

Isadora Oliveira Prata

Dissertação de Mestrado

**Caracterização funcional do fator de transcrição SmZF1
de *Schistosoma mansoni* por interferência de RNA (RNAi)**

Belo Horizonte, Fevereiro de 2016

**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Laboratório de Genética Bioquímica**

**Caracterização funcional do fator de transcrição SmZF1
de *Schistosoma mansoni* por interferência de RNA (RNAi)**

Isadora Oliveira Prata

Orientadora: Dra. Glória Regina Franco

Co-orientador: Dr. João Pedro Vieira da Rocha

Co-orientadora: Dra. Marina de Moraes Mourão

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Área de concentração: Bioquímica.

Belo Horizonte, Fevereiro de 2016

Agradecimentos

Os meus sinceros agradecimentos à minha orientadora Glória pela paciência e vontade de ensinar. Obrigada pela confiança depositada e pela amizade, boa vontade, simpatia e animação sempre! Sou muito grata pela maravilhosa experiência que vem sendo aprender com a Chefa.

Agradeço também ao meu co-orientador João Pedro pela superproteção e companhia ao longo de todo esse trabalho. Tenho certeza absoluta que sem ele esse trabalho não se concretizaria! Obrigada por ensinar sempre com boa vontade e paciência, por estar sempre presente nos momentos importantes e pela amizade.

Agradeço ainda à minha co-orientadora Marina por toda a assistência dada para a realização deste trabalho. Agradeço a sua valiosa ajuda para a realização dos experimentos, bem como para a análise dos dados obtidos. Muito obrigada pela disposição, vontade e animação sempre!

Agradeço aos Professores do LGB, Carlos Renato Machado, Andréa Macedo e Sérgio Danilo Pena, pelas sugestões dadas e participação ao longo do desenvolvimento deste trabalho, e também à Neuza, pela ajuda sempre.

Meus sinceros agradecimentos aos “Gloriosos”! Gostaria de dizer que tem sido ótimo estar com todos vocês! Um salve aos Gloriosos da bancada, principalmente a Dani Chame, uma pessoa maravilhosa que tive o prazer de dividir todos os momentos (desde os experimentos até os happy hours). Aos Gloriosos da bioinformática, Tiago Bruno, André, Nayara, Mainá, Eddie, Tarcísio, Carol, Mika, Willian, Jéssica e Thiago. Obrigada pelas reuniões, conversas, cafés e pelos happy hours sempre animados!

Agradeço aos colegas do LGB por estarem sempre presentes nessa jornada, tornando até os dias mais difíceis em dias alegres e animados. Obrigada aos alunos do Carlos Renato que sempre estiveram dispostos a ajudar: à Ceres, sempre presente e animada, aos Brunos 1 (mal-humorado, mas sempre disposto a ajudar) e 2 (companheiro demais!), à Isabela (má e ótima pessoa) e Héllida (completando o time dos bioquímicos do LGB).

Agradeço também ao Professor Dawidson Assis Gomes e aos seus alunos pela ajuda na realização dos experimentos de microscopia confocal.

Gostaria de agradecer à Dr. Neusa Araújo pela ajuda na realização das perfusões dos camundongos e aos colegas do Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular (LPCM), especialmente ao Erick Eidy e à Luciana Lamas, pela companhia durante a realização dos experimentos.

Agradeço toda a minha família, por sempre incentivar de todas as formas o meu crescimento e minhas realizações. Agradeço aos meus maravilhosos avós, aos meus tios, aos primos e especialmente as minha irmãs que tanto amo, Isabela e Liana. Obrigada mãe e pai, por sempre depositarem sua confiança em mim, permitindo que eu siga em frente sabendo sempre que posso contar com vocês.

Agradeço também à Laila, companheira em todos os momentos dessa caminhada. Tem sido maravilhoso dividir todos os momentos com você, discutir assuntos interessantes e ter a oportunidade de aprender sempre. Muito obrigada pela amizade!

Agradeço aos meus professores da Universidade Federal de Viçosa, especialmente aos meus orientadores da iniciação científica, Everaldo Barros e Maurílio Moreira (*in memoriam*), pelo conhecimento e todos ensinamentos durante a minha graduação.

Finalmente, gostaria de agradecer aos meus grandes amigos: Pedro, meu quase irmão, presente em todos os momentos da minha vida; às minhas amoras Virgínia, Luiza, Gabi e Marcela; e à Mari, pelas ótimas discussões e amizade sempre.

Agradeço à CAPES, pela concessão da bolsa, ao apoio financeiro dado pelo CNPq e FAPEMIG, a FIOCRUZ e à Plataforma de PCR em tempo real do CPqRR.

Agradeço a todos que contribuíram para a conclusão dessa etapa!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE QUADROS	9
LISTA DE ABREVIATURAS	10
Resumo	12
Abstract	13
1. Introdução	14
1.1- Aspectos gerais da biologia do <i>Schistosoma</i> spp.	14
1.2- Aspectos gerais da esquistossomose	17
1.3- Controle e tratamento da esquistossomose	19
1.4- O genoma e o transcriptoma de <i>Schistosoma mansoni</i>	20
1.5- Mecanismos de controle da expressão gênica de <i>Schistosoma mansoni</i>	21
1.6- Fatores de transcrição contendo motivos do tipo Dedos de Zinco em <i>S. mansoni</i>	23
1.7- O fator de transcrição SmZF1	27
1.8- Interferência por RNA (RNAi)	33
2. Objetivos	36
2.1- Objetivo geral	36
2.2- Objetivos específicos	36
3. Material e Métodos	37
3.1- Interferência por RNA (RNAi) – Experimentos <i>in vitro</i>	37
3.1.1- Desenho de iniciadores para as reações de PCR e RT-qPCR	37
3.1.1-a Iniciadores para a amplificação do DNA molde utilizado na síntese dos dsRNAs	37
3.1.1-b Iniciadores utilizados nos ensaios de RT-qPCR para a validação do silenciamento dos transcritos de SmZF1	38
3.1.1-c Escolha de genes possivelmente regulados por SmZF1 e desenho de iniciadores .	40
3.1.2- Amplificação dos DNAs molde e síntese dos dsRNAs	40
3.1.3- Obtenção dos parasitos e transformação mecânica de cercárias em esquistossômulos	41
3.1.4- Exposição dos esquistossômulos aos dsRNAs	42
3.1.5- Análises morfológicas dos esquistossômulos expostos ao dsRNA	42
3.2- Avaliação dos níveis de transcritos de SmZF1 e de genes possivelmente regulados por essa proteína e verificação de possíveis efeitos <i>off-target</i> decorrentes da exposição ao dsRNA específico para SmZF1	43
3.2.1- Extração e tratamento do RNA total	43
3.2.2- Síntese de cDNA	44
3.2.3- Ensaios de RT-qPCR	44

3.3- Experimentos <i>in vivo</i>	46
3.3.1- Infecção de camundongos com esquistossômulos silenciados para os transcritos de SmZF1 e recuperação dos vermes adultos.....	46
3.3.2- Análise de ovoposição – Contagem de ovos em fígados de camundongos infectados com parasitos silenciados para o transcrito de SmZF1	46
3.3.3- Análises Histopatológicas	47
3.3.3-a Coloração dos cortes Histológicos	47
3.3.3-b Análise Quantitativa de Granulomas.....	47
4. Resultados	49
4.1- Síntese dos dsRNAs.....	49
4.2- Análise do silenciamento dos transcritos de SmZF1 em cultura de esquistossômulos	51
4.2.1- Análises dos níveis dos transcritos de SmZF1 nos esquistossômulos tratados com dsRNA SmZF1-específico	51
4.2.2- Avaliação de efeito <i>off-target</i> nos experimentos de RNAi.....	55
4.2.3- Avaliação dos níveis de transcritos de dois genes que possivelmente são alvos de regulação da SmZF1 durante os experimentos de RNAi.....	57
4.3- Análises morfométricas dos esquistossômulos expostos à dsRNA.....	59
4.4- Investigação do papel biológico de SmZF1 - Experimentos <i>in vivo</i>	62
4.4.1- Recuperação dos vermes adultos resultantes da infecção de camundongos com esquistossômulos silenciados para SmZF1.....	62
4.4.2- Avaliação por RT-qPCR dos níveis de transcritos de SmZF1 em vermes adultos recuperados dos camundongos infectados com esquistossômulos silenciados.....	65
4.4.3- Contagem de ovos dos fígados de camundongos infectados com parasitos silenciados	67
4.4.4- Análises histopatológicas dos fígados recuperados de camundongos infectados com esquistossomulos silenciados	69
5. Discussão	74
6. Conclusão	84
7. Perspectivas	85
8. Referências Bibliográficas	86
9. Anexo.....	101
9.1- Padronização dos iniciadores utilizados nos ensaios de RT-qPCR para validação do silenciamento dos transcritos de SmZF1.....	101
9.2- Padronização dos iniciadores utilizados nos ensaios de RT-qPCR para avaliação de efeito <i>off-target</i>	103
9.3- Padronização dos iniciadores utilizados nos ensaios de RT-qPCR para avaliação dos genes Smp_065180 e Smp_030710	107
9.4- Sequência de nucleotídeos das regiões promotoras e dos genes Smp_030710 e Smp_065180, que possivelmente são alvos de regulação por SmZF1.....	109

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo biológico dos parasitos do gênero <i>Schistosoma</i>	16
Figura 2: Distribuição geográfica das diferentes espécies causadoras da esquistossomose no mundo (Weerakoon et al., 2015).....	18
Figura 3: Distribuição do <i>S. mansoni</i> no Brasil.	18
Figura 4: Representação tridimensional de um motivo dedo de zinco.....	25
Figura 5: Nova sequência do cDNA que codifica para a proteína SmZF1 e sua respectiva sequência deduzida de aminoácidos, que foram redefinidas a partir de novo sequenciamento e experimentos de RLM-RACE.	29
Figura 6: Modelagem molecular de SmZF1.	29
Figura 7: Identificação de um possível sítio de interação entre uma sequência específica de DNA e a SmZF1 através de <i>docking</i>	31
Figura 8: Classificação dos genes contendo, em seus respectivos promotores, pelo menos um sítio de ligação para SmZF1.	32
Figura 9: Esquema ilustrativo da via de RNAi. Pri-miRNAs são transcritos no núcleo e processados pela Droscha em pré-miRNAs (aproximadamente ~70 nucleotídeos).	35
Figura 10: Análise dos dsRNAs de SmZF1 e dos controles inespecíficos mCherry e GFP, através de gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo.	50
Figura 11: Cinética de silenciamento dos transcritos de SmZF1 nos grupos tratados com os dsRNAs de SmZF1 e inespecífico (<i>Scrambled</i>).....	53
Figura 12: Nível de transcritos de SmZF1 nos esquistossômulos tratados por 3 dias com os dsRNAs inespecíficos (<i>Scrambled</i>) e de SmZF1.....	54
Figura 13: Níveis de transcritos de GAPDH, alfa-tubulina e SMYB1 nos esquistossômulos tratados com os dsRNAs de SmZF1 e <i>Scrambled</i>	56
Figura 14: Níveis de transcritos dos genes Smp_065180 e Smp_030710 nos esquistossômulos cultivados na presença e ausência dos dsRNAs de SmZF1 e <i>Scrambled</i>	58
Figura 15: Imagens representativas de esquistossômulos tratados por 2 dias com os dsRNAs <i>Scrambled</i> e de SmZF1.....	60
Figura 16: Área dos esquistossômulos cultivados na ausência e presença dos dsRNAs <i>Scrambled</i> e de SmZF1.	61
Figura 17: Contagem de vermes adultos de cada gênero recuperados da perfusão de camundongos infectados com parasitos silenciados e não silenciados para os transcritos de SmZF1.	63
Figura 18: Contagem de vermes adultos totais recuperados da perfusão de camundongos infectados com esquistossômulos silenciados e não silenciados para os transcritos de SmZF1..	64

Figura 19: Nível de transcritos de SmZF1 em vermes adultos recuperados de camundongos infectados com esquistossômulos silenciados.	66
Figura 20: Contagem de ovos nos fígados dos camundongos infectados com esquistossômulos silenciados para SmZF1.	68
Figura 21: Imagens representativas de cortes histológicos, corados com hematoxilina e tricrômico de Gomori, de fígados de camundongos infectados com esquistossômulos silenciados para os transcritos de SmZF1.	70
Figura 22: Número de granulomas por mm² de fígado.	72
Figura 23: Análise das áreas de fibrose e das áreas totais dos granulomas presentes nos fígados de camundongos infectados com esquistossômulos silenciados para os transcritos de SmZF1. ..	73
Figura Anexo 1: Padronização dos iniciadores desenhados para SmCOX1.	101
Figura Anexo 2: Padronização dos iniciadores desenhados para SmZF1.	102
Figura Anexo 3: Padronização dos iniciadores desenhados para GAPDH de <i>S. mansoni</i>.	103
Figura Anexo 4: Padronização dos iniciadores desenhados para SmCOX1.	104
Figura Anexo 5: Padronização dos iniciadores desenhados para SMYB1.	105
Figura Anexo 6: Padronização dos iniciadores desenhados para Alfa-Tubulina.	106
Figura Anexo 7: Padronização dos iniciadores desenhados para Smp_030710.	107
Figura Anexo 8: Padronização dos iniciadores desenhados para Smp_065180.	108
Figura Anexo 9: Sequência de nucleotídeos do gene Smp_030710.	109
Figura Anexo 10: Sequência de nucleotídeos do gene Smp_065180.	110

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Sequência dos iniciadores utilizados para a amplificação do DNA molde para a síntese dos dsRNAs.	38
Quadro 2: Sequência dos iniciadores utilizados nos experimentos de RT-qPCR.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

µm² – Micrometros quadrado

Ago2 – Argonaute 2

ANOVA – Análise de Variância

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar

CO₂ – Dióxido de carbono

CPqRR – Centro de Pesquisas René Rachou

Ct – Threshold cycle;

dNTP – Deoxiribonucleotídeos

dsRNA – RNA de dupla fita

EMSA – Ensaio de Mudança de Mobilidade Eletroforética

g – Gravidade

GAPDH – Gliceraldeído-3- fosfato- desidrogenase

GFP – Green fluorescent protein

H – Hora

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

KDa – Quilo Dalton

KOH – Hidróxido de potássio

LGB – Laboratório de Genética e Bioquímica

MEM – Minimum Essential Media

Min – Minutos

mL – Mililitro

mRNA – RNA mensageiro

NCBI – National Center for Biotechnology Information

nM – Nano molar

°C – Graus Celsius

OD – Densidade óptica

pb – Pares de base

PCR – Reação em cadeia de polimerase
PZQ – Praziquantel
qRT-PCR – PCR quantitativo em tempo real
RISC – RNA-induced silencing complex
RNA – ácido ribonucleico
RNAi – RNA de interferência
RNAseq – Sequenciamento RNA de última geração
siRNA – Pequeno RNA de interferência
SmCOX – Citocromo Oxidase C de *Schistosoma mansoni*
SMYB1 – YB1 de *Schistosoma mansoni*
SmZF1 – Proteína Zinc Finger de *Schistosoma mansoni*
 Δ Ct – Variação de threshold cycles
 $\Delta\Delta$ Ct – Variação da variação do Ct
 μ L – Microlitro

Resumo

A esquistossomose é uma doença causada por parasitos do gênero *Schistosoma*, sendo uma das mais prevalentes dentre as doenças tropicais negligenciadas. Atualmente, mais de 240 milhões de pessoas no mundo estão infectadas. No Brasil, a esquistossomose é causada pela espécie *Schistosoma mansoni*. Durante o seu complexo ciclo de vida, o *S. mansoni* é submetido a diferentes ambientes, onde a regulação da expressão gênica exerce um papel central nas transformações morfológicas e fisiológicas necessárias para o desenvolvimento deste parasito. Nesse contexto, a proteína SmZF1, um fator de transcrição de *S. mansoni* que contém quatro motivos dedos de zinco do tipo C2H2, representa um alvo em potencial para estudos do controle da expressão gênica associada ao desenvolvimento larval e ao processo reprodutivo em vermes adultos do parasito. Esse projeto teve como objetivo a caracterização funcional da proteína SmZF1, através de interferência de RNA (RNAi), a fim de investigarmos a importância dessa proteína durante o estabelecimento da infecção do hospedeiro vertebrado pelo *S. mansoni*. Após o cultivo *in vitro* de esquistossômulos na presença do dsRNA de SmZF1 por sete dias, verificamos que os transcritos de SmZF1 foram silenciados de maneira efetiva e específica, alcançando uma diminuição máxima de ~69% com relação aos esquistossômulos cultivados na ausência de qualquer dsRNA. Além disso, observamos um leve retardo no crescimento dos esquistossômulos após dois dias de tratamento com o dsRNA de SmZF1. Avaliamos ainda a expressão gênica de dois genes que podem ser alvo de regulação por SmZF1 em *S. mansoni*, Smp_065180 e Smp_030710, e verificamos que o silenciamento desse fator de transcrição não alterou significativamente os níveis dos transcritos de ambos os genes. A infecção de camundongos com esquistossômulos silenciados para os transcritos de SmZF1, quando comparada à infecção do grupo controle, resultou em uma diminuição de ~72% da carga parasitária, além de uma redução de ~70% na carga de ovos depositados nos fígados dos camundongos. O silenciamento dos transcritos de SmZF1 induzido em esquistossômulos foi transiente, uma vez que o mesmo não se manteve nos vermes adultos, derivados dos esquistossômulos transformados. Também não foram observadas alterações nos parâmetros histopatológicos avaliados nos fígados dos camundongos infectados com esquistossômulos silenciados para os transcritos de SmZF1. Os resultados sugerem o envolvimento de SmZF1 no desenvolvimento larval e no estabelecimento da infecção de *S. mansoni* no hospedeiro vertebrado.

Abstract

Schistosomiasis is a disease caused by parasites of *Schistosoma* genus. This parasitic disease is one of the most prevalent among the neglected tropical diseases affecting over 240 million people worldwide. In Brazil, schistosomiasis is caused by *Schistosoma mansoni*. *S. mansoni* is exposed to different environments during its complex life cycle, in which the regulation of gene expression plays a central role in the morphological and physiological changes required for parasite development. The SmZF1 protein, a transcription factor from *S. mansoni* that contains four C2H2 zinc fingers, represents a potential research target for the understanding of gene expression control associated to the parasite larval development and adult worm reproduction. Herein we performed functional studies through RNA interference (RNAi) in order to investigate whether SmZF1 is involved in the establishment of *S. mansoni* infection in the mammalian host. Therefore, we induced the silencing of SmZF1 mRNA by soaking schistosomula cultivated *in vitro* with SmZF1 dsRNA for seven days. We show that SmZF1 transcript levels were effectively and specifically reduced by 69% relative to untreated control. Schistosomula growth was slightly affected after two days of treatment with SmZF1 dsRNA. Furthermore, the gene expression of two putative genes targeted by SmZF1, Smp_065180 and Smp_030710 were not significantly affected by SmZF1 silencing. We found that SmZF1 knockdown was transient, because the RNAi induced in schistosomules did not persist in adult worms derived from mice infected with dsRNA-treated parasites. In addition, parasite and liver egg burden recovered from mice infected with transformed schistosomula compared to control infection was significantly reduced by 72% and 70%, respectively. We observed no changes in histopathological parameters from liver of mice infected with knockdown schistosomula. The results suggest that SmZF1 might play a role during *S. mansoni* larval development and parasite infection establishment in the mammalian host.

1. Introdução

1.1- Aspectos gerais da biologia do *Schistosoma* spp.

Os parasitos do gênero *Schistosoma* são platelmintos trematódeos da ordem *Digenea*. Esses organismos são os agentes etiológicos da esquistossomose, a segunda mais prevalente dentre as doenças tropicais negligenciadas do mundo. As espécies de maior impacto para a saúde humana mundial são o *Schistosoma mansoni*, o *S. haematobium* e o *S. japonicum*, apresentando características morfológicas e fisiológicas particulares, além de diferentes distribuições geográficas e hospedeiros intermediários (Jordan, 1987).

O gênero *Schistosoma* é composto por organismos diploides, em que o macho se caracteriza por ser o sexo homogamético (ZZ) e a fêmea, o heterogamético (ZW) (Simpson et al., 1982). A biologia desses parasitos é peculiar em diversos aspectos e seu ciclo de vida é bastante complexo. De mais de 100 famílias e 10000 espécies de trematódeos digenéticos, apenas o gênero *Schistosoma* é exclusivamente dióico (Platt and Brooks, 1997). Além disso, esses parasitos são um dos primeiros animais a desenvolver dimorfismo sexual e cromossomos sexuais heteromórficos (Verjovski-Almeida et al., 2003). O ciclo de vida dos parasitos do gênero *Schistosoma* é bastante complexo e compreende diferentes formas evolutivas que vivem em diversos ambientes. O hospedeiro vertebrado é infectado pelo *Schistosoma* através do contato direto com fontes de água contendo larvas cercárias. As cercárias, quando liberadas pelo hospedeiro intermediário em um ambiente aquático, utilizam sua grande capacidade de movimentação aliada ao reconhecimento de gradientes térmicos e químicos, para encontrar o hospedeiro definitivo (Han et al., 2009). Após o contato com a pele, elas penetram no hospedeiro definitivo e entram na circulação sanguínea via capilares. Durante a penetração, as cercárias dão início ao processo de transformação em esquistossômulos, enquanto migram através da circulação sanguínea (Weerakoon et al., 2015). Através da circulação, os esquistossômulos chegam ao coração e aos pulmões em torno de quatro dias, tornando-se mais longos e delgados, o que facilita a sua migração através da rede vascular pulmonar. Os esquistossômulos saem do pulmão e voltam ao coração, sendo então enviados pela circulação sistêmica a todas as partes do corpo do hospedeiro. Somente quando os esquistossômulos alcançam o sistema porta intra-hepático do hospedeiro, que eles completam seu desenvolvimento em vermes adultos (Rey, 2001).

Os machos e fêmeas sexualmente maduros pareiam-se e então migram para as veias mesentéricas superiores (no caso do *S. mansoni*) ou inferiores (no caso do *S. japonicum*), ou para o plexo venoso perivesical, em infecções por *S. haematobium* (Weerakoon et al., 2015). O

desenvolvimento reprodutivo da fêmea somente acontece através do pareamento com o macho. Nesse processo, a fêmea passa a se localizar no canal ginecóforo do macho e então suas gônadas se desenvolvem para a produção de ovos (Wang et al., 2015) (Figura 1).

A ovoposição inicia-se a partir de 4 a 6 semanas, após a infecção por *Schistosoma mansoni* e por *S. japonicum* e a partir de 13 semanas em infecções por *S. haematobium*. Os ovos migram através das paredes dos vasos em que foram depositados, atingindo os tecidos e, em seguida, o lúmen intestinal (esquistossomose intestinal), ou o lúmen da bexiga urinária (esquistossomose urinária). A presença dos ovos no tecido do hospedeiro mamífero promove uma resposta granulomatosa irreversível, causando sérios danos em diversos órgãos, principalmente no fígado, por gerar hipertensão do sistema porta, o que caracteriza a fase crônica da esquistossomose (Elbaz and Esmat, 2013). A esquistossomose hepática, causada pelo *S. mansoni* e pelo *S. japonicum*, leva à fibrose hepática, enquanto os ovos de *S. haematobium* levam a um quadro de inflamação granulomatosa associado a ulceração e pseudopolipose das paredes uretrais e vesicais (Han et al., 2009).

Os ovos são então liberados no ambiente, por fezes ou urina, e eclodem na água sob a forma de miracídio (Weerakoon et al., 2015). As células ciliadas e nervos sensoriais do miracídio agem como quimiorreceptores, fotorreceptores e sensores profundos, com a provável função de busca e penetração no hospedeiro intermediário (moluscos) (Peterson et al., 2009). Após a penetração no hospedeiro intermediário, o miracídio se apresenta como um tubo enovelado, repleto de células germinativas em multiplicação, transformando-se em esporocisto. O esporocisto primário apresenta grandes células germinativas que se rompem para liberar esporocistos filhos. Já os esporocistos secundários, apresentam células germinativas em constante multiplicação que formam aglomerados celulares e se diferenciam para formar cercárias. As larvas cercárias são então liberadas na água, fechando o ciclo de vida desses parasitos (Rey, 2001).

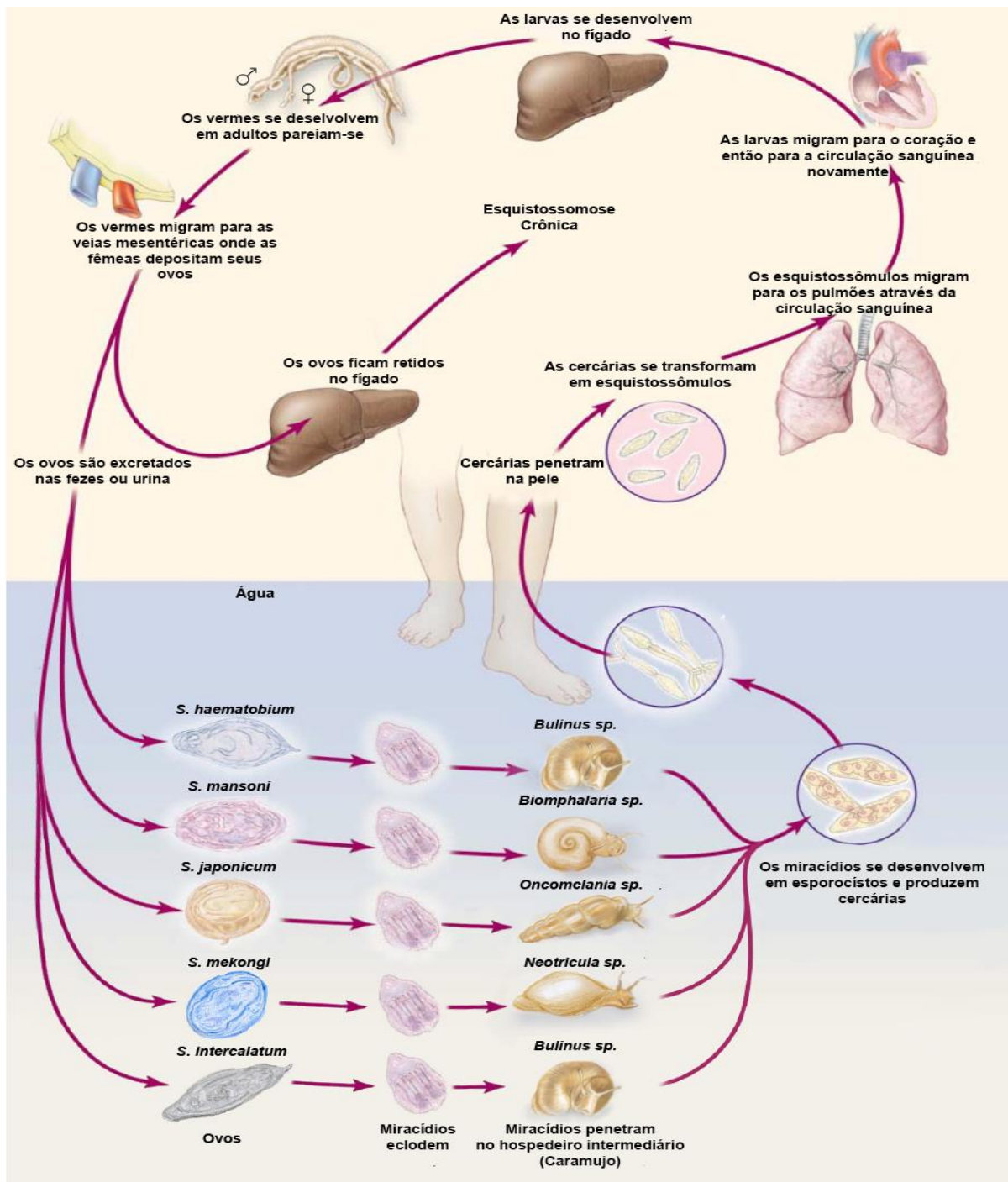


Figura 1 - Ciclo biológico dos parasitos do gênero *Schistosoma*. O complexo ciclo de vida do parasito envolve morfologias distintas, que variam conforme cada estágio de desenvolvimento, os diferentes ambientes e os hospedeiros invertebrado (caramujos) e vertebrado (mamíferos). (Modificado de Weerakoon et al., 2015).

1.2- Aspectos gerais da esquistossomose

A esquistossomose é uma doença caracterizada por causar infecções crônicas de alta morbidade, sendo considerada uma das mais prevalentes dentre as doenças tropicais negligenciadas e, portanto, um problema de saúde pública mundial (Weerakoon et al., 2015). São conhecidas 23 espécies de parasitos do gênero *Schistosoma*, das quais ao menos 7 estão diretamente relacionadas com a causa e prevalência da esquistossomose (Lawton et al., 2011). Mais de 240 milhões de pessoas em 78 países estão infectadas e aproximadamente 700 milhões correm o risco de infecção (WHO, 2014). Essa doença possui sérias consequências para a saúde pública e significantes impactos socioeconômicos em países em desenvolvimento. Sua transmissão é influenciada por fatores socioambientais, como instalações sanitárias inadequadas (Engels et al., 2002) e também pela distribuição e presença dos hospedeiros intermediários. Entre as espécies de hospedeiros intermediários mais prevalentes mundialmente estão moluscos do gênero *Biomphalaria*, *Oncomelania* e *Bulinus*, que são, respectivamente, hospedeiros do *S. mansoni*, do *S. japonicum* e do *S. haematobium*) (Pereira et al., 2010).

As espécies de *S. mansoni* e de *S. japonicum* são as responsáveis pela esquistossomose intestinal, enquanto o *S. haematobium* é o agente causador da esquistossomose urinária. O *S. japonicum* está localizado principalmente em regiões da República da China, Indonésia e Filipinas, enquanto *S. mansoni* está amplamente distribuído em regiões da África, Oriente Médio e América do Sul. O *S. haematobium* possui uma distribuição similar à do *S. mansoni*, mas não ocorre na América do Sul. Espécies menos prevalentes, porém, de importância local, como o *S. mekongi* e o *S. intercalatum*, também causam a esquistossomose intestinal em regiões do sudeste da Ásia e nas regiões central e oeste da África (Figura 2) (Weerakoon et al., 2015).

Na América, o único agente etiológico da esquistossomose humana é o *Schistosoma mansoni*, causador da esquistossomose mansoni. Essa doença é endêmica em países e ilhas latino-americanas e foi introduzida no Brasil devido ao tráfico de escravos trazidos da África. A partir de então, o fluxo migratório foi responsável por espalhar a esquistossomose para o interior do país. No Brasil, a esquistossomose afeta aproximadamente 6 milhões de pessoas, enquanto aproximadamente 25 milhões de pessoas vivem em áreas com risco de infecção pelo parasito (Martins et al., 2015). Todos os estados do Brasil afetados pela esquistossomose estão listados na Figura 3. Os estados que possuem a maior prevalência da doença são Bahia e Minas Gerais. Alguns estados são foco de infecção, mas não são regiões endêmicas, como Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Distrito Federal, Rio de Janeiro, Piauí, Maranhão e Pará (Conceição and Coura, 2012).

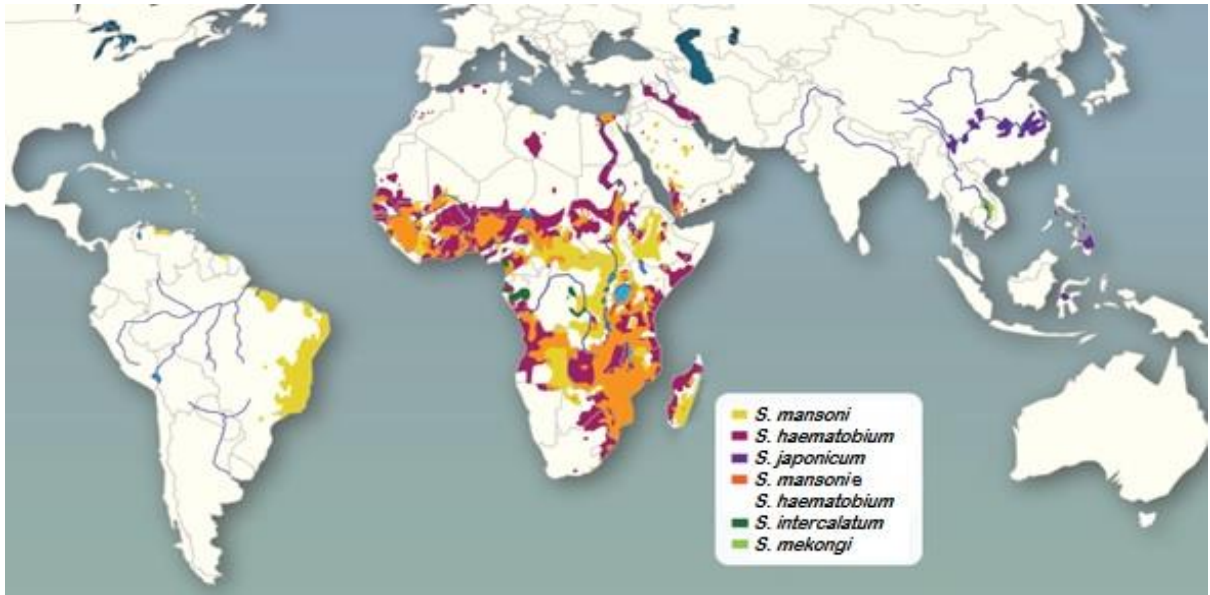


Figura 2 - Distribuição geográfica das diferentes espécies causadoras da esquistossomose no mundo (Weerakoon et al., 2015).

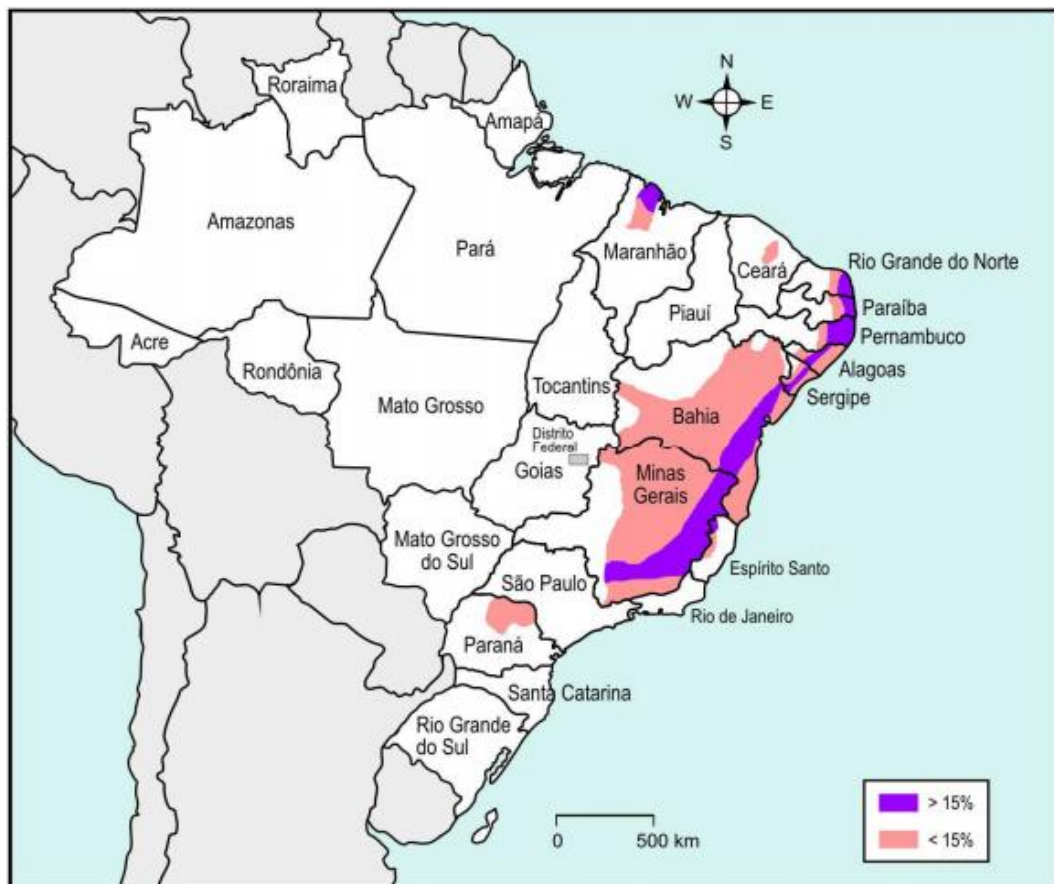


Figura 3 - Distribuição do *S. mansoni* no Brasil. As áreas delimitadas em cor-de-rosa representam as regiões onde menos de 15% dos indivíduos estão infectados por *S. mansoni* e as áreas marcadas pela cor roxa indicam as regiões onde mais de 15% dos indivíduos estão infectados pelo parasito. (Conceição and Coura, 2012).

1.3- Controle e tratamento da esquistossomose

O controle da esquistossomose ainda é um desafio por vários motivos. A grande disseminação dos hospedeiros intermediários e seus mecanismos de escape do controle biológico feito com o uso de moluscicidas, os altos custos associados à implementação de condições sanitárias e o contato da população rural com água poluída em atividades como agricultura e pesca, o tempo necessário para a educação sanitária e adesão aos programas de controle pelas comunidades afetadas compõem algumas das dificuldades (Coura and Amaral, 2005).

O principal quimioterápico utilizado no tratamento da esquistossomose, o Praziquantel (PZQ), foi desenvolvido na Alemanha durante os anos 70 através de uma parceria entre as companhias Bayer AG (atual Bayer Schering Pharma) e Merck Darmstadt (Merck KG). Atualmente esse é o tratamento prioritário comercialmente disponível para a esquistossomose, devido ao seu baixo custo. Essa droga, quando usada em campanhas anuais de entrega em larga escala, mostrou-se capaz de reduzir a prevalência e mortalidade da doença (Hotez, 2010). Além do PZQ, uma outra droga de igual eficiência contra a morbidade, porém de alto custo, é a Oxamniquina, usada exclusivamente no tratamento contra o *S. mansoni* (Cioli et al., 1995). Entretanto, apesar de serem os mais efetivos e seguros tratamentos disponíveis, várias limitações estão associadas a eles. A principal delas é o fato de que o tratamento com ambas as drogas não previne a reinfecção, que pode ocorrer rapidamente nas áreas endêmicas. Além disso, a entrega eficaz da droga em toda essa área necessita de uma infraestrutura sólida, o que torna essa abordagem cara quando a situação econômica de muitos dos países localizados em regiões endêmicas é levada em consideração (McManus and Loukas, 2008). Adicionalmente, existem relatos da diminuição da suscetibilidade do parasito ao PZQ e Oxamniquina (Cioli et al., 1993; Coelho et al., 1997; Melman et al., 2009).

Devido a necessidade de uma nova abordagem para o tratamento da esquistossomose, a Organização Mundial de Saúde (OMS) criou, nos anos 90, o Projeto Genoma de *Schistosoma mansoni*. Esse projeto teve como principal objetivo elucidar questões fundamentais da biologia e fisiologia desse parasito, abrindo assim novos caminhos para o desenvolvimento de drogas, a descoberta de antígenos candidatos vacinais e outras abordagens para o tratamento da esquistossomose (Brindley and Pearce, 2007). Devido a esse projeto, em 1995 alguns genes que foram identificados como candidatos vacinais foram submetidos à testes. Dentre eles estão a enzima glicolítica triose-fosfato-isomerase (SmTPI), a paramiosina (Sm97), a glutationa-S-transferase (Sh28GST), uma proteína integral de membrana (Sm23) e uma proteína relacionada

com ligação a ácidos graxos (Sm14). Alguns desses antígenos mostraram potencial vacinal e chegaram a progredir para ensaios clínicos (Bergquist et al., 2002). Em outros trabalhos, duas proteínas presentes no tegumento de vermes adultos e esquistossômulos de *S. mansoni*, Sm29 e tetraspanina-2 (SmTSP-2), conferiram proteção de 51% e 57% em camundongos desafiados com essas proteínas recombinantes (Cardoso et al., 2008; Tran et al., 2006). Todavia, apesar dos esforços, até o momento ainda não há uma vacina contra esquistossomose.

1.4- O genoma e o transcriptoma de *Schistosoma mansoni*

A iniciativa de se estudar o genoma de *Schistosoma mansoni* no Brasil surgiu em 1992, onde se iniciou um projeto liderado por pesquisadores da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e do Centro de Pesquisas René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz (CPqRR-FIOCRUZ). Em 1994, este projeto se tornou um consórcio internacional, incluindo laboratórios na Europa, Ásia, África, Austrália, América do Sul e América do Norte, sendo parcialmente financiado pela Organização Mundial de Saúde OMS/UNDP/*World Bank Special Program for Research and Training in Tropical Diseases* (TDR) (Revisão em Franco et al., 2000).

Para a obtenção de dados sobre o transcriptoma de *S. mansoni*, a estratégia de geração de Etiquetas de Sequências Expressas (*Expressed Sequence Tags* – ESTs) foi adotada, uma vez que as metodologias empregadas para a realização dessa técnica são eficientes, simples e de baixo custo (Franco et al., 2004). Em 1995, esse programa gerou a primeira publicação com 607 ESTs (Franco et al. 1995). Até 2003, mais de 17000 ESTs foram geradas através de bibliotecas de cDNA de vários estágios do ciclo de vida do *S. mansoni* (Revisão em Oliveira et al., 2008).

Os grupos de pesquisa envolvidos no projeto ONSA (*Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis*), financiado pela FAPESP, publicaram em 2003 um total de 163000 ESTs de seis estágios de desenvolvimento do parasito, resultando em uma amostragem de 92% dos 14000 genes preditos para o *S. mansoni*. Das sequências geradas, 77% representaram novos fragmentos, dos quais 1% representavam novos parálogos, 20% representavam novos ortólogos e 55% não possuíam função conhecida (Verjovski-Almeida et al., 2003). Os dados gerados pelo transcriptoma de *S. mansoni* identificaram mecanismos moleculares para a maturação do parasito dependente do hospedeiro, evasão do sistema imune do hospedeiro, desenvolvimento, sinalização celular e dimorfismo sexual. Essa informação é de extrema importância para o entendimento da biologia do parasito, uma vez que possibilita a busca de potenciais alvos para drogas e candidatos vacinais (Verjovski-Almeida et al., 2003; McManus and Bartley, 2004).

O projeto de sequenciamento do genoma completo do parasito foi desenvolvido nos EUA e na Inglaterra, em colaboração com a Rede do Projeto Genoma de *S. mansoni* da OMS/UNDP/World Bank, sendo realizado pelo The Institute for Genome Research em Maryland, EUA e pelo Wellcome Trust Sanger Institute em Cambridge, na Inglaterra. O genoma de *S. mansoni* foi finalmente sequenciado em 2009, completando 363 Mb, sendo composto de aproximadamente 40% de sequências repetitivas e contendo ao menos 11809 genes (Berriman et al., 2009). Em 2012, Protasio e colaboradores disponibilizaram uma nova versão do genoma de *S. mansoni*, integrando dados de mapeamento genético e de sequenciamento massivo de mRNA (RNA-seq) de diferentes fases de desenvolvimento do parasito. A natureza quantitativa do RNA-seq aumentou a resolução do transcriptoma de *S. mansoni*, permitindo identificar genes diferencialmente expressos de uma maneira mais acurada e sensível (Protasio et al, 2012). Por exemplo, a partir de abordagens baseadas em RNA-seq, Almeida e colaboradores mapearam regiões intergênicas e intrônicas em vermes adultos de *Schistosoma mansoni*, onde não havia predição de genes anteriormente, revelando possíveis novos genes codificadores de proteínas ou RNAs não codificadores (ncRNAs) (Almeida et al., 2011).

1.5- Mecanismos de controle da expressão gênica de *Schistosoma mansoni*

O *S. mansoni* possui um ciclo de vida bastante complexo, composto pela diferenciação desse parasito em diversas formas evolutivas, um processo pelo qual vários genes são diferencialmente expressos. Por exemplo, estima-se que mais de 1000 genes do *S. mansoni* sejam específicos de cada uma das fases do ciclo de vida desse parasito (Verjovski-Almeida et al., 2004). No intuito de caracterizar os mecanismos de controle da expressão gênica relacionados aos mais diversos aspectos da biologia desse parasito, vários outros trabalhos foram publicados nos últimos anos. Descreveremos, a seguir, alguns deles.

Vários trabalhos correlacionaram a influência do pareamento sexual no controle da expressão gênica de vermes adultos machos e fêmeas de *S. mansoni*. Em 2006, Fitzpatrick e Hoffmann descreveram, pela técnica de microarranjo, os genes diferencialmente expressos entre machos de *S. mansoni* pareados e não-pareados com fêmeas adultas desta mesma espécie. Além disso, esse trabalho mostrou que nem todos os genes de fêmeas descritos como críticos para a produção de ovos deste parasito (Fantappiè et al., 2001) são regulados pelo pareamento com o macho (Fitzpatrick and Hoffmann, 2006). Além disso, de modo a investigar os transcritos associados com a maturação sexual e ovoposição de *S. mansoni*, Waisberg e colaboradores

compararam, pela técnica de microarranjo, o perfil de expressão gênica entre vermes adultos sexualmente maduros, isto é, vermes machos e fêmeas que se desenvolveram pareados e vermes imaturos, ou seja, que não foram pareados durante o seu desenvolvimento. Os resultados indicaram que, quando vermes sexualmente maduros e imaturos foram comparados, enquanto que 265 transcritos foram diferencialmente expressos em fêmeas, apenas 53 transcritos se mostraram diferencialmente expressos em machos. Além disso, verificou-se que, dos genes diferencialmente expressos em fêmeas, 55% possuíam alta expressão em fêmeas maduras, enquanto que os outros 45% dos genes demonstraram ser mais expressos em fêmeas não pareadas. Já nos genes diferencialmente expressos em machos, 56,6% foram mais expressos em vermes machos pareados, enquanto que os outros 43,4% desses genes foram mais expressos nos vermes adultos machos imaturos (Waisberg et al., 2007).

Ainda através de experimentos de microarranjo, para analisar transcritos relacionados com o sexo do hospedeiro mamífero, Waisberg e colaboradores compararam o perfil de expressão gênica de vermes adultos de *S. mansoni* obtidos pela infecção de camundongos fêmeas e machos. Os resultados indicaram que de 11 genes diferencialmente expressos em fêmeas desse parasito, 10 foram preferencialmente expressos nas fêmeas de vermes obtidas da infecção de camundongos machos. Já nos vermes adultos machos, 134 genes foram diferencialmente expressos, dos quais 79 foram preferencialmente expressos em vermes recuperados da infecção de camundongos fêmeas (Waisberg et al., 2008).

Em relação à caracterização de outros elementos responsáveis pelo controle da expressão gênica em *S. mansoni*, diversos fatores de transcrição vêm sendo estudados. Dentre eles, está a proteína SmHSF1 (*Heat Shock Factor 1*), um fator de transcrição bem caracterizado em *S. mansoni*, responsável pela regulação da transcrição de genes codificadores de proteínas HSP (*Heat Shock Proteins*) e manutenção da homeostase celular (Levy-Holtzman et al., 1995). Recentemente, através de imunohistoquímica, ao contrário do que se esperava em se tratando de um fator de transcrição, a proteína SmHSF1 foi observada na região citoplasmática, não nuclear, de glândulas secretórias de cercárias, o que sugere uma nova função para essa proteína (Ishida et al., 2014).

Outra proteína que atua na regulação da expressão gênica e que vem sendo caracterizada em *S. mansoni* é a SMYB1. As proteínas *Y-box binding protein 1* (YB-1) são membros de uma família de proteínas de ligação a DNA e RNA, que podem exercer suas funções tanto no citoplasma, quanto no núcleo. Essas proteínas possuem participação na replicação, reparo e transcrição do DNA, além de atuarem nos processos de *splicing*, estabilização e tradução de mRNA (Eliseeva et al., 2011). O gene que codifica para a proteína SMYB1 de *Schistosoma*

mansoni foi identificado a partir de uma biblioteca de cDNA da fase adulta do parasito. Esse gene é expresso em vários estágios do ciclo de vida do parasito, sendo que a expressão da proteína é elevada vermes adultos (Franco et al., 1997). Em 2002, Valadão e colaboradores demonstraram que a SMYB1 é capaz de se ligar a oligonucleotídeos de DNA fita dupla e fita simples, com uma preferência para sequências contendo os motivos CCAATT (domínio Y-box invertido) (Valadão et al., 2002). Além disso, a proteína se mostrou capaz de ligar a oligonucleotídeos de RNA. Em 2004, de Oliveira e colaboradores mostraram que a proteína SMYB1 é capaz de interagir com SmPura, uma proteína que também participa da regulação da transcrição gênica (de Oliveira et al., 2004). Estudos de localização celular da SMYB1 por imunohistoquímica mostraram que essa proteína está presente no citoplasma de todas os estágios do ciclo de vida do parasito (Rocha et al., 2013). Recentemente, a SMYB1 foi avaliada como candidata vacinal contra a esquistossomose, de modo que a imunização com a proteína recombinante levou a uma redução da carga parasitária e do número de ovos retidos no fígado, em camundongos infectados com *S. mansoni* (Dias et al., 2014).

1.6- Fatores de transcrição contendo motivos do tipo Dedos de Zinco em *S. mansoni*

O maior grupo de fatores de transcrição em eucariotos é constituído por proteínas contendo dedos de zinco, que estão envolvidas em variados processos celulares como transcrição, tradução, empacotamento de RNA, remodelamento de cromatina, enovelamento proteico, organização do citoesqueleto, desenvolvimento epitelial e adesão celular (Malgieri et al., 2015). Fatores de transcrição que contêm dedos de zinco possuem esses motivos dispostos repetidamente para direcionar ligações sequência-específicas em várias regiões promotoras do DNA (Berg, 1990). Algumas dessas proteínas demonstraram, em ensaios *in vitro*, que possuem capacidade de se ligar a RNA ou a híbridos de DNA-RNA (Shi e Berg, 1995; Jamieson et al., 1996). O motivo dedo de zinco foi primeiramente reconhecido como um motivo repetitivo de ligação à zinco, contendo cisteínas e histidinas como ligantes conservados, em um fator de transcrição de *Xenopus* (TFIIIA) (Miller et al., 1985). Desde então, vários outros motivos de ligação à zinco vêm sendo identificados e classificados como dedos de zinco (Laity et al., 2001).

Os motivos dedo de zinco são as primeiras estruturas do grupo de proteínas que se ligam à DNA que possuem ampla informação estrutural em termos de propriedades de reconhecimento ao DNA (Jamieson et al., 1996). Os tipos de dedos de zinco são classificados de acordo com as disposições dos resíduos que coordenam o Zn^{2+} nas α -hélices e folhas β , podendo ser C2HC, C2H2 ou C2C2, onde C representa o resíduo de cisteína e H o de histidina

(Iuchi, 2001). O motivo dedo de zinco clássico e mais comum entre os eucariotos, o C2H2, consiste em uma sequência com cerca de 30 aminoácidos que possuem duas histidinas, duas cisteínas e três resíduos hidrofóbicos dispostos de maneira altamente conservada. Juntos eles formam pequenos domínios estabilizados por Zn^{2+} que possuem a mesma rede estrutural, alterando suas propriedades químicas através da variação de resíduos chave (Lu et al., 2003). A folha β se localiza na região N-terminal e inclui duas cisteínas coordenadas, enquanto a α -hélice é constituída de três voltas, onde duas histidinas se localizam em duas voltas sucessivas até a região C-terminal (Figura 4) (Malgieri et al., 2015).

As proteínas contendo dedos de zinco se ligam ao DNA em tandem, de maneira polar e linearizada, para reconhecer sequências de DNA e RNA de diferentes tamanhos. Essa estrutura oferece um enorme número de possibilidades para reconhecimento desses ácidos nucleicos, o que as torna tão variadas e amplamente expressas em diversos organismos (Klug, 2010). O padrão de interação entre os aminoácidos dos dedos de zinco e o DNA foi estudado e entendido por Pavletich e Pabo em 1991, através da análise de cristalografia de um complexo, em que um oligonucleotídeo de DNA estava especificamente ligado à um domínio com três dedos de zinco do fator de transcrição Zif268, uma proteína de camundongo. O contato primário é feito pela α -hélice, que se liga à fenda maior do DNA através de ligações de hidrogênio entre alguns de seus resíduos de aminoácidos específicos e três bases sucessivas da fita do DNA (Klug, 2010). Esse é o modelo clássico de interação, porém os motivos dedo de zinco se mostraram capaz de interagir com o DNA de outras formas (Fairall et al., 1993; Elrod-Erickson et al., 1998).

Proteínas contendo o clássico motivo C2H2 estão entre as mais abundantes entre os genomas de eucariotos. Estima-se que em humanos 3% dos genes codificam para essas proteínas e em camundongos (*Mus musculus*) essa porcentagem chega a 2,7%. Já em *Caenorhabditis elegans*, cerca de 0,88% dos seus genes codificam para proteínas contendo o motivo C2H2 (Klug, 2010). No trabalho que deu origem à publicação do transcriptoma de *S. mansoni*, 2,4% das ESTs categorizadas quanto à sua função molecular no Gene Ontology (GO) codificam para reguladores da transcrição. A busca por domínios conservados nesses transcritos encontrou que cerca de 5% dos mesmos consistem em transcritos que codificam para proteínas dedo de zinco do tipo C2H2 (Verjovski-Almeida et al., 2003).

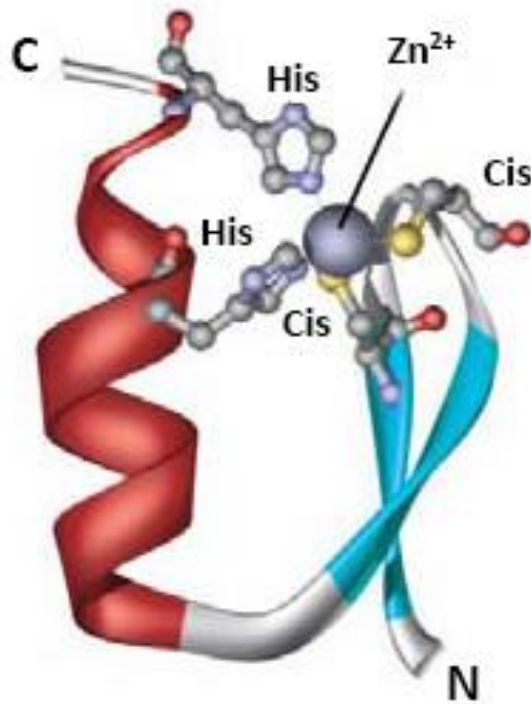


Figura 4 - Representação tridimensional de um motivo dedo de zinco. As folhas β estão coloridas em azul e as α -hélices estão representadas em vermelho. (Lodish et al., 2003, p.59).

Diversos trabalhos vêm buscando elucidar mecanismos de regulação da expressão gênica em *S. mansoni*, através da busca por fatores de transcrição relacionados com os mais diversos processos biológicos que ocorrem neste parasito. Alguns desses fatores, que possuem motivos do tipo dedo de zinco, vêm sendo amplamente estudados, como é o caso dos receptores nucleares da superfamília de receptores esteroides. Em *S. mansoni*, foram identificados membros de duas subfamílias desta superfamília: os receptores retinóides (RXR) e os receptores Fushi tarazu fator 1 (FTZ-F1) (Revisão em Wu and LoVerde, 2011).

Os receptores SmRXR1/SmNR1 regulam a transcrição do gene *Smp14*, codificador da principal proteína que compõe a casca do ovo do parasito, através do recrutamento de duas histonas acetiltransferases (SmGCN5 e SmCBP1) (Fantappié et al., 2008). A SmGCN5 é homóloga da proteína GCN5 (*Gender Control Nonrepressed*) de *Drosophila* e contém um domínio HAT (Histona Acetiltransferase). Essa proteína é capaz de acetilar as histonas H3 e H2A em experimentos *in vitro*, atuando no remodelamento da cromatina, além de conter um domínio de ligação a receptores nucleares (Maciel et al., 2004). A SmCBP1 é homóloga da proteína CBP (*CREB Binding Protein*), um coativador transcricional bastante conservado que também possui um domínio HAT e foi capaz de acetilar histonas *in vitro*, principalmente histonas H4 (Bertin et al., 2005). Em um trabalho recente, foi demonstrado que a acetilação dessas histonas e o remodelamento de cromatina são essenciais para a ativação de *Smp14*, uma vez que a inibição da atividade de acetiltransferase de SmCBP1 ou SmGCN5 por inibidores específicos ou por RNA de interferência levou a um efeito extremamente negativo na formação do ovo de *S. mansoni* (Carneiro et al., 2014).

Células CV-1 cotransfectadas mostraram que as proteínas SmFTZ-F1 e SmRXR1 são capazes de ativar a transcrição de genes repórter apenas se SmFTZ-F1 estiver fisicamente ligada ao promotor destes genes (Mendonça et al., 2002). Outro estudo mostrou que SmCBP1 pode interagir fisicamente com SmFTZ-F1 (Bertin et al., 2005). O mRNA de SmFTZ-F1 é expresso em todos os estágios de desenvolvimento do parasito com maior expressão em cercárias, esquistossômulos e vermes adultos. Devido a essas observações, existe a hipótese de que essa proteína poderia atuar na regulação de processos envolvidos na penetração e adaptação do parasito no hospedeiro definitivo (Mendonça et al., 2002).

1.7- O fator de transcrição SmZF1

Nosso grupo de trabalho vem buscando caracterizar a SmZF1, uma proteína inicialmente descrita com três motivos dedos de zinco do tipo C2H2 em sua estrutura, cujo cDNA parcial foi encontrado por acaso durante a triagem de uma biblioteca de cDNA de vermes adultos que buscava obter o cDNA completo para Sm13, uma proteína antigênica do tegumento de *S. mansoni* (Abath et al., 2000). A partir disso, Eleutério de Souza e colaboradores obtiveram a sequência completa de seu gene através da subclonagem e sequenciamento do cDNA e de fragmentos do DNA genômico de *S. mansoni*. Nesse trabalho, o gene que codifica para SmZF1 foi caracterizado e foi mostrado que o mesmo possui 2181 pb e três íntrons. O cDNA de SmZF1 possui 705 pb, que contém uma ORF de 492 pb, uma região 5' UTR de 52 pb e uma região 3' UTR de 161 pb. A partir de análises *in silico*, a sequência deduzida de aminoácidos dessa proteína foi definida como uma cadeia polipeptídica de 164 aminoácidos, com massa molecular teórica de aproximadamente 18,7 kDa. Durante a busca por homologia em bancos de dados, constatou-se que a SmZF1 apresenta cerca de 47% de similaridade com outras proteínas que contêm motivos do tipo dedos de zinco. Utilizando modelagem computacional, por comparação com a proteína Zif268 de camundongo, a estrutura tridimensional teórica de SmZF1 foi predita e verificou-se a presença de três motivos do tipo dedo de zinco da classe C2H2 (Eleutério de Souza et al., 2001).

A proteína recombinante SmZF1 foi então expressa e testada em ensaios de deslocamento da mobilidade eletroforética (EMSA) para investigar a especificidade da ligação de SmZF1 a oligonucleotídeos de DNA e RNA. Os resultados demonstraram que essa proteína se liga a DNA fita dupla e simples de maneira específica, além de se ligar ao RNA, porém com menor afinidade neste último caso. A sequência CGAGGGAGT, que foi predita *in silico* e que está presente no oligonucleotídeo D1-3DNA, foi o sítio de ligação de maior afinidade da SmZF1 (Calzavara-Silva et al., 2004).

Em 2009, Drummond e colaboradores realizaram experimentos de imunohistoquímica em vermes adultos (fêmeas e machos), cercárias e esquistossômulos para analisar o padrão de distribuição celular da SmZF1. As análises mostraram que essa proteína está presente no núcleo das células de todas essas fases do ciclo de vida do parasito, com exceção das fêmeas de vermes adultos. Foram também realizados experimentos de localização celular com células COS-7 de mamíferos expressando YFP (*Yellow Fluorescent Protein*)-SmZF1, e verificou-se que, quando expressa, SmZF1 migra para o núcleo dessas células. Adicionalmente, para avaliar a possível capacidade que SmZF1 possui de regular a transcrição gênica, as células COS-7 expressando

YFP-SmZF1 foram testadas em um sistema que utilizou a enzima luciferase como gene-repórter. O sistema continha o gene da luciferase *downstream* a um promotor mínimo e *upstream* a uma região de DNA que continha quatro cópias do melhor sítio de ligação para SmZF1 (D1-3DNA). Como resultado, observou-se que SmZF1 aumentou a transcrição do gene repórter, de maneira significativa, apenas quando o D1-3DNA estava presente (Drummond et al., 2009).

Bitar e colaboradores reportaram em 2013 uma inconsistência entre a sequência do cDNA de SmZF1 predita por Eleutério de Souza e colaboradores e a sequência codificadora de SmZF1, presente no banco de dados que contém as ESTs de *S. mansoni* (dbEST). O cDNA de SmZF1 foi então sequenciado e a inserção de uma citosina extra no último éxon do gene foi encontrada. A deleção da citosina revelou uma ORF diferente da anterior, possuindo agora 576 pb. A sequência C-terminal da SmZF1 também se mostrou diferente, o que alterou o número de aminoácidos para 191. Para confirmar o sítio de iniciação da transcrição e também o tamanho da região 5'UTR, foram realizados experimentos de RLM-RACE (RNA *Ligase-mediated Rapid Amplification of 5' and 3' cDNA ends*), o que permitiu verificar que essa região é de 34 pb, que é maior do que a sequência descrita anteriormente. Essa abordagem encontrou outra inconsistência na região *upstream* ao códon de início da tradução, onde faltava uma adenina na sequência predita anteriormente (Figura 5).

A estrutura tridimensional da nova cadeia polipeptídica de SmZF1 também foi analisada em maiores detalhes por modelagem molecular. (Figura 6A). Verificou-se então que a SmZF1 possui quatro motivos dedos de zinco do tipo C2H2, um a mais do que havia sido predito anteriormente (Figura 6B). Um dos motivos dedos de zinco se encontra mais distante dos outros três e é codificado pelo terceiro éxon, sendo mais provável que o mesmo realize interações com outras proteínas, enquanto os outros três motivos, codificados pelo quarto éxon do gene de SmZF1, interagem diretamente com o DNA (Bitar et al., 2013).

ATATTTGAGCGCAGCTACGACTGTGAACGAATCGGTT CAGT AAAAT GTT CAATTGTGCGCTGGAATCTATTGTGTAGACTTTAACT 87
 ATGGAATTTACTT CACATTGACTAAAAAGCTGAGCAAATATACCTGGAGCGTT CAGACTTTCAAGATGAACGAACCAACTGGTGT C 174
 M E F Y F T L T K K L S K Y T W S V Q T F K M N E P T G V 29
 GGGCCAACATTTGCTGATGCATGCGATGATGGCGAACTTATCAGCATTGTGTCTTTGTGGTAAAACGTTTTCAAGT CAGAGTCTT 261
 G P T F A D A C D D G E L I S I C C L C G K T F S S Q S L 58
 CTACACAACATTTTGAATTGATGCATGAAGGTACGGAAATAGAT ACT GAACAGTATGATCTAAGTGGATTGCCGCTATGGGGAAT 348
 L H K H F E L M H E G T E I D T E Q Y D L S G F A A M G N 87
 GAACAAGTCGTAAAAGT AATGGTGAAGAAGATGCAAATTTCCGAGTCTGAATTGTGCGTTTTGCAACAAAGTATTTACTAAACAC 435
 E Q G R K S N G E E D A N F R V L N C A F C N K V F T K H 116
 TGT AATTTAAACACACATATCAAAGCAGTCCAT AAAGGTGTAAAACCGTTTGAATGCACCTATTGTTAT AAAGGATTCAGT CGAAAT 522
 C N L N T H I K A V H K G V K P F E C T Y C Y K G F T R N 145
 TCTGATCTTCATAAGCACATCGACGCTGTT CACAAGGTCTCAAGCCTTTCCGGATGTGAAGTATGCCAGCGAAACTCTCTCAGAA 609
 S D L H K H I D A V H K G L K P F R M * 164
 G C E V C Q R N F S Q K 174
 ATCCAGCCTAAAACGACACATAGAAGCAATT CACGAAGATCCTCGGCATCGCTGAAGAGAAACCAGATTGTATAATCCTCTCCAATT 696
 S S L K R H I E A I H E D C R H R * 191
 TTCATATGATTT CATGTTCAAAAATATACATTTATTATTCTTTC 739

Figura 5 - Nova sequência do cDNA que codifica para a proteína SmZF1 e sua respectiva sequência deduzida de aminoácidos, que foram redefinidas a partir de novo sequenciamento e experimentos de RLM-RACE. A região 5' UTR adicionada pelos experimentos de RLM-RACE está marcada em amarelo. A adenina marcada em azul e a citosina marcada em vermelho indicam, respectivamente, a base que foi inserida e a base que foi deletada nesta sequência, quando comparada a sequência descrita por Eleutério de Souza et al., (2001). A nova região C-terminal, possuindo 29 aminoácidos adicionais originados da mudança de fase de leitura causada pela inserção de uma cisteína extra, está marcada na sequência de aminoácidos. (Bitar et al., 2013).

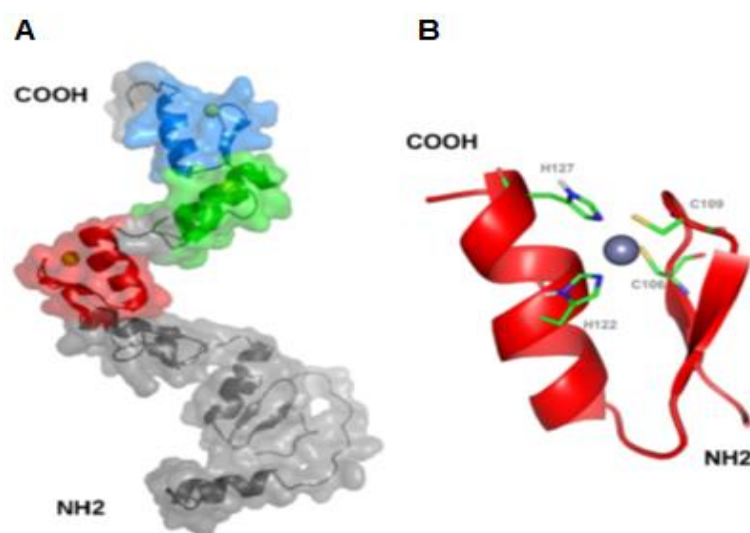


Figura 6 - Modelagem molecular de SmZF1. **A** - A estrutura tridimensional da SmZF1. Os motivos dedos de zinco que interagem com DNA estão coloridos de vermelho, verde e azul. **B** - Representação detalhada do terceiro motivo dedo de zinco a partir da região C-terminal da estrutura tridimensional de SmZF1, mostrando o zinco coordenado por dois resíduos de cisteína e histidina. (Bitar et al., 2013).

A partir da nova estrutura tridimensional definida para a SmZF1, iniciou-se uma busca pela sequência dos sítios de ligação ao DNA que seriam reconhecidos por SmZF1. Utilizando três abordagens de bioinformática para a predição de sítios de interação entre proteínas dedo de zinco e DNA (Kaplan et al., 2005; Cho et al., 2008; Liu and Stormo, 2008), três possíveis sítios foram gerados e então usados para a definição de uma sequência degenerada. A estabilidade da interação entre um possível sítio do DNA gerado *in silico* e entre os três dedos de zinco de SmZF1 que interagem com DNA foi então avaliada, de forma que a sequência ‘5-GCAGCGTAG-3’ foi predita como um provável sítio de ligação da SmZF1 (Figura 7) (Bitar et al., 2013).

A sequência gerada *in silico* e considerada como o sítio de DNA mais provável de interagir com a SmZF1 foi utilizada para encontrar, no genoma de *S. mansoni*, genes que possivelmente estariam sob o controle do fator de transcrição SmZF1. Um total de 415 genes foram então identificados como potenciais alvos da ação de SmZF1, dos quais 124 foram categorizados baseado em buscas por similaridade no banco de dados Gene Ontology (GO). Esses genes foram então classificados de acordo com a função molecular das proteínas codificadas por eles (Figura 8A), com os compartimentos celulares nos quais os seus produtos gênicos se encontram (Figura 8B) e com os processos biológicos dos quais essas proteínas participam (Figura 8C). Nessa análise verificou-se que aproximadamente um quarto desses genes estão envolvidos diretamente em mecanismos de desenvolvimento e reprodução do parasito (desenvolvimento larval e sucesso no desenvolvimento embrionário e eclosão dos ovos) (Bitar et al., 2013).

Dessa forma, os resultados obtidos nos trabalhos anteriores indicaram que a SmZF1 é um fator de transcrição possivelmente relacionado ao desenvolvimento do *S. mansoni*. O presente projeto foi proposto com o objetivo de continuar com a caracterização dessa proteína, relacionando a sua função à biologia desse parasito. Para isso, utilizamos a ferramenta de interferência por RNA (RNAi), pelo fato de que essa técnica tem possibilitado o aprofundamento de estudos sobre as funções de diversas proteínas em vários organismos, incluindo o *S. mansoni*.

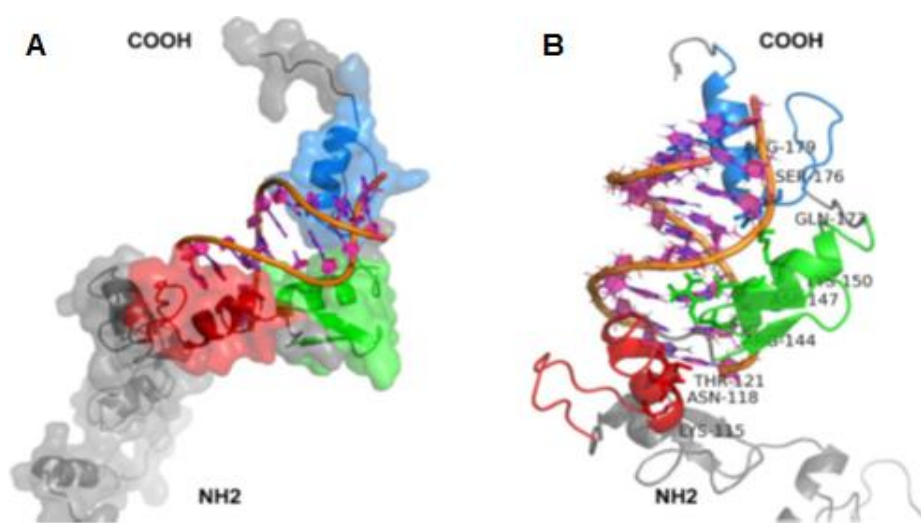


Figura 7 - Identificação de um possível sítio de interação entre uma sequência específica de DNA e a SmZF1 através de *docking*. Os cálculos de docking foram realizados através do software HADDOCK e o sítio do DNA utilizado para o cálculo foi gerado in silico. O esqueleto da molécula de DNA está representado em alaranjado e os três dedos de zinco que interagem com o DNA estão coloridos em azul, verde e vermelho. **A** - Interação entre três dedos de zinco de SmZF1 e DNA. **B** - Representação dos resíduos ativos na interação entre SmZF1 e DNA, mostrando os dedos de zinco com mais detalhes e evidenciando os elementos estruturais secundários de SmZF1. (Bitar et al., 2013).

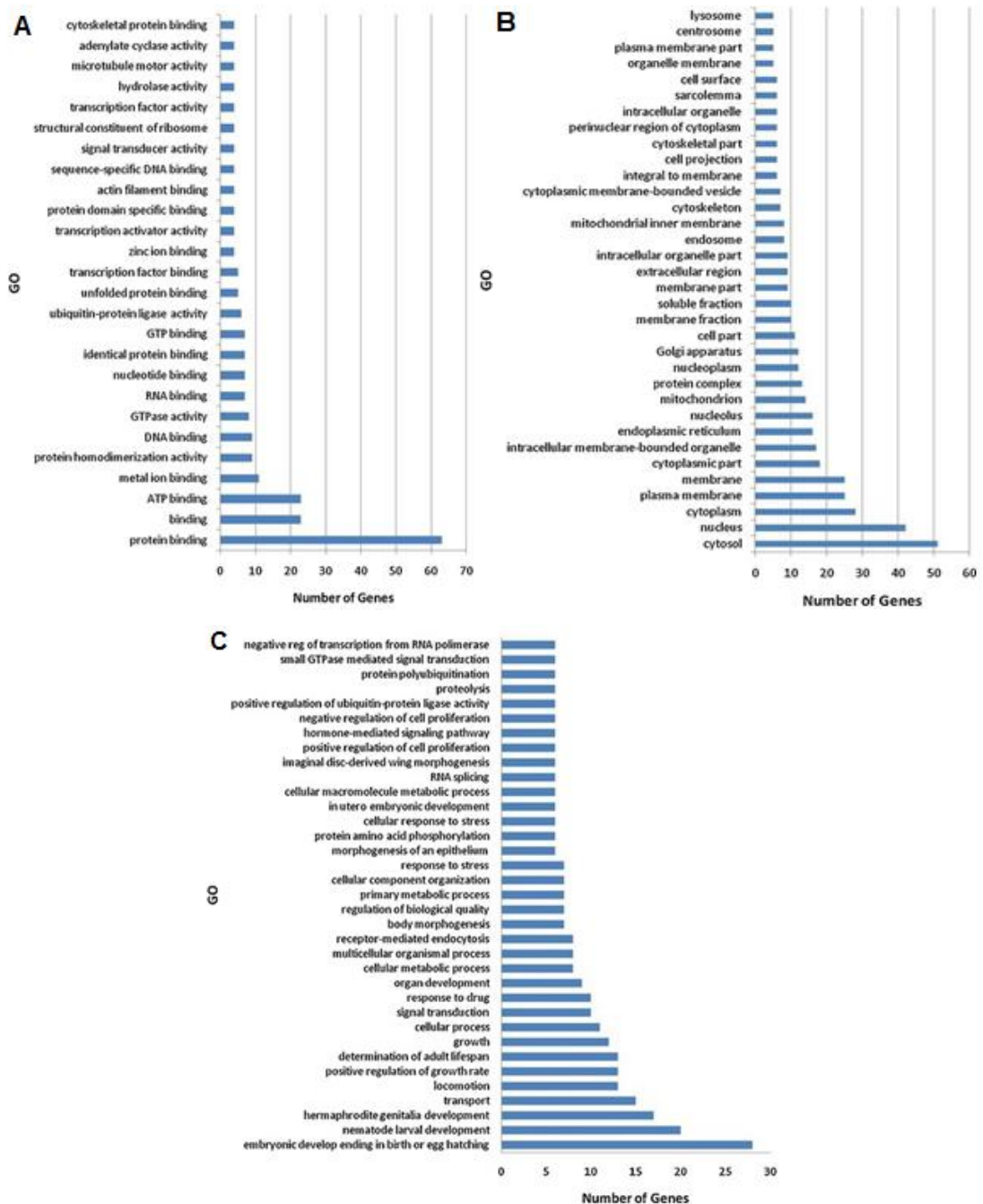


Figura 8 - Classificação dos genes contendo, em seus respectivos promotores, pelo menos um sítio de ligação para SmZF1. Os genes foram categorizados com base em buscas por similaridade no banco de dados Gene Ontology (GO) e classificados de acordo com a função molecular das proteínas codificadas por eles (A), bem como pelos compartimentos celulares (B) e processos biológicos associados a essas proteínas (C). (Bitar et al., 2013).

1.8- Interferência por RNA (RNAi)

A interferência por RNA é um mecanismo celular de silenciamento gênico pós-transcricional evolutivamente conservado, que utiliza um pequeno RNA antisense, para marcar os RNAs mensageiros (mRNAs) correspondentes para clivagem (Matzke and Birchler, 2005). As primeiras observações desse fenômeno deram origem a alguns trabalhos nos anos 90. Ao estudar petúnias na intenção de obter a cor púrpura mais intensa em suas pétalas, Napoli e colaboradores obtiveram um resultado inesperado em 1990, onde as plantas transgênicas resultantes do trabalho possuíam cores variadas ou nenhuma pigmentação. Devido à inserção de cópias extras do gene de uma enzima chave da síntese dos flavonóides responsáveis pela pigmentação púrpura, tanto esse mesmo gene, quanto genes endógenos tiveram sua expressão alterada devido a um fenômeno que foi chamado na época de co-supressão reversível.

Em 1991, Fire e colaboradores demonstraram que RNAs antisense podem atuar na expressão gênica, diminuindo os níveis dos transcritos de proteínas filamentosas do músculo de *C. elegans*. Em 1995, ainda em *C. elegans*, foi demonstrado que os RNAs senso são tão efetivos quanto os RNAs antisense para a diminuição da expressão gênica. (Guo and Kemphues, 1995). Em 1998, Fire e colaboradores demonstraram o fenômeno RNAi ao injetar dsRNA em *C. elegans*. O dsRNA se mostrou muito mais eficiente do que os RNAs senso ou antisense na diminuição da expressão de proteínas filamentosas. A técnica se mostrou específica e esse fenômeno ficou conhecido como interferência de RNA. Andrews Fire e Craig Mello foram laureados com o prêmio Nobel de fisiologia ou medicina em 2006 devido a esse trabalho (nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/).

Pesquisadores vem utilizando o RNAi como ferramenta alternativa devido às limitações que as ferramentas clássicas da genética podem apresentar. Uma das vantagens do RNAi, no caso da aplicação em parasitos, deve-se à dificuldade na obtenção de modelos de parasitos transgênicos em função da complexidade e das limitações associadas à manutenção *in vitro* de seus respectivos ciclos vida, além da complexidade da organização tecidual, no caso de parasitos multicelulares (Brindley and Pearce, 2007). Outra vantagem associadas a essa abordagem é que a mesma permite a realização de silenciamento gênico (*knockdown*) em larga escala de vários tipos de células e organismos (Mohr et al., 2014).

A maquinaria de RNAi funciona quando a célula é exposta a um dsRNA, que é processado no citoplasma pela DICER em pequenos dsRNAs de 21-25 pb, denominados siRNAs (*small interfering RNAs*). Uma das fitas do siRNA é seletivamente incorporada ao complexo RISC (*RNA-induced silencing complex*), que direciona a clivagem do mRNA

complementar. No núcleo, outra via acontece quando os miRNAs (uma família de pequenos RNAs com tamanho entre 21-25 pb) são inicialmente transcritos como miRNAs primários (pri-miRNAs), que são processados pela Drosha em miRNAs precursores de aproximadamente 70 pb (pré-miRNAs). Os pré-miRNAs são transportados para o citoplasma via Exportina 5 e são então processados pela DICER, como indicado na Figura 9 (He and Hannon, 2004).

A presença de transcritos que codificam para as proteínas DICER e Argonauta (proteína presente no complexo RISC) em *Schistosoma mansoni* mostrou que esse parasito possivelmente responderia a um dsRNA via RNAi (Verjovski-Almeida et al., 2003). Skelly e colaboradores mostraram em culturas de esquistossômulos de *S. mansoni* o *knockdown* da Catepsina B1 (SmCB1), uma cisteína-protease relacionada com a digestão da hemoglobina do hospedeiro, utilizando um dsRNA específico para SmCB1 (Skelly et al., 2003).

Devido às suas vantagens quando comparada a outras técnicas, a ferramenta RNAi vem sendo largamente empregada para manipular a expressão gênica em diversas fases do ciclo de desenvolvimento do *S. mansoni*: ovos (Rinaldi et al., 2009), esporocistos (Boyle et al., 2003; Dingirard and Yoshino, 2006; Mourão et al., 2009), esquistossômulos (Štefanić et al., 2010; Andrade et al., 2014; Guidi et al., 2015) e vermes adultos (Freitas et al., 2007; Morales et al., 2008; Guidi et al., 2015).

Nesse contexto, pretendemos neste estudo utilizar a ferramenta de RNAi com o objetivo de iniciarmos a caracterização do papel da proteína SmZF1 associado ao desenvolvimento e reprodução do parasito *S. mansoni* no hospedeiro vertebrado.

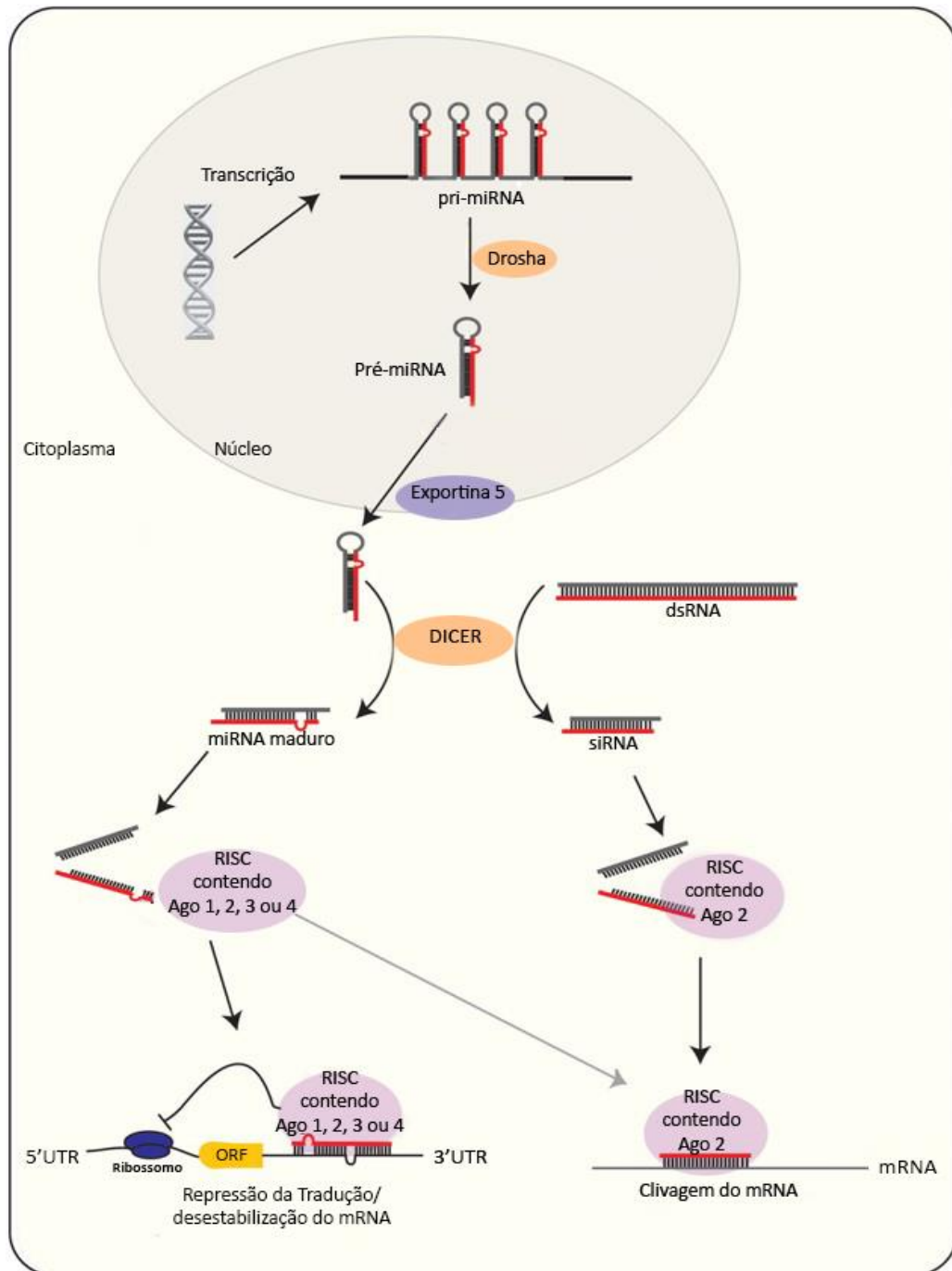


Figura 9 - Esquema ilustrativo da via de RNAi. Pri-miRNAs são transcritos no núcleo e processados pela Drosha em pré-miRNAs (aproximadamente ~70 nucleotídeos). Os pré-miRNAs são então exportados via Exportina 5 e processados em miRNAs maduros pela Dicer. dsRNAs também são processados pela Dicer em siRNAs. Os miRNAs ou siRNAs são então agregados ao complexo RISC e agem em seus respectivos alvos ao se ligarem tanto na região 3'-UTR, causando a repressão da tradução, quanto no alvo complementar, induzindo a sua posterior clivagem. Os principais componentes do complexo RISC são as proteínas da família Argonauta (Ago). As Ago 1, 2, 3 e 4 são capazes de causar repressão da tradução e desestabilização do mRNA, mas apenas a Ago 2 possui atividade endonucleásica, capaz de clivar o mRNA alvo. (Modificado de Kelly and Hurlstone, 2011).

2. Objetivos

2.1- Objetivo geral

Estudar o papel da proteína SmZF1 de *S. mansoni* associado à reprodução e ao desenvolvimento do parasito no hospedeiro vertebrado através do silenciamento de seu transcrito por Interferência de RNA (RNAi).

2.2- Objetivos específicos

- Silenciar o transcrito de SmZF1 em esquistossômulos de *S. mansoni* pelo tratamento com o RNA dupla fita (dsRNA) de SmZF1;
- Validar e quantificar o silenciamento do transcrito de SmZF1 por PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR);
- Avaliar se o tratamento com o dsRNA de SmZF1 induziria alterações inespecíficas na expressão de outros genes que não a própria SmZF1;
- Quantificar através de RT-qPCR os níveis de transcritos de genes que possivelmente seriam regulados pela SmZF1, após o silenciamento dos transcritos que codificam para essa proteína;
- Avaliar possíveis alterações fenotípicas em esquistossômulos submetidos ao tratamento com o dsRNA de SmZF1;
- Verificar se o silenciamento de SmZF1 alteraria a carga parasitária de *S. mansoni* no hospedeiro vertebrado;
- Avaliar se o silenciamento de SmZF1 persiste nos vermes adultos obtidos pela infecção de camundongos com esquistossômulos silenciados;
- Analisar o perfil histopatológico dos fígados dos camundongos infectados com esquistossômulos silenciados para SmZF1.

3. Material e Métodos

3.1- Interferência por RNA (RNAi) – Experimentos *in vitro*

3.1.1- Desenho de iniciadores para as reações de PCR e RT-qPCR

3.1.1-a Iniciadores para a amplificação do DNA molde utilizado na síntese dos dsRNAs

Os dsRNA dos genes GFP (*Green Fluorescent Protein*) (GenBank: KM593907.1) e mCherry (*Red Fluorescent Protein*) (GenBank: AY678264.1) foram selecionados para realização de um controle inespecífico, isto é, não direcionado ao mRNA de SmZF1. Para realizarmos o *knockdown* do transcrito de SmZF1, foi utilizado um dsRNA específico, produzido a partir da sequência que codifica para esta proteína (GenBank: AAG38587). O controle inespecífico é utilizado para demonstrar que a expressão gênica do organismo de estudo não é alterada pela presença de dsRNAs exógenos, garantindo a especificidade do silenciamento dos transcritos de SmZF1 através da introdução de um dsRNA específico para os transcritos dessa proteína. O primeiro passo necessário para síntese dos dsRNAs é a amplificação das sequências de DNA molde de cada um dos alvos citados, com a adição do sítio promotor da RNA polimerase T7 nas extremidades de cada amplicon. Para isso, foram utilizados iniciadores contendo a sequência do promotor da RNA polimerase T7 nas suas extremidades 5'. Os iniciadores para a síntese de dsRNA para GFP e SmZF1 foram desenhados pela Dr^a. Marina Mourão e o par de iniciadores para amplificarmos a sequência de mCherry foi obtido a partir de Štefanić et al., (2010) (Quadro 1). Todos os iniciadores foram desenhados para amplificarem fragmentos entre 400-800 pb. Além disso, os iniciadores utilizados na síntese do dsRNA de SmZF1 foram desenhados de forma a se anelarem especificamente na sequência codificadora desta proteína, não reconhecendo, portanto, nenhum outro sítio no cDNA deste parasito.

Quadro 1 - Sequência dos iniciadores utilizados para a amplificação do DNA molde para a síntese dos dsRNAs.

Iniciador 5'-3'	Iniciadores para a geração de DNA molde para as reações de dsRNA - Sequência	Tamanho do Fragmento
SmZF1 Senso 5'	<u>GGATCCTAATACGACTCACTATAGGATGGAATTT</u> ACTTCACA	554 pb
SmZF1 Anti-senso 3'	<u>GGATCCTAATACGACTCACTATAGGCTGGCATACT</u> TCACAT	
mCherry Senso 5'	<u>TAATACGACTCACTATAGGGCATCGTGTGGTTCTT</u> GTTGG	751 pb
mCherry Anti-senso 3'	<u>TAATACGACTCACTATAGGGATTTGGGAAATCGGC</u> ATACA	
GFP Senso 5'	<u>TAATACGACTCACTATAGGGTCTTCAGTCCGCCAT</u> G	400 pb
GFP Anti-senso 3'	<u>TAATACGACTCACTATAGGGTGCTCAGGTAGTGGT</u> TGTC	

*Os segmentos dos iniciadores sublinhados constituem o sítio da RNA Polimerase T7.

3.1.1-b Iniciadores utilizados nos ensaios de RT-qPCR para a validação do silenciamento dos transcritos de SmZF1

A validação do silenciamento dos transcritos de SmZF1 foi feita através de reações de RT-qPCR (PCR quantitativo em tempo real). Para isso foram utilizados iniciadores, previamente desenhados pela Dr^a. Marina Mourão, específicos para os transcritos da SmZF1 e do controle endógeno, a proteína SmCOX1 (subunidade 1 do Citocromo Oxidase C de *Schistosoma mansoni*) (GenBank: AF216698) (Quadro 2). Vale ressaltar que os oligonucleotídeos anelavam em uma região externa àquela utilizada para realizar a síntese do dsRNA, de forma a evitar a quantificação dos dsRNAs durante a verificação do silenciamento pelos ensaios de RT-qPCR.

Para a avaliação do efeito *off-target*, isto é, o silenciamento de transcritos que não são alvos específicos para os dsRNAs introduzidos, foi desenhado um par de iniciadores para o transcrito da proteína Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) de *S. mansoni* (GenBank: M92359.1), além de termos utilizado dois outros pares de iniciadores, previamente desenhados pela Dr^a. Marina Mourão, sendo um deles específico para o transcrito da proteína alfa-Tubulina de *S. mansoni* (GenBank: M80214.1) e o outro para o transcrito da proteína

SMYB1 (*Y-box protein 1* de *S. mansoni*) (GenBank: U39883.1) (Quadro 2). Os genes GAPDH e alfa-Tubulina foram escolhidos por representarem genes de expressão constitutiva. Já o gene que codifica para a SMYB1, uma proteína que está envolvida no controle da expressão gênica em *S. mansoni*, foi escolhido para este tipo de análise por pertencer a mesma categoria funcional do gene que codifica para a SmZF1. Os iniciadores utilizados nos ensaios de RT-qPCR foram desenhados através do programa Primer Express Software v3.0.1 (*Thermo Fisher Scientific*). Em seguida, os valores de ΔG de formação de estruturas em grampo e de hétero ou homodímeros envolvendo os iniciadores então desenhados foram considerados através do programa OligoAnalyzer 3.1 (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>). Adicionalmente, os iniciadores foram analisados quanto à sua especificidade por pesquisa de similaridade utilizando o algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) contra banco de dados de ESTs do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Quadro 2 - Sequência dos iniciadores utilizados nos experimentos de RT-qPCR.

Iniciador 5'-3'	Iniciadores para a realização dos experimentos de RT-qPCR - Sequência	Tamanho do Fragmento
GAPDH Senso 5'	ACGGAAAATTAACGGGAATGG	65 pb
GAPDH Anti-senso 3'	TGTCAGATCAACGACTGAAACGT	
Alfa-Tubulina Senso 5'	CAAATGGGAAATGCTTGTTG	106 pb
Alfa-Tubulina Anti-senso 3'	TGAACGAGTCATCACCCACT	
SmCOX1 Senso 5'	TACGGTTGGTGGTGTACAG	152 pb
SmCOX1 Anti-senso 3'	ACGGCCATCACCATACTAGC	
SmZF1 Senso 5'	ACTTCTCTCAGAAATCCAGCCT	97 pb
SmZF1 Anti-senso 3'	TGGAGAGGATTATACAATCTGGTT	
SMYB1 Senso 5'	ACTTGCAGCACACTGGATTG	82 pb
SMYB1 Anti-senso 3'	GACGTGCGAACTGAGGAAGG	
Smp_030710 Senso 5'	AAGTACGGCTCAGCGATGGT	66 pb
Smp_030710 Anti-senso 3'	AGCAGAAAGGCACAGATAATCAA	

Smp_065180 Senso 5'	ACTTCTCAGGTGTTATCGAGTGGTT	69 pb
Smp_065180 Anti-senso 3'	TGTGGGCGTCAAAAAGCA	

3.1.1-c Escolha de genes possivelmente regulados por SmZF1 e desenho de iniciadores

Como descrito no item 1.7, os genes que possuem o sítio de interação com a SmZF1 em sua região promotora foram descritos por Bitar e colaboradores (2013). A partir disso, escolhemos para o desenho de iniciadores dois genes que possuem 2 sítios de ligação de SmZF1 em sua região promotora: (1) o gene Smp_030710, codificador para a Serina/Treonina Proteína Fosfatase (GenBank: CCD59124.1), uma enzima relacionada com diversos processos celulares como organização dos microtúbulos, apoptose e reparo de DNA; e (2) o gene Smp_065180, que codifica para a proteína *EH Domain containing/past-1-related* de *S. mansoni* (GenBank: CCD77695), uma proteína de ligação à ATP que atua no controle da reorganização da membrana celular, além de estar relacionada com o transporte endocítico.

Os iniciadores utilizados nos ensaios de RT-qPCR foram desenhados com a utilização do programa Primer Express Software v3.0.1 (*Thermo Fisher Scientific*), os valores de ΔG e a possibilidade de formação de estruturas em grampo e dímeros dos iniciadores desenhados foram calculados através do programa OligoAnalyzer 3.1 e analisados quanto à sua especificidade pelo BLAST contra o banco de dados de ESTs do NCBI (Quadro 2).

3.1.2- Amplificação dos DNAs molde e síntese dos dsRNAs

A amplificação dos DNAs molde foi realizada utilizando o kit *Platinum Taq DNA Polymerase* (*Invitrogen – Life Technologies*), segundo o protocolo sugerido pelo fabricante: 1,5 μL de MgCl_2 (concentração final de 1,5 mM), 1 μL de dNTP (concentração final de 0,2 mM), 0,2 μL Taq DNA polymerase (concentração final 0,02 U/ μL), 5 μL de 10X PCR Buffer (200 mM Tris HCl pH 8.4, 500 mM KCl) (concentração final de 1X), 0,2 μL iniciadores a 10 pmol (concentração final de 200 nM), água (quantidade suficiente para completar 50 μL) e, por fim, 1 μL (~5-10 ng) dos plasmídeos contendo as sequências de SmZF1, GFP e mCherry clonadas. As reações de PCR foram então realizadas no termociclador Veriti 96-well (*Applied Biosystems*) com o seguinte programa de amplificação: desnaturação inicial a 94°C por 2 min, 35 ciclos desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 55°C por 30 s e extensão a 72°C por 1 min e 30 s, além da extensão final a 72°C por 10 min.

Após a amplificação, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1% (p/v) corado com brometo de etídeo e a imagem foi digitalizada através de um transluminador (*Transluminador UV 302 nm – T26M, BioAgency*) acoplado a uma câmera fotográfica. Os produtos amplificados foram excisados do gel e purificados através do kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (*GE Healthcare*), utilizando as recomendações do fabricante. Seguiu-se com a dosagem do produto de amplificação em um espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (*Thermo-Fisher Scientific*).

Para a síntese dos dsRNAs de GFP, mCherry e SmZF1 foi utilizado o kit T7 RiboMAX™ Express RNAi System (*Promega*), segundo as recomendações do fabricante, com algumas modificações. Para cada reação de síntese de dsRNA foram adicionados 8 µL do produto de PCR gerado anteriormente (~80 ng/µL), 2 µL de Enzyme Mix T7 Express (concentração final de 0,1 U/µL) e 10 µL de RiboMAX™ Express T7 2X Buffer (concentração final de 1X). Com o intuito de aumentar a concentração final de dsRNA, as reações foram deixadas a 37°C por 16 h. Após esse período, o dsRNA de cada reação foi precipitado com etanol 70% (v/v), centrifugado a 10000 g por 2 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol 95% (v/v). O precipitado foi então ressuspensionado em água livre de nucleases e dosado em um espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (*Thermo-Fisher Scientific*).

3.1.3- Obtenção dos parasitos e transformação mecânica de cercárias em esquistossômulos

Os parasitos utilizados nesse trabalho são da espécie *S. mansoni* cepa LE. As cercárias foram provenientes do Moluscário do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR/FIOCRUZ) e gentilmente cedidos pela Dra. Liana Konovaloff Jannotti Passos (Laboratório de Helmintoses Intestinais), para a realização dos experimentos.

Após a obtenção das cercárias, seguiu-se com o protocolo modificado de transformação mecânica das mesmas em esquistossômulos, segundo Ramalho-Pinto et al., (1974). As cercárias foram distribuídas em alíquotas de 50 mL e incubadas por 1 hora no gelo. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 110 g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. O sedimento de cada tubo foi então lavado com aproximadamente 2 mL de meio MEM (*Minimum Essential Medium Eagle – Sigma-Aldrich*) contendo 1% de penicilina/estreptomicina e o conteúdo de cada um dos 3 tubos foi homogeneizado e passado para um tubo de 15 mL. Os conteúdos dos tubos de 15 mL foram então passados 3 vezes em uma seringa contendo uma agulha com o calibre de 22G, para a quebra das caudas das cercárias. Após esse procedimento, os volumes restantes nos tubos foram colocados em um frasco de cultura estéril e incubados por 1 h a 37°C

em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade. Passado o período de incubação, o conteúdo do frasco foi transferido para um tubo estéril e deixado por 7 minutos para sedimentação. O sobrenadante foi então removido, adicionou-se aproximadamente 7 mL de meio MEM contendo 1% de penicilina/estreptomicina, e, após homogeneização, a amostra foi deixada novamente por 7 minutos para sedimentação. O sobrenadante foi removido novamente e esse passo foi repetido por mais 6 vezes com tempos de sedimentação cada vez menores (6 min, 5 min e 4 min). Após a última etapa de sedimentação, o material foi ressuspensionado em 1 mL de meio MEM. A amostra foi homogeneizada e foram retiradas alíquotas de 10 µL em triplicata para a contagem de esquistossômulos presentes em microscópio invertido com aumento de 10x. Após a contagem, os parasitos foram mantidos a 37 °C em estufa com 5% de CO₂ e 95% de umidade em uma concentração de aproximadamente 1,7x10³ parasitos/mL.

3.1.4- Exposição dos esquistossômulos aos dsRNAs

Aproximadamente 5x10³ esquistossômulos foram colocados em 3 mL de meio MEM suplementado com meio *Schneider* (5%), hipoxantina (5x10⁻⁷ M), triiodotironina (2x10⁻⁷ M), hidrocortisona (1x10⁻⁶ M), MEM vitaminas (0,5%), soro fetal bovino - *Sigma* (1%) e penicilina/estreptomicina (1%) na presença ou ausência de 100 nM de cada dsRNA utilizado (GFP, mCherry e SmZF1).

3.1.5- Análises morfométricas dos esquistossômulos expostos ao dsRNA

Para as análises morfométricas, os esquistossômulos foram cultivados na presença ou ausência de dsRNA, como descrito no item 3.1.4, por sete dias. Com o intuito de verificar se houve alterações fenotípicas nesses parasitos durante a exposição aos dsRNAs, foram avaliadas possíveis alterações no tegumento, aumento nas taxas de mortalidade e mudanças no crescimento dos parasitos. As culturas foram diariamente observadas e as imagens dos esquistossômulos foram registradas utilizando uma câmera de alta resolução *Axiocam MRC Ver.3 (Carl Zeiss)* acoplada a um microscópio invertido *Axio Observer (Carl Zeiss)*. Para a realização das análises morfométricas, fotos de três campos de cada poço foram retiradas aleatoriamente durante 6 dos 7 dias de tratamento com o dsRNA.

Após os ensaios, a área (µm²) dos esquistossômulos fotografados foi avaliada utilizando-se o programa *AxionVision Release 4.8*. As áreas dos esquistossômulos tratados com o dsRNA de SmZF1 foram comparadas às áreas dos parasitos pertencentes aos grupos controle inespecífico (tratados com os dsRNAs de GFP/mCherry) e controle negativo (cultivados da

ausência de qualquer dsRNA). Para a análise estatística dos dados, o teste Kruskal-Wallis foi utilizado, seguido do teste Dunn para comparações múltiplas.

3.2- Avaliação dos níveis de transcritos de SmZF1 e de genes possivelmente regulados por essa proteína e verificação de possíveis efeitos *off-target* decorrentes da exposição ao dsRNA específico para SmZF1

3.2.1- Extração e tratamento do RNA total

Para padronizarmos o tempo de exposição dos esquistossômulos ao dsRNA de SmZF1 e assim garantirmos a maior eficiência possível de silenciamento de seus transcritos, os esquistossômulos foram cultivados durante sete dias na presença e ausência dos dsRNAs *scrambled* (GFP/mCherry) e de SmZF1, de onde foram extraídos os RNAs do primeiro, segundo, terceiro, quinto e sétimo dia de tratamento. Após a avaliação dos níveis de transcritos em todos esses dias, as extrações de RNA subsequentes foram realizadas somente no dia onde foi verificado o maior silenciamento do transcrito de SmZF1. Também foram realizadas as extrações de RNA dos vermes adultos obtidos a partir de perfusão de camundongos infectados com esquistossômulos silenciados para o transcrito de SmZF1.

As extrações de RNAs foram realizadas pelo método do TRIzol (*Invitrogen – Life Technologies*). Para tal, aproximadamente 1×10^3 parasitos foram transferidos para microtubos e centrifugados. O sobrenadante foi retirado e 100 μ L de TRIzol foi adicionado para a maceração dos parasitos com o auxílio de um pistilo. Em seguida, foram adicionados 900 μ L de TRIzol e as amostras mantidas por 10 min à temperatura ambiente. Foi então acrescentado 200 μ L de clorofórmio, seguido de 2-3 min de agitação das amostras. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 12000 g por 15 min a 4°C, onde as fases aquosa, interfase e fase orgânica foram separadas. A fase aquosa, na qual se encontra o RNA, foi transferida para um microtubo novo onde foi também adicionado 0,5 mL de isopropanol 100%. As amostras foram então homogeneizadas, deixadas por 10 min a temperatura ambiente e centrifugadas a 12000 g por 10 min a 4°C. Após essa etapa, o sobrenadante foi retirado e ao pellet foi adicionado 1 mL de etanol 75%. As amostras foram então submetidas a uma breve agitação em um vórtex e centrifugadas a 7500 g por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi retirado e o pellet foi deixado por 10 min secando a temperatura ambiente, para a eliminação máxima do etanol restante. Finalmente, o pellet foi ressuscitado em 30 μ L de água livre de RNases.

Para a eliminação do DNA genômico presente nas amostras de RNA, as amostras foram tratadas com DNase duas vezes utilizando o kit TURBO DNA-free™ DNase (*Ambion – Life Technologies*), conforme manual do fabricante. Por último, a concentração do RNA tratado foi

mensurada por meio de um espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (*Thermo-Fisher Scientific*).

3.2.2- Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA a partir do RNA extraído e tratado como descrito acima, foi utilizado o kit SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (*Invitrogen- Life Technologies*), segundo as instruções do fabricante. Para cada reação de volume final igual a 20 µL foram adicionados às amostras de RNA 1 µL de oligo (dT) (concentração final de 2,5 µM), 1 µL de hexâmeros aleatórios (concentração final de 2,5 ng/µL), 1 µL de dNTPs (concentração final de 0,5 mM) e água para um volume final de 10 µL, seguida de posterior incubação à 65°C por 5 min. Imediatamente após, as amostras foram colocadas no gelo e acrescidas de 4 µL de tampão 5X (250 mM Tris-HCl, pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂) (concentração final de 1X), 2 µL de DTT (concentração final de 10 mM) e 1 µL de RNase-Out (2 U/µL) (*Invitrogen- Life Technologies*) e 1 µL de SuperScript III (2 U/mL). A reação foi então incubada a 50 °C por 50 min e depois a 80°C por 15 min. Finalmente, 1 µL de RNase H foi adicionado para remoção da fita de RNA do híbrido RNA-DNA, sendo incubado a 37°C por 20 min. Ao término, as amostras foram armazenadas a -20°C para posterior utilização.

3.2.3- Ensaios de RT-qPCR

Para avaliar a eficiência dos iniciadores e a concentração dos mesmos a ser utilizada, ensaios de verificação de sua eficiência foram realizados seguindo as diretrizes do MIQE (Bustin et al., 2009). Para isso, os iniciadores desenhados para a análise do nível dos transcritos de cada gene estudado deviam apresentar eficiência similar a dos iniciadores específicos para o gene normalizador (SmCOX1). A validação foi feita através da análise da variação do C_T (*Threshold cycle*) com diluição seriada (1:2) da curva padrão com cinco quantidades diferentes do cDNA de esquistossômulos – 50 ng, 25 ng, 12,5 ng, 6,25 ng, 3,125 ng – e quatro concentrações finais diferentes para cada um dos iniciadores, 200 nM, 400 nM, 600 nM e 800nM. A avaliação da eficiência da amplificação foi feita pela análise da inclinação da curva da equação de regressão linear, resultante da relação entre a variação dos C_{Ts} gerados pelas amostras e suas respectivas concentrações, sendo analisados os valores dos seguintes parâmetros: coeficiente de regressão (R²), inclinação (entre -3,5 e -3,1) e eficiência da curva padrão. Para verificarmos a especificidade dos iniciadores, as curvas de dissociação também foram avaliadas.

Após a padronização dos iniciadores, os cDNAs dos esquistossômulos tratados ou não com os dsRNAs *scrambled* e de SmZF1 foram analisados por RT-qPCR, para avaliarmos os níveis de transcritos de SmZF1 nesses parasitos. Para as reações de RT-qPCR, foram utilizados iniciadores específicos para SmZF1 e SmCOX1, sendo que este último foi utilizado como o gene normalizador. Todas as reações de RT-qPCR foram conduzidas em triplicata técnica.

Para cada reação foram utilizados 12,5 µL de SYBR GREEN PCR Master Mix (*Applied Biosystems*), cerca de 100 ng de cDNA, o volume de cada iniciador foi utilizado a fim de atingir as seguintes concentrações finais: 200nM para os iniciadores específicos para SmZF1, 400 nM para os iniciadores específicos para Smp_065180 e Smp_030710 e 600 nM para os iniciadores específicos para GAPDH, alfa-Tubulina e SmCOX1, e água para completar 25 µL por reação. Em cada placa havia também um controle negativo, contendo todos os reagentes para a RT-qPCR, exceto o cDNA. As reações foram realizadas no aparelho ViiA™ 7 Real-Time PCR System (*Life Technologies*) e os resultados obtidos foram analisados pelo programa ViiA 7 Software v1.2 (*Life Technologies*).

Os experimentos para a avaliação de *off-targets*, bem como os experimentos para avaliar os genes que possivelmente são alvos de regulação por SmZF1, foram realizados utilizando os cDNAs em que a RT-qPCR, feito como descrito acima, confirmou o silenciamento do transcrito de SmZF1. Dessa forma, as amostras de cDNA do controle negativo (cDNAs dos esquistossômulos que não receberam nenhum tipo de tratamento em cultura), dos tratados com o dsRNA inespecífico e dos tratados com dsRNA específico para SmZF1 foram novamente submetidas à RT-qPCR, para avaliarmos se o silenciamento de SmZF1 alteraria a expressão de outros genes que a princípio não estariam relacionados a ela, tais como aqueles que codificam para GAPDH, alfa-tubulina e SMYB1. Para cada reação foi utilizado 2,5 µL de SYBR GREEN PCR Master Mix (*Applied Biosystems*), cerca de 50 ng de cDNA, o volume de cada *primer* conforme sua concentração padronizada e água para completar 5 µL por reação. Em cada placa havia também um controle negativo, contendo todos os reagentes para a RT-qPCR, exceto o cDNA. As reações foram realizadas no aparelho 7900HT Fast Real-Time PCR System (*Applied Biosystems*) e os resultados foram analisados no programa 7900 SDS v2.4.1 (*Applied Biosystems*).

A expressão relativa foi analisada através do método do $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak and Schmittgen, 2001), no qual os valores C_T de cada amostra são subtraídos do C_T do normalizador (SmCOX) (ΔC_T). Em seguida, os valores correspondentes ao ΔC_T encontrado para cada amostra é subtraído do ΔC_T normalizado. Os níveis de expressão de cada gene dos grupos de parasitos tratados com dsRNA específico para SmZF1 e inespecífico (GFP ou mCherry) foram

comparados com os níveis de expressão de transcritos do mesmo gene em parasitos do controle negativo. A significância dos resultados foi verificada através do teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido do teste Dunn para comparações múltiplas.

3.3- Experimentos *in vivo*

3.3.1- Infecção de camundongos com esquistossômulos silenciados para os transcritos de SmZF1 e recuperação dos vermes adultos

Após o tratamento dos esquistossômulos durante três dias como descrito no item 3.1.3, cerca de 200 parasitos foram ressuspensos em 0,2 mL de meio de cultura MEM suplementado e inoculados em dose única, na região dorsal e com aplicação subcutânea, em camundongos Swiss (*Mus musculus*). Um total de doze camundongos foi dividido em dois grupos de seis animais para a infecção: o primeiro grupo foi infectado com os esquistossômulos cultivados em meio sem presença de dsRNA (Controle Negativo), e o segundo foi infectado com esquistossômulos tratados com o dsRNA específico para SmZF1 (SmZF1). Os animais foram mantidos no biotério por um período de 47 dias e eutanasiados por deslocamentocervical. A perfusão dos camundongos foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido por Pellegrino et al. (1956), onde os vermes adultos foram recuperados e os fígados de cada camundongo retirados para contagem de ovos e análises histopatológicas. Após a perfusão, os vermes adultos recuperados de cada camundongo foram contados e ao final foi feita a análise estatística visando comparar o número de parasitos entre os grupos “Controle Negativo” e “SmZF1”. Foram realizados dois experimentos de infecção independentes para a geração dos resultados. A significância dos resultados foi realizada utilizando o teste estatístico Mann-Whitney (Wilcoxon sum of ranks).

3.3.2- Análise de ovoposição – Contagem de ovos em fígados de camundongos infectados com parasitos silenciados para o transcrito de SmZF1

Após a perfusão, os fígados retirados de cada camundongo foram pesados e alocados em tubos com 50 mL de KOH 10% (p/v), onde ficaram por 16 h a 4 °C e, em seguida, incubados a 37 °C por 1 h. Os tubos foram centrifugados por 5 min a 450 g e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi ressuspensado com salina 0,85% para lavagem. Esta etapa foi repetida por mais duas vezes. Depois da última centrifugação, o sedimento foi ressuspensado em 1 mL de salina 0,85% e o número de ovos presentes em cada amostra foi contado em triplicatas de alíquotas

de 10 µL em um microscópio de luz com aumento de 10x. A significância dos resultados foi avaliada através do teste Mann-Whitney (Wilcoxon sum of ranks).

3.3.3- Análises Histopatológicas

3.3.3-a Coloração dos cortes Histológicos

Fragmentos do lobo esquerdo de fígado de animais infectados por *S. mansoni* foram cuidadosamente retirados e lavados em solução salina 0,85% (pH 7,2) e posteriormente fixados em formaldeído tamponado. Após 48 horas de fixação, todo o material foi colocado em álcool 70% e, em seguida, desidratado progressivamente em séries crescentes de álcool (de 70% a absoluto), clarificado em xilol e embebido em parafina. A seguir foram realizados cortes de 4 µm de espessura, que foram desparafinizados em xilol, hidratados em séries decrescentes de álcool (absoluto à 70%) e corados com hematoxilina. Após essa coloração, as lâminas passaram por lavagem em água corrente e foram então coradas com tricrômico de Gomori (TG). Essa técnica a permite a identificação do tecido conjuntivo fibroso, uma vez que o TG indica o processo de neoformação de colágeno pela tonalidade azul. Após a imersão por 15 minutos em solução de TG, os cortes foram lavados em água corrente, desidratados novamente em álcool e levados à estufa a 56°C para secagem e posterior montagem das lâminas com lamínulas. As lâminas preparadas de secções do fígado foram analisadas ao microscópio óptico, para a observação das lesões e da deposição de fibras colágenas.

3.3.3-b Análise Quantitativa de Granulomas

Para realizar as análises histopatológicas desse trabalho foram analisados três parâmetros: área de fibrose, área dos granulomas e número de granulomas por mm² de tecido hepático. Os cortes histológicos corados pelo tricrômico de Gomori foram visualizados pela objetiva de 20x para digitalização de trinta imagens aleatórias através da microcâmera TK-1270/RGB (JVC). Foram considerados os granulomas que continham apenas um ovo de *S. mansoni* bem definido e que não estivessem com infiltrado inflamatório. A área de cada granuloma foi obtida pelo software KS300 (Carl Zeiss). Já a área de fibrose dos granulomas foi calculada através da seleção de pixels com tons de azul (gerados pela coloração com TG) na imagem real, com subsequente criação de uma imagem binária e processamento digital, operação esta que foi realizada pelo mesmo software. A metodologia empregada para o imageamento microscópico, segmentação de imagens e definição das condições de morfometria é a descrita por Caliari (1997). O número de granulomas de cada camundongo dos dois grupos infectados foi contado

em um microscópio Axiolab (*Carl Zeiss*), utilizando a objetiva de 10x. Todos os cortes foram digitalizados através da *scanner Lide 110 (Canon)* e, através do software KS300, as áreas de tecido hepático foram mensuradas. Para as análises estatísticas, o número de granulomas de cada corte foi normalizado com o número de granulomas do menor corte de tecido hepático. Para a análise dos resultados e verificação de sua significância, o teste estatístico Mann-Whitney (Wilcoxon sum of ranks) foi utilizado.

4. Resultados

4.1- Síntese dos dsRNAs

A realização dos experimentos de RNAi iniciou-se com a síntese dos dsRNAs de SmZF1, mCherry e GFP, por transcrição *in vitro*, a partir do produto da PCR dos plasmídeos contendo suas respectivas sequências codificadoras. Posteriormente, cada dsRNA foi purificado, dosado e analisado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Verificou-se que os três dsRNAs sintetizados possuíram o tamanho esperado: o dsRNA de SmZF1 apresentou um tamanho aproximado de 554 pb, o de mCherry apresentou aproximadamente 751 pb e o dsRNA de GFP possui cerca de 400 pb (Figura 10).

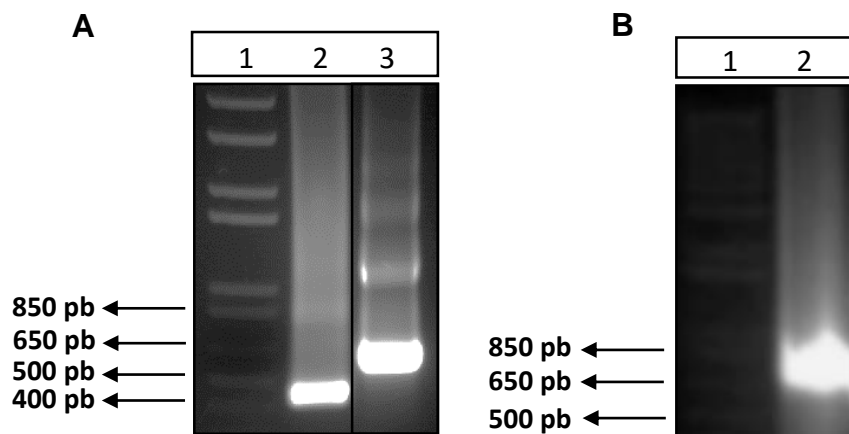


Figura 10 - Análise dos dsRNAs de SmZF1 e dos controles inespecíficos mCherry e GFP, através de gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. A - Canaleta 1: Padrão de peso molecular (1 kb Plus DNA Ladder - Invitrogen); Canaleta 2: dsRNA de GFP; Canaleta 3: dsRNA de SmZF1. B - Canaleta 1: Padrão de peso molecular (1 kb Plus DNA Ladder - Invitrogen); Canaleta 2: dsRNA de mCherry.

4.2- Análise do silenciamento dos transcritos de SmZF1 em cultura de esquistossômulos

4.2.1- Análises dos níveis dos transcritos de SmZF1 nos esquistossômulos tratados com dsRNA SmZF1-específico

Todos os iniciadores utilizados nesse trabalho foram devidamente padronizados para possuir eficiência similar e assim permitir a utilização do método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak and Schmittgen, 2001). O controle endógeno utilizado na normalização dos transcritos foi o SmCOX1 e a concentração ideal encontrada para a máxima eficiência de seu iniciador foi de 600 nM, onde a curva padrão gerada apresentou uma inclinação de -3,46 e coeficiente de determinação da reta (R^2) igual a 0,995, calculando assim uma eficiência de aproximadamente 95% (Figura 1A do Anexo). Também foram analisadas as curvas amplificação e de dissociação para avaliar a especificidade do iniciador (Figuras 1B e 1C do Anexo) (Ririe et al., 1997).

Para o par de iniciadores específico para o transcrito de SmZF1, a concentração ideal, para que sua eficiência fosse máxima e similar à eficiência de SmCOX1 (acima de 90%), foi de 200 nM (Figura 2A do Anexo). Nessa concentração, a inclinação da curva padrão foi de -3,38, a eficiência calculada foi de aproximadamente 98% e o R^2 foi igual a 0,999. As curvas de amplificação e dissociação também foram analisadas (Figuras 2B e 2C do Anexo). Dessa forma, os iniciadores foram devidamente validados e, portanto, utilizados para a realização dos ensaios de RT-qPCR, que foram necessários para confirmação do silenciamento dos transcritos de SmZF1 através da ferramenta de RNAi.

Para realizarmos a cinética de silenciamento dos transcritos de SmZF1 em *S. mansoni*, esquistossômulos da cepa LE foram obtidos e cultivados, como descrito nos itens 3.1.3 e 3.1.4, na ausência ou presença dos dsRNAs inespecíficos (GFP e mCherry) e específico (SmZF1) para os transcritos de SmZF1, durante 7 dias. A validação do silenciamento induzido pelo RNAi foi realizada por RT-qPCR, a partir dos cDNAs obtidos pela extração do RNA total dos parasitos tratados com os dsRNAs descritos acima. Durante 1, 2, 3, 5 e 7 dias de exposição ao dsRNA de SmZF1, os níveis de silenciamento do mRNA de SmZF1 foram de, respectivamente, 47%, 58%, 69%, 68% e 46%, quando o grupo experimental “SmZF1” foi comparado ao grupo “Controle Negativo”. Observou-se que após o terceiro dia de tratamento com o dsRNA de SmZF1, o transcrito alvo obteve seu maior nível de silenciamento (69%), alcançado durante os dias avaliados, sendo que este foi o único dos dias em que apresentou diferença significativa quando comparado aos dois grupos controles (Figura 11). Os níveis de transcritos de SmZF1 foram avaliados nos três grupos experimentais e comparados entre si. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de mRNA de SmZF1 entre os grupos “Controle” e “Scrambled”.

Consideramos como silenciamento satisfatório quando, no grupo “SmZF1”, os níveis de transcritos de SmZF1 se mostraram significativamente diferentes dos grupos “Controle Negativo” e “*Scrambled*”. Além disso, a comparação dos níveis de transcrito de SmZF1 entre os grupos “*Scrambled*” e “Controle Negativo” deveria mostrar diferença não significativa, de forma a validar o silenciamento específico de SmZF1 nos esquistossômulos. Esse resultado somente foi alcançado no terceiro dia de tratamento e, devido a isso, os experimentos subsequentes foram realizados com esquistossômulos deixados em cultura na presença dos dsRNAs por 3 dias.

O silenciamento dos transcritos de SmZF1 através de RNAi foi reproduzido em três experimentos independentes, em duplicata técnica, e a expressão relativa dos transcritos de SmZF1 foi então analisada. Desta forma, observamos que os transcritos de SmZF1 não voltaram a apresentar um silenciamento de ~69%, como encontrado anteriormente, alcançando uma diminuição de 54% (Figura 12).

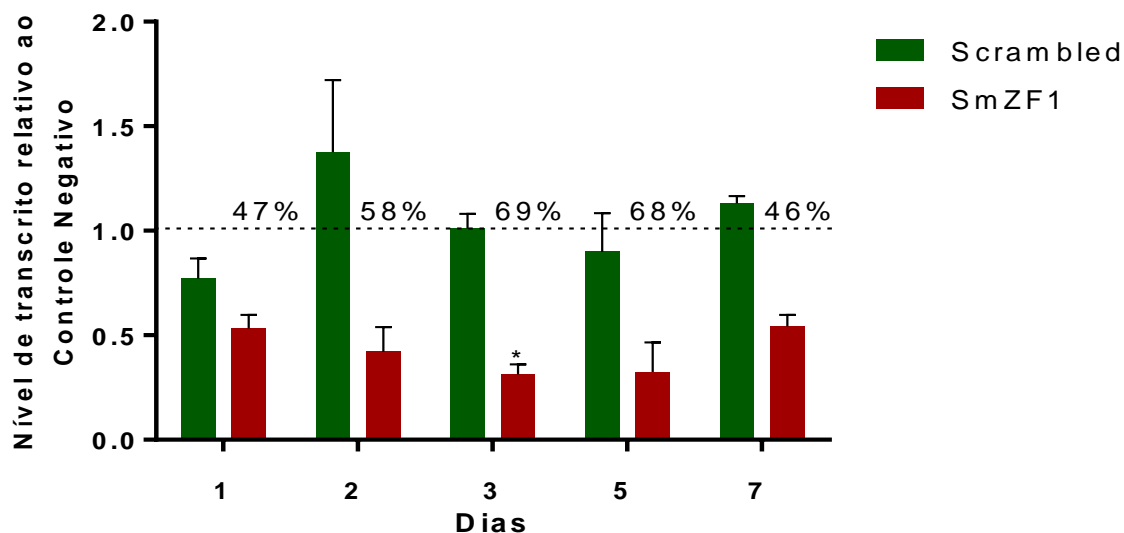


Figura 11 - Cinética de silenciamento dos transcritos de SmZF1 nos grupos tratados com os dsRNAs de SmZF1 e inespecífico (*Scrambled*). As barras indicam os níveis de mRNA de SmZF1 de esquistosômulos tratados com os dsRNAs de SmZF1 (barras vermelhas) e *Scrambled* (barras verdes), em relação aos níveis de mRNA de SmZF1 do grupo “Controle Negativo” e em função do tempo de tratamento (1, 2, 3, 5 e 7 dias). As barras representam a média de dois experimentos de silenciamento independentes, em que os níveis dos transcritos foram medidos em triplicata técnica por RT-qPCR. O teste Kruskal-Wallis e o teste Dunn para comparações múltiplas foram utilizados para as análises estatísticas ($P < 0,05$; $n = 4$). O asterisco (*) indica que os níveis de transcritos de SmZF1 foram significativamente menores que os dos dois grupos controles (Controle Negativo e *Scrambled*) ($*P < 0,05$). As barras representam o erro padrão e a linha pontilhada representa o nível normalizado de transcritos do grupo “Controle Negativo”. Os números acima das colunas vermelhas indicam a porcentagem de silenciamento de SmZF1 no grupo tratado com o dsRNA específico para os transcritos de SmZF1 relativo ao grupo “Controle Negativo” em cada dia de tratamento.

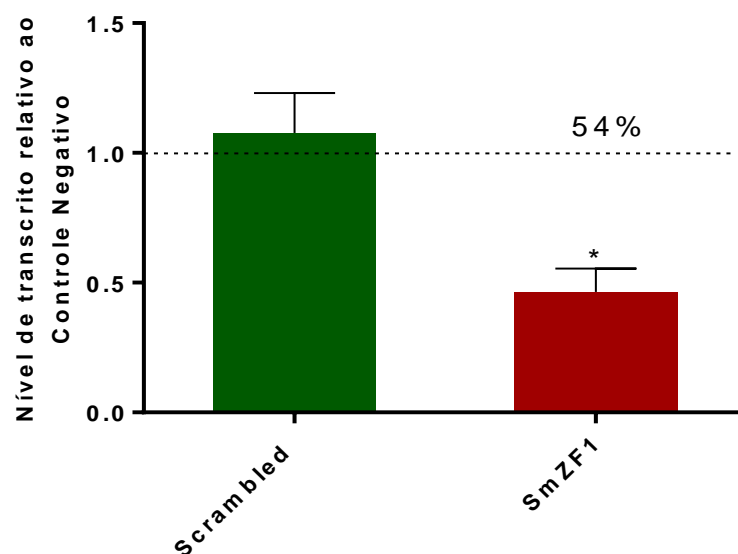


Figura 12 - Nível de transcritos de SmZF1 nos esquistossômulos tratados por 3 dias com os dsRNAs inespecíficos (*Scrambled*) e de SmZF1. Níveis de transcritos de SmZF1 em esquistossômulos tratados até o terceiro dia de cultura com os dsRNAs de SmZF1 (barras vermelhas) e Scrambled (barras verdes). As barras representam a média de três experimentos de silenciamento independentes em que os níveis dos transcritos foram medidos em triplicata técnica por RT-qPCR. O teste Kruskal-Wallis foi utilizado para as análises estatísticas, seguido do teste de comparações múltiplas Dunn ($P < 0,05$; $n = 6$). O asterisco (*) indica que os níveis de transcritos de SmZF1 foram significativamente menores que os dos dois grupos controles (Controle Negativo e Scrambled) ($*P < 0,05$). As barras representam o erro padrão e a linha pontilhada representa o nível normalizado de transcritos do grupo “Controle Negativo”. O número acima da coluna vermelha indica a porcentagem de silenciamento com relação ao “Controle Negativo”.

4.2.2- Avaliação de efeito *off-target* nos experimentos de RNAi

Durante a realização de experimentos de RNAi existe a possibilidade de ocorrer o efeito *off-target*, isto é, o silenciamento de transcritos que não são alvos específicos para o dsRNA introduzido, o que pode desencadear fenótipos falso-positivos no organismo de estudo. O efeito *off-target* é um efeito indesejável e de certa forma comum em experimentos de RNAi, sendo uma das limitações dessa técnica. No intuito de avaliar se a introdução dos dsRNAs utilizados nesse trabalho geraram alterações dessa natureza nos esquistossômulos tratados, mensuramos os níveis de transcritos de 3 genes, sendo 2 de expressão constitutiva, a Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e a alfa-Tubulina de *S. mansoni*, e um codificador para a proteína SMYB1, uma proteína envolvida na expressão gênica desse parasito.

Os iniciadores dos genes GAPDH, alfa-Tubulina e SMYB1 de *S. mansoni* foram desenhados, como descrito no item 3.1.1-b, e padronizados, como descrito no item 3.2.3, para alcançar a maior eficiência possível. A concentração padronizada para esses 3 iniciadores foi de 600 nM. Vale ressaltar que, uma vez que os ensaios de RT-qPCR realizados para a avaliação de efeitos *off-target* foram realizados em um aparelho de RT-PCR diferente do aparelho utilizado para a análise da cinética de silenciamento, o iniciador para SmCOX1 (controle normalizador) foi novamente padronizado, desta vez mostrando uma eficiência maior em uma concentração de 800 nM. As curvas padrão, curvas de amplificação e de dissociação de todos os iniciadores utilizados na avaliação de *off-targets* estão em anexo (Figura Anexo 3-6).

A avaliação de *off-targets* foi realizada após o tratamento dos esquistossômulos com os dsRNAs de SmZF1 e *Scrambled* por 3 dias, mostrando um silenciamento de ~54% dos transcritos de SmZF1 com relação ao grupo “Controle Negativo” (item 4.2.2). Os resultados mostraram que nenhum dos três alvos selecionados foi alterado significativamente pela presença dos dsRNAs inespecíficos ou específicos para os transcritos de SmZF1 (Figura 13).

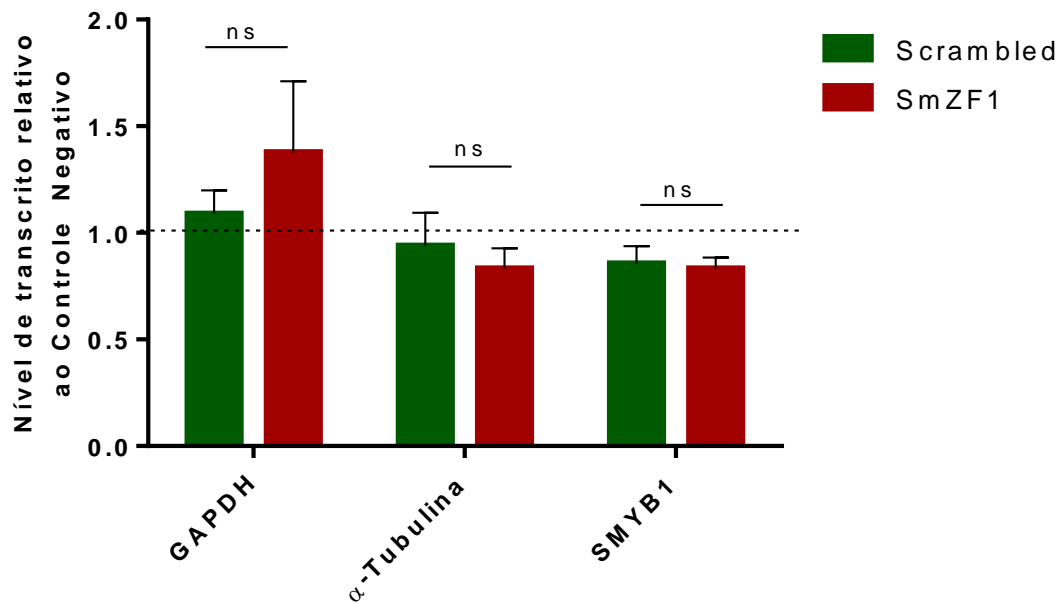


Figura 13 - Níveis de transcritos de GAPDH, alfa-tubulina e SMYB1 nos esquistossômulos tratados com os dsRNAs de SmZF1 e Scrambled. Níveis de transcritos de GAPDH, alfa-tubulina e SMYB1 em esquistossômulos tratados com os dsRNAs de SmZF1 (barras vermelhas) e Scrambled (barras verdes) por 3 dias. As barras representam a média de três experimentos de silenciamento independentes, em que os níveis dos transcritos foram medidos em triplicata técnica. O teste Kruskal-Wallis foi utilizado para as análises estatísticas, seguido do teste Dunn de comparações múltiplas ($P < 0,05$; $n = 3$). As barras representam o erro padrão e a linha pontilhada representa o nível normalizado de transcritos do grupo “Controle Negativo”. ns = não significativo.

4.2.3- Avaliação dos níveis de transcritos de dois genes que possivelmente são alvos de regulação da SmZF1 durante os experimentos de RNAi

A proteína SmZF1 é um fator de transcrição que possuiria potenciais sítios de interação nas regiões promotoras de vários genes relacionados com o desenvolvimento e a reprodução do parasito *S. mansoni*, podendo atuar no controle da expressão desses genes (Bitar et al., 2013). Para avaliarmos se o silenciamento de SmZF1 alteraria a expressão desses genes, medimos os níveis de mRNA de dois genes que possuem 2 sítios de ligação de SmZF1 em sua região promotora (Figuras 9 e 10 do Anexo), nos parasitos silenciados para SmZF1. Dos genes que possuem prováveis sítios de ligação à SmZF1 e que foram escolhidos para esta análise, um deles é identificado no banco de dados do NCBI como Smp_030710, codificando para uma serina/treonina fosfatase relacionada com diversos processos celulares, tais como como organização dos microtúbulos, apoptose e reparo de DNA; e o outro gene é identificado como Smp_065180, que codifica para uma proteína que, contém um domínio EH, relacionado ao homólogo PAST1 de humanos; é capaz de se ligar ao ATP, atua no controle da reorganização da membrana celular e está relacionada ao transporte endocítico.

Dessa forma, foram realizados ensaios de RT-qPCR, para medir os níveis de transcritos dos genes Smp_065180 e Smp_030710, após o silenciamento dos transcritos de SmZF1 em esquistossômulos. Os iniciadores desenhados para os dois transcritos foram padronizados como descrito no item 3.2.3, de modo que a concentração encontrada, para que ambos atuem com máxima eficiência, foi a de 400 nM. O normalizador utilizado foi novamente o SmCOX1. As curvas padrão, curvas de amplificação e de dissociação dos dois iniciadores podem ser vistas nas figuras 5 e 6 do anexo. No entanto, quando os níveis de mRNA de Smp_065180 e Smp_030710 foram analisados nos parasitos silenciados e não silenciados para SmZF1, não foi observada nenhuma alteração significativa no nível desses transcritos (Figura 14). Portanto, a diminuição dos níveis de SmZF1 não afetou significativamente a expressão gênica de nenhum dos dois transcritos avaliados.

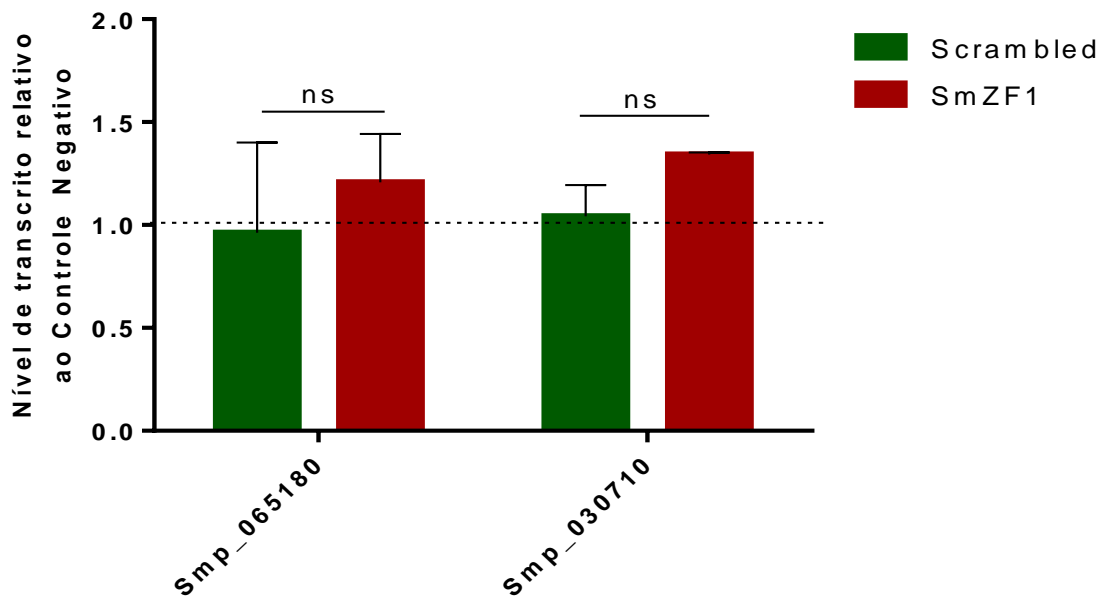


Figura 14 - Níveis de transcritos dos genes Smp_065180 e Smp_030710 nos esquistossômulos cultivados na presença e ausência dos dsRNAs de SmZF1 e Scrambled. Níveis de transcritos de Smp_065180 e Smp_030710 em esquistossômulos tratados com os dsRNAs de SmZF1 (barras vermelhas) e Scrambled (barras verdes) por 3 dias. Os resultados obtidos foram estatisticamente analisados através do teste Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas Dunn ($P < 0,05$; $n = 3$). As barras verdes e vermelhas representam a média de três experimentos de silenciamento independentes, em que os níveis dos transcritos foram medidos em triplicata técnica. As barras representam o erro padrão e a linha pontilhada representa o nível normalizado de transcritos no grupo “Controle Negativo”. ns = não significativo.

4.3- Análises morfométricas dos esquistossômulos expostos à dsRNA

Para avaliarmos se a SmZF1 é uma proteína essencial para a sobrevivência e o desenvolvimento do parasito, analisamos o desenvolvimento de esquistossômulos cultivados *in vitro*, durante o silenciamento dos transcritos de SmZF1.

Assim, esquistossômulos foram cultivados na ausência ou presença dos dsRNAs específicos para os transcritos de SmZF1 e *Scrambled*. Durante o cultivo, os parasitos foram observados todos os dias e imagens de três campos distintos e aleatórios de cada poço foram capturadas nos dias 1, 2, 3, 4, 5 e 7 (Figura 15A, B e C).

Nenhum fenótipo claro foi detectado nos esquistossômulos expostos aos dsRNAs utilizados nesses experimentos. Visto que o silenciamento dos transcritos de SmZF1 se mostrou eficiente durante a cinética de silenciamento, esse resultado nos indica que provavelmente esta não é uma proteína absolutamente essencial para a viabilidade dos esquistossômulos *in vitro*. A fim de verificarmos alterações fenotípicas menos perceptíveis, as áreas (em μm^2) dos esquistossômulos tratados com os dsRNAs *Scrambled* e de SmZF1 foram avaliadas conforme descrito no material e métodos (Seção 3.1.5) (Figura 15D).

Como indicado no gráfico da Figura 16, verificou-se que, no segundo dia de tratamento com o dsRNA de SmZF1, os esquistossômulos apresentaram uma medida de área significativamente menor do que os parasitos dos respectivos grupos controles. Essa diferença não se manteve no terceiro dia, mas voltou a ser significativa no quarto dia de cultura, onde os esquistossômulos do grupo “SmZF1” apresentaram área menor, quando comparados aos parasitos do grupo “Controle Negativo”, mas não quando comparados ao grupo “*Scrambled*”.

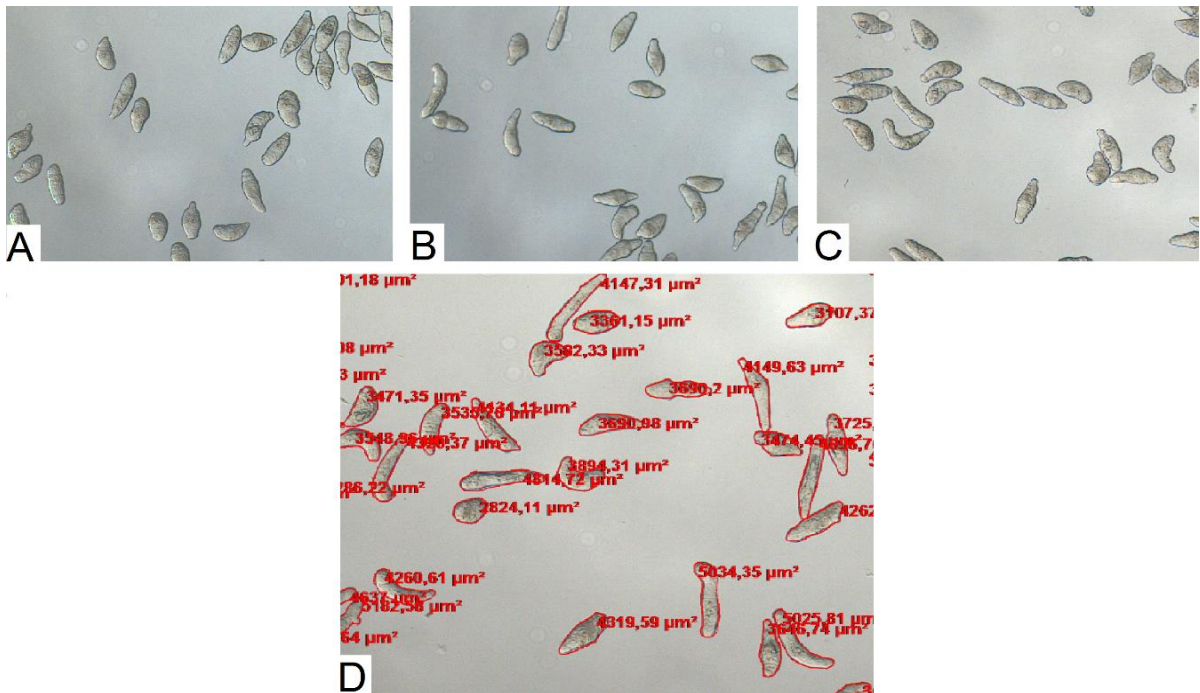


Figura 15 - Imagens representativas de esquistossômulos tratados por 2 dias com os dsRNAs *Scrambled* e de *SmZF1*. As imagens foram obtidas em microscópio invertido no aumento 5x dos 3 grupos de esquistossômulos analisados. **A** - Esquistossômulos do grupo “Controle Negativo”. **B** - Parasitos expostos ao dsRNA “Scrambled”. **C** - Parasitos tratados com o dsRNA de *SmZF1*. **D** - Parasitos contornados (em vermelho) manualmente através do software AxionVision Release 4.8 para a obtenção de suas respectivas áreas em μm^2 .

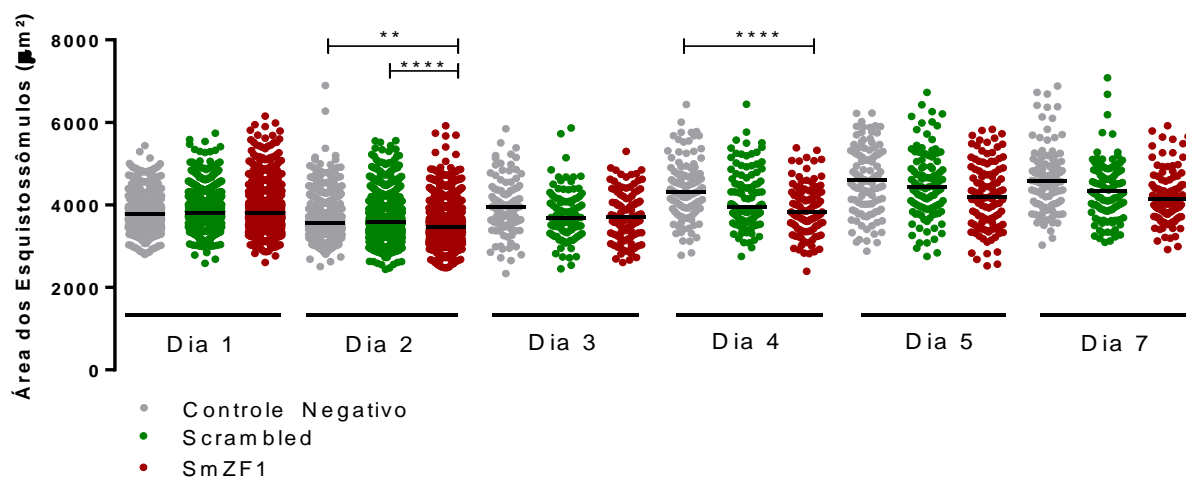


Figura 16 - Área dos esquistossômulos cultivados na ausência e presença dos dsRNAs *Scrambled* e de *SmZF1*. As áreas de cerca de 100 esquistossômulos expostos ao dsRNA específico para os transcritos de *SmZF1* foram analisadas e comparadas às áreas dos parasitos dos grupos “Controle Negativo” e “Scrambled”. Cada símbolo representa a área de um único verme dos grupos experimentais “Controle Negativo” (círculos cinzas), “Scrambled” (círculos verdes) e “SmZF1” (círculos vermelhos). O gráfico representa dois experimentos independentes realizados em duplicata e analisados pelo teste Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas Dunn ($P < 0,01$; $n = 108$). Os grupos de esquistossômulos tratados com o dsRNA de *SmZF1*, que apresentaram alteração significativa da área dos parasitos quando comparados ao grupo “Controle Negativo” e ao grupo “Scrambled,” estão indicadas com asteriscos. As barras horizontais pretas representam a mediana da área da população amostrada. ** e **** indicam $P < 0,01$ e $P < 0,0001$, respectivamente.

4.4- Investigação do papel biológico de SmZF1 - Experimentos *in vivo*

4.4.1- Recuperação dos vermes adultos resultantes da infecção de camundongos com esquistossômulos silenciados para SmZF1

Seguimos este estudo com a investigação do papel biológico da proteína SmZF1 no desenvolvimento e reprodução do parasito *S. mansoni* no hospedeiro vertebrado, já que possuímos embasamento para acreditar que essa proteína está diretamente envolvida com tais processos. Para isso, nossa estratégia consistiu em infectar camundongos com esquistossômulos silenciados para os transcritos dessa proteína e, por conseguinte, avaliar se os parasitos foram ainda capazes de se desenvolver em vermes adultos.

Cerca de 200 esquistossômulos cultivados na presença do dsRNA específico para os transcritos de SmZF1 e ausência do mesmo foram então inoculados em camundongos machos da linhagem Swiss. Após o período de infecção de 47 dias, os camundongos foram eutanasiados e a perfusão para recuperação dos vermes adultos foi realizada. O número de vermes machos e fêmeas foram contados separadamente a fim de analisar possíveis alterações sexo-específicas causadas pelo silenciamento dos transcritos de SmZF1 (Figura 17), e o número total de vermes foi agrupado para avaliação do desenvolvimento do parasito *S. mansoni* e de sua capacidade em estabelecer a infecção no hospedeiro vertebrado (Figura 18). As análises carga parasitária mostraram que o número de vermes adultos fêmeas foi reduzido em ~74%, enquanto o número de vermes machos adultos diminuiu ~70%, quando o grupo de camundongos infectados com esquistossômulos silenciados para os transcritos de SmZF1 foi comparado ao respectivo grupo controle.

Portanto, o número total de vermes adultos recuperados do grupo experimental “SmZF1” foi significativamente menor que o número de vermes recuperados do grupo “Controle Negativo”, mostrando que a infecção foi reduzida em aproximadamente 72% quando esquistossômulos silenciados para os transcritos de SmZF1 foram utilizados para infectar camundongos.

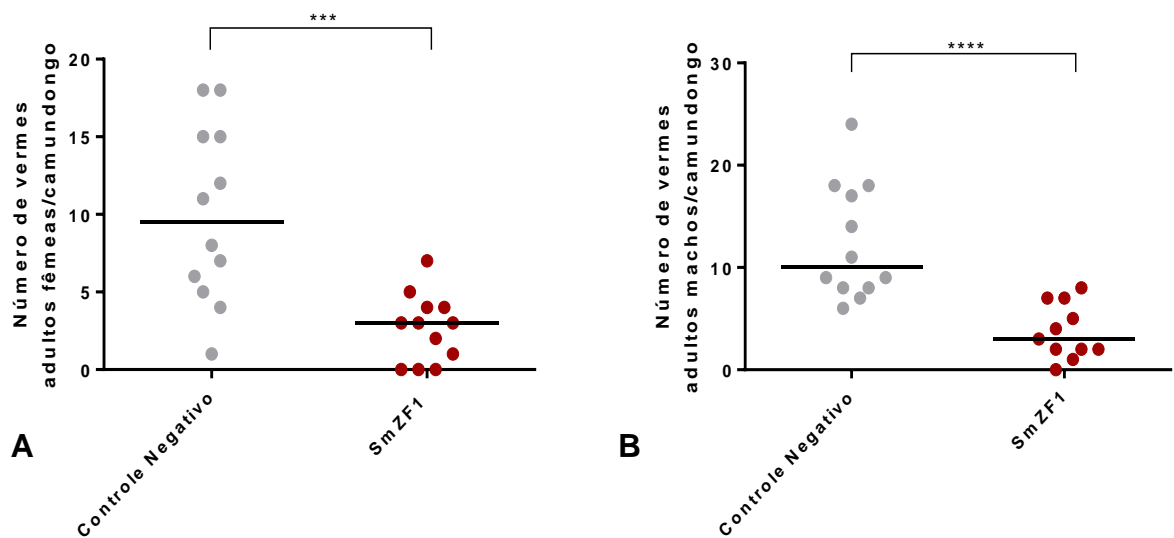


Figura 17 - Contagem de vermes adultos de cada gênero recuperados da perfusão de camundongos infectados com parasitos silenciados e não silenciados para os transcritos de SmZF1. O número de vermes adultos fêmeas (**A**) e machos (**B**), que foram recuperados de cada camundongo pertencente aos respectivos grupos “Controle Negativo” (círculos cinzas) e “SmZF1” (círculos vermelhos) está plotado nos gráficos acima, conforme indicado. A barra horizontal representa a mediana do número de vermes total para cada grupo experimental e os asteriscos indicam que os valores diferem significativamente. *** indica $P < 0,001$ e **** indica $P < 0,0001$. Estes resultados foram obtidos a partir de dois experimentos independentes, analisados pelo teste estatístico Mann-Whitney (Wilcoxon sum of ranks) ($P < 0,05$; $n = 12$).

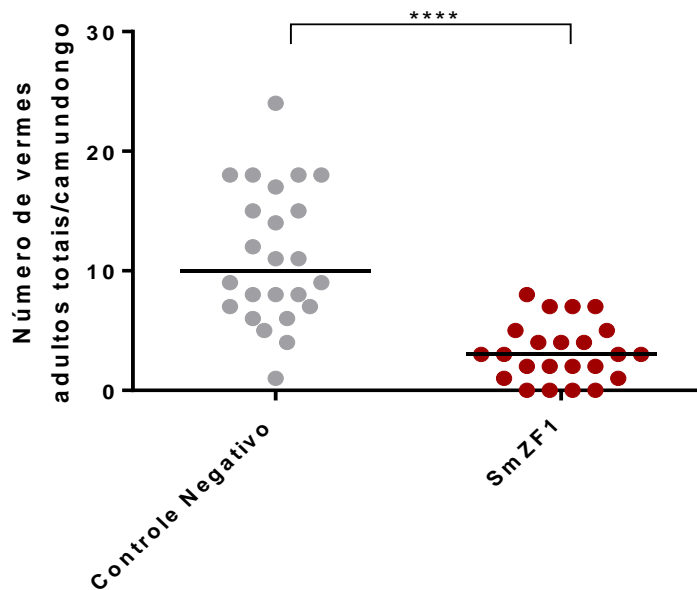


Figura 18 - Contagem de vermes adultos totais recuperados da perfusão de camundongos infectados com esquistossômulos silenciados e não silenciados para os transcritos de SmZF1. Os símbolos representam o número de vermes adultos recuperados para cada camundongo, onde o grupo “Controle Negativo” é representado por círculos cinzas e o grupo “SmZF1” por círculos vermelhos. A barra horizontal representa a mediana do número de vermes total para cada grupo experimental e os asteriscos indicam que os valores diferem significativamente. **** indica $P < 0,0001$. Estes resultados foram obtidos a partir de dois experimentos independentes, que foram analisados pelo teste estatístico Mann-Whitney (Wilcoxon sum of ranks) ($P < 0,05$; $n = 24$).

4.4.2- Avaliação por RT-qPCR dos níveis de transcritos de SmZF1 em vermes adultos recuperados dos camundongos infectados com esquistossômulos silenciados

No intuito de verificar se o silenciamento dos transcritos de SmZF1 nos esquistossômulos utilizados para infectar camundongos persistiria após o desenvolvimento desses parasitos em vermes adultos, os níveis de transcritos de SmZF1 nos vermes adultos dos grupos experimentais “Controle Negativo” e “SmZF1” foram avaliados através de ensaios de RT-qPCR (Figura 19). Os resultados demonstram que não houve a permanência do silenciamento dos transcritos de SmZF1 nos vermes adultos resultantes da infecção de camundongos com esquistossômulos silenciados e que os níveis de SmZF1 voltaram a se igualar aos dos vermes do grupo “Controle Negativo”. Portanto, nossos resultados indicam que o efeito do RNAi contra os transcritos de SmZF1 não se estendeu ao longo do desenvolvimento do parasito no hospedeiro vertebrado.

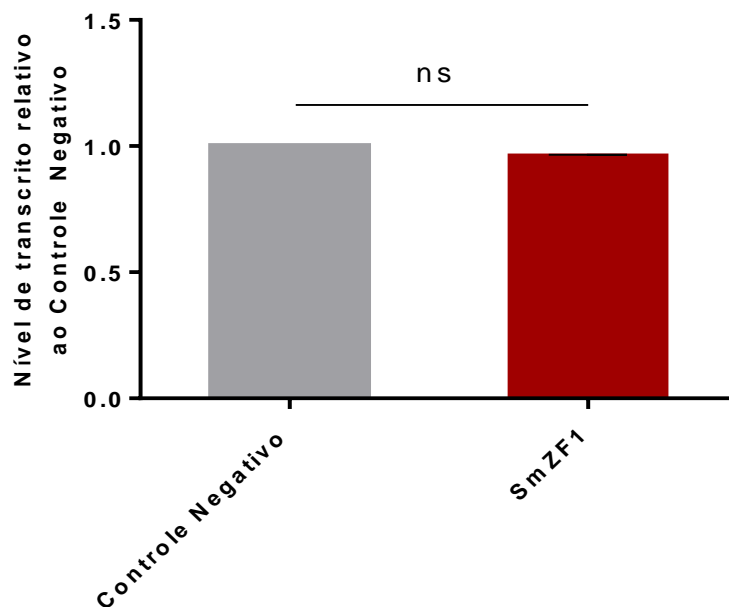


Figura 19 - Nível de transcritos de SmZF1 em vermes adultos recuperados de camundongos infectados com esquistossômulos silenciados. Os vermes adultos recuperados de camundongos infectados com esquistossômulos silenciados para os transcritos de SmZF1 (barras vermelhas) e os vermes adultos do grupo controle (barras cinzas) tiveram seus níveis de transcritos de SmZF1 mensurados e estatisticamente analisados através do teste estatístico Mann-Whitney (Wilcoxon sum of ranks) ($P < 0,05$; $n = 2$). As barras representam a média de dois experimentos de silenciamento independentes, em que os níveis de transcritos foram medidos em triplicata técnica. As barras de erro representam o erro padrão. ns = não significativo.

4.4.3- Contagem de ovos dos fígados de camundongos infectados com parasitos silenciados

Ainda buscando possíveis consequências da supressão parcial da expressão gênica de SmZF1 nos processos vitais do *S. mansoni*, avaliamos se a capacidade de reprodução dos vermes adultos foi alterada. Para isso, realizamos a contagem da carga de ovos nos fígados dos camundongos infectados com esquistossômulos silenciados para os transcritos de SmZF1 e comparamos os resultados com as contagens do grupo controle.

Os resultados mostram que os camundongos infectados com esquistossômulos tratados com o dsRNA de SmZF1 apresentam uma quantidade significativamente menor de ovos recuperados do fígado, quando comparados aos camundongos do grupo “Controle Negativo” (Figura 20). Dessa forma, observamos uma redução de aproximadamente 70% na quantidade de ovos de *S. mansoni* recuperados dos fígados.

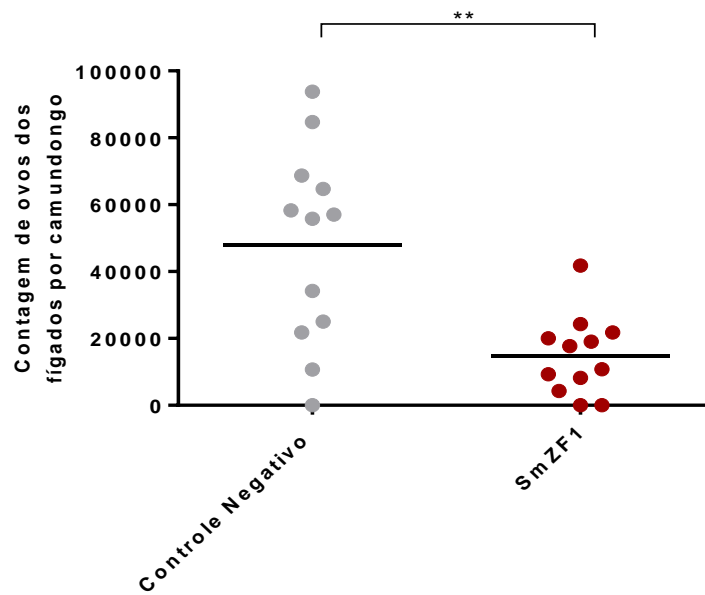


Figura 20 - Contagem de ovos nos fígados dos camundongos infectados com esquistossômulos silenciados para SmZF1. Cada símbolo representa o número de ovos recuperados para cada camundongo dos grupos “Controle Negativo” (círculos cinza) e “SmZF1” (círculos vermelhos). Estes resultados foram obtidos a partir de dois experimentos independentes, analisados pelo teste Mann-Whitney (Wilcoxon sum of ranks) ($P < 0,05$; $n = 12$). A mediana do número de ovos para cada grupo experimental é representada pela barra horizontal. ** indica $P < 0,01$.

4.4.4- Análises histopatológicas dos fígados recuperados de camundongos infectados com esquistossomos silenciados

Um dos eventos patogênicos mais importantes na esquistossomose é a formação do granuloma hepático, decorrente da secreção de proteínas antigênicas solúveis a partir dos ovos depositados no fígado (Gobert et al., 2015). Uma vez que a proteína SmZF1 mostrou potencial de atuação na regulação da expressão de genes envolvidos com o desenvolvimento e a eclosão dos ovos de *S. mansoni* (Bitar et al., 2013), as análises histopatológicas foram realizadas de modo a investigarmos possíveis alterações no perfil antigênico dos ovos do parasito, decorrentes do silenciamento de SmZF1, que poderiam alterar o perfil histopatológico dos granulomas hepáticos. Para isso, fragmentos do lobo esquerdo do fígado dos camundongos infectados com esquistossômulos silenciados para os transcritos de SmZF1 e do respectivo grupo controle foram retirados. Posteriormente, os granulomas hepáticos de ambos os grupos experimentais foram analisados (Figura 21).

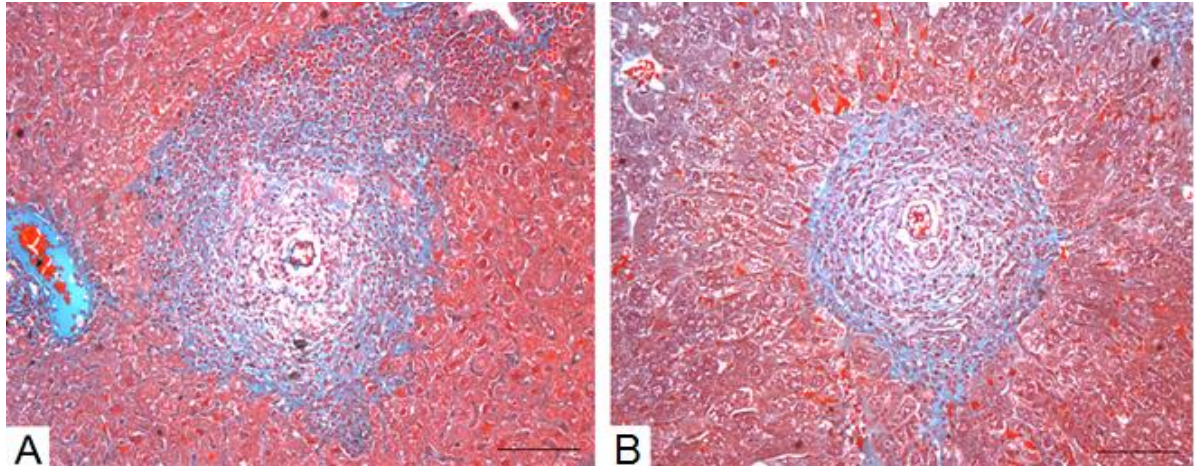


Figura 21 - Imagens representativas de cortes histológicos, corados com hematoxilina e tricrômico de Gomori, de fígados de camundongos infectados com esquistossômulos silenciados para os transcritos de SmZF1. Os cortes foram corados com tricrômico de Gomori para evidenciar o depósito de colágeno. As imagens, em aumento de 20x, representam a formação do granuloma no tecido hepático dos grupos “Controle Negativo” (A) e “SmZF1” (B). Barra de escala: 50µm.

Primeiramente, utilizando objetivas de 10x, a contagem de granulomas totais para cada seção histológica de cada grupo experimental foi realizada (Figura 22). A média do número de granulomas no fígado apresentou-se menor no grupo experimental “SmZF1” em comparação ao grupo “Controle Negativo”, entretanto essa alteração não foi estatisticamente significativa.

Posteriormente, avaliamos a área dos granulomas presentes nos grupos de camundongos infectados com esquistossômulos silenciados e não silenciados para SmZF1 (Figura 23A). Essa análise foi realizada a partir de dois experimentos independentes, onde 37 imagens foram capturadas para cada grupo experimental. Além disso, para avaliarmos o depósito de colágeno hepático, a área de fibrose foi calculada através da marcação em azul, obtida pela coloração por tricrômico de Gomori, presente na área de cada granuloma capturado (Figura 23B). Com isso, verificou-se que, para ambos os parâmetros, área dos granulomas e área de fibrose dos granulomas do tecido hepático dos camundongos infectados com esquistossômulos silenciados para os transcritos de SmZF1 não houve alteração significativa em relação ao grupo experimental “Controle Negativo”.

Estes resultados indicam, portanto, que os parâmetros avaliados pelas análises histopatológicas não foram alterados no grupo de camundongos infectados com esquistossômulos silenciados para o transcrito de SmZF1.

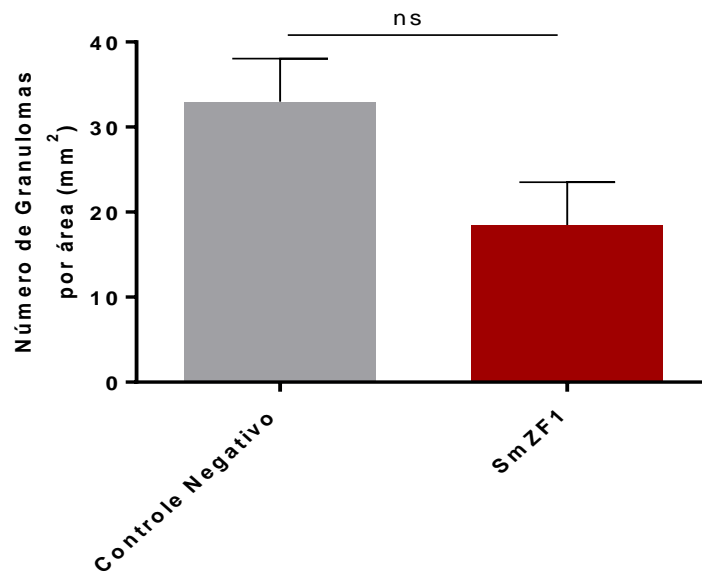


Figura 22 - Número de granulomas por mm² de fígado. As barras representam o número de granulomas por mm² de fígado dos camundongos infectados com esquistossômulos cultivados na ausência (barras cinzas) e na presença do dsRNA de SmZF1 (barras vermelhas). Estes resultados foram obtidos a partir de dois experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas através do teste Mann-Whitney (Wilcoxon sum of ranks) ($P < 0,05$; $n = 12$). As barras indicam erro padrão para cada experimento. ns = não significativo.

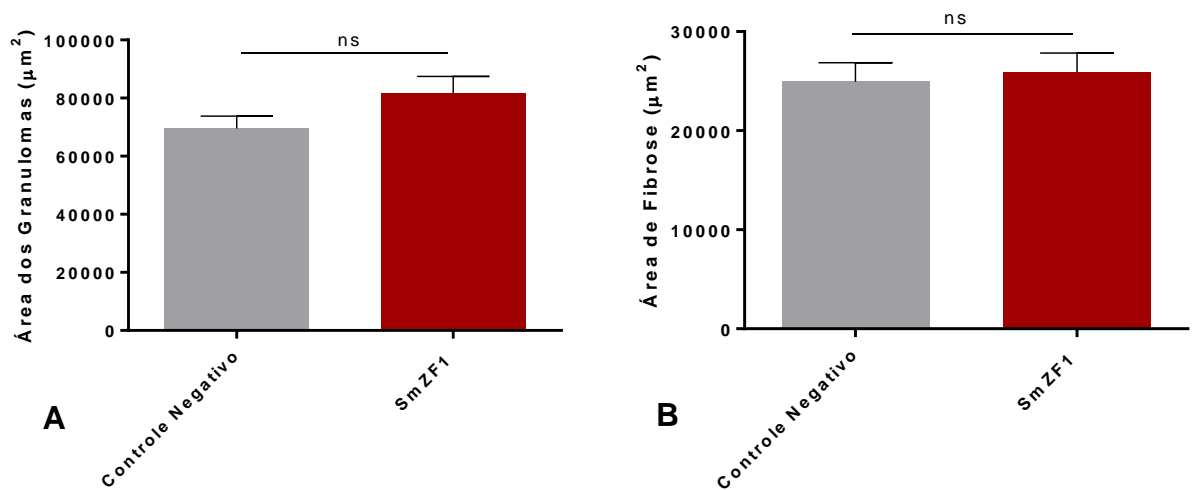


Figura 23 - Análise das áreas de fibrose e das áreas totais dos granulomas presentes nos fígados de camundongos infectados com esquistossômulos silenciados para os transcritos de SmZF1. Medidas das áreas totais dos granulomas (A) e das áreas de fibrose dos granulomas (B) presentes nos fígados de camundongos infectados com esquistossômulos silenciados para os transcritos de SmZF1 (barras vermelhas) e seu respectivo grupo controle (barras cinzas). As análises estatísticas foram realizadas através do teste Mann-Whitney (Wilcoxon sum of ranks) ($P < 0,05$; $n = 37$). Estes resultados foram obtidos a partir de dois experimentos independentes. As barras indicam erro padrão para cada experimento. ns = não significativo.

5. Discussão

Neste trabalho utilizamos a ferramenta interferência por RNA (RNAi) com o objetivo de caracterizar o papel da proteína SmZF1, relacionando a sua função à biologia do *Schistosoma mansoni*. Uma vez que os resultados obtidos nos trabalhos anteriores indicaram que essa proteína é um fator de transcrição possivelmente relacionado ao desenvolvimento e reprodução deste parasito (Bitar et al., 2013), procuramos observar o impacto causado pela diminuição dos transcritos de SmZF1 na infecção do hospedeiro vertebrado.

Nossos resultados indicaram que uma diminuição significativa na expressão relativa dos transcritos de SmZF1 entre o grupo experimental “SmZF1” e os dois grupos controles foi encontrada no terceiro dia de tratamento com dsRNA, onde a eficiência de silenciamento chegou ao seu máximo. Após o quarto dia de tratamento, observamos que os níveis de transcritos de SmZF1 no grupo “SmZF1” aumenta gradativamente até o último dia da cinética temporal. Verificamos também que os níveis de transcritos de SmZF1 não variaram de maneira significativa na presença de dsRNA controle (*Scrambled*) ao longo da cinética de silenciamento, quando comparados ao grupo experimental “Controle Negativo”, o que indica que a presença de um dsRNA inespecífico não alterou significativamente a expressão gênica de SmZF1. Já foi demonstrado em esporocistos e esquistossômulos de *S. mansoni* que o tempo de exposição ao dsRNA influencia diretamente na eficiência do silenciamento de cada transcrito e, uma vez que diferentes transcritos apresentam diferentes *turnovers*, estes poderão apresentar maior eficiência de silenciamento em diferentes dias (Mourão et al., 2009; Štefanić et al., 2010). Além disso, a diminuição gradativa da eficiência de silenciamento observada ao fim da cinética realizada está provavelmente relacionada ao caráter transiente do silenciamento induzido pela maquinaria RNAi, já descrito em diversos estudos que utilizaram essa técnica em parasitos (Revisão em Kalinna and Brindley, 2007).

Ao reproduzirmos os experimentos de silenciamento, dessa vez deixando esquistossômulos em cultura na presença dos dsRNAs até o terceiro dia de tratamento (dia que demonstrou mais silenciamento para os transcritos de SmZF1 nos experimentos de cinética), verificamos que a eficiência de *knockdown* se mostrou variável entre as réplicas biológicas. Durante o experimento de cinética de silenciamento, os transcritos de SmZF1 chegaram, no terceiro dia de tratamento com dsRNA de SmZF1, a um total de ~69% de silenciamento. A subsequente reprodução desses experimentos, necessária para que os experimentos *in vivo* fossem realizados, alcançou um nível de silenciamento dos transcritos de SmZF1 menor, sendo agora de ~54%. Larsson e colaboradores demonstraram, ao investigar a relação entre a meia-

vida de mRNAs em células HeLa, a quantidade desses mRNAs e sua suscetibilidade à interferência por siRNAs, que transcritos com meia-vida curta, ou seja, maior *turnover*, apresentaram maior resistência ao silenciamento por RNAi (Larsson et al., 2010). Esses resultados poderiam estar relacionados à variação das eficiências do silenciamento de SmZF1 entre as diferentes réplicas biológicas realizadas neste trabalho, uma vez que transcritos com função regulatória em células eucarióticas tendem a possuir alto *turnover* (Yang et al., 2003). Adicionalmente, observamos que a eficiência média do silenciamento de SmZF1 não foi alta, quando comparada às eficiências de silenciamento de alguns outros genes de *S. mansoni* já descritas na literatura, cujo método de RNAi foi o mesmo daquele utilizado neste trabalho (Krautz-Peterson et al., 2007; Tran et al., 2010). Grandes variações de resultados nos níveis de redução de transcritos entre diferentes genes em *S. mansoni* já foram descritas na fase de esporocistos (Mourão et al., 2009) e de esquistossômulos (Morales et al., 2008; Krautz-Peterson et al., 2010; Stefanić et al., 2010), demonstrando que genes expressos no tegumento e intestino, por estarem expostos ao ambiente externo contendo dsRNA, são mais facilmente silenciados. A partir desses trabalhos podemos concluir que o silenciamento por RNAi é alvo-específico, dependendo de fatores inerentes ao transcrito alvo (como sua meia-vida), e também da localização de sua expressão. Portanto, uma vez que SmZF1 não se localiza preferencialmente nos tecidos mais expostos ao dsRNA, fato que, aliado ao possível alto *turnover* de seu transcrito, pode explicar o silenciamento mediano e a variação da eficiência desse silenciamento, que foram observados nos diferentes experimentos realizados.

Durante o tratamento dado aos esquistossômulos para a realização da cinética de silenciamento, as culturas foram diariamente observadas na busca de possíveis fenótipos causados pelo silenciamento dos transcritos de SmZF1, como por exemplo morte e/ou alteração do tegumento do parasito. Embora o silenciamento dos transcritos de SmZF1 tenha sido observado ao longo da cinética, nenhuma alteração desse tipo foi encontrada. Esse resultado sugere que talvez a SmZF1 não seja uma proteína essencial para a viabilidade de esquistossômulos, quando estes são cultivados *in vitro*. O fato da efetividade do silenciamento por RNAi ser alvo-específica, isto é, nem todos os genes podem ser suprimidos de forma satisfatória pela presença de um dsRNA ou siRNA, a dificuldade de entrega dos dsRNAs ou siRNAs ao organismo de interesse, além da transiência do silenciamento dos transcritos compõem algumas das limitações encontradas para o uso desse método. Adicionalmente, existe a possibilidade do *knockdown* gerar fenótipos parciais, uma vez que o efeito da supressão da expressão gênica é transiente e uma expressão mínima da proteína de estudo pode ser suficiente para a execução de sua função (Kalinna and Brindley, 2007).

Para a avaliação de possíveis fenótipos que fossem menos perceptíveis, a área dos esquistossômulos foi estimada ao longo da cinética do silenciamento de SmZF1. Nossos resultados indicaram que, quando os grupos experimentais “Controle Negativo”, “*Scrambled*” e “SmZF1” foram comparados, apenas no segundo dia de tratamento obtivemos resultados significativos, isto é, o grupo tratado com dsRNA de SmZF1 mostrou uma área média significativamente menor do que os dois grupos controle, indicando um pequeno retardo no crescimento desses esquistossômulos. Entretanto, verificamos que esse fenótipo é perdido ao longo dos próximos dias, inclusive no terceiro dia, quando obtivemos a maior eficiência de silenciamento. Uma possível explicação para o fato de o fenótipo não ter se mostrado presente no dia de maior silenciamento dos transcritos de SmZF1 é a relação entre o transcrito e a quantidade de proteína presente na célula. De forma geral, menos da metade dos transcritos se correlaciona positivamente com a concentração de proteínas correspondentes, tanto em eucariotos quanto em procariotos (Revisão Vogel and Marcotte, 2012). Utilizando uma abordagem para incorporação de um marcador de proteínas em células NIH3T3 de camundongo, o SILAC (*Stable Isotope Labelling by Amino Acids in Cell Culture*), além de RNA-seq das mesmas, Schwanhäusser e colaboradores mostraram que apenas cerca de 40% da variação dos níveis de proteínas foram explicados pela quantidade de seus transcritos nas células (Schwanhäusser et al., 2011). Corroborando com essa hipótese, McVeigh e colaboradores demonstraram, através de RNAi no trematódeo *Fasciola gigantica*, que um silenciamento bastante efetivo dos transcritos de FheCatB, FheCatL e FheσGST durante um período de 72h não exibiu a diminuição proteica correspondente nesse período, sendo somente detectada para a proteína FheCatL após 21 dias da exposição desses parasitos aos dsRNA, após 9 dias para a FheσGST, e não foi encontrada para a proteína FheCatB (McVeigh et al., 2014). Portanto, existe a possibilidade de que, durante a cinética, a variação proteica de SmZF1 tenha se mostrado diferente das quantidades de transcritos encontradas para cada dia de tratamento com dsRNA. No nosso caso, é possível que os silenciamentos do primeiro e segundo dia de cinética causaram uma significativa diminuição da proteína SmZF1 no segundo dia, gerando assim uma alteração no crescimento dos esquistossômulos. Para melhor estudar essa hipótese, ainda se faz necessária a realização de experimentos de *Western Blot*, a fim de avaliarmos os níveis proteicos de SmZF1 durante a realização da cinética de silenciamento de seus transcritos.

O tamanho dos esquistossômulos do grupo SmZF1 foi significativamente menor do que o dos parasitos do grupo experimental “Controle Negativo” no quarto dia de tratamento, mas não diferiu do grupo “*Scrambled*”. Devido a isso, esse fenótipo foi desconsiderado como uma alteração específica causada pelo dsRNA de SmZF1. Uma hipótese para explicar esse resultado

seria a possibilidade de efeito *off-target* eventualmente desencadeado nos esquistossômulos do grupo experimental “*Scrambled*” pela presença do dsRNA inespecífico. Esse tipo de resultado foi descrito por Mourão e colaboradores quando, ao medir a área de esporocistos de *S. mansoni* tratados com dsRNA para diferentes alvos, foi observado que os parasitos silenciados para alguns desses alvos apresentaram tamanho significativamente menor que o controle negativo (grupo que não recebeu tratamento com dsRNA), mas não apresentaram diferença significativa quando comparado ao grupo tratado com o dsRNA de GFP (Mourão et al., 2009). Já foi demonstrado na literatura que o dsRNA controle inespecífico, apesar de ser específico para transcritos de proteínas que não fazem parte do genoma de *S. mansoni*, pode produzir efeitos não específicos. Essa possibilidade é ainda aumentada quando se trata de longos dsRNAs, uma vez que a enzima Dicer cliva aleatoriamente essas moléculas, podendo gerar siRNAs complementares a algum transcrito do parasito (Mourão et al., 2009). Efeitos mais severos causados pela presença de um dsRNA inespecífico (GFP) já foram descritos em outros organismos, como por exemplo o aparecimento de pigmentação indesejada em abelhas ou alteração no seu tempo de desenvolvimento (Nunes et al., 2013).

A geração de efeitos *off-target*, ou seja, o silenciamento inespecífico de genes que não são os alvos esperados para o dsRNA ou siRNA introduzido no organismo, compõe, além das já citadas, uma das mais importantes desvantagens da utilização do RNAi. Em dois ensaios de triagem de fenótipos através de RNAi em *D. melanogaster*, verificou-se que a taxa de fenótipos falso-positivos está entre 5-7% (Mummary-Widmer et al., 2009; Schnorrer et al., 2010). Efeitos não específicos resultantes da introdução de siRNAs ou dsRNAs podem possuir diferentes causas. Fedorov e colaboradores demonstraram que, quando transfecções dos mesmos siRNAs através de diferentes lipídios como método de entrega foram realizadas em células HeLa, diferentes perfis de expressão gênica eram encontrados (Fedorov et al., 2005). Em outro trabalho, Sledz demonstrou que a transfecção de siRNAs em células humanas de glioblastoma induziu uma resposta da via Jak-Stat mediada por interferon (Sledz et al., 2003). Porém, de maneira geral, a principal causa da geração de *off-targets* na maioria dos organismos está relacionada com o complexo RISC, onde siRNAs, devido à suas pequenas sequências, podem se ligar à região 3’UTR de outros mRNAs além do transcrito alvo, e gerar uma resposta de silenciamento inespecífico. Diversos esforços vêm sendo feitos para que seja possível a interpretação de *off-targets* e também a prevenção desse tipo de resposta indesejada (Revisão em Jackson and Linsley, 2010).

Para verificar possíveis efeitos *off-target*, além da utilização de dois dsRNAs controle para demonstrar a especificidade do silenciamento dos transcritos de SmZF1, avaliamos os

níveis de transcritos dos genes de expressão gênica constitutiva Alfa-Tubulina e GAPDH, além dos níveis de transcritos de SMYB1, uma proteína envolvida em processos de regulação da expressão gênica em *S. mansoni*, nos esquistossômulos silenciados para SmZF1. Verificamos que nenhum dos transcritos avaliados se mostrou significativamente alterado nas amostras tratadas com o dsRNA de SmZF1, quando comparadas às amostras dos grupos “Controle Negativo” e “*Scrambled*”. Nossos resultados indicam que o silenciamento dos transcritos de SmZF1 foi específico e que os genes avaliados não demonstraram alteração pela introdução, no meio de cultura de esquistossômulos, dos dsRNAs utilizados neste trabalho. Entretanto, é importante ressaltar que foi avaliada a expressão relativa de apenas 3 genes, um número pequeno para garantir que nenhum efeito *off-target* ocorreu durante o tratamento com os dsRNAs utilizados nesse trabalho. Somente um estudo em larga escala para avaliação da expressão gênica após o tratamento com os dsRNAs seria capaz de refutar completamente a presença de efeito *off-target*.

Após o silenciamento dos transcritos de SmZF1, avaliamos a expressão relativa dos transcritos de dois genes que possivelmente seriam alvos de regulação da SmZF1. Os genes Smp_030710 e Smp_065180, que codificam respectivamente para as proteínas Serina/Treonina Proteína Fosfatase e *EH Domain containing/past-1-related* de *S. mansoni*, não se mostraram alterados pelo *knockdown* dos transcritos de SmZF1. A ausência de alteração na expressão dos transcritos dos genes alvos de SmZF1 avaliados pode estar relacionada com o baixo silenciamento dos transcritos de SmZF1, o que possivelmente levou a uma diminuição proteica de SmZF1 sutil, gerando uma alteração imperceptível pelos métodos de avaliação utilizados. Devido à ferramenta RNAi gerar uma diminuição parcial do mRNA alvo, uma segunda hipótese plausível justificaria que, mesmo que a diminuição do nível de transcrito e, possivelmente da proteína SmZF1, seja satisfatória, a presença de uma pequena quantidade de proteína já poderia ser suficiente para que a sua função seja mantida. Adicionalmente, existe ainda a possibilidade de que a função exercida por SmZF1 tenha sido substituída por outras proteínas funcionalmente equivalentes. Ainda é válido ressaltar que foram encontrados 415 genes que podem ser alvo de regulação por SmZF1 (Bitar et al., 2013) e que este trabalho testou dois desses genes, escolhidos por possuírem 2 sítios de ligação de SmZF1 ao DNA em suas regiões promotoras. Portanto, existe ainda a possibilidade de que os dois genes estudados não sejam alvos de regulação por SmZF1. Para obter informações acerca dos genes que possuem o sítio de interação entre SmZF1 e o DNA em sua região promotora, um estudo mais robusto, envolvendo mais genes, deve ser realizado.

Nos experimentos *in vivo*, ao infectarmos camundongos com esquistossômulos silenciados para SmZF1, de forma a investigarmos o possível papel desta proteína, durante o desenvolvimento e a reprodução do *S. mansoni* no hospedeiro vertebrado, observamos uma redução de ~72% no número de vermes adultos. Mourão e colaboradores demonstraram que a absorção de dsRNA pelos esquistossômulos cultivados *in vitro* não é uniforme, o que pode gerar a ausência de silenciamento em determinada quantidade de parasitos da população cultivada (Mourão et al., 2009). Uma vez que a redução dos níveis de SmZF1 levou a uma expressiva diminuição na contagem de vermes adultos recuperados, o que indica o importante papel desempenhado por essa proteína no estabelecimento da infecção e desenvolvimento do parasito, existe ainda a possibilidade de que os vermes remanescentes sejam resultantes do desenvolvimento de esquistossômulos não silenciados. Dessa forma, este resultado evidencia um possível papel da proteína SmZF1 durante o estabelecimento da infecção e desenvolvimento dos esquistossômulos em vermes adultos. Quando os vermes adultos foram contados separadamente, verificou-se que a diminuição foi de ~74% para as fêmeas recuperadas do grupo experimental “SmZF1” com relação às recuperadas do grupo controle, enquanto o número de machos foi diminuído em ~70% com relação ao grupo controle, mostrando que essa alteração não é sexo-específica. A dependência de SmZF1 para a sobrevivência de fêmeas adultas no hospedeiro vertebrado é intrigante, uma vez que, apesar da presença dos transcritos de SmZF1, essa proteína não está presente em fêmeas de *S. mansoni* (Drummond et al., 2009). Considerando que a fêmea de vermes adultos desse parasito necessita diretamente do pareamento com o macho para atingir seu desenvolvimento sexual (Revisão em LoVerde et al., 2009), nossa hipótese sugere que o silenciamento dos transcritos de SmZF1 nos vermes adultos machos comprometeria seu desenvolvimento e conseqüentemente a maturação sexual e sobrevivência das fêmeas. Concluímos que o silenciamento dos transcritos de SmZF1 nos esquistossômulos de *S. mansoni* tornou-os menos aptos a se desenvolverem no hospedeiro mamífero. Essas alterações encontradas corroboram com o trabalho realizado por Bitar e colaboradores, onde foi demonstrado o papel regulatório desempenhado por essa proteína, que mostrou atuar na expressão de genes relacionados com desenvolvimento larval do parasito (Bitar et al., 2013).

Nossos dados demonstraram uma queda de ~70% da carga de ovos retidos nos fígados dos camundongos do grupo experimental “SmZF1”. Essa alteração é proporcional à diminuição de vermes adultos devido ao silenciamento de SmZF1. Como demonstrado por Bitar e colaboradores, SmZF1 possivelmente atua na regulação de genes de *S. mansoni* envolvidos nos processos relacionados à reprodução do parasito, como desenvolvimento e eclosão dos ovos

(Bitar et al., 2013). Entretanto, o silenciamento de SmZF1 não se manteve nos vermes adultos, indicando que a diminuição da carga de ovos no fígado dos camundongos não pode ser atribuída diretamente à supressão dessa proteína no verme adulto. Portanto, a causa da diminuição da quantidade de ovos encontrada nos fígados do hospedeiro mamífero está diretamente relacionada com a diminuição do número de vermes adultos, causada pelo silenciamento de SmZF1. Para analisarmos o papel de SmZF1 na postura e desenvolvimento dos ovos desse parasito, mais estudos devem ser realizados, porém com o foco voltado para o silenciamento dos transcritos dessa proteína nos vermes adultos e nos ovos do parasito.

Proteínas que contêm dedos de zinco estão dentre as mais abundantes no genoma de eucariotos, possuindo diversas funções, como reconhecimento de DNA, empacotamento de RNA, regulação da apoptose, enovelamento proteico e regulação da transcrição gênica (Laity et al., 2001). Devido ao seu papel regulatório, proteínas contendo dedos de zinco em sua estrutura vêm sendo estudadas em parasitos do gênero *Schistosoma* na intenção de compreender eventos cruciais nesses organismos, como desenvolvimento e reprodução (Hu et al., 2006; Qiu et al., 2012). Recentemente, Liu e colaboradores demonstraram que, após induzir o silenciamento dos transcritos de SjZFP1, uma proteína que contém dedos de zinco, utilizando siRNAs específicos durante a infecção de camundongos com parasitos da espécie *S. japonicum*, verificou-se uma redução média de 22% no número de vermes adultos recuperados, após o período de infecção, com relação ao grupo controle negativo, além de observar ~25% de redução da carga de ovos nos fígados desses camundongos. Esses resultados indicam que essa proteína possui um papel relacionado com o desenvolvimento dos parasitos no hospedeiro vertebrado (Liu et al., 2015).

Como citado anteriormente, nossos resultados indicaram que os vermes adultos de *S. mansoni*, obtidos pela infecção de camundongos com esquistossômulos silenciados para os transcritos de SmZF1, retomaram a expressão de SmZF1 encontrada nos vermes adultos do grupo controle. O silenciamento transiente dos transcritos constitui uma característica da ferramenta RNAi, sendo uma das limitações encontradas para a utilização da técnica (Kalinna and Brindley, 2007). No entanto, o caráter transitório do silenciamento por RNAi, por si, pode não ser suficiente para explicar a ausência da continuidade do silenciamento de SmZF1 nos vermes adultos originados de esquistossômulos transformados. Correnti e colaboradores demonstraram que, após a infecção de camundongos com esquistossômulos de *S. mansoni* silenciados para os transcritos de Catepsina B (SmCB1), através de dsRNA, os vermes adultos recuperados após 3 semanas de infecção ainda mantiveram a expressão de SmCB1 silenciada

(Correnti et al., 2005). Isso indica que a manutenção do silenciamento ao longo do desenvolvimento do parasito é alvo-específica.

Esforços vêm sendo feitos para aumentar a eficiência e contornar o efeito passageiro do silenciamento através de RNAi. Nesse sentido, Yu e colaboradores desenvolveram vetores de expressão de shRNAs (*small hairpin RNAs*) que, quando transfectados em células de mamíferos, são continuamente processados em dsRNAs e desencadeiam o *knockdown* do transcrito alvo (Yu et al., 2002). Em uma abordagem parecida, Hagen e colaboradores demonstraram o silenciamento contínuo dos transcritos das proteínas Omega-1, IPSE e Kappa-5 em *S. mansoni* através de um sistema que utiliza um vetor lentiviral para a entrega de shRNAs adaptados em microRNAs (shRNAmirs) às células do parasito (Hagen et al., 2014). Essa técnica seria bastante promissora para demonstrarmos os efeitos do silenciamento dos transcritos de SmZF1 nos vermes adultos de *S. mansoni*. Como uma alternativa menos laboriosa, a fim de se estudar os efeitos do silenciamento de determinados alvos em vermes adultos de *Schistosoma*, alguns grupos de trabalho vem inserindo siRNAs específicos para transcritos-alvos do parasito na corrente sanguínea dos hospedeiros mamíferos, alcançando com sucesso o *knockdown* específico desses alvos nos parasitos (Yang et al., 2012; Liu et al., 2015).

A significativa diminuição dos vermes adultos observada no grupo experimental SmZF1, acompanhada pela queda na quantidade de ovos dos fígados dos camundongos desse grupo, nos indicava uma possível diminuição no número de granulomas presentes nos fígados desses camundongos, com relação ao grupo controle. Entretanto, não houve diferença significativa no número de granulomas nos fígados dos camundongos infectados com esquistossômulos silenciados para os transcritos de SmZF1. Em relação aos demais parâmetros histopatológicos analisados, tais como a área total e a área de fibrose dos granulomas, não foram observadas alterações significativas nos fígados dos camundongos infectados com esquistossômulos silenciados para SmZF1 em relação aos fígados dos animais do grupo controle. A área dos granulomas e sua área de fibrose não se mostraram menores, indicando que o recrutamento e a migração de células do hospedeiro associadas à formação do granuloma hepático não foram afetados no grupo experimental “SmZF1”. Entretanto, não podemos estabelecer uma relação entre esses dois parâmetros avaliados e a SmZF1, uma vez que o silenciamento dos transcritos dessa proteína não perdurou até a fase adulta do *S. mansoni*. Um dos eventos patogênicos mais importantes na esquistossomose é a formação do granuloma hepático, decorrente da secreção de proteínas antigênicas solúveis a partir dos ovos depositados no fígado (Gobert et al., 2015). Uma vez que a proteína SmZF1 mostrou potencial de atuação da regulação da expressão gênica de genes envolvidos na reprodução (Bitar et al., 2013), as análises histopatológicas foram

realizadas com a finalidade de encontrar uma possível influência dessa proteína na formação dos ovos desse parasito. Caso o silenciamento dos transcritos dessa proteína gerasse um fenótipo nos ovos, como, por exemplo, a diminuição de proteínas antigênicas secretadas, é provável que uma diminuição no infiltrado inflamatório e na formação dos granulomas poderia ser observada. Esse tipo de fenótipo foi descrito por Hagen e colaboradores, que demonstraram a diminuição na formação de granulomas pulmonares de camundongos, causados pela infecção com *S. mansoni*, decorrente do silenciamento dos transcritos de uma proteína citotóxica secretada pelos ovos (Hagen et al., 2014). Uma vez que a relação entre a SmZF1 e a formação de granulomas ainda não foi estabelecida, estudos através do silenciamento de SmZF1 nos vermes adultos ainda serão necessários.

A técnica de RNAi causou uma revolução no campo da biologia molecular desde que passou a ser utilizada para identificar a função de genes essenciais em um organismo, através do silenciamento de seus transcritos. O fato da maquinaria de RNAi estar presente na maioria dos organismos eucarióticos foi fundamental no processo de consolidação dessa ferramenta como uma alternativa aos métodos de manipulação gênica convencionais (Pereira et al, 2013). Descoberta e amplamente empregada no estudo do organismo modelo *C. elegans* (Revisão em Britton and Murray, 2006), essa técnica vem sendo utilizada no estudo de agentes patogênicos como príons e vírus (White et al., 2008; Herker et al., 2010), bactérias (Luo and McBride, 2012), fungos (Moazeni et al., 2012) e em parasitos multicelulares (Revisão em Geldhof et al., 2007).

Nos parasitos do gênero *Schistosoma*, devido à dificuldade da manutenção *in vitro* de seu ciclo de vida completo, a construção de modelos transgênicos é limitada. Métodos como microinjeção, biobalística (bombardeamento de partículas), eletroporação e uso de vetores de retrovírus ou elementos genéticos móveis (transposons) já foram testados para a geração de modelos transgênicos nesses parasitos (Revisão em Brindley and Pearce, 2007). Porém, esses modelos muitas vezes se mostraram não efetivos e de difícil manipulação. Por esses motivos, a ferramenta RNAi vem sendo uma grande aliada na caracterização funcional de proteínas em *S. mansoni* desde que foi demonstrada pela primeira vez por Skelly e colaboradores em 2003.

As tecnologias baseadas em CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic*) vem sendo aplicadas com muito sucesso em células de mamíferos devido às limitações encontradas na utilização da ferramenta de RNAi, tais como a geração de *knockdown* e não *knockout*, o silenciamento transiente e o efeito *off-target* (Boettcher and McManus, 2015). Entretanto, a manutenção do complexo ciclo de vida dos parasitos helmintos em laboratório, aliada à dificuldade encontrada para a sua manipulação genética e celular vem constituindo as

principais barreiras para a implementação desse tipo de tecnologia nesses parasitos (Hoffmann et al., 2014). Apesar da abordagem CRISPR-Cas9 mostrar sucesso quando empregada em *C. elegans* (Revisão em Frøkjær-Jensen, 2013), o mesmo ainda não foi demonstrado em parasitos do gênero *Schistosoma*. Portanto, a ferramenta RNAi ainda é a maior aliada nos estudos dos parasitos helmintos, utilizada como alternativa aos métodos de genética convencionais, devido à dificuldade da manipulação nesses parasitos.

6. Conclusão

A ferramenta RNAi, apesar de apresentar algumas limitações, possibilitou a continuidade dos estudos de caracterização funcional da proteína SmZF1 de *S. mansoni*, contribuindo, conseqüentemente, para a geração de mais conhecimento acerca da biologia desse parasito. Os resultados apresentados neste estudo mostraram que o silenciamento dos transcritos de SmZF1 foi efetivo em esquistossômulos e que contribuiu para a diminuição da carga parasitária e da carga de ovos depositados no fígado do hospedeiro vertebrado. Com isso, sugerimos o envolvimento da proteína SmZF1 no desenvolvimento larval de esquistossômulos de *S. mansoni* e no estabelecimento da infecção desse parasito no hospedeiro vertebrado.

7. Perspectivas

- Realizar experimentos de Microscopia Confocal e *Western Blot* para quantificar a diminuição proteica de SmZF1 decorrente do silenciamento de seus transcritos no parasito *S. mansoni*;
- Utilizar a ferramenta RNAi para induzir o silenciamento dos transcritos de SmZF1 em vermes adultos de *S. mansoni* através de duas abordagens: a abordagem *in vitro*, que consiste em cultivar vermes adultos em meio de cultura RPMI contendo dsRNA específico para os transcritos de SmZF1; a abordagem *in vivo*, que pretende inocular siRNA específico para os transcritos de SmZF1 em camundongos infectados com *S. mansoni*. Assim, pretendemos avaliar as possíveis alterações decorrentes da supressão dessa proteína nos vermes adultos desse parasito;
- Realizar o RNA-Seq dos esquistossômulos silenciados para os transcritos de SmZF1, para avaliarmos a expressão gênica dos genes que possivelmente são alvos de regulação desse fator de transcrição.
- Avaliar o fenótipo do silenciamento de SmZF1 em outras formas de vida do parasito (ovos e esporocistos), além de estudar a possibilidade de silenciar os transcritos dessa proteína nas formas miracídio e cercária;
- Utilizar o *Worm Tracker* para avaliar se o silenciamento de SmZF1 em esquistossômulos de *S. mansoni* está relacionado com uma possível alteração nos padrões de movimentação e comportamento desses vermes;
- Identificar, através de experimentos de imunoprecipitação de cromatina e sequenciamento de nova geração (ChIP-Seq), os sítios de ligação desta proteína no genoma de *S. mansoni*.

8. Referências Bibliográficas

- Abath F.G., Xavier E.M., Allen R., Gomes Y.M., Lucena-Silva N., Baliza M., Simpson A.J.; Characterization of Sm13, a tegumental antigen of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Research* 2000; 86(9): 745-752.
- Almeida G.T., Amaral M.S., Beckedorff F.C.F., Kitajima J.P., DeMarco R., Verjovski-Almeida S.; Exploring the *Schistosoma mansoni* adult male transcriptome using RNA-seq. *Experimental Parasitology* 2011; 132(1): 22-31.
- Andrade L.F., Mourão M.M., Geraldo J.A., Coelho F.S., Silva L.L., Neves R.H., Volpini A., Machado-Silva J.R., Araujo N., Nacif-Pimenta R., Caffrey C.R., Oliveira G.; Regulation of *Schistosoma mansoni* Development and Reproduction by the Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2014; 8(6): e2949.
- Berg J.M.; Zinc finger domains: hypotheses and current knowledge. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 1990; 19: 405-421.
- Bergquist R., Al-Sherbiny M., Barakat R., Olds R.; Blueprint for schistosomiasis vaccine development. *Acta Tropica* 2002; 82(2): 183-192.
- Berriman M., Haas B.J., LoVerde P.T., Wilson R.A., Dillon G.P., Cerqueira G.C., Mashiyama S.T., Al-Lazikani B., Andrade L.F., Ashton P.D., Aslett M.A., Bartholomeu D.C., Blandin G., Caffrey C.R., Coghlan A., Coulson R., Day T.A., Delcher A., DeMarco R., Djikeng A., Eyre T., Gamble J.A., Ghedin E., et al.; The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature* 2009; 460(7253): 352-358.
- Bertin B., Caby S., Oger F., Sasorith S., Wurtz J.M., Pierce R.J.; The monomeric orphan nuclear receptor *Schistosoma mansoni* Ftz-F1 dimerizes specifically and functionally with the schistosome RXR homologue, SmRXR1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005; 327(4): 1072-1082.
- Boettcher M., McManus M.T.; Choosing the Right Tool for the Job: RNAi, TALEN, or CRISPR. *Molecular Cell* 2015; 58(4): 575-585.

- Boyle J.P., Wu X.J., Shoemaker C.B., Yoshino T.P.; Using RNA interference to manipulate endogenous gene expression in *Schistosoma mansoni* sporocysts. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2003; 128(2): 205-215.
- Brindley P.J., Pearce E.J.; Genetic manipulation of schistosomes. *International Journal of Parasitology* 2007; 37(5): 465-473.
- Britton C., Murray L.; Using *Caenorhabditis elegans* for functional analysis of genes of parasitic nematodes. *International Journal of Parasitology* 2006; 36(6): 651-659.
- Caliari M.V.; Princípios de Morfometria Digital: KS300 para iniciantes. Belo Horizonte 1997. Ed. UFMG, 149 p.
- Calzavara-Silva, C.E., Prosdocimi F., Abath F.G., Pena S.D., Franco G.R.; Nucleic acid binding properties of SmZF1, a zinc finger protein of *Schistosoma mansoni*. *International Journal for Parasitology* 2004; 34(11): 1211-1219.
- Cardoso F.C., Macedo G.C., Gava E., Kitten G.T., Mati V.L., de Melo A.L., Caliari M.V., Almeida G.T., Venancio T.M., Verjovski-Almeida S., Oliveira S.C.; *Schistosoma mansoni* tegument protein Sm29 is able to induce a Th1-type of immune response and protection against parasite infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2008; 2(10): e308.
- Carneiro V.C., Silva I.C.A, Torres E.J.L., Caby S., Lancelot J., Vanderstraete M., Furdas S.D., Jung M., Pierce R.J., Fantappiè M.R.; Epigenetic Changes Modulate Schistosome Egg Formation and Are a Novel Target for Reducing Transmission of Schistosomiasis. *PLoS Pathogens* 2014; 10(5): e1004116.
- Cho S.Y., Chung M., Park M., Park S., Lee Y.S.; ZIFIBI: prediction of DNA binding sites for zinc finger proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008; 369(3): 845-848.
- Cioli D., Pica-Mattoccia L., Archer S.; AntiSchistosomal drugs: past, present ... and future?. *Pharmacology and Therapeutics* 1995; 68(1): 35-85.

- Cioli D., Pica-Mattoccia L., Archer S.; Drug resistance in schistosomes. *Parasitology Today* 1993; 9(5): 162-166.
- Coelho P.M., Lima-e-Silva F.C., Nogueira-Machado J.A.; Resistance to Oxamniquine of a *Schistosoma mansoni* strain isolated from patient submitted to repeated treatments. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 1997; 39(2): 101-106.
- Conceição M.J., Coura J.R.; Epidemiology of *Schistosomiasis mansoni* in Brazil. *Schistosomiasis* 2012; Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/schistosomiasis/epidemiology-of-schistosomiasis-mansoni-in-brazil>. Acesso em: 05 de setembro de 2015.
- Correnti J.M., Brindley P.J., Pearce E.J.; Long-term suppression of cathepsin B levels by RNA interference retards schistosome growth. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2005; 143(2): 209-215.
- Coura, J.R., Amaral, R.S.; Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2005; 99(1): 13-19.
- de Oliveira F.M., da Silva I.C., Rumjanek F.D., Valadão A.F., Franco G.R., Mesquita R.D., da Silva-Neto M.A., Fantappiè M.R.; Functional properties of *Schistosoma mansoni* single-stranded DNA-binding protein SmPUR-alpha. Description of the interaction between SmPUR-alpha and SMYB1. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2004; 135(1): 21-30.
- Dias S.R., Boroni M., Rocha E.A., Dias T.L., Laet D.S., Oliveira F.M., Bitar M., Macedo A.M., Machado C.R., Caliarì M.V., Franco G.R.; Evaluation of the *Schistosoma mansoni* Y-box-binding protein (SMYB1) potential as a vaccine candidate against schistosomiasis. *Frontiers in genetics* 2014; 5: 174.
- Dinguirard N., Yoshino T.P.; Potential role of a CD36-like class B scavenger receptor in the binding of modified low-density lipoprotein (acLDL) to the tegumental surface of *Schistosoma mansoni* sporocysts. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2006; 146(2): 219-230.

- Drummond M.G., Calzavara-Silva C.E., D'Astolfo D.S., Cardoso F.C., Rajão M.A., Mourão M.M., Gava E., Oliveira S.C., Macedo A.M., Machado C.R., Pena S.D., Kitten G.T., Franco G.R.; Molecular characterization of the *Schistosoma mansoni* zinc finger protein SmZF1 as a transcription factor. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2009; 3(11): e547.
- Elbaz T., Esmat G.; Hepatic and intestinal schistosomiasis: review. *Journal of Advanced Research* 2013; 4(5): 445-452.
- Eleutério de Souza, P.R., Valadão A.F., Calzavara-Silva C.E., Franco G.R., Morais M.A., Abath F.G.C.; Cloning and characterization of SmZF1, a gene encoding a *Schistosoma mansoni* zinc finger protein. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2001; 96: 123-130.
- Eliseeva I.A., Kim E.R., Guryanov S.G., Ovchinnikov L.P., Lyabin D.N.; Y-box-binding protein 1 (YB-1) and its functions. *Biochemistry (Mosc)* 2011; 76(13): 1402-1433.
- Elrod-Erickson M., Benson T.E., Pabo C.O.; High-resolution structures of variant Zif268-DNA complexes: implications for understanding zinc finger-DNA recognition. *Structure* 1998; 6(4): 451-464.
- Engels D., Chitsulo L., Montresor A., Savioli L.; The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. *Acta Tropica* 2002; 82: 139-146.
- Fairall L., Schwabe J.W., Chapman L., Finch J.T., Rhodes D.; The crystal structure of a two zinc-finger peptide reveals an extension to the rules for zinc-finger/DNA recognition. *Nature* 1993; 366(6454): 483-487.
- Fantappiè, M.R., Freebern, W.J., Osman, A., LaDuca, J., Niles, E.G., LoVerde, P.T.; 2001. Evaluation of *Schistosoma mansoni* retinoid X receptor (SmRXR1 and SmRXR2) activity and tissue distribution. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2001; 115: 87-99.

- Fantappi  M.R., Furtado D.R., Rumjanek F.D., Loverde P.T.; A unique nuclear receptor direct repeat 17 (DR17) is present within the upstream region of *Schistosoma mansoni* female-specific p14 gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008; 371(4): 689-693.
- Fedorov Y., King A., Anderson E., Karpilow J., Ilsley D., Marshall W., Khvorova A.; Different delivery methods-different expression profiles. *Nature Methods* 2005; 2(4):241.
- Hoffmann K.F., Brindley P.J., Berriman M.; Medicine. Halting harmful helminths. *Science* 2014; 346(6206): 168-169.
- Fire A., Albertson D., Harrison S.W., Moerman D.G.; Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle. *Development* 1991; 113(2): 503-514.
- Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C.; Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391(6669): 806-811.
- Fitzpatrick J.M., Hoffmann K.F.; Dioecious *Schistosoma mansoni* express divergent gene repertoires regulated by pairing. *International Journal of Parasitology* 2006; 36(10-11): 1081-1089.
- Franco G.R., Adams M.D., Soares M.B., Simpson A.J.G., Venter J.C., Pena S.D.J.; Identification of new *Schistosoma mansoni* genes by the EST strategy using a directional cDNA library. *Gene* 1995; 152(2): 141-147.
- Franco G.R., Garratt R.C., Tanaka M., Simpson A.J., Pena S.D.; Characterization of a *Schistosoma mansoni* gene encoding a homologue of the Y-box binding protein. *Gene* 1997; 198(1-2): 5-16.
- Franco G.R., Prosdocimi F., Faria-Campos A.C., Ortega J.M.; Rede mineira de sequenciamento: o estudo do transcriptoma do parasita *Schistosoma mansoni*. *Bioscience Journal* 2004; 20: 93-100.

- Franco G.R., Valadão A.F., Azevedo V., Rabelo E.M.; The *Schistosoma* gene discovery program: state of the art. *International Journal for Parasitology* 2000; 30(4): 453-463.
- Freitas T.C., Jung E., Pearce E.J.; TGF- β Signaling controls embryo development in the parasitic flatworm *Schistosoma mansoni*. *PLoS Pathogens* 2007; 3(4): e52.
- Frøkjær-Jensen, C.; Exciting prospects for precise engineering of *Caenorhabditis elegans* genomes with CRISPR/Cas9. *Genetics* 2013; 195(3): 635-642.
- Gobert G.N., Nawaratna S.K., Harvie M., Ramm G.A., McManus D.P.; An ex vivo model for studying hepatic schistosomiasis and the effect of released protein from dying eggs. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2015; 9(5):e0003760.
- Guidi A., Mansour N.R., Paveley R.A., Carruthers I.M., Besnard J., Hopkins A.L., Gilbert I.H., Bickle Q.D.; Application of RNAi to Genomic Drug Target Validation in Schistosomes. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2015; 9(5): e0003801.
- Guo S., Kempfues K.J.; par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 1995; 81(4): 611-620.
- Hagen J., Young N.D., Every A.L., Pagel C.N., Schnoeller C., Scheerlinck, J.-P., Gasser R.B., Kalinna B.H.; Omega-1 knockdown in *Schistosoma mansoni* eggs by lentivirus transduction reduces granuloma size in vivo. *Nature Communications* 2014; 5: 5375.
- Han Z.G., Brindley P.J., Wang S.Y., Chen Z.; *Schistosoma* genomics: new perspectives on schistosome biology and host-parasite interaction. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 2009; 10: 211-240.
- He L., Hannon G.J.; MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews. Genetics* 2004; 5(7): 522-531.

- Herker E., Harris C., Hernandez C., Carpentier A., Kaehlcke K., Rosenberg A.R., Farese R.V., Ott M.; Efficient hepatitis C virus particle formation requires diacylglycerol acyltransferase-1. *Nature Medicine* 2010; 16(11): 1295-1298.
- Hotez, P. J., Engels D., Fenwick A., Savioli L.; Africa is desperate for praziquantel. *The Lancet* 2010; 376: 496-498.
- Hu R., Niles E.G., LoVerde P.T.; DNA binding and transactivation properties of the *Schistosoma mansoni* constitutive androstane receptor homologue. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2006; 150(2): 174-185.
- Ishida K., Varrecchia M., Knudsen G.M., Jolly E.R.; Immunolocalization of Anti-Hsf1 to the Acetabular Glands of Infectious Schistosomes Suggests a Non-Transcriptional Function for This Transcriptional Activator. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2014; 8(7): e3051.
- Iuchi S.; Three classes of C2H2 zinc finger proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2001; 58(4): 625-635.
- Jackson A.L., Linsley P.S.; Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nature Reviews Drug Discovery* 2010; 9(1): 57-67.
- Jamieson A.C., Wang H., Kim S.-H.; A zinc finger directory for high-affinity DNA recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1996; 93(23): 12834-12839.
- Jordan P.; The biology of schistosomes; from genes to Latrines. *Trends in Parasitology* 1987; 4(12): 361-362.
- Kalinna B.H., Brindley P.J.; Manipulating the manipulators: advances in parasitic helminth transgenesis and RNAi. *Trends in Parasitology* 2007; 23(5): 197-204.
- Kaplan T., Friedman N., Margalit H.; Ab initio prediction of transcription factor targets using structural knowledge. *PLoS Computational Biology* 2005; 1(1): e1.

- Kelly A., Hurlstone A.F.; The use of RNAi technologies for gene knockdown in zebrafish. *Briefings in Functional Genomics* 2011; 10(4): 189-196.
- Klug A.; The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation. *Annual Review Biochemistry* 2010; 79: 213-231.
- Krautz-Peterson G., Bhardwaj R., Faghiri Z., Tararam C.A., Skelly P.J.; RNA interference in schistosomes: machinery and methodology. *Parasitology* 2010; 137(3): 485-495.
- Krautz-Peterson G., Radwanska M., Ndegwa D., Shoemaker C.B., Skelly P.J.; Optimizing gene suppression in schistosomes using RNA interference. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2007; 153(2): 194-202.
- Laity J.H., Lee B.M., Wright P.E.; Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Current Opinion in Structural Biology* 2001; 11(1): 39-46.
- Larsson E., Sander C., Marks D.; mRNA turnover rate limits siRNA and microRNA efficacy. *Molecular Systems Biology* 2010; 6: 433.
- Lawton S.P., Hirai H., Ironside J.E., Johnston D.A., Rollinson D.; Genomes and geography: genomic insights into the evolution and phylogeography of the genus *Schistosoma*. *Parasites and Vectors* 2011; 4:131.
- Levy-Holtzman R., Clos J., Schechter I.; Differences in DNA sequence recognition by the heat-shock factors of *Drosophila melanogaster* and the parasitic helminth *Schistosoma mansoni*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1995; 1264(1): 134-140.
- Liu J., Stormo G.D.; Context-dependent DNA recognition code for C2H2 zinc finger transcription factors. *Bioinformatics* 2008; 24(17): 1850-1857.
- Liu X., Liu J.M., Song Z.Y., Xing R.H., Jin Y.M., Guo Y.H., Li H., Lu K., Shi Y.J., Cheng G.F., Lin J.J.; The molecular characterization and RNAi silencing of SjZFP1 in *Schistosoma japonicum* 2015. *Parasitology Research* 2015; 114(3): 903–911.

- 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* 2001; 25(4): 402-408.
- Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J.; *Molecular Cell Biology*. 5^a Ed. New York 2003. W. H. Freeman and Company. 973 p.
- Lu C., Wu W., Niles E.G., LoVerde P.T.; Identification and characterization of a novel fushi tarazu factor 1 (FTZ-F1) nuclear receptor in *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2006; 150(1): 25-36.
- Lu D., Searles M.A., Klug A.; Crystal structure of a zinc-finger-RNA complex reveals two modes of molecular recognition. *Nature* 2003; 426(6962): 96-100.
- Luo T., McBride J.W.; *Ehrlichia chaffeensis* TRP32 interacts with host cell targets that influence intracellular survival. *Infection and Immunity* 2012; 80(7): 2297-2306.
- Lv Z., Wu Z., Zhang L., Ji P., Cai Y., Luo S., Wang H., Li H.; Genome mining offers a new starting point for parasitology research. *Parasitology Research* 2015; 114(2): 399-409.
- Maciel R.M., Dutra D.L.S, Rumjanek F.D., Juliano L., Juliano M.A., Fantappi  M.R.; *Schistosoma mansoni* histone acetyltransferase GCN5: linking histone acetylation to gene activation. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2004; 133(1): 131-135.
- Malgieri G., Palmieri M., Russo L., Fattorusso R., Pedone P.V., Isernia C.; The prokaryotic zinc-finger: structure, function and comparison with the eukaryotic counterpart. *The Federation of European Biochemical Societies Journal* 2015;
- Martins D.S., Xavier M.F., Masiero F.S., Cordeiro J., Thyssen P.J.; Schistosomiasis in Southern Brazil 17 years after the confirmation of the first autochthonous case. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2015; 48(3): 354-357.
- Matzke M.A., Birchler J.A.; RNAi-Mediated pathways in the nucleus. *Nature Reviews Genetics* 2005; 6(1): 24-35.

- McManus D.P., Bartley P.B.; A vaccine against Asian schistosomiasis. *Parasitology International* 2004; 53(2): 163-173.
- McManus D.P., Hu W., Brindley P.J., Feng Z., Han Z.G.; Schistosome transcriptome analysis at the cutting edge. *Research Focus* 2004; 20(7): 301-304.
- McManus D.P., Loukas A.; Current Status of Vaccines for Schistosomiasis. *Clinical Microbiology Review* 2008; 21(1): 225-242.
- McVeigh P., McCammick E.M., McCusker P., Morphew R.M., Mousley A., Abidi A., Saifullah K.M., Muthusamy R., Gopalakrishnan R., Spithill T.W., Dalton J.P., Brophy P.M., Marks N.J., Maule A.G.; RNAi dynamics in Juvenile *Fasciola* spp. Liver flukes reveals the persistence of gene silencing in vitro. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2014; 8(9): e3185.
- Melman S.D., Steinauer M.L., Cunningham C., Kubatko L.S., Mwangi I.N., Wynn N.B., Mutuku M.W., Karanja D.M.S., Colley D.G., Black C.L., Secor W.E., Mkoji G.M., Loker E.S.; Reduced Susceptibility to Praziquantel among Naturally Occurring Kenyan Isolates of *Schistosoma mansoni*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2009; 3(8): e504.
- Mendonça R.L., Bouton D., Bertin B., Escriva H., Noel C., Vanacker J.M., Cornette J., Laudet V., Pierce R.J.; A functionally conserved member of the FTZ-F1 nuclear receptor family from *Schistosoma mansoni*. *European Journal of Biochemistry* 2002; 269(22): 5700-5711.
- Miller J., McLachlan A.D., Klug A.; Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *The EMBO Journal* 1985; 4(6): 1609-1614.
- Moazeni M., Khoramizadeh M.R., Kordbacheh P., Sepehrizadeh Z., Zeraati H., Noorbakhsh F., Teimoori-Toolabi L., Rezaie S.; RNA-mediated gene silencing in *Candida albicans*: inhibition of hyphae formation by use of RNAi technology. *Mycopathologia* 2012; 174(3): 177-185.

- Mohr S.E., Smith J.A., Shamu C.E., Neumüller R.A., Perrimon N.; RNAi screening comes of age: improved techniques and complementary approaches. *Nature Reviews Molecular Cell Biololy* 2014; 15(9): 591-600.
- Morales M.E., Rinaldi G., Gobert G.N., Kines K.J., Tort J.F., Brindley P.J.; RNA interference of *Schistosoma mansoni* cathepsin D, the apical enzyme of the hemoglobin proteolysis cascade. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2008; 157(2): 160-168.
- Mourão M.M., Dinguirard N., Franco G.R., Yoshino T.P.; Phenotypic screen of early-developing larvae of the Blood Fluke, *Schistosoma mansoni*, using RNA Interference. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2009; 3(8):e502.
- Mummery-Widmer J.L., Yamazaki M., Stoeger T., Novatchkova M., Bhalerao S., Chen D., Dietzl G., Dickson B.J., Knoblich J.A.; Genome-wide analysis of Notch signalling in *Drosophila* by transgenic RNAi. *Nature* 2009; 458(7241): 987-992.
- Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R.; Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 1990; 2(4): 279-289.
- Nunes F.M., Aleixo A.C., Barchuk A.R., Bomtorin A.D., Grozinger C.M., Simões Z.L.; Non-Target Effects of Green Fluorescent Protein (GFP)-Derived Double-Stranded RNA (dsRNA-GFP) Used in Honey Bee RNA Interference (RNAi) Assays. *Insects* 2013; 4(1): 90-103.
- Oliveira G., Franco G.R., Verjovski-Almeida S.; The Brazilian contribution to the study of the *Schistosoma mansoni* transcriptome. *Acta Tropica* 2008; 108(2-3): 179-182.
- Pavletich N.P., Pabo C.O.; Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1Å. *Science* 1991; 252 (5007): 809-817.
- Pellegrino J. Siqueira A.F.; A perfusion technic for recovery of *Schistosoma mansoni* from experimentally infected guinea pigs. *Revista Brasileiras de Malariologia e Doenças Tropicais* 1956; 8: 589-597.

- Pereira T.C., Evangelista C.C.S., Borges G., Zanotti-Magalhães E.M., Magalhães L.A., Lopes-Cendes I.; Applications of RNA Interference in Schistosomiasis: Gene Function Identification and Development of New Therapies. *ISRN Parasitology*, 2013; 2013: 1-10.
- Pereira W.R., Kloos H., Crawford S.B., Velasquez-Melendez J.G., Matoso L.F., Fujiwara R.T., Cançado G.G., LoVerde P.T., Correa-Oliveira R., Gazzinelli A.; *Schistosoma mansoni* infection in a rural area of the Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil: analysis of exposure risk. *Acta Tropica* 2010; 113(1): 34-41.
- Peterson N.A., Hokke C.H., Deelder A.M., Yoshino T.P.; Glycotope analysis in miracidia and primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*: Differential expression during the miracidium-to-sporocyst transformation. *International Journal of Parasitology* 2009; 39(12): 1331-1344.
- Platt T.R., Brooks D.R.; Evolution of the schistosomes (Digenea: Schistosomatoidea): the origin of dioecy and colonization of the venous system. *Journal of Parasitology* 1997; 83(6): 1035-1044.
- Protasio A.V., Tsai I.J., Babbage A., Nichol S., Hunt M., Aslett M.A., De Silva N., Velarde G.S., Anderson T.J., 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.; A systematically improved high quality genome and transcriptome of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2012; 6(1): e1455.
- Qiu C., Liu S., Hong Y., Fu Z., Wei M., Ai D., Lin J.; Molecular characterization of thyroid hormone receptor beta from *Schistosoma japonicum* and assessment of its potential as a vaccine candidate antigen against schistosomiasis in BALB/c mice. *Parasites and Vectors* 2012; 5: 172.
- Ramalho-Pinto F.J., Gazzinelli G., Howells R.E., Mota-Santos T.A., Figueiredo E.A., Pellegrino J.; *Schistosoma mansoni*: Defined system for stepwise transformation of cercaria to schistosomule in vitro. *Experimental Parasitology* 1974; 36(3): 360-372.

- Rey L.; Parasitologia. Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 3ª Ed. Rio de Janeiro 2007. Guanabara Koogan. 856 p.
- Rinaldi G., Morales M.E., Alrefaei Y.N., Cancela M., Castillo E., Dalton J.P., Tort J.F., Brindley P.J.; RNA interference targeting leucine aminopeptidase blocks hatching of *Schistosoma mansoni* eggs. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2009; 167(2): 118-126.
- Ririe K.M., Rasmussen R.P., Wittwer C.T.; Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction. *Analytical Biochemistry* 1997; 245(2):154-60 (1997).
- Rocha E.A., Valadão A.F., Rezende C.M., Dias S.R., Macedo A.M., Machado C.R., Fantappiè M.R., Rumjanek F.D., Goes A.M., Gomes D.A., LoVerde P.T., Drummond M.G., Franco G.R.; Identification of a new *Schistosoma mansoni* SMYB1 partner: putative roles in RNA metabolism. *Parasitology* 2013; 140(9): 1085-1095.
- Schnorrer F., Schönbauer C., Langer C.C., Dietzl G., Novatchkova M., Schernhuber K., Fellner M., Azaryan A., Radolf M., Stark A., Keleman K., Dickson B.J.; Systematic genetic analysis of muscle morphogenesis and function in *Drosophila*. *Nature* 2010; 464(7286): 287-291.
- Schwanhäusser B., Busse D., Li N., Dittmar G., Schuchhardt J., Wolf J., Chen W., Selbach M.; Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 2011; 473(7347): 337-342.
- Simpson A.J., Sher A., McCutchan T.F.; The genome of *Schistosoma mansoni*: isolation of DNA, its size, bases and repetitive sequences. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1982; 6(2): 125-137.
- Sledz C.A., Holko M., de-Veer M.J., Silverman R.H., Williams B.R.; Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nature Cell Biology* 2003; 5(9): 834-839.

Skelly P.J., Da'dara A., Harn D.A.; Suppression of cathepsin B expression in *Schistosoma mansoni* by RNA interference. *International Journal for Parasitology* 2003; 33(4): 363-369.

Štefanić 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.; RNA Interference in *Schistosoma mansoni* schistosomula: selectivity, sensitivity and operation for Larger-Scale screening. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2010; 4(10): e850.

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006. Nobel Media AB 2014. Disponível em: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/Acessado_em: 8 de outubro de 2015.

Shi Y., Berg J.M.; Specific DNA-RNA hybrid binding by zinc finger proteins. *Science* 1995; 268(5208): 282-284.

Tran M.H., Freitas T.C., Cooper L., Gaze S., Gatton M.L., Jones M.K., Lovas E., Pearce E.J., Loukas A.; Suppression of mRNAs encoding tegument tetraspanins from *Schistosoma mansoni* results in impaired tegument turnover. *PLoS Pathogens* 2010; 6(4): e1000840.

Tran M.H., Pearson M.S., Bethony J.M., Smyth D.J., Jones M.K., Duke M., Don T.A., McManus D.P., Correa-Oliveira R., Loukas A.; Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis. *Nature Medicine* 2006; 12(7): 835-840.

Valadão A.F., Fantappie M.R., LoVerde P.T., Pena S.D., Rumjanek F.D., Franco G.R.; Y-box binding protein from *Schistosoma mansoni*: interaction with DNA and RNA. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2002; 125(1-2): 47-57.

Verjovski-Almeida S., DeMarco R., Martins E.A., Guimarães P.E., Ojopi E.P., Paquola A.C., Piazza J.P., Nishiyama M.Y.J., 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., Marques R.C., Miyasato P.A., et al.; Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. *Nature Genetics* 2003; 35(2): 148-157.

Verjovski-Almeida S., Leite L.C., Dias-Neto E., Menck C.F., Wilson R.A.; Schistosome transcriptome: insights and perspectives for functional genomics. *Trends in Parasitology* 2004; 20(7): 304-308.

9. Anexo

9.1- Padronização dos iniciadores utilizados nos ensaios de RT-qPCR para validação do silenciamento dos transcritos de SmZF1

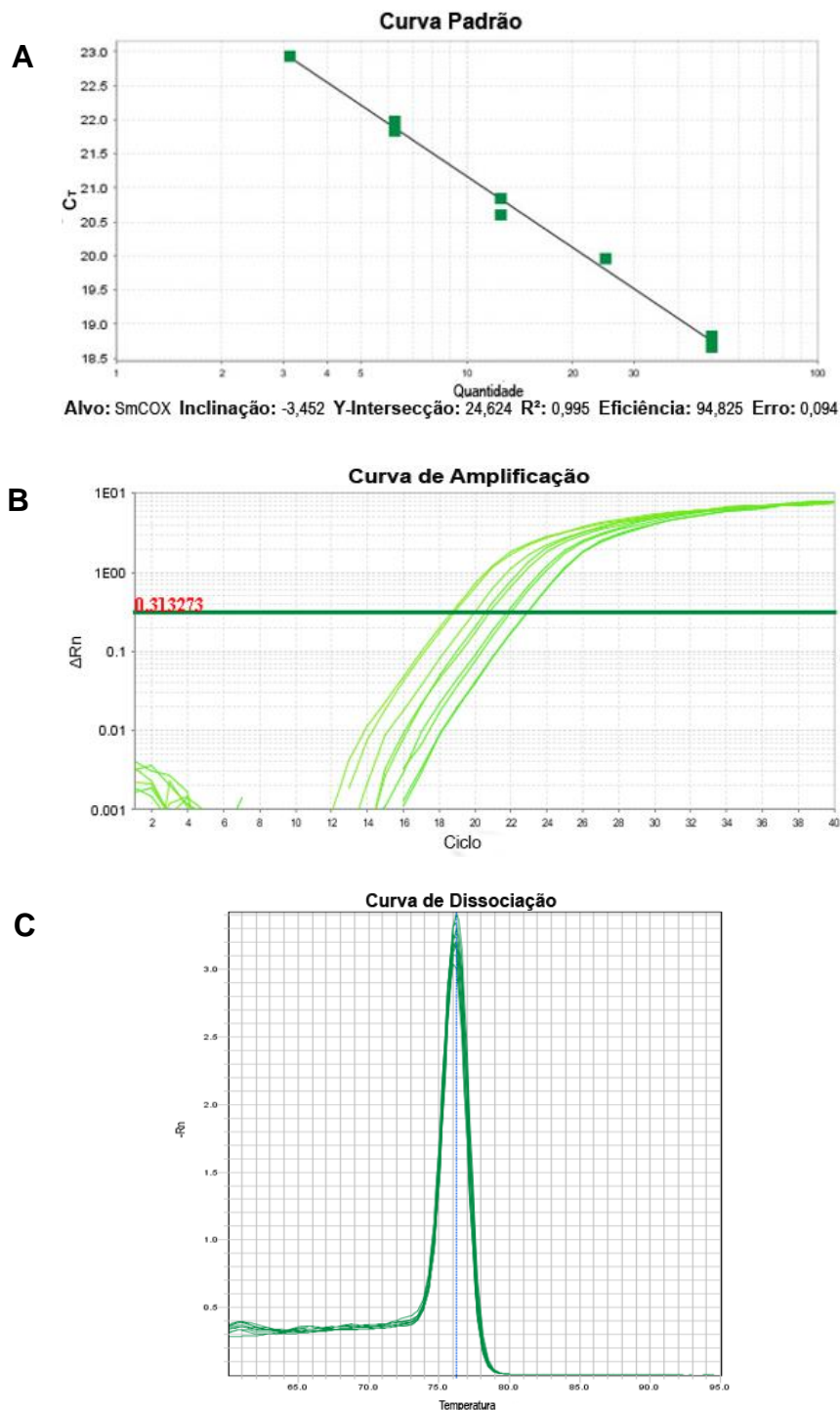


Figura Anexo 1 - Padronização dos iniciadores desenhados para SmCOX1. **A** - Curva padrão gerada com quantidades decrescentes de cDNA (de 50 ng até 3,125 ng). Abaixo do gráfico estão os cálculos da eficiência, da inclinação da reta e do coeficiente de determinação da reta (R^2). O eixo-y representa os C_T s e o eixo-x a quantidade de cDNA. **B** - Curva de amplificação do cDNA em concentrações decrescentes. O eixo-y representa o ΔRn (Repórter normalizado) e o eixo-x representa os ciclos da reação. **C** - Curva de dissociação. O eixo-y representa o $-\Delta F/\Delta T$ (Mudança na fluorescência/mudança na temperatura) e o eixo-x representa a temperatura.

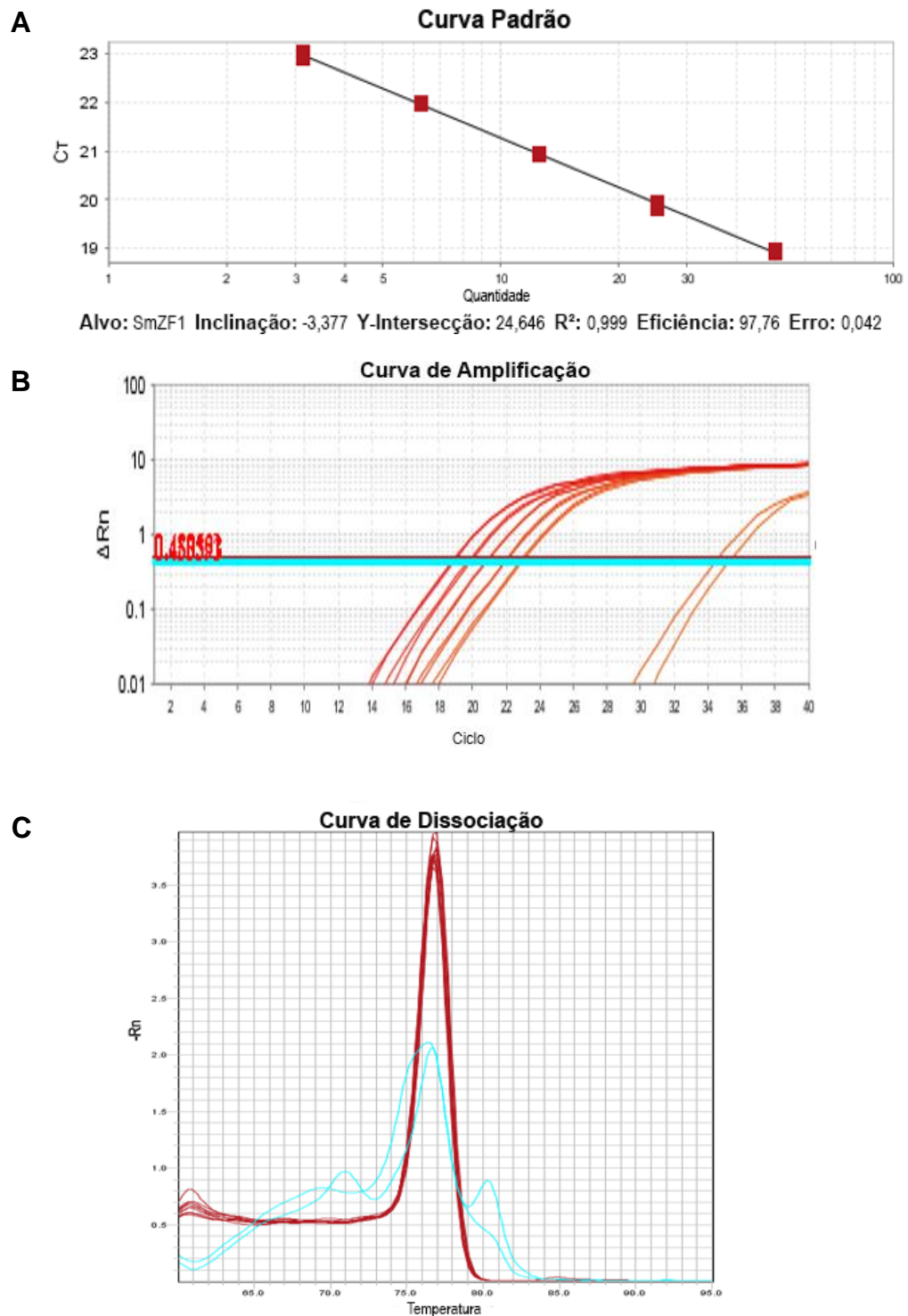


Figura Anexo 2 - Padronização dos iniciadores desenhados para SmZF1. **A** - Curva padrão realizada com quantidades decrescentes de cDNA (de 50 ng até 3,125 ng). Abaixo do gráfico estão os cálculos da eficiência, da inclinação da curva e do coeficiente de determinação da reta (R^2). O eixo-y representa os C_T e o eixo-x a quantidade de cDNA. **B** - Curva de amplificação do cDNA em concentrações decrescentes. O eixo-y representa o ΔR_n (Repórter normalizado) e o eixo-x os ciclos da reação. **C** - Curva de dissociação. O eixo-y representa o $-\Delta F/\Delta T$ (Mudança na fluorescência/mudança na temperatura) e o eixo-x representa a temperatura.

9.2- Padronização dos iniciadores utilizados nos ensaios de RT-qPCR para avaliação de efeito *off-target*

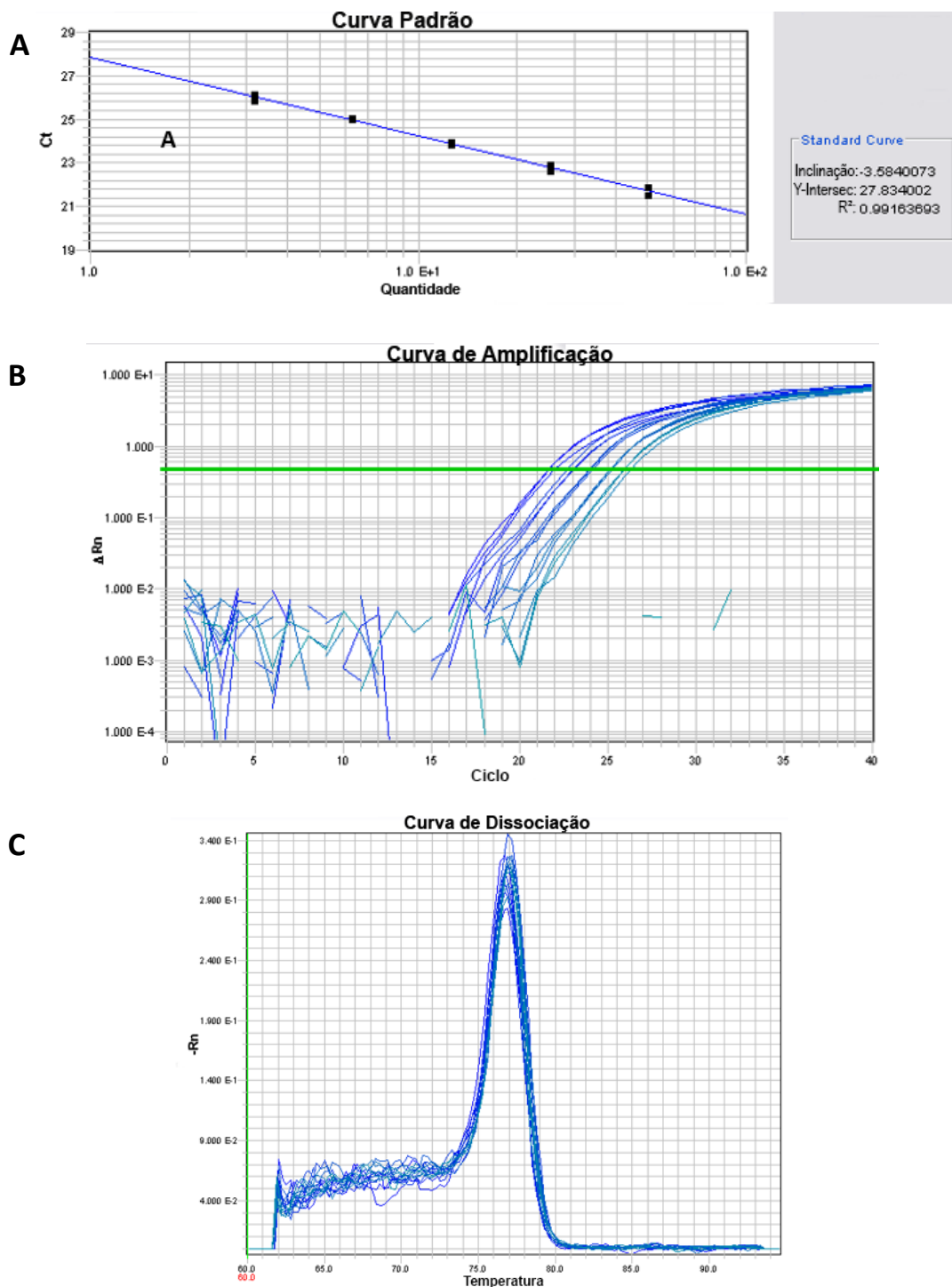


Figura Anexo 3 - Padronização dos iniciadores desenhados para GAPDH de *S. mansoni*. **A** - Curva padrão realizada com quantidades decrescentes de cDNA (de 50 ng até 3,125 ng). Abaixo do gráfico estão os cálculos da eficiência, da inclinação da curva e do coeficiente de determinação da reta (R²). O eixo-y representa os C_Ts e o eixo-x a quantidade de cDNA. **B** - Curva de amplificação do cDNA em concentrações decrescentes. O eixo-y representa o ΔRn (Repórter normalizado) e o eixo-x os ciclos da reação. **C** - Curva de dissociação. O eixo-y representa o -ΔF/ΔT (Mudança na fluorescência/mudança na temperatura) e o eixo-x representa a temperatura.

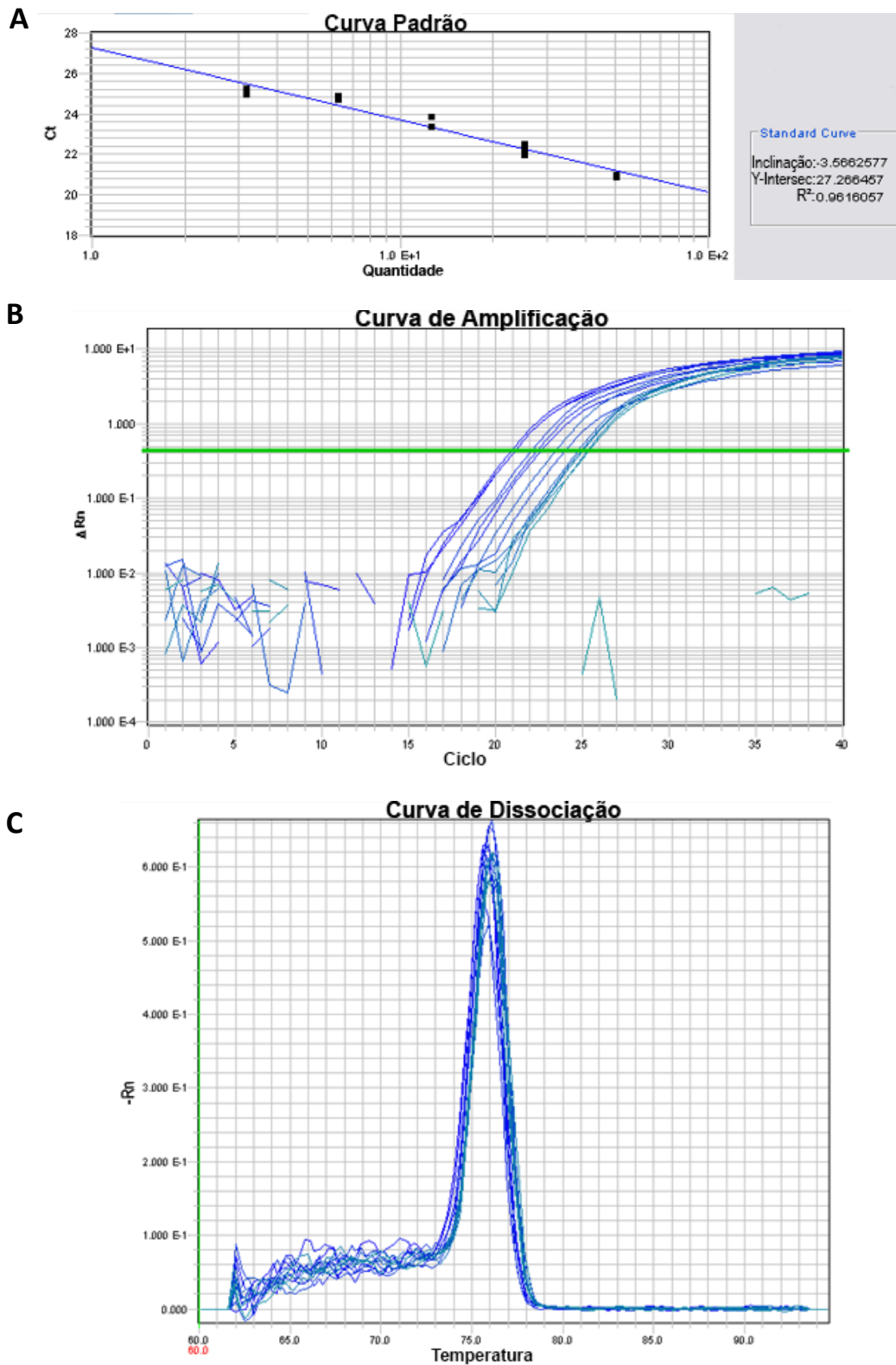


Figura Anexo 4 - Padronização dos iniciadores desenhados para SmCOX1. **A** - Curva padrão realizada com quantidades decrescentes de cDNA (de 50 ng até 3,125 ng). Abaixo do gráfico estão os cálculos da eficiência, da inclinação da curva e do coeficiente de determinação da reta (R^2). O eixo-y representa os C_T s e o eixo-x a quantidade de cDNA. **B** - Curva de amplificação do cDNA em concentrações decrescentes. O eixo-y representa o ΔRn (Repórter normalizado) e o eixo-x os ciclos da reação. **C** - Curva de dissociação. O eixo-y representa o $-\Delta F/\Delta T$ (Mudança na fluorescência/mudança na temperatura) e o eixo-x representa a temperatura.

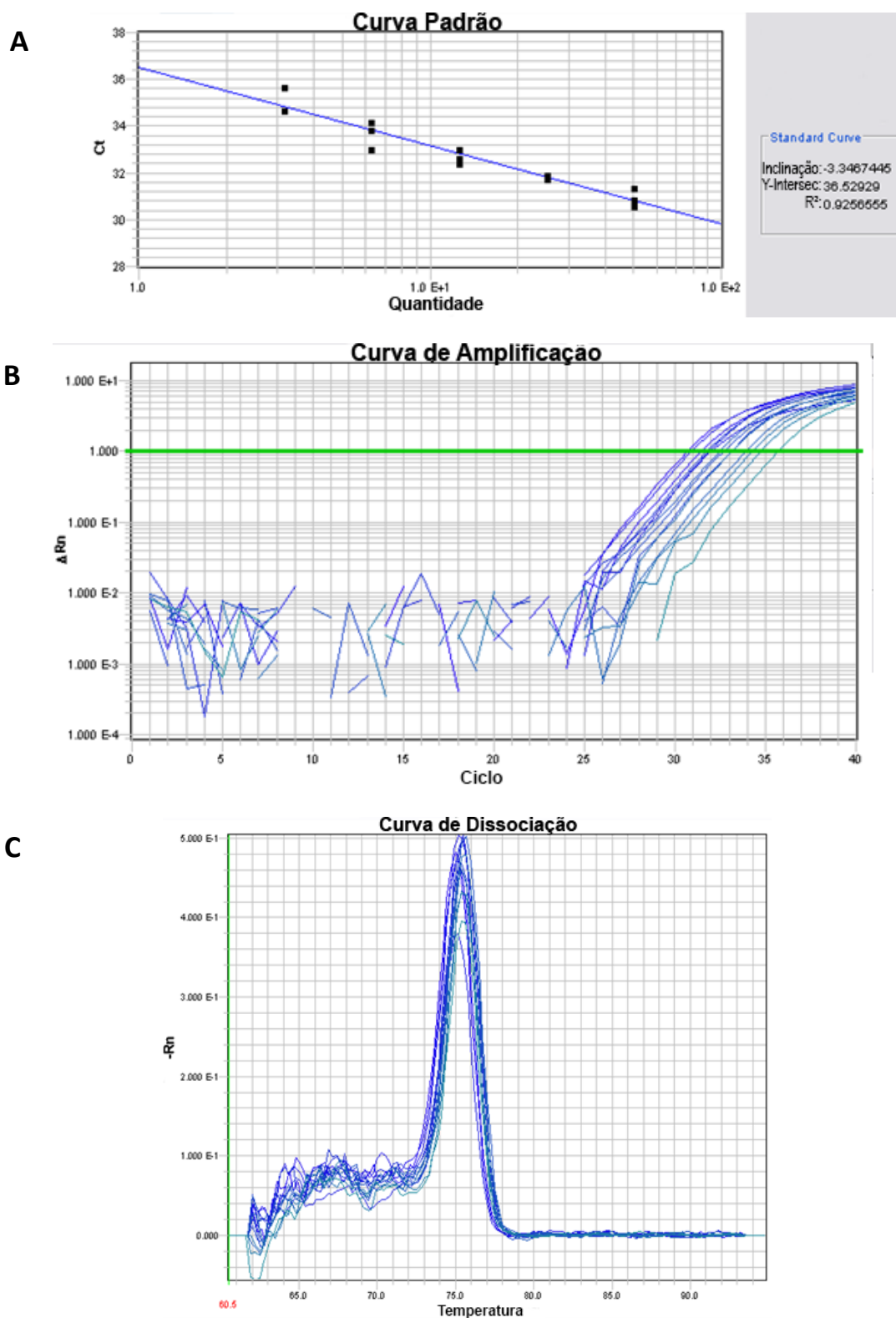


Figura Anexo 5 - Padronização dos iniciadores desenhados para SMYB1. **A** - Curva padrão realizada com quantidades decrescentes de cDNA (de 50 ng até 3,125 ng). Abaixo do gráfico estão os cálculos da eficiência, da inclinação da curva e do coeficiente de determinação da reta (R^2). O eixo-y representa os C_T s e o eixo-x a quantidade de cDNA. **B** - Curva de amplificação do cDNA em concentrações decrescentes. O eixo-y representa o ΔRn (Repórter normalizado) e o eixo-x os ciclos da reação. **C** - Curva de dissociação. O eixo-y representa o $-\Delta F/\Delta T$ (Mudança na fluorescência/mudança na temperatura) e o eixo-x representa a temperatura.

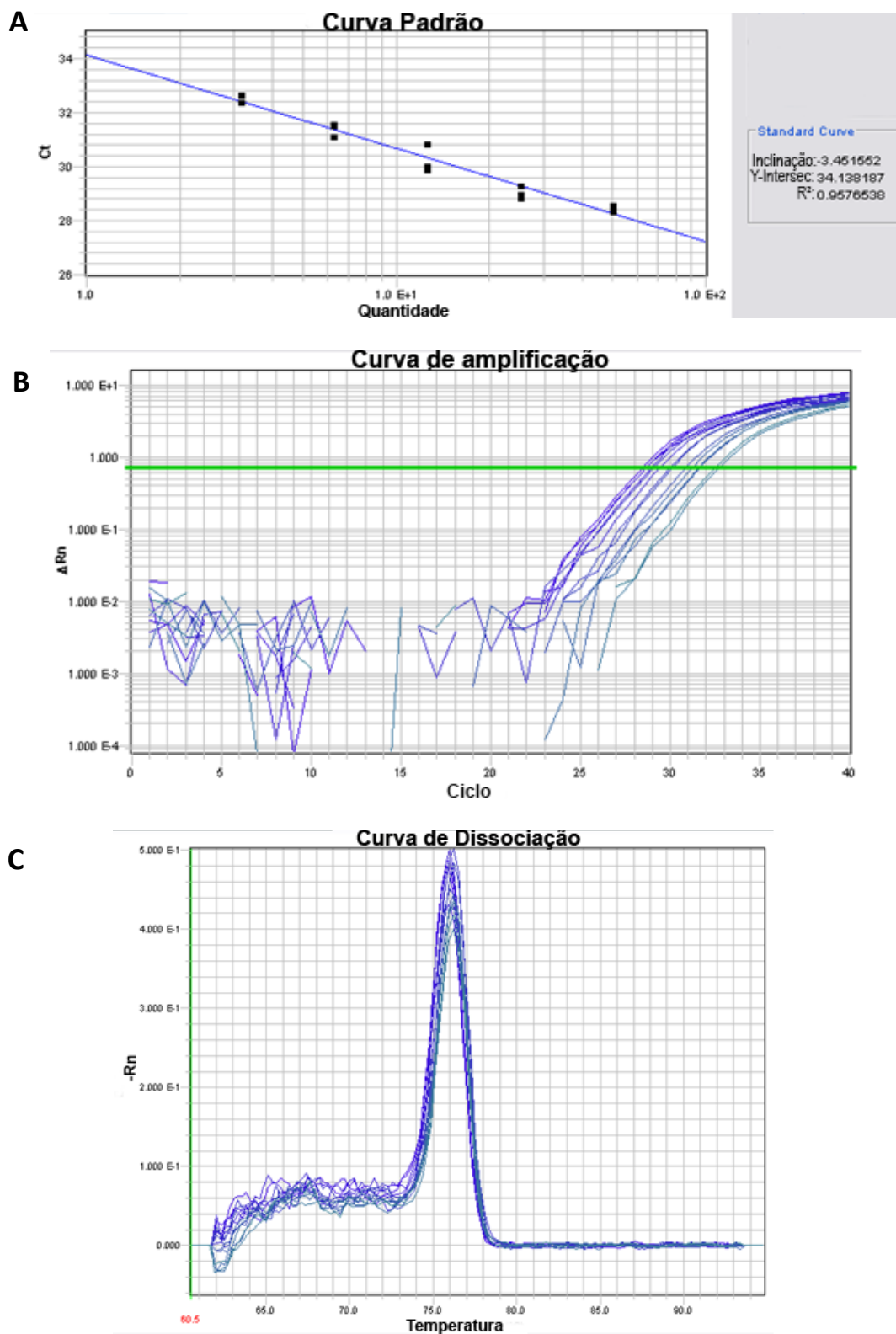


Figura Anexo 6 - Padronização dos iniciadores desenhados para Alfa-Tubulina. **A** - Curva padrão realizada com quantidades decrescentes de cDNA (de 50 ng até 3,125 ng). Abaixo do gráfico estão os cálculos da eficiência, da inclinação da curva e do coeficiente de determinação da reta (R^2). O eixo-y representa os C_{TS} e o eixo-x a quantidade de cDNA. **B** - Curva de amplificação do cDNA em concentrações decrescentes. O eixo-y representa o ΔRn (Repórter normalizado) e o eixo-x os ciclos da reação. **C** - Curva de dissociação. O eixo-y representa o $-\Delta F/\Delta T$ (Mudança na fluorescência/mudança na temperatura) e o eixo-x representa a temperatura.

9.3- Padronização dos iniciadores utilizados nos ensaios de RT-qPCR para avaliação dos genes Smp_065180 e Smp_030710

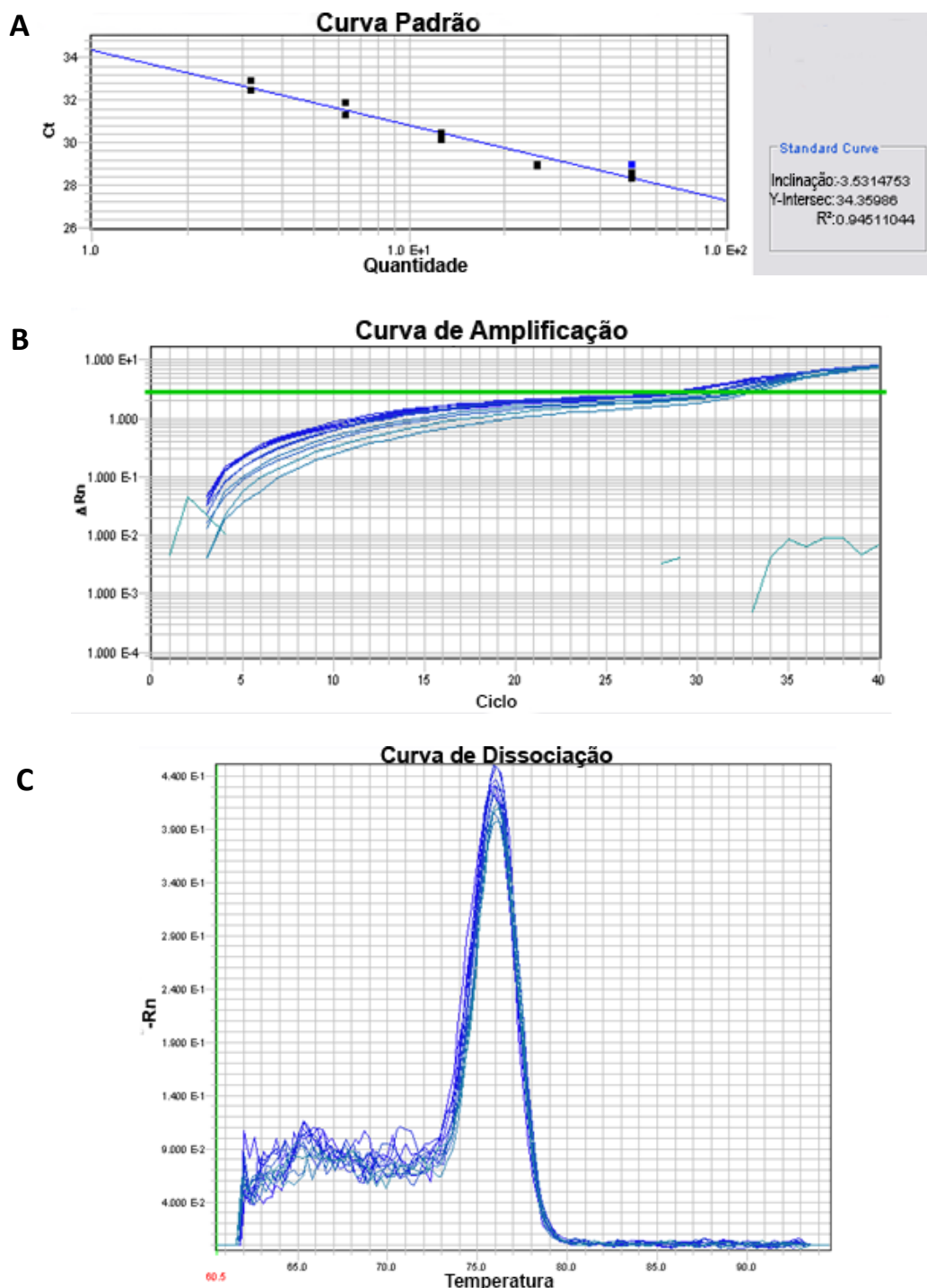


Figura Anexo 7 - Padronização dos iniciadores desenhados para Smp_030710. **A** - Curva padrão realizada com quantidades decrescentes de cDNA (de 50 ng até 3,125 ng). Abaixo do gráfico estão os cálculos da eficiência, da inclinação da curva e do coeficiente de determinação da reta (R^2). O eixo-y representa os C_T s e o eixo-x a quantidade de cDNA. **B** - Curva de amplificação do cDNA em concentrações decrescentes. O eixo-y representa o ΔRn (Repórter normalizado) e o eixo-x os ciclos da reação. **C** - Curva de dissociação. O eixo-y representa o $-\Delta F/\Delta T$ (Mudança na fluorescência/mudança na temperatura) e o eixo-x representa a temperatura.

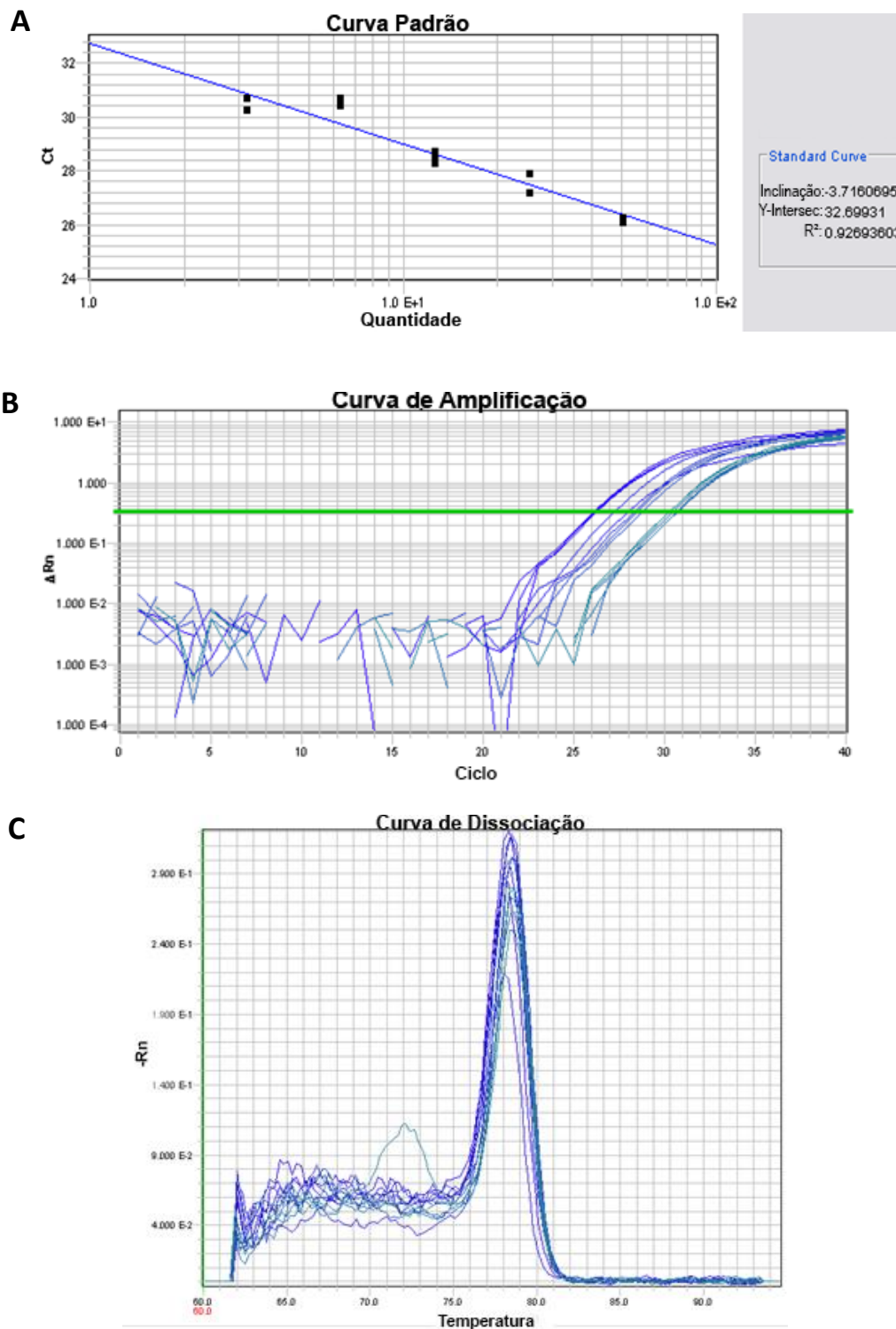


Figura Anexo 8 - Padronização dos iniciadores desenhados para Smp_065180. **A** - Curva padrão realizada com quantidades decrescentes de cDNA (de 50 ng até 3,125 ng). Abaixo do gráfico estão os cálculos da eficiência, da inclinação da curva e do coeficiente de determinação da reta (R^2). O eixo-y representa os C_{TS} e o eixo-x a quantidade de cDNA. **B** - Curva de amplificação do cDNA em concentrações decrescentes. O eixo-y representa o ΔRn (Repórter normalizado) e o eixo-x os ciclos da reação. **C** - Curva de dissociação. O eixo-y representa o $-\Delta F/\Delta T$ (Mudança na fluorescência/mudança na temperatura) e o eixo-x representa a temperatura.

9.4- Sequência de nucleotídeos das regiões promotoras e dos genes Smp_030710 e Smp_065180, que possivelmente são alvos de regulação por SmZF1

TCGTTTGTCCAGACAGAAAATCAGAAACGAAGCGAAGTCACGAACGGTAGAAGGCAAGCG
TGCAAACTTCTGTTTCGCTTCGGTTCGCTTCTCACCTACCGCCTTTCATTTTGAATGTTTG
 GAGTCATATCGACAAGTAAAAAATGGTGAGTCTGATATGATGATCGAGGTGAGCGATGG
 ATACGCATACGCTGATGTAACAAACAGTCCAGTTCATAAGCGAATGACTGTGTTGGGCCA
 GTGAAATGTCACTGAACCCTAGCCAAATCATCCGGCAGTTGGGTCACTGAATATCGAACT
 GATCATCGATCAAAATGTGACTGAAGAAAAATAAATGAATTAGTCTATCCGGGAGCTAGA
 ATTGCTCTGTGTTGGGCTTGATATAGTACCACATACCCTTAAGTTTTACAAGGTATCTCCTG
 GTTATATCGTACTTAAATATTAGTCACATAATTATCTATCCATTTTTACAGAACATTTCC
 GAAAGATGTTTCCCTTGTTTACACCTTTTTATTAATTAATCGCTTCTAAAAGTAGTGAGCTG
 TCGGTGGTGATCATGATACAAGTCGACCTGTGGTTCGTTACACGAATAATGAAATAAGCA
 GTCAGCTCTCCATATCAACTTGACGGAACAGTTCTCGGTGAGAACAATGTCATCGAAATG
 TTGTGAAATATCCTTCATTAGGTCTGAAAGCATTAAAATGGATTCCACATGGAACGTTA
 AGAAAAATGAGGAGTATAAATTCGCTTTTGAGGTTTGAACGACGAGCGTAACATACCCA
 CTGGTGACCTGACTTGAATACGTGATCGAGCACCTTCATCTACAGAGTGTCCAATAAAAC
 TAATAAGGTTGACATAAATGTGCAAACTTACGAACTACTTATTTTCATGTATTTATTTA
 CTGCTGCACCTAACCTAAAAGTTTAAATTTATTGAAAGTTGGATTGGCCAGAGAGCCCTTTC
 AGTTCAAAATTGACGCGGGTAAAGCGTCTTCAACGTTTCAGATGTCTGGTCAAAGTGATCT
 TGATCGTCAAATCGAACAAATTAAGGGCATGTAAACTTATTACGGAAGACGAAGTAAAAGC
 TCTATGTGCAAAAGCCAGGGAGATCCTTATTGAAGAAAGCAATGTGCAGTGCAGTAGATTC
 TCCGGTTACAGTAAGTTGCATTAGATTTAGTAACTATCCCTAGGTATGTGGTGATATTC
 TGGACAGTTCTACGATTTAATCGAATTTGTTCAAGGTTGGTGGAGATGTACCGGACACTAA
 CTATCTCTTCCCTCGGTGATTTTGTGATCGCGGATATCACAGCGTCGAGACATTCCTTCT
 TCTCCTTGCACTGAAGGTAAATAAATTTTCTTGTGTTTCAATTTGTGTAGGTCAGTTCCCA
 GACGAATTACACTCATACGAGGAAACCATGAAAGTTCGGCAGATAACAATGGTTTACGGA
 TTTTATGAAGA**ATG**TCTGAGGAAGTACGGCTCAGCGATGGTCTGGCGACAATGTACTGAG
 ATATTTGATTATCTGTGCCTTCTGCTATTATCGACGGAAGGGTAAGTAAATATAAAGCA
 TGCTTAAATACTATTTGCGCATTCAAAAAACTGCAAGTTTTGCATTTGTAGGAATACGTT
 ATGATTAATTGTTATTAGTGCACAGTTTGTGCTCATGAGAGGTTTAAACAGGCAAAACGAAT
 GTAGCGAGTATCGGAACTCAAGTTATGTCGCTGTTAGATTTGTTGTTGTGGACGCTAAC
 TCGCTGTTTGGAGTGACGCTCCACTCTGTCAGAACCCTTAATCTATACATGAAATCTTAC
 CTATTTCCAAAAATGTGGACACGCCATAAAATTAAGTGATTCTGCAAACTTTAAAGTTCC
 TTCTCATGATCCTGTCAATATCCTTAATTCATGCTATAGGTAGGAGATGCCCATAAAG
 TACCATCCGATTCCTGTCATTTGTCACGTGCAACTTGTAGGAGTTGAGATACTGTAAAG
 ATTTTTTAGGTTAGATTTCTTATTTATATGCTTCGATCATTATTAGTAGTGTAGACCATC
 TATGTCGAATAATTGGAGGCTTACTCGAGTTAGACGGGAACGGGTGTAACGAACAATCTAA
 CTTCGAAATCACACCCCGCGGTGAGCATTAACCGTGGATTACCCCATTCGACGTATTAAG
 GTACTATGCTGCGTCAAGATTGTATAATACAAGGAGCATTATTGCGTAAATCTATTAG
 TAAGAATGAATACAGAGATGTTAATGAGACCACCTCCGAATGAGCCAGTCCATGGATTAT
 GATTAACGATGCGCATTTTGTGTTGCTTACTTTAACAGGGATCGATAATGTGTTTCGAT
 ATTCAGTGACCCAACCTCCGGATGATTTGGCTAGTGACATTTCACTGCCGCTACAATGGC
 TAGGTCATGCAACATCTGTTACTGGATGGTTATTTTATGTACATAAATTTAGTCATACAT
 ACATTCACTACAACCTTCTCTATCACAGTACTGGTAAAATTTCCAGTACCTTAGATTTTATG
 TTGTCGATGCTTCAAATACATATTTGTTAACAAGTAAAATACTTTCCCTTAACTTGCTGTA
 ATGCTACAATTTATGCAATGAGGATTCGTTTTGATGTGGGAAATTCGTGCGATCTACAT
 TTCTGTAGGGTCCCATGTCAATTATGACTATGTGATTCTTCCCTTCGGGTTTCATATTTTT
 CTAACAAGTAACTCATTTCGATATTACTATCGTGTCACTTCCCCTTATAAAAAATCACAAA
 ACTAACATTTCTTTTTTATAATTCATAATTACTGTAATTCGTTTGAATTTATTTTCTTA
 TCACTCAAGTGGGAATAACATGGGTATATTCATAAAGTGAAAAGTTTCTCTGGTCTAAT
 TTTTTGAATTCGATTAGTTTATTTTATCTGTTAACGTACACAAGTGTAGTTTCTATTATC
 ATGGATACCAACCTAAATATTTTAAATGTCTCGTCCAAAAGTATGTCCAGTTTAAATAACA
 AATGCATTTATGAATGTTTTTCCCTTGATAAGATATTTTGTGTTTCATGGAGGCCTATCACC
 TACAATTACAACATTTGGATCAAATCCGTACCATTGATCGTAAACAGGAAGTCCCACATGA

Figura Anexo 9 - Sequência de nucleotídeos do gene Smp_030710. A região marcada em verde e amarelo é referente a dois sítios sobrepostos de ligação da proteína SmZF1 presentes na região promotora deste gene. A região marcada em vermelho é referente ao sítio ATG de início da tradução.

AACTGAGTCAAGGAAGTTTGACACTGATTTTAACCATACTTTCAAATAAGACTCGTCAA
 ACATAACGCTATATATGCTGTAAATTTTTATGGCATTAAACATACAATATTGAATGAAGT
 AAATACTATCTATTCATCTATCTGTCCATCCACATTGTAAGTAAAGGTAACCATCGAACA
 ACGAATTTTTTCGTACACTTTAAAGATTTATTTCTGTCCCTTTTTGCGTTATTTGTGGAC
 TGTATTGGTATTTACTGTGTCTCACGATGACTTTACCCTCTAGGGACTTCCTATCATCTT
 GGATGTCTTTAGTGAGGCCCTTCATTTTGACGTCAATTAGGTTGGACGATGTTATCG
 ACGGGCTCACCACCTTTAGTTGCCCGAGATCGGACTCCAGTTACATCGTATGATTATCGTC
 ACTGAAATACACATATCGCCAATCTTCTTACATAATCGCATTGTGAATAACTGAATTAA
 ATAAGTCATATACGAGGATGAAGTTTTGAATACGTATATTTTGTACACTGATTGATCTCG
ACAGACAATCAGAGGGTCGAAGCGAAGGAATAGAAGAAAAGGAAGCGAAGCGAAATGACA
 CTCAGTGGAAAAAGCATGTGAACAACTCGATTTATTCAAGCGTTAATTAATTTTATGG
 TCACACAAAAATAAGCTACAGACATGTGATGAGTAGTATGAGATGTACACACACATACAT
 CCATACAAAAACAACCAAGCTTGATAAGTAAATAATCAACAAGACCAAGACGTGAATCAA
 GAATAATGGATAAAATGGCCGTCCAGAAGCTCGAATAAGTTATGGGGTTAACATAGTA
 ACCGACACTACATTTCAAACATAACTTTAGAAGAGCCACTAATCTGACACAGCATCATGT
 ACCTCTAAATAGTGTAAACGAATTACATGGCCGAGATCTGGCGTCTTACTATGCTTTATC
 AAAATAAGTACCTAAGCAATTTTTGGTTTTTGTGCACGTGATCACAACTTGAAGATCTC
 TTTAGGGTACGATCGTCATTTAAATTCGCGATGTTAAGCGCTTTAAAAAATTCAGACC
 AAAGGATCAGGAGGTGTACGACAATGTAATTGATGGGCTTGAAAAATGTACTTTAAAAA
 ATTACTTCCCTCGAAAAATTTGTACAAATTCATGATTTCCACTCACCTCCGCTTGAAAA
 AAGCGACTTCGAATCGAAGCCAATGGTTTTGCTTATTGGTCAATATTCACCCGAAAAAC
 AACTTTTATACGTTACCTGATTGGTGAAGACTTTCCCTGGCATCCGAATTGGTCCCGAGCC
 GACCACAGATAGCTTCATAGCCGTCATGAACGATGCAAGGAGCGGGATTATTCCTGGAAA
 TGCTCTTGTAATGGATTATTCAAAGCAGTTTAGACCTCTTCTAAATTTGGAAACGGTTT
 TTTGAATCGTTTTCAGTGTGCGCACATGCCCAATGGTGTTTGGATGGGATAACGTTTTAT
 TGATACACCTGGTATTTGAGTGGCGAAAAGCAACGTGTCGATCGTGGTTACGACTCTC
 CAAATTTGGATATATCGGACGAATTCGCGGAGTTATCGAAGTTTTAAAGGTACGATTTTC
 TGATATTTTGGTAATTGAGTTAAAGCTACCCAATCTCCTCATTTCGGGGAAGCCGCTATA
 GAAAAATTTGGGAAAATAGCACAAAATTCCTAAAATTTGCTTCAGATCTGGGGAAGACCAT
 TGGAATTTGGGAAAACCCCAAAATAGGGAGATTGTTTTTTCATTGCACCTGTACTCGTG
 TAGTACTCTTTCCAAATATATTTCCCTCAGAATCTTTCAGAATCAAAGTGGTCAATTAA
 ATACTCAGTTCGAGGCAATTGTTTCGTTGCTCATGCTAGGATTAGCGTCCCTATTTTTAT
 TCTGAATGACTGCTTCCAGTTTTAAGTGATCACCTCTTTAAAAAGTTATGAAATTCGCAA
 ATATATCAAAGGAGTGTACTTTGTTACTTCAGATCAGAATCTTCATAAGTTACCTGTAT
 ATATGTTAAAGTCAGGCTGTTAATATTAGAATAAAAATACTGTTTTCACTCCCTCAGTGA
 ACAGTAGCCAAGGTGAGTCATCCGAAAGTGATTGTCACGGTGAAATCTGACTAGATTTA
 TAACGTTTTGAAAGTAAAAGACATGGACTTCTAGTATTGTTGCTTTTCGATGTGATGTCAG
 ATTACGAGCACTTCACTTATGTATATATGAAAAATGGTCATACCTAATCTTGTGCGTCAA
 ATCTAACTTGGAAATCCAAACACCCCTCATTAGACATCATGAAGCCCCAGTTCATAGTG
 TGGTTCCATCTTGTTTATATCTTGTGGTTTTGGTCACTTAGTTTTTGAATGCGAATCCT
 ATTATAGTAACTCGTGTTTTGAGAAAAATTAAGCTGGATACACTCCCTTATTGATTTCC
 TACATTTATTTCTGTTTTATTTGGTGATAAAGAGCTTCATTGGGGGGTGCAAATATCCAA
 AGCTAGTAGTTTACAAGACAAAATCAAATTAGTTCGCTTAACATAGATGTTATTCATTTCC
 CTATCTTGTTTTAGAAATCTTATAGTTTTAGCTTTTTAAAAATTCGAAGTTTTTGTAAATG
 CATGACTCTAAACTAACGGTGTGTTTTTTATTTCCCTAATAAACGTTTATCTGTTGATCAG
 GTTGGCCACGATAATGTAACGATTATTTTTTTTATAGTAATATCTTAAAAACACTTAATCA
 ACGCTAAAGTTACAATTATGTTCTGAGACATTACTGTGCTTATCGCGGATAAATTTGAACC
 TCTACGCAAGATAATTGTAATCAATAGCTAGATGATGTTTGTCCCAAAGTATAGACTCG
 GAACGGGTCATCAATTCATTTGCCCTCAAGCTTTACTCCTCTCTATTTTTATCTTCTCCA
 GTTATTGATTACTTTTTGGTTTTTTTTCCAATAATCTACCTTTTCCGCTCAGTTACTCTTAT
 TAACCGACACACCTAAACGCTTATCTGGTACAAATTTGCATGAATTTACTGTAAGTCAT

Figura Anexo 10 - Sequência de nucleotídeos do gene Smp_065180. A região marcada de verde e a região marcada de amarelo são referentes, respectivamente, ao primeiro e segundo sítio de ligação da proteína SmZF1 presentes na região promotora deste gene. A região marcada em vermelho é referente ao sítio ATG de início da tradução.