

## Resumo

Atualmente, interferência por RNA (RNAi) é a única metodologia de genética reversa disponível em *Schistosoma sp.*, pois as técnicas de nocaute e super-expressão gênica ainda não são possíveis de serem realizadas nesse parasita. Apesar do silenciamento gênico por RNAi estar sendo mais comumente utilizado, existe muito que se aprimorar para sua aplicação em larga escala em parasitas helmintos. No presente estudo, 33 genes foram selecionados para silenciamento, incluindo fatores de transcrição, moléculas de sinalização, enzimas metabólicas e anti-oxidantes. Estes alvos foram escolhidos, em sua maioria, devido a sua alta expressão na fase larval do parasita, e/ou pelo seu possível envolvimento no processo de desenvolvimento do organismo, como é o caso das enzimas anti-oxidantes, que parecem estar envolvidas na manutenção do equilíbrio redox celular em *Schistosoma mansoni*, contribuindo para a sobrevivência do parasita no hospedeiro intermediário *Biomphalaria glabrata*.

Neste estudo miracídeos de *S. mansoni* foram transformados *in vitro* e expostos a dsRNAs dos genes alvos por sete dias, durante os quais, mudanças no fenótipo foram observadas, dentre estas: (1) falha ou atraso na transformação, (2) perda de mobilidade, (3) alteração de tamanho e (4) viabilidade. Dentre os fenótipos avaliados, apenas redução de tamanho dos indivíduos foi consistentemente detectado e observado em 11 de 34 tratamentos com dsRNA dos genes SOD, Smad1, RHO2, Smad2, Cav2A, ring box, GST26, calcineurina B, Smad4, lactato desidrogenase e EF1 $\alpha$ . Após sete dias de incubação com dsRNA, apenas 6 tratamentos demonstraram consistente e significativa diminuição nos níveis de transcritos medidos por qRT-PCR. Inesperadamente, a expressão de um dos genes cujos parasitas exibiram um fenótipo tratamento-associado, o gene SOD, foi altamente induzida (~1600 vezes). Variações no nível dos transcritos em consequência do tratamento com dsRNA, também foi evidente em grupos de esporocistos sem fenótipo aparente. Níveis de transcritos de 14 dos 23 grupos tratados com dsRNAs (que não apresentaram fenótipo aparente) foram analisados e, destes, 7 genes exibiram consistente redução no nível de expressão. Resultados demonstraram que a eficácia da utilização da técnica de RNAi é altamente dependente do alvo a ser silenciado, da sequência de dsRNA utilizada e do momento da análise.

Adicionalmente, na tentativa de avaliar a função anti-oxidativa endógena de esporocistos de *S. mansoni*, foi feita a caracterização funcional de algumas enzimas anti-oxidantes do parasita (GST26, GST28, GPx, TPx1/2 e SOD). Foi mostrado através de *Western blot* que tratamentos com dsRNA para EF1 $\alpha$ , GST26 ou TPx1/2 resultaram em significativa diminuição dos níveis proteicos (80%, 90% e 50%, respectivamente), dados corroborados por experimentos de imunolocalização. Experimentos *in vitro* foram conduzidos para determinar o efeito na sobrevivência dos parasitas silenciados para as enzimas anti-oxidantes na presença de concentrações subletais de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Maior susceptibilidade (60-80% de mortalidade após 48 h) ao estresse oxidativo pode ser claramente observado para parasitas silenciados para GST26, GST28, TPx1/2 e GPx, comparado ao controle GFP (~15 % mortalidade). Co-culturas dos parasitas silenciados para as enzimas anti-oxidantes com hemócitos de *B. glabrata* susceptível à infecção pelo *S. mansoni* permitiram avaliar a hipótese de que a redução da habilidade anti-oxidante dos esporocistos aumentaria a sua vulnerabilidade aos níveis sub-letais de ROS normalmente produzidos pelos hemócitos durante o processo de encapsulação. Assim, foi demonstrado que a sobrevivência de esporocistos silenciados para GST26, GST28 e TPx1/2 foi afetada após 24 horas de co-cultura, mostrando um papel significativo de TPxs e GSTs de proteção para sobrevivência do parasita no seu hospedeiro intermediário.

Apesar de RNAi prometer grandes avanços como ferramenta de genômica funcional em estágios larvais de esquistossomas, observamos que tratamentos com dsRNA podem gerar eficiências de silenciamento variáveis, indicando uma necessidade de padronização da técnica de forma gene-específica, como parte essencial do desenho experimental. Adicionalmente, experimentos funcionais com enzimas anti-oxidantes suportam fortemente a hipótese de que a regulação desta classe de enzimas em esporocistos tem uma função direta na proteção contra o estresse oxidativo e contra o ataque citotóxico das células de defesa do hospedeiro.