. R. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. **The Biochemical journal**, v. 429, n. 3, p. 403–17, 1 ago. 2010.
- DAVIES, S. J.; SHOEMAKER, C. B.; PEARCE, E. J. A Divergent Member of the Transforming Growth Factor $\sim\beta$ Receptor Family from *Schistosoma mansoni* Is Expressed on the Parasite Surface Membrane. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 18, p. 11234–11240, 1998.
- DEACON, K. p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Mediates Cell Death and p21-Activated Kinase Mediates Cell Survival during Chemotherapeutic Drug-induced Mitotic Arrest. **Molecular Biology of the Cell**, v. 14, n. 5, p. 2071–2087, 1 maio 2003.
- DISSOUS, C.; AHIER, A.; KHAYATH, N. Protein tyrosine kinases as new potential targets against human schistosomiasis. **BioEssays news and reviews in molecular cellular and developmental biology**, v. 29, n. 12, p. 1281–1288, 2007.
- DOBIN, A. et al. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. **Bioinformatics**, v. 29, n. 1, p. 15–21, 1 jan. 2013.
- DOENHOFF, M. J. et al. Praziquantel: its use in control of schistosomiasis in sub-Saharan Africa and current research needs. **Parasitology**, v. 136, n. 13, p. 1825–35, nov. 2009.
- DONADEU, M. et al. Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiases: number of people treated in 2015. **Releve epidemiologique hebdomadaire**, v. 91, n. 49–50, p. 585–95, 9 fev. 2016.
- ENGSTRÖM, P. G. et al. Systematic evaluation of spliced alignment programs for RNA-seq data. **Nature methods**, v. 10, n. 12, p. 1185–91, 2013.
- EURLINGS, I. M. J. et al. Involvement of c-Jun N-Terminal Kinase in TNF- α -Driven Remodeling. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 56, n. 3, p. 393–401, mar. 2017.

- FENWICK, A.; WEBSTER, J. P.; JOANNE, P. Schistosomiasis: challenges for control, treatment and drug resistance. **Current opinion in infectious diseases**, v. 19, n. 6, p. 577–82, dez. 2006.
- FIELDING, A. B.; DEDHAR, S. The mitotic functions of integrin-linked kinase. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 28, n. 1–2, p. 99–111, 20 jun. 2009.
- FIRE, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 806–11, 19 fev. 1998.
- GAVA, S. G. **Estudo funcional da proteína quinase JNK de *Schistosoma mansoni* através de expressão heteróloga no organismo modelo *Caenorhabditis elegans***. [s.l.] Centro de Pesquisas René Rachou, 2013.
- GELDHOF, P. et al. RNA interference in parasitic helminths: Current situation, potential pitfalls and future prospects. **Parasitology**, v. 134, n. 5, p. 609–619, 4 maio 2007.
- GELMEDIN, V. et al. Evidence for Integrin – Venus Kinase Receptor 1 Alliance in the Ovary of *Schistosoma mansoni* Females Controlling Cell Survival. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 1, p. e1006147, 23 jan. 2017.
- GERENU, G. et al. Modulation of BDNF cleavage by plasminogen-activator inhibitor-1 contributes to Alzheimer’s neuropathology and cognitive deficits. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, 2017.
- GONZÁLEZ-MIGUEL, J. et al. Plasmin in Parasitic Chronic Infections: Friend or Foe? **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 4, p. 325–335, 2016.
- GRANT, G. R. et al. Comparative analysis of RNA-Seq alignment algorithms and the RNA-Seq unified mapper (RUM). **Bioinformatics**, v. 27, n. 18, p. 2518–2528, 2011.
- GROSSO, A. R. et al. Tissue-specific splicing factor gene expression signatures. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 15, p. 4823–4832, 2008.
- GRYSEELS, B. Schistosomiasis. **Infectious disease clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 383–97, 13 jun. 2012.
- GUIDI, A. et al. Application of RNAi to Genomic Drug Target Validation in Schistosomes. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 5, p. 1–22, maio 2015.
- HAAS, W. et al. *Schistosoma mansoni* cercariae: stimulation of acetabular gland secretion is adapted to the chemical composition of mammalian skin. **The Journal of parasitology**, v. 83, n. 6, p. 1079–85, dez. 1997.
- HAGEN, J.; SCHEERLINCK, J.-P. P. Y.; GASSER, R. B. Knocking down schistosomes - promise for lentiviral transduction in parasites. **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 7, p. 324–

332, 28 abr. 2015.

HALL, S. L. et al. Insights into blood feeding by schistosomes from a proteomic analysis of worm vomitus. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 179, n. 1, p. 18–29, 2011.

HAMIDOU SOUMANA, I. et al. Comparative gene expression of *Wigglesworthia* inhabiting non-infected and *Trypanosoma brucei* gambiense-infected *Glossina palpalis gambiensis* flies. **Frontiers in microbiology**, v. 5, n. NOV, p. 620, 2014.

HAN, Z.-G. et al. *Schistosoma* genomics: new perspectives on schistosome biology and host-parasite interaction. **Annual review of genomics and human genetics**, v. 10, p. 211–40, jan. 2009.

HANKS, S. K.; QUINN, A. M.; HUNTER, T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. **Science**, v. 241, n. 4861, p. 42–52, 1 jul. 1988.

HANNON, G. J. RNA interference. **Nature**, v. 418, n. 6894, p. 244–251, 11 jul. 2002.

HANSEN, K. D.; IRIZARRY, R. A.; WU, Z. Removing technical variability in RNA-seq data using conditional quantile normalization. **Biostatistics**, v. 13, n. 2, p. 204–216, 1 abr. 2012.

HOLLIDAY, L. S. Vacuolar H⁺-ATPase: An Essential Multitasking Enzyme in Physiology and Pathophysiology. **New Journal of Science**, v. 2014, 2014.

HUANG, G.; SHI, L. Z.; CHI, H. Regulation of JNK and p38 MAPK in the immune system: Signal integration, propagation and termination. **Cytokine**, v. 48, n. 3, p. 161–169, dez. 2009.

HUANG, X. et al. JNK2 Participates in Spindle Assembly during Mouse Oocyte Meiotic Maturation. **Microscopy and Microanalysis**, v. 17, n. 02, p. 197–205, 31 mar. 2011.

HÜTTEMANN, M. et al. Regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation through cell signaling. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1773, n. 12, p. 1701–1720, dez. 2007.

JOHNSON, G. L. et al. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. **Science (New York, N.Y.)**, v. 298, n. 5600, p. 1911–2, 6 dez. 2002.

JOHNSON, G. L.; LAPADAT, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. **Science (New York, N.Y.)**, v. 298, n. 5600, p. 1911–2, dez. 2002.

JORNAYVAZ, F.; SHULMAN, G. Regulation of mitochondrial biogenesis. **Essays Biochem**, v. 47, p. 69–84, 2010.

KANEHISA, M. et al. The KEGG resource for deciphering the genome. **Nucleic acids**

research, v. 32, n. Database issue, p. D277-80, 2004.

KARIGANE, D. et al. p38 α Activates Purine Metabolism to Initiate Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Cycling in Response to Stress. **Cell Stem Cell**, v. 19, n. 2, p. 192–204, ago. 2016.

KIMOTO, K. et al. p38 MAPK Mediates the Expression of Type I Collagen Induced by TGF- β 2 in Human Retinal Pigment Epithelial Cells ARPE-19. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 45, n. 7, p. 2431, 1 jul. 2004.

KISSING, S. et al. Vacuolar ATPase in phagosome-lysosome fusion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 22, p. 14166–14180, 2015.

KNIGHT, M. et al. Epigenetic modulation, stress and plasticity in susceptibility of the snail host, *Biomphalaria glabrata*, to *Schistosoma mansoni* infection. **International Journal for Parasitology**, v. 46, n. 7, p. 389–394, 2016.

KREUNIN, P. et al. Differential expression of ribosomal proteins in a human metastasis model identified by coupling 2-D liquid chromatography and mass spectrometry. **Cancer Genomics and Proteomics**, v. 4, n. 5, p. 329–339, 2007.

LAMBERTUCCI, J. R. Acute schistosomiasis: clinical, diagnostic and therapeutic features. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 35, n. 5, p. 399–404, 1 out. 1993.

LEE, K. S. et al. JNK/FOXO-mediated neuronal expression of fly homologue of peroxiredoxin II reduces oxidative stress and extends life span. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 43, p. 29454–29461, 2009.

LI, X. et al. Enhanced cytotoxicity and activation of ROS-dependent c-Jun NH 2-terminal kinase and caspase-3 by low doses of tetrandrine-loaded nanoparticles in Lovo cells - A possible Trojan strategy against cancer. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 75, n. 3, p. 334–340, 2010.

LIANG, Y. S. et al. Genetic analysis of praziquantel resistance in *Schistosoma mansoni*. **The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health**, v. 34, n. 2, p. 274–80, jun. 2003.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–8, dez. 2001.

LONG, T. et al. Structure-Bioactivity Relationship for Benzimidazole Thiophene Inhibitors of Polo-Like Kinase 1 (PLK1), a Potential Drug Target in *Schistosoma mansoni*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. e0004356, 2016.

- LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, v. 15, n. 12, p. 1–21, 2014.
- LOVERDE, P. T. et al. *Schistosoma mansoni* genome project: an update. **Parasitology International**, v. 53, n. 2, p. 183–192, 2004.
- MACDONALD, K. et al. A constitutively active G protein-coupled acetylcholine receptor regulates motility of larval *Schistosoma mansoni*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 202, n. 1, p. 29–37, 2015.
- MAGER, W. H. Control of ribosomal protein gene expression. **Biochimica et biophysica acta**, v. 949, n. 1, p. 1–15, 25 jan. 1988.
- MANN, V. H. et al. Establishing transgenic schistosomes. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 8, p. 1–7, 2011.
- MAREK, M. et al. Structural basis for the inhibition of histone deacetylase 8 (HDAC8), a key epigenetic player in the blood fluke *Schistosoma mansoni*. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 9, p. e1003645, jan. 2013.
- MARTINEZ, N. M. et al. Widespread JNK-dependent alternative splicing induces a positive feedback loop through CELF2-mediated regulation of MKK7 during T-cell activation. **Genes & Development**, v. 29, n. 19, p. 2054–2066, 1 out. 2015.
- MEBIUS, M. M. et al. Interference with the Host Haemostatic System by Schistosomes. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 12, p. 1–8, 2013.
- MEI, H.; LOVERDE, P. T. *Schistosoma mansoni*: the developmental regulation and immunolocalization of antioxidant enzymes. **Experimental parasitology**, v. 86, n. 1, p. 69–78, maio 1997.
- MELMAN, S. D. et al. Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 8, p. e504, jan. 2009.
- MI, H. et al. Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. **Nature protocols**, v. 8, n. 8, p. 1551–66, ago. 2013.
- MINOCHE, A. E.; DOHM, J. C.; HIMMELBAUER, H. Evaluation of genomic high-throughput sequencing data generated on Illumina HiSeq and Genome Analyzer systems. **Genome Biology**, v. 12, n. 11, p. R112, 2011.
- MKOJI, G. M.; SMITH, J. M.; PRICHARD, R. K. Antioxidant systems in *Schistosoma mansoni*: Evidence for their role in protection of the adult worms against oxidant killing. **International Journal for Parasitology**, v. 18, n. 5, p. 667–673, jul. 1988.

- MORAND, S.; MÜLLER-GRAF, C. D. Muscles or testes? Comparative evidence for sexual competition among dioecious blood parasites (*Schistosomatidae*) of vertebrates. **Parasitology**, v. 120 (Pt 1, n. 1965, p. 45–56, jan. 2000.
- MOURÃO, M. M. et al. Phenotypic screen of early-developing larvae of the blood fluke, *Schistosoma mansoni*, using RNA interference. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 8, p. e502, 11 ago. 2009.
- NAGIAH, S.; PHULUKDAREE, A.; CHUTURGOON, A. A. Lon protease and eIF2 α are involved in acute, but not prolonged, antiretroviral induced stress response in HepG2 cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 252, p. 82–86, maio 2016.
- NAULA, C.; PARSONS, M.; MOTTRAM, J. C. Protein kinases as drug targets in trypanosomes and *Leishmania*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1754, n. 1–2, p. 151–159, 2005.
- NAWARATNA, S. S. K. et al. Gene atlasing of digestive and reproductive tissues in *Schistosoma mansoni*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 4, 2011.
- NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paula: Atheneu, 2001.
- NUTTER, F. H.; HAYLOR, J. L.; KHWAJA, A. Inhibiting ERK activation with CI-1040 leads to compensatory upregulation of alternate MAPKs and plasminogen activator inhibitor- 1 following subtotal nephrectomy with no impact on kidney fibrosis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1–18, 28 set. 2015.
- OLIVEIRA, M. P.; CORREA SOARES, J. B. R.; OLIVEIRA, M. F. Sexual preferences in nutrient utilization regulate oxygen consumption and reactive oxygen species generation in *Schistosoma mansoni*: Potential implications for parasite redox biology. **PLoS ONE**, v. 11, n. 7, p. 1–28, 2016.
- PATOCKA, N.; RIBEIRO, P. Characterization of a serotonin transporter in the parasitic flatworm, *Schistosoma mansoni*: Cloning, expression and functional analysis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 154, n. 2, p. 125–133, ago. 2007.
- PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nature reviews. Immunology**, v. 2, n. 7, p. 499–511, 2002.
- PELISCH, F. et al. Cross-talk between signaling pathways regulates alternative splicing: A novel role for JNK. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 27, p. 25461–25469, 2005.
- PICA-MATTOCCIA, L.; CIOLI, D. Sex- and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to in vivo and in vitro praziquantel treatment. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 4, p. 527–33, 2004.

- PICKRELL, J. et al. Understanding mechanisms underlying human gene expression variation with RNA sequencing. **Nature**, v. 464, n. 7289, p. 768–772, 2010.
- PROTASIO, A. V.; DUNNE, D. W.; BERRIMAN, M. Comparative Study of Transcriptome Profiles of Mechanical- and Skin-Transformed *Schistosoma mansoni* Schistosomula. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 3, p. 1–10, 2013.
- PROTASIO, A. V et al. A systematically improved high quality genome and transcriptome of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 1, p. e1455, jan. 2012.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing** Vienna, Austria R Foundation for Statistical Computing, , 2011.
- RAJKUMAR, A. P. et al. Experimental validation of methods for differential gene expression analysis and sample pooling in RNA-seq. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, p. 1–8, jan. 2015.
- RESSURREIÇÃO, M. et al. A role for p38 MAPK in the regulation of ciliary motion in a eukaryote. **BMC Cell Biology**, v. 12, n. 1, p. 6, jan. 2011a.
- RESSURREIÇÃO, M. et al. A role for p38 mitogen-activated protein kinase in early post-embryonic development of *Schistosoma mansoni*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 180, n. 1, p. 51–55, nov. 2011b.
- RESSURREIÇÃO, M. et al. Protein kinase C and extracellular signal-regulated kinase regulate movement, attachment, pairing and egg release in *Schistosoma mansoni*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 6, p. e2924, jun. 2014.
- RESSURREIÇÃO, M. et al. Molecular characterization of host-parasite cell signalling in *Schistosoma mansoni* during early development. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 35614, dez. 2016.
- RINKER, E. B. et al. Differential expression of ribosomal proteins in myelodysplastic syndromes. **Journal of Clinical Pathology**, p. jclinpath-2015-203093, 2015.
- ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, n. 1, p. 139–140, 2009.
- ROLLINSON, D.; SIMPSON, A. J. G. **The Biology of Schistosomes from Genes to Latrines**. London: Academic Press, 1987.
- SAGASTI, A. et al. The CaMKII UNC-43 activates the MAPKKK NSY-1 to execute a lateral signaling decision required for asymmetric olfactory neuron fates. **Cell**, v. 105, n. 2, p. 221–32, 20 abr. 2001.

- SANTARPIA, L. L.; LIPPMAN, S.; EL-NAGGAR, A. Targeting the Mitogen-Activated Protein Kinase RAS-RAF Signaling Pathway in Cancer Therapy. **Expert Opin Ther Targets**, v. 16, n. 1, p. 103–119, 2012.
- SENF, A. W. et al. Purine metabolism in *Schistosoma mansoni*. **International Journal for Parasitology**, v. 2, n. 2, p. 249–260, 1972.
- SINGH, D. et al. RNA Interference Technology — Applications and Limitations. **Intechopen**, 6 abr. 2016.
- SKELLY, P. J. et al. Schistosome Feeding and Regurgitation. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 8, p. e1004246, 14 ago. 2014.
- SKELLY, P. J.; DA'DARA, A.; HARN, D. A. Suppression of cathepsin B expression in *Schistosoma mansoni* by RNA interference. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 4, p. 363–369, abr. 2003.
- SOUZA, F. P. C. DE et al. Esquistossomose mansônica : aspectos gerais , imunologia , patogênese e história natural *. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 9, n. 4, p. 300–307, 2011.
- SRINIVASAN, S.; AVADHANI, N. G. Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress. **Free radical biology & medicine**, v. 53, n. 6, p. 1252–63, 2012.
- STEFANIĆ, S. et al. RNA interference in *Schistosoma mansoni* schistosomula: selectivity, sensitivity and operation for larger-scale screening. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 10, p. e850, 19 out. 2010.
- SUNDARAM, M. V. RTK/Ras/MAPK signaling. **WormBook : the online review of C. elegans biology**, p. 1–19, 11 fev. 2006.
- THOMAS, P. D. et al. PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. **Genome research**, v. 13, n. 9, p. 2129–41, set. 2003.
- THOMAS, P. D. et al. Applications for protein sequence-function evolution data: mRNA/protein expression analysis and coding SNP scoring tools. **Nucleic acids research**, v. 34, n. Web Server issue, p. W645-50, 1 jul. 2006.
- TSUKADA, S. SMAD and p38 MAPK Signaling Pathways Independently Regulate 1(I) Collagen Gene Expression in Unstimulated and Transforming Growth Factor- β -stimulated Hepatic Stellate Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 11, p. 10055–10064, 11 jan. 2005.
- TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **The Journal of physiology**, v. 552, n. Pt 2, p. 335–44, 15 out. 2003.

- TWUMASI-BOATENG, K. et al. An age-dependent reversal in the protective capacities of JNK signaling shortens *Caenorhabditis elegans* lifespan. **Aging Cell**, v. 11, n. 4, p. 659–667, ago. 2012.
- UNIPROT CONSORTIUM. The Universal Protein Resource (UniProt) 2009. **Nucleic acids research**, v. 37, n. Database issue, p. D169-74, 1 jan. 2009.
- WAGNER, E. F.; NEBREDA, A. R. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. **Nature reviews. Cancer**, v. 9, n. 8, p. 537–49, ago. 2009.
- WAKNINE-GRINBERG, J. H. et al. *Schistosoma mansoni* infection reduces the incidence of murine cerebral malaria. **Malaria Journal**, v. 9, n. 1, p. 5, 2010.
- WALKER, A. J. Insights into the functional biology of schistosomes. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 1, p. 203, jan. 2011.
- WANG, J. et al. Expression changes of ribosomal proteins in phosphate- and iron-deficient Arabidopsis roots predict stress-specific alterations in ribosome composition. **BMC genomics**, v. 14, n. 1, p. 783, 13 nov. 2013.
- WARD, P. et al. Protein kinases of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: the kinome of a divergent eukaryote. **BMC Genomics**, v. 5, n. 1, p. 79, 2004.
- WHO. **Schistosomiasis control**.
- WIDMANN, C. et al. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. **Physiological reviews**, v. 79, n. 1, p. 143–80, jan. 1999.
- WOLOWCZUK, I. et al. Infection of Mice Lacking Interleukin-7 (IL-7) Reveals an Unexpected Role for IL-7 in the Development of the Parasite *Schistosoma mansoni* Infection of Mice Lacking Interleukin-7 (IL-7) Reveals an Unexpected Role for IL-7 in the Development of the Para. v. 7, n. 8, p. 4183–4190, 1999.
- WOOL, I. G.; CHAN, Y.-L.; GLÜCK, A. Structure and evolution of mammalian ribosomal proteins. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 73, n. 11–12, p. 933–947, dez. 1995.
- YANG, C. et al. **The impact of RNA-seq aligners on gene expression estimation**. Proceedings of the 6th ACM Conference on Bioinformatics, Computational Biology and Health Informatics - BCB '15. **Anais...**New York, New York, USA: ACM Press, abr. 2015Disponível em: <<http://dl.acm.org/citation.cfm?doid=2808719.2808767>>
- YOU, H. et al. Transcriptional profiles of adult male and female *Schistosoma japonicum* in response to insulin reveal increased expression of genes involved in growth and development. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 14, p. 1551–1559, dez. 2009.

- YOU, H. et al. The insulin receptor is a transmission blocking veterinary vaccine target for zoonotic *Schistosoma japonicum*. **International Journal for Parasitology**, v. 42, n. 9, p. 801–807, ago. 2012.
- YOUNG, N. D. et al. Whole-genome sequence of *Schistosoma haematobium*. **Nature Genetics**, n. January, 15 jan. 2012.
- ZAMORE, P. D. Ancient pathways programmed by small RNAs. **Science**, v. 296, n. 5571, p. 1265–9, 17 maio 2002.
- ZERLOTINI, A. et al. SchistoDB: an updated genome resource for the three key schistosomes of humans. **Nucleic acids research**, v. 41, n. Database issue, p. D728-31, jan. 2013.
- ZETSER, A.; GREDINGER, E.; BENGAL, E. p38 Mitogen-activated Protein Kinase Pathway Promotes Skeletal Muscle Differentiation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 8, p. 5193–5200, 1999.
- ZHANG, J.; LIANG, J.; HUANG, J. Downregulated microRNA-26a modulates prostate cancer cell proliferation and apoptosis by targeting COX-2. **Oncology Letters**, p. 3397–3402, 2016.
- ZHANG, W.; LIU, H. T. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. **Cell Research**, v. 12, n. 1, p. 9–18, mar. 2002.
- ZHANG, Z. H. et al. A comparative study of techniques for differential expression analysis on RNA-seq data. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, 2014.

ANEXOS

Anexo 1 – Gráficos de valores de qualidade por base.

Arquivo Anexo 1 disponível para consulta em:

<https://drive.google.com/file/d/0B5cogEmSGui6ZXAYaVpVMldJbm8/view?usp=sharing>

Anexo 2 – Gráficos de valores de qualidade média por sequência.

Arquivo Anexo 2 disponível para consulta em:

<https://drive.google.com/file/d/0B5cogEmSGui6czgtTEw4RDhkVnc/view?usp=sharing>

Anexo 3 – Gráficos do conteúdo de base ao longo da sequência.

Arquivo Anexo 3 disponível para consulta em:

<https://drive.google.com/file/d/0B5cogEmSGui6dE1PeFk1QkhBV28/view?usp=sharing>

Anexo 4 – Gráficos do conteúdo GC por sequência.

Arquivo Anexo 4 disponível para consulta em:

<https://drive.google.com/file/d/0B5cogEmSGui6cTJ6Nnh0bE5XMmM/view?usp=sharing>

Anexo 5 – Gráficos do grau de duplicação das sequências.

Arquivo Anexo 5 disponível para consulta em:

<https://drive.google.com/file/d/0B5cogEmSGui6ZIZSOUpU3dVVG8/view?usp=sharing>

Anexo 6 – Scripts

Exemplo de código utilizado para a análise das amostras tratadas com dsRNA-SmERK comparadas ao controle não tratado.

edgeR.R

```
> library("edgeR")
> group <- factor(c("Control", "Control", "SmERK-dsRNA", "SmERK-dsRNA"))
> dge = DGEList(counts=counts, group=group)
> dge <- estimateCommonDisp(dge, pair=c("SmERK-dsRNA", "Control"))
> dge <- estimateTagwiseDisp(dge, pair=c("SmERK-dsRNA", "Control"))
> et <- exactTest(dge, pair=c("SmERK-dsRNA", "Control"))
> etp <- topTags(et, n=100000)
> etp$table$logFC = -etp$table$logFC
> select = which(etp$table$PValue < 0.01)
> length(select)
> plot(etp$table$logCPM, etp$table$logFC, xlab="Average logCPM", ylab="logFC", xlim=c(-6, 18),
ylim=c(-10,10), pch=20, cex=1, col = ifelse( etp$table$FDR < .05, "red", "black" ) )
> title(main = "edgeR")
> write.csv(etp$table, "edgeR_DEGs_Control_ERK.csv")
```

DESeq2.R

```
> colData = data.frame(condition=c("Control", "Control", "SmERK-dsRNA", "SmERK-dsRNA"),
type=c("Replicate 1", "Replicate 2", "Replicate 1", "Replicate 2"))
> dds <- DESeqDataSetFromMatrix(countData=counts, colData=colData, design=~condition)
> dds <- updateObject(dds)
> dds <- DESeq(dds)
> res <- results(dds)
> head(res)
> mcols(res, use.names=TRUE)

> table(res$padj<0.01)
> res <- res[order(res$padj),]

> df = as.data.frame(res@listData)
> rownames(df)=rownames(res)

> plotMA(res, main="DESeq2", ylim=c(-2,2), cex=0.4)
> plotDispEsts( dds, ylim = c(1e-8, 1e2) )
> hist(res$pvalue, breaks=20, col="grey", ylim=c(0,3000))

> select = which(res$padj<0.01)
> length(select)
> write.csv(as.data.frame(res), file="DESeq2_DEGs_Control_ERK.csv")
```

Volcano Plot

```
> volcanoplot <- function (res, lfcthresh=1, sigthresh=0.01, main="Volcano Plot", labelsig=TRUE,
textcex=1, ...) {
  with(res, plot(log2FoldChange, -log10(pvalue), pch=20, cex=1, main=main))
  with(subset(res, padj<sigthresh ), points(log2FoldChange, -log10(pvalue), pch=20, cex = 1, col="red"))
  with(subset(res, abs(log2FoldChange)>lfcthresh), points(log2FoldChange, -log10(pvalue), pch=20,
cex = 1, col="orange"))
```

```

with(subset(res, padj<sigthresh & abs(log2FoldChange)>lfcthresh), points(log2FoldChange, -
log10(pvalue), pch=20, cex=1, col="green"))
if (labelsig) {
  require(calibrate)
  with(subset(res, padj<sigthresh & abs(log2FoldChange)>lfcthresh), textxy(log2FoldChange, -
log10(pvalue), labs=Gene, cex=textcx))
}
legend("topright", legend=c(paste("padj<0.01"), "padj<0.01 and logFC>1"), pch=20, cex=1,
col=c("red","green"))
}
> volcanoPlot(resdata, lfcthresh=1, sigthresh=0.01, textcx=0.8, xlim=c(-2.8, 2.7), ylim=c(0,35))

```

Heatmap

```

> rld <- rlog(dds)
> head(assay(rld))

> sampleDists <- dist(t(assay(rld)))
> sampleDists
> sampleDistMatrix <- as.matrix(sampleDists)
> colnames(sampleDistMatrix) <- c("Control 1", "Control 3", "SmERK-dsRNA 1", "SmERK-dsRNA 3")
> rownames(sampleDistMatrix) <- c("Control 1", "Control 3", "SmERK-dsRNA 1", "SmERK-dsRNA 3")

> library("gplots")
> library("RColorBrewer")
> colours = colorRampPalette( rev(brewer.pal(9, "Blues"))) (255)
> heatmap.2(sampleDistMatrix, trace="none", col=colours, margin=c(11, 11), cexRow = 1.4, cexCol =
1.4)

```

PCA

```

> library("ggplot2")
> data <- plotPCA(rld, intgroup=c("condition", "type"), returnData=TRUE)
> percentVar <- round(100 * attr(data, "percentVar"))
> ggplot(data, aes(PC1, PC2, color=condition, shape=type, size=4)) +
  theme(text = element_text(size=14),
        axis.title.x = element_text(vjust = -1, size=14),
        axis.title.y = element_text(vjust = 2, size=14),
        legend.position="right",
        legend.justification = 0.1,
        legend.text = element_text(size = 14, color = "black")) +
  geom_point(size=4) +
  coord_cartesian(ylim = c(-10, 10), xlim = c(-5,5)) +
  xlab(paste0("PC1: ",percentVar[1],"% variance")) +
  ylab(paste0("PC2: ",percentVar[2],"% variance"))

```


Anexo 7 – Padronização dos iniciadores utilizados na validação dos DEGs por qPCR.

Iniciadores qPCR - DEGs regulados por SmJNK e Smp38				
	Concentração (nM)	Slope	R²	Eficiência (%)
Smp_029820	1200	-3,383	0,994	97,5
Smp_171900	800	-3,21	0,985	104,9
Smp_202770	800	-3,402	0,998	96,8
Smp_096750	3000	-3,509	0,997	92,8
Smp_153580	800	-3,267	0,979	102,4
Smp_118560	1200	-3,331	0,993	99,6
Iniciadores qPCR - DEGs regulados por SmJNK				
	Concentração (nM)	Slope	R²	Eficiência (%)
Smp_009580	1200	-3,332	0,984	99,6
Smp_043650	1200	-3,456	0,992	94,7
Smp_052880	400	-3,447	0,994	95,0
Smp_053390	400	-3,474	0,993	94,0
Smp_058480	400	-3,505	0,99	92,9
Smp_126230	Sem amplificação nas reações de qPCR			
Smp_161920	1200	-3,204	0,99	105,2
Smp_200120	1200	-3,313	0,997	100,4
Smp_200280	400	-3,419	0,996	96,1
Smp_205010	1200	-3,178	0,999	106,4
Iniciadores qPCR - DEGs regulados por Smp38				
	Concentração (nM)	Slope	R²	Eficiência (%)
Smp_081430	800	-3,253	0,992	102,9
Smp_185680	400	-3,416	0,995	96,2
Smp_022560	800	-3,438	0,987	95,4
Smp_041650	800	-3,389	0,995	97,3
Smp_200840	2000	-3,577	0,993	90,3
Smp_175300	1200	-3,587	0,992	90,0
Smp_061980	1200	-3,249	0,993	103,1
Smp_180920	1200	-3,333	0,992	99,5

Anexo 8 – Produção científica

Anexo 8.1 Capítulo de livro publicado

TAVARES, N. C.; DE AGUIAR, P. H. N.; GAVA, S. G.; OLIVEIRA, G.; MOURÃO, M. M. Schistosomiasis: Setting Routes for Drug Discovery. In: T. Chen (Org.); Special Topics in Drug Discovery, 2016. InTech.

Este capítulo revisa os principais avanços na descoberta de fármacos contra a esquistossomose, os métodos mais utilizados para rastreio composto nos diferentes estágios do parasito, os métodos mais comumente utilizados para a busca de alvos promissores e os alvos de drogas mais estudados em *S. mansoni*.

Schistosomiasis: Setting Routes for Drug Discovery

Naiara Clemente Tavares,
Pedro Henrique Nascimento de Aguiar,
Sandra Grossi Gava, Guilherme Oliveira and
Marina Moraes Mourão

Additional information is available at the end of the chapter

<http://dx.doi.org/10.5772/65386>

Abstract

Schistosomiasis is the second most prevalent parasitic disease in the world. Currently, the treatment of this disease relies on a single drug, praziquantel, and due to the identification of resistant parasites, the development of new drugs is urged. The demand for the development of robust high-throughput parasite screening techniques is increasing as drug discovery research in schistosomiasis gains significance. Here, we review the most common methods used for compound screening in the parasites life stages and also summarize some of the methods that have been recently developed. In addition, we reviewed the methods most commonly implemented to search for promising targets and how they have been used to validate new targets against the parasite *Schistosoma mansoni*. We also review some promising targets in this parasite and show the main approaches and the major advances that have been achieved by those studies. Moreover, we share our experiences in schistosomiasis drug discovery attained with our *S. mansoni* drug screening platform establishment.

Keywords: *Schistosoma mansoni*, drug screening, histone-modifying enzymes, protein kinases, inhibitors, RNA interference

1. Introduction

Schistosomiasis is a chronic parasitic disease caused by flatworms of the genus *Schistosoma*. The main species of medical relevance are *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*, and *Schistosoma haematobium*, which infect around 258 million people worldwide, causing 300,000

deaths yearly, according to WHO statistics. The economic and health effects of schistosomiasis are considerable as this disease can be highly debilitating. To date, there is no licensed vaccine against the disease, and treatment is based on a single drug, praziquantel [1, 2]. Despite its effectiveness, the heavy reliance on a single drug bears a risk of drug resistance development and, indeed, resistant parasites have already been reported [3–7]. Additionally, praziquantel presents poor efficacy against immature schistosome life stage, and there is no pediatric formulation available. Hence, drug discovery in schistosomiasis is still of great importance.

2. Drug screening techniques in schistosomiasis

Several approaches are used to search new drugs for infectious diseases. Among them, we can highlight: selective, empirical, biochemical, and genomic approaches. In the selective approach, compounds targeting molecules important for parasite survival and/or development (a “chokepoint”) are tested. The empirical method consists of a blind random test of a large number of compounds, without any previous knowledge. The biochemical approach verifies whether the compounds are capable to change parasite metabolism. Finally, the genomic approach aims to search for new drug targets based on parasite and/or host genome analysis [8, 9].

Drug screening in *Schistosoma* has been performed using a myriad of techniques and, most of the time, using a single life stage. In order to optimize drug screening in a parasite presenting such distinct and complex life cycle, the search for inhibitors must be performed in the different human infecting life cycle stages such as the schistosomula and adult worms (males and females) as drug sensitivity can differ between the stages and sexes [7]. The screening should also be conducted *in vitro* and *in vivo* since drug activity can be diverse in different systems.

A wide range of *in vitro* methods for drug screening in *S. mansoni* is described; however, microscopic observation to identify the presence of intracellular granularity and changes in the shape and movement of the parasite remains the most used technique, and it is considered the “gold standard” for parasite viability evaluation [10, 11]. However, this analysis can be subjective: (1) it relies in one observing person; (2) schistosomula may exhibit characteristics of dead specimens even when viable [12]; and (3) it is time consuming.

Recently, new methods based on high-throughput (HTS) and whole-organism screens in helminths have emerged. The HTS method is based on screening a parasite target against a large number of compounds in parallel (minimum of 10,000) and may be performed manually or automatically using robotic systems [13–15]. In contrast, the whole-organism screen intends to test a small number of compounds against the pathogen and the drug effect is usually individually analyzed [16]. These new methods monitor the parasite by video, impedance, enzymatic activity, colorimetry, and fluorimetry among others [17–23].

An example of fluorimetric method is the quantification of lactate excreted by the parasite in the culture medium. The parasite tegument presents two glucose transporters, SGTP1 and SGTP4, which acquire glucose present in the host bloodstream [24]. Lactate is the final product

after glycolysis, and it is excreted through aquaporin SmAQP, an aquaglyceroporin homologue [25]. The amount of lactate excreted by the parasite can be measured by fluorimetric assays with probes that bind to lactate and emit fluorescence. The measurement of lactate produced by cells has frequently been used for the analysis of cells or whole-organism viability [26, 27]. This method was used by Howe and collaborators [17] and was proved feasible in *S. mansoni*, owing to its sensitivity to measure the viability of adult worms and schistosomula.

Fluorescence viability analysis in schistosomula was also performed by Peak and collaborators [23] combining the use of propidium iodide (PI) (544 nm excitation/620 nm emission) and fluorescein diacetate (FDA) (485 nm excitation/520 nm emission). The PI intercalates into DNA if the membrane of cells is permeable in damaged or dead parasites, but in viable schistosomula, PI is incapable to cross the membrane. Breach of the membrane permeability allows PI to stain nucleic acids. On the other hand, FDA is able to penetrate the membrane of live schistosomula, and due to the parasite esterase activity, it is converted into a highly fluorescent and charged fluorescein, and FDA cannot readily exit living cells. This test requires a fluorescence inverted microscope to evaluate each spectrum. However, even without a fluorescence readout, staining with PI is a quantitative, simple and low-cost method that has been used for a long time for viability evaluation in *S. mansoni* by our group [28].

The blue dye resazurin has been widely used in drug testing in *Trypanosoma* and *Leishmania* species [29, 30]. This method relies on an oxidation-reduction reaction, wherein resazurin suffers a colorimetric change in response to cellular metabolic reduction. The reduced form is pink, and thus, the intensity of fluorescence produced is proportional to the number of living cells. Despite being described as an effective drug test for *S. mansoni* and demonstrating that they were able to detect schistosomula viability, its use is questionable since, when compared to the visual test, this method showed low sensitivity [22]. In our hands, this method has proven very variable among replicates and requires a very specific fluorescence plate reader.

Movement-based assays are widely used for anthelmintic drug screening in adult worms and might be the first phenotype tested in most screenings, whereas movement measures are not explored as much for testing viability of the *S. mansoni* larval stage. Kotze et al. [31] performed visual assays to test drug sensitivity in *Strongyloides* species. This method consisted in scoring the larvae that exhibited movement after 48 h of drug incubation and stimulation with hot water. The approach proved to be an efficient assay for testing new drugs and for detection of resistance; nevertheless, it is quite subjective. Meanwhile, Paveley et al. [19] performed a phenotype analysis in *S. mansoni* schistosomula exposed to drugs. The authors developed an image-based method that collects images in time-lapse every 6 s and analyzes the cumulative change in the area occupied by each schistosomulum. The researchers concluded that this method is suitable for drug screening in schistosomula, although requiring a complex analysis involving machine training.

Recently, Rinaldi et al. [11] have adapted a cell viability method, which is based on impedance, called xCELLigence, to evaluate the movement of cercariae, schistosomula and adult worms, and measure egg hatching of *S. mansoni*. This assay consists in analyzing the changes in electric conductivity due to parasite contact with electrodes; therefore, more parasite movement is

measured as a large electric conductivity change. The possibility of using this method in drug screening using cercariae, adult worms, and eggs was also verified. However, this method is at a preliminary stage of standardization, since only one drug was tested and exhibited large variation across electrical frequencies tested; in addition, the cost of the equipment and its plates is elevated.

A very promising method that provides a viability assay in a high-throughput fashion and with semiquantitative measurements of movement of helminth worms was developed by Marcellino and collaborators [18]. This method has demonstrated to be efficient and sensitive for drug screening using *S. mansoni* adult worms, since worm movement is considered an important parameter for high performance tests. In this assay, a video camera and a free software, called WormAssay, are required and output adult worm movement units. The smaller the value of movement units generated by the software, the lower the parasite viability. Later, this methodology, named it as Worminator, was adapted to be used with microscopic parasites as third-stage larvae of *Cooperia* spp. and *Brugia malayi* and *Dirofilaria immitis* microfilariae. Therefore, Worminator could be an efficient alternative for measuring schistosomula motility [32].

Another promising method based on video capture was developed by Lee and collaborators [14]. This assay is an automated method to analyze images of schistosomula or other parasites in 96, 384, or 1536 well plate format and qualify innumerable phenotypes. A machine-trained algorithm was able to quantitatively describe the following characteristics: size, shape, movement, texture, and color. With this method, it is possible to perform a high-throughput whole-organism drug screening. The web server called quantal dose-response calculator (QDREC), which was described by Asarnow and collaborators [33], is based on this methodology. QDREC compares drug-treated parasites with untreated parasites and automatically determines dose-response. This method is the only automated method to date that provides EC₅₀ (half maximal effective concentration) values based on phenotypic analysis. QDREC was validated using schistosomula and proved to be a high-throughput and reliable method.

For *in vivo* assays, mice are suggested as the animals of choice, owing to their susceptibility to experimental infection [8, 34]. Thus, mice are infected with cercariae and treated with drugs. After infection, one should observe eggs and granuloma numbers in the liver and intestine, oogram alterations, and number of adult worms recovered after perfusion [35]. This method has been employed using single or combination of praziquantel and in association with lovastatin, clonazepam, among others.

3. Case studies

In order to perform *in vivo* assays, mice infected with *S. mansoni* for 45 days were treated with a single dose of imatinib. After 15 days of treatment, the animals were killed and perfused. *In vitro* tests with imatinib impaired movement of adult worms; however, when mice were treated with this drug, no alterations were found in the oogram and adult worm recovery, demonstrating the need of a complete assay during drug screening [36]. In addition, Pereira and

collaborators [37] tested the compound (–)-6,6'-dinitrohinokinin (DNK), a dibenzylbutyrolactone lignin, using *in vitro* and *in vivo* assays. This compound seems to affect the development and reproduction of the parasite as it caused reduction in adult worm recovery and significantly decreased egg count, corroborating the results of *in vitro* tests. These findings reaffirm the need for *in vivo* testing to confirm drug efficacy, since the biological effects highly rely on host metabolism.

Drug combinations for infectious diseases therapy represent an alternative to retard drug resistance. Based on that premise, Araújo et al. [38] treated infected mice with a single dose of clonazepam associated with praziquantel or oxamniquine. The results showed alterations in the oogram and a higher number of dead worms recovered from liver of mice treated with both clonazepam and praziquantel, in comparison with mice treated only with praziquantel. In another study, the association of praziquantel and oxamniquine with lovastatin was investigated *in vivo*, and a higher number of dead adult worms, as well as oogram changes, were observed in mice treated with the combination lovastatin and oxamniquine compared to animals treated with praziquantel [38]. These findings suggest that drug combination is a promising alternative for schistosomiasis treatment.

Thus, it is highly relevant to follow systematic procedures during drug screening. Here, we present a schematic workflow of the above-mentioned methods and different life stages that could be included in drug screening experiments (Figure 1).

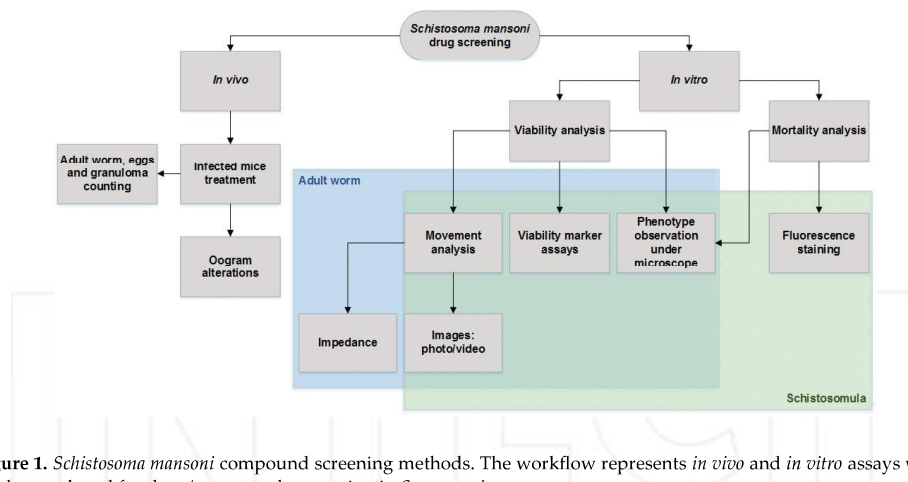


Figure 1. *Schistosoma mansoni* compound screening methods. The workflow represents *in vivo* and *in vitro* assays which can be employed for drug/compounds screening in *S. mansoni*.

4. Establishment of an anti-*Schistosoma mansoni* drug screening platform

The absence of efficient alternative for schistosomiasis treatment demonstrates the need for new research involving the development of new schistosomicidal compounds. Accordingly,

development of a *S. mansoni* drug screening platform, which aims at the study of compound/drug efficacy in different parasite life stages using distinct methodological approaches is required. To date, our group has immersed in this field seeking new methodologies, standardization of existing ones, and validation of results between different laboratories working in the field. It is important to highlight that *Schistosoma* strains vary in response to treatment, and in order to attain relevant leads, a concerted effort is important. Here we present some data of drug screening in schistosomula and adult worm stages and the comparison of four *in vitro* methodologies.

For drug screening in schistosomula, the methods of choice were: resazurin fluorescence assay, lactate quantitative analysis, and visual assay using propidium iodide staining (PI). In order to perform drug screening in adult worms, the movement analysis software WormAssay was employed.

The standardization for schistosomula drug screening was performed using 96-well plate format with 100, 200, 400, 600, and 800 parasites per well. Schistosomula were submitted to three different treatments: parasites exposed to 0.1% dimethyl sulfoxide (DMSO; vehicle control); heat-killed parasites (negative control); and parasites exposed to 20 μ M of the sirtuin inhibitor Salermide (half maximal inhibitory concentration—IC₅₀). Lancelot et al. [39] demonstrated that Salermide induces death and apoptosis of schistosomula, separation of adult worm pairs, as well as a reduction in egg laying.

The PI staining procedure was established by the use of 5 μ g/mL of fluorophore into 96-well culture plates containing 100 parasites and visualized in inverted fluorescence microscope. Our results have shown that mortality evaluation by phenotype observation in bright-field light microscope was overestimated when compared to PI staining results. This result reinforces the subjectivity problem of bright-field visual analysis since parasites that presented a dead phenotype (intracellular granularity and absence of movement) not always stain with PI, indicating their viability.

In viability assays using resazurin, we observed large variability between technical and biological replicates and a low value of relative fluorescence units (RFU). Mansour and Bickle [22] described RFU values >1000 in wells containing 100 schistosomula, and such high RFU values were possible only with 500 parasites per well in our assays conditions. Overall, using this fluorescence assay, we were unable to discriminate schistosomula killed by Salermide treatment from the vehicle control (0.1% DMSO). Issues in assay sensitivity measured by RFU values could be due to differences in the fluorescence reader platform, indicating that the assay can present a reproducibility issue. Limitations in this methodology such as low sensitivity and reliability, when compared to visual analysis, were described by the authors who proposed the application of resazurin as *S. mansoni* viability test [22].

Standardization of lactate quantitative analysis demonstrated low variability and significant differences between RFU values of schistosomula exposed to 20 μ M Salermide from 0.1% DMSO. RFU values were similar to those described in the work of Howe and collaborators [17] confirming the method's reproducibility. Mortality of the parasites detected in the lactate quantitative analysis was confirmed by PI staining and observation under the microscope, in

contrast to our previous results with resazurin assay. Considering the fluorescence-based viability assays, lactate quantitative analysis has shown to be more reliable in our hands. However, the test may also be subject to interference, since some compounds crystallize in contact with culture medium and can emit fluorescence at the wavelength utilized (530 nm excitation/590 nm emission).

The use of viability assays that target schistosome metabolism is important for drug screening, since some drugs may reduce parasite viability but do not cause parasite death, and hence these parasites may not stain by PI. Therefore, we believe that the combination of these two approaches to evaluate parasite viability/mortality is a good strategy for drug screening as they are complementary methodologies.

Regarding adult worm drug screening, Howe and collaborators [17] proposed the use of one male adult worm per well exposed for 72-h treatment with praziquantel and mefloquine, and detected a reduction in medium lactate. The use of only males and one parasite per well does not validate this methodology for drug testing in adult worms, as males and females may react differently to treatments and each individual has distinct susceptibility/metabolism. Therefore, the use of this method would require larger number of worms including both sexes.

The method of trematode movement analysis using impedance was described by Smout and collaborators [20] and was recently validated in *S. mansoni* [11]. In this study, one worm per well was also challenged and wide variation in sensitivity of the experiment was reported due to variation in the electric frequency (kHz). Due to the limitations in those methods, we implemented the WormAssay [18] to analyze adult worm exposure to drugs.

In our platform, eight adult worms were established as the minimum number of specimens to be analyzed. Most importantly, paired females and males should not be analyzed because a drug could be active in only sex, disturbing the movement analysis due to female presence in male gynaecophoric channel. The plates containing the worms are filmed for 1 min and 30 s every day for 10 days. The software is freely available for download, recognizes the wells, and provides the total of movement units for each. Moreover, handling is simple and our tests confirm its sensitivity and accuracy.

For validation of our anti-*S. mansoni* drug screening platform, we used epigenetic modification factor inhibitors. A total of 137 compounds were tested on *S. mansoni* schistosomula and adult worms as part of the A-PARADDISE consortium (<http://a-paraddise.cebio.org/>) using the visual assay with PI, the quantitative analysis of lactate for schistosomula, and the WormAssay for adult worms. Among these compounds, 114 (83%) exhibited some effect on the parasite. From 114 active compounds, 29 were active in all methods used, and in both sexes and stages tested, 12 compounds were active only in schistosomula, 35 were active at least in one sex of adult worm and, among them, 24 were active only in female worms (**Figure 2**).

These data confirm the need to perform an assay aimed at identifying compounds capable of altering the parasite metabolism and, consequently, their viability, since the compound cannot cause parasite death, hindering the observation of drug effect in a visual assay. Clustering methodologies, life stages, and parasite strains could change the outcomes of large screening studies such as those using a single method and stage; for example, Li et al. [40] performed a

screening of 59,360 thioredoxin glutathione reductase (TGR) inhibitors against *S. mansoni* thioredoxin glutathione reductase (SmTGR) recombinant protein using a fluorometric assay, 74 were active and tested in *S. mansoni*, and among them, 53% were active in schistosomula and only 2.7% were effective against adult worms. Additionally, Yousif et al. [41] carried out a screen of 309 plant extracts on adult worms employing visual analysis of viability and identified 14% as active.

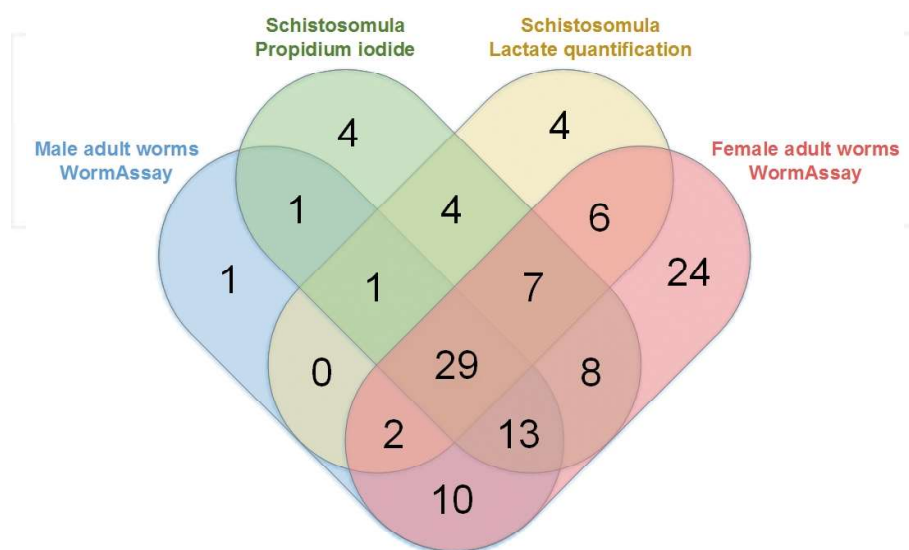


Figure 2. Venn diagram of the active compounds tested in propidium iodide, lactate quantification, and WormAssay. The diagram represents the distribution of the active compounds according to stage and used methods. The schistosomula assay using staining with PI is identified by the color green, schistosomula assay using the quantitative analysis of lactate is identified by the color yellow, the test in male adult worms by WormAssay is indicated by the color blue, and the test in female adult worms by WormAssay is represented by the color red.

Our work demonstrates the need to use parallel and complementary methods, since only using PI, for example, a lower number of compounds would be selected as active and consequently, potential compounds would be excluded. In view of the foregoing methods, the contributions from studies aimed at identifying new therapeutic compounds against schistosomiasis could, perhaps, be most effective if they employ more than a single method for screening drugs and different parasite stages. The association of fluorescence with PI staining enables the selection of compounds capable of altering parasite viability and/or inducing mortality. Moreover, male and female adult worms develop and have different metabolisms, and thus, their susceptibility to a specific drug also differs. One clear example is the studies demonstrating that female adult worms are more sensitive to praziquantel than males [4, 42] and approximately 1341 genes are up-regulated in female adult worms when compared to male [43]. Regarding the different life stages, results demonstrate that some drugs, including praziquantel, are active solely in the mature stage of *S. mansoni* [44].

These results indicate the need to employ different methods for drug screening as one can find a larger number of hits than when the tests are performed using only one method or in only one stage of the parasite. In addition, it substantiates the importance of using the selective approach to find active compounds, thus using a rational approach targeting previous validated targets, allowing direct design of specific compounds.

5. Validation of *S. mansoni* drug targets

The most common strategies used in drug discovery are the empirical and the rational approaches. The first is based on testing various compounds randomly looking for biological activities. The second is also called the selective approach as it proposes identifying a biological target and then designing or looking for a specific inhibitor for that target. In this sense, there are many strategies to assess gene function in parasites in order to elucidate their role in development, mechanisms of drug resistance, and speculate its use as a parasite control method. Among them, we can mention comparative "omics," RNA interference, heterologous complementation using model organisms (i.e., *Caenorhabditis elegans*) and *in silico* approaches. Comparative "omics" has been used to identify potential target proteins that appear to be essential for the parasite, while RNA interference has been used to validate a variety of drug target molecules, such as histone-modifying enzymes (HMEs), protein kinases, and others.

5.1. Histone-modifying enzymes

Among the most studied targets are epigenetic modulators, and among them are regulators of chromatin epigenetic modifications, named histone-modifying enzymes (HMEs), which act on the epigenome resulting in a change in the gene transcription profile. HMEs are involved in a wide range of reactions including methylation, demethylation, acetylation, deacetylation, phosphorylation, ADP-ribosylation, deimination, sumoylation, ubiquitination, etc. Yet, recent findings have described a myriad of lysine modifications, among others: formylation, succinylation, crotonylation, and malonylation [45].

The enzymes involved in the insertion and removal of methyl groups are called histone methyltransferase (HMT) and histone demethylases (HDM) [46]. The histone-modifying enzymes involved in the insertion and removal of acetyl groups are called histone acetyltransferases (HAT) and histone deacetylases (HDAC and sirtuins). Acetylation of lysine residues and methylation of lysine and/or arginine residues in histones H3 and H4 tails are two changes of particular importance [47, 48]. The insertion of acetyl and methyl groups neutralizes the positive charge of histones, destabilizing the structure of nucleosome and allowing the DNA to separate from histones. This results in the facilitation of the access of transcription factors and RNA polymerase to the DNA stimulating gene expression. The removal of these groups has the opposite effect, increasing the positive charge, condensing chromatin, and thereby, repressing transcription [49]. The heterochromatin is transcriptionally inactive when highly methylated at lysine 9 of histone H3 and not methylated at lysine 4, and hypoacetylated in histones H3 and H4 [50]. It is important to highlight that HDACs and sirtuins also deacetylate

other nonhistone substrates such as chaperones, peroxiredoxins, transcription factors, signaling mediators, and structural proteins (e.g., [51–55]).

These modifications allow specific combinations that affect the overall structure of chromatin and the transcription of genes, the so-called histone code, which is, in many cases, conserved among organisms [50]. Aberrant epigenetic states are often associated with human diseases such as cancer, inflammation, metabolic, and neuropsychiatric disorders, and thus HMEs are implicated and intensively studied as therapeutic targets in various diseases [56–59].

One of the most promising approaches for drug discovery among HMEs is the development of HDAC inhibitors, which targets the highly studied lysine deacetylases. These targets are also key for parasites, including schistosomes, which present, similarly to tumors, dependence on lactate fermentation as energy source, host independent growth, high metabolic activity, and host immune evasion through mimetism of molecules [60]. In addition to schistosomes, HMEs have been highly explored as drug targets for parasitic diseases such as *Trypanosoma brucei*, *Plasmodium falciparum*, *Leishmania* spp., *Toxoplasma* sp., among others [61–63].

Many different types of HDAC inhibitors (HDACi) are under development. The inhibitors targeting class I and II HDACs are classified into four families according to their structure: inhibitors containing short-chain fatty acids (butyrate and the valproic acid—VPA), compounds derived from hydroxamic acid (the Trichostatin A—TSA and the acid-suberoylanilide hydroxamic—SAHA or vorinostat), and the group of cyclic tetrapeptides and benzamides. Among these inhibitors, SAHA was approved by Food and Drug Administration (FDA) for use in adult individuals with cutaneous T-cell lymphoma [64]. *In vitro* tests with butyrate, VPA and TSA, performed with human cells demonstrated that these inhibitors lead to apoptosis, differentiation, and cell cycle arrest [65].

Some studies have shown that HDACi, such as TSA, triggers histone H4 hyperacetylation in *S. mansoni* schistosomula at low concentration (2 μ M), leading to apoptosis and affecting significantly gene transcription [66, 67]. According to Pierce and collaborators [65], *in vitro* exposure of schistosomula and adult worms with VPA inhibitors (TSA and SAHA) inhibited 80% of the total HDAC activity and caused the death of parasites.

In addition to pan HDAC inhibitors, one international consortium has been focusing in strategic epigenetic druggable targets for diverse parasites [65]. Recently, SmHDAC8 has risen as a promising target to treat schistosomiasis. First, SmHDAC8 was validated and proved to be essential for parasite infectivity, since parasites knocked down for SmHDAC8 were unable to normally develop in the mammalian host and showed, approximately, 50% reduction in oviposition [68]. Structural analysis has also shown that HDAC8 of *S. mansoni* presents important structural differences when compared to the human orthologue, despite a single amino acid substitution in the active site [68]. In this work, schistosomula larvae were exposed to hydroxamate derivative, HDAC8-specific inhibitor (J1075), which led to apoptosis and parasite death. These studies are a proof of concept that HMEs are important therapeutic targets, and potential new drugs based on HDACi can be developed against schistosomiasis.

To date, a way to expand the repertoire of specific *Schistosoma*, HDACi is utilizing a “piggy-back” strategy, which accelerates the exploration for novel antischistosomal compounds. These

strategies are founded in the principle of using structure-based inhibitors, previously validated for other illnesses or other targets, to add a variety of chemical scaffolds and backbones, facilitating the development of selective inhibitors specifically aiming the schistosoma HMEs [69].

Besides deacetylases, HAT inhibitors and some derivatives of medicinal herbs, such as curcumin, also demonstrated their potential as inhibitors, since they induce hypoacetylation and lead tumor cells into apoptosis [70, 71]. Magalhães and collaborators [72] demonstrated the efficacy of curcumin in *S. mansoni*. In this study, the authors reported that in the presence of curcumin (5 and 20 μM), adult worms lose 50% of viability and reduce oviposition, and higher concentrations (50 and 100 μM) cause 100% mortality of worms. These data corroborate the results observed by our group, that 20 μM of this KDM1 and HAT inhibitor, causes a 95.5% motility reduction of female adult worms, confirming the importance of LSD1 and HAT for the development of *S. mansoni* (unpublished data).

Recent studies in *S. mansoni* demonstrated that the HAT inhibitor, PU139, at a high concentration (50 μM), affects adult worm pairing, the reproductive system of female adult worms, and the maturation of viable eggs [73]. In our hands, with a lower dose (20 μM), this compound was able to reduce female motility, confirming that it is active in the worm and highlighting the aforementioned (Section 2) necessity of assaying drug tests in female and male separately in order to reduce false negatives in drug screening in schistosomes.

Studies using HMT and HDM inhibitors are less common, but some results have shown that the chloroacetyl derivative, allantodapsona, a PRMT1 (arginine methyltransferase) inhibitor, showed selective inhibition affecting the growth of tumor cells [74]. Inhibitors of KDM1 (LSD1), a histone demethylase, are considered promising compounds for cancer therapy [75]. Studies performed by our group, knocked down for PRMT3 and KDMs in schistosomula by RNA interference, show that these enzymes are important for *S. mansoni* reproduction (unpublished data).

Due to the wide range of HME functions as “erasers” and “writers” of the epigenome, boosted by the use of histone and many nonhistone protein substrates, and taking into account the cellular localizations of these enzymes, it has been demonstrated, as expected, that they are essential and attractive targets for development of therapy for a number of infectious diseases, including schistosomiasis.

5.2. Protein kinases

The *Schistosoma* complex life cycle involves different life stages and requires sophisticated coordination of its physiological systems to ensure success of infection and survival in both hosts. Therefore, signals of the environment and hosts stimulate physiological, morphological, and biochemical changes [76, 77]. It involves nonlinear signaling networks that switch protein activity by phosphorylation (by protein kinases—PKs) and dephosphorylation (by protein phosphatases) of amino acid residues, or by incorporation of GTP. Protein kinase phosphorylation and the subsequent activation of signaling cascades result in the activation of transcription factors that target specific genes promoting or blocking their transcription. Furthermore,

they can alter enzymatic activity, interaction with other proteins and molecules, cellular localization, and susceptibility to proteases degradation [78].

Eukaryotic protein kinases (ePKs) participate in phosphorylation cascades that regulate diverse cellular processes. PKs are among the largest gene families in eukaryotes and have been extensively studied and considered potential targets for drug development. The development of PK inhibitors has culminated in the approval of some drugs for the treatment of various human diseases such as cancer and diabetes. Furthermore, PKs have gained interest as potential drug targets against many parasites, including *S. mansoni* [79–82].

The *S. mansoni* predicted proteome is composed of about 2% of PKs, a total of 252 proteins, of which only about 30 have some functional experimental evidence [83]. The scarcity of data on *S. mansoni* PKs has motivated studies that will contribute to a better understanding of the roles of this protein family in parasite development and survival.

Four mitogen-activated protein kinases (MAPKs) were studied by our group using double-stranded RNA-mediated interference to elucidate their functional roles. Mice were infected with schistosomula after gene knockdown, and the development of adult worms was observed. Andrade et al. [79] showed that c-Jun N-terminal kinase SmJNK participates in the maturation and survival of the parasite, associated with the presence of undifferentiated oocytes and damage in the adult male tegument. SmERK-1 and SmERK-2 are involved in egg production, since females were recovered with undeveloped ovaries and immature oocytes, and the infected mice harbored significantly fewer eggs. Furthermore, the Smp38 kinase seems to have an important role in the development and survival of parasites and in their protection against reactive oxygen species (unpublished data). Thus, we demonstrated that MAPK proteins are important for parasite survival *in vivo* and are essential for the development and reproduction of the parasite.

Guidi et al. [84] used RNA interference to investigate the function of 24 proteins in adult worms and schistosomula, and among those, kinases were included. For atypical protein kinase C (SmaPKC), knockdown resulted in decreased viability in both stages. Knockdown of polo-like kinase 1 (SmPLK1) and p38 MAPK (Smp38) increased mortality only in larvae. The SmPLK1 inhibition with BI2536, a specific inhibitor, also increased mortality and interfered with egg production. Knockdown of SmPLK1 and SmaPKC also resulted in lower worm recoveries *in vivo*.

Ressurreição et al. [85] reported that phosphorylation of PKC, ERK, and p38 MAPK kinases is modulated by light and temperature. Furthermore, in response to linoleic acid, these kinases appear to coordinate the release of components of the cercarial acetabular gland, and PKC and ERK, when activated, are located in putative sensory receptors in the tail, thus demonstrating the importance of PKC, ERK, and p38 MAPK signaling pathways in the mechanisms for host penetration.

As mentioned, PKs are conserved and widely studied in many organisms; therefore, a range of PK inhibitors is already available, which are valuable tools. The function of some kinases was studied by parasite exposure to these inhibitors to explore PK functions in *S. mansoni*. Matsuyama et al. [86] demonstrated that cAMP-dependent protein kinase is involved in the

osmosis-regulated ciliary movement of miracidia by exposure to the inhibitors PKI(14-22)amide, H89, and H88, verifying the complete inhibition of miracidia swimming in artificial pond water. Inhibition of protein kinase C (SmPKC) by GF109203X accelerates the rate of larval development of *S. mansoni*, with miracidia shedding its ciliary plates significantly faster and developing into mother sporocyst [87]. Another example, the polo-like kinase SmPlk1 has a potent and selective inhibitor (the anticancer drug BI 2536), which induces changes in schistosoma gonads, an indication that SmPlk1 participates in parasite gametogenesis [88]. More recently, Long et al. [89] showed that knockdown of SmPlk1 using RNA interference induced abnormal phenotypes in schistosomula. They also tested a panel of 38 benzimidazole thiophene PLK1 inhibitors and 11 commercially available human PLK1 inhibitors in schistosomula and adult worms using microscopical observation and the QDREC approaches to verify changes in the parasite. Many of these inhibitors caused deleterious changes in the parasite.

Knobloch et al. [90] used the inhibitor Herbimycin A to demonstrate that protein tyrosine kinases (PTKs) regulates gonad development and egg production through changes in gene expression of eggshell proteins, and suggested PTKs as novel anti-*Schistosoma* drug targets. Transcriptome analyses of female worms after treatment with the inhibitors Herbimycin A and TRIKI, or both, revealed a number of genes that were transcriptionally affected. Herbimycin A specifically inhibited the Src kinase SmTK3, and TRIKI (TGF- β receptor type I kinase inhibitor) inhibited the TGF β receptor, SmT β R. The expression of genes with recognized function in eggshell formation was investigated using quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and proved to be regulated by the signaling pathways containing Src and T β RI [91].

Imatinib, an Abl-kinase-specific inhibitor used in human cancer therapy, was tested against adult worms and caused effects on morphology and physiology of *S. mansoni* couples *in vitro* [92]. Transcriptome analyses of adult worms treated with imatinib were performed using microarray and qPCR. Genes related to surface, muscle, gut, and gonad processes were differentially expressed. In addition, a comparative analysis of microarray data with previous data after TRIKI inhibition was performed and provided evidence of an association between TGF β and Abl kinase signaling pathways [93].

Syk kinase (SmTK4) function was studied in adult worms using RNA interference and the specific inhibitor piceatannol. Prominent morphological changes in testes and ovaries were observed, demonstrating the role of SmTK4 in gametogenesis. In addition, the authors used yeast two-/three-hybrid library screenings and identified a Src kinase (SmTK6) acting upstream and a MAPK-activating protein and a mapmodulin acting downstream of SmTK4 [94].

A set of commercial kinase inhibitors was tested by Morel et al. [95] in schistosomula and adult worms, conforming deleterious effects on parasite physiology, as well as the importance of kinases in parasite biology and reproduction. In that study, five protein kinase B (SmPKB or SmAkt) inhibitors were tested and three affected pairing and oviposition of adult worms, in addition cause mortality in larvae. These data, along with other studies [96], suggest that SmAkt is a key regulator of schistosoma reproduction processes [95].

The roles of protein kinases C (PKCs) and extracellular signal-regulated kinases (ERKs) were studied through modulation of PKC and ERK activity by kinase activators and inhibitors in

adult worms. Results have shown that this modulation induced worm uncoupling, suppressed egg output, male worm detachment, worm paralysis, and provoked sustained coiling. The authors also reported that praziquantel, the drug of choice for schistosomiasis treatment, induced activation of *S. mansoni* PKCs and ERKs. Activated PKC and ERK in adult worms are associated with muscular, tegumental, and reproductive structures [97].

5.3. Other targets

In addition to epigenetic modification, effectors and protein kinases, numerous proteins related to proteolytic, xenobiotic metabolism, redox processes, nucleotide biosynthesis and proteins involved in the nervous system of *Schistosoma* have been tested as therapeutic targets.

5.3.1. Peptidases

Peptidases are enzymes that perform proteolytic reactions and peptide bond hydrolysis. *Schistosoma mansoni* peptidases are attractive drug targets because they act in the host-parasite interaction during parasite invasion, migration, nutrition, and immune evasion [98]. The parasite serine peptidase involved in skin penetration of the human host, called cercarial elastase (SmCE), has been well studied [99, 100]. SmCE could have a role in immune evasion, as a highly purified SmCE was able to cleave IgE and other key molecules involved in immune regulation [101]. The use of serine protease inhibitors prevented IgE cleavage by cercariae and schistosomula extracts in a previous study, indicating that this could be a promising path for therapeutic strategies [102].

The *S. mansoni* cysteine and aspartic peptidases have drawn attention of many researchers as they participate in digestion of the blood meal. A previous study has shown that the use of inhibitors of these peptidases impairs hemoglobin degradation and arrests schistosome development and egg production [103]. The *S. mansoni* cathepsin B1 (SmCB1), which is a highly abundant digestive protease, was the focal point of various studies (reviewed in Ref. [104]). SmCB1 has been validated as a molecular target for therapy against schistosomiasis in a murine model of *S. mansoni* infection [105]. Moreover, SmCB1 crystal structure was determined, and specific inhibitors were designed, which are potential drug leads [106–108]. Another schistosome aspartic peptidase under study as a target is cathepsin D (SmCD). Morales et al. [109] have shown that silencing SmCD transcripts by RNA interference promoted schistosomula growth retardation as well as reduced worm and egg burden in infected mice. SmCD is currently under consideration for vaccine development against *S. mansoni* [110].

Prolyl oligopeptidases of the S9 family of serine peptidases have been investigated in *S. mansoni* by Fajtová et al. [111] who characterized the *S. mansoni* prolyl oligopeptidase (SmPOP) activity and showed that it is localized in the tegument and parenchyma of adult worms and schistosomula. Additionally, the authors designed specific inhibitors of SmPOP that were able to induce schistosoma death, suggesting that SmPOP could be a potential target for antischistosomal drug development.

5.3.2. Xenobiotic metabolism

The biotransformation of xenobiotics involves pathways that can be divided into three phases: (I) oxidation, reduction, or hydrolysis of xenobiotics; (II) conjugation of metabolites with endogenous compounds; and (III) excretion of modified molecules through membrane-bound transport proteins [112]. The xenobiotic metabolism can be a promising area for drug development since it implicates mechanisms that the parasite uses to eliminate drugs or toxic compounds; additionally, it plays vital roles in providing essential molecules for parasite survival. Among the *S. mansoni* biotransformation proteins, the phase I enzyme CYP450 has been studied by Ziniel et al. [113] who demonstrated that CYP450 RNA interference-mediated knockdown resulted in worm death. Additionally, imidazole antifungal CYP450 inhibitors had schistosomicidal activity against adult and larval worms, and blocked embryonic development in the egg.

The glutathione S-transferase (GST) family, from biotransformation pathway phase II, has been extensively studied in schistosomes. The knockdown of SmGST26 and SmGST28 in sporocysts by dsRNA exposure increased their susceptibility to exogenous oxidative stress and to *Biomphalaria glabrata* hemocytes-mediated killing [114]. The GST family of proteins is currently important vaccine candidate as it has been shown that these enzymes bind to several commercially available anthelmintics [115, 116].

The phase III membrane-bound transport proteins are currently under study, and the ABC transporters are the most studied among them [117]. The involvement of these ABC transporters such as P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein (SmDR1, SmDR2, SmMRP1, ABCA4, ABCB6, and ABCC10/MRP7) in drug susceptibility and development of drug resistance in schistosomes is clear, and this makes them excellent candidate targets for inhibitors that could potentiate the effect of existing drugs against schistosomes [118] or as new therapeutic targets themselves [119].

5.3.3. Redox mechanisms

Redox balance mechanisms are essential for schistosome worm survival, and differences between schistosome and human host redox networks were shown in previous studies (reviewed in Ref. [120]). The *S. mansoni* thioredoxin glutathione reductase (SmTGR) has been shown to be an important drug target. The use of oxadiazole-2-oxides as novel TGR inhibitors produced significant activity against various *S. mansoni* stages *ex vivo* and *in vivo* [40, 121, 122]. Another drug target in schistosome redox biology is the peroxiredoxins (SmPrx), which may be responsible to neutralize H₂O₂ due to the fact that schistosomes lack the catalase enzyme, resulting in a limited capacity to cope with this oxidant [120]. Sayed et al. [123] have shown that SmPrx1 knockdown by dsRNA exposure can potentially lead to schistosome death. *Schistosoma mansoni* antioxidant system relevance was also demonstrated in sporocysts by Mourão et al. [114]. RNAi-mediated knockdown of glutathione peroxidase (SmGPx), SmPrx1, and SmPrx2 increased larvae susceptibility to H₂O₂ oxidative stress. Additionally, treatment of parasites with SmPrx1/2 dsRNA increased hemocyte-mediated killing *in vitro*.

5.3.4. Purine biosynthesis

The purine nucleotide *de novo* synthesis pathway is absent in *S. mansoni*, which makes the parasite purine salvage pathway an attractive target for antischistosomal therapy development. A key component of this pathway is the purine nucleoside phosphorylase. The *S. mansoni* purine nucleoside phosphorylase (SmPNP) activity and structure have been well characterized [124–126]. Selective inhibitors for SmPNP have been tested in enzymatic assays *in vitro*; however, experiments with parasite larval or adult stages have not been reported yet [127–129]. The hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRase) was also considered as a potential drug target [130]. Pereira et al. [131] performed with siRNA directed against SmHGPRase the first successful demonstration of an *in vivo* RNAi-based treatment against schistosomiasis.

5.3.5. Neurotransmitter transporters

Schistosoma mansoni nervous system is very well developed with a rich diversity of neurotransmitters. The neurotransmitter serotonin is one of the most abundant neuroactive substances in the *S. mansoni* nervous system [132], stimulating worm movement, muscle contraction, glycogenolysis, and glucose utilization in schistosomes [133, 134]. The *S. mansoni* serotonin transporter (SmSERT) function and localization have been studied [135, 136], and apparently, it acts as a neuronal transporter playing a key role in serotonergic control of parasite motility. Some classical selective serotonin reuptake inhibitors that usually target this type of transporters have shown potent schistosomicidal effect in drug screening [10, 137]. Some of these inhibitors presented different potency and selectivity for SmSERT when compared to the human hSERT, indicating that this evolutionary distance could be explored for the development of novel anti-*Schistosoma* therapies.

The inhibitory neurotransmitters, norepinephrine (NE) and dopamine (DA), are also present in *S. mansoni*, and they cause muscular relaxation and worm body lengthening [134]. A dopamine/norepinephrine transporter (DAT) from *S. mansoni* (SmDAT) has been characterized [138], and it would be responsible for clearance of NE and DA following their release to terminate the signal. SmDAT pharmacological studies showed that its response to tricyclic antidepressants and to selective serotonin reuptake inhibitors was higher than that shown for human DAT. Once again, the differences in ligand binding activity of schistosome neurotransmitter transporters reinforce them as good candidates for selective drug targeting. Nevertheless, inhibitors of schistosome neurotransmitter transporters have not been tested in an animal infection model yet, so the concerns over psychoactivity and undesirable side effects in the host could not be ruled out.

5.3.6. Neurotransmitter receptors

The *S. mansoni* genome sequence predicts several putative neurotransmitter receptors from the two main classes: ligand-gated ion channels and G protein-coupled receptors (GPCR) [139]. Receptors of neurotransmitters dopamine, histamine, glutamate, serotonin, and acetylcholine have been cloned and characterized [140–147]. Many of these receptors have

shown divergences from host receptors in structural and pharmacological aspects, indicating a possible track for antischistosomal therapy development. MacDonald et al. [148] demonstrated through RNA interference phenotypic assay that the knockdown of *S. mansoni* GPCR for acetylcholine (SmGAR) can disrupt larval motility. The importance of a serotonin receptor (Sm5HTR) for parasite motor activity has been also demonstrated by RNA interference [145]. Furthermore, it has been shown that the use of a heterologous system based on a fluorescent mammalian cell high-throughput functional assay can contribute as a new tool in the search for schistosomicidal drugs in the neurotransmitter receptors field [144].

6. Future directions and new approaches

While schistosomiasis still has a high socioeconomic impact, with the total number of disability-adjusted life years (DALY) lost to schistosomiasis estimated at 4.5 million per year, and treatment relies only on praziquantel since the early 1980s, drug discovery is still of great relevance. Our results with a *S. mansoni* drug screening platform reinforce that the use of parallel and complementary methods to assess parasites viability is essential in future studies. Drug discovery studies that employ different methods for drug screening are more prone to find new lead compounds. Additionally, drug screening should be performed in more than one parasite stages as some compound may present activity in schistosomula larval stage but be inactive in the adult worm stage or vice versa. It is worth to mention that praziquantel has little effect on immature worms; however, this drug acts in <1 h on adult worms damaging the tegument and paralyzing the worms. A compound that acts in all parasite stages and in both sexes is desirable, as such drug could be used to combat the acute and chronic phases of schistosomiasis, as well as to prevent the dissemination of viable eggs.

It is noteworthy that after identifying potential anti-*Schistosoma mansoni* drugs, several strict tests for validation are needed, those include bioavailability, stability, absorption, metabolism, distribution, excretion/pharmacokinetics, and toxicity in *in vivo* assays. The present chapter depicted the most studied drug targets on *S. mansoni*. The extensive publications on *Schistosoma* gene characterization studies and selective inhibitors design may pave the way for new therapeutic approaches against schistosomiasis.

Acknowledgements

This work has been supported by funding from the European Commission's Seventh Framework Programme for research, under Grant agreement no. 602080 (A-ParaDDisE), CAPES Programa PCDD-Programa CAPES/Nottingham University (3661/2014), FAPEMIG (CBB-APQ-00520-13). GO received funds from CNPq (470673/2014-1 and 309312/2012-4) and is funded by CAPES (003/2014, REDE 21/2015), CNPq (304138/2014-2), and FAPEMIG (PPM-00189-13).

Author details

Naiara Clemente Tavares¹, Pedro Henrique Nascimento de Aguiar¹, Sandra Grossi Gava¹,
Guilherme Oliveira² and Marina Moraes Mourão^{1*}

*Address all correspondence to: marinamm@cpqrr.fiocruz.br

1 Rene Rachou Research Center, FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

2 Vale Institute of Technology – ITV, Belém, Pará, Brazil

References

- [1] Hotez PJ, Fenwick A. Schistosomiasis in Africa: an emerging tragedy in our new global health decade. *PLoS Negl Trop Dis* 2009; 3: e485.
- [2] Gryseels B. Schistosomiasis. *Infect Dis Clin North Am* 2012; 26: 383–97.
- [3] Botros S, Bennett J. Praziquantel resistance. *Expert Opin Drug Discov* 2007; 2: S35–S40.
- [4] Coeli R, Baba EH, Araujo N, et al. Praziquantel treatment decreases *Schistosoma mansoni* genetic diversity in experimental infections. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; 7: e2596.
- [5] Liang YS, Dai J-RR, Zhu Y-CC, et al. Genetic analysis of praziquantel resistance in *Schistosoma mansoni*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2003; 34: 274–80.
- [6] Melman SD, Steinauer ML, Cunningham C, et al. Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis* 2009; 3: e504.
- [7] Pica-Mattoccia L, Cioli D. Sex- and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to in vivo and in vitro praziquantel treatment. *Int J Parasitol* 2004; 34: 527–33.
- [8] Carvalho O dos S, Coelho PMZ, Lenzi HL. *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008.
- [9] Suggitt M, Bibby MC. 50 Years of preclinical anticancer drug screening: Empirical to target-driven approaches. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 971–981.
- [10] Abdulla M-H, Ruelas DS, Wolff B, et al. Drug discovery for schistosomiasis: hit and lead compounds identified in a library of known drugs by medium-throughput phenotypic screening. *PLoS Negl Trop Dis* 2009; 3: e478.
- [11] Rinaldi G, Loukas A, Brindley PJ, et al. Viability of developmental stages of *Schistosoma mansoni* quantified with xCELLigence worm real-time motility assay (xWORM). *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 2015; 5: 141–148.

- [12] Keiser J. In vitro and in vivo trematode models for chemotherapeutic studies. *Parasitology* 2010; 137: 589–603.
- [13] Inglese J, Johnson RL, Simeonov A, et al. High-throughput screening assays for the identification of chemical probes. *Nat Chem Biol* 2007; 3: 466–79.
- [14] Lee H, Moody-Davis A, Saha U, et al. Quantification and clustering of phenotypic screening data using time-series analysis for chemotherapy of schistosomiasis. *BMC Genomics* 2012; 13: S4.
- [15] Soufan O, Ba-Alawi W, Afeef M, et al. Mining chemical activity status from high-throughput screening assays. *PLoS One* 2015; 10: 1–16.
- [16] Lemieux GA, Liu J, Mayer N, et al. A whole-organism screen identifies new regulators of fat storage. *Nat Chem Biol* 2011; 7: 206–213.
- [17] Howe S, Zöphel D, Subbaraman H, et al. Lactate as a novel quantitative measure of viability in *Schistosoma mansoni* drug sensitivity assays. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59: 1193–1199.
- [18] Marcellino C, Gut J, Lim KC, et al. WormAssay: a novel computer application for whole-plate motion-based screening of macroscopic parasites. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6: e1494.
- [19] Paveley RA, Mansour NR, Hallyburton I, et al. Whole organism high-content screening by label-free, image-based bayesian classification for parasitic diseases. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6: 1–11.
- [20] Smout MJ, Kotze AC, McCarthy JS, et al. A novel high throughput assay for anthelmintic drug screening and resistance diagnosis by real-time monitoring of parasite motility. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4: e885.
- [21] Tritten L, Silbereisen A, Keiser J. Nitazoxanide: In vitro and in vivo drug effects against *Trichuris muris* and *Ancylostoma ceylanicum*, alone or in combination. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 2012; 2: 98–105.
- [22] Mansour NR, Bickle QD. Comparison of microscopy and Alamar blue reduction in a larval based assay for schistosome drug screening. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4: e795.
- [23] Peak E, Chalmers IW, Hoffmann KF. Development and validation of a quantitative, high-throughput, fluorescent-based bioassay to detect schistosoma viability. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4: e759.
- [24] Krautz-Peterson G, Simoes M, Faghiri Z, et al. Suppressing glucose transporter gene expression in schistosomes impairs parasite feeding and decreases survival in the mammalian host. *PLoS Pathog* 2010; 6: e1000932.
- [25] Faghiri Z, Camargo SMR, Huggel K, et al. The tegument of the human parasitic worm *Schistosoma mansoni* as an excretory organ: the surface aquaporin SmAQP is a lactate transporter. *PLoS One* 2010; 5: e10451.

- [26] Massie CE, Lynch A, Ramos-Montoya A, et al. The androgen receptor fuels prostate cancer by regulating central metabolism and biosynthesis. *EMBO J* 2011; 30: 2719–33.
- [27] Matos P, Horn JA, Beards F, et al. A role for the mitochondrial-associated protein p32 in regulation of trophoblast proliferation. *Mol Hum Reprod* 2014; 20: 745–755.
- [28] de Moraes Mourão M, Dinguirard N, Franco GR, et al. Phenotypic screen of early-developing larvae of the blood fluke, *Schistosoma mansoni*, using RNA interference. *PLoS Negl Trop Dis* 2009; 3: e502.
- [29] Bowling T, Mercer L, Don R, et al. Application of a resazurin-based high-throughput screening assay for the identification and progression of new treatments for human African trypanosomiasis. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 2012; 2: 262–270.
- [30] Shimony O, Jaffe CL. Rapid fluorescent assay for screening drugs on *Leishmania amastigotes*. *J Microbiol Methods* 2008; 75: 196–200.
- [31] Kotze AC, Clifford S, O'Grady J, et al. An in vitro larval motility assay to determine anthelmintic sensitivity for human hookworm and *Strongyloides* species. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 71: 608–616.
- [32] Storey B, Marcellino C, Miller M, et al. Utilization of computer processed high definition video imaging for measuring motility of microscopic nematode stages on a quantitative scale: 'The Worminator'. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 2014; 4: 233–43.
- [33] Asarnow D, Rojo-Arreola L, Suzuki BM, et al. The QDREC web server: determining dose-response characteristics of complex macroparasites in phenotypic drug screens. *Bioinformatics* 2015; 31: 1515–8.
- [34] Farah IO, Kariuki TM, King CL, et al. An overview of animal models in experimental schistosomiasis and refinements in the use of non-human primates. *Lab Anim* 2001; 35: 205–12.
- [35] Pellegrino J, Katz N. Experimental chemotherapy of *Schistosomiasis mansoni*. *Adv Parasitol* 1968; 6: 233–90.
- [36] Katz N, Couto FFB, Araújo N. Imatinib activity on *Schistosoma mansoni*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2013; 108: 850–3.
- [37] Pereira AC, Silva MLA e, Souza JM, et al. In vitro and in vivo anthelmintic activity of (-)-6,6'-dinitrohinokinin against schistosomula and juvenile and adult worms of *Schistosoma mansoni*. *Acta Trop* 2015; 149: 195–201.
- [38] Araujo N, Mattos ACA de, Coelho PMZ, et al. Association of oxamniquine praziquantel and clonazepam in experimental *Schistosomiasis mansoni*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; 103: 781–5.
- [39] Lancelot J, Caby S, Dubois-Abdeselem F, et al. *Schistosoma mansoni* sirtuins: characterization and potential as chemotherapeutic targets. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; 7: 1–13.

- [40] Li T, Ziniel PD, He P, et al. High-throughput screening against thioredoxin glutathione reductase identifies novel inhibitors with potential therapeutic value for schistosomiasis. *Infect Dis Poverty* 2015; 4: 40.
- [41] Yousif F, Wassel G, Boulos L, et al. Contribution to in vitro screening of Egyptian plants for schistosomicidal activity. *Pharm Biol* 2012; 50: 732–9.
- [42] Mwangi IN, Sanchez MC, Mkoji GM, et al. Praziquantel sensitivity of Kenyan *Schistosoma mansoni* isolates and the generation of a laboratory strain with reduced susceptibility to the drug. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 2014; 4: 296–300.
- [43] Anderson L, Amaral MS, Beckedorff F, et al. *Schistosoma mansoni* egg, adult male and female comparative gene expression analysis and identification of novel genes by RNA-Seq. *PLoS Negl Trop Dis* 2015; 9: e0004334.
- [44] Doenhoff MJ, Cioli D, Utzinger J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Curr Opin Infect Dis* 2008; 21: 659–67.
- [45] Choudhary C, Weinert BT, Nishida Y, et al. The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15: 536–50.
- [46] de la Cruz X, Lois S, Sánchez-Molina S, et al. Do protein motifs read the histone code? *Bioessays* 2005; 27: 164–75.
- [47] Berger SL. Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev* 2002; 12: 142–148.
- [48] Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell* 2007; 128: 693–705.
- [49] Cavalcante AGDM, de Bruin PFC. The role of oxidative stress in COPD: current concepts and perspectives. *J Bras Pneumol* 2009; 35: 1227–37.
- [50] Jasencakova Z, Soppe WJJ, Meister A, et al. Histone modifications in Arabidopsis—high methylation of H3 lysine 9 is dispensable for constitutive heterochromatin. *Plant J* 2003; 33: 471–480.
- [51] Dowling DP, Gantt SL, Gattis SG, et al. Structural studies of human histone deacetylase 8 and its site-specific variants complexed with substrate and inhibitors. *Biochemistry* 2008; 47: 13554–63.
- [52] Haberland M, Montgomery RL, Olson EN. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet* 2009; 10: 32–42.
- [53] Beumer JH, Tawbi H. Role of histone deacetylases and their inhibitors in cancer biology and treatment. *Curr Clin Pharmacol* 2010; 5: 196–208.
- [54] Delcuve GP, Khan DH, Davie JR. Roles of histone deacetylases in epigenetic regulation: emerging paradigms from studies with inhibitors. *Clin Epigenet* 2012; 4: 5.

- [55] Van Dyke MW. Lysine deacetylase (KDAC) regulatory pathways: an alternative approach to selective modulation. *ChemMedChem* 2014; 9: 511–22.
- [56] Falkenberg KJ, Johnstone RW. Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. *Nat Rev Drug Discov* 2014; 13: 673–91.
- [57] Mottamal M, Zheng S, Huang T, et al. Histone deacetylase inhibitors in clinical studies as templates for new anticancer agents. *Molecules* 2015; 20: 3898–3941.
- [58] Kumar R, Li D-Q, Müller S, et al. Epigenomic regulation of oncogenesis by chromatin remodeling. *Oncogene* 2016; 35: 4423–36.
- [59] Wang Z, Xue X, Sun J, et al. An ‘in-depth’ description of the small non-coding RNA population of *Schistosoma japonicum* schistosomulum. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4: e596.
- [60] Oliveira G. Cancer and parasitic infections: similarities and opportunities for the development of new control tools. *Rev Soc Bras Med Trop* 2014; 47: 1–2.
- [61] Ouaisi M, Ouaisi A. Histone deacetylase enzymes as potential drug targets in cancer and parasitic diseases. *J Biomed Biotechnol* 2006; 2006: 134–74.
- [62] New M, Olzscha H, La Thangue NB. HDAC inhibitor-based therapies: Can we interpret the code? *Mol Oncol* 2012; 6: 637–656.
- [63] Andrews KT, Haque A, Jones MK. HDAC inhibitors in parasitic diseases. *Immunol Cell Biol* 2012; 90: 66–77.
- [64] Duvic M, Talpur R, Ni X, et al. Phase 2 trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Blood* 2007; 109: 31–39.
- [65] Pierce RJ, Dubois-Abdeselem F, Lancelot J, et al. Targeting schistosome histone modifying enzymes for drug development. *Curr Pharm Des* 2012; 18: 3567–78.
- [66] Azzi A, Cosseau C, Grunau C. *Schistosoma mansoni*: developmental arrest of miracidia treated with histone deacetylase inhibitors. *Exp Parasitol* 2009; 121: 288–91.
- [67] Dubois F, Caby S, Oger F, et al. Histone deacetylase inhibitors induce apoptosis, histone hyperacetylation and up-regulation of gene transcription in *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol* 2009; 168: 7–15.
- [68] Marek M, Kannan S, Hauser A-T, et al. Structural basis for the inhibition of histone deacetylase 8 (HDAC8), a key epigenetic player in the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *PLoS Pathog* 2013; 9: e1003645.
- [69] Marek M, Oliveira G, Pierce RJ, et al. Drugging the schistosome zinc-dependent HDACs: current progress and future perspectives. *Future Med Chem* 2015; 7: 783–800.
- [70] Balasubramanyam K, Varier RA, Altaf M, et al. Curcumin, a novel p300/CREB-binding protein-specific inhibitor of acetyltransferase, represses the acetylation of histone/

- nonhistone proteins and histone acetyltransferase-dependent chromatin transcription. *J Biol Chem* 2004; 279: 51163–71.
- [71] Stimson L, Rowlands MG, Newbatt YM, et al. Isothiazolones as inhibitors of PCAF and p300 histone acetyltransferase activity. *Mol Cancer Ther* 2005; 4: 1521–1532.
- [72] Magalhães LG, Machado CB, Morais ER, et al. In vitro schistosomicidal activity of curcumin against *Schistosoma mansoni* adult worms. *Parasitol Res* 2009; 104: 1197–1201.
- [73] Carneiro VC, de Abreu da Silva IC, Torres EJJ, et al. Epigenetic changes modulate schistosome egg formation and are a novel target for reducing transmission of schistosomiasis. *PLoS Pathog* 2014; 10: e1004116.
- [74] Bissinger E-M, Heinke R, Spannhoff A, et al. Acyl derivatives of p-aminosulfonamides and dapsone as new inhibitors of the arginine methyltransferase hPRMT1. *Bioorg Med Chem* 2011; 19: 3717–31.
- [75] Wang J, Lu F, Ren Q, et al. Novel histone demethylase LSD1 inhibitors selectively target cancer cells with pluripotent stem cell properties. *Cancer Res* 2011; 71: 7238–7249.
- [76] Amiri P, Locksley RM, Parslow TG, et al. Tumour necrosis factor alpha restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice. *Nature* 1992; 356: 604–7.
- [77] LoVerde PT, Hirai H, Merrick JM, et al. *Schistosoma mansoni* genome project: an update. *Parasitol Int* 2004; 53: 183–192.
- [78] Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 2002; 298: 1911–2.
- [79] Andrade LF De, Mourão MDM, Geraldo JA, et al. Regulation of *Schistosoma mansoni* development and reproduction by the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; 8: e2949.
- [80] Dissous C, Ahier A, Khayath N. Protein tyrosine kinases as new potential targets against human schistosomiasis. *BioEssays* 2007; 29: 1281–1288.
- [81] Naula C, Parsons M, Mottram JC. Protein kinases as drug targets in trypanosomes and *Leishmania*. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1754: 151–159.
- [82] Ward P, Equinet L, Packer J, et al. Protein kinases of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: the kinome of a divergent eukaryote. *BMC Genomics* 2004; 5: 79.
- [83] Andrade LF, Nahum LA, Avelar LGA, et al. Eukaryotic protein kinases (ePKs) of the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *BMC Genomics* 2011; 12: 215.
- [84] Guidi A, Mansour NR, Paveley R a, et al. Application of RNAi to genomic drug target validation in schistosomes. *PLoS Negl Trop Dis* 2015; 9: e0003801.

- [85] Ressurreição M, Kirk RS, Rollinson D, et al. Sensory protein kinase signaling in *Schistosoma mansoni* cercariae: host location and invasion. *J Infect Dis* 2015; 212: 1787–97.
- [86] Matsuyama H, Takahashi H, Watanabe K, et al. The involvement of cyclic adenosine monophosphate in the control of schistosome miracidium cilia. *J Parasitol* 2004; 90: 8–14.
- [87] Ludtmann MHR, Rollinson D, Emery AM, et al. Protein kinase C signalling during miracidium to mother sporocyst development in the helminth parasite, *Schistosoma mansoni*. *Int J Parasitol* 2009; 39: 1223–1233.
- [88] Dissous C, Grevelding CG, Long T. *Schistosoma mansoni* polo-like kinases and their function in control of mitosis and parasite reproduction. *An Acad Bras Cienc* 2011; 83: 627–635.
- [89] Long T, Neitz RJ, Beasley R, et al. Structure-bioactivity relationship for benzimidazole thiophene inhibitors of polo-like kinase 1 (PLK1), a potential drug target in *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10: e0004356.
- [90] Knobloch J, Kunz W, Grevelding CG. Herbimycin A suppresses mitotic activity and egg production of female *Schistosoma mansoni*. *Int J Parasitol* 2006; 36: 1261–72.
- [91] Buro C, Oliveira KC, Lu Z, et al. Transcriptome analyses of inhibitor-treated schistosome females provide evidence for cooperating Src-kinase and TGF β receptor pathways controlling mitosis and eggshell formation. *PLoS Pathog* 2013; 9: e1003448.
- [92] Beckmann S, Grevelding CG. Imatinib has a fatal impact on morphology, pairing stability and survival of adult *Schistosoma mansoni* in vitro. *Int J Parasitol* 2010; 40: 521–526.
- [93] Buro C, Beckmann S, Oliveira KC, et al. Imatinib treatment causes substantial transcriptional changes in adult *Schistosoma mansoni* in vitro exhibiting pleiotropic effects. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; 8: e2923.
- [94] Beckmann S, Buro C, Dissous C, et al. The Syk kinase SmTK4 of *Schistosoma mansoni* is involved in the regulation of spermatogenesis and oogenesis. *PLoS Pathog* 2010; 6: e1000769.
- [95] Morel M, Vanderstraete M, Cailliau K, et al. Compound library screening identified Akt/PKB kinase pathway inhibitors as potential key molecules for the development of new chemotherapeutics against schistosomiasis. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 2014; 4: 256–266.
- [96] Vanderstraete M, Gougnard N, Cailliau K, et al. Venus kinase receptors control reproduction in the platyhelminth parasite *Schistosoma mansoni*. *PLoS Pathog* 2014; 10: e1004138.

- [97] Ressurreição M, De Saram P, Kirk RS, et al. Protein kinase C and extracellular signal-regulated kinase regulate movement, attachment, pairing and egg release in *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; 8: e2924.
- [98] McKerrow JH, Caffrey C, Kelly B, et al. Proteases in parasitic diseases. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2006; 1: 497–536.
- [99] Ingram JR, Rafi SB, Eroy-Reveles AA, et al. Investigation of the proteolytic functions of an expanded cercarial elastase gene family in *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6: e1589.
- [100] Yang Y, Wen YJ, Cai YN, et al. Serine proteases of parasitic helminths. *Korean J Parasitol* 2015; 53: 1–11.
- [101] Aslam A, Quinn P, McIntosh RS, et al. Proteases from *Schistosoma mansoni* cercariae cleave IgE at solvent exposed interdomain regions. *Mol Immunol* 2008; 45: 567–74.
- [102] Pleass RJ, Kusel JR, Woof JM. Cleavage of human IgE mediated by *Schistosoma mansoni*. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 121: 194–204.
- [103] Wasilewski MM, Lim KC, Phillips J, et al. Cysteine protease inhibitors block schistosome hemoglobin degradation in vitro and decrease worm burden and egg production in vivo. *Mol Biochem Parasitol* 1996; 81: 179–89.
- [104] Jílková A, Horn M, Řezáč P, et al. Activation route of the *Schistosoma mansoni* cathepsin B1 drug target: structural map with a glycosaminoglycan switch. *Structure* 2014; 22: 1786–98.
- [105] Abdulla M-H, Lim K-C, Sajid M, et al. Schistosomiasis mansoni: novel chemotherapy using a cysteine protease inhibitor. *PLoS Med* 2007; 4: e14.
- [106] Fanfrlík J, Brahmikshatriya PS, Řezáč J, et al. Quantum mechanics-based scoring rationalizes the irreversible inactivation of parasitic *Schistosoma mansoni* cysteine peptidase by vinyl sulfone inhibitors. *J Phys Chem B* 2013; 117: 14973–82.
- [107] Horn M, Jílková A, Vondrášek J, et al. Mapping the pro-peptide of the *Schistosoma mansoni* cathepsin B1 drug target: modulation of inhibition by heparin and design of mimetic inhibitors. *ACS Chem Biol* 2011; 6: 609–17.
- [108] Jílková A, Rezáčová P, Lepsík M, et al. Structural basis for inhibition of cathepsin B drug target from the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem* 2011; 286: 35770–81.
- [109] Morales ME, Rinaldi G, Gobert GN, et al. RNA interference of *Schistosoma mansoni* cathepsin D, the apical enzyme of the hemoglobin proteolysis cascade. *Mol Biochem Parasitol* 2008; 157: 160–168.
- [110] Ahmad Fuaad AAH, Roubille R, Pearson MS, et al. The use of a conformational cathepsin D-derived epitope for vaccine development against *Schistosoma mansoni*. *Bioorg Med Chem* 2015; 23: 1307–12.

- [111] Fajtová P, Štefanić S, Hradilek M, et al. Prolyl oligopeptidase from the blood fluke *Schistosoma mansoni*: from functional analysis to anti-schistosomal inhibitors. *PLoS Negl Trop Dis* 2015; 9: e0003827.
- [112] Cvilink V, Lamka J, Skálová L. Xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of anthelmintics in helminths. *Drug Metab Rev* 2009; 41: 8–26.
- [113] Ziniel PD, Karumudi B, Barnard AH, et al. The *Schistosoma mansoni* cytochrome P450 (CYP3050A1) is essential for worm survival and egg development. *PLoS Negl Trop Dis* 2015; 9: e0004279.
- [114] Mourão MDM, Dinguirard N, Franco GR, et al. Role of the endogenous antioxidant system in the protection of *Schistosoma mansoni* primary sporocysts against exogenous oxidative stress. *PLoS Negl Trop Dis* 2009; 3: e550.
- [115] Brophy PM, Barrett J. Glutathione transferase in helminths. *Parasitology* 1990; 100 Pt 2: 345–9.
- [116] Mo AX, Agosti JM, Walson JL, et al. Schistosomiasis elimination strategies and potential role of a vaccine in achieving global health goals. *Am J Trop Med Hyg* 2014; 90: 54–60.
- [117] Greenberg RM. Schistosome ABC multidrug transporters: from pharmacology to physiology. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 2014; 4: 301–309.
- [118] Kasinathan RS, Sharma LK, Cunningham C, et al. Inhibition or knockdown of ABC transporters enhances susceptibility of adult and juvenile schistosomes to praziquantel. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; 8: 1–11.
- [119] Kasinathan RS, Morgan WM, Greenberg RM. Genetic knockdown and pharmacological inhibition of parasite multidrug resistance transporters disrupts egg production in *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5: e1425.
- [120] Huang H-H, Rigouin C, Williams DL. The redox biology of schistosome parasites and applications for drug development. *Curr Pharm Des* 2012; 18: 3595–611.
- [121] Sayed A a, Simeonov A, Thomas CJ, et al. Identification of oxadiazoles as new drug leads for the control of schistosomiasis. *Nat Med* 2008; 14: 407–412.
- [122] Rai G, Sayed AA, Lea WA, et al. Structure mechanism insights and the role of nitric oxide donation guide the development of oxadiazole-2-oxides as therapeutic agents against schistosomiasis. *J Med Chem* 2009; 52: 6474–83.
- [123] Sayed AA, Cook SK, Williams DL. Redox balance mechanisms in *Schistosoma mansoni* rely on peroxiredoxins and albumin and implicate peroxiredoxins as novel drug targets. *J Biol Chem* 2006; 281: 17001–17010.
- [124] da Silveira NJF, Uchôa HB, Canduri F, et al. Structural bioinformatics study of PNP from *Schistosoma mansoni*. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 322: 100–4.

- [125] Pereira HD, Franco GR, Cleasby A, et al. Structures for the potential drug target purine nucleoside phosphorylase from *Schistosoma mansoni* causal agent of schistosomiasis. *J Mol Biol* 2005; 353: 584–99.
- [126] Pereira HM, Cleasby A, Pena S SDJ, et al. Cloning, expression and preliminary crystallographic studies of the potential drug target purine nucleoside phosphorylase from *Schistosoma mansoni*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2003; 59: 1096–9.
- [127] Castilho MS, Postigo MP, Pereira HM, et al. Structural basis for selective inhibition of purine nucleoside phosphorylase from *Schistosoma mansoni*: kinetic and structural studies. *Bioorg Med Chem* 2010; 18: 1421–1427.
- [128] De Moraes MC, Cardoso CL, Cass QB. Immobilized purine nucleoside phosphorylase from *Schistosoma mansoni* for specific inhibition studies. *Anal Bioanal Chem* 2013; 405: 4871–4878.
- [129] Postigo MP, Guido RVC, Oliva G, et al. Discovery of new inhibitors of schistosoma mansoni PNP by pharmacophore-based virtual screening. *J Chem Inf Model* 2010; 50: 1693–1705.
- [130] Craig SP, McKerrow JH, Newport GR, et al. Analysis of cDNA encoding the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRase) of *Schistosoma mansoni*; a putative target for chemotherapy. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 7087–101.
- [131] Pereira TC, Pascoal VDB, Marchesini RB, et al. *Schistosoma mansoni*: evaluation of an RNAi-based treatment targeting HGPRase gene. *Exp Parasitol* 2008; 118: 619–623.
- [132] Bennett J, Bueding E, Timms AR, et al. Occurrence and levels of 5-hydroxytryptamine in *Schistosoma mansoni*. *Mol Pharmacol* 1969; 5: 542–5.
- [133] Day TA, Bennett JL, Pax RA. Serotonin and its requirement for maintenance of contractility in muscle fibres isolated from *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 1994; 108 (Pt 4): 425–32.
- [134] Pax RA, Siefker C, Bennett JL. *Schistosoma mansoni*: differences in acetylcholine, dopamine, and serotonin control of circular and longitudinal parasite muscles. *Exp Parasitol* 1984; 58: 314–24.
- [135] Patocka N, Ribeiro P. Characterization of a serotonin transporter in the parasitic flatworm, *Schistosoma mansoni*: Cloning, expression and functional analysis. *Mol Biochem Parasitol* 2007; 154: 125–133.
- [136] Patocka N, Ribeiro P. The functional role of a serotonin transporter in *Schistosoma mansoni* elucidated through immunolocalization and RNA interference (RNAi). *Mol Biochem Parasitol* 2013; 187: 32–42.
- [137] Ribeiro P, Patocka N. Neurotransmitter transporters in schistosomes: structure, function and prospects for drug discovery. *Parasitol Int* 2013; 62: 629–638.

- [138] Larsen MB, Fontana ACK, Magalhães LG, et al. A catecholamine transporter from the human parasite *Schistosoma mansoni* with low affinity for psychostimulants. *Mol Biochem Parasitol* 2011; 177: 35–41.
- [139] Berriman M, Haas BJ, LoVerde PT, et al. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature* 2009; 460: 352–8.
- [140] El-Shehabi F, Ribeiro P. Histamine signalling in *Schistosoma mansoni*: immunolocalisation and characterisation of a new histamine-responsive receptor (SmGPR-2). *Int J Parasitol* 2010; 40: 1395–1406.
- [141] El-Shehabi F, Vermeire JJ, Yoshino TP, et al. Developmental expression analysis and immunolocalization of a biogenic amine receptor in *Schistosoma mansoni*. *Exp Parasitol* 2009; 122: 17–27.
- [142] El-Shehabi F, Taman A, Moali LS, et al. A novel G protein-coupled receptor of *Schistosoma mansoni* (SmGPR-3) is activated by dopamine and is widely expressed in the nervous system. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6: e1523.
- [143] Hamdan FF, Abramovitz M, Mousa A, et al. A novel *Schistosoma mansoni* G protein-coupled receptor is responsive to histamine. *Mol Biochem Parasitol* 2002; 119: 75–86.
- [144] MacDonald K, Buxton S, Kimber MJ, et al. Functional characterization of a novel family of acetylcholine-gated chloride channels in *Schistosoma mansoni*. *PLoS Pathog* 2014; 10: e1004181.
- [145] Patocka N, Sharma N, Rashid M, et al. Serotonin signaling in *Schistosoma mansoni*: a serotonin-activated G protein-coupled receptor controls parasite movement. *PLoS Pathog* 2014; 10: e1003878.
- [146] Taman A, Ribeiro P. Investigation of a dopamine receptor in *Schistosoma mansoni*: functional studies and immunolocalization. *Mol Biochem Parasitol* 2009; 168: 24–33.
- [147] Taman A, Ribeiro P. Glutamate-mediated signaling in *Schistosoma mansoni*: a novel glutamate receptor is expressed in neurons and the female reproductive tract. *Mol Biochem Parasitol* 2011; 176: 42–50.
- [148] MacDonald K, Kimber MJ, Day TA, et al. A constitutively active G protein-coupled acetylcholine receptor regulates motility of larval *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol* 2015; 202: 29–37.

Anexo 8.2 – Artigo publicado

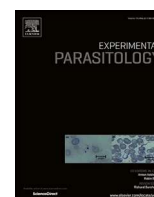
GAVA, S. G.; TAVARES, N. C.; SALIM, A. C. DE M.; ARAÚJO, F. M. G.; OLIVEIRA, G.; MOURÃO, M. M. *Schistosoma mansoni*: Off-target analyses using nonspecific double-stranded RNAs as control for RNAi experiments in schistosomula. **Experimental Parasitology**, v. 177, p. 98–103, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28457995>>.

Este artigo publicado na revista *Experimental Parasitology* trata das análises presentes nesta tese do transcrito de esquistossômulos de *S. mansoni* expostos aos dsRNA de controles inespecíficos.



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexpr

Schistosoma mansoni: Off-target analyses using nonspecific double-stranded RNAs as control for RNAi experiments in schistosomes



Sandra Grossi Gava^a, Naiara Clemente Tavares^a, Anna Christina de Matos Salim^a, Flávio Marcos Gomes de Araújo^a, Guilherme Oliveira^b, Marina Moraes Mourão^{a,*}

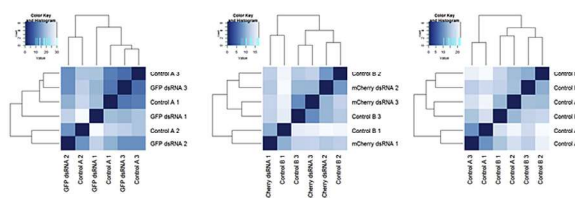
^a Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^b Instituto Tecnológico Vale, Belém, Pará, Brazil

HIGHLIGHTS

- Extrinsic factors generate greater experimental variability than most used RNAi controls.
- Nonspecific genes GFP/mCherry are suitable controls for RNAi assays in schistosomes.
- Untreated parasites could also be set as controls for RNAi assays in schistosomes.
- This work sets parameters that will enhance RNAi work in *S. mansoni*.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 December 2016

Received in revised form

21 April 2017

Accepted 25 April 2017

Available online 27 April 2017

Keywords:

RNA interference

Nonspecific controls

Off-target

RNASeq

Schistosoma mansoni

ABSTRACT

RNA interference is a well established and widely used reverse genetic tool available for gene functional studies in trematodes. This technique requires the use of nonrelevant double-stranded RNA as control. However, several authors have reported inconsistencies associated with RNAi. We used RNASeq to analyze genes affected by nonspecific dsRNA exposure. We found only few genes presenting altered expression in schistosomes exposed to GFP or mCherry nonspecific-dsRNAs, most of them encoding uncharacterized proteins. Correlation analysis revealed that there are more differences among biological replicates, than due to treatment with nonspecific controls. These observations are of key relevance to other RNAi gene function assessment in other organisms.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Gene silencing using specific dsRNA is an informative and powerful reverse genetic tool to examine gene function by loss or reduction of specific transcripts. It is widely used in many

organisms including parasites such as *Schistosoma mansoni* (Andrade et al., 2014; Boyle et al., 2003; Kotze and Bagnall, 2006; Mourão et al., 2009; Skelly et al., 2003). Most of the RNA interference (RNAi) assays in trematodes have been performed in *Schistosoma* sp., mostly in *S. mansoni*. Dicer and RISC-associated proteins (piwi/argonaute orthologues) are coded in the genome and transcribed in schistosomes, indicating that post-transcriptional gene silencing could occur (Verjovski-Almeida et al., 2003). Therefore, the use of RNAi to suppress schistosome gene function was possible and had been pursued by different groups as the primary reverse

* Corresponding author. Permanent address: Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Avenida Augusto de Lima, 1715, Barro Preto, Belo Horizonte, Minas Gerais CEP:30190-002, Brazil.

E-mail address: marinamm@cpqrr.fiocruz.br (M.M. Mourão).

genetics tool available in helminthes. The first two reports of RNAi targeted manipulation of endogenous gene expression in a parasitic flatworm were in *S. mansoni*. Skelly and collaborators (Skelly et al., 2003) suppressed the expression of a cathepsin B gene in *S. mansoni* by soaking schistosomula in dsRNA for 6 days. Lower levels of cathepsin B were identified by immuno-staining and by enzyme activity measurements, and the suppression was checked at the RNA level using RT-qPCR. In another report, Boyle and collaborators (Boyle et al., 2003) targeted two *S. mansoni* genes: SGTP1, a facilitated diffusion glucose transporter and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). *S. mansoni* larvae treated *in vitro* for 6 days with specific dsRNA showed 70–80% reduction at the transcript level, while non-targeted transcripts were not affected. The phenotype of parasites exposed to SGTP1 dsRNA was 40% reduction in glucose absorption (Boyle et al., 2003). Since then, a number of experiments based on RNAi have been performed in *Schistosoma* targeting diverse life stages in culture: miracidia, sporocysts, schistosomula and adult worms, demonstrating the feasibility of manipulation of gene expression and shedding light on the functions of several schistosome genes.

Despite the clear success of RNAi use in schistosomes, there are critical reports on the reproducibility of experiments among other pitfalls, especially off-target effects (Geldhof et al., 2007). To date there are 49 papers that used RNAi to knockdown different genes in various life stages of *S. mansoni*, using long double-stranded RNA (dsRNA) or small interfering RNA (siRNA). For those using siRNAs, the commonly used controls are commercial irrelevant scrambled siRNAs or mutated versions of the siRNAs. Regarding the use of dsRNA, 85% of the papers used a nonspecific dsRNA as control. The most frequently used controls are dsRNA of an irrelevant non-schistosome RNA, GFP (green-fluorescent protein from pCRII plasmid vector) and mCherry (*Discosoma* sp. mCherry fluorescent protein, GenBank AY678264) accounting for 18% and 11% of the reports, respectively. In most studies, the authors used quantitative real-time PCR (qPCR) to measure the levels of knockdown. The endogenous genes commonly used in qPCR normalization are α -tubulin, GAPDH, 18S rRNA or cytochrome C oxidase I. Additionally, dsRNAs specific for paramyosin, actin, alkaline phosphatase and proteasome subunit beta type-4 were used as controls.

Since its discovery, among the main concerns of any study involving functional analysis by RNAi are around the occurrence and extent of off-target effects (disturbance in the expression of genes non-related or similar to the specific gene target). Off-targeting has been a concern for experiments using schistosomes and other helminthes, in addition to issues regarding the reproducibility of different methods used to deliver dsRNAs in RNAi experiments (Geldhof et al., 2007; Mourão et al., 2009; Stefanić et al., 2010). It has also been described that the dsRNA itself can have an effect on the parasites which emphasizes the need for adequate controls (Geldhof et al., 2007). Furthermore, we have observed that for some genes, the transcript expression levels of controls treated with different nonspecific dsRNAs diverge from untreated controls. Based on the above mentioned issues and taking into account discrepancies observed in our experience working for years with functional analysis using RNAi of several *S. mansoni* genes, we decided to globally investigate the effects of two of the most frequently used nonspecific dsRNA controls, GFP and mCherry. We used an RNASeq approach in order to globally investigate off-target effects.

2. Material and methods

2.1. Parasites

Here, we used the LE strain of *S. mansoni* that was maintained at

Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ by passages using *Biomphalaria glabrata* as the intermediate host. Schistosomula were obtained by mechanical transformation of cercariae (Basch, 1981) and cultured in Glasgow Minimum Essential Medium (GMEM) (Sigma-Aldrich, Germany) supplemented with 0.2 μ M triiodothyronine (Sigma-Aldrich, Germany); 0.1% glucose; 0.1% lactalbumin (Sigma-Aldrich, Germany); 20 mM HEPES; 0.5% MEM vitamin solution (Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA); 5% Schneider's Insect Medium (Sigma-Aldrich, Germany); 0.5 μ M Hypoxanthine (Sigma-Aldrich, Germany), 1 μ M hydrocortisone (Sigma-Aldrich, Germany), 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA) and 2% heat-inactivated Fetal Bovine Serum (Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA).

2.2. dsRNA synthesis

The sequences of primers for dsRNA synthesis were taken from the literature (Mourão et al., 2009; Stefanić et al., 2010) and synthesized by IDT (IDT, USA). A T7 promoter tag was added to the 5' end of all PCR primers. A fragment of 360 bp of the open reading frame for GFP was amplified from the plasmid vector pCRII-GFP (Thermo Fisher Scientific, USA) (GFP_dsRNA_Forward 5'-taatacactactatagggTCTCAAGTCCGCCATG-3' and GFP_dsRNA_Reverse 5'-taatacactactatagggTGCTCAGGTAGTGGTTGTC-3') and a 711 bp fragment for mCherry (mCherry_dsRNA_Forward 5'-taatacactactatagggTGGTGAGCAAGGGCGA-3' and mCherry_dsRNA_Reverse 5'-taatacactactatagggTTACTTGTACAGCTCGTCC-3') were used as nonspecific RNAi controls. In lowercase are the T7 promoter sequence and in capital letters are the specific sequences for each gene. Following amplification, PCR products were separated on 1% agarose gels and purified using QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany), sequence identity was confirmed by Sanger sequencing. The dsRNAs were generated from PCR products using the T7 RiboMAX Express RNAi Kit (Promega, USA) according to the manufacturer instructions (Mourão et al., 2009; Stefanić et al., 2010). dsRNAs were analyzed by 1% agarose electrophoresis to check the integrity and annealing of the dsRNA transcript. In order to have a positive dsRNA knockdown control, a SmERK (Smp142050) gene fragment of approximately 500 bp was also amplified by PCR. Primers for this gene were previously designed and used by Andrade et al. (2014). cDNA was synthesized using SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA). Transcript levels were verified by RT-qPCR on an ABI 7500 RT-PCR system (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, USA) using Power SYBR® Green Master mix (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, USA) and using the Cytochrome C oxidase I gene (GenBank AF216698) (Oliveira et al., 1998) as endogenous control to normalize expression levels. Post-RNAi transcript levels were analyzed using the comparative Ct method (Livak and Schmittgen, 2001) and expressed as percentage of difference compared to the untreated control.

2.3. Parasite exposure and RNA extraction

In order to clarify the effects in gene expression triggered by largely used nonspecific controls in schistosomula transcriptomes, we performed RNASeq-based deep sequencing in schistosomula untreated and treated with dsRNA of GFP or mCherry and the positive control SmERK. Schistosomula (~500,000 worms) were cultivated in flasks containing 10 mL GMEM supplemented as above mentioned. For each treatment, 100 nM of dsRNA were added after transformation. Untreated controls (A and B) contained only supplemented medium and parasites. Incubations were carried for 2 days at 37 °C under 5% CO₂ and 95% relative humidity. Three biological replicates of each one of the four conditions

(control A, control B, GFP-dsRNA and mCherry-dsRNA) were used for RNASeq analysis, totaling 12 samples.

2.4. RNASeq libraries and sequencing

Total RNA was isolated from 12 samples using RNeasy Mini kit (Qiagen, Germany). DNase digestion was performed to remove DNA using Turbo DNA-free kit (Ambion, Thermo Fisher Scientific, USA). The quality of RNA samples was assessed using Agilent RNA 6000 Pico kit and BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies, USA). After quality assessment, RNA samples were directed to mRNA purification, fragmentation, cDNA synthesis, and library preparation. Barcoded RNASeq libraries were prepared using TruSeq stranded mRNA kit (Illumina, USA) and were pooled in equimolar concentrations after quantitative PCR analysis. Libraries were sequenced for 200 cycles (paired-end sequencing) in a HiSeq 2500 (Illumina, USA) using a HiSeq Rapid SBS sequencing kit v.2 (Illumina, USA). Raw reads were preprocessed using the standard Illumina pipeline to segregate multiplexed reads. Sequence quality were checked using the FastQC program (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). Sequences were then aligned to the *S. mansoni* reference genome (v. 5.0) (Protasio et al., 2012) using STAR (v. 2.5.0a) (Dobin et al., 2013). The sub-command multicov in bedtools suite (v. 2.15.0) was used to count the reads mapped to genes.

2.5. Differential gene expression analyses

Downstream analyses of count data was carried out using the R statistical software package (v. 3.3.2) (R Development Core Team, 2011). To ascertain genes that significantly change after nonspecific dsRNA exposure, we used edgeR (v. 3.14.0) (Robinson et al., 2009) to normalize the data and performed statistical analysis using false discovery rate (FDR) of 0.05. UniProt, KEGG, GO and databases were used to elucidate the functional classifications of these differentially expressed genes (DEGs). Additionally, we used BLASTN to search for sequence similarities among the DEGs and the nonspecific controls. Clustering analysis was performed using the heatmap function from ggplots package and PCA plots were generated using ggplot2 package in R environment (R Development Core Team, 2011).

3. Results

3.1. DsRNA exposure, sample preparation, sequencing and quality assessment of RNASeq libraries

First, in order to show that target genes are effectively knocked down after exposure to dsRNAs, the transcript levels of SmERK gene were assessed in samples treated with GFP-dsRNA and SmERK-dsRNA relative to the untreated controls (Fig. 1).

We generated 12 paired-end libraries yielding a total of 567 M paired-end reads with 100 bps as average sequence length, with GC content of 38–40%. Initial quality assessment was carried out using the FastQC program (<http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc>). The results indicated that RNASeq data were of high quality and adequate for downstream transcriptome analyses. Raw data of all samples analyzed in the present study was uploaded to Sequence Read Archive (SRA; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>), with accession number: PRJNA354932. Sequences were then aligned to the *S. mansoni* reference genome (v. 5.0) resulting in more than 85% of uniquely mapped reads.

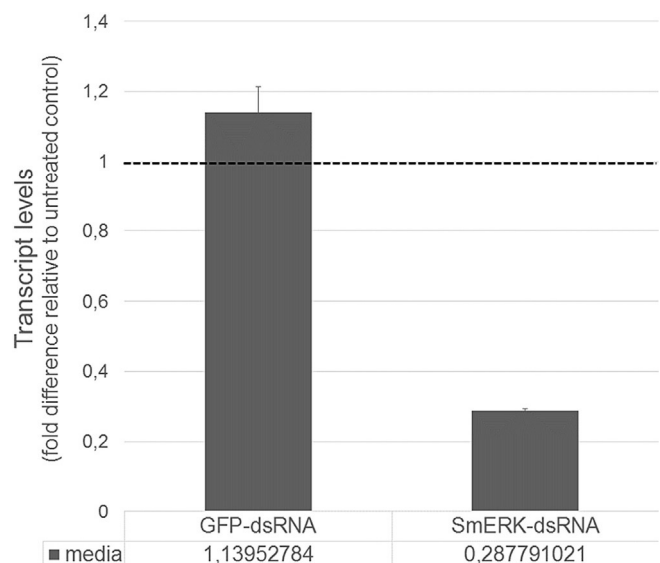


Fig. 1. Positive gene knockdown by dsRNA in schistosomula. Mean of transcript levels of positive control (SmERK) relative to untreated control in samples exposed to GFP-dsRNA or SmERK-dsRNAs after 2 days. Bar graph depicting the mean fold-differences of SmERK transcripts levels in the three biological replicates with the standard errors. The dotted line represents the normalized transcript levels relative to untreated controls.

3.2. Gene expression in schistosomula treated with nonspecific dsRNA

A total of 6 DEGs were identified in the GFP-dsRNA treated schistosomula and 3 DEGs in the mCherry-dsRNA (P -value < 0.01) compared with untreated control parasites. Additionally, the same analyzes were conducted among the untreated control samples and we found 8 DEGS (Fig. 2).

The majority of DEGs coded for uncharacterized proteins and none of them were used before as endogenous control to normalize relative quantification by RT-qPCR experiments (Table 1). We also found that none of the DEGs encode proteins related to the post-transcriptional gene silencing complex/mechanism.

Moreover, in order to identify possible sequences similarities among nonspecific controls and *S. mansoni* DEGs, we checked that there is no sequence similarity between DEGs and GFP or mCherry dsRNAs sequences using BLASTN and find no evidence of off-targeting.

Importantly, we visualized sample-to-sample distances in a heatmap and PCA analyses and found that the biological replicates are more prone to cluster together than nonspecific or untreated controls (Fig. 3A and B, D and E). Also, we demonstrated that performing RNASeq in six different populations of untreated schistosomula (Fig. 3 C and F) results in the same pattern observed for samples treated with nonspecific dsRNA compared to respective untreated controls, thus indicating that there is no significant difference in expression in nonspecific dsRNA treated parasites. Correlation analysis between all intra and inter treatment conditions resulted in a Spearman's rank coefficient greater than 0.987, which indicates very low variability between conditions and replicates.

4. Discussion

RNA interference is long-serving and a well-established reverse genetic tool for gene function studies in trematodes. Here, we used RNASeq to investigate transcriptional profiles of schistosomula exposed to commonly used nonspecific dsRNAs. We demonstrated

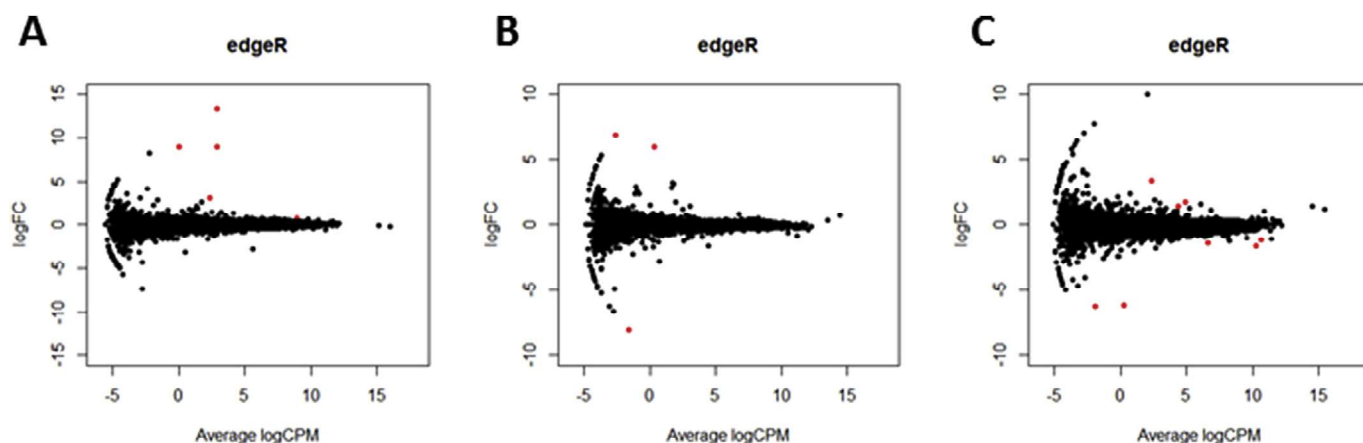


Fig. 2. Summary of *Schistosoma mansoni* genes identified as being differentially expressed in dsRNA-treated schistosomula compared to untreated controls. Smear plot depicting an edgeR analyses to identify DEGs between GFP-dsRNA control and untreated control A (A), mCherry-dsRNA and untreated control B (B) and between untreated controls (C). The log-fold change (logFC) for each gene is plotted against the average abundance (logCPM). Significantly altered genes were defined using a false discovery rate (FDR) of 0.05. DEGs are highlighted in red. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.).

Table 1

Table shows the differentially expressed genes of *Schistosoma mansoni* dsRNA treated and untreated controls. The gene ID, FDR, UniProt ID, protein name, number of amino acids and GO and KEGG annotations of the DEGs are presented in the table.

GFP versus Control A						
Gene ID	FDR	UniProt ID	Protein name	Length (aa)	KO	GO
Smp_101720	0.00327679263752273	G4VGG9	Uncharacterized protein	119		
Smp_178030	2.45E+09	G4VAH3	Putative uncharacterized protein	120		
Smp_180620	0.0195356437654303	G4LVF0	Putative uncharacterized protein	65		
Smp_185310	0.000201551055411758	G4VAH1	Putative uncharacterized protein	71		
Smp_190340	2.45E+09	G4VAH1	Putative uncharacterized protein	71		
Smp_192030	0.000275707659743057	G4VGG8	Uncharacterized protein	121		
mCherry versus Control B						
Gene ID	FDR	UniProt ID	Protein name	Length (aa)	KO	GO
Smp_089920	0.0091345014770806	G4VCW7	Putative uncharacterized protein (Fragment)	177		
Smp_174330	0.0091345014770806	G4VRM0	Uncharacterized protein	91	K12818	
Smp_201260	0.00156715409127624	G4LUX3	Putative uncharacterized protein Smp_201260	82		
Control A versus Control B						
Gene ID	FDR	UniProt ID	Protein name	Length (aa)	KO	GO
Smp_089920	0.0451589356896681	G4VCW7	Putative uncharacterized protein (Fragment)	177		
Smp_138070	0.0319760185368912	G4LZU0	MEG-3 (Grail) family (Fragment)	117		
Smp_145520	0.0474989522973106	G4VIY3	Putative adrenoreceptor	379	K04163	GO:0001588; GO:0001963; GO:0007191; GO:0007612; GO:0016021; GO:0035240; GO:0060158; GO:0007017; GO:0030286
Smp_169190	4.175E+08	C1M053	Putative tegumental protein (Tegumental allergen-like protein)	176		
Smp_180620	0.00581379598174796	G4LVF0	Putative uncharacterized protein	65		
Smp_183600	0.000158856109980954	G4VDW9	Jagged (Fragment)	146		GO:0016021
Smp_192030	0.000498671425697683	G4VGG8	Uncharacterized protein	121		
Smp_205590	0.00830752482154586	G4M211	Putative uncharacterized protein Smp_205590	50		

FDR (false discovery rate); aa (amino acids); KO (KEGG Ontology annotation); GO (Gene Ontology annotation).

that there are very few genes with altered expression in schistosomula exposed to dsRNAs at a concentration of 100 nM after 2 days of culture, when compared to untreated controls. We also show that the number of differentially expressed genes found in the samples treated with nonspecific dsRNAs is even lower than that observed in untreated controls (derived from two different sequencing runs including three biological replicates). Reinforcing

this result, biological replicates tend to group more closely than equally treated parasites, which indicates that there is more variation among biological replicates than those triggered by the exposure to the two different nonspecific dsRNAs. Despite the highly discussed experimental variations and inconsistencies in RNAi assays, our findings confirm that GFP and mCherry dsRNAs can continue to be used as controls in RNAi experiments in

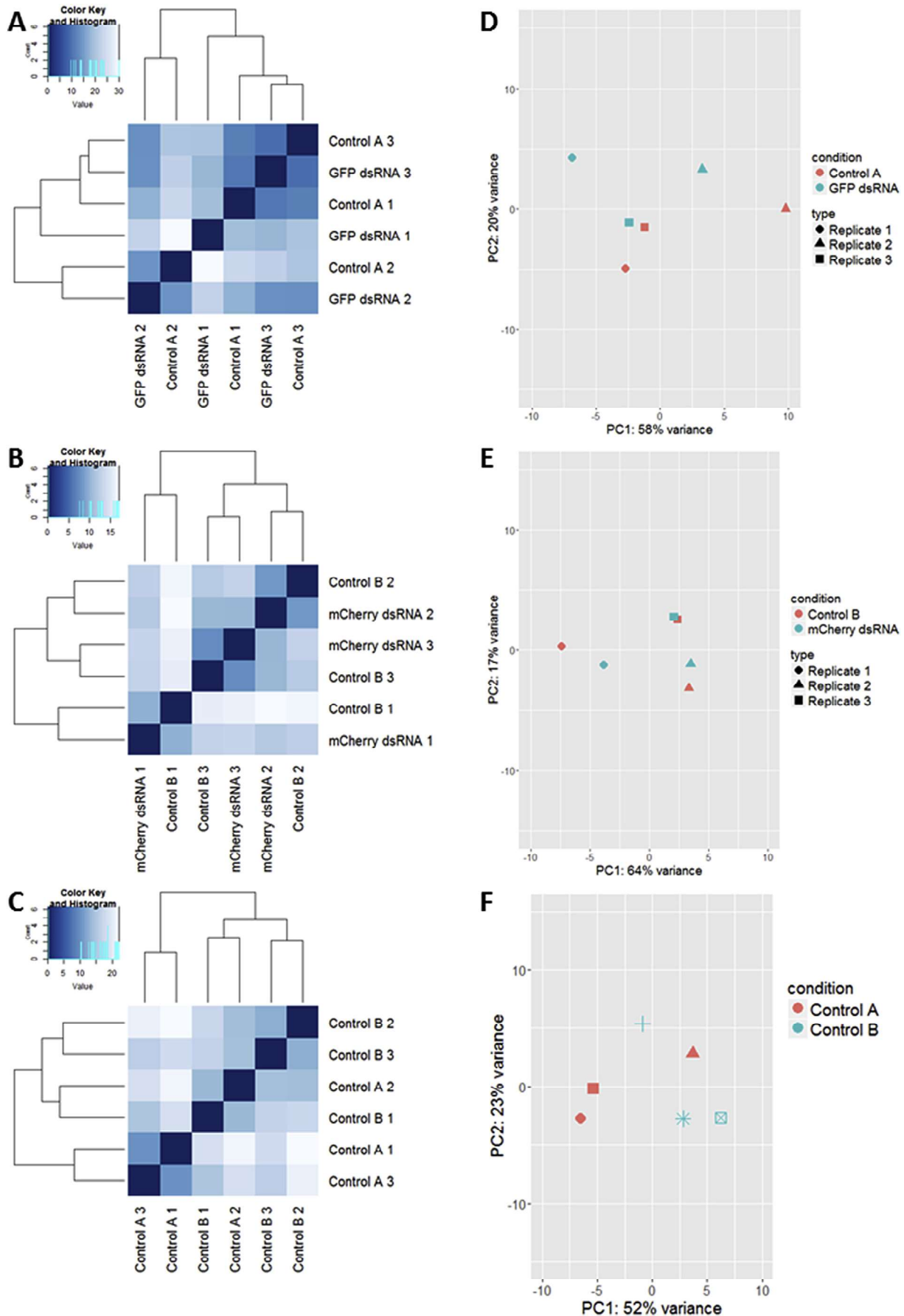


Fig. 3. Analyses of biological samples of *Schistosoma mansoni* dsRNA treated and untreated controls. Correlation plots with a dendrogram and a color key and histogram (upper left of the heatmap) for the samples of *S. mansoni* RNASeq GFP-dsRNA control versus untreated control A (A), mCherry-dsRNA versus untreated control B (B) and untreated controls (C). Principal Component Analysis (PCA) of whole transcriptome expression patterns in GFP-dsRNA control versus untreated control A (D), mCherry-dsRNA versus untreated control B (E) and untreated controls (F). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

S. mansoni, taking into account the low impact that their presence has on parasite gene expression.

The variations and inconsistencies widely observed and discussed in the literature may be due to other parameters, either related to RNAi, for example the different delivery methods, or to cultivation methods, like medium acidification, temperature, quantity of parasites. This type of observation has already been noted in our laboratory in which the same experiment with the same dsRNAs and the same culture conditions when carried out on a large scale have discrepant results. This emphasizes the importance of performing knockdown kinetics using strictly the same parameters and experimental controls. Here, we demonstrate that GFP and mCherry are good controls for loss of function experiments in *S. mansoni* schistosomula. Our results indicate that factors extrinsic to the RNAi can be more relevant to the variation observed. The measured differences due to the interference are essentially negligible. In sum our finds that the controls that most laboratories use, GFP or mCherry, are suitable controls for RNAi studies in schistosomula. The results indicate clearly that RNAi is a very robust approach that needs to be very carefully executed.

Acknowledgements

This work has been supported by funding from the European Commission's Seventh Framework Programme for research, under Grant agreement no. 602080 (A-ParaDDisE), CAPES Programa PCDD-Programa CAPES/Nottingham University (3661/2014), FAPEMIG (CBB-APQ-0520-13), Rede de Plataformas Tecnológicas Fiocruz. GO received funds from CNPq (470673/2014-1 and 309312/2012-4) and is funded by CAPES (003/2014, REDE 21/2015), CNPq (304138/2014-2), and FAPEMIG (PPM-35 00189-13).

References

- Basch, P.F., 1981. Cultivation of *Schistosoma mansoni* in vitro. I. Establishment of cultures from cercariae and development until pairing. *J. Parasitol.* 67, 179–185. <http://dx.doi.org/10.2307/3280632>.
- Boyle, J.P., Wu, X.-J., Shoemaker, C.B., Yoshino, T.P., 2003. Using RNA interference to manipulate endogenous gene expression in *Schistosoma mansoni* sporocysts. *Mol. Biochem. Parasitol.* 128, 205–215. [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-6851\(03\)00078-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-6851(03)00078-1).
- Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., Gingeras, T.R., 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15–21. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>.
- Geldhof, P., Visser, A., Clark, D., Saunders, G., Britton, C., Gilleard, J., Berriman, M., Knox, D., 2007. RNA interference in parasitic helminths: current situation, potential pitfalls and future prospects. *Parasitology* 134, 609–619. <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182006002071>.
- Andrade, L.F.d., Mourão, MdM, Geraldo, J.A., Coelho, F.S., Silva, L.L., Neves, R.H., et al., 2014. Regulation of *Schistosoma mansoni* development and reproduction by the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8 (6), e2949. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002949>.
- Kotze, A.C., Bagnall, N.H., 2006. RNA interference in *Haemonchus contortus*: suppression of beta-tubulin gene expression in L3, L4 and adult worms in vitro. *Mol. Biochem. Parasitol.* 145, 101–110. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.09.012>.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25, 402–408. <http://dx.doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Mourão, M.M., de Moraes Mourão, M., Dinguirard, N., Franco, G.R., Yoshino, T.P., 2009. Phenotypic screen of early-developing larvae of the blood fluke, *Schistosoma mansoni*, using RNA interference. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3, e502. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000502>.
- Oliveira, G., Busek, S., Corrêa-Oliveira, R., 1998. Transcription levels of two actin genes (SmAct and SmAct2), cytochrome C oxidase subunit II (SmCOXII), triosephosphate isomerase (TPI), and a putative translation regulatory protein EIF-5 during the first seven days of in vitro development of *Schistosoma*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 93 (Suppl. 1), 215–217.
- Protasio, A.V., Tsai, I.J., Babbage, A., Nichol, S., Hunt, M., Aslett, M. a, De Silva, N., Velarde, G.S., Anderson, T.J.C., Clark, R.C., Davidson, C., Dillon, G.P., Holroyd, N.E., LoVerde, P.T., Lloyd, C., McQuillan, J., Oliveira, G., Otto, T.D., Parker-Manuel, S.J., Quail, M. a, Wilson, R.A., Zerlotini, A., Dunne, D.W., Berriman, M., 2012. A systematically improved high quality genome and transcriptome of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1455. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001455>.
- R Development Core Team, 2011. R: a Language and Environment for Statistical Computing.
- Robinson, M.D., McCarthy, D.J., Smyth, G.K., 2009. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26, 139–140. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>.
- Skelly, P.J., Da'dara, A., Harn, D. a, 2003. Suppression of cathepsin B expression in *Schistosoma mansoni* by RNA interference. *Int. J. Parasitol.* 33, 363–369. [http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519\(03\)00030-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519(03)00030-4).
- Stefanić, S., Dvořák, J., Horn, M., Braschi, S., Sojka, D., Ruelas, D.S., Suzuki, B., Lim, K.-C., Hopkins, S.D., McKerrow, J.H., Caffrey, C.R., 2010. RNA interference in *Schistosoma mansoni* schistosomula: selectivity, sensitivity and operation for larger-scale screening. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e850. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000850>.
- Verjovski-Almeida, S., DeMarco, R., Martins, E. a L., Guimarães, P.E.M., Ojopi, E.P.B., Paquola, A.C.M., Piazza, J.P., Nishiyama, M.Y., Kitajima, J.P., Adamson, R.E., Ashton, P.D., Bonaldo, M.F., Coulson, P.S., Dillon, G.P., Farias, L.P., Gregorio, S.P., Ho, P.L., Leite, R. a, Malaquias, L.C.C., Marques, R.C.P., Miyasato, P. a, Nascimento, A.L.T.O., Ohlweiler, F.P., Reis, E.M., Ribeiro, M. a, Sá, R.G., Stukart, G.C., Soares, M.B., Gargioni, C., Kawano, T., Rodrigues, V., Madeira, A.M.B.N., Wilson, R.A., Menck, C.F.M., Setubal, J.C., Leite, L.C.C., Dias-Neto, E., 2003. Transcriptome analysis of the acelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. *Nat. Genet.* 35, 148–157. <http://dx.doi.org/10.1038/ng1237>.

Anexo 8.3 – Artigo publicado

Dr. Coen Adema; Dr. LaDeana Hillier , Dr. Catherine Jones , Dr. Eric Loker , Dr. Matty Knight , Mr. Patrick Minx , Dr. Guilherme Oliveira , Dr. Nithya Raghavan , Dr. Andrew Shedlock , Dr. Laurence Amaral , Dr. Halime Arican-Goktas , Ms. Juliana Assis , Dr. Elio Baba , Dr. Olga Baron , Dr. Christopher Bayne , Mr. Utibe Bickham-Wright , Dr. Kyle Biggar , Prof. Michael Blouin , Dr. Bryony Bonning , Dr. Christopher Botka , Dr. Joanna Bridger , Dr. Katherine Buckley , Ms. Sarah Buddenborg , Dr. Roberta Caldeira , Ms. Julia Carleton , Dr. Omar Carvalho , Dr. Maria Castillo , Dr. Iain Chalmers , Dr. Mikkel Christensens , Dr. Sandra Clifton , Céline Cosseau , Dr. Christine Coustau , Dr. Richard Cripps , Dr. Yesid Cuesta-Astroz , Dr. Scott Cummins , Mr. Leon Di Stefano , Miss Nathalie Dinguirard , Dr. David Duval , Dr. Scott Emrich , Dr. Cedric Feschotte , Dr. Rene Feyereisen , Dr. Peter FitzGerald , Mrs. Catrina Fronick , Dr. Lucinda Fulton , Dr. Richard Galinier , Ms. Sandra Gava , Dr. Michael Geusz , Dr. Kathrin Geyer , Dr. Gloria I. Giraldo-Calderón , Dr. Matheus de Souza Gomes , Mrs. Michelle Gordy , Dr. Benjamin Gourbal , Prof. Christoph Grunau , Dr. Patrick Hanington , Prof. Karl F Hoffmann , Dr. Daniel Hughes , Dr. Judith Humphries , Prof. Daniel Jackson , Dr. Liana Jannotti-Passos , Dr. Wander Jeremias , Prof. Susan Jobling , Dr. Bishoy Kamel , Dr. Aurélie Kapusta , Dr. Satwant Kaur , Dr. Joris Koene , Dr. Andrea Kohn , Dr. Dan Lawson , Dr. Scott Lawton , Dr. Di Liang , Dr. Yanin Limpanont , Dr. Sijun Liu , Dr. Anne Lockyer , Ms. TyAnna Lovato , Dr. Fernanda Ludolf , Dr. Vincent Magrini , Prof. Donald McManus , Dr. Monica Medina , Dr. Milind Misra , Prof. Guillaume Mitta , Dr. Gerald Mkoji , Dr. Michael Montague , Mr. Cesar Montelongo Hernandez , Prof. Leonid Moroz , Dr. Monica Munoz-Torres , Dr. Umar Niazi , Dr. Leslie Noble , Mr. Francislon Oliveira , Dr. Fabiano Pais , Prof. Anthony Papenfuss , Mr. Rob Peace , Ms. Janeth Pena , Mr. Emmanuel Pila , Dr. Titouan Quelais , Dr. Brian Raney , Dr. Jonathan Rast , David Rollinson , Dr. Izinara Rosse , Ms. Bronwyn Rotgans , Dr. Edwin Routledge , Dr. Katryn Ryan , Dr. Larissa Scholte , Dr. Kenneth Storey , Dr. Martin Swain , Dr. Jacob Tennesen , Dr. Chad Tomlinson , Dr. Damian Trujillo , Dr. Emanuela Volpi , Prof. Anthony Walker , Dr. Tianfang Wang , Dr. Ittiprasert Wannaporn , Dr. Wesley Warren , Dr. Xiao-Jun Wu , Dr. Timothy Yoshino , Dr. Mohammed Yusuf , Dr. Si-Ming Zhang , Dr. Min Zhao , Rick Wilson. Whole genome analysis of a schistosomiasis-transmitting freshwater snail. **Nature Communications**, 2017.

Este artigo publicado na revista Nature Communications trata do sequenciamento e análise do genoma de *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário de *Schistosoma mansoni*. Atuei nas análises do transcriptoma de *B. glabrata*, na identificação de SNPs a partir de dados de RNASeq de 12 diferentes tecidos do caramujo e seu possível envolvimento em interações parasito-hospedeiro.

ARTICLE

Received 25 Feb 2016 | Accepted 30 Mar 2017 | Published 16 May 2017

DOI: 10.1038/ncomms15451

OPEN

Whole genome analysis of a schistosomiasis-transmitting freshwater snail

Coen M. Adema *et al.*[#]

Biomphalaria snails are instrumental in transmission of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. With the World Health Organization's goal to eliminate schistosomiasis as a global health problem by 2025, there is now renewed emphasis on snail control. Here, we characterize the genome of *Biomphalaria glabrata*, a lophotrochozoan protostome, and provide timely and important information on snail biology. We describe aspects of phero-perception, stress responses, immune function and regulation of gene expression that support the persistence of *B. glabrata* in the field and may define this species as a suitable snail host for *S. mansoni*. We identify several potential targets for developing novel control measures aimed at reducing snail-mediated transmission of schistosomiasis.

Correspondence and requests for materials should be addressed to C.M.A. (email: coenadem@unm.edu).
[#]A full list of authors and their affiliations appears at the end of the paper.

The fresh water snail *Biomphalaria glabrata* (Lophotrochozoa, Mollusca) is of medical relevance as this Neotropical gastropod contributes as intermediate host of *Schistosoma mansoni* (Lophotrochozoa, Platyhelminthes) to transmission of the neglected tropical disease human intestinal schistosomiasis¹. Penetration by an *S. mansoni* miracidium into *B. glabrata* initiates a chronic infection in which the parasite alters snail neurophysiology, metabolism, immunity and causes parasitic castration such that *B. glabrata* does not reproduce but instead supports generation of cercariae, the human-infective stage of *S. mansoni*. The complex molecular underpinnings of this long term, intimate parasite-host association remain to be fully understood. Patently infected snails release free-swimming cercariae that penetrate the skin of humans that they encounter in their aquatic environment. Inside the human host, *S. mansoni* matures to adult worms that reproduce sexually in the venous system surrounding the intestines, releasing eggs, many of which pass through the intestinal wall and are deposited in water with the feces. Miracidia hatch from the eggs and infect another *B. glabrata* to complete the life cycle. Related *Biomphalaria* species transmit *S. mansoni* in Africa. Schistosomiasis is chronically debilitating. Estimates of disease burden indicate that disability-adjusted life years lost due to morbidity rank schistosomiasis second only to malaria among parasitic diseases in impact on global human health².

In the absence of a vaccine, control measures emphasize mass drug administration of praziquantel (PZQ), the only drug available for large-scale treatment of schistosomiasis³. Schistosomes, however, may develop resistance and reduce the effectiveness of PZQ⁴. Importantly, PZQ treatment does not protect against re-infection by water-borne cercariae released from infected snails. Snail-mediated parasite transmission must be interrupted to achieve long-term sustainable control of schistosomiasis⁵. The World Health Organization has set a strategy that recognizes both mass drug administration and targeting of the snail intermediate host as crucial towards achieving global elimination of schistosomiasis as a public health threat by the year 2025 (ref. 6). This significant goal provides added impetus for detailed study of the biology of *B. glabrata*.

Here we characterize the *B. glabrata* genome and describe biological properties that likely afford the snail's persistence in the field, a prerequisite for schistosome transmission, and that may shape *B. glabrata*/*S. mansoni* interactions, including aspects of immunity and gene regulation. These efforts, we anticipate, will foster developments to interrupt snail-mediated parasite transmission in support of schistosomiasis elimination.

Results

Genome sequencing and analysis. The *B. glabrata* genome has an estimated size of 916 Mb (ref. 7) and comprises eighteen chromosomes (Supplementary Figs 1–3; Supplementary Note 1). We assembled the genome of BB02 strain *B. glabrata*⁸ (~78.5× coverage) from Sanger sequences (end reads from ~136 kbp BAC inserts⁸), 454 sequences (short fragments, mate pairs at 3 and 8 kbp) and Illumina paired ends (300 bp fragments; Supplementary Data 1). Automated prediction (Maker 2)⁹ yielded 14,423 gene models (Methods). A linkage map was used to assign genomic scaffolds to linkage groups (Supplementary Note 2; Supplementary Data 2). We mapped transcriptomes (Illumina PE reads) from 12 different tissues of BB02 snails (Methods; Supplementary Data 1) onto the assembly to aid gene annotation. The pile up of reads revealed polymorphic transcripts (containing single nucleotide variants; SNV), that were correlated through KEGG¹⁰ analyses with metabolic

pathways represented in the predicted proteome and the secretome (Supplementary Figs 4–7; Supplementary Note 3; Supplementary Data 7–8). Combined with delineation of organ-specific patterns of gene expression (Supplementary Figs 8 and 9; Supplementary Note 4; Supplementary Data 9), this provided potential molecular markers to help interpret *B. glabrata*'s responses to environmental insults and pathogens, including schistosome-susceptible mechanisms and resistant phenotypes.

Communication in an aquatic environment. Aquatic molluscs employ proteins for communication; for example, *Aplysia* attracts conspecifics using water-soluble peptide pheromones¹¹. We collected *B. glabrata* proteins from snail conditioned water (SCW) and following electrostimulation (ES), which induces rapid release of proteins. The detection by NanoHPLC-MS/MS of an orthologue of temptin, a pheromone of *Aplysia*¹², among these proteins (Supplementary Note 5; Supplementary Data 10) suggests an operational pheromone sensory system in *B. glabrata*. To explore mechanisms for chemosensory perception, the *B. glabrata* genome was analysed for candidate chemosensory receptor genes of the G-protein-coupled receptor (GPCR) superfamily. We identified 241 seven transmembrane domain GPCR-like genes belonging to fourteen subfamilies, that cluster in the genome. RT-PCR and *in situ* hybridization confirmed expression of a GPCR-like gene within *B. glabrata* tentacles, known to be involved in chemosensation (Fig. 1). Use of chemical communication systems to interact with conspecifics may have a tradeoff effect by potentially exposing *B. glabrata* as a target for parasites (Supplementary Figs 10 and 11; Supplementary Note 6; Supplementary Data 11) and that can be developed to interfere with snail mate finding and/or host location by parasites.

Stress and immunity. To persist in the environment, *B. glabrata* must manage diverse stressors, including heat, drought, xenobiotics, pollutants and pathogens including *S. mansoni*. Additional to previous reports of *Capsaspora*¹³ a single-cell eukaryote endosymbiont, we noted from the sequenced material an unclassified mycoplasma (or mollicute bacteria) and viruses (Supplementary Figs 12 and 13; Supplementary Notes 7 and 8; Supplementary Data 12). Pending further characterization of prevalence, specificity of association with *B. glabrata*, and impact on snail biology, these novel agents may find application in genetic modification of *B. glabrata* or control of snails through use of specific natural pathogens. Five families of heat-shock proteins (HSP): HSP20, HSP40, HSP60, HSP70 and HSP90 contribute to anti-stress response capabilities of *B. glabrata*. The *HSP70* gene family is the largest with six multi-exon genes, five single-exon genes, and over ten pseudogenes (Supplementary Figs 14–17; Supplementary Note 9; Supplementary Data 13). In general, it is anticipated that future genome assemblies and continued annotation efforts can identify additional *B. glabrata* genes and provide updated gene models to reveal that some current pseudogenes are in fact intact functional genes. The existence of a single-exon *HSP70* gene, however, was independently confirmed by sequence obtained from *B. glabrata* BAC clone (BG_BB117G16, Genbank AC233578, basepair interval 49686–51425) and this supports the notion that prediction of single exon gene models for several *HSP70* genes from the current genome assembly is accurate. Retention of *HSP* genes in *B. glabrata* embryonic (*Bge*) cells, the only available molluscan cell line¹⁴, enables *in vitro* investigation of anti-stress and pathogen responses involving *B. glabrata* HSPs (Supplementary Figs 18–22; Supplementary Note 10; Supplementary Data 14). In addition, *B. glabrata* has about 99 genes encoding haem-thiolate enzymes (CYP superfamily)

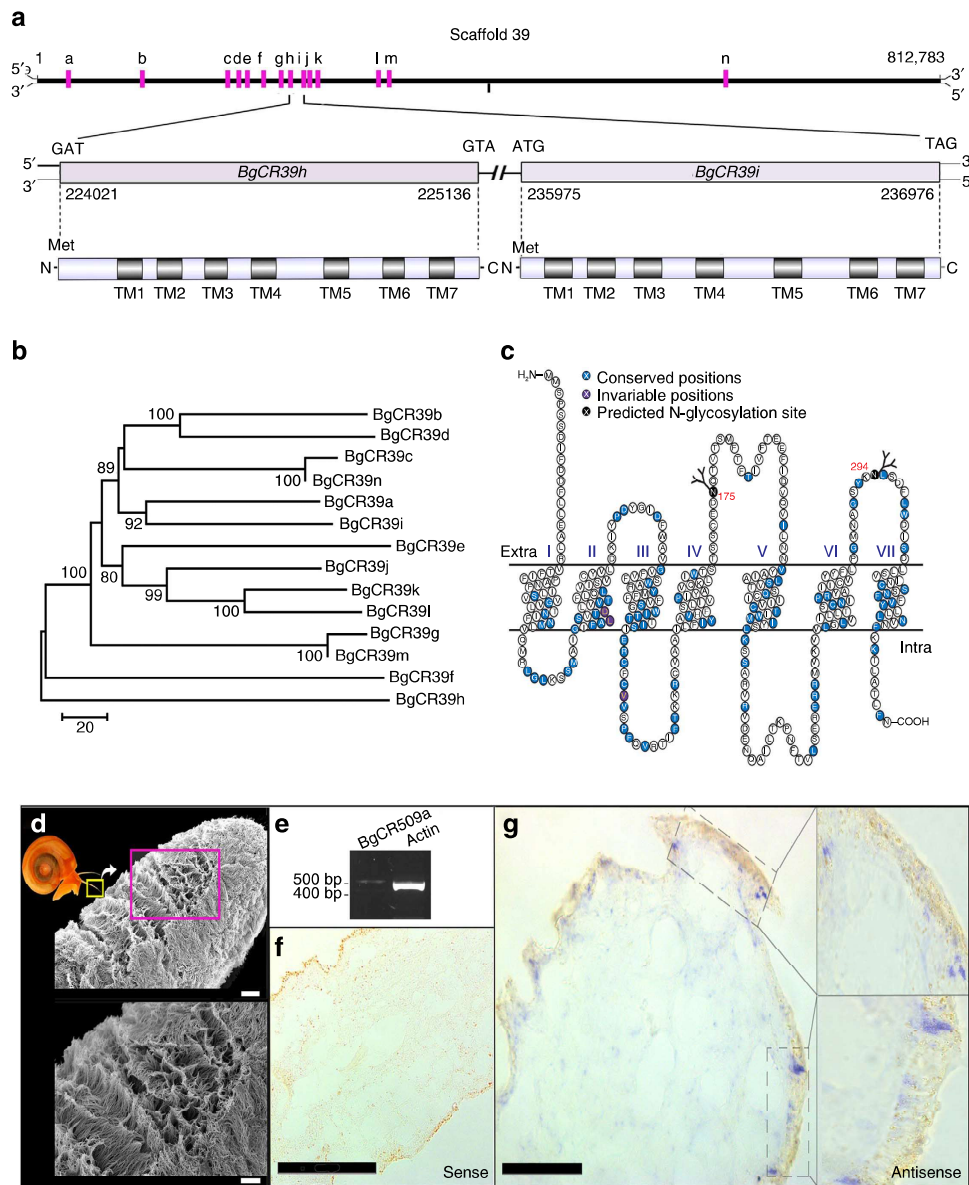


Figure 1 | Candidate chemosensory receptors of *B. glabrata*. (a) LGUN_random_Scaffold39 contains fourteen candidate chemosensory receptor (CR) genes (BgCRa-n). Most encode seven-transmembrane domain G-protein-coupled receptor-like proteins, BgCRm and BgCRn are truncated to six-transmembrane domains. See Supplementary Data 11 for gene model identifiers. (b) Phylogenetic analysis (neighbour joining, scale bar represents amino-acid substitutions per site) of chemosensory receptors on LGUN_random_Scaffold39 (protein-level). (c) Schematic of receptor showing conserved and invariable amino acids, transmembrane domains I-VII; and location of glycosylation sites. (d) Scanning electron micrograph showing anterior tentacle, with cilia covering the surface. Scale bar, 20 μ m (top); 10 μ m (bottom). (e) RT-PCR gel showing amplicon for BgCR509a and actin from *B. glabrata* tentacle. (f,g) *In situ* hybridization showing sense (negative control) and antisense localization of BgCR509a mRNA in anterior tentacle section (purple). Scale bar (f): 100 μ m; (g) 50 μ m.

toward detoxifying xenobiotics, with representation of all major animal cytochrome P450 clans. Eighteen genes of the mitochondrial clan suggest that molluscs, like arthropods, but unlike vertebrates, also utilize mitochondrial P450s for detoxification¹⁵. Tissue-specific expression (for example, four transcript sequences uniquely in ovotestis) suggests that 15 P450 genes serve specific biological processes. These findings indicate potential for rational design of selective molluscicides, for example, by inhibiting unique P450s or by activation of the molluscicide only by *B. glabrata*-specific P450s (Supplementary Note 11; Supplementary Data 16).

Biomphalaria glabrata employs pattern recognition receptors (PRRs)¹⁶ to detect pathogens and regulate immune responses.

These include 56 *Toll-like receptor* (TLR) genes, of which 27 encode complete TLRs (Fig. 2; Supplementary Note 12; Supplementary Data 17), associated with a signaling network for transcriptional regulation through NF- κ B transcription factors (Supplementary Fig. 23; Supplementary Note 13; Supplementary Data 18). Like other lophotrochozoans, *B. glabrata* shows expansion of TLR genes relative to mammals and insects which have ~10 TLRs¹⁷. Other PRRs include eight peptidoglycan recognition-binding proteins (PGRPs), and a single Gram-negative binding protein (GNBP; Supplementary Note 12; Supplementary Data 17). A prominent category of *B. glabrata* PRRs consists of fibrinogen-related proteins (FREPs), plasma lectins that are somatically mutated to yield unique FREP

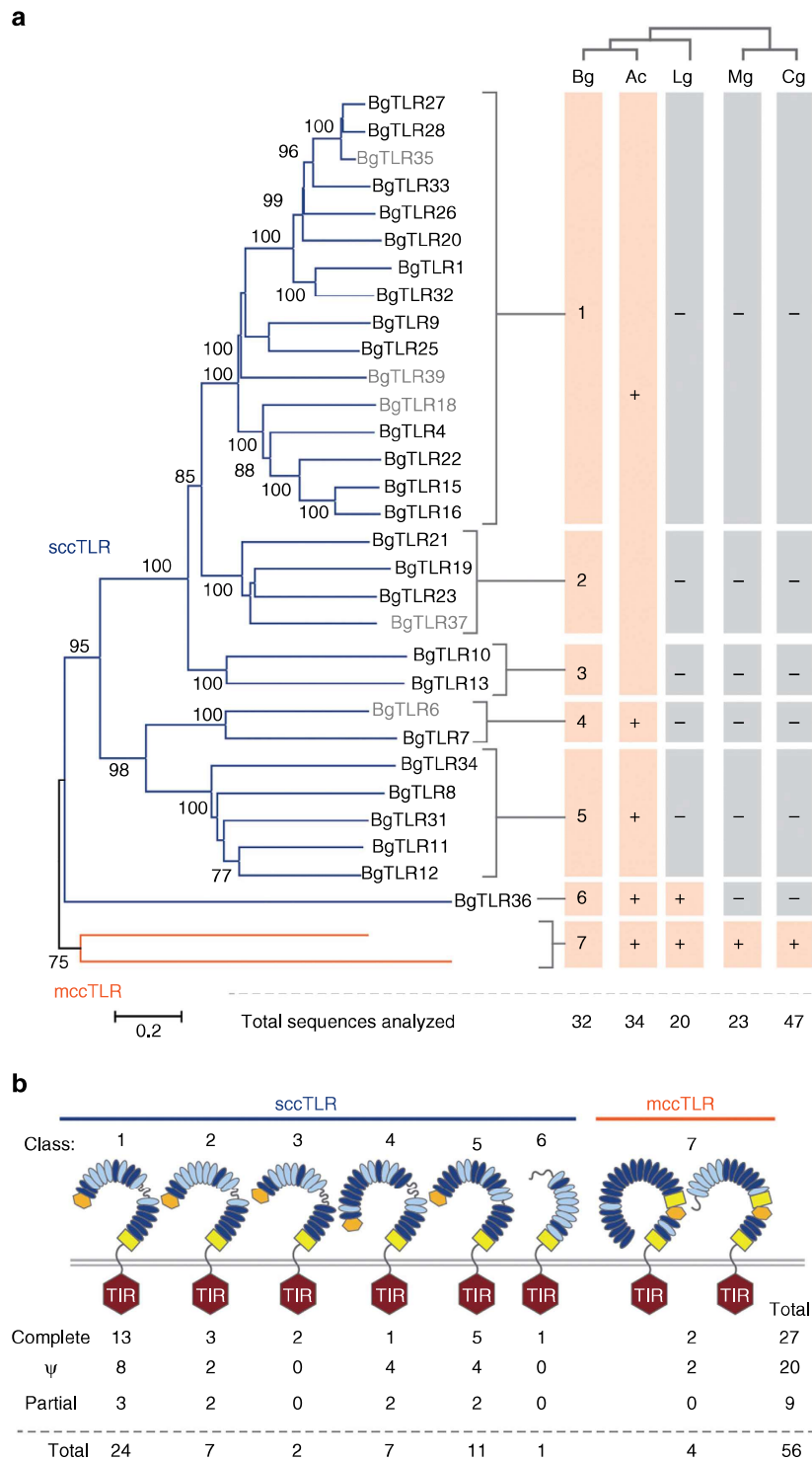


Figure 2 | TLR genes in *B. glabrata*. (a) Analysis of the (complete) TIR domains from BgTLRs identified seven classes (neighbour-joining tree, scale bar represents amino-acid substitutions per site). Bootstrap values shown for 1,000 replicates. Comparisons included TLRs from *A. californica* (Ac), *L. gigantea* (Lg), *Mytilus galloprovincialis* (Mg) and *C. gigas* (Cg). The presence or absence of orthologues of each class in each molluscan species is indicated. A representative of the *B. glabrata* class 1/2/3 clade is present within *A. californica*, but is independent of the *B. glabrata* TLR classes (indicated by the large pink box). Grey font indicates pseudogenes or partial genes. (b) *B. glabrata* has both single cysteine cluster (scc; blue line)- and multiple cysteine cluster (mcc; orange line) TLRs. Domain structures are shown for BgTLR classes. BgTLRs consist of an LRRNT (orange hexagon), a series of LRRs (ovals), a variable region (curvy line), LRRCT (yellow box), and transmembrane domain, and an intracellular TIR domain (hexagon). The dark blue ovals indicate well defined LRRs (predicted by LRRfinder⁵⁷); light blue ovals are less confident predictions. Each of the two class 7 BgTLRs has a distinct ectodomain structure. The numbers of complete, pseudogenes (Ψ) and partial genes are indicated for each class.

repertoires in individual snails¹⁸. Our analyses revealed that this PRR diversity is generated from a limited set of germline sequences comprising 20 *FREP* genes with two upstream IgSF domains preceding an fibrinogen (FBG)-like domain, and four *FREP* genes encoding one immunoglobulin (IgSF) domain and one C-terminal FBG-like domain, including one gene with an N-terminal PAN_AP domain. *FREP* genes cluster in the genome, often accompanied by partial *FREP*-like sequences (Supplementary Figs 24–27; Supplementary Note 14). A proteomics level study indicated that *S. mansoni* resistance in *B. glabrata* associates with expression of parasite-binding FREPs of particular gene families, as well as GREP (galectin-related protein), *FREP*-like lectins that instead of a C-terminal FBG domain contain a galectin domain¹⁹ (Supplementary Figs 18,19; Supplementary Note 10; Supplementary Data 15). Further analyses yielded novel aspects of *B. glabrata* immune capabilities. We identified several cytokines, including twelve homologs of IL-17, four MIF homologs, and eleven TNF sequences (Supplementary Note 12; Supplementary Data 17). *Biomphalaria glabrata* possesses gene orthologs of complement factors that may function to opsonize pathogens (Supplementary Figs 28 and 29; Supplementary Note 15, Supplementary Data 19).

We discovered an extensive gene set for apoptosis, a response that can regulate invertebrate immune defense²⁰, including ~50 genes encoding for Baculovirus IAP Repeat (BIR) domain-containing caspase inhibitors. The expansion of this gene family in molluscs (17 genes in *Lottia gigantea*, 48 in *Crassostrea gigas*), relative to other animal clades, suggests important regulatory roles in apoptosis and innate immune responses of molluscs²¹ (Supplementary Figs 30–32; Supplementary Note 16; Supplementary Data 20). We characterized a large gene complement to metabolize reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) that are generated by *B. glabrata* hemocytes to exert cell-mediated cytotoxicity toward pathogens, including schistosomes (Supplementary Fig. 33; Supplementary Note 17; Supplementary Data 21).

The antimicrobial peptide (AMP) arsenal of *B. glabrata* is surprisingly reduced compared to other invertebrate species (for example, bivalve molluscs have multiple AMP gene families²²); our searches indicated only a single macin-type gene family, comprising six biomphamacin genes. However, *B. glabrata* does possess multigenic families of antibacterial proteins including two achacins, five LBP/BPIs, and 21 biomphalysins (Supplementary Fig. 34; Supplementary Note 18; Supplementary Data 22 and 23). While gaps in functional annotation limit our interpretation of *B. glabrata* immune function (Supplementary Note 19; Supplementary Data 24 and 25), our analyses reveal a multifaceted, complex internal defense system that must be evaded or negated by parasites such as *S. mansoni* to successfully establish infection.

Regulation of biological processes. Characterization of the regulatory mechanisms that rule gene expression and general biological functions is especially interesting because survival of *B. glabrata* relies on the capacity to quickly recognize, respond, and adapt to external and internal signals. In addition, a better understanding of parasite–host compatibility will be afforded by characterization of snail control mechanisms for gene expression and signalling pathways as possible targets for interference by *S. mansoni* to alter host physiology, including reproductive activities, to survive in *B. glabrata*²³. Gene expression in *B. glabrata* is under epigenetic regulation^{24–26}, we identified chromatin-modifying enzymes including class I and II histone methyltransferases, LSD-class and Jumonji-class histone demethylases, class I–IV histone deacetylases, and GNAT, Myst and CBP superfamilies of histone acetyltransferases.

Biomphalaria has homologues of DNA (cytosine-5)-methyltransferases 1 and 2 (no homolog of DNMT3), as well as putative methyl-CpG binding domain proteins 2/3. *In silico* analyses predicted a mosaic type of DNA methylation, as is typical for invertebrates (Supplementary Figs 35–39; Supplementary Note 20; Supplementary Data 26). The potential role of DNA methylation in *B. glabrata* reproduction and *S. mansoni* interactions is reported in a companion paper²⁷.

The *B. glabrata* genome also encodes the protein machinery for biogenesis of microRNA (miRNAs) to regulate gene expression (Supplementary Note 21; Supplementary Data 27). Two computational methods independently predicted the same 95 pre-miRNAs, encoding 102 mature miRNAs. Of these, 36 miRNAs were observed within our transcriptome data, another 53 miRNAs displayed ≥90% nucleotide identity with *L. gigantea* miRNAs. Bioinformatics predicted 107 novel pre-miRNAs unique to *B. glabrata*. Based on the analysis of binding thermodynamics and miRNA:mRNA structural features, several novel miRNAs were predicted to likely regulate transcripts involved in processes unique to snail biology, including secretory mucosal proteins and shell formation (biomineralization) that may present possible targets for control of *B. glabrata* (Supplementary Figs 40–67; Supplementary Note 21 and 22; Supplementary Data 28–33).

Periodicity of aspects of *B. glabrata* biology²⁸ indicates likely control by circadian timing mechanisms. We identified seven candidate clock genes *in silico*, including a gene with strong similarity to the *period* gene of *A. californica*. Modification of expression of clock genes may interrupt circadian rhythms of *B. glabrata* and affect feeding, egg-laying and emergence of cercariae (Supplementary Note 23).

Neuropeptides expressed within the nervous system coordinate the complex physiology of *B. glabrata*, a simultaneous hermaphrodite snail. *In silico* searches identified 43 *B. glabrata* neuropeptide precursors, predicted to yield over 250 mature signalling products. Neuropeptide transcripts occurred in multiple tissues, yet some were most prominent within terminal genitalia (49%) and the CNS (56%), or even specific to the CNS, including gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and insulin-like peptides 2 and 3 (Supplementary Fig. 68; Supplementary Note 24; Supplementary Data 34–36). The reproductive physiology of hermaphroditic snails is also modulated by male accessory gland proteins (ACPs), which are delivered with spermatozoa to augment fertilization success²⁹. The *B. glabrata* genome has sequences matching one such protein, Ovipostatin (LyAcp10), but none of the other ACPs identified in *Lymnaea stagnalis*³⁰. Putatively, ACPs evolve rapidly and are taxon specific (Supplementary Fig. 69; Supplementary Note 25; Supplementary Data 34), such that they allow for specific targeting of reproductive activity for control measures.

A role of steroid hormones in reproduction of hermaphrodite snails with male and female reproductive organs remains speculative. *Biomphalaria glabrata* has a *CYP51* gene to biosynthesize sterols *de novo*, yet we found no orthologs of genes involved in either vertebrate steroid or arthropod ecdysteroid biosynthesis. The lack of *CYP11A1* suggests that *B. glabrata* cannot process cholesterol to make vertebrate-like steroids. The absence of aromatase (*CYP19*), required for the formation of estrogens, is particularly enigmatic as molluscs possess homologues of mammalian estrogen receptors. Characterization of snail-specific aspects of steroidogenesis may identify targets to disrupt reproduction towards control of snails. (Supplementary Fig. 70; Supplementary Note 26; Supplementary Data 37).

Eukaryotic protein kinases (ePKs) and phosphatases constitute the core of cellular signaling pathways, playing a central role in signal transduction by catalyzing reversible protein

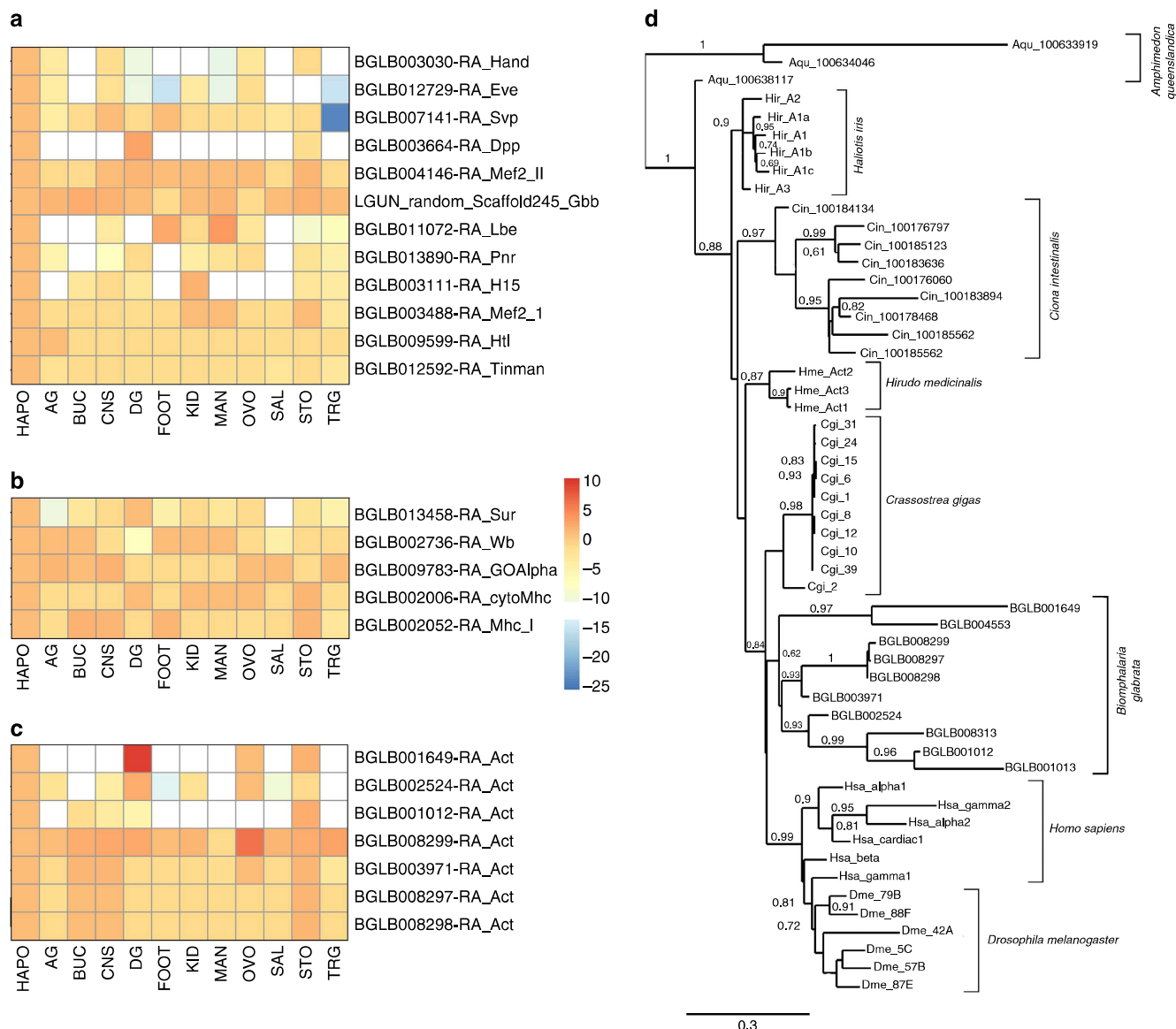


Figure 3 | Expression of cardiac genes and actin genes in *B. glabrata* tissues. (a) Cardiac regulatory genes. (b) Cardiac structural genes. (c) Relative expression of actin genes in *B. glabrata* tissues. For (a–c), the score represents gene level aggregate of normalized FPKM counts for *de novo* assembled tissue transcripts, relative to expression levels in the heart/APO sample. The counts were scaled (with median read count as 0) to indicate expression intensity with red indicating highest, blue lowest. AG, Albumen gland; BUC, buccal mass; CNS, central nervous system; DG, digestive gland; FOOT, headfoot; HAPO, heart/APO; KID, kidney; MAN, mantle edge; OVO, ovotestes; SAL, salivary glands; STO, stomach; TRG, terminal genitalia. (d) Maximum Likelihood tree (Phylogeny.fr, scale bar represents amino-acid substitutions per site) showing phylogenetic relationships of actin genes, based on amino-acid sequence alignment (ClustalW). *Biomphalaria* -snail; *Crassostrea gigas*—oyster; *Haliotis iris*—abalone; *Hirudo medicinalis*—leech (all lophotrochozoans); *Amphimedon queenslandica*, sponge, Prebilateria, ophrotrochozoans), *Drosophila melanogaster*—fruit fly, Ecdysozoa), and the deuterostomes *Ciona intestinalis*, sea squirt; *Homo sapiens*, human. See Supplementary Note 31 for accession numbers.

phosphorylation in non-linearly integrated networks. *Schistosoma mansoni* likely interferes with the extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway to survive in *B. glabrata*²³. Hidden Markov model searches on the predicted *B. glabrata* proteome identified 240 potential ePKs, encompassing all main types of animal ePKs (Supplementary Fig. 71; Supplementary Note 27). Similarity searches also identified 60 putative protein phosphatases comprising ~36 protein Tyr phosphatases (PTPs) and ~24 protein Ser/Thr phosphatases (PSPs) (Supplementary Figs 72–74; Supplementary Note 28). These sequences can be studied for understanding control of homeostasis, particularly in the face of environmental and pathogenic insults encountered by *B. glabrata*.

Bilateria evolution. Genome study of *B. glabrata* can also provide new insights into evolution of bilateria metazoa by increasing diversity of the relatively few lophotrochozoan taxa that have been characterized to date (that is, platyhelminths, leech, bivalve, cephalopod and polychaete)^{31–35}. Comparison of similar biological features and gene expression patterns among lophotrochozoans, ecdysozoans and deuterostomes may indicate the evolutionary origin of conserved gene families and anatomical features. The prevalence in diverse taxa of metazoa, including molluscs, arthropods and chordates, of muscular heart-like organs that function to circulate blood or hemolymph, has led to the proposal that these structures evolved over evolutionary time from a primitive heart present in an urbilateria ancestor.

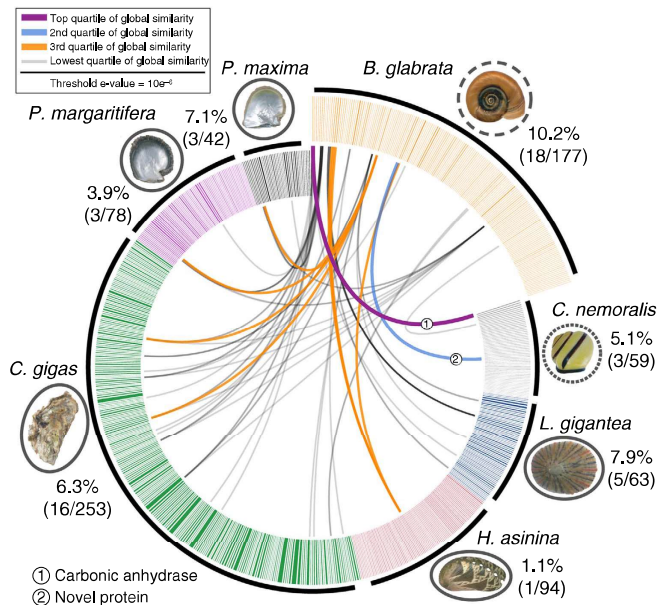


Figure 4 | Comparison of molluscan shell forming proteomes. Circos diagram of 177 mantle-specific, secreted *Biomphalaria* gene products compared against shell forming proteomes of six other molluscs (BLASTp threshold $\leq 10e^{-6}$). Protein pairs that share sequence similarity in the top quartile are linked in purple, the second quartile is linked in blue, third quartile has orange links and lowest quartile of similarity has grey links. Species that occupy marine habitats are surrounded by a solid line, A finely dashed line identifies the terrestrial species *Cepea nemoralis*, the freshwater species *B. glabrata* has a coarse line. Percentages (and proportions in brackets) indicate the number of proteins that shared similarity with a *Biomphalaria* shell forming candidate gene. The width of each sector line around the ideogram is proportional to the length of that gene in basepairs. Photographs taken by DJ Jackson, with exception of photograph of *C. gigas*, by David Monniaux, distributed under a CC-A SA 3.0 license.

This hypothesis is supported by similarities in core genes for specification and differentiation of cardiac structures between insects (in particular *Drosophila*) and vertebrates^{36,37}. To further develop this notion, we searched for molluscan cardiac-specification and -differentiation genes in the genome of *B. glabrata*. A previously characterized short cDNA sequence from snail heart RNA led to identification of BGLB012592 as the *Biomphalaria* ortholog of *tin/Nkx2.5* (ref. 38). Similarity searches with *Drosophila* orthologues identified most of the core cardiac regulatory factors and structural genes in the *B. glabrata* genome (Supplementary Note 29; Supplementary Data 38), with enriched expression of these genes in cardiac tissues (Fig. 3). Pending confirmation of functional involvement of these core cardiac genes in heart formation, these results from a lophotrochozoan, in conjunction with ecdysozoans and deuterostomes, merit continued consideration of the presence of a primitive heart-like structure and in the urbilaterian ancestor.

We also investigated in molluscs, relative to insects and mammals, the evolution of the gene family of actins, conserved proteins that function in cell motility (cytoplasmic actins) and muscle contraction (sarcomeric actins)³⁹. Previous study showed that cephalopod actin genes⁴⁰, are more closely related to one another than to any single mammalian gene, an observation also made another mollusc *Haliothis*⁴¹ and for insect actins⁴². Thus, it has been proposed that actin diversification in arthropods, molluscs and vertebrates each occurred independently. However, it has not been determined whether different molluscan lineages independently underwent actin gene divergence, and few studies

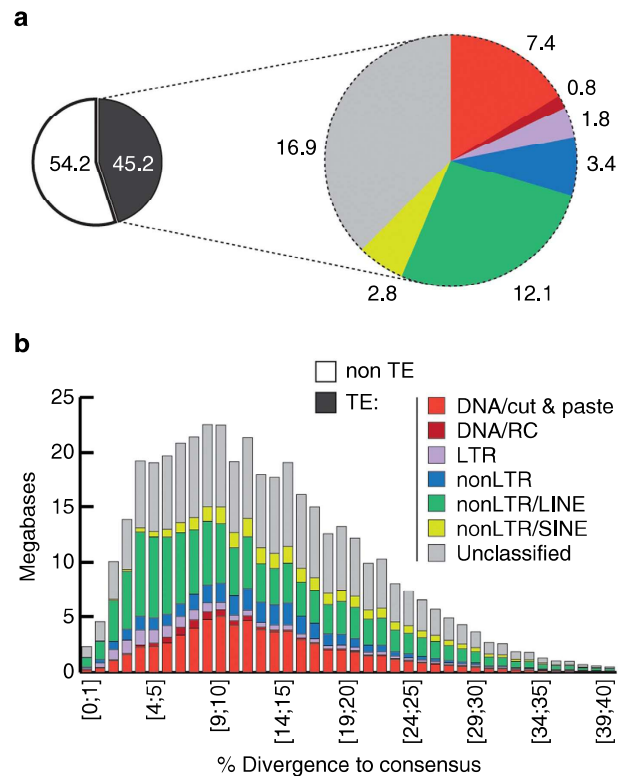


Figure 5 | Transposable element (TE) landscape of *B. glabrata*.

(a) Left: proportion (%) of the genome assembly annotated as TE (black). Right: TE composition by class (indicating % of the genome corresponding to each class). (b) Evolutionary view of TE landscape. For each class, cumulative amounts of DNA (in Mb) are shown as function of the percentage of divergence from the consensus (by bins of 1%, first one being ≥ 0 and < 1 ; see Supplementary Note 32 for Methods). Percentage of divergence from consensus is used as a proxy for age: the older the invasion of the TE is, the more copies will have accumulated mutations (higher percentage of divergence, right of the graph; left of the graph: youngest elements showing little divergence from consensus). Note that the result of this analysis of assembled sequence does not exclude the likelihood that intact transposable elements are present in *B. glabrata*. Colors are as in a. RC, rolling circle.

have analysed expression of mollusc actin genes in different tissues^{41,43}. We identified ten actin genes in *B. glabrata* that are clustered across seven scaffolds to suggest that some of these genes arose through tandem duplication. Expression across all tissues indicates that four genes encode cytoplasmic actins (Fig. 3). Protein sequence comparisons placed all *B. glabrata* actins as most closely related to mammalian cytoplasmic rather than sarcomeric actins (Supplementary Note 30; Supplementary Data 39), a pattern also observed for all six actin genes of *D. melanogaster*⁴⁴. The actin genes of *B. glabrata* and other molluscs were most similar to paralogs within their own genomes, rather than to other animal orthologs (Fig. 3). One interpretation is that actin genes diverged independently multiple times in molluscs, similar to an earlier hypothesis for independent actin diversification in arthropods and chordates⁴². Alternatively, a stronger appearance of monophyly than really exists may result if selective pressures due to functional constraints keep actin sequences similar within a genome, for example if the encoded proteins have overlapping functions.

To gain insight into the diversification of mechanisms involved in biomineralization in molluscs, we analyzed the transcriptomic data for *B. glabrata* genes involved in biomineralization. Of 1,211

transcripts that were more than twofold upregulated in the mantle relative to other tissues, 34 shared similarity with molluscan sequences known to be involved in shell formation and biomineralization. Another 177 candidate sequences putatively involved in shell formation including 18 genes (10.2%) with similarity to sequences of shell forming secretomes of other marine and terrestrial molluscs were identified from the entire mantle transcriptome (Fig. 4). Highly conserved components of the molluscan shell forming toolkit include carbonic anhydrases and tyrosinases³³ (Supplementary Fig. 75; Supplementary Note 31; Supplementary Data 40). In summary, this genome-level analysis of a subset of molluscan molecular pathways provides new insight into the evolutionary origins of bilaterian organs, gene families and genetic pathways.

Repetitive landscape. Repeat content analysis showed that 44.8% of the *B. glabrata* assembly consists of transposable elements (TEs; Fig. 5; Supplementary Figs 76–78; Supplementary Note 32; Supplementary Data 41), comparable to *Octopus bimaculoides* (43%)³⁴ and higher than observed in other molluscs: Owl limpet, *L. gigantea* (21%)³¹; Pacific oyster, *C. gigas* (36%)³²; Sea hare, *A. californica* (30%)⁴⁵. The fraction of unclassified elements in *B. glabrata* was high (17.6%). Most abundant classified repeats were LINES, including Nimbus⁴⁶ (27% of TEs, 12.1% of the genome), and DNA TEs (17.7% of TEs, 8% of the genome). Long terminal repeats (LTRs) represented 6% of TEs (1.7% of the genome), and non-mobile simple repeats comprised 2.6% of the genome (with abundant short dinucleotide satellite motifs). Divergence analyses of element copy and consensus sequences indicated that DNA TEs were not recent invaders of the *B. glabrata* genome; no intact transposases were detected in the assembly. A hAT DNA transposon of *B. glabrata* (~1,000 copies) has significant identity with *SPACE INVADERS (SPIN)* which horizontally infiltrated a range of animal species, possibly through host-parasite interactions⁴⁷. Overall, our results reinforce a model in which diverse repeats comprise a large fraction of molluscan genomes.

Discussion

The genome of the Neotropical freshwater snail *B. glabrata* expands insights into animal biology by further defining the Lophotrochozoan lineage relative to Ecdysozoa and Deuterostomia. An important rationale for genome analysis of *B. glabrata* pertains to its role in transmission of *S. mansoni* in the New World. Most of the world's cases of *S. mansoni* infection, however, occur in sub-Saharan Africa where other *Biomphalaria* species are responsible for transmission, most notably *Biomphalaria pfeifferi*. Likely due to a shared common ancestor, *B. glabrata* provides a good representation of the genomes of African *Biomphalaria* species^{48,49}. At least 90% sequence identity was shared among 196 assembled transcripts collected from *B. pfeifferi* (Illumina RNAseq) and the transcriptome of *B. glabrata* (Supplementary Note 33; Supplementary Data 42–43). Accordingly, our analyses of the *B. glabrata* genome likely reveal biological features that define snail species of the genus *Biomphalaria* as effective hosts for transmission of human schistosomiasis. This work provides several inroads for control of *Biomphalaria* snails to reduce risks of schistosome (re)infection of endemic human populations, an important component of the WHO strategy aimed at elimination of the global health risks posed by schistosomiasis⁶. The following are among options that can be considered⁵⁰. The genetic information uncovered may be applied to characterize and track the field distribution of snail populations that differ in effectiveness of parasite transmission. Targeting aspects of pheromone-based

communication among *Biomphalaria* conspecifics may alter the mating dynamics of these snails and perhaps also to interfere with the intermediate host finding of larval schistosomes. Molluscicide design may be tailored to impact unique gene products and mechanisms for gene regulation, reproduction and metabolism toward selective control of *Biomphalaria* snails. Finally, genetic modification of determinants of intermediate host competence may alter schistosome transmission by *Biomphalaria*. In summary, this report provides novel details on the biological properties of *B. glabrata*, including several that may help determine suitability of *B. glabrata* as intermediate host for *S. mansoni*, and points to potential approaches for more effective control efforts against *Biomphalaria* to limit the transmission of schistosomiasis.

Methods

The genetic material used for sequencing the genome of the hermaphroditic freshwater snail *Biomphalaria glabrata* was derived from three snails of the BB02 strain (shell diameter 8, 10 and 12 mm, respectively), established at the University of New Mexico, USA from a field isolate collected from Minas Gerais, Brazil, 2002 (ref. 8). Using a genome size estimate of 0.9–1 Gb (ref. 7), we sequenced fragments (450 bp read length; 14.08 × coverage) and paired ends from 3 kb long inserts (8.12 ×) and 8 kb long inserts (2.82 ×) with reads generated on Roche 454 instrumentation, plus 0.06 × from bacterial artificial chromosome (BAC) ends⁸ on the ABI3730xl. Reads were assembled using Newbler (v2.6)⁵¹. Paired end reads from a 300 bp insert library (53.42 × coverage) were collected using Illumina instrumentation and assembled *de novo* using SOAP (v1.0.5)⁵². The Newbler assembly was merged with the SOAP assembly using GAA⁵³ (see Supplementary Data 1 for accession numbers of sequence data sets). Redundant contigs in the merged assembly were collapsed and gaps between contigs were closed through iterative rounds of Illumina mate-pair read alignment and extension using custom scripts. We removed from the assembly all contaminating sequences, trimmed vectors (X), and ambiguous bases (N). Short contigs (≤200 bp) were removed prior to public release. In the creation of the linkage group AGP files, we identified all scaffolds (145 Mb total) that were uniquely placed in a single linkage group (Supplementary Note 2; Supplementary Data 2). Note that because of low marker density, scaffolds could not be ordered or oriented within linkage groups. The final draft assembly (NCBI: ASM45736v1) is comprised of 331,400 scaffolds with an N50 scaffold length of 48 kb and an N50 contig length of 7.3 kb. The assembly spans over 916 Mb (with a coverage of 98%, 899 Mb of sequence with ~17 Mb of estimated gaps). The draft genome sequence of *Biomphalaria glabrata* was aligned with assemblies of *Lottia* and *Aplysia* (<http://biology.unm.edu/biomphalaria-genome/syteny.html>) and deposited in the DDBJ/EMBL/GenBank database (Accession Number APKA00000000.1). It includes the genomes of an unclassified mollusc (Supplementary Note 7; accession numbers CP013128). The genome assembly was also deposited in Vectorbase⁵⁴ (<https://www.vectorbase.org/organisms/biomphalaria-glabrata>). Computational annotation using Maker2 (ref. 9) yielded 14,423 predicted gene models, including 96.5% of the 458 sequences from the CEGMA core set of eukaryotic genes⁵⁵. Total RNA was extracted from 12 different tissues/organs dissected from several individual adult BB02 *B. glabrata* snails (shell diameter 10–12 mm; between 2 and 10 snails per sample to obtain sufficient amounts of RNA). RNA was reverse transcribed using random priming, no size selection was done. Illumina RNAseq (paired ends) was used to generate tissue-specific transcriptomes for albumen gland (AG); buccal mass (BUC); central nervous system (CNS); digestive gland/hepatopancreas (DG/HP); muscular part of the headfoot (FOOT); heart including amebocyte producing organ (HAPO); kidney (KID); mantle edge (MAN); ovotestis (OVO); salivary gland (SAL); stomach (STO); terminal genitalia (TRG), see Supplementary Data 1 for accession numbers of sequence data sets. RNAseq data were mapped to the genome assembly (Supplementary Note 3). No formal effort was made to use the RNA-data to systematically enhance the structural annotation. VectorBase did, however, make this RNAseq data available in WebApollo⁵⁶ such that the community could use these data to correct exon-intron junctions, UTRs, etc. through community annotation. All of these community-based updates have been incorporated and are available via the current VectorBase gene set. Repeat features were analyzed and masked (Supplementary Note 32; see Vectorbase *Biomphalaria-glabrata*-BB02_REPEATS.lib, *Biomphalaria-glabrata*-BB02_REPEATFEATURES_Bglab1.gff3.gz). Further methods and results are described in the Supplementary Information.

Data availability. The sequence data that support the findings of this study have been deposited in GenBank with the accession codes SRX005826, -27, -28; SRX008161, -2; SRX648260, -61, -62, -63, -64, -65, -66, -67, -68, -69, -70, -71; SRA480937; SRA480939; SRA480940; SRA480945; TI accessions2091872204-2092480271; 2104228958-2104243968; 2110153721-2118515136; 2181062043-2181066224; 2193113537-2193116528; 2204642410-2204763511; 2204820860-2204852286; 2213009530-2213057324; 2260448774-2260450167. Also see Supplementary Data 1. The assembly and related data are available from

VectorBase, <https://www.vectorbase.org/organisms/biomphalaria-glabrata>. The *Biomphalaria glabrata* genome project has been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under the accession number APKA00000000.1

References

- Paraense, W. L. The schistosome vectors in the Americas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **96**(Suppl): 7–16 (2001).
- King, C. H. Parasites and poverty: The case of schistosomiasis. *Acta Trop.* **113**, 95–104 (2010).
- Doenhoff, M. J. *et al.* Praziquantel: Its use in control of schistosomiasis in sub-Saharan Africa and current research needs. *Parasitology* **136**, 1825–1835 (2009).
- Melman, S. D. *et al.* Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **3**, e504–e504 (2009).
- Rollinson, D. *et al.* Time to set the agenda for schistosomiasis elimination. *Acta Trop.* **128**, 423–440 (2013).
- World Health Organization. *Accelerating Work to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases: a Roadmap for Implementation*. Available at http://www.who.int/entity/neglected_diseases/NTD_RoadMap_2012_Fullversion.pdf (WHO, 2012).
- Gregory, T. R. Genome size estimates for two important freshwater molluscs, the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and the schistosomiasis vector snail (*Biomphalaria glabrata*). *Genome* **46**, 841–844 (2003).
- Adema, C. M. *et al.* A bacterial artificial chromosome library for *Biomphalaria glabrata*, intermediate snail host of *Schistosoma mansoni*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **101**, 167–177 (2006).
- Holt, C. & Yandell, M. MAKER2: An annotation pipeline and genome-database management tool for second-generation genome projects. *BMC Bioinformatics* **12**, 491 (2011).
- Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Furumichi, M. & Tanabe, M. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Res.* **40**, D109–D114 (2012).
- Cummins, S. F. & Degnan, B. Sensory sea slugs: Towards decoding the molecular toolkit required for a mollusc to smell. *Commun. Integr. Biol.* **3**, 423–426 (2010).
- Cummins, S. F. *et al.* *Aplysia* temptin - the 'glue' in the water-borne attractin pheromone complex. *FEBS J.* **274**, 5425–5437 (2007).
- Hertel, L. A., Bayne, C. J. & Loker, E. S. The symbiont *Capsaspora owczarzaki*, nov. gen. nov. sp., isolated from three strains of the pulmonate snail *Biomphalaria glabrata* is related to members of the Mesomycetozoa. *Int. J. Parasitol.* **32**, 1183–1191 (2002).
- Odoemelam, E., Raghavan, N., Miller, A., Bridger, J. M. & Knight, M. Revised karyotyping and gene mapping of the *Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) cell line. *Int. J. Parasitol.* **39**, 675–681 (2009).
- Feyereisen, R. Arthropod CYPomes illustrate the tempo and mode in P450 evolution. *Biochim. Biophys. Acta* **1814**, 19–28 (2011).
- Janeway, C. A. & Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Ann. Rev. Immunol.* **20**, 197–216 (2002).
- Buckley, K. M. & Rast, J. P. Diversity of animal immune receptors and the origins of recognition complexity in the deuterostomes. *Dev. Comp. Immunol.* **49**, 179–189 (2015).
- Zhang, S.-M., Adema, C. M., Kepler, T. B. & Loker, E. S. Diversification of Ig superfamily genes in an invertebrate. *Science* **305**, 251–254 (2004).
- Dheilly, N. M. *et al.* A family of variable immunoglobulin and lectin domain containing molecules in the snail *Biomphalaria glabrata*. *Dev. Comp. Immunol.* **48**, 234–243 (2015).
- Falschlehner, C. & Boutros, M. Innate immunity: Regulation of caspases by IAP-dependent ubiquitylation. *EMBO J.* **31**, 2750–2752 (2012).
- Vandenabeele, P. & Bertrand, M. J. M. The role of the IAP E3 ubiquitin ligases in regulating pattern-recognition receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 833–844 (2012).
- Mitta, G., Vandenbulcke, F. & Roch, P. Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS Lett.* **486**, 185–190 (2000).
- Zahoor, Z., Davies, A. J., Kirk, R. S., Rollinson, D. & Walker, A. J. Nitric oxide production by *Biomphalaria glabrata* haemocytes: effects of *Schistosoma mansoni* ESPs and regulation through the extracellular signal-regulated kinase pathway. *Parasit. Vectors* **2**, 18–18 (2009).
- Fneich, S. *et al.* 5-methyl-cytosine and 5-hydroxy-methyl-cytosine in the genome of *Biomphalaria glabrata*, a snail intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Parasit. Vectors* **6**, 167–167 (2013).
- Geyer, K. K. *et al.* Cytosine methylation regulates oviposition in the pathogenic blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nat. Commun.* **2**, 424–424 (2011).
- Knight, M. *et al.* Polyethyleneimine (PEI) mediated siRNA gene silencing in the *Schistosoma mansoni* snail host, *Biomphalaria glabrata*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **5**, e1212 (2011).
- Geyer, K. K. *et al.* The *Biomphalaria glabrata* DNA methylation machinery displays spatial tissue expression, is differentially active in distinct snail populations and is modulated by interactions with *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* doi:10.1371/journal.pntd.0005246.
- Rotenberg, L. *et al.* Oviposition rhythms in *Biomphalaria* spp. (Mollusca: Gastropoda). 1. Studies in *B. glabrata*, *B. straminea* and *B. tenagophila* under outdoor conditions. *Prog. Clin. Biol. Res.* **341B**, 763–771 (1990).
- Koene, J. M. *et al.* Male accessory gland protein reduces egg laying in a simultaneous hermaphrodite. *PLoS ONE* **5**, e10117–e10117 (2010).
- Nakadera, Y. *et al.* Receipt of seminal fluid proteins causes reduction of male investment in a simultaneous hermaphrodite. *Curr. Biol.* **24**, 859–862 (2014).
- Berriman, M. *et al.* The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature* **460**, 352–358 (2009).
- Simakov, O. *et al.* Insights into bilaterian evolution from three spiralian genomes. *Nature* **493**, 526–531 (2013).
- Zhang, G. *et al.* The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* **490**, 49–54 (2012).
- Tsai, I. J. *et al.* The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature* **496**, 57–63 (2013).
- Albertin, C. B. *et al.* The octopus genome and the evolution of cephalopod neural and morphological novelties. *Nature* **524**, 220–224 (2015).
- Cripps, R. M. & Olson, E. N. Control of cardiac development by an evolutionarily conserved transcriptional network. *Dev. Biol.* **246**, 14–28 (2002).
- Medioni, C. *et al.* The fabulous destiny of the *Drosophila* heart. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **19**, 518–525 (2009).
- Holland, N. D., Venkatesh, T. V., Holland, L. Z., Jacobs, D. K. & Bodmer, R. *AmphiNk2-tin*, an amphioxus homeobox gene expressed in myocardial progenitors: Insights into evolution of the vertebrate heart. *Dev. Biol.* **255**, 128–137 (2003).
- Fyrberg, E. A., Mahaffey, J. W., Bond, B. J. & Davidson, N. Transcripts of the six *Drosophila* actin genes accumulate in a stage- and tissue-specific manner. *Cell* **33**, 115–123 (1983).
- Carlini, D. B., Reece, K. S. & Graves, J. E. Actin gene family evolution and the phylogeny of coleoid cephalopods (Mollusca: Cephalopoda). *Mol. Biol. Evol.* **17**, 1353–1370 (2000).
- Sin, F. Y. T., Bryant, M. J. & Johnstone, A. Molecular evolution and phylogeny of actin genes in *Halictis* species (Mollusca: Gastropoda). *Zool. Study* **46**, 734–745 (2007).
- Mounier, N., Gouy, M., Mouchiroud, D. & Prudhomme, J. C. Insect muscle actins differ distinctly from invertebrate and vertebrate cytoplasmic actins. *J. Mol. Evol.* **34**, 406–415 (1992).
- DesGroseillers, L., Auclair, D., Wickham, L. & Maalouf, M. A novel actin cDNA is expressed in the neurons of *Aplysia californica*. *Biochim. Biophys. Acta* **1217**, 322–324 (1994).
- Fyrberg, E. A., Bond, B. J., Hershey, N. D., Mixer, K. S. & Davidson, N. The actin genes of *Drosophila*: Protein coding regions are highly conserved but intron positions are not. *Cell* **24**, 107–116 (1981).
- Panchin, Y. & Moroz, L. L. Molluscan mobile elements similar to the vertebrate Recombination-Activating Genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **369**, 818–823 (2008).
- Raghavan, N. *et al.* *Nimbus (Bgl)*: An active non-LTR retrotransposon of the *Schistosoma mansoni* snail host *Biomphalaria glabrata*. *Int. J. Parasitol.* **37**, 1307–1318 (2007).
- Pace, J. K., Gilbert, C., Clark, M. S. & Feschotte, C. Repeated horizontal transfer of a DNA transposon in mammals and other tetrapods. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **105**, 17023–17028 (2008).
- DeJong, R. J. *et al.* Evolutionary relationships and biogeography of *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) with implications regarding its role as host of the human bloodfluke, *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biol. Evol.* **18**, 2225–2239 (2001).
- Campbell, G. *et al.* Molecular evidence supports an African affinity of the Neotropical freshwater gastropod, *Biomphalaria glabrata*, Say 1818, an intermediate host for *Schistosoma mansoni*. *Proc. Biol. Sci.* **267**, 2351–2358 (2000).
- Adema, C. M. *et al.* Will all scientists working on snails and the diseases they transmit please stand up? *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, e1835 (2012).
- Margulies, M. *et al.* Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* **437**, 376–380 (2005).
- Li, R. *et al.* De novo assembly of human genomes with massively parallel short read sequencing. *Genome Res.* **20**, 265–272 (2010).
- Yao, G. *et al.* Graph accordance of next-generation sequence assemblies. *Bioinformatics* **28**, 13–16 (2012).
- Giraldo-Calderón, G. I. *et al.* VectorBase: an updated bioinformatics resource for invertebrate vectors and other organisms related with human diseases. *Nucleic Acids Res.* **43**, D707–D713 (2015).
- Parra, G., Bradnam, K. & Korf, I. CEGMA: A pipeline to accurately annotate core genes in eukaryotic genomes. *Bioinformatics* **23**, 1061–1067 (2007).
- Lee, E. *et al.* Web Apollo: A web-based genomic annotation editing platform. *Genome Biol.* **14**, R93–R93 (2013).
- Offord, V. & Werling, D. LRRfinder2.0: A webserver for the prediction of leucine-rich repeats. *Innate Immun.* **19**, 398–402 (2013).

Acknowledgements

We thank S. Newfield for discussion of actin evolution; N. El Sayed and H. Tettelin for discussion of HSP annotation and expression. We acknowledge access to the Metafer microscopy system at the I. Robinson Research Complex, Harwell, Rutherford Appleton Laboratory, Oxon, UK (BBSRC Professorial Fellowship, grant number BB/H022597/1). Sequence characterization of the *Biomphalaria glabrata* genome was funded by NIH-NHGRI grant HG003079 to R.K.W., McDonnell Genome Institute, Washington University School of Medicine. *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni* were provided to some participating labs by the NIAID Schistosomiasis Resource Center (Biomedical Research Institute, Rockville, MD) through NIH-NIAID Contract HHSN272201000005I for distribution through BEI Resources. C.M.A. and E.S.L. acknowledge NIH grant P30GM110907 from the National Institute of General Medical Sciences (NIGMS). Publication costs were contributed equally by McDonnell Genome Institute, Washington University School of Medicine and the COBRE Center for Evolutionary and Theoretical Immunology (CETI) which is supported by NIH grant P30GM110907 from the National Institute of General Medical Sciences (NIGMS). E.S.L. acknowledges NIH/NIAID ROI AI101438. J.M.B., H.D.A.-G and M.K. acknowledge NIH-NIAID R01-AI0634808. M.Y. acknowledges UK BBSRC (BB/H022597/1). G.O. acknowledges support from FAPEMIG (RED-00014-14, PPM-00189-13) and CNPq (304138/2014-2, 309312/2012-4). R.L.C. acknowledges CNPq (503275/2011-5). T.P.Y. acknowledges NIH/NIAID ROI AI015503. K.F.H. and M.T.S. acknowledge BBSRC (BB/K005448/1). B.G. acknowledges ANR JCJC INVIMORY (ANR-13-JSV7-0009). S.E. acknowledges NIAID contract HHSN272201400029C. J.M.K. acknowledges the Research Council for Earth and Life Sciences (A.L.W.; 819.01.007) and the Netherlands Organization for Scientific Research (NWO). R.M.C. acknowledges NIH GM061738 and support from the American Heart Association, Southwest Affiliate (14GRNT20490250). D.T. acknowledges NIH R25 GM075149. C.F. acknowledges NIH R01-GM077582. D.J.J. acknowledges D.F.G. JA2108/1-2. M.de S.G. acknowledges CNPq 479890/2013-7. K.M.B. and J.P.R. acknowledge NSERC 312221 and CIHR MOP74667. C.S.J., L.R.N., S.J., E.J.R., S.K. and A.E.L. acknowledge NC3R GO900802/1. K.K.B. and K.B.S. acknowledge NSERC 315051 and 6793, respectively. M.B. and C.J.B. acknowledge NIH ROI-AI109134. C.J.B. acknowledges NIH AI016137 and AI111201. B.R. acknowledges NHGRI 4U41HG002371. P.C.H., M.A.G. and E.A.P. acknowledge NSERC 418540. O.L.B. and Ch.C. acknowledge ANR-12-EMMA-0007-01. S.F.C. acknowledges Australian Research Council FT110100990.

Author contributions

C.M.A., E.S.L., M.K., N.R. conceived the study, scientific objectives. C.M.A. led the project and manuscript preparation with input from steering committee members M.K., C.S.J., G.O., P.M., L.W.H., A.S., E.S.L., assisted by S.E. O.C. provided field collected snails. C.M.A. and E.S.L. cultured snails and provided materials. P.M., L.W.H., S.C., L.F., W.C.W., R.K.W., V.M., C.T. developed the sequencing strategy, managed the project, conducted assembly and evaluation. B.R. performed genome alignments. M.C., D.H., S.E., G.G.-C. and D.L. performed the genebuild, managed metadata, performed genome annotation and data analysis, and facilitated Community Annotation with M.C.M.-T. H.D. A.-G., M.Y., E.V.V., M.K. and J.M.B. performed karyotyping and FISH analysis. J.A.T. and M.B. performed linkage mapping. G.O., J.G.A., Y.C.-A., S.G.G., F.L. F.S.O., F.S.P., I.C.R., and L.L.S.S. performed computational analyses of genomic, proteomic, and transcriptomic data, SNP content, secretome, metabolic pathways and annotation of eukaryote protein kinases (ePKs). S.F.C., L.Y., D.L., M.Z. and D.McM. conducted pheroreception studies. M.T.S., K.K.G., U.N. and K.F.H. conducted bacterial symbiont

analysis. S.L., S.-M.Z., E.S.L. and B.C.B. performed virus analyses. M.K., P.F., W.I. and N.R. performed annotation of HSP. T.P.Y., X.-J.W., U.B.-W. and N.D. conducted proteogenomic studies of *B. glabrata* embryonic (Bge) cells and parasite-reactive snail host proteins and data analysis. R.F., A.E.L. and C.S.J. performed annotation of CYP. J.H. performed annotation of NfκB. K.M.B. and J.P.R. performed annotation of conserved immune factors. C.M.A. and J.J.P. performed annotation of FREPs. M.C. and C.M. performed annotation of complement. D.D. performed annotation of apoptosis. B.G. and C.J.B. performed annotation of REDOX balance. O.L.B., D.D., R.G., Ch.C. and G.M. performed annotation of antibacterial defenses. L.d.S. and A.T.P. performed search for antibacterial defense genes. P.C.H., M.A.G. and E.A.P. performed annotation of unknown novel sequences. K.K.G., I.W.C., U.N., K.F.H., M.T.S., Ce.C., T.Q. and C.G. performed annotation and analysis of epigenetic sequences. E.H.B., L.R. doA., M.de.S.G., R.L.C. and W.de.J.J. performed annotation of miRNA (Brazil), K.K.B., R.P. and K.B.S. performed annotation of miRNA (Canada). M.G. performed annotation of periodicity. S.F.C., B.R., T.W., A.E.L. and S.K. conducted neuropeptide studies and data analysis. A.E.L., R.F., S.K., E.J.R., S.J., D.R., C.S.J. and L.R.N. performed annotation of steroidogenesis. J.M.K., B.R. and S.F.C. performed annotation of ovipostatin. A.B.K. and L.L.M. performed tissue location of transcripts analysis. A.J.W. and S.P.L. performed annotation of phosphatases. T.L.L., K.M.R., M.Mi., and R.C. performed annotation of actins and annotation of cardiac transcriptional program with D.L.T. D.J.J., B.K. and M.Me. performed annotation of biomineralization genes. J.C., A.K. and C.F. performed annotation of DNA transposons, global analysis of transposable element landscape, and horizontal transfer events. A.S. and C.B. performed repeat/TE analysis. E.S.L., S.M.Z., G.M.M. and S.K.B. conducted comparative *B. Pfeifferi* transcriptome studies and data analysis. C.M.A., did most of the writing with P.M., M.L.M. and contributions from all authors.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

Competing interests: The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

How to cite this article: Adema, C. M. *et al.* Whole genome analysis of a schistosomiasis-transmitting freshwater snail. *Nat. Commun.* **8**, 15451 doi: 10.1038/ncomms15451 (2017).

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2017

Coen M. Adema¹, LaDeana W. Hillier², Catherine S. Jones³, Eric S. Loker¹, Matty Knight^{4,5}, Patrick Minx², Guilherme Oliveira^{6,7}, Nithya Raghavan⁸, Andrew Shedlock⁹, Laurence Rodrigues do Amaral¹⁰, Halime D. Arican-Goktas¹¹, Juliana G. Assis⁶, Elio Hideo Baba⁶, Olga L. Baron¹², Christopher J. Bayne¹³, Utibe Bickham-Wright¹⁴, Kyle K. Biggar¹⁵, Michael Blouin¹³, Bryony C. Bonning¹⁶, Chris Botka¹⁷, Joanna M. Bridger¹¹, Katherine M. Buckley¹⁸, Sarah K. Buddenborg¹, Roberta Lima Caldeira¹⁹, Julia Carleton²⁰, Omar S. Carvalho¹⁹, Maria G. Castillo²¹, Iain W. Chalmers²², Mikkel Christensens²³, Sandra Clifton², Celine Cosseau²⁴, Christine Coustau¹², Richard M. Cripps²⁵, Yesid Cuesta-Astroz⁶, Scott F. Cummins²⁶, Leon di Stephano^{27,28}, Nathalie Dinguirard¹⁴, David Duval²⁴, Scott Emrich²⁹, Cédric Feschotte²⁰, Rene Feyereisen³⁰, Peter FitzGerald³¹, Catrina Fronick², Lucinda Fulton², Richard Galinier²⁴, Sandra G. Gava⁶, Michael Geusz³², Kathrin K. Geyer²², Gloria I. Giraldo-Calderón²⁹, Matheus de Souza Gomes¹⁰, Michelle A. Gordy³³, Benjamin Gourbal²⁴, Christoph Grunau²⁴, Patrick C. Hanington³³, Karl F. Hoffmann²², Daniel Hughes²³, Judith Humphries³⁴, Daniel J. Jackson³⁵, Liana K. Jannotti-Passos⁶, Wander de Jesus Jeremias⁶, Susan Jobling³⁶, Bishoy Kamel³⁷, Aurélie Kapusta²⁰, Satwant Kaur³⁶,

Joris M. Koene³⁸, Andrea B. Kohn³⁹, Dan Lawson²³, Scott P. Lawton⁴⁰, Di Liang²⁶, Yanin Limpanont²⁶, Sijun Liu¹⁶, Anne E. Lockyer³⁶, TyAnna L. Lovato²⁵, Fernanda Ludolf⁶, Vince Magrini², Donald P. McManus⁴¹, Monica Medina³⁷, Milind Misra¹, Guillaume Mitta²⁴, Gerald M. Mkoji⁴², Michael J. Montague⁴³, Cesar Montelongo²¹, Leonid L. Moroz³⁹, Monica C. Munoz-Torres⁴⁴, Umar Niazi²², Leslie R. Noble³, Francislson S. Oliveira⁶, Fabiano S. Pais⁶, Anthony T. Papenfuss^{27,28}, Rob Peace⁴⁵, Janeth J. Pena¹, Emmanuel A. Pila³³, Titouan Quelais²⁴, Brian J. Raney⁴⁶, Jonathan P. Rast¹⁸, David Rollinson⁴⁷, Izinara C. Rosse⁶, Bronwyn Rotgans²⁶, Edwin J. Routledge³⁶, Kathryn M. Ryan²⁵, Larissa L.S. Scholte⁶, Kenneth B. Storey¹⁵, Martin Swain²², Jacob A. Tennesen¹³, Chad Tomlinson², Damian L. Trujillo²⁵, Emanuela V. Volpi⁴⁸, Anthony J. Walker⁴⁰, Tianfang Wang²⁶, Ittiprasert Wannaporn⁴, Wesley C. Warren², Xiao-Jun Wu¹⁴, Timothy P. Yoshino¹⁴, Mohammed Yusuf^{49,50}, Si-Ming Zhang¹, Min Zhao²⁶ & Richard K. Wilson²

¹Center for Theoretical and Evolutionary Immunology, Biology, University of New Mexico, Albuquerque, New Mexico 87131, USA. ²The McDonnell Genome Institute, Washington University, Saint Louis, Missouri 63108, USA. ³Institute of Biological and Environmental Sciences, School of Biological Sciences, University of Aberdeen, Tillydrone Avenue, Aberdeen AB24 2TZ, UK. ⁴Department of Microbiology, Immunology & Tropical Medicine and Research Center for Neglected Diseases of Poverty, School of Medicine & Health Sciences, The George Washington University, Washington, District Of Columbia 20037, USA. ⁵Division of Science & Mathematics, University of the District of Columbia, 4200 Connecticut Avenue NW Washington, Washington, District Of Columbia 20008, USA. ⁶René Rachou Research Center, FIOCRUZ-Minas, Belo Horizonte, Minas Gerais 30190-002, Brazil. ⁷Instituto Tecnológico Vale, Belém 66055-090, Brazil. ⁸10805 Tenbrook Dr Silver Spring, Maryland 20901, USA. ⁹College of Charleston, Biology Department, Medical University of South Carolina College of Graduate Studies Hollings Marine Laboratory Charleston, Charleston, South Carolina 29412, USA. ¹⁰Laboratory of Bioinformatics and Molecular Analysis, Institute of Genetics and Biochemistry Federal University of Uberlândia - Campus Patos de Minas (UFU), CEP 38700-128 Patos de Minas, Brasil. ¹¹Department of Life Sciences, College of Health and Life Sciences, Brunel University, London, Uxbridge UB8 3PH, UK. ¹²Institut Sophia Agrobiotech, INRA/CNRS/UNS, Sophia Antipolis 06 903, France. ¹³Department of Integrative Biology, Oregon State University, 3029 Cordley Hall, Corvallis, Oregon 97331, USA. ¹⁴Department of Pathobiological Sciences, University of Wisconsin - School of Veterinary Medicine, 2015 Linden Dr., Madison, Wisconsin 53706, USA. ¹⁵Institute of Biochemistry and Department of Biology, Carleton University, Ottawa, Ontario, Canada K1S 5B6. ¹⁶Iowa State University, Ames, Iowa 50011, USA. ¹⁷Department of Information Technology, Harvard Medical School, 107 Avenue Louis Pasteur, Boston, Massachusetts 02115, USA. ¹⁸Sunnybrook Health Sciences Centre, Department of Immunology, University of Toronto, 2075 Bayview Avenue, Rm. S126, Toronto, Ontario, Canada M4N 3M5. ¹⁹Laboratorio de Helminologia e Malacologia Médica, FIOCRUZ-Minas, René Rachou Research Center, Belo Horizonte 30190-002, Brazil. ²⁰Department of Human Genetics, University of Utah, 15 North 2030 East, Salt Lake City, Utah 84112, USA. ²¹Department of Biology, New Mexico State University, Las Cruces, New Mexico 88003, USA. ²²Animal and Microbial Sciences Research Theme, IBERS, Aberystwyth University, Aberystwyth SY23 3FG, UK. ²³EMBL-EBI, Wellcome Genome Campus, Hinxton, Cambridgeshire CB10 1SD, UK. ²⁴Univ. Perpignan Via Domitia, IHPE UMR 5244, CNRS, IFREMER, Univ. Montpellier, F-66860 Perpignan, France. ²⁵Department of Biology, University of New Mexico, Albuquerque, New Mexico 87131, USA. ²⁶Faculty of Science, Health and Education, University of the Sunshine Coast, Maroochydore, Queensland 4558, Australia. ²⁷The Walter and Eliza Hall Institute for Medical Research 1G Royal Parade, Parkville, Victoria 3052, Australia. ²⁸Bioinformatics and Cancer Genomics lab Lorenzo and Pamela Galli, Melanoma Research Fellow Peter MacCallum Cancer Centre St Andrews Place, East Melbourne, Victoria 3002, Australia. ²⁹Genomics and Bioinformatics Core Facility, 19 Galvin Life Sciences, University of Notre Dame, Notre Dame, Indiana 46556, USA. ³⁰University of Copenhagen, Faculty of Science, Department of Plant and Environmental Sciences, Thorvaldsensvej 40, 1871 Frederiksberg C, Denmark. ³¹Genome Analysis Unit, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892, USA. ³²Biological Sciences, Bowling Green State University, Bowling Green, Ohio 43403, USA. ³³Department of Public Health Sciences, University of Alberta, 3-57F South Academic Building, Edmonton, Alberta, Canada T6G 1C9. ³⁴Department of Biology, Lawrence University, Appleton, Wisconsin 54911, USA. ³⁵Courant Research Centre Geobiology, Georg-August University of Göttingen, Goldschmidtstraße 3, 37077 Göttingen, Germany. ³⁶Institute of Environment, Health & Societies, Environment and Health Theme, Brunel University London, Uxbridge UB8 3PH, UK. ³⁷Department of Biology, Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania 16802, USA. ³⁸Faculteit der Aard- en Levenswetenschappen, Vrije Universiteit, De Boelelaan 1085-1087, 1081 HV Amsterdam, The Netherlands. ³⁹The Whitney Laboratory for Marine Bioscience, University of Florida, 9505 Ocean Shore Blvd, St Augustine, Florida 32080, USA. ⁴⁰Molecular Parasitology Laboratory, School of Life Sciences Pharmacy and Chemistry, Kingston University, Kingston upon Thames, Surrey KT1 2EE, UK. ⁴¹Molecular Parasitology Laboratory, QIMR Berghofer Medical Research Institute, Brisbane, Queensland 4006, Australia. ⁴²Kenya Medical Research Institute, P.O. Box 54840, 00200 Nairobi, Kenya. ⁴³Department of Neuroscience, Perelman School of Medicine at the University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania 19104, USA. ⁴⁴Berkeley Bioinformatics Open-Source Projects, Environmental Genomics and Systems Biology Division, Lawrence Berkeley National Laboratory, One Cyclotron Road MS 977, Berkeley, California 94720, USA. ⁴⁵Department of Systems and Computer Engineering, Carleton University, Ottawa, Ontario, Canada K1S 5B6. ⁴⁶Genomics Institute, UC Santa Cruz, Santa Cruz, California 95064, USA. ⁴⁷Parasites and Vectors Division, London Centre for Neglected Tropical Disease Research, Wolfson Wellcome Biomedical Laboratories, Department of Life Sciences, Natural History Museum, Cromwell Road, London SW7 5BD, UK. ⁴⁸Department of Biomedical Sciences, Faculty of Science and Technology, University of Westminster, 115 New Cavendish Street, London W1W 6UW, UK. ⁴⁹London Centre for Nanotechnology, University College London, Gower Street, London WC1E 6BT, UK. ⁵⁰Research Complex at Harwell, Rutherford Appleton Laboratory, Oxfordshire OX11 0FA, UK

Anexo 8.4 – Artigo em preparação

GAVA, S. G.; TAVARES, N. C.; FALCONE, F. H.; OLIVEIRA, G.; MOURÃO, M. M.
Transcriptome profiling of JNK MAP Kinase knockdown in *Schistosoma mansoni*.

Este artigo está em fase final de revisão pelos coautores e trata das análises de RNASeq referentes ao silenciamento de SmJNK presentes nesta tese.

Anexo 8.5 – Artigo em preparação

AVELAR, L. G. A.*; GAVA, S. G.*; NEVES, R; H., SILVA, M. C.; ARAÚJO, N., TAVARES, N. C.; EL KHAL, A.; MATTOS, A. C. A.; MACHADO-SILVA, J. R; OLIVEIRA, G.; MOURÃO, M. M. Smp38 MAP Kinase regulation in *Schistosoma mansoni*: roles in survival, oviposition and protection against oxidative stress.

Este artigo está sendo escrito em colaboração com a Dra. Lívia Avelar e engloba os dados por ela obtidos em seu doutorado referente aos ensaios funcionais de Smp38 MAPK por RNA de interferência *in vitro* e *in vivo*, bem como as análises de RNASeq referentes a Smp38 MAPK presentes nesta tese.