

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**Caracterização da maquinaria de processamento de miRNAs e piRNAs em
Biomphalaria glabrata e o efeito da infecção por *Schistosoma mansoni* no processo**

por

Fábio Ribeiro Queiroz

Belo Horizonte
Fevereiro / 2015

DISSERTAÇÃO MDIP – CPqRR

F.R. QUEIROZ

2015

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Caracterização da maquinaria de processamento de miRNAs e piRNAs em
Biomphalaria glabrata e o efeito da infecção por *Schistosoma mansoni* no processo

por

Fábio Ribeiro Queiroz

Dissertação apresentada com vistas a
obtenção do Título de Mestre em Ciências na
área de concentração Doenças Infecciosas e
Parasitárias.

Orientação: Dr. Paulo Marcos Zech Coelho
Co-Orientação: Dra. Luciana Maria Silva

Belo Horizonte
Fevereiro / 2015

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

Q3c
2015

Queiroz, Fábio Ribeiro.

Caracterização da maquinaria de processamento de miRNAs e piRNAs em *Biomphalaria glabrata* e o efeito da infecção por *Schistosoma mansoni* no processo / Fábio Ribeiro Queiroz. – Belo Horizonte, 2015.

xix, 99 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 99 - 118

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Esquistossomose mansoni/prevenção & controle 2. *Schistosoma mansoni*/parasitologia 3. MicroRNAs/genética I. Título. II. Coelho, Paulo Marcos Zech (Orientação). III. Silva, Luciana Maria (Coorientação).

CDD – 22. ed. – 616.963

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Caracterização da maquinaria de processamento de miRNAs e piRNAs em *Biomphalaria glabrata* e o efeito da infecção por *Schistosoma mansoni* no processo

Por

Fábio Ribeiro Queiroz

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Paulo Marcos Zech Coelho (Presidente)

Prof. Dra. Deborah Aparecida Negrão Correa

Prof. Dr. Fabiano Sviatopolk Mirsky Pais

Suplente: Prof. Dra. Flora Satiko Kano

Dissertação defendida e aprovada em: 24/02/2015.

“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente, mas o que melhor se adapta às mudanças”

Charles Robert Darwin

1809 a 1882

SUPORTE FINANCEIRO

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Bolsa)

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG – APQ-00467-13)

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Fundação Ezequiel Dias/FUNED

Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

À Deus toda honra e toda glória.

Ao iniciar essa jornada pude conviver com a alegria de estar dando mais um grande passo na direção do meu sonho de ser um grande cientista. Porém, nada teria sido possível ou mesmo tolerável sem a presença constante de Deus guiando meus passos, dos queridos e inseparáveis familiares, dos sempre inquestionáveis amigos e colegas.

O caminho não tem sido fácil, mas com a fé, força, confiança e amor daquela a quem dedico esse trabalho, minha amada MÃE Luíza de Fátima Ribeiro Queiroz, que sem medir nenhum tipo de esforço, lutou para que nada viesse a faltar, mesmo diante das inúmeras adversidades. Ainda lembro, com os olhos por transbordar, o dia em que, aos 16 anos de idade, tive que deixar minha querida São João do Pacuí para estudar na tão acolhedora Montes Claros, ouvi no calor da despedida minha mãe dizer, comigo envolto em seus braços, “DEUS ABENÇOE MEU FILHO, VÁ COM DEUS, TUDO VAI DAR CERTO”.

Ainda falta um pouco mamãe! Mas Deus tem guiado meu caminho e por ele espalhado seus anjos para me guiar. Me atrevo a citar alguns como minha tia Conceição, Dona Mércia, Wilson, meu querido amigo Éwerton Gomes Oliveira (Piu), com quem tive a honra de conviver, estudar e admirar. Sem vocês a jornada não teria se iniciado.

Deus ainda me honrou mais do que eu um dia irei merecer, ao colocar em minha vida, anjos que tenho a felicidade de poder os chamar de Pai, Mãe, Vó e Tia, a você Rui (Companheiro), Suely, Dona Maria e Mércia, que Deus os abençoe grandemente. Vocês irão para todo o sempre habitar meu peito.

Cabe aqui ainda um agradecimento em especial ao meu grande amigo, compadre e por que não dizer irmão Aristeu Silva Neto que tanto tem me ajudado nessa caminhada, com seu sempre inquestionável companheirismo.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Biologia Celular da Funed, Flávia, Letícia, Heloísa, Josiane, Milene, Rita, Isabela, Bryan, Nikole, Rodrigo, Thuane e principalmente aquela que é a culpada pela minha presença em Belo Horizonte, aquela que apostou (importou) em um recém formado, imaturo e apaixonado por ciência, lá do norte de Minas. A você minha querida e eterna orientadora Luciana Maria Silva o meu mais que obrigado.

Ao Dr. Paulo Marcos Zech Coelho, querido orientador com quem tive a honra de trabalhar e aprender não só com seu conhecimento infindável e contribuição científica, mas também com o homem honrado, e sempre ao lado dos seus.

Falando ainda de orientadores, tenho a honra de estar ao lado de um ser humano sem precedentes, que tanto enobrece esse trabalho quanto me honra com sua sempre disponível e enorme contribuição científica, além é claro de ser um exemplo a ser seguido. Você Dr. Elio Hideo Babá é um presente de Deus nessa jornada. Ao Dr. Matheus de Souza Gomes não existem palavras para agradecer, com sua humildade e capacidade extrema se estabeleceu como um dos grandes pilares desse trabalho e se tornou um dos meus exemplos a serem seguidos como profissional.

Meu querido amigo Wander de Jesus Jeremias com quem tenho a honra de dividir a bancada e aprender a cada momento de conversa, um grande exemplo. Meus queridos amigos e colegas do Laboratório de Esquistossomose da Fiocruz, Flávia pela ajuda de sempre, Gardênia, Clarice, Viviane, Thaís, Áureo, Jussara, Ana Karine, Cristina, Neuza, Vanessa, Nathalie, Wagner, Suliene, Patrícia, Ana Carolina, Rafaela e Diana, muito obrigado por me tolerar.

Aos meus irmãos Jonas Henrique Ribeiro Rabelo e Maria Mercês Ribeiro Rabelo que tanto amo e me motivam a seguir no caminho correto e com responsabilidade, obrigado por estarem sempre disponíveis com carinho, amor e um grande sorriso no rosto. Ao meu pai Paulo Henrique Ramos Rabelo, com quem tive a honra de aprender a ser um homem melhor, honesto e digno, te amo muito e espero que Deus me dê mais oportunidades na vida de poder lhe abraçar e demonstrar o quanto é importante.

Por fim, gostaria de agradecer a Deus por colocar em meu caminho aquela que tem sido mais que uma companheira, meu porto seguro, minha rainha Dayane Andriotti Otta. Cada dia ao seu lado tem sido mais que especiais, tem sido aqueles que não quero que acabem e durem para sempre. Amo você! Você é a responsável por me dar o maior de todos os presentes possíveis, o nosso amado filho, nosso príncipe Davi Otta Queiroz. A você meu filho, desejo todas as Bênçãos do nosso Senhor Jesus Cristo, que ele o guie e proteja a cada passo dado em sua vida. Você é a razão do meu maior sorriso.

Agradeço a Deus pela honra de poder contar com todos vocês meus queridos familiares, parentes, amigos e colegas, que o Senhor em sua infinita bondade possa lhes recompensar com toda sorte de Bênçãos.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	ESQUISTOSSOMOSE MANSONI	20
1.2	INTERAÇÃO PARASITO HOSPEDEIRO	23
1.3	PEQUENOS RNAs	26
1.4	BIOGÊNESE DOS PEQUENOS RNAs	28
2	JUSTIFICATIVA	32
3	OBJETIVOS	33
3.1	OBJETIVO GERAL	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4	METODOLOGIA	34
4.1	CARAMUJOS	34
4.2	EXTRAÇÃO DE mRNA E PCR	34
4.3	ANÁLISE <i>IN SILICO</i>	35
4.3.1	ANÁLISE DE DOMÍNIOS CONSERVADOS	35
4.3.2	ANÁLISE FILOGENÉTICA	36
4.3.3	SEQUENCIAMENTO	36
4.3.4	MONTAGEM DE CONTIGS	37
4.4	ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA	37
5	RESULTADOS	38
5.1	ANÁLISE <i>IN SILICO</i>	38
5.2	ANÁLISE DE DOMÍNIOS CONSERVADOS	40
5.3	ALINHAMENTO GLOBAL E ANÁLISE FILOGENÉTICA	51
5.4	DESENHO DE PRIMERS	58
5.5	SEQUENCIAMENTO DOS AMPLICONS	60
5.6	EXPRESSÃO GÊNICA	63
6	DISCUSSÃO	86
6.1	ANÁLISE <i>IN SILICO</i>	86
6.2	EXPRESSÃO GÊNICA	88
6.2.1	EXPRESSÃO GÊNICA DOS GENES DA MAQUINARIA DE PEQUENOS RNAs NOS DIFERENTES TEMPOS DE DESENVOLVIMENTO	90

	6.2.2 EXPRESSÃO GÊNICA DOS GENES DA MAQUINARIA DE PEQUENOS RNAs NOS DIFERENTES TEMPOS DE INFECÇÃO	92
7	CONCLUSÕES.....	95
8	PERSPECTIVAS.....	98
9	REFERÊNCIAS	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo evolutivo das espécies de <i>Schistosoma</i>	21
Figura 2: Via de biogênese dos miRNAs	29
Figura 3: Alinhamento global do domínio PIWI das proteínas Ago-like e Piwi-like	52
Figura 4: Alinhamento global dos domínios Riboc das proteínas Dicer e Drosha	54
Figura 5: Árvore filogenética para as preditas proteínas Bgl-Argonauta Bgl-Piwi	56
Figura 6: Árvore filogenética para as preditas proteínas Bgl-Drosha e Bgl-Dicer	57
Figura 7: Eletroforese em gel de agarose 2 % para avaliação dos produtos de PCR referentes aos iniciadores dos genes da maquinaria de pequenos RNAs	59
Figura 8: Curva padrão para o ensaio de eficiência do gene Argonauta	63
Figura 9: Curva padrão para o ensaio de eficiência do gene Drosha	64
Figura 10: Curva padrão para o ensaio de eficiência do gene Exportina 5	64
Figura 11: Curva padrão para o ensaio de eficiência do gene Piwi	65
Figura 12: Curva padrão para o ensaio de eficiência do gene Tudor	65
Figura 13: Curva padrão para o ensaio de eficiência do gene Mioglobina	66
Figura 14: Curva padrão para o ensaio de eficiência do gene Dicer	66
Figura 15: Curva padrão para o ensaio de eficiência do gene SPN	67

Figura 16: Curva padrão para o ensaio de eficiência do gene Loquacious	67
Figura 17: Curva padrão para o ensaio de eficiência do gene Partner de Drosha	68
Figura 18: Curva padrão para o ensaio de eficiência do gene TDRD	68
Figura 19: Curva padrão para o ensaio de eficiência do gene FMR	69
Figura 20: Expressão do gene Argonauta em relação aos tempos de desenvolvimento considerando o tempo desova como calibrador	70
Figura 21: Expressão do gene Drosha em relação aos tempos de desenvolvimento considerando o tempo desova como calibrador	71
Figura 22: Expressão do gene Piwi em relação aos tempos de desenvolvimento considerando o tempo desova como calibrador	72
Figura 23: Expressão do gene Exportina 5 em relação aos tempos de desenvolvimento considerando o tempo desova como calibrador	72
Figura 24: Expressão do gene Tudor em relação aos tempos de desenvolvimento considerando o tempo desova como calibrador	73
Figura 25: Expressão relativa do gene Argonauta nos diversos tempos de infecção de <i>B. glabrata</i> com o <i>S. mansoni</i>	76
Figura 26: Expressão relativa do gene Drosha nos diversos tempos de infecção de <i>B. glabrata</i> com o <i>S. mansoni</i>	78
Figura 27: Expressão relativa do gene Piwi nos diversos tempos de infecção de <i>B. glabrata</i> com o <i>S. mansoni</i>	80
Figura 28: Expressão relativa do gene Exportina 5 nos diversos tempos de infecção de <i>B. glabrata</i> com o <i>S. mansoni</i>	82
Figura 29: Expressão relativa do gene Tudor nos diversos tempos de infecção de <i>B. glabrata</i> com o <i>S. mansoni</i>	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Proteínas das vias de miRNA e piRNA em organismos modelo	38
Tabela 2: Posicionamento dos preditos genes em <i>B. glabrata</i>	39
Tabela 3: Preditos genes e proteínas das vias de miRNAs e piRNAs de <i>B. glabrata</i>	40
Tabela 4: Similaridade entre Bgl-Argonata e suas ortólogas de organismos Protostômios e Deuterostômios	41
Tabela 5: Similaridade entre Bgl-Piwi e suas ortólogas de organismos Protostômios e Deuterostômios	42
Tabela 6: Similaridade entre Bgl-Drosha e suas ortólogas de organismos Protostômios e Deuterostômios	43
Tabela 7: Similaridade entre Bgl-Dicer e suas ortólogas de organismos Protostômios e Deuterostômios	44
Tabela 8: Domínios conservados para Bgl-Argonata e seus ortólogos	45
Tabela 9: Domínios conservados para Bgl-Piwi e seus ortólogos	46
Tabela 10: Domínios conservados para Bgl-Drosha e seus ortólogos	48
Tabela 11: Domínios conservados para Bgl-Dicer e seus ortólogos	49
Tabela 12: Primers dos genes da maquinaria de pequenos RNAs em <i>B. glabrata</i>	58
Tabela 13: Sequências obtidas do sequenciamento e processadas por CAP3	61
Tabela 14: Preditas proteínas de <i>B. glabrata</i> e seus ortólogos em <i>D. melanogaster</i> e <i>C. elegans</i>	62

Tabela 15: Expressão gênica para os genes da maquinaria de Processamento de pequenos RNAs nos diferentes tempos de desenvolvimento	74
Tabela 16: Expressão gênica relativa para Argonauta nos diferentes tempos de infecção	77
Tabela 17: Expressão gênica relativa para Drosha nos diferentes tempos de infecção	79
Tabela 18: Expressão gênica relativa para Piwi nos diferentes tempos de infecção	81
Tabela 19: Expressão gênica relativa para Exportina 5 nos diferentes tempos de infecção	83
Tabela 20: Expressão gênica relativa para Tudor nos diferentes tempos de infecção	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µl – Micro Litro

aa – Aminoácido

BLASTp – Software que promove alinhamento da proteína de interesse contra um determinado banco de dados de proteínas

BLASTx – Software que encontra proteínas através de sequências de nucleotídeos

cDNA – DNA complementar

CI – Intervalo de Confiança

Ct – Ciclo Threshold (Ponto da reação de PCR em que o ciclo está no limiar da fase exponencial)

D – Ácido aspártico

DEAD-box – Proteínas RNA Helicases que apresentam a sequência de aminoácidos

D-E-A-D (Ácido aspártico–Ácido Glutâmico–Alanina– Ácido aspártico)

DGCR8 – Região 8 Crítica do Gene da Síndrome DiGeorge

DNA – Ácido Desoxidoribonucléico

E – Ácido glutâmico

EXP5 – Exportina 5

FMR – Proteína “Retardo Mental Ligado ao X Frágil”

H – Histidina

ID – Identidade

M – Molar

mg – Mili Grama

Mg²⁺ – Íon Magnésio

miRNA – Micro RNA

ml – Mili Litro

NCBI – Centro Nacional de Informação Biotecnológica dos Estados Unidos da América

NOS – Espécies Reativas de Nitrogênio

°C – Graus Célsius

OMS – Organização das Nações Unidas

P – Valor p

PA – Puro (100%)

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PFAM – Protein Families Databases

piRNA – Pequeno RNA Associado a PIWI

Q – Glutamina

R² – R quadrado

RAN-GTP – Proteína que se liga à guanosina trifosfato para transportar RNA através da membrana nuclear até o citoplasma

RefSeq – Banco de dados do NCBI contendo apenas sequências referência

REST – Software para análise de dados de expressão gênica

Riboc – Domínio catalítico ribonucléico

RISC – Complexo de Silenciamento Induzido de RNA

RNA – Ácido Ribonucléico

RNAm – RNA Mensageiro

RNase – Enzima que Processa RNA

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

RS – Rio Grande do Sul

shRNA – Pequeno RNA em forma de grampo

siRNA – Pequeno RNA de Interferência

SPN – Proteína “Spindle”

T0 – Tempo Zero

T1 – Tempo um

T2 – Tempo dois

T3 – Tempo três

T4 – Tempo quatro

T5 – Tempo cinco

T6 – Tempo seis

T7 – Tempo sete

TDRD – Proteínas Contendo o Domínio Tudor

RESUMO

A Organização Mundial de Saúde estima que cerca de 240 milhões de pessoas, em 78 países, necessitam de tratamento para esquistossomose, uma doença crônica causada por trematódeos do gênero *Schistosoma*. No Brasil, o *Schistosoma mansoni* é o único representante deste gênero, cuja passagem pelo hospedeiro invertebrado, caramujos do gênero *Biomphalaria*, é obrigatória antes de infectar um hospedeiro mamífero, entre eles o homem. A interação parasito-hospedeiro invertebrado é complexa, podendo o grau de susceptibilidade do caramujo à infecção variar desde extremamente permissivo até completamente resistente. Com o genoma e transcriptoma de *B. glabrata* disponíveis, o estudo de genes relacionados à regulação da expressão gênica, principalmente aqueles responsáveis pela maquinaria de processamento de miRNAs e piRNAs poderão auxiliar no entendimento da biologia do vetor *B. glabrata* bem como sua relação como o parasito *S. mansoni*. Alguns aspectos da interação parasito-hospedeiro invertebrado continuam pouco explorados, incluindo a participação dos pequenos RNAs não codificadores de proteínas como miRNAs, siRNAs e piRNAs. Utilizando ferramentas de bioinformática e PCR quantitativa, buscamos identificar e caracterizar a maquinaria de processamento de miRNAs e piRNAs em *B. glabrata*. Nosso trabalho demonstra que a maquinaria necessária para o processamento destas moléculas está ativa em *B. glabrata* com expressão gênica diferencial dos genes Argonauta, Drosha, Piwi, Exportina 5 e Tudor em diferentes estágios de desenvolvimento do animal bem como durante a infecção pelo *S. mansoni*. As análises de bioinformática utilizadas nesse trabalho mostraram a alta conservação dos genes envolvidos na maquinaria de miRNAs e piRNAs utilizando análise e distribuição de domínios conservados, análise de resíduos do sítio catalítico bem como análise filogenética. Estes dados sugerem que a maquinaria de silenciamento mediada por miRNAs e piRNAs interferem na biologia do caramujo durante todo o seu ciclo de vida, além de contribuir, de maneira ainda indefinida, na relação *B. glabrata/S. mansoni*. Estudos mais detalhados necessitarão ser realizados para confirmar a participação das preditas proteínas da via de miRNAs e piRNAs na relação parasito/hospedeiro, principalmente sua participação efetiva em seus genes alvos, uma vez que o parasito *S. mansoni* não possui expressa a via de piRNAs em seu genoma.

ABSTRACT

The World Health Organization (WHO) estimates that about 240 million people in 78 countries require treatment for schistosomiasis, a chronic disease caused by trematodes of the genus *Schistosoma*. In Brazil, the *Schistosoma mansoni* is the only representative specie, whose passage through the invertebrate host, snails of the genus *Biomphalaria*, is mandatory before infecting a mammalian host, including humans. The interaction between the invertebrate host and the parasite is complex and the degree of susceptibility of the snail to infection ranges from extremely permissive to completely resistant. With the genome and transcriptome of *B. glabrata* available, the study of genes related to the regulation of gene expression, particularly those responsible for miRNAs and piRNAs processing machinery may assist in vector biology understanding *B. glabrata* well as its relation to the parasite *Schistosoma mansoni*. Some aspects of this interaction are still poorly explored, including the participation of small RNAs not protein-coding as miRNAs, siRNAs and piRNAs. Using bioinformatics tools and quantitative PCR, we seek to identify and characterize the processing machinery of miRNAs and piRNAs in *B. glabrata*. Our work shows that the protein machinery required for processing these molecules are active at the level of gene transcription in *B. glabrata* with a differential expression of the genes Argonata, Drosha, Piwi, Exportin 5 and Tudor in different developmental stages and also during infection with *S. mansoni*. The bioinformatics analysis used in this study showed the high conservation of genes involved in miRNAs and piRNAs machinery using analysis and distribution of conserved domains, the catalytic site residue analysis and phylogenetic analysis. These data suggest that the silencing machinery mediated by miRNAs and piRNAs interfere in the snail biology throughout its life cycle, and contribute, even indefinitely, in relation *B. glabrata*/*S. mansoni*. More detailed studies need to be performed to confirm the participation of the predicted proteins of miRNAs and piRNAs pathway in the parasite/host relationship, mainly their effective participation in their target genes, since the parasite *S. mansoni* has not expressed the piRNAs pathway in its genome.

1 INTRODUÇÃO

1.1 ESQUISTOSSOMOSE MANSONI

Com ocorrência em 78 países da África, América do Sul, Ásia e Caribe, afetando mais de 240 milhões de pessoas a esquistossomose é uma doença negligenciada com alto índice de morbidade segundo a OMS, sendo portanto um grande problema de saúde pública. Em 2008 estimava-se em 30 milhões de pessoas no Brasil vivendo em áreas de risco de transmissão, com 8 milhões de infectados pelo *Schistosoma mansoni* Sambom, 1907, (Brasil, 2008; Oms, 2014). Segundo dados atuais parciais do Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose e Geohelmintos, apresentados no XXIII Congresso Brasileiro de Parasitologia e III Encontro de Parasitologia do Mercosul em outubro de 2013, até o presente momento, estima-se que cerca de 1,5 milhão de pessoas, com prevalência de 4,17%, encontram-se infectadas por *S. mansoni* no Brasil

A esquistossomose é uma doença crônica causada por trematódeos dígenéticos do gênero *Schistosoma* (Weinland, 1858), ocorre principalmente em localidades sem saneamento ou com saneamento básico inadequado. A infecção acontece através da penetração ativa das formas infectantes do *S. mansoni* pela pele e mucosas quando o homem entra em águas contaminadas. O ciclo de transmissão (Figura 1) da doença ocorre quando hospedeiros mamíferos infectados, principalmente o homem, excretam os ovos do parasita pelas fezes, que após atingirem o ambiente aquático, induzem a eclosão dos miracídeos que infectam os caramujos *Biomphalaria*, hospedeiros invertebrados. Nestes os parasitos, por reprodução assexuada, liberam as cercarias, larvas infectantes do *S. mansoni* nas coleções hídricas utilizadas pelos seres humanos e outros mamíferos (Figura 1). No Brasil, a esquistossomose foi descrita pela primeira vez por Pirajá da Silva em 1908, é endêmica e considerada um grave problema de saúde pública (Sire *et al.*, 2001; Brasil, 2008; Coelho *et al.*, 2008).

Certamente os agentes etiológicos das esquistossomoses chegaram às Américas por intermédio de escravos trazidos da África durante o período de colonização e imigrantes asiáticos (Caldeira *et al.*, 2009). Com estes indivíduos, várias espécies de *Schistosoma* foram introduzidas no continente, entretanto apenas a espécie *Schistosoma mansoni*, encontrou hospedeiros intermediários susceptíveis, moluscos aquáticos do gênero *Biomphalaria*. No Brasil o gênero *Biomphalaria* é composto por dez espécies e uma subespécie, sendo que apenas três espécies foram encontradas naturalmente

infectadas pelo *S. mansoni*: *Biomphalaria glabrata* (Say, 1918), *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835), e *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) (Coelho *et al.*, 2008; Caldeira *et al.*, 2009).

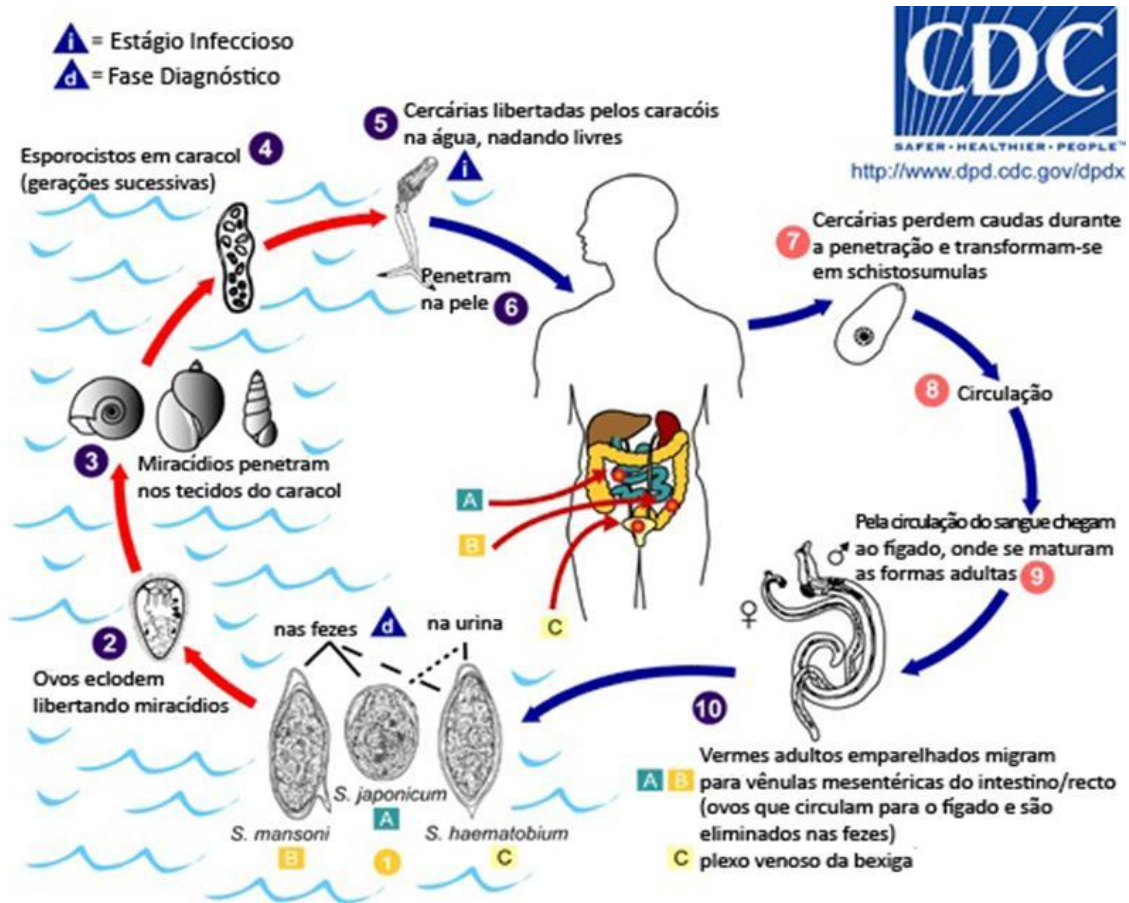


Figura 1: Ciclo evolutivo das espécies de *Schistosoma*. 1 - Ovos eliminados nas fezes de hospedeiros mamíferos infectados, em contato com coleções hídricas, 2 - liberam larvas ciliadas, denominadas miracídeo, 3 - infectantes para os hospedeiros invertebrados, no caso caramujos *Biomphalaria*. 4 - Nos caramujos, os parasitos se desenvolverão até originarem as 5 - larvas denominadas cercárias, 6 - infectantes para mamíferos, e que saem ativamente para fora do caramujo para coleção hídrica 6, 7 e 8 cercárias atingem a circulação do indivíduo atingem o fígado e se desenvolvem em vermes adultos. A: *Schistosoma japonicum*; B: *Schistosoma mansoni*; C: *Schistosoma haematobium*; FONTE: modificado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Schistosomiasis.htm>.

Os principais sintomas da esquistossomose mansoni são decorrentes da resposta do organismo frente à presença dos ovos do parasito nos tecidos e normalmente são representados por fortes dores abdominais, diarreia e eventualmente sangue nas fezes. Em casos avançados da doença é comum o fígado e o baço se encontrarem aumentados (Oms, 2014).

O diagnóstico é realizado através da procura dos ovos do parasito nas fezes do hospedeiro vertebrado e o método de escolha preconizado pela OMS para essa finalidade é o Kato-Katz (Katz *et al.*, 1972; Oms, 2014). Porém, o método Kato-Katz não é tão

efetivo em indivíduos com baixas cargas parasitárias, requerendo novas técnicas de maior sensibilidade, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real, que apesar do alto custo e dificuldade de utilização em campo, se desponta como uma ótima alternativa em casos de dúvida diagnóstica ou como controle de cura (Espírito-Santo *et al.*, 2014).

Coelho e colaboradores (2009) propôs um novo método diagnóstico baseado na sedimentação dos ovos do *S. mansoni* em gradiente salino, que se mostrou mais sensível que o Kato-Katz para áreas de baixo índice de transmissão da esquistossomose mansoni (Coelho *et al.*, 2009). Outros métodos apresentam alta sensibilidade, mas ainda não se encontram, assim como o gradiente salino, padronizados para uso como método de escolha. É o caso dos métodos enzimáticos baseados em Elisa (Grenfell, Martins, Drummond, *et al.*, 2013; Grenfell, Martins, Enk, *et al.*, 2013; Grenfell *et al.*, 2014).

Existem evidências de que a esquistossomose esteja interagindo com outras doenças aumentando a morbidade destas (Secor, 2012; McClure *et al.*, 2014). Recentemente um paciente com carcinoma urogenital foi detectado com ovos de *Schistosoma sp* na medula óssea, ele possuía histórico de esquistossomose 20 anos antes quando esteve no Vietnã, área com alta prevalência desta doença (Jones e Leday, 2014). Além disso, *Schistosoma haematobium* está associado ao desenvolvimento de carcinoma na bexiga (Honeycutt *et al.*, 2014).

No controle a transmissão da esquistossomose inúmeras técnicas são empregadas, sendo que sua maioria como medidas de controle do hospedeiro intermediário. Evitar o contato com águas contaminadas e fazer uso de águas tratadas bem como a educação para a saúde se despontam como as principais medidas de controle e combate à esquistossomose (Evan Secor, 2014; Oms, 2014).

O uso de moluscidas vem sendo constantemente sugerido para situações de alta prevalência da doença e com grande presença caramujos susceptíveis (Treyvaud *et al.*, 2000; Dos Santos *et al.*, 2007; Fabri *et al.*, 2014; Martins *et al.*, 2014; Pereira Filho *et al.*, 2014). Marques e colaboradores (2014) demonstraram a possibilidade de controlar a transmissão da esquistossomose através da introdução de espécies resistentes de caramujos em locais de alta endemicidade, onde os caramujos resistentes à infecção pelo *S. mansoni* ao realizar a fecundação cruzada com outros indivíduos susceptíveis transferem a estes o caractere de resistência, que é dominante, método eficiente e que não

confere prejuízos ao ambiente como os moluscicidas (Marques *et al.*, 2014). Uma vacina infelizmente ainda não é uma realidade para a esquistossomose, embora avanços importantes tenham sido feitos (Fonseca *et al.*, 2012; You e Mcmanus, 2014).

Como forma de tratamento da esquistossomose a OMS preconiza o uso do Praziquantel, que por ser totalmente eficiente contra todas as espécies de *Schistosoma* e apresentar um custo baixo é a droga de escolha. Em alguns países toda a população infectada de áreas endêmicas é tratada como medida profilática. Contudo, o controle da esquistossomose depende de um saneamento básico eficiente, da educação em saúde para a população e escolares, além do tratamento dos infectados e controle das populações planorbídicas (Coeli *et al.*, 2013; Oms, 2014).

1.2 INTERAÇÃO PARASITO HOSPEDEIRO

Os moluscos apresentam um sistema inato de defesa contra potenciais patógenos, capaz de detectar e distinguir os alvos, moléculas, próprios de não próprios. A resposta dos moluscos a patógenos é realizada por um sistema de defesa diferente dos mamíferos, pois atuam somente hemócitos em cooperação com componentes humorais solúveis na hemolinfa (Loker e Bayne, 2001). Ao entrar em contato com um hemócito, o patógeno desencadeia reações que mudam o comportamento do sistema de defesa do molusco; desde a marcação por opsoninas para facilitar a fagocitose, alterações no perfil de transcrição de proteínas, até o comportamento de migração, degranulação e encapsulamento promovido pelas células de defesa (Bayne *et al.*, 1986; Loker e Bayne, 2001; Bayne, 2009; Negrao-Correa *et al.*, 2012; Larson *et al.*, 2014).

É considerada resistência toda vez que o sistema interno de defesa do caramujo consegue evitar o estabelecimento e desenvolvimento do parasita, e susceptibilidade quando as defesas do molusco em deter o desenvolvimento do parasita são ineficientes (Theron e Coustau, 2005). Fatores fisiológicos do hospedeiro invertebrado e parasito também influenciam na infecção. Essa relação pode estar acompanhada de uma adaptação entre parasita e hospedeiro, como demonstrado por Paraense e Corrêa, em 1963, onde linhagens de *S. mansoni* isoladas em *B. glabrata* de Minas Gerais foram incapazes de infectar caramujos *B. tenagophila* em São Paulo, sugerindo um determinado tropismo dos parasitas em relação aos caramujos de suas próprias regiões, independente de uma espécie ser mais suscetível do que outra (Paraense e Correa, 1963a; b).

Caramujos susceptíveis à infecção por *S. mansoni* podem, eventualmente, apresentar tanto esporocistos mortos por seu sistema de defesa quanto esporocistos viáveis, em um mesmo espécime. Assim, dentro de diversos cenários de linhagens e parasitos e hospedeiros, a infecção pode variar desde a destruição rápida do esporocisto, poucos momentos após penetrar no molusco, ou o desenvolvimento completo e a liberação de cercarias. Essas variações ocorrem provavelmente porque há um padrão individual de compatibilidade entre linhagens de parasitas e linhagens de hospedeiros, tendo em vista que há uma grande variedade genética destes, sendo o sucesso ou insucesso da infecção determinada pelo “status” de compatibilidade fenotípica entre molusco e trematódeo (Theron e Coustau, 2005; Coelho *et al.*, 2008; Nacif-Pimenta *et al.*, 2012).

No Brasil, *B. glabrata* apresenta todas as linhagens geográficas susceptíveis a infecção pelo *S. mansoni*, sendo apontada como a espécie vetora de maior importância epidemiológica, além de ser a espécie modelo para estudos da interação parasito/hospedeiro invertebrado. Nosso grupo tem estudado uma linhagem de caramujos *B. tenagophila* oriunda da reserva biológica do Taim (RS), que demonstrou ser completamente resistente a infecção por *S. mansoni*, sendo seu sistema interno de defesa capaz de reconhecer e eliminar todos parasitas nas primeiras horas de infecção. O caráter de resistência dessa linhagem é geneticamente dominante sobre a susceptibilidade, fazendo dessa linhagem uma referência no controle biológico da transmissão da esquistossomose mansoni, como sugerido por Rosa e colaboradores em 2005 (Rosa *et al.*, 2005; Martins-Souza *et al.*, 2006; Marques *et al.*, 2014).

Devido ao fato do sistema interno de defesa dos caramujos ser constituído por componentes humorais solúveis na hemolinfa e componentes celulares, principalmente os hemócitos, a relação parasito-hospedeiro em todos os seus aspectos, está condicionada à capacidade do sistema interno de defesa em reconhecer e destruir o invasor, bem como a capacidade evasiva do parasita e sua autodefesa contra o ataque deste sistema, que envolve artimanhas sofisticadas, como o mimetismo de moléculas do caramujo, fazendo com que o sistema interno de defesa do caramujo não seja hábil em reconhecer essas moléculas como não próprias (Plows *et al.*, 2005; Lehr *et al.*, 2008; Bayne, 2009; Negrao-Correa *et al.*, 2012). Mesmo diante disso, quando o trematódeo é reconhecido pelo sistema interno de defesa do molusco, uma série de reações e alterações no perfil de expressão de genes é desencadeada, principalmente nos hemócitos, que atuam como principais efetores da destruição do esporocisto. Espécies reativas de oxigênio e

nitrogênio (ROS) e (NOS) são produzidas pelos hemócitos, desencadeando a explosão respiratória leucocitária, presente em diversos organismos ao longo da evolução (Dikkeboom *et al.*, 1988; Boehmler *et al.*, 1996; Hahn *et al.*, 2000; 2001a; b; Bayne, 2009; Negrao-Correa *et al.*, 2012).

Lockyer (2008) identificou através do transcriptoma de *B. glabrata* genes super-expressos em caramujos resistentes, infectados com *S. mansoni*, relacionados às vias de estresse oxidativo, sendo a enzima superóxido dismutase o mais expresso nos caramujos infectados (Lockyer *et al.*, 2008). Embora as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, por si só, não sejam suficientes para destruir o esporocisto, sua atuação potencializando os efeitos danosos da explosão respiratória no parasita são notáveis e a identificação de genes envolvidos em mecanismos de proteção das células do hospedeiro contra a ação danosa dessa cascata oxidativa é de fundamental importância (Dikkeboom *et al.*, 1988; Boehmler *et al.*, 1996; Hahn *et al.*, 2000; 2001a; b; Lockyer *et al.*, 2008; Bayne, 2009; Negrao-Correa *et al.*, 2012).

Embora pouco eficientes sozinhos para destruir os esporocistos sem a participação dos hemócitos, os fatores solúveis da hemolinfa os auxiliam significativamente nessa tarefa. Estudos realizados com caramujos resistentes e susceptíveis demonstraram que é possível aumentar a resistência de um caramujo suscetível contra *S. mansoni* apenas com a transferência da hemolinfa de caramujos resistentes (Bayne *et al.*, 1980a; b; Granath e Yoshino, 1984; Van Der Knaap e Loker, 1990; Coelho e Bezerra, 2006; Pereira *et al.*, 2008; Bayne, 2009).

Através de suas características morfológicas e bioquímicas os hemócitos circulantes na hemolinfa do molusco podem ser classificados em hialinócitos e granulócitos. Os primeiros correspondem a 10% dos hemócitos circulantes, são células esféricas e pequenas com um grande núcleo circundado por uma fina camada de citoplasma, não apresentando pseudópodes ou filopódios. Seu citoplasma é rico em ribossomos e mitocôndrias, apresentando um retículo endoplasmático rugoso pouco desenvolvido e pequena quantidade de lisossomos. Já os granulócitos representam 90% dos hemócitos circulantes, são células maiores e polimórficas, emitem pseudópodes, apresentam citoplasma grande, contendo grânulos basofílicos, complexo de Golgi bem desenvolvido, densos aglomerados de lisossomos e mitocôndrias, com grande presença

da enzimas fosfatase ácida (Harris, 1975; Loverde *et al.*, 1982; Barracco *et al.*, 1993; Bezerra *et al.*, 1997; Johnston e Yoshino, 2001; Martins-Souza *et al.*, 2003).

Estima-se que os hemócitos circulantes sejam originados de forma multicêntrica em *Biomphalaria*. Isso ocorreria a partir de uma camada endotelial de células que ocupa os espaços vasculares ao longo de todo o corpo do caramujo, dispensando a distribuição dos hemócitos através da hemolinfa. Infiltrados e aglomerados de hemócitos já foram descritos em órgãos como ovotesti, glândula digestiva e tecido renal, de moluscos infectados. A cavidade do coração é outro local onde já foram encontrados aglomerados de hemócitos, mesmo em caramujos não infectados. (Pan, 1963; Azevedo *et al.*, 2006; Borges *et al.*, 2006; Souza Sdos e Andrade, 2006; Silva-Neto *et al.*, 2014).

Análises comparativas dos perfis diferenciais de expressão de genes de linhagens de *Biomphalaria*, expostos e não-expostos ao *S. mansoni*, demonstraram grande potencial para explicar a susceptibilidade do molusco frente ao trematódeo, onde a expressão de diversos genes foi potencializada após a estimulação de hemócitos com antígenos do parasita, em linhagens resistentes ao *S. mansoni*, sendo que o mesmo não ocorre nos moluscos susceptíveis. Alguns desses genes foram observados, dentro de uma mesma linhagem de caramujos, em alta-expressão em adultos resistentes e não-expressos nos juvenis e sub-adultos susceptíveis (Durand *et al.*, 2000; Bayne, 2009; Larson *et al.*, 2014; Zahoor *et al.*, 2014).

1.3 PEQUENOS RNAs

Apesar do vasto conhecimento da biologia de *B. glabrata*, pouco ainda é conhecido sobre a regulação da expressão de genes importantes para o seu crescimento e sua inter-relação com o *S. mansoni*. Estudos recentes, em diversos organismos, desde protozoários unicelulares até multicelulares complexos, têm mostrado a importância da regulação gênica envolvendo pequenos RNAs, suas vias de processamento e sua atuação ao nível celular (Moazed, 2009). Estes processos são orquestrados por diversas proteínas alcançando uma fina e específica regulação do genoma e/ou transcriptoma. Alguns dos principais pequenos RNAs não codificadores, são os microRNAs (miRNAs), os pequenos RNAs interferentes (siRNAs) e os RNAs associados a proteína PIWI (piRNAs). Estes pequenos RNAs se diferenciam em número de nucleotídeos, biogênese e o alvo final (Kim *et al.*, 2009).

Várias estratégias moleculares têm sido avaliadas para melhor entender os mecanismos de resistência e susceptibilidade na interação *Biomphalaria/S. mansoni*. As moléculas envolvidas nos aspectos regulatórios do sistema interno de defesa durante a interação entre parasito-hospedeiro invertebrado na esquistossomose ainda não estão completamente elucidadas. Um grupo de moléculas que provavelmente podem estar participando dessa interação, ainda pouco estudado, são os miRNAs. Estas moléculas de RNA fita simples possuem em tamanho de 19 a 25 nucleotídeos, não codificadores de proteínas, que agem como potentes reguladores pós-transcricionais da expressão gênica em plantas e animais. Sua biossíntese é evolutivamente conservada e envolve clivagens endonucleolíticas sequenciais mediadas por duas enzimas RNase III, Dicer, e Drosha (Kim, 2005; Kim *et al.*, 2009; Davis-Dusenbery e Hata, 2010).

Estudos de bioinformática estimam que existam mais de dois mil e quinhentos miRNAs em humanos, e mais de 28 mil miRNAs depositados atualmente das mais variadas espécies estudadas, desde procariotos a eucariotos, no principal banco de dados para miRNA o miRBase (<http://www.mirbase.org/>). Constituindo uma das maiores classes de reguladores gênicos, os miRNAs exercem seus efeitos regulatórios ligando-se à região 3' não traduzida de RNAs mensageiros alvo. Este mecanismo de atuação permite a redução dos níveis proteicos de seus genes-alvo, raramente afetando o nível de expressão transcricional (Berezikov *et al.*, 2005; Kim, 2005; Kozomara e Griffiths-Jones, 2014).

Apesar de não terem suas funções totalmente esclarecidas, a descoberta dos miRNAs atraiu a comunidade científica pelas evidências sugestivas de que estas moléculas apresentam papel fundamental em diversos processos biológicos. Em mamíferos, estes pequenos RNAs foram associados à regulação da proliferação celular, apoptose, diferenciação celular, hematopoese, entre outras funções. Estudos recentes enfatizam a importância destas moléculas ao relatar alterações na expressão dos miRNAs em diferentes patologias humanas, inclusive no câncer (Esau *et al.*, 2004; Zhang, 2009; Costa *et al.*, 2012; Kolenda *et al.*, 2014; Melo e Esteller, 2014).

1.4 BIOGÊNESE DOS PEQUENOS RNAs

Os pequenos RNAs não codificadores de proteínas apresentam uma ampla gama de proteínas relacionadas a sua biogênese no espaço intra e extranucleares. Algumas apresentam papel que se superpõe entre as diversas classes dos RNAs não codificantes, porém outras apresentam participação diferencial (Winter *et al.*, 2009). Por exemplo, a proteína RNase III nuclear só participa da via de processamento de miRNAs (Han *et al.*, 2004; Ha e Kim, 2014). Já outras proteínas são compartilhadas entre vias de processamento de pequenos RNAs como Dicer (RNase III citoplasmática) e componentes do complexo RISC (complexo de indução do silenciamento gênico mediado por RNA) (Carthew e Sontheimer, 2009; Ha e Kim, 2014). No citoplasma, proteínas como Argonauta, principal componente de RISC, são distintas em suas ações, processando diferentes RNAs e almejando diferentes tipos de alvos. A classe das proteínas Argonauta é dividida em duas subclasses: Argonauta e PIWI. Cada classe é direcionada para um tipo específico de RNA, sendo a proteína PIWI participante da via de processamento de piRNAs e a proteína Argonauta do processamento de miRNAs (Peters e Meister, 2007). A biossíntese de piRNAs ainda permanece não completamente entendida, mas as proteínas Piwi e Tudor apresentam papéis destacados (Weick e Miska, 2014).

Para que um miRNA possa desempenhar suas funções como regulador gênico, é necessário que ele seja transcrito e processado por um conjunto de proteínas nucleares e citoplasmáticas. Um miRNA pode ser codificado a partir de regiões intrônicas, transcritos não codificadores ou a partir de exons. Normalmente eles estão posicionados em *Loci* próximos, sendo transcritos em conjunto formando estruturas policistrônicas (Lee *et al.*, 2002; Hertel *et al.*, 2006; Ha e Kim, 2014).

A via clássica de síntese de um miRNA, esquematizada na figura 2, inicia-se com a transcrição de seu gene pela RNA polimerase II, gerando um longo transcrito de miRNA primário (pri-miRNA) contendo cap 5' e cauda poli(A) (Lee *et al.*, 2004). O pri-miRNA apresenta uma estrutura hairpin em seu arcabouço que é clivada ainda no núcleo pela RNase III Drosha, e seu cofator DGCR8 (do inglês DiGeorge syndrome critical region gene 8), gerando uma molécula precursora do miRNA maduro denominada pré-miRNA, com cerca de 70 nucleotídeos (Lee *et al.*, 2003). Em seguida, o pré-miRNA é transportado rapidamente ao citoplasma pela exportina-5 (Exp5), proteína de exportação nuclear que utiliza Ran-GTP como co-fator. No citoplasma, o pré-miRNA é processado pela RNase

III Dicer, gerando um miRNA fita dupla de 19 a 25 nucleotídeos. Este produto é incorporado a um complexo multimérico denominado RISC (do inglês RNA-induced silencing complex), que inclui as proteínas Argonautas como principais componentes. Apenas uma das fitas do duplex de miRNA permanece no complexo RISC para controlar a expressão pós-transcricional de genes-alvo. A expressão alterada de componentes da maquinaria de biogênese dos miRNAs como Drosha, Dicer e Argonautas, tem sido associada a diferentes tumores humanos, destacando a importância desta via no funcionamento celular adequado (Bernstein *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003; Schwarz *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004; Lund *et al.*, 2004; Esquela-Kerscher e Slack, 2006).

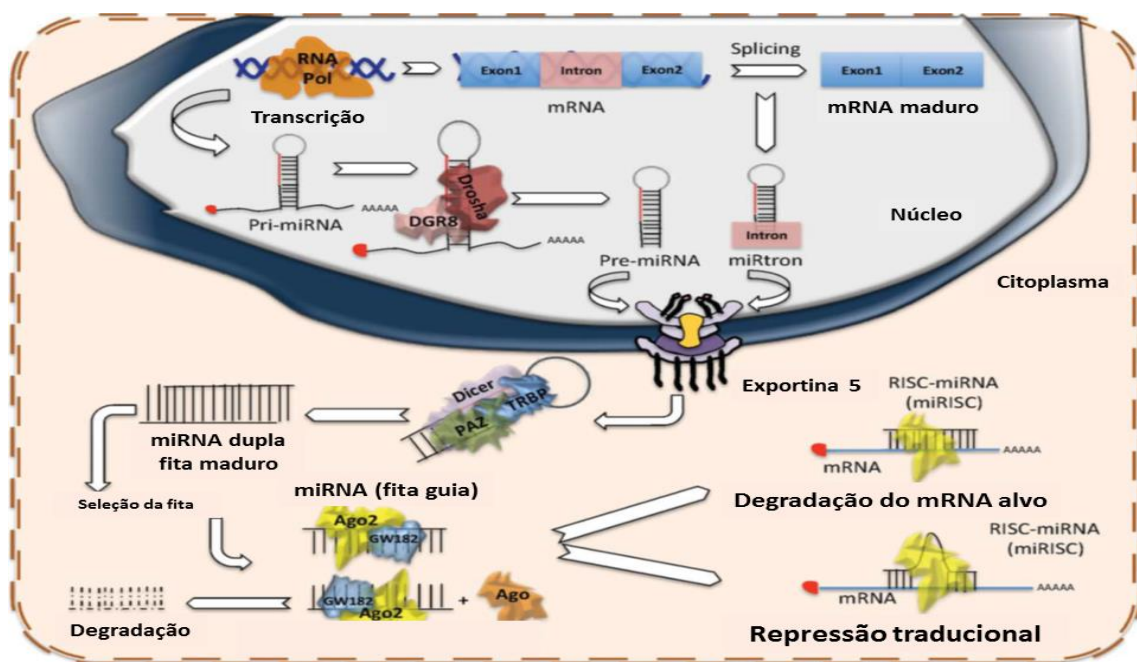


Figura 2: Via de biogênese dos miRNAs. O gene de miRNA é transcrito pela RNA polimerase II. O transcrito primário (pri-miRNA) apresenta uma estrutura hairpin, que é processada pela enzima RNase III, Drosha juntamente com DGCR8, formando o miRNA precursor (pré-miRNA) de ~70 nucleotídeos. A proteína exportina-5 leva esse produto ao citoplasma para ser processado pela RNase III, Dicer, gerando um miRNA fita dupla de ~22 nucleotídeos. Uma das fitas do duplex de miRNA é degradada enquanto a outra permanece no complexo RISC para controlar a expressão pós-transcricional de genes-alvo. Caso o pareamento miRNA/mRNA alvo seja perfeito ocorre uma degradação completa do mRNA alvo, caso essa associação seja apenas parcial, haverá uma repressão translacional, onde o mRNA alvo será silenciado mas não degradado. **Modificado de (Romero-Cordoba *et al.*, 2014).**

A regulação pós-transcricional exercida pelos miRNAs ocorre na região 3' UTR e depende do grau de complementaridade com o RNAm-alvo, podendo ocorrer por inibição translacional ou degradação do RNAm. O pareamento de modo imperfeito com o RNAm acarreta a inibição translacional do alvo, sendo o mecanismo principal de atuação dos miRNAs em mamíferos. Em função dos miRNAs possuírem sequências pequenas e

agirem sem a necessidade de pareamento completo, um único miRNA pode regular muitos RNAm-alvo, além de cooperarem no controle de um único RNAm. Alguns estudos indicam que um miRNA possa regular 200 RNAs apresentando funções totalmente diversas. Desta forma, os miRNAs constituem uma enorme e complexa rede regulatória celular. Em plantas, a regulação dos miRNAs ocorre principalmente através de sua interação perfeita com o RNAm, levando-o à degradação. No entanto, já se têm exemplos da ocorrência deste silenciamento gênico também em mamíferos. Apesar de estarmos apenas no início de entender a biologia dos miRNAs, o crescente número de trabalhos vem revelando importante desempenho destes pequenos RNAs em diversos processos biológicos. Além disso, através da regulação global da expressão gênica celular e associação a diferentes funções, torna-se evidente que os miRNAs possam alterar a progressão de diversas patologias (Brennecke *et al.*, 2005; Valencia-Sanchez *et al.*, 2006; Brodersen e Voinnet, 2009; Costa *et al.*, 2012; Kolenda *et al.*, 2014).

A biogênese de piRNAs não é tão bem caracterizada quanto em miRNAs. Atualmente vários modelos estão em estudo para melhor entender a biogênese dessa molécula, principalmente em *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* e *Mus musculus* (Fu e Wang, 2014; Weick e Miska, 2014). O que se pode afirmar até o momento é que existe uma grande quantidade de proteínas envolvidas nesse processo, onde é essencial a participação de proteínas Piwi, Tudor e inúmeras proteínas parceiras como Zucchini e Vasa (Ipsaro *et al.*, 2012; Thivierge *et al.*, 2012; Weick e Miska, 2014; Xiol *et al.*, 2014).

Os piRNAs foram inicialmente relacionados ao controle de transposons em células germinais (Aravin *et al.*, 2006; Girard *et al.*, 2006). Experimentos demonstraram que a ausência de Piwi gera inúmeros problemas de fertilidade em camundongos, o que relaciona os piRNAs como potentes reguladores do processo reprodutivo (Carmell *et al.*, 2007). Contudo, hoje já é conhecido o papel essencial de piRNAs também em tecidos somáticos (Malone *et al.*, 2009). Os piRNAs apresentam um comprimento de 24 a 30 nucleotídeos e uma preferência por apresentar uma uracila em sua extremidade 5' e um açúcar metilado no carbono 2 da extremidade 3' (Saito *et al.*, 2007; Saito *et al.*, 2009).

Apesar do grande potencial, os estudos envolvendo miRNAs relacionados a esquistossomose ainda não são uma realidade consolidada, embora tenham sido identificados possíveis miRNAs de *S. mansoni*, através de técnicas de clonagem,

sequenciamento e bioinformática de pequenos RNAs (Simoes *et al.*, 2011). Gomes et al (2009) caracterizou a via de processamento de miRNAs em *S. mansoni* e demonstrou expressão gênica diferencial de dois genes chaves da via, Argonauta e Dicer, em diversos estágios do parasito. Em 2011, dois trabalhos do grupo mostraram a presença de miRNAs e seus precursores no genoma de *S. mansoni*, além de sua importância na regulação da expressão gênica de alvos específicos (Gomes *et al.*, 2009; De Souza Gomes *et al.*, 2011; Simoes *et al.*, 2011).

Na relação *Biomphalaria/S. mansoni*, um ponto primordial é o fato do parasito não apresentar a via de piRNAs ativa. Este fato pode conferir uma grande margem para discussões acerca da participação dos piRNAs no processo de interação parasita-hospedeiro, uma vez que *Aplysia californica*, outro molusco, apresenta esta via ativa (Gomes *et al.*, 2009; De Souza Gomes *et al.*, 2011; Rajasethupathy *et al.*, 2012). Confirmar a presença da maquinaria de pequenos RNAs em *B. glabrata* é um grande passo na direção de entender a relação *Biomphalaria/S. mansoni*.

2 JUSTIFICATIVA

Apesar dos conhecimentos obtidos nos últimos anos na interação *Biomphalaria/S. mansoni*, essa relação requer maiores estudos em alguns aspectos. Dentre elas a forma de atuação do sistema interno de defesa, como e por que ele elimina o trematódeo em certas linhagens e não em outras. Ou ainda, quais as estruturas dos hemócitos que estão envolvidas no reconhecimento do parasita. A compreensão dos diferentes graus de susceptibilidade das espécies do molusco, apresentando diferenças inter e intraespecíficas, é um desafio a ser vencido e pode contribuir para o desenvolvimento de método para o controle da esquistossomose.

Para tanto, os estudos relativos aos pequenos RNAs constituem uma tecnologia inovadora que pode contribuir de forma significativa para uma melhor compreensão da biologia da interação *Biomphalaria/S. mansoni*. Isso é possível através da descoberta de moléculas de pequenos RNAs capazes de interferir diretamente no perfil de expressão de genes específicos relacionados ao processo de resistência ou susceptibilidade do caramujo frente à infecção. O melhor entendimento desta relação pode fornecer informações importantes para o desenvolvimento de estratégias mais eficientes para o controle da transmissão da esquistossomose.

O estudo da maquinaria de processamento dos pequenos RNAs se desponta como o marco inicial do processo. Uma vez que se faz necessário determinar a presença das proteínas das vias, principalmente de miRNAs e piRNAs, em *B. glabrata*, organismo modelo nos estudos de interação parasita-hospedeiro na esquistossomose mansoni.

Como os estudos até o momento demonstram a ausência da maquinaria de piRNAs em *S. mansoni*, a presença desta em *Biomphalaria* pode conferir inúmeras respostas ao processo de interação trematódeo/molusco. Uma vez que, como piRNAs estão relacionados ao processo de desenvolvimento do animal, essa classe de moléculas pode estar de certa forma, influenciando a relação de resistência do caramujo frente ao trematódeo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar e caracterizar a maquinaria de processamento de miRNAs e piRNAs em *B. glabrata* e validar sua atuação em diferentes estágios de desenvolvimento bem como na interação parasito/hospedeiro.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Analisar *in silico* os genes responsáveis pela biogênese miRNAs e piRNAs.
- ✓ Validar genes da maquinaria de processamento de miRNAs e piRNAs por PCR em Tempo Real.
- ✓ Analisar a expressão dos diversos genes envolvidos na produção de pequenos RNAs em diferentes estágios de desenvolvimento e na interação parasito/hospedeiro.

4 METODOLOGIA

4.1 CARAMUJOS

Foram utilizados neste estudo, caramujos da espécie *B. glabrata* linhagem de Belo Horizonte (056/2012/SECEX/CGEN), susceptível ao *S. mansoni*, obtida junto ao Moluscário Lobato Paraense, do Centro de Pesquisas René Rachou, em Belo Horizonte/MG, onde é mantida em condições de laboratório por mais de 25 anos. Para realização dos experimentos foram escolhidos caramujos cujo tamanho estivesse entre 7-15 mm, além de desovas e caramujos imaturos sexualmente, afim de contemplar as diversas fases de desenvolvimento do caramujo e possíveis variáveis na produção de pequenos RNAs.

Para os ensaios de infecção, caramujos *B. glabrata* de tamanho compreendido entre 7 e 15 mm maduros sexualmente foram infectados individualmente com 30 miracídios de *S. mansoni* da cepa LE, gentilmente cedidos pelo moluscário Lobato Paraense, e mantidos por 3 horas sob luz artificial e posteriormente mantidos em aquário durante o período experimental em condições adequadas de desenvolvimento padronizadas pelo moluscário (Souza e Passos, 2001). O grupo controle foi criado com animais da mesma idade e quantidade do grupo experimental sem a presença dos miracídios. Foram retirados 30 animais de cada grupo antes do processo de infecção para serem utilizados como tempo zero do experimento. Nos demais tempos experimentais foram retirados 30 animais em cada grupo nos intervalos de 4 horas, 12 horas, 24 horas, 7 dias, 15 dias, 21 dias e 30 dias. Foi mantido um grupo de caramujos até os 38 dias de infecção para confirmar que estes estavam eliminando cercarias, o que confirmou o sucesso da infecção.

4.2 EXTRAÇÃO DE mRNA E PCR

As amostras de caramujo utilizadas nos experimentos foram processadas utilizando toda sua biomassa tecidual, incluindo a hemolinfa. Os caramujos foram congelados em nitrogênio líquido, macerados com o auxílio do graal e homogeneizados em Quiazol (QIAGENTM), conforme instruções do fabricante. Posteriormente o homogeneizado foi transferido para microtubos de 1,5 mL e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente para permitir a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas. A seguir foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio (Sigma - St. Louis,

MO, USA) para cada 1,0mL de Quiazol. A mistura foi homogeneizada vigorosamente com auxílio de um vórtex. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 4°C sendo a fase aquosa transferida para um novo tubo. Para extração de RNA mensageiro foi utilizado o kit miRNAeasy (QIAGEN™), conforme instruções do fabricante. Um passo seguinte foi a eliminação da presença de DNA utilizando DNase livre de RNase (QIAGEN™). No final as qualidades das preparações foram avaliadas em gel de agarose 1% e a pureza e quantificação foram determinadas utilizando o aparelho NanoDrop. Na preparação dos cDNAs usamos High-Capacity (Life Technologies™) para obtenção da primeira fita a partir de 1 µg de RNA total. Para reação de PCR em tempo real, para quantificação dos mRNAs referentes às prováveis proteínas envolvidas nas vias de biogênese de pequenos RNAs, foi utilizado Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems®) no aparelho (Applied Biosystems 7500), com ciclagem térmica (95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, seguido de análise da curva de Melt de 60° a 95°C).

4.3 ANÁLISE *IN SILICO*

Foi utilizado para realização desse trabalho o genoma de *B. glabrata* (Genome Assembly v 4.1 – <http://biology.unm.edu/biomphalaria-genome/index.html>). Através deste, foi possível obter as sequências nucleotídicas referentes aos principais genes envolvidos na biogênese de piRNAs e miRNAs de *B. glabrata*. Para obtenção desses genes em *B. glabrata* foram utilizadas sequências desses genes obtidas de *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans*. Essas sequências foram confrontadas contra o banco de dados de genoma e transcriptoma de *B. glabrata* (<https://www.vectorbase.org>). As sequências obtidas foram recuperadas e utilizadas para caracterização e validação da maquinaria de processamento de miRNAs e piRNAs em *B. glabrata*. Foram gerados primers para as sequências referentes aos genes Bgl-Argonauta, Bgl-Drosha, Bgl-Dicer, Bgl-Piwi, Bgl-Loquacious, Bgl-Partner de Drosha (DGCR8), Bgl-FMR-1 (Fragile X Mental Retardation), Bgl-Tudor, Bgl-Exportina-5 e Bgl-Mioglobina, utilizando o software Gene Runner (<http://generunner.net/>).

4.3.1 ANÁLISE DE DOMÍNIOS CONSERVADOS

As sequências de aminoácidos das preditas proteínas envolvidas na via de processamento de pequenos RNAs não codificadores foram submetidas ao alinhamento múltiplo de sequência utilizando a ferramenta ClustalX 2.1 (Thompson *et al.*, 2002). Os

domínios conservados foram recuperados separadamente das proteínas preditas e suas homólogas a fim de analisar através do alinhamento múltiplo a presença de resíduos de aminoácidos importantes para a respectiva proteína. Além disso, utilizamos o banco de dados de famílias de proteínas PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) e o banco de dados de domínios conservados CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) para auxiliar na análise (Marchler-Bauer *et al.*, 2015).

4.3.2 ANÁLISE FILOGENÉTICA

A análise filogenética foi realizada utilizando o método Neighbor-joining para ambos grupos de sequência (Saitou e Nei, 1987). Uma árvore consenso foi inferida utilizando “bootstrap” para 1000 réplicas representando a história evolutiva do grupo de sequências estudadas. A distância evolutiva foi computada utilizando o modelo JTT. A análise filogenética foi conduzida no programa Mega5.2 (Tamura *et al.*, 2011).

4.3.3 SEQUENCIAMENTO

Para a validação dos “primers” foram realizadas PCRs (Reação em Cadeia da Polimerase) destes com DNA complementar (cDNA) oriundo de caramujos *B. glabrata* adultos, onde cada primer foi processado separadamente em duplicatas. Os produtos de PCR gerados foram transferidos para um microtubo de 1,5 ml, neste foi adicionando 53 µl da solução (Glicogênio 20mg/mL + acetato de sódio 3M + etanol PA), a solução foi homogeneizada e incubada a -20°C por 45 minutos e posteriormente centrifugada por 15 minutos a 12000 xg. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado 500 µl de etanol 80 % gelado e centrifugado por 5 minutos a 12000 xg, o sobrenadante foi descartado. Esta etapa foi repetida por duas vezes afim de eliminar todas as impurezas presentes. O tubo contendo o precipitado permaneceu vertido na capela de exaustão até completa secagem. O produto de PCR foi ressuspensionado em água livre de enzimas nucleases. Os amplicons purificados foram sequenciados em plataforma tipo Sanger (Sanger e Coulson, 1975; Sanger *et al.*, 1977) utilizando o aparelho ABI 3730 da Life Technologies, conforme instruções do fabricante na plataforma de sequenciamento do Centro de Pesquisas René Rachou.

4.3.4 MONTAGEM DE CONTIGS

Para analisar a presença de sobreposição entre as sequências obtidas no sequenciamento e montagem dos contigs foi utilizado o algoritmo CAP3 (Huang e Madan, 1999) disponível em <http://doua.prabi.fr/software/cap3>.

4.4 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA

Os resultados obtidos na PCR em tempo real foram analisados utilizando o software Rest 2009, disponível em (<http://www.rest.de.com>). Este software utiliza os valores de Ct (Ciclo threshold) dos genes alvo e endógenos nas condições tratadas e não tratadas, além dos seus valores de eficiência. Técnicas de randomização e “bootstrapping” são utilizadas para demonstrar os valores de expressão e significância estatística. Os valores são plotados em escala logarítmica \log^{10} (Pfaffl, 2001; Pfaffl *et al.*, 2002; Vandesompele *et al.*, 2002).

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE *IN SILICO*

Para obtenção dos preditos genes e proteínas das vias de miRNAs e piRNAs em *B. glabrata* foram utilizadas sequências de proteínas conhecidas dos genomas de *D. melanogaster* e *C. elegans*, que além de serem organismos modelo são também próximos evolutivamente de *B. glabrata*. Estas proteínas foram confrontadas contra o banco de dados de genoma e transcriptoma de *B. glabrata* (<https://www.vectorbase.org>). As sequências de proteínas utilizadas nesta análise estão disponíveis na tabela 1.

TABELA 1: Proteínas das vias de miRNA e piRNA em organismos modelo.

Nome	ID	Organismo
Argonauta	Argonauta-1 - NP_725341.1	<i>D. melanogaster</i>
Dicer	Dicer-1 - NP_524453.1	<i>D. melanogaster</i>
Drosha	Drosha - NP_477436.1	<i>D. melanogaster</i>
Fmr1	Fmr1 - NP_731445.1	<i>D. melanogaster</i>
Loquacious	Loquacious - NP_609646.1	<i>D. melanogaster</i>
TDRD1	Tudor - NP_476773.1	<i>D. melanogaster</i>
PIWI	Argonauta 3 - NP_001036627.2	<i>D. melanogaster</i>
Tudor	Tudor-SN - NP_612021.1	<i>D. melanogaster</i>
SPN-E	Spindle E - NP_476741.1	<i>D. melanogaster</i>
Exportina 5	Proteína XPO-1 - NP_741567.1	<i>C. elegans</i>
Mioglobina	Proteína GLB-13 - NP_510079.2	<i>C. elegans</i>
Partner- Drosha	Partner-Drosha - NP_001263149.1	<i>D. melanogaster</i>

Nesta análise foi obtido inicialmente o posicionamento desses preditos genes, no genoma de *B. glabrata* (tabela 2). Foram recuperadas sequências “scaffold” para todos os preditos genes em que foram encontradas as sequências, além de suas respectivas fitas no DNA. Nos casos de Bgl-Argonauta, Bgl-Dicer, Bgl-Drosha, Bgl-Piwi e Bgl-Tudor foi possível ainda recuperar sequências ESTs.

TABELA 2: Posicionamento dos preditos genes em *B. glabrata*.

Nome	Posição no Genoma	Contig	Fita	EST Bgl clustered
Bgl-Argonauta	Scaffold LG46i_random_Scaffold 473:79990-93283	473.9	-	EST_Bglabrata-16-03- 09_54304-contig_11202
Bgl-Dicer	Scaffold LG33_random_ Scaffold118: 304037-320879	118	+	N.A
Bgl-Drosha	Scaffold_LG73i_random_ Scaffold 3021:4712-37027	3021.3	-	EST_Bglabrata-16-03- 09_54304_contig_12992
Bgl-Fmr1	Scaffold_LGUN_random_ Scaffold74: 255517-266655	74.36	-	EST_Bglabrata-16-03- 09_54304-contig_13357
Bgl-Loquacious	Scaffold_LGUN_random_ Scaffold399: 172373-176683	1625.4	+	N.A
Bgl-TDRD1	Scaffold LG4_random_ Scaffold1766: 22826-47531	1766.3	-	N.A
Bgl-PIWI	Scaffold_LGUN_random_ Scaffold443:34109-49170:1	443.4	-	EST_Bglabrata-16-03- 09_54304-contig_2477 e EST_Bglabrata-16-03- 09_54304-contig_13991
Bgl-Tudor	Scaffold_LGUN_random_ Scaffold1451: 25731-37471: 1	1451.5	+	EST_Bglabrata-16-03- 09_54304_contig_5431 e EST_Bglabrata-16-03- 09_54304-contig_12018
Bgl-SPN-E	Scaffold LG27_random_ Scaffold64: 204653-230649	64.23	+	N.A
Bgl-Exportin 5	LGUN_random_Scaffold 334:178309-179622:-1	395.19	-	N.A
Bgl-Myoglobin	LGUN_random_Scaffold 5091:5912-9498:-1	5091.1	+	N.A
Bgl-Partner- Drosha	LGUN_random_Scaffold1: 919394-953868:-1	19476	+	N.A

As sequências de proteínas dos organismos modelo foram submetidas a análise de similaridade no Blastp do banco de dados de *B. glabrata*. As preditas proteínas obtidas no genoma de *B. glabrata* bem como seus transcritos codificadores acompanhados de seus respectivos tamanhos de aminoácidos e nucleotídeos podem ser observados na tabela 3. As sequências de aminoácidos destas preditas proteínas foram submetidas a uma análise contra o banco de dados não redundante do NCBI para obtenção dos seus possíveis ortólogos de outras espécies. Como resultados dessa análise foram recuperadas sequências equivalente aos genes de *B. glabrata* nos moluscos *Aplysia californica* e *Lottia gigantea*.

TABELA 3: Preditos genes e proteínas das vias de miRNAs e piRNAs de *B. glabrata*.

Gene	Via	Transcrito ID	T(bp)	Proteína ID	T(aa)	Ortóloga Blastp NCBI	E-value
Bgl-Argonauta	miRNA	BGLTMP001980-RA	2565	BGLTMP001980-PA	855	Argonauta XP_005107588.1 [<i>Aplysia californica</i>]	0
Bgl-Dicer	miRNA	BGLTMP001707-RA	6579	BGLTMP001707-PA	2165	Dicer XP_005106232.1 [<i>Aplysia californica</i>]	0
Bgl-Drosha	miRNA	BGLTMP002761-RA	3387	BGLTMP002761-PA	1128	Ribonuclease3 XP_005107264.1 [<i>Aplysia californica</i>]	0
Bgl-Fmr1	miRNA	BGLTMP012686-RA	1184	BGLTMP012686-PA	376	FMR NP_001191563.1 [<i>Aplysia californica</i>]	0
Bgl-Loquacious	miRNA	BGLTMP009419-RA	957	BGLTMP009419-PA	319	XP_005098097.1 - [<i>Aplysia californica</i>]	8e-167
Bgl-TDRD1	piRNA	BGLTMP002069-RA	9999	BGLTMP002069-PA	3332	XP_005100619.1 - [<i>Aplysia californica</i>]	0
Bgl-PIWI	piRNA	BGLTMP009852-RA	2565	BGLTMP009852-PA	854	Piwi XP_005096149.1 [<i>Aplysia californica</i>]	0
Bgl-Tudor	piRNA	BGLTMP004883-RA	2595	BGLTMP004883-PA	864	XP_005100071.1 - [<i>Aplysia californica</i>]	0
Bgl-SPN-E	piRNA	BGLTMP001135-RA	4275	BGLTMP001135-PA	1424	XP_005093451.1 - [<i>Aplysia californica</i>]	0
Bgl-Exportina 5	miRNA	BGLTMP008611-RA	1314	BGLTMP008611-PA	437	XP_005110990.1 - [<i>Aplysia californica</i>]	0.0
Bgl-Mioglobina	Controle	BGLTMP010556-RA	453	BGLTMP010556-PA	150	Mioglobina XP_009053623.1 [<i>Lottia gigantea</i>]	4e-97
Bgl-Partner-Drosha	miRNA	BGLTMP003262-RA	4083	BGLTMP003262-PA	1360	XP_005100879.1 - [<i>Aplysia californica</i>]	0.0

5.2 ANÁLISE DE DOMÍNIOS CONSERVADOS

Para caracterização das proteínas preditas, análises de domínios conservados foram desenvolvidos. Para tanto foram obtidas sequências de proteínas dos possíveis ortólogos das preditas proteínas de *B. glabrata*. Suas sequências de aminoácidos foram utilizadas como “query” na análise contra o banco de dados RefSeq do NCBI. Assim, aquelas com os melhores “hits” e consequentemente maior porcentagem de semelhança com a “query” foram selecionadas e suas sequências fasta recuperadas para análise de domínios conservados, filogenia e alinhamento global. Foram obtidas sequências de espécies referência e daquelas próximas filogeneticamente de *B. glabrata*, como *D. melanogaster*, *C. elegans*, *D. rerio*, *H. sapiens*, *M. musculus*. Além de outras com importância na relação parasito-hospedeiro.

A análise com as proteínas ortólogas demonstrou que Bgl-Argonauta (Tabela 4), possui um tamanho predito de 855 aminoácidos (aa), Bgl-Piwi (Tabela 5) possui 854 aa, Bgl-Drosha (Tabela 6) possui 1128 aa e Bgl-Dicer (Tabela 7) possui 2165 aa. Nossos resultados mostraram que, ao nível de aminoácidos, estas proteínas estão bem conservadas quando comparadas aos seus ortólogos, encontrados em diversas espécies separadas em dois grupos taxonômicos distintos, protostômios e deuterostômios.

Tabela 4: Similaridade entre Bgl-Argonauta e suas ortólogas de organismos Protostômios e Deuterostômios.

Organismo	Proteína ID	E-value Blastp	Tamanho (aa)
<i>Biomphalaria glabrata</i>	BGLTMP001980-PA	N.A	855
<i>Aplysia californica</i>	XP_005107587.1	0.0	932
<i>Lottia gigantea</i>	XP_009064000.1	0.0	919
<i>Metaseiulus occidentalis</i>	XP_003747659.1	0.0	887
<i>Ceratitidis capitata</i>	XP_004529840.1	0.0	982
<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_725341.1	0.0	984
<i>Apis dorsata</i>	XP_006622112.1	0.0	818
<i>Homo sapiens</i>	NP_036286.2	0.0	859
<i>Mus musculus</i>	NP_700451.2	0.0	860
<i>Crassostrea gigas</i>	EKC19600.1	0.0	1002
<i>Caenorhabditis elegans</i>	NP_001257239.1	0.0	1023
<i>Rattus norvegicus</i>	NP_067608.1	0.0	863
<i>Danio rerio</i>	NP_001289151.1	0.0	873
<i>Canis lupus familiaris</i>	XP_005629013.1	0.0	860
<i>Musca domestica</i>	XP_005175308.1	0.0	987
<i>Bombus terrestris</i>	XP_003400152.1	0.0	928
<i>Gallus gallus</i>	XP_004940123.1	0.0	863
<i>Bos taurus</i>	NP_991363.1	0.0	860
<i>Schistosoma japonicum</i>	Sjp_0044720.1	0.0	987
<i>Schistosoma mansoni</i>	Smp_198380.1	0.0	928

Tabela 5: Similaridade entre Bgl-Piwi e suas ortólogas de organismos Protostômios e Deuterostômios.

Organismo	Proteína ID	E-value Blastp	Tamanho (aa)
<i>Biomphalaria glabrata</i>	BGLTMP009852-PA	N.A	854
<i>Aplysia californica</i>	XP_005096149.1	0.0	918
<i>Lottia gigantea</i>	XP_009064630.1	0.0	791
<i>Nematostella vectensis</i>	XP_001641994.1	0.0	871
<i>Hydra vulgaris</i>	NP_001274302.1	0.0	889
<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_476875.1	2e-170	843
<i>Homo sapiens</i>	NP_004755.2	0.0	861
<i>Mus musculus</i>	NP_067286.1	0.0	862
<i>Crassostrea gigas</i>	EKC35279.1	0.0	885
<i>Danio rerio</i>	NP_899181.1	0.0	858
<i>Canis lupus familiaris</i>	XP_534638.2	0.0	861
<i>Rattus norvegicus</i>	XP_008764202.1	0.0	848
<i>Gallus gallus</i>	NP_001092322.1	0.0	867
<i>Bos taurus</i>	XP_618020.4	0.0	861
<i>Aedes aegypti</i>	XP_001652945.1	0.0	944
<i>Bombus terrestris</i>	XP_003400353.1	0.0	902
<i>Musca domestica</i>	XP_005183556.1	0.0	929

Tabela 6: Similaridade entre Bgl-Drosha e suas ortólogas de organismos Protostômios e Deuterostômios.

Organismo	Proteína ID	E-value Blastp	Tamanho (aa)
<i>Biomphalaria glabrata</i>	BGLTMP002761-PA	N.A	1128
<i>Tribolium castaneum</i>	XP_008199088.1	0.0	1176
<i>Apis dorsata</i>	XP_006618766.1	0.0	1307
<i>Apis mellifera</i>	XP_006558454.1	0.0	1307
<i>Bombus terrestris</i>	XP_003394274.1	0.0	1306
<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_477436.1	0.0	1327
<i>Homo sapiens</i>	XP_005248351.1	0.0	1306
<i>Mus musculus</i>	XP_006520084.1	0.0	1393
<i>Crassostrea gigas</i>	EKC20603.1	0.0	1354
<i>Caenorhabditis elegans</i>	NP_001122460.2	2e-87	1081
<i>Danio rerio</i>	NP_001103942.1	0.0	1289
<i>Rattus norvegicus</i>	NP_001101125.2	0.0	1373
<i>Canis lupus familiaris</i>	XP_854135.2	0.0	1373
<i>Bos taurus</i>	XP_591998.4	0.0	1330
<i>Musca domestica</i>	XP_005186977.1	0.0	1384
<i>Gallus gallus</i>	NP_001006379.1	0.0	1336
<i>Schistosoma mansoni</i>	Smp_142510.2	1.3e-124	1577
<i>Schistosoma japonicum</i>	Sjp_0048900.1	3.7e-135	1611

Tabela 7: Similaridade entre Bgl-Dicer e suas ortólogas de organismos Protostômios e Deuterostômios.

Organismo	Proteína ID	E-value Blastp	Tamanho (aa)
<i>Biomphalaria glabrata</i>	BGLTMP001707-PA	N.A	2165
<i>Aplysia californica</i>	XP_005106232.1	0.0	2495
<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_524453.1	0.0	2249
<i>Mus musculus</i>	NP_683750.2	0.0	1906
<i>Apis dorsata</i>	XP_006618601.1	3e-172	1954
<i>Ceratitidis capitata</i>	XP_004523314.1	7e-142	2306
<i>Metaseiulus occidentalis</i>	XP_003745061.1	9e-141	1863
<i>Caenorhabditis elegans</i>	NP_498761.2	6e-111	1910
<i>Danio rerio</i>	NP_001154925.1	0.0	1865
<i>Canis lupus familiaris</i>	XP_868526.3	0.0	1924
<i>Rattus norvegicus</i>	XP_008774532.1	0.0	1918
<i>Bos taurus</i>	NP_976235.1	0.0	1923
<i>Musca domestica</i>	XP_005179924.1	4e-149	2385
<i>Schistosoma mansoni</i>	Smp_169750.2	2.5e-161	2541

Para identificação dos domínios conservados nas preditas proteínas Bgl-Argonauta, Bgl-Piwi, Bgl-Drosha e Bgl-Dicer e suas ortólogas, as sequências de aminoácidos foram submetidas ao alinhamento global contra o banco de dados de famílias de proteínas PFAM (<http://pfam.xfam.org/>). Para encontrar os sítios ativos com a localização exata dos resíduos catalíticos nos domínios das preditas proteínas foi utilizado o banco de dados CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) (Marchler-Bauer *et al.*, 2015).

Bgl-Argonauta (Tabela 8) apresentou os domínios altamente conservados DUF posicionado entre os aminoácidos 191 a 242, PAZ posicionado entre os aminoácidos 252 a 369 e PIWI posicionado entre os aminoácidos 557 a 849. Esses resultados nos mostram que o domínio PIWI em *B. glabrata* possui 292 resíduos de aminoácidos.

Tabela 8: Domínios conservados para Bgl-Argonauta e seus ortólogos.

Organismo	ID NCBI	Família	ID Pfam	Alinhamento		E-value
				Início	Fim	
<i>Biomphalaria glabrata</i>	BGLTMP001980-PA	DUF1785	PF08699	191	242	9.9e-22
		PAZ	PF02170	252	369	1.3e-26
		Piwi	PF02171	557	849	3.3e-102
<i>Aplysia californica</i>	XP_005107587.1	DUF1785	PF08699	242	293	1.1e-21
		PAZ	PF02170	303	437	7.1e-38
		Piwi	PF02171	584	884	8.7e-108
<i>Lottia gigantea</i>	XP_009064000.1	DUF1785	PF08699	235	287	1.2e-22
		PAZ	PF02170	296	430	9,00E-39
		Piwi	PF02171	577	877	8.7e-110
<i>Metaseiulus occidentalis</i>	XP_003747659.1	DUF1785	PF08699	203	255	3.5e-22
		PAZ	PF02170	265	398	6.3e-36
		Piwi	PF02171	546	845	3.1e-111
<i>Ceratitidis capitata</i>	XP_004529840.1	DUF1785	PF08699	283	335	3.9e-22
		PAZ	PF02170	343	478	3.3e-37
		Piwi	PF02171	640	940	4.9e-111
<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_725341.1	DUF1785	PF08699	284	336	3.8e-22
		PAZ	PF02170	344	479	2.2e-37
		Piwi	PF02171	642	942	2.1e-111
<i>Apis dorsata</i>	XP_006622112.1	DUF1785	PF08699	126	178	1.4e-22
		PAZ	PF02170	187	321	1.1e-36
		Piwi	PF02171	475	776	5.3e-110
<i>Homo sapiens</i>	NP_036286.2	DUF1785	PF08699	175	227	1,00E-20
		PAZ	PF02170	235	370	1.9e-39
		Piwi	PF02171	518	817	1.4e-111
<i>Mus musculus</i>	NP_700451.2	DUF1785	PF08699	176	228	1.9e-21
		PAZ	PF02170	237	371	2.5e-38
		Piwi	PF02171	518	818	9.3e-110
<i>Crassostrea gigas</i>	EKC19600.1	DUF1785	PF08699	228	280	5.5e-21
		PAZ	PF02170	291	422	1.3e-35
		Piwi	PF02171	570	870	4.5e-109
<i>Caenorhabditis elegans</i>	NP_001257239.1	DUF1785	PF08699	309	390	4.2e-18
		PAZ	PF02170	399	534	2,00E-37
		Piwi	PF02171	682	981	3.8e-113
<i>Rattus norvegicus</i>	NP_067608.1	DUF1785	PF08699	179	231	1,00E-20
		PAZ	PF02170	239	374	1.9e-39
		Piwi	PF02171	522	821	2.1e-111
<i>Danio rerio</i>	NP_001289151.1	DUF1785	PF08699	189	241	4,00E-21
		PAZ	PF02170	249	384	5.8e-40
		Piwi	PF02171	532	831	1.2e-109
<i>Canis lupus familiaris</i>	XP_005629013.1	DUF1785	PF08699	176	228	1.9e-21
		PAZ	PF02170	237	371	2.5e-38

		Piwi	PF02171	518	818	6.8e-110
<i>Musca domestica</i>	XP_005175308.1	DUF1785	PF08699	288	340	3.7e-22
		PAZ	PF02170	348	483	1.7e-36
		Piwi	PF02171	645	945	5,00E-111
<i>Bombus terrestris</i>	XP_003400152.1	DUF1785	PF08699	236	288	1.7e-22
		PAZ	PF02170	297	431	1.3e-36
		Piwi	PF02171	585	886	6.8e-110
<i>Gallus gallus</i>	XP_004940123.1	DUF1785	PF08699	179	231	1,00E-20
		PAZ	PF02170	239	374	2.3e-39
		Piwi	PF02171	522	821	3.4e-111
<i>Bos taurus</i>	NP_991363.1	DUF1785	PF08699	176	228	1,00E-20
		PAZ	PF02170	236	371	1.9e-39
		Piwi	PF02171	519	818	3.7e-111
<i>Schistosoma mansoni</i>	Smp_198380.1	DUF1785	PF08699	244	296	7.6e-22
		PAZ	PF02170	305	439	3.4e-37
		Piwi	PF02171	586	886	8.4e-112
<i>Schistosoma japonicum</i>	Sjp_0044720.1	DUF1785	PF08699	307	355	5.2e-20
		PAZ	PF02170	364	498	2.8e-37
		Piwi	PF02171	645	945	9.4e-112

Nas análises da predita proteína Bgl-Piwi, na tabela 9, foram encontrados os domínios PAZ e PIWI, com o primeiro sendo representado entre os aminoácidos 271 a 405. O domínio PIWI está contido entre os aminoácidos 547 e 839, totalizando 292 resíduos. Em nossas análises não foi possível encontrar ortólogos para Bgl-Piwi em *Schistosoma mansoni* nem em *Schistosoma japonicum*, disponíveis no GeneDB (<http://www.genedb.org/>), confirmando que esse parasito não possui a via de piRNAs em seu genoma.

Tabela 9: Domínios conservados para Bgl-Piwi e seus ortólogos.

Organismo	ID NCBI	Família	ID Pfam	Alinhamento		E-value
				Início	Fim	
<i>Biomphalaria glabrata</i>	BGLTMP009852-PA	PAZ	PF02170	271	405	8.1e-35
		Piwi	PF02171	547	839	1.6e-96
<i>Aplysia californica</i>	XP_005096149.1	PAZ	PF02170	336	462	2.8e-35
		Piwi	PF02171	612	904	8.4e-93
<i>Lottia gigantea</i>	XP_009064630.1	PAZ	PF02170	206	340	7.6e-35
		Piwi	PF02171	484	777	1.1e-99
<i>Nematostella vectensis</i>	XP_001641994.1	PAZ	PF02170	281	412	1.1e-36
		Piwi	PF02171	558	857	3.7e-95
	NP_001274302.1	PAZ	PF02170	303	441	1.3e-31

<i>Hydra vulgaris</i>		Piwi	PF02171	585	875	1E-101
<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_476875.1	PAZ	PF02170	263	394	1.3e-33
		Piwi	PF02171	538	829	4.1e-97
<i>Homo sapiens</i>	NP_004755.2	GAGE	PF05831	1	106	1.8e-05
		PAZ	PF02170	278	413	7.8e-40
<i>Mus musculus</i>	NP_067286.1	Piwi	PF02171	556	847	8E-107
		PAZ	PF02170	279	414	4.3e-40
<i>Crassostrea gigas</i>	EKC35279.1	Piwi	PF02171	557	848	6.4e-105
		PAZ	PF02170	247	378	2.1e-33
		Piwi	PF02171	646	871	9.8e-76
<i>Danio rerio</i>	NP_899181.1	PAZ	PF02170	276	410	4.3e-35
		Piwi	PF02171	552	844	3E-101
<i>Canis lupus familiaris</i>	XP_534638.2	GAGE	PF05831	1	106	0,00009
		PAZ	PF02170	278	413	6.9e-40
		Piwi	PF02171	556	847	7.4e-106
<i>Rattus norvegicus</i>	XP_008764202.1	PAZ	PF02170	267	401	4.2e-35
		Piwi	PF02171	542	834	1.4e-89
<i>Gallus gallus</i>	NP_001092322.1	PAZ	PF02170	286	419	6.8e-38
		Piwi	PF02171	562	853	8.4e-106
<i>Bos taurus</i>	XP_618020.4	GAGE	PF05831	1	106	0.00012
		PAZ	PF02170	278	413	6.8e-40
		Piwi	PF02171	556	847	7.4e-106
<i>Aedes aegypti</i>	XP_001652945.1	PAZ	PF02170	363	496	4.1e-32
		Piwi	PF02171	638	930	3.7e-89
<i>Bombus terrestris</i>	XP_003400353.1	PAZ	PF02170	331	450	3.7e-25
		Piwi	PF02171	596	887	2.9e-92
<i>Musca domestica</i>	XP_005183556.1	PAZ	PF02170	347	480	7.8e-32
		Piwi	PF02171	624	914	4.7e-89

Nas análises de Bgl-Drosha (Tabela 10) ficou evidente que esta predita proteína ainda não está completa no banco de dados de *B. glabrata*, apresentando apenas um domínio Riboc. O primeiro domínio Riboc, está compreendido entre os aminoácidos 923 a 1030, totalizando 107 resíduos no domínio. É possível perceber ainda a presença do domínio DSRM, importante para a ligação à dupla fita de RNA, compreendido entre os aminoácidos 1065 e 1124.

Tabela 10: Domínios conservados para Bgl-Drosha e seus ortólogos.

Organismo	ID NCBI	Família	ID Pfam	Alinhamento		E-value
				Início	Fim	
<i>Biomphalaria glabrata</i>	BGLTMP002761-PA	Riboc_3_3	PF14622	923	1030	3.5e-22
		dsrm	PF00035	1065	1124	6.7e-07
<i>Tribolium castaneum</i>	XP_008199088.1	Riboc_3_3	PF14622	721	830	3.3e-22
		Riboc_3	PF00636	905	991	3.2e-20
		dsrm	PF00035	1019	1087	3.7e-08
<i>Apis dorsata</i>	XP_006618766.1	Riboc_3_3	PF14622	883	991	1.1e-22
		Riboc_3	PF00636	1065	1151	6.2e-20
		dsrm	PF00035	1179	1250	2.3e-10
<i>Apis mellifera</i>	XP_006558454.1	Riboc_3_3	PF14622	883	991	1.1e-22
		Riboc_3	PF00636	1065	1151	6.2e-20
		dsrm	PF00035	1179	1250	2.3e-10
<i>Bombus terrestris</i>	XP_003394274.1	Riboc_3_3	PF14622	882	989	1.8e-22
		Riboc_3	PF00636	1064	1150	6.2e-20
		dsrm	PF00035	1178	1249	2.3e-10
<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_477436.1	Riboc_3_3	PF14622	829	936	2.1e-22
		Riboc_3	PF00636	1012	1098	1,00E-20
		dsrm	PF00035	1126	1197	9.7e-13
<i>Homo sapiens</i>	XP_005248351.1	Riboc_3_3	PF14622	894	1002	5,00E-24
		Riboc_3	PF00636	1076	1164	3,00E-21
		dsrm	PF00035	1193	1263	8.5e-14
<i>Mus musculus</i>	XP_006520084.1	Riboc_3_3	PF14622	981	1089	5.4e-24
		Riboc_3	PF00636	1163	1251	3.3e-21
		dsrm	PF00035	1280	1350	9.2e-14
<i>Crassostrea gigas</i>	EKC20603.1	Riboc_3_3	PF14622	896	1005	3.3e-24
		Riboc_3_3	PF00636	1057	1180	1.6e-21
		dsrm	PF00035	1196	1265	2.8e-09
<i>Caenorhabditis elegans</i>	NP_001122460.2	Riboc_3_3	PF14622	687	789	2.2e-19
		Riboc_3	PF00636	868	955	8.3e-19
		dsrm	PF00035	983	1055	1.2e-09
<i>Danio rerio</i>	NP_001103942.1	Riboc_3_3	PF14622	882	989	3.7e-25
		Riboc_3	PF00636	1064	1152	4.2e-21
		dsrm	PF00035	1181	1251	8.3e-14
<i>Rattus norvegicus</i>	NP_001101125.2	Riboc_3_3	PF14622	961	1069	5.6e-24
		Riboc_3	PF00636	1143	1231	3.2e-21
		dsrm	PF00035	1260	1330	9,00E-14
<i>Canis lupus familiaris</i>	XP_854135.2	Riboc_3_3	PF14622	961	1069	5.3e-24
		Riboc_3	PF00636	1143	1231	3.2e-21
		dsrm	PF00035	1260	1330	9,00E-14
<i>Bos taurus</i>	XP_591998.4	Riboc_3_3	PF14622	918	1026	5.1e-24
		Riboc_3	PF00636	1100	1188	3.1e-21
		dsrm	PF00035	1217	1287	8.7e-14
<i>Musca domestica</i>	XP_005186977.1	Riboc_3_3	PF14622	817	925	3.9e-23

		Riboc_3	PF00636	1001	1087	3.7e-20
		dsrm	PF00035	1115	1186	1.1e-12
<i>Gallus gallus</i>	NP_001006379.1	Riboc_3_3	PF14622	924	1032	4.3e-24
		Riboc_3	PF00636	1106	1194	4.4e-21
		dsrm	PF00035	1223	1293	8.7e-14
		Riboc_3	PF14622	966	1056	1.4e-16
<i>Schistosoma mansoni</i>	Smp_142510.2	Riboc_3	PF00636	1145	1236	1.6e-21
		dsrm	PF00035	1265	1334	9.3e-11
		Riboc_3_3	PF14622	940	1050	6.2e-17
<i>Schistosoma japonicum</i>	Sjp_0048900.1	Riboc_3	PF00636	1129	1279	7.5e-23
		dsrm	PF00035	1308	1362	2.8e-08

Nossos resultados demonstraram que todos os domínios presentes em Dicer são encontrados em Bgl-Dicer e seus ortólogos das demais espécies analisadas (Tabela 11). O domínio Helicase está compreendido entre os aminoácidos 427 a 502, o domínio Dicer entre 592 a 683, PAZ entre 885 a 1049. No que diz respeito aos domínios catalíticos Riboc, o primeiro está compreendido entre os aminoácidos 1665 a 1842, totalizando 177 resíduos no domínio, o segundo domínio Riboc está compreendido entre os aminoácidos 1951 a 2086, com um total de 135 resíduos neste domínio. Encontra-se ainda o domínio DSRM entre os aminoácidos 2117 a 2155.

Tabela 11: Domínios conservados para Bgl-Dicer e seus ortólogos

Organismo	ID	Família	ID PFAM	Alinhamento		E-value
				Início	Fim	
<i>Biomphalaria glabrata</i>	BGLTMP001707-PA	Helicase_C	PF00271	427	502	1.3e-11
		Dicer_dimer	PF03368	592	683	1.5e-26
		PAZ	PF02170	885	1049	1.7e-29
		Riboc_3	PF00636	1665	1842	3.2e-33
		Riboc_3	PF00636	1951	2086	1.5e-22
		dsrm	PF00035	2117	2155	7.1e-05
<i>Aplysia californica</i>	XP_005106232.1	Helicase_C	PF00271	519	582	2.8e-13
		Dicer_dimer	PF03368	676	768	2.4e-26
		PAZ	PF02170	947	1111	4,00E-34
		Riboc_3	PF00636	1972	2157	1.1e-30
		Riboc_3	PF00636	2265	2398	2,00E-22
		dsrm	PF00035	2436	2485	6.1e-05
<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_524453.1	Helicase_C	PF00271	544	604	3.3e-17
		Dicer_dimer	PF03368	825	918	3.7e-28
		PAZ	PF02170	1111	1267	7.2e-37
		Riboc_3	PF00636	1742	1919	3.9e-35

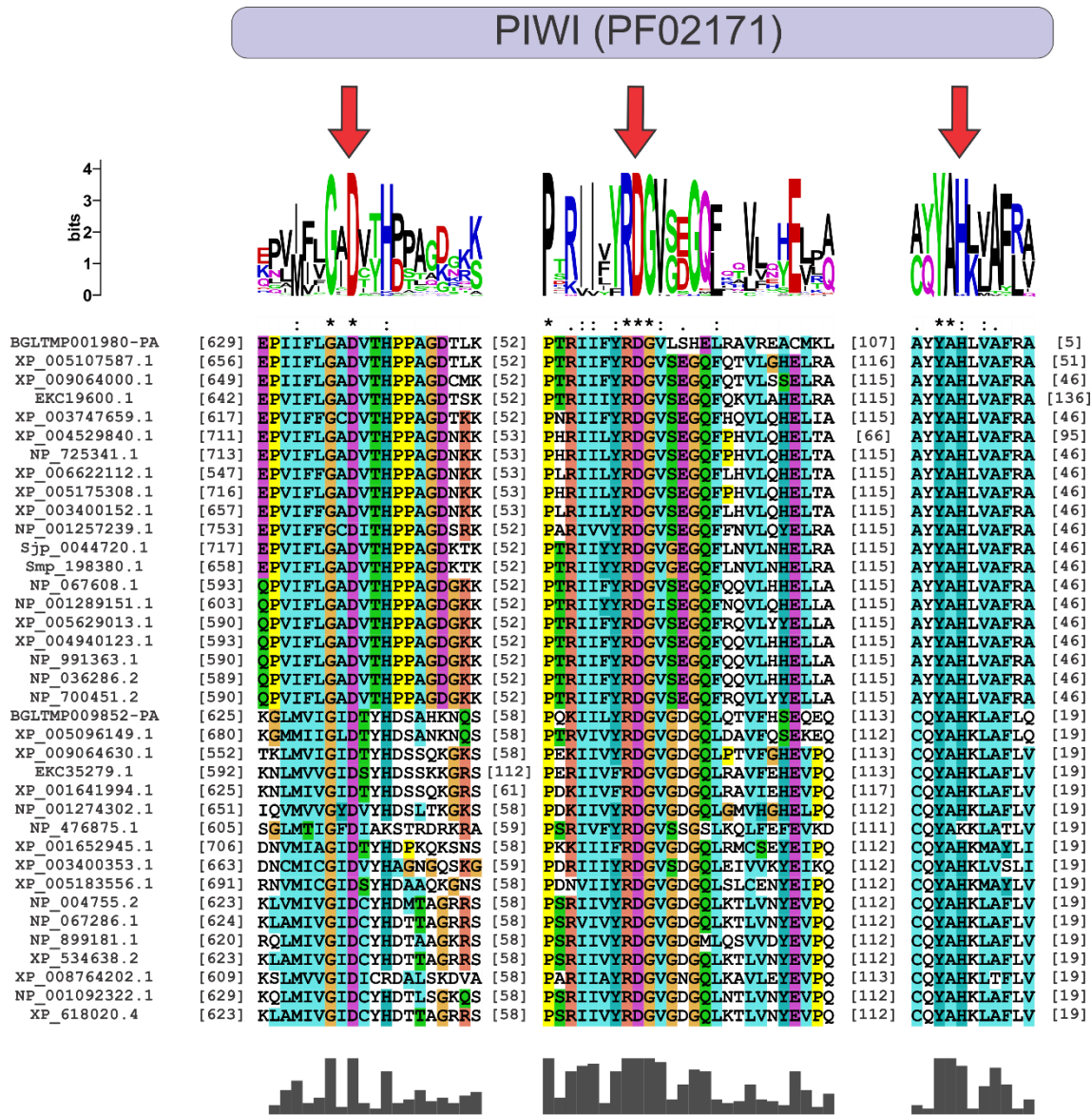
		Riboc_3	PF00636	2029	2149	3.9e-22
<i>Mus musculus</i>	NP_683750.2	DEAD	PF00270	36	198	3.9e-10
		Helicase_C	PF00271	485	544	2.2e-17
		Dicer_dimer	PF03368	620	711	1,00E-30
		PAZ	PF02170	884	1054	4.5e-39
		Riboc_3	PF00636	1303	1561	3.8e-48
		Riboc_3	PF00636	1686	1808	3.3e-23
<i>Apis dorsata</i>	XP_006618601.1	Helicase_C	PF00271	490	549	1.2e-15
		Dicer_dimer	PF03368	624	718	9.9e-28
		PAZ	PF02170	915	1064	3.4e-35
		Riboc_3	PF00636	1438	1613	1.5e-34
		Riboc_3	PF00636	1733	1854	1.2e-22
<i>Ceratitidis capitata</i>	XP_004523314.1	Helicase_C	PF00271	532	592	4.9e-17
		Dicer_dimer	PF03368	875	968	1.4e-25
		PAZ	PF02170	1168	1316	1.3e-35
		Riboc_3	PF00636	1798	1977	8.4e-35
		Riboc_3	PF00636	2086	2206	2.4e-22
<i>Metaseiulus occidentalis</i>	XP_003745061.1	Helicase_C	PF00271	465	512	3,00E-06
		Dicer_dimer	PF03368	594	685	3.7e-24
		PAZ	PF02170	870	1020	5.8e-32
		Riboc_3	PF00636	1379	1519	5.2e-33
		Riboc_3	PF00636	1607	1729	5.6e-23
<i>Caenorhabditis elegans</i>	NP_498761.2	DEAD	PF00270	15	184	6.1e-13
		Helicase_C	PF00271	436	498	1.7e-16
		Dicer_dimer	PF03368	571	666	1.3e-27
		PAZ	PF02170	851	1025	6.1e-45
		Riboc_3	PF00636	1413	1588	4.3e-31
		Riboc_3	PF00636	1679	1805	2.6e-21
<i>Danio rerio</i>	NP_001154925.1	DEAD	PF00270	36	194	2.1e-11
		Helicase_C	PF00271	481	540	2,00E-17
		Dicer_dimer	PF03368	616	707	2,00E-29
		PAZ	PF02170	880	1050	1.7e-38
		Riboc_3	PF00636	1295	1551	1.1e-49
		Riboc_3	PF00636	1645	1767	3.4e-23
<i>Canis lupus familiaris</i>	XP_868526.3	DEAD	PF00270	47	209	1.2e-10
		Helicase_C	PF00271	496	555	2.7e-17
		Dicer_dimer	PF03368	631	722	1.9e-30
		PAZ	PF02170	895	1065	4.6e-39
		Riboc_3	PF00636	1315	1577	2.6e-48
		Riboc_3	PF00636	1704	1826	3.6e-23
<i>Rattus norvegicus</i>	XP_008774532.1	DEAD	PF00270	46	208	2.2e-10
		Helicase_C	PF00271	495	554	2.2e-17
		Dicer_dimer	PF03368	630	721	8.6e-30
		PAZ	PF02170	894	1064	4.6e-39
		Riboc_3	PF00636	1313	1573	2.3e-47

		Riboc_3	PF00636	1698	1820	3.6e-23
<i>Musca domestica</i>	XP_005179924.1	Helicase_C	PF00271	551	608	2,00E-16
		Dicer_dimer	PF03368	963	1055	1.7e-24
		PAZ	PF02170	1265	1406	3.9e-31
		Riboc_3	PF00636	1880	2057	2.1e-34
		Riboc_3	PF00636	2166	2286	3.2e-22
		DEAD	PF00270	46	208	1.4e-10
<i>Bos taurus</i>	NP_976235.1	Helicase_C	PF00271	495	554	2.7e-17
		Dicer_dimer	PF03368	629	720	4.3e-30
		PAZ	PF02170	893	1063	4.6e-39
		Riboc_3	PF00636	1313	1576	1.6e-40
		Riboc_3	PF00636	1703	1825	3.6e-23
		Dicer_dimer	PF03368	840	947	6.2e-17
<i>Schistosoma mansoni</i>	Smp_169750.2	PAZ	PF02170	1292	1454	1.3e-22
		Riboc_3	PF00636	1863	2039	3.7e-31
		Riboc_3	PF00636	2149	2430	2.2e-21

5.3 ALINHAMENTO GLOBAL E ANÁLISE FILOGENÉTICA

Para finalizar o processo de caracterização *in silico* das preditas proteínas de *B. glabrata* foram conduzidos ensaios de alinhamento global e filogenia entre estas sequências e suas prováveis ortólogas de várias espécies de protostômios e deuterostômios, descritas anteriormente nas tabelas 4 a 7.

O alinhamento global foi realizado utilizando o software ClustalX2.1. No alinhamento das proteínas Ago-like e Piwi-like (Figura 3) ficou evidenciado a presença dos resíduos catalíticos altamente conservados D-D-H (Ácido aspártico-Ácido aspártico-Histidina) presentes no sítio ativo de proteínas Argonautas e do tipo RNase. É possível observar ainda que os aminoácidos adjacentes aos sítios ativos D-D-H em Bgl-Argonauta e Bgl-Piwi, apresentam uma elevada semelhança com seus ortólogos, demonstrando que estes resíduos são conservados ao longo dos clados.



Legenda:

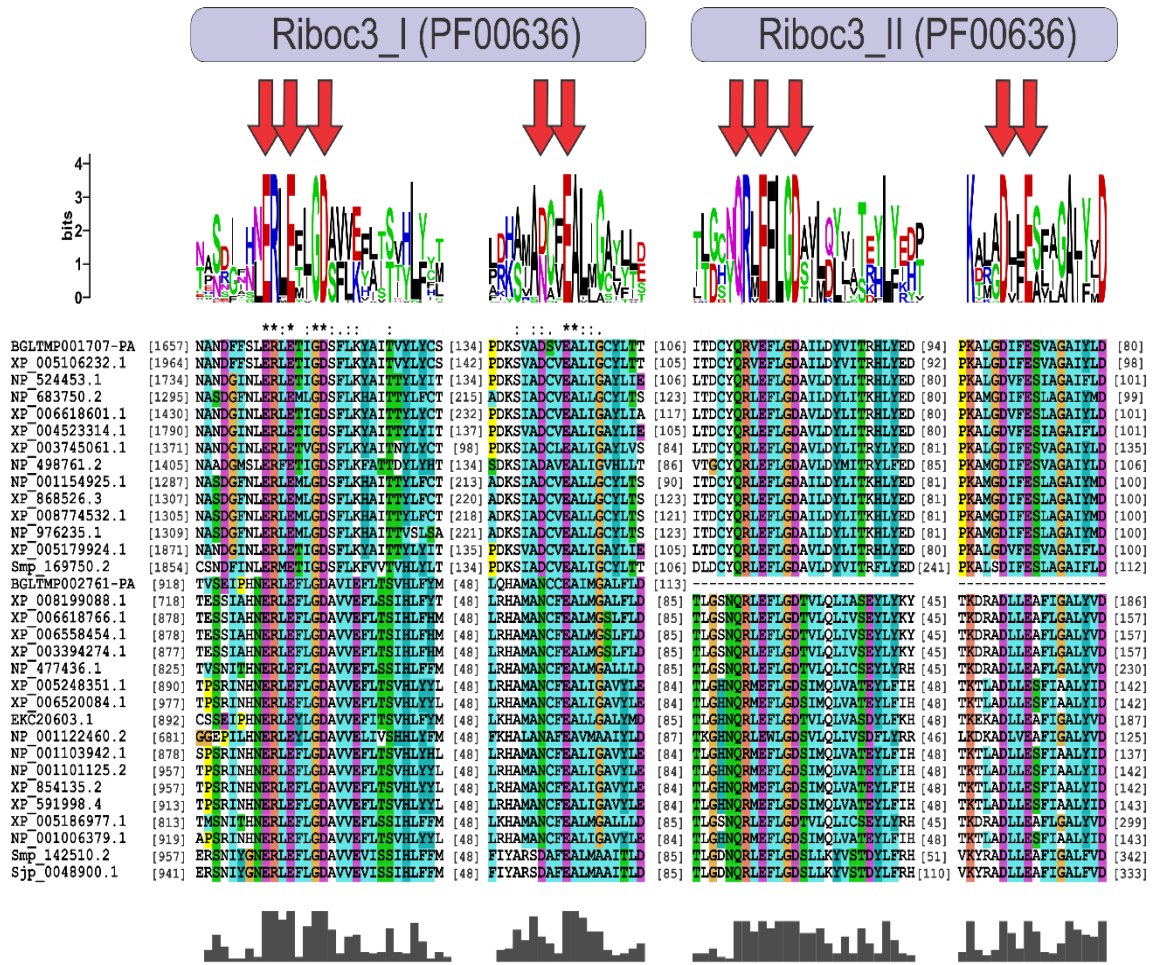


Resíduos do sítio catalítico

Figura 3: Alinhamento global do domínio PIWI das proteínas Ago-like e Piwi-like.

Os resíduos destacados, D (Ácido aspártico) e H (Histidina), altamente conservados nos domínios PIWI de *B. glabrata* e seus ortólogos são os responsáveis por sua atividade catalítica. As sequências utilizadas para a família Ago-like foram: BGLTMP001980-PA [*B. glabrata*], XP_005107587.1 [*A. californica*], XP_009064000.1 [*L. gigantea*], EKC19600.1 [*C. gigas*], XP_003747659.1 [*M. occidentalis*], XP_004529840.1 [*C. capitata*], NP_725341.1 [*D. melanogaster*], XP_006622112.1 [*A. dorsata*], XP_005175308.1 [*M. domestica*], XP_003400152.1 [*B. terrestris*], NP_001257239.1 [*C. elegans*], Sjp_0044720.1 [*S. japonicum*], Smp_198380.1 [*S. mansoni*], NP_067608.1 [*R. norvegicus*], NP_001289151.1 [*D. rerio*], XP_005629013.1 [*C. familiaris*], XP_004940123.1 [*G. gallus*], NP_991363.1 [*B. taurus*], NP_036286.2 [*H. sapiens*], NP_700451.2 [*M. musculus*]; as sequências utilizadas para a família Piwi-like foram: BGLTMP009852-PA [*B. glabrata*], XP_005096149.1 [*A. californica*], XP_009064630.1 [*L. gigantea*], EKC35279.1 [*C. gigas*], XP_001641994.1 [*N. vectensis*], NP_001274302.1 [*H. vulgaris*], NP_476875.1 [*D. melanogaster*], XP_001652945.1 [*A. aegypti*], XP_003400353.1 [*B. terrestris*], XP_005183556.1 [*M. domestica*], NP_004755.2 [*H. sapiens*], NP_067286.1 [*M. musculus*], NP_899181.1 [*D. rerio*], XP_534638.2 [*C. familiaris*], XP_008764202.1 [*R. norvegicus*], NP_001092322.1 [*G. gallus*], XP_618020.4 [*B. taurus*].

Para as análises de alinhamento referentes às preditas proteínas Drosha e Dicer (Figura 4), foi possível perceber que os dois domínios Riboc, responsáveis pela ação catalítica destas, se encontram presentes em Dicer com a presença dos aminoácidos importantes para essa função E-E-D-D-E-Q-E-D-D-E (Ácido glutâmico - Ácido glutâmico - Ácido aspártico - Ácido aspártico - Ácido glutâmico - Glutamina - Ácido glutâmico - Ácido aspártico - Ácido aspártico - Ácido glutâmico) e altamente conservados dentre as espécies, se encontram presentes também em Dicer de *B. glabrata*. Em Drosha, provavelmente devido ao fato de o genoma de *B. glabrata* ainda não estar completamente curado, não foi possível evidenciar a presença do segundo domínio catalítico Riboc. Porém, o primeiro domínio Riboc está presente e com os domínios de importância catalítica E-E-D-E (Ácido glutâmico - Ácido glutâmico - Ácido aspártico - Ácido glutâmico).



Legenda:



Resíduos do sítio catalítico

Figura 4: Alinhamento global dos domínios RIBOc das proteínas Dicer e Drosha. Os resíduos destacados, D (Ácido aspártico) e E (Ácido glutâmico), altamente conservados nos domínios RIBOc de *B. glabrata* e seus ortólogos são os responsáveis por sua atividade catalítica. As seqüências utilizadas para a família Dicer foram: BGLTMP001707-PA [*B. glabrata*], XP_005106232.1 [*A. californica*], NP_524453.1 [*D. melanogaster*], NP_683750.2 [*M. musculus*], XP_006618601.1 [*A. dorsata*], XP_004523314.1 [*C. capitata*], XP_003745061.1 [*M. occidentalis*], NP_498761.2 [*C. elegans*], NP_001154925.1 [*D. rerio*], XP_868526.3 [*C. familiaris*], XP_008774532.1 [*R. norvegicus*], NP_976235.1 [*B. taurus*], XP_005179924.1 [*M. domestica*], Smp_169750.2 [*S. mansoni*]; as seqüências utilizadas para a família Drosha foram: BGLTMP002761-PA [*B. glabrata*], XP_008199088.1 [*T. castaneum*], XP_006618766.1 [*A. dorsata*], XP_006558454.1 [*A. mellifera*], XP_003394274.1 [*B. terrestris*], NP_477436.1 [*D. melanogaster*], XP_005248351.1 [*H. sapiens*], XP_006520084.1 [*M. musculus*], EKC20603.1 [*C. gigas*], NP_001122460.2 [*C. elegans*], NP_001103942.1 [*D. rerio*], NP_001101125.2 [*R. norvegicus*], XP_854135.2 [*C. familiaris*], XP_591998.4 [*B. taurus*], XP_005186977.1 [*M. domestica*], NP_001006379.1 [*G. gallus*], Smp_142510.2 [*S. mansoni*], Sjp_0048900.1 [*S. japonicum*].

Para construção da árvore filogenética das preditas proteínas e suas ortólogas foi utilizado o método Neighbor-Joining com valor de Bootstrap igual a 1000 no software Mega 5.2 (Saitou e Nei, 1987; Tamura *et al.*, 2011). Com nossos resultados, foi possível afirmar que as preditas proteínas Bgl-Argonata e Bgl-Piwi (Figura 5) são ortólogas de suas respectivas proteínas Ago-like e Piwi-like. Bgl-Drosha e Bgl-Dicer (Figura 6) são também, ortólogas das proteínas Dicer e Drosha das demais espécies analisadas.

Bgl-Argonata, Bgl-Piwi e Bgl-Dicer apresentam um posicionamento na árvore no mesmo clado que *A. californica*, formando um grupo monofilético entre elas, que são moluscos. Bgl-Drosha forma um grupo monofilético com Drosha de *Crassostrea gigas*, formando um agrupamento mollusca.

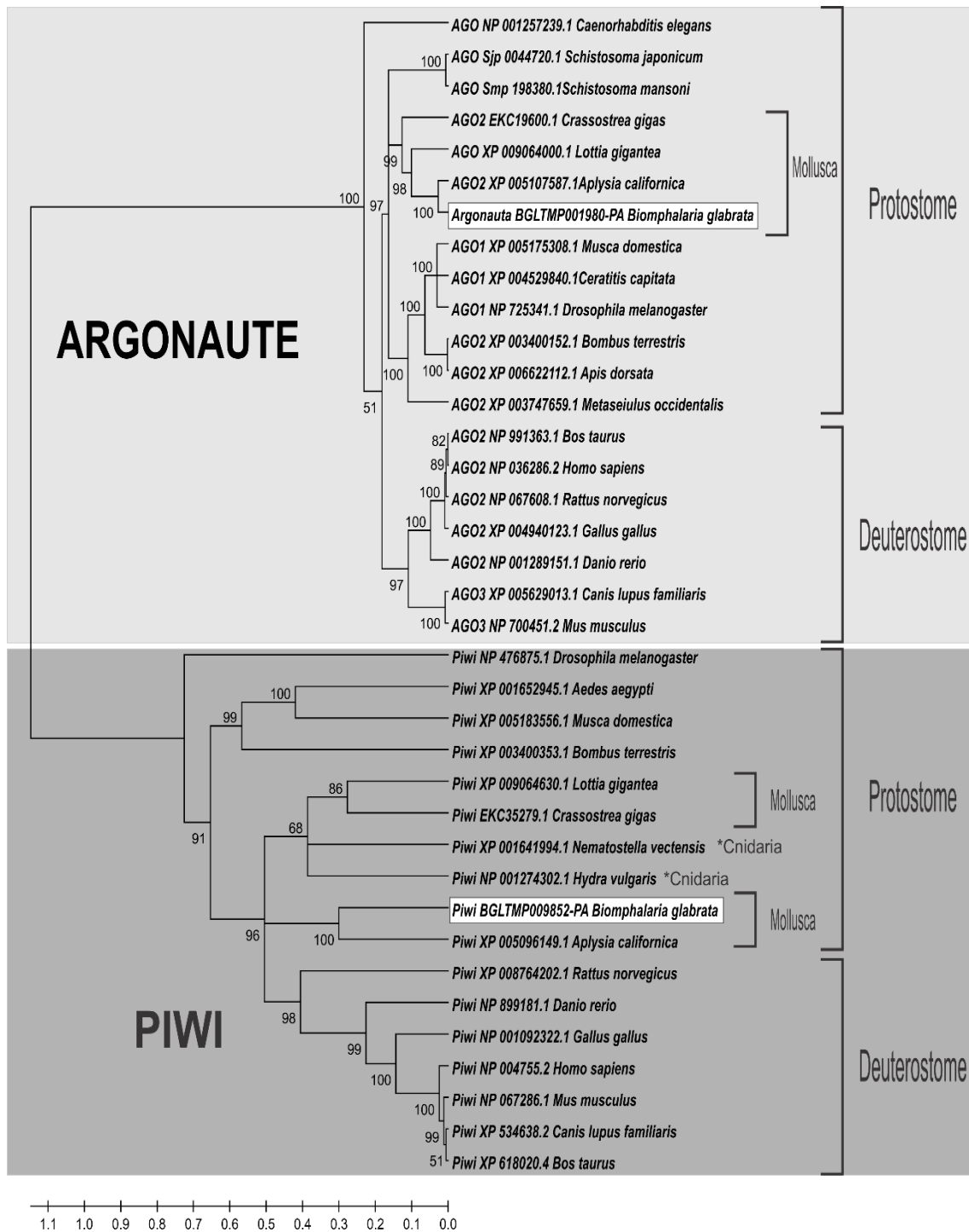


Figura 5: Árvore filogenética para as preditas proteínas Bgl-Argonauta e Bgl-Piwi. Bgl-Argonauta apresenta elevada similaridade com Argonauta de *A. californica* formando um grupamento monofilético mollusca com valor de bootstrap igual a 100. Bgl-Piwi também forma um grupamento monofilético com Piwi de *A. californica* com valor de bootstrap igual a 100.

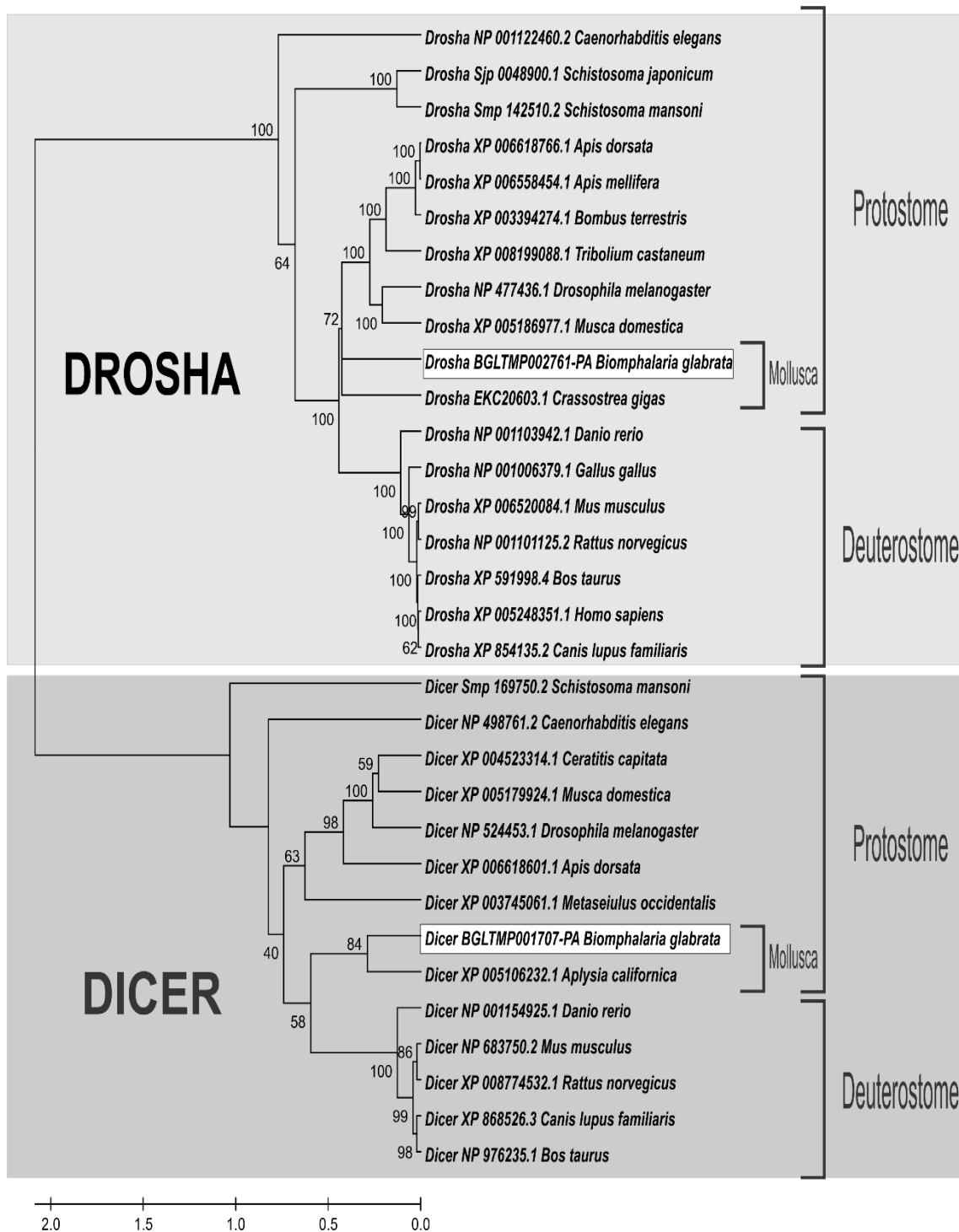


Figura 6: Árvore filogenética para as preditas proteínas Bgl-Drosha e Bgl-Dicer. Bgl-Drosha apresenta similaridade com Drosha de *C. gigas* formando um grupamento mollusca com valor de bootstrap igual a 72. Já Bgl-Dicer forma um grupo mollusca monofilético com Dicer de *A. californica* com valor de bootstrap igual a 100.

5.4 DESENHO DE INICIADORES

Após as análises de caracterização *in silico* das preditas proteínas das vias de processamento de miRNAs e piRNAs em *B. glabrata*, os transcritos e sequências de ESTs foram utilizados para sintetizar iniciadores para a análise de expressão desses genes. Esses iniciadores estão disponíveis na tabela 12.

Tabela 12: Primers dos genes da maquinaria de pequenos RNAs em *B. glabrata*

Gene	Sequência (5' para 3')	TM °C	Amplicom Predito
Bgl-Argonaute	(F): TTAGCTACCCAGTGC GTCCAG (R): TTGGTTCTCGGAATACATGAGG	55	148 pb
Bgl-Dicer	(F): GTCAAGGCAGACTGTGGCTACC (R): CTTTGGAAGTGAATCCTGCTCG	55,5	136 pb
Bgl-Drosha	(F): CATTGCGTTTCCACATTTGTC (R): GCGGTAAGAAGTGTGAGTCAGG	55	105 pb
Bgl-Fmr1	(F): CATGGAAAGCATTAGCAACG (R): TCTCTAGGAGGCGGGAAATAAG	54	156 pb
Bgl-Partner-Dicer	(F): CAAGGTCCTCCACATGCCAG (R): TTTGCTGCGGCTGTTCGTTTC	55	110 pb
Bgl-TDRD1	(F): GGTGTCAGGAGAGTGAATCGG (R): ACTTGGCAGCACAAATCATCC	54	126 pb
Bgl-PIWI	(F): TGCAACCTTTGATGACTGCTGC (R): CCCATCACCAACACCATCTCTG	58	98 pb
Bgl-Tudor-SN	(F): TGCCACTGCCACCACGATAC (R): AACACTTCCACCACAAGCCAC	56,5	152 pb
Bgl-SPN-E	(F): TGGCTAAGTCATCTTTGGTTGC (R): AACTGGCAGGTCTCTCAACATG	53,5	92 pb
Bgl-Exportina 5	(F): AGACAGGCGGCATTCATTG (R): TCCATGAAGTACTCGGGTGAAC	53	101 pb
Bgl-Mioglobina	(F): CAAGCTCGCCAAGTCTCACGTC (R): GCTTTGGGTTTCGTCACCTCCG	58,5	126 pb
Bgl-Partner-Drosha	(F): ACCCAGTCCCTTCCAACCTTCTC (R): CCCACATTGATGGTGAACCTCAC	55	123 pb

Foi realizada PCR para avaliação da especificidade dos iniciadores. Utilizando gel de agarose 2%, verificou-se que os produtos gerados pela PCR demonstraram tamanhos condizentes com a parte do gene predito, não apresentando produtos secundários, como pode ser evidenciado nas figuras 7 A e B. Esses resultados comprovam a especificidade dos iniciadores sintetizados.

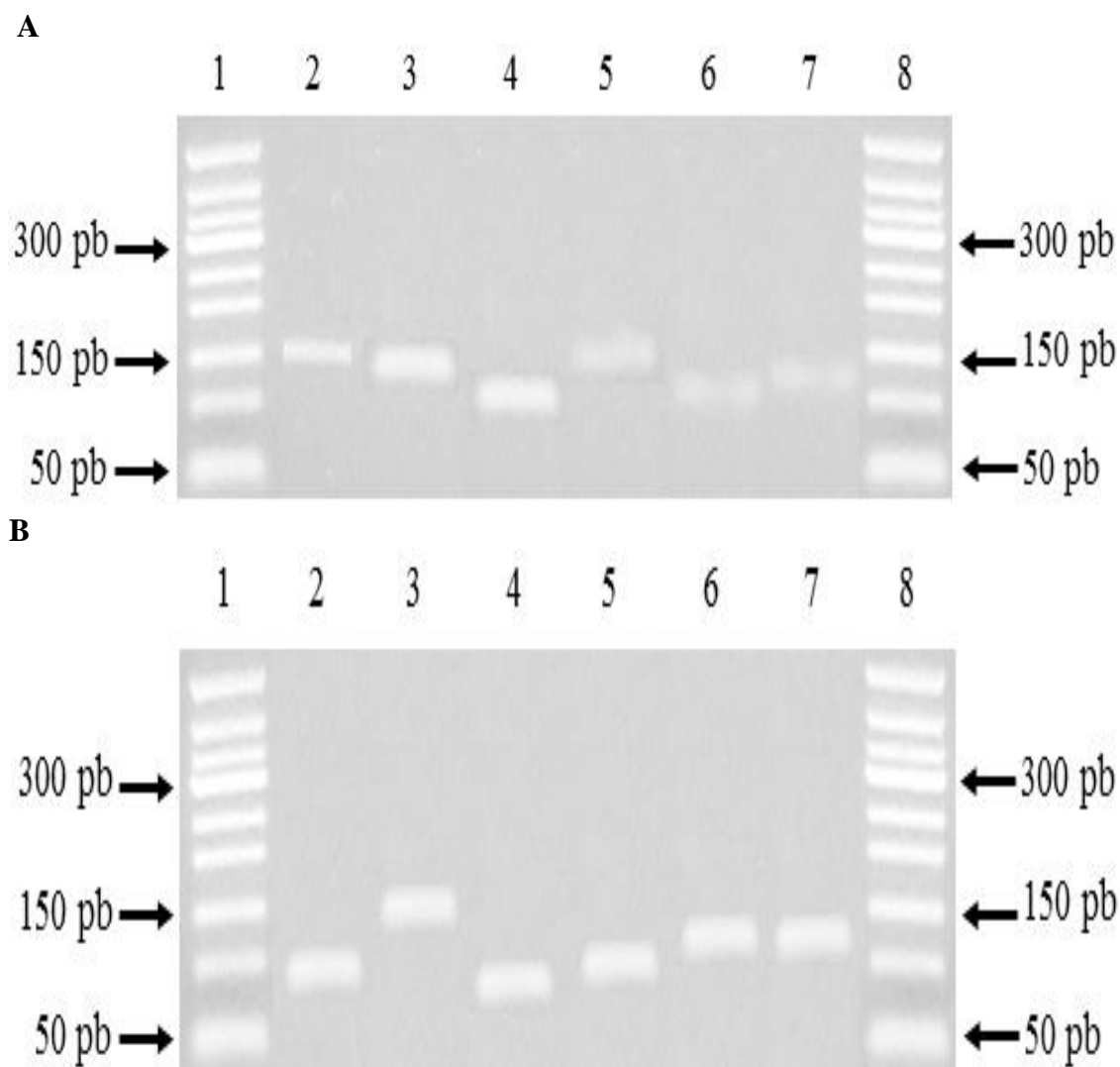


FIGURA 7: Eletroforese em gel de agarose 2% para avaliação dos produtos de PCR referentes aos iniciadores dos genes da maquinaria de pequenos RNAs **A)** 1 – Marcador de Peso molecular (QIAGEN™ 239025), 2 – Argonauta, 3 – Dicer, 4 – Drosha, 5 – FMR, 6 – Parceira de Dicer (Loquacious), 7 – TDRD, 8 – Marcador de Peso molecular (QIAGEN™ 239025); **B)** 1 – Marcador de Peso molecular (QIAGEN™ 239025), 2 – Piwi, 3 – Tudor, 4 – SPN, 5 – Exportina, 6 – Mioglobina, 7 – Parceira de Drosha, 8 – Marcador de Peso molecular (QIAGEN™ 239025).

5.5 SEQUENCIAMENTO DOS AMPLICONS

Os iniciadores foram submetidos a PCR e os amplicons gerados foram submetidos ao sequenciamento tipo Sanger (Sanger *et al.*, 1977) afim de comprovar a especificidade destes em relação aos seus alvos no transcriptoma de *B. glabrata*. Para esta análise foram utilizados caramujos adultos já maduros sexualmente.

As sequências geradas por cada primer foram inicialmente analisadas quanto à possibilidade de haver agrupamento entre estas. Para tanto foi utilizado o algoritmo CAP3 (<http://doua.prabi.fr/software/cap3>). Os agrupamentos que formaram uma sequência consenso, denominada contig, foram analisados diretamente contra o banco de dados de transcriptoma de *B. glabrata*. As sequências testadas podem ser conferidas na tabela 13.

TABELA 13: Sequências obtidas do sequenciamento e processadas por CAP3

Nome	Fita	Sequência do Contig (5' para 3')
Bgl-Argonauta	-	CCCGGCCTAGGGCATAGTATACTGTTGACTCCCCAAGCTTAACATT GATCTTAAGGCAGAGATTGGAAAGAGTCTGTGGAGTGGTTTTGTT ACATTCTTGGCCTGGACGCACTGGGTAGCTAAAACGG
Bgl-Dicer	+	GGACACGGGACAATAATGGAATCGCATAATGAATTAGAATAGAAT GGGACTTTGTGGACAAAAGTAATTGATTTTATAAAAATAGAGAAAC GAGCAGGATTCAGTTCCAAAGAAGGATTTTAAAAGGT
Bgl-Drosha	-	GGCAATAAAGGGATTCTATCACAACCTGTAGTCTATGGAATTCTC TAGTACATCCAGACAAATGTGGAAACGCAAAGCTAAAAAGCC
Bgl-Fmr1	-	CGGGCAAATAAGGTTCACTTGGATCATCTCAAGGAAGTGGAACAG TTGCGCCAAGCTAAACTTGAAATTGACCAACAGCTTAAGTCATTAT CAGGGCCCCAGCCTGGCTCTATTTCCCGCCTCCTAGAGAAGACCT GTGATATGAAATCTGGATGGGCGTCTTTCTGTTTTTTTTGTCAGCAC TTCTTCTCTCCATGAATCAGCCTATACTT
Bgl-Loquacious	+	GGGGGGTTTTTCCATCAGTTACCTTTTTGTCAAACTTTCCCAATT TGATGTTGCAGATGAATTCTCTGGCATGTGGAGGACCTGAGCCCCG TCTGGCGTCTAGATGATTAAGGGAGGGCCCA
Bgl-TDRD1	-	GGGCCAGTCTATCTATCAGCAGTATTATCCAGACTTCATATGACTC AGGACATGAGGCCATTACACAACCTGTGTCCCAGGGATGATTTGTGC TGCCAAGTAATATCGGAATTTAAAAAGAAGGCTATCTCGTGACTA GGAGGGGGAAATTCCTCATTTATTGCCCTCTTCAATCTTTTCTCAA ACGATAACGTGGA
Bgl-PIWI	-	AATTCCTTTTTTGGCGGCAGTGCCTTGTTACATCATGATATTCCT AAGTGCAGCAGTCATCAAAGGTTGCAATTGGAAAAAGATGATGT GAACAAGGCACTGCCGCAAAGATAATTCTTAAACAGAGGGGGTG TGGGGGGGGGGA
Bgl-Tudor-SN	+	TTTTGGGCTGTGTATCAGTCCAAGTGATGAGATGCTAAGCAAGAT GCTGTTGATGCTCTTTACAATGACATCCTGAACAAGACAATGCTGC TCAATATTGAGTATCGTGGTGGCAGTGGCAAGAGCATCAACAGCA TCTTGCTTAGCATCTTCATCACTTGGGACTGATACACAGGCAAGTG TATATTCAGTGGCTTGTGGTGGAAAGTGTACAGCAGATGCTGTTGAT GCTCTTTACAATGACATCCTGAACAAGACAATGCTGCTCAATATTG AGTATCGTGGTGGCAGTGGCAA
Bgl-SPN-E	+	GGGGATTCTCTGGTGGCTTGGCACACAGAGTTGATAGAAGTTGG CATGTTGAGAGACCTGCCAGTAGATCGGGGAGTTGGATAGTCAA CAAAGAAAACCTTAGCAACCAAAGATGACTTAGCA
Exportina 5	-	GGGGAATTATTAATCTTCTGATGACCACAACCTCCTTGACCGGTGCA ATAACTTCCTCAATGAATGCCGCCTGTCACCATGAGGGGCTCGAAG ATTCTATAAGGCTTTGGTTCTCAAAAAAAAAAAGGAAATTTTTTC CAACAAATTACTCAT
Mioglobina	+	AAAAACGGACTCGAGTCTTTCGGACTCTGCACAGAACATTCACAG CTTCATTGAAAGTGCTCTTGGAGTCGGTGCCGGAAGTGACGAACCC AAAGCACTTCATGGGGTGGGACAGGACAGGTGGAGGGGGAAGGA GGATTGGGTCGGGTTTTCGGGTGGAAAGGGAGGGGTGGGTTGGCTT CGTCTTTCCCAAAAAAAAAAACCTCCCCGCATAACACAAAAAAAAAA ACCACGACAACCTAACTCACTACTA
Partner-Drosha	+	CCCCGATTCGAGGACTTTGGCATGGGCACACCCAGTGTGAGGTGA GCACCAAGGCTTTGAAGAATCAGAAGTGTGAGTTCACCATCAATG TGGGACCGGGGCTAGTACCCAAGAGACATTCAGGAGAAGTTGGA AGGGACTGGGTATCCTCCCTTTTTTTTTCTCCCTCTTCTCCGTTTTCT CCCCCTAACATTTT

As sequências geradas foram inicialmente confrontadas contra o banco de dados Vector Base (<https://www.vectorbase.org/blast?organism=Biomphalaria%20glabrata>) utilizando a ferramenta BLASTx, com a qual é possível inserir uma sequência de DNA e obter seu correspondente protéico.

Afim de certificar a identidade dos transcritos, estes foram confrontados contra o banco de dados RefSeq do NCBI, onde apenas organismos modelo foram utilizados na análise. Nesta etapa *D. melanogaster* e *C. elegans* foram os escolhidos, uma vez que são referência e filogeneticamente estão próximos de *B. glabrata* fazendo parte do táxon protostomia. Os resultados dessa análise podem ser evidenciados na tabela 14 e demonstraram que os transcritos obtidos no sequenciamento foram de fato os genes preditos, confirmando a presença destes no transcriptoma de *B. glabrata*.

TABELA 14: Preditas proteínas de *B. glabrata* e seus ortólogos em *D. melanogaster* e *C. elegans*.

Nome	Ref. Seq. <i>D. melanogaster</i>	E-value	Ref. Seq. <i>C. elegans</i>	E-value
Bgl-Argonauta	Argonauta-1 - NP_725341.1	0.0	Proteína ALG-1 - NP_001257239.1	0.0
Bgl-Dicer	Dicer-1 - NP_524453.1	7e-140	Protein DCR-1 - NP_498761.2	4e-112
Bgl-Drosha	Drosha - NP_477436.1	0.0	Proteína DRSH-1 - NP_001122460.2	7e-89
Bgl-Fmr1	Fmr1 - NP_731445.1	6e-84	Proteína C56G2.1 - NP_741191.1	0.12
Bgl-Loquacious	Loquacious - NP_609646.1	3e-53	Proteína STAU-1 - NP_508196.1	9e-12
Bgl-TDRD1	Tudor - NP_476773.1	1e-31	Proteína TSN-1 - NP_494839.1	1e-06
Bgl-PIWI	Argonauta 3 - NP_001036627.2	0.0	Proteína PRG-1 - NP_492121.1	3e-160
Bgl-Tudor	Tudor-SN - NP_612021.1	0.0	Proteína TSN-1 - NP_494839.1	0.0
Bgl-SPN-E	Spindle E - NP_476741.1	2e-180	Proteína MOG-1 - NP_499212.1	1e-48
Bgl-Exportina 5	Ranbp21 - NP_608339.2	0.0	Proteína XPO-1 - NP_741567.1	2e-11
Bgl-Mioglobina	Ugt86Dc - NP_652625.2	0.045	Proteína GLB-13 - NP_510079.2	2e-04
Bgl-Partner-Drosha	Partner-Drosha - NP_001263149.1	5e-102	Proteína PASH-1 - NP_492774.1	3e-17

5.6 EXPRESSÃO GÊNICA

Para os ensaios de avaliação da expressão gênica foi realizada PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR). Os iniciadores para amplificação dos genes Argonauta, Drosha, Piwi, Tudor e Exportina 5 que apresentaram nas curvas padrão valores de eficiência entre 90 a 110 % e R2 superior a 0,985, adequados para a continuidade das análises (Bustin *et al.*, 2009) foram avaliados. Foram utilizados pelo menos cinco pontos para a construção das curvas-padrão. A eficiência foi calculada através da fórmula: $efficiency (\%) = [10^{(-1/slope)} - 1] * 100$. O valor da eficiência para cada um desses alvos, bem como para o gene endógeno Mioglobina, utilizado para normalizar os ensaios de expressão gênica relativa estão dispostos nas figuras 8 a 13.

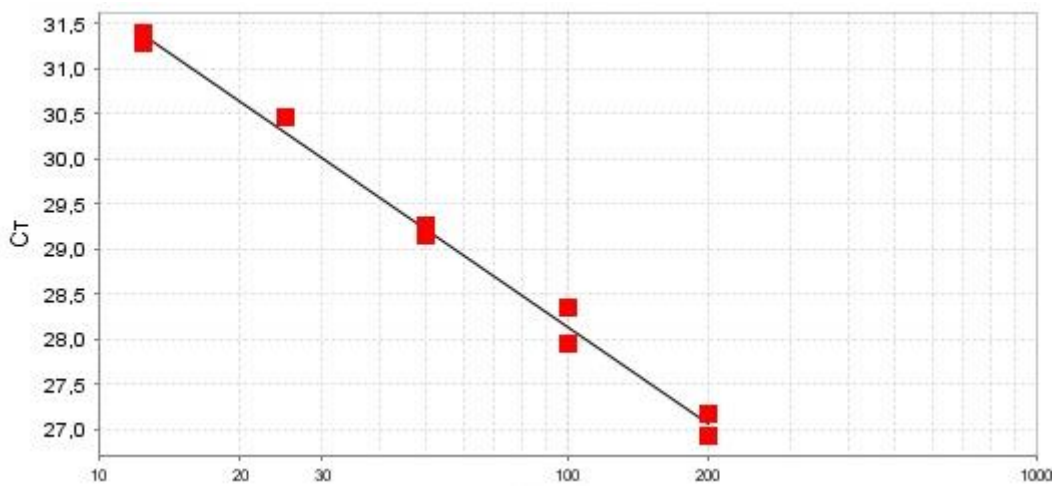


FIGURA 8: Curva padrão obtida para determinar a eficiência dos iniciadores para o gene Argonauta na reação de RT qPCR. Foram obtidos com valores de Slope igual a -3,586; R² igual a 0,993 e a eficiência calculada foi de 90,065.

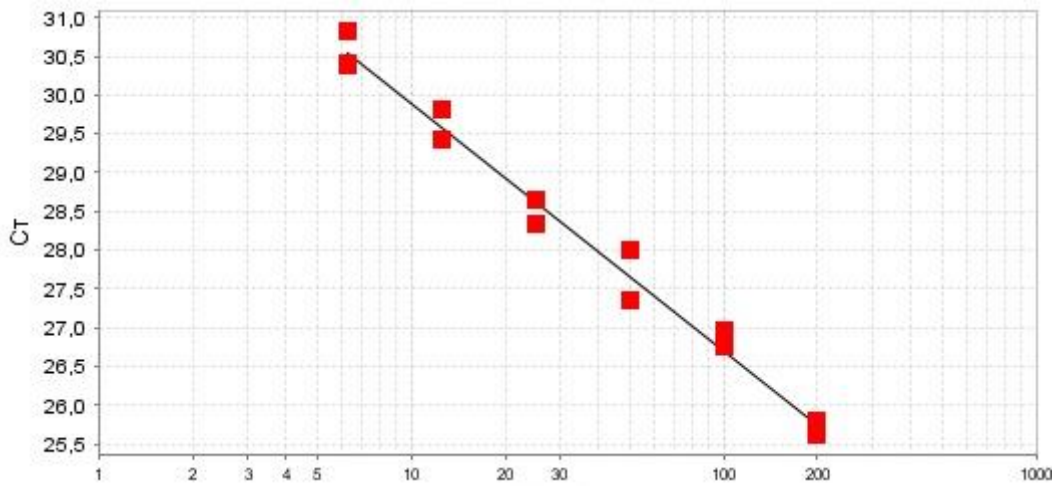


FIGURA 9: Curva padrão obtida para determinar a eficiência dos iniciadores para o gene Droscha na reação de RT qPCR. Foram obtidos com valores de Slope igual a $-3,178$; R^2 igual a $0,987$ e a eficiência calculada foi de $106,364$.

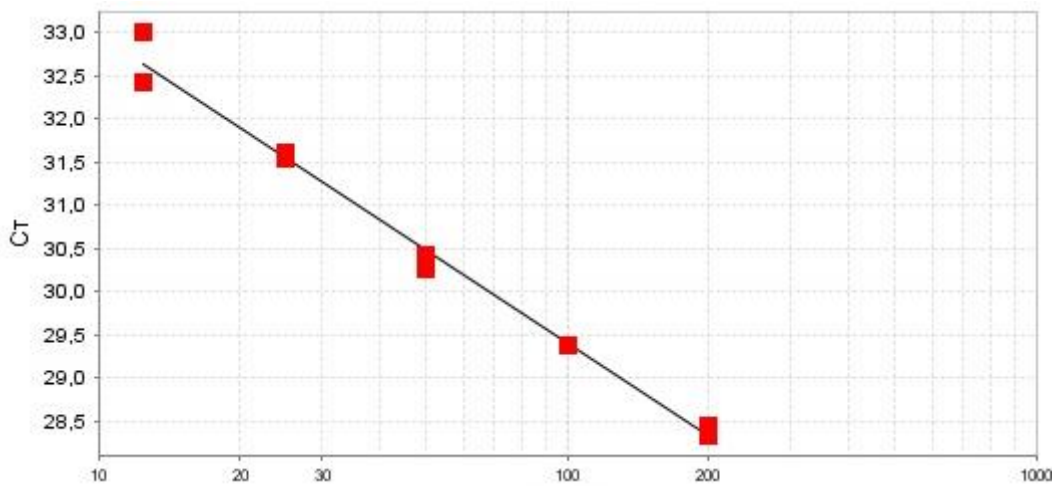


FIGURA 10: Curva padrão obtida para determinar a eficiência dos iniciadores para o gene Exportina 5 na reação de RT qPCR. Foram obtidos com valores de Slope igual a $-3,572$; R^2 igual a $0,99$ e a eficiência calculada foi de $90,53$.

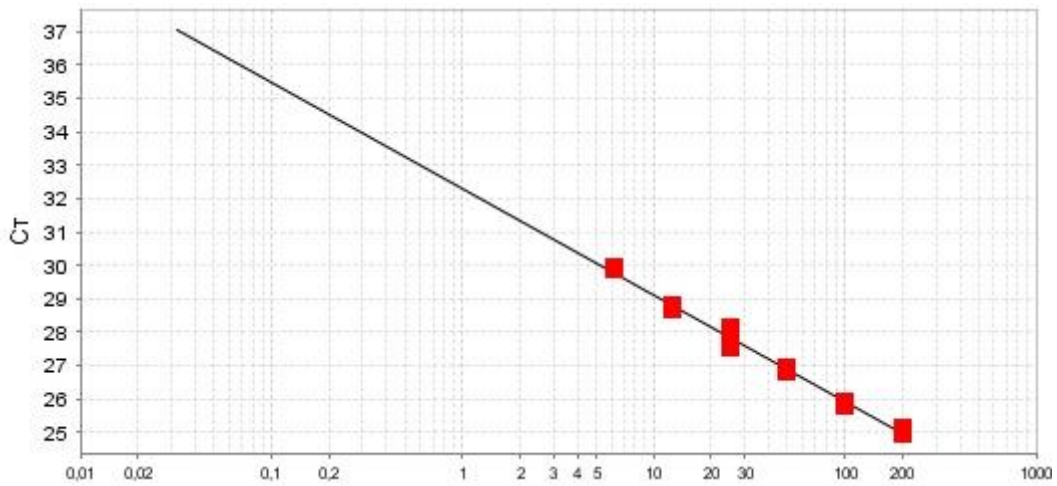


FIGURA 11: Curva padrão obtida para determinar a eficiência dos iniciadores para o gene Piwi na reação de RT qPCR. Foram obtidos com valores de Slope igual a -3,176; R^2 igual a 0,99 e a eficiência calculada foi de 106,491.

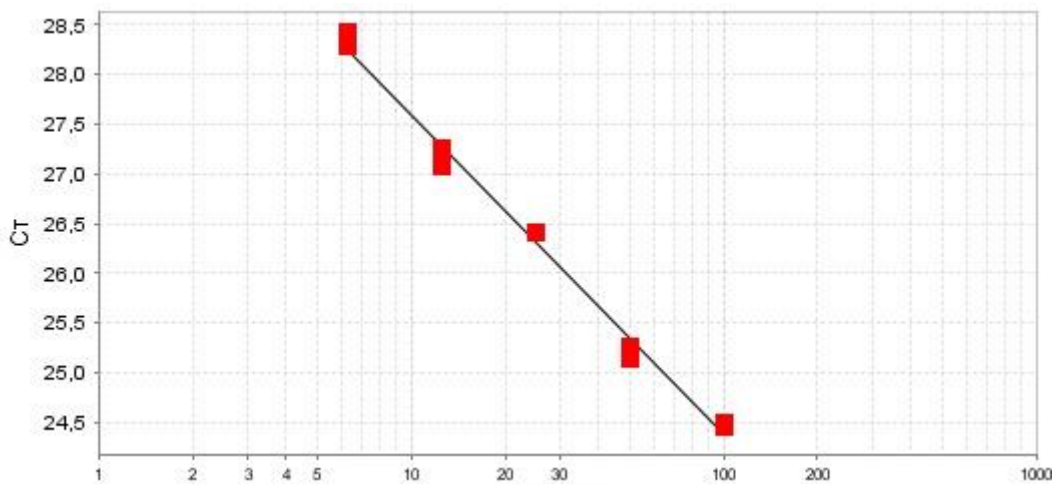


FIGURA 12: Curva padrão obtida para determinar a eficiência dos iniciadores para o gene Tudor na reação de RT qPCR. Foram obtidos com valores de Slope igual a -3,226; R^2 igual a 0,992 e a eficiência calculada foi de 104,147.

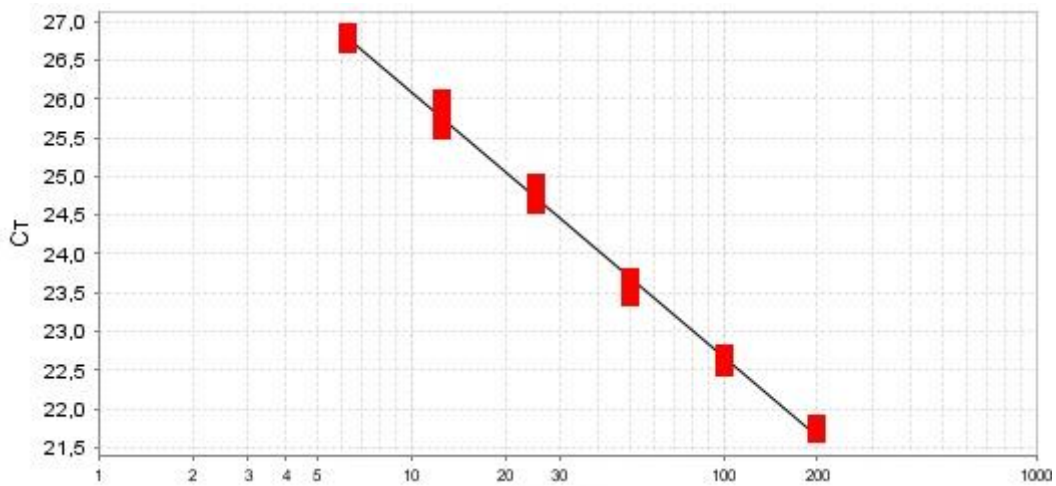


FIGURA 13: Curva padrão obtida para determinar a eficiência dos iniciadores para o gene Mioglobina na reação de RT qPCR. Foram obtidos com valores de Slope igual a -3,415; R^2 igual a 0,995 e a eficiência calculada foi de 96,238.

Os demais alvos não apresentaram perfis de amplificação e valores de eficiência adequados para os ensaios de qRT-PCR. As curvas padrão obtidas demonstram não ser possível a utilização destes iniciadores no presente estudo (Figuras 14 a 19).

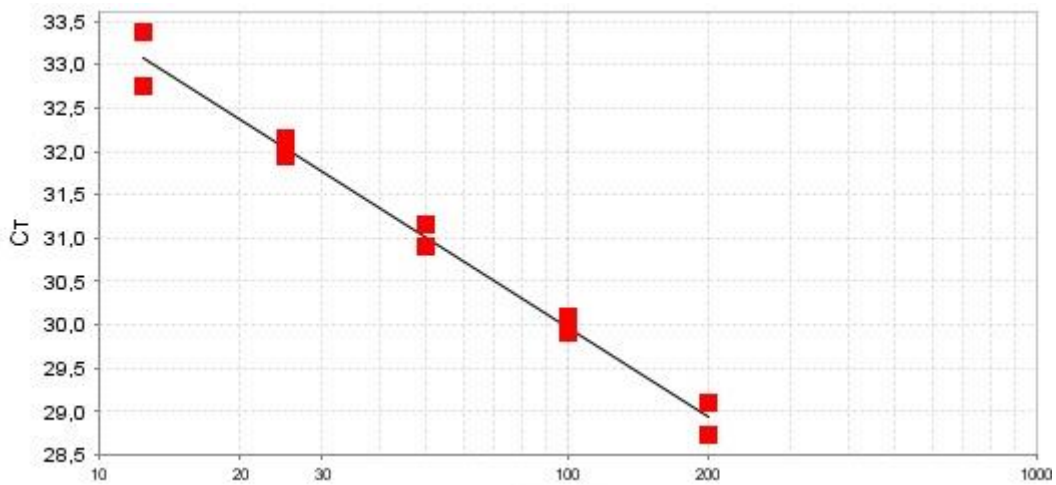


FIGURA 14: Curva padrão obtida para determinar a eficiência dos iniciadores para o gene Dicer na reação de RT qPCR. Foram obtidos com valores de Slope igual a -3,432; R^2 igual a 0,984 e a eficiência calculada foi de 95,595.

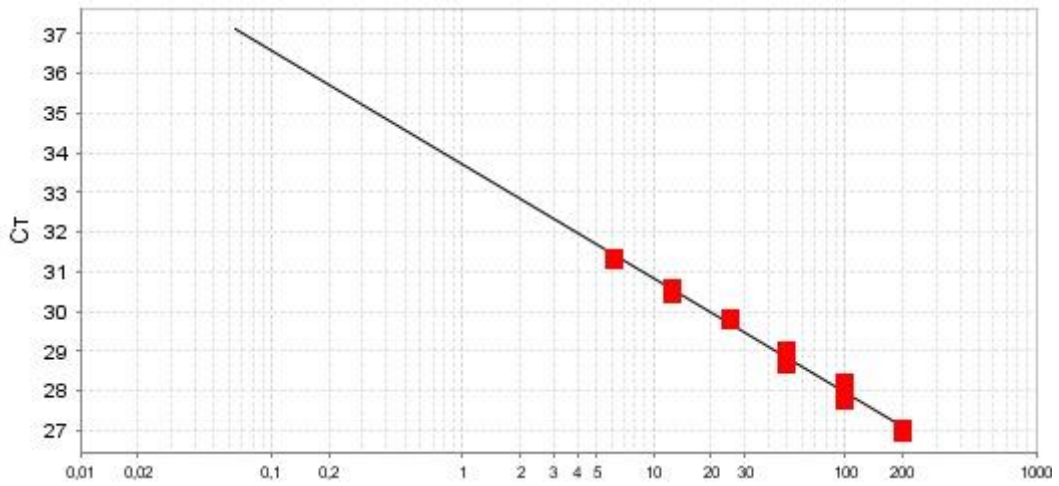


FIGURA 15: Curva padrão obtida para determinar a eficiência dos iniciadores para o gene SPN na reação de RT qPCR. Foram obtidos com valores de Slope igual a -2,882; R^2 igual a 0,99 e a eficiência calculada foi de 122,346.

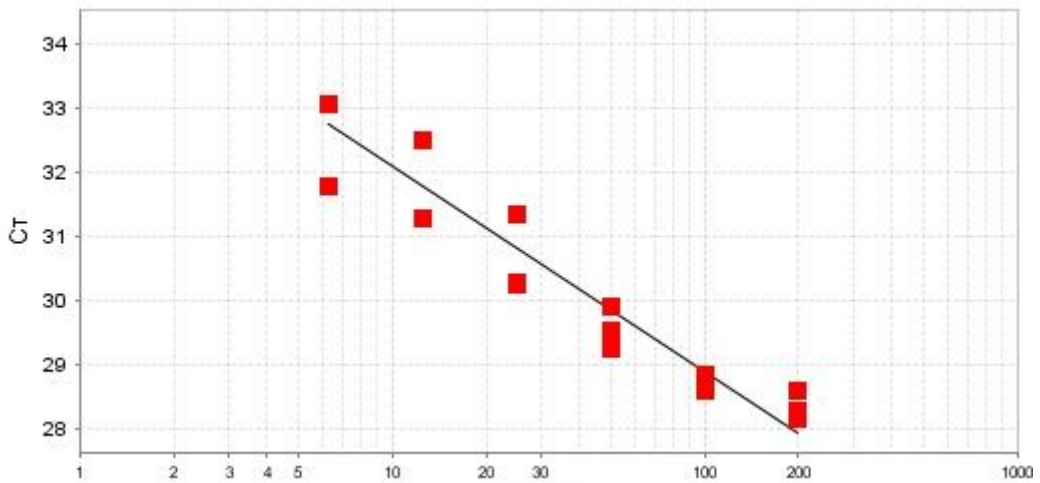


FIGURA 16: Curva padrão obtida para determinar a eficiência dos iniciadores para o gene Loquacious na reação de RT qPCR. Foram obtidos com valores de Slope igual a -2,785; R^2 igual a 0,97 e a eficiência calculada foi de 128,608.

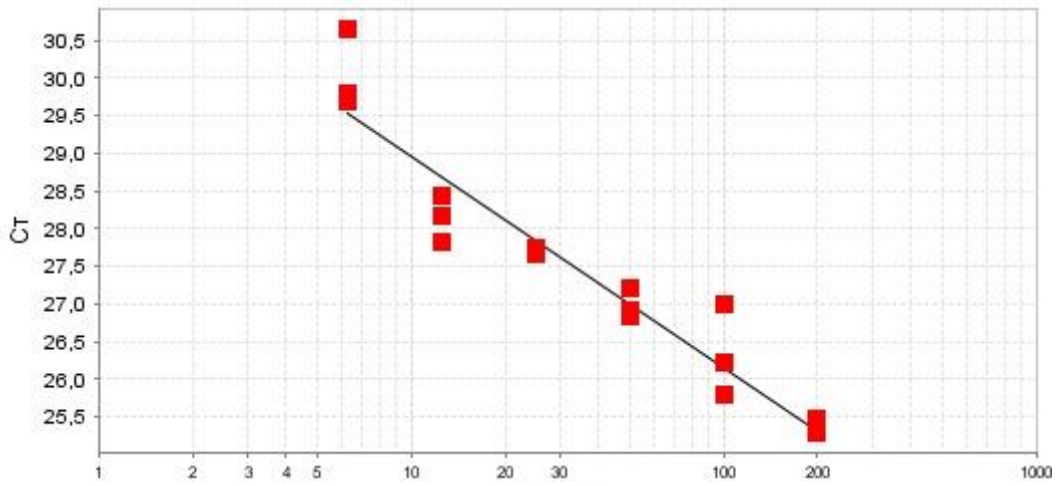


FIGURA 17: Curva padrão obtida para determinar a eficiência dos iniciadores para o gene Partner de Droscha na reação de RT qPCR. Foram obtidos com valores de Slope igual a $-2,804$; R^2 igual a $0,917$ e a eficiência calculada foi de $127,324$.

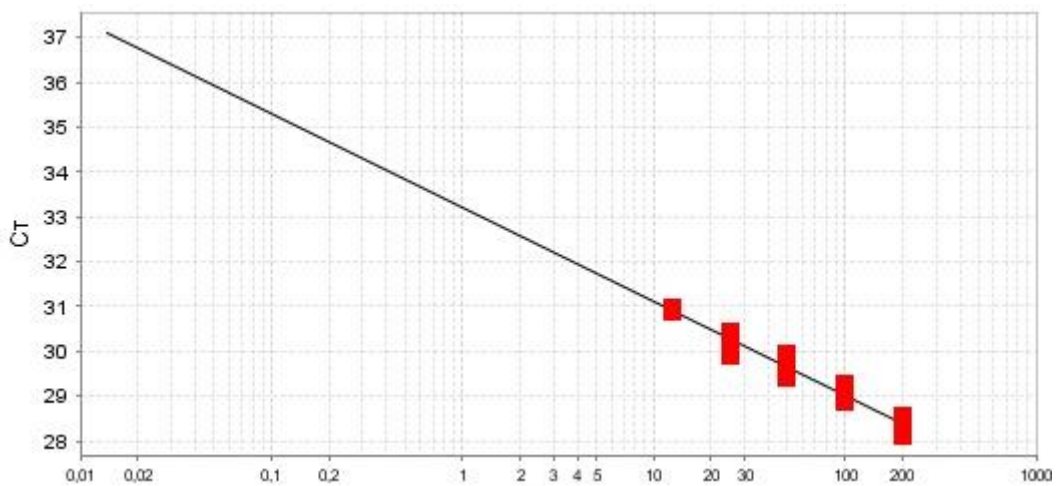


FIGURA 18: Curva padrão obtida para determinar a eficiência dos iniciadores para o gene TDRD na reação de RT qPCR. Foram obtidos com valores de Slope igual a $-2,095$; R^2 igual a $0,96$ e a eficiência calculada foi de $200,205$.

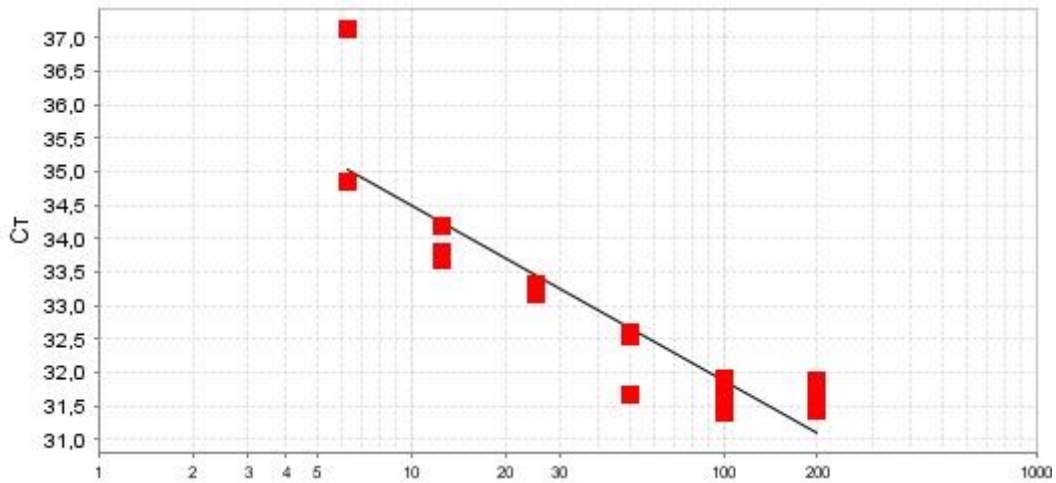


FIGURA 19: Curva padrão obtida para determinar a eficiência dos iniciadores para o gene FMR na reação de RT qPCR. Foram obtidos com valores de Slope igual a -2,612; R^2 igual a 0,815 e a eficiência calculada foi de 141,429.

Os dados obtidos nos experimentos de PCR em tempo real foram analisados com o auxílio do software REST 2009 (QIAGEN), onde os valores de Ct obtidos são processados em um formato ‘bootstrap’ e randomização, garantindo que os valores utilizados no teste, mesmo que com um número de casos baixo seja possível se obter um valor de ‘p’ na comparação entre os grupos experimental e controle, uma vez que os valores são testados de maneira randômica milhares de vezes (Pfaffl, 2001; Pfaffl *et al.*, 2002).

Para elucidar os níveis de expressão dos genes da maquinaria de processamento de pequenos RNAs em *B. glabrata*, foi desenvolvido um ensaio considerando as diversas etapas do desenvolvimento dos caramujos. Foram utilizados Desovas, caramujos com 5 dias, 10 dias, 20 dias e 40 dias de vida. Os caramujos de 5 e 10 dias são jovens imaturos sexualmente. Aqueles com 20 dias são, de acordo com observações feitas no Moluscário Lobato Paraense, jovens que estão iniciando sua maturidade sexual. Já os caramujos de 40 dias são adultos e apresentam o melhor momento para infecção pelo *S. mansoni* com tamanhos aproximados de 7 a 10 mm (Fernandez e Pieri, 2001).

Os resultados dos ensaios de qRT-PCR para os genes Argonauta, Drosha, Piwi, Exportina e Tudor em função do período de desenvolvimento dos caramujos *B. glabrata* estão dispostos nas figuras 20 a 24. O tempo desova foi utilizado como calibrador da reação. Para esta amostra é atribuído uma quantidade arbitrária de “1” e todas as outras amostras são expressas em termos de sua diferença de ct para esta amostra. Desta forma,

os valores de expressão de cada alvo foram considerados super expressos quando acima de 1 e sub expressos quando abaixo de 1. As diferenças entre os grupos foram avaliados considerando significância estatística de $p < 0,05$.

Aos 10 e 20 dias de desenvolvimento, Argonauta se encontra 4,393 e 6,154 vezes, respectivamente, mais expressa que no tempo desova, diferindo consideravelmente dos tempos 5 e 40 dias, onde não houve diferença estatística da desova (Figura 20).

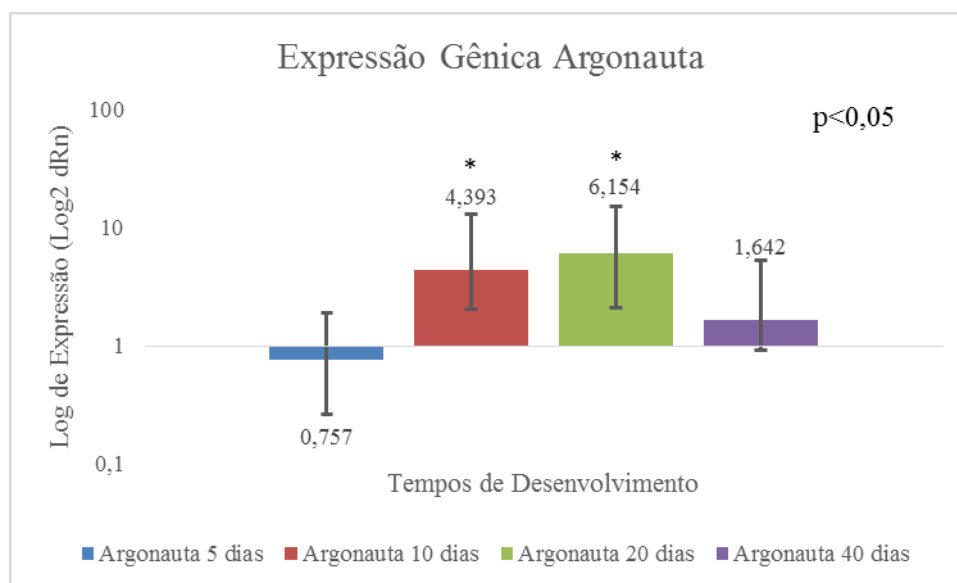


FIGURA 20: Expressão do gene Argonauta em relação aos tempos de desenvolvimento considerando o tempo desova como calibrador. Observa-se a super expressão do alvo nos tempos 10, 20 e 40 dias de desenvolvimento, enquanto que no tempo 5 dias observa-se a sub expressão. Os níveis de expressão com significância estatística entre os grupos ($p < 0,05$) estão destacados com (*).

Para Drosha, (Figura 21) nota-se que, aos 10, 20 e 40 dias, este alvo se encontra super expresso em relação ao seu calibrador, desova. Contudo, diferenças estatisticamente significativas foram obtidas apenas para os níveis de expressão nos tempos 10 e 20 dias, onde observou-se que o gene está 2,471 e 2,642 vezes mais expresso, respectivamente.

Para Piwi, (Figura 22), observa-se que aos 5 dias de desenvolvimento foi possível constatar que este alvo se encontra 0,455 vezes menos expresso que a desova, enquanto que aos 10, 20 e 40 dias está 2,429, 2,041 e 3,293 vezes, respectivamente, mais expresso.

Já para Exportina 5 (Figura 23), os tempos de 10 e 40 dias estão mais expressos 5,143 e 3,723 vezes, respectivamente, em relação a desova. Enquanto que, nos tempos 5

e 20 dias, os níveis de expressão não apresentaram diferenças estatísticas em relação ao tempo desova.

A expressão do alvo Tudor (Figura 24), estatisticamente, somente é diferente da desova aos 10 dias de desenvolvimento do caramujo, estando este 0,263 vezes menos expresso.

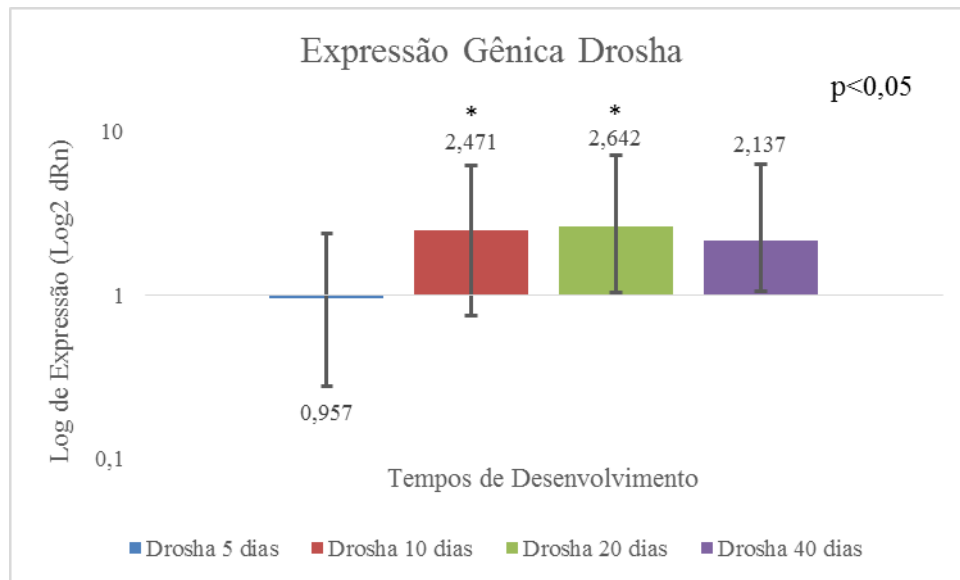


FIGURA 21: Expressão do gene Droscha em relação aos tempos de desenvolvimento considerando o tempo desova como calibrador. Observa-se uma super expressão nos tempos 10, 20 e 40 dias de desenvolvimento, sendo que aos 5 dias observa-se uma sub expressão. Os níveis de expressão com significância estatística entre os grupos ($p < 0,05$) estão destacados com (*).

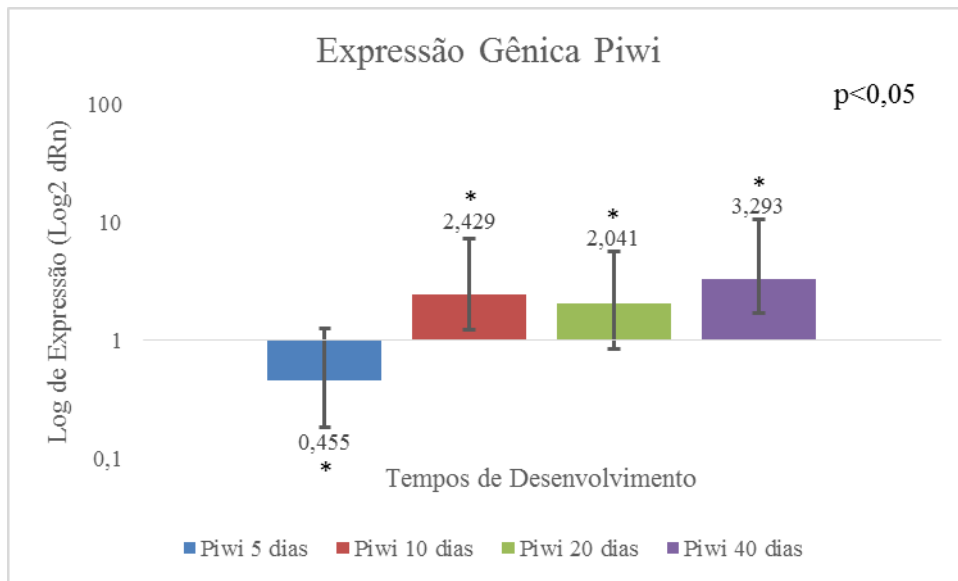


FIGURA 22: Expressão do gene Piwi em relação aos tempos de desenvolvimento considerando o tempo desova como calibrador. Observa-se uma super expressão nos tempos 10, 20 e 40 dias de desenvolvimento, sendo que aos 5 dias observa-se uma sub expressão. Os níveis de expressão com significância estatística entre os grupos ($p < 0,05$) estão destacados com (*).

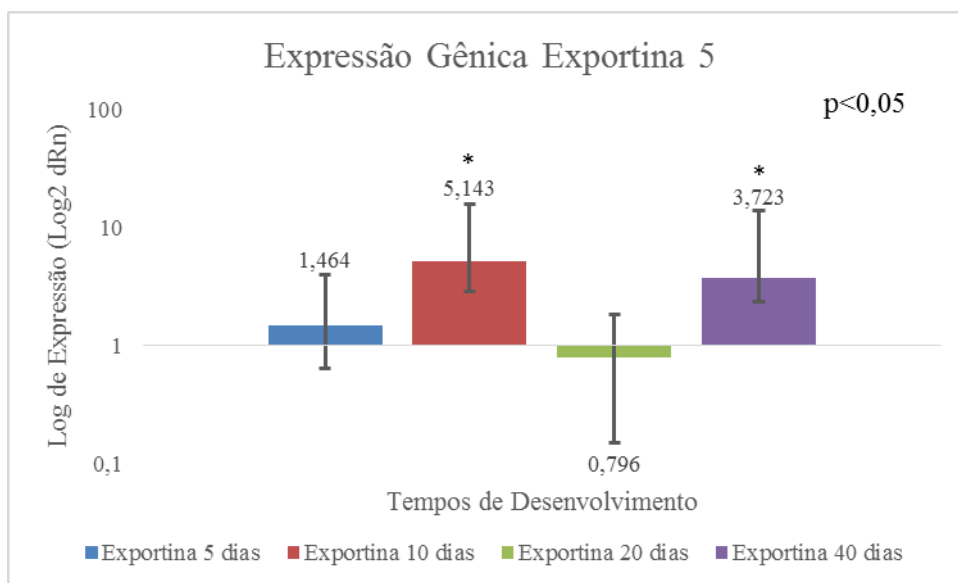


FIGURA 23: Expressão do gene Exportina 5 em relação aos tempos de desenvolvimento considerando o tempo desova como calibrador. Observa-se uma super expressão nos tempos 5, 10 e 40 dias de desenvolvimento, sendo que aos 20 dias observa-se uma sub expressão. Os níveis de expressão com significância estatística entre os grupos ($p < 0,05$) estão destacados com (*).

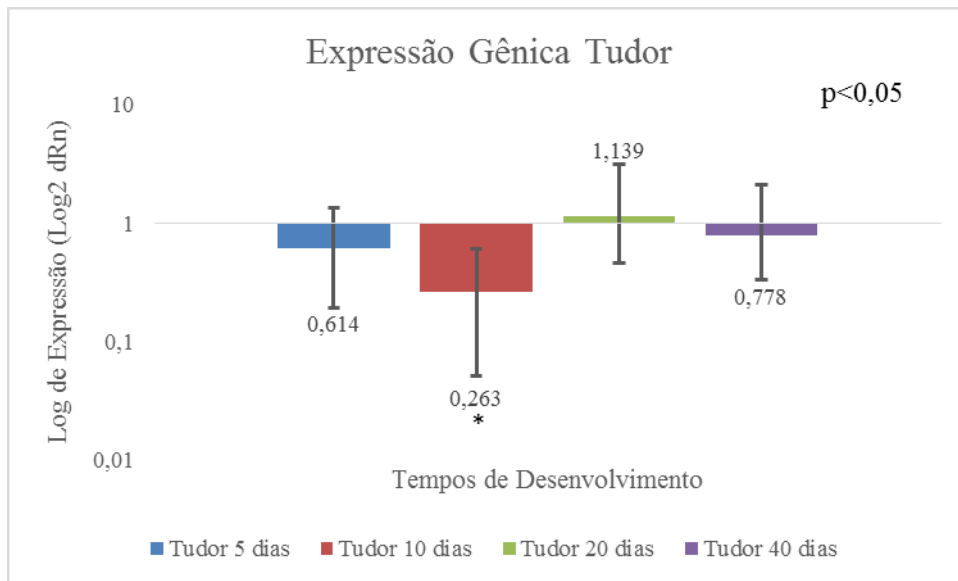


FIGURA 24: Expressão do gene Tudor em relação aos tempos de desenvolvimento considerando o tempo desova como calibrador. Observa-se uma super expressão no tempo 20 dias de desenvolvimento, sendo que aos 5, 10 e 40 dias observa-se uma sub expressão. Os níveis de expressão com significância estatística entre os grupos ($p < 0,05$) estão destacados com (*).

Os níveis de expressão relativa para os genes Argonauta, Drosha, Piwi, Exportina 5 e Tudor nos diversos tempos de desenvolvimento do caramujo estão dispostos na tabela 15. Para obtenção dos níveis de expressão gênica relativa, considerou-se o tempo desova como calibrador e todas as análises foram normalizadas pelo gene endógeno Mioglobina.

TABELA 15: Expressão gênica relativa para os genes da maquinaria de processamento de pequenos RNAs nos diferentes tempos de desenvolvimento.

Gene	Tempo	Expressão	Erro Padrão	95% C.I.	P	Conclusão
Argonauta	5 dias	0,757	0,492 - 1,161	0,431 - 1,373	0,344	Argonauta 5 dias não é diferente do grupo controle.
	10 dias	4,393	2,344 - 8,663	1,724 - 10,721	0,000	Argonauta 10 dias está super expresso em relação ao grupo controle. Argonauta 10 dias é diferente do grupo controle.
	20 dias	6,154	4,045 - 9,177	3,501 - 11,221	0,032	Argonauta 20 dias está super expresso em relação ao grupo controle. Argonauta 20 dias é diferente do grupo controle.
	40 dias	1,642	0,718 - 3,613	0,621 - 4,467	0,214	Argonauta 40 dias não é diferente do grupo controle.
Drosha	5 dias	0,957	0,679 - 1,417	0,581 - 1,464	0,805	Drosha 5 dias não é diferente do grupo controle.
	10 dias	2,471	1,730 - 3,676	1,522 - 3,798	0,001	Drosha 10 dias está super expresso em relação ao grupo controle. Drosha 10 dias é diferente do grupo controle.
	20 dias	2,642	1,605 - 4,509	1,412 - 4,760	0,028	Drosha 20 dias está super expresso em relação ao grupo controle. Drosha 20 dias é diferente do grupo controle.
	40 dias	2,137	1,091 - 4,196	0,960 - 4,716	0,071	Drosha 40 dias não é diferente do grupo controle.
Piwi	5 dias	0,455	0,271 - 0,815	0,212 - 0,909	0,003	Piwi 5 dias está sub expresso em relação ao grupo controle. Piwi 5 dias é diferente do grupo controle.
	10 dias	2,429	1,180 - 4,866	0,907 - 6,604	0,037	Piwi 10 dias está super expresso em relação ao grupo controle. Piwi 10 dias é diferente do grupo controle.
	20 dias	2,041	1,198 - 3,701	0,937 - 4,107	0,036	Piwi 20 dias está super expresso em relação ao grupo controle. Piwi 20 dias é diferente do grupo controle.
	40 dias	3,293	1,604 - 7,301	1,119 - 8,780	0,015	Piwi 40 dias está super expresso em relação ao grupo controle. Piwi 40 dias é diferente do grupo controle.
Exportina	5 dias	1,464	0,829 - 2,473	0,753 - 2,964	0,251	Exportina 5 dias não é diferente do grupo controle.
	10 dias	5,143	2,294 - 10,505	1,662 - 14,801	0,003	Exportina 10 dias está super expresso em relação ao grupo controle. Exportina 10 dias é diferente do grupo controle.
	20 dias	0,796	0,646 - 1,013	0,575 - 1,129	0,164	Exportina 20 dias não é diferente do grupo controle.
	40 dias	3,723	1,380 - 10,054	1,146 - 12,051	0,000	Exportina 40 dias está super expresso em relação ao grupo controle. Exportina 40 dias é diferente do grupo controle.
Tudor	5 dias	0,614	0,423 - 0,742	0,408 - 1,173	0,062	Tudor 5 dias não é diferente do grupo controle.
	10 dias	0,263	0,212 - 0,347	0,182 - 0,362	0,014	Tudor 10 dias está sub expresso em relação ao grupo controle. Tudor 10 dias é diferente do grupo controle.
	20 dias	1,139	0,680 - 1,996	0,587 - 2,123	0,554	Tudor 20 dias não é diferente do grupo controle.
	40 dias	0,778	0,443 - 1,324	0,428 - 1,476	0,289	Tudor 40 dias não é diferente do grupo controle.

Para elucidar se o perfil de expressão dos genes da maquinaria de processamento de pequenos RNAs não codificadores de proteínas em *B. glabrata*, sofre alguma alteração quando estes estão infectados pelo *S. mansoni*, os ensaios de PCR em tempo real foram desenvolvidos com amostras de caramujos separados em dois grupos, um infectado e outro não infectado. Uma amostra de caramujos foi retirada no momento da infecção para ser utilizada como controle tempo zero (T0). 4 horas após infecção foram retirados uma amostra de caramujos do grupo infectado e outra igual no grupo não infectado, sendo portanto o grupo tempo 1 (T1). O procedimento foi repetido 12 horas após infecção, formando o grupo tempo 2 (T2); 24 horas após infecção, formando o grupo tempo 3 (T3); 7 dias após infecção, formando o grupo tempo 4 (T4); 15 dias após infecção, formando o grupo tempo 5 (T5); 21 dias após infecção, formando o grupo tempo 6 (T6) e 30 dias após infecção, formando o grupo tempo 7 (T7).

Uma amostra de caramujos foi mantida no aquário até o dia 38 afim de confirmar o sucesso da infecção através da eliminação de cercarias, onde foi possível comprovar que de 30 caramujos, 22 estavam eliminando cercarias ativamente, o que representa 73,4% do total.

Nas análises de expressão gênica relativa os grupos não infectados foram utilizados como calibradores e a eles foi estabelecido o valor arbitrário de 1. Os valores plotados nas figuras 25 a 29 referem-se a quantas vezes o gene alvo foi mais ou menos expresso que seu respectivo controle e os valores marcados com um asterisco (*) demonstram que estatisticamente aquele grupo é diferente do grupo controle com um valor de “p” menor que 0,05, o que garante uma confiabilidade maior que 95% nos valores encontrados.

Observa-se que os níveis de expressão diferiram entre os tempos estudados para todos os alvos. Para o gene Argonauta (Figura 25) com análise de expressão detalhada na tabela 16, os grupos T0, T3, T6 e T7 não apresentaram diferenças estatísticas significativas em relação a seus respectivos controles não infectados, o que nos leva a afirmar que nesses tempos não há diferença na expressão gênica para Argonauta entre os grupos infectados e não infectados. Enquanto que, nos tempos T1, T2 e T5 observa-se uma expressão 0,026, 0,225 e 0,624 vezes menor desse alvo, respectivamente, que em seus grupos controle. Já T4 está 3,91 vezes mais expresso que seu controle não infectado.

Essas diferenças nos perfis de expressão nos mostra que o processo de infecção em *B. glabrata* pelo *S. mansoni*, nesses tempos, altera a regulação de Argonauta.

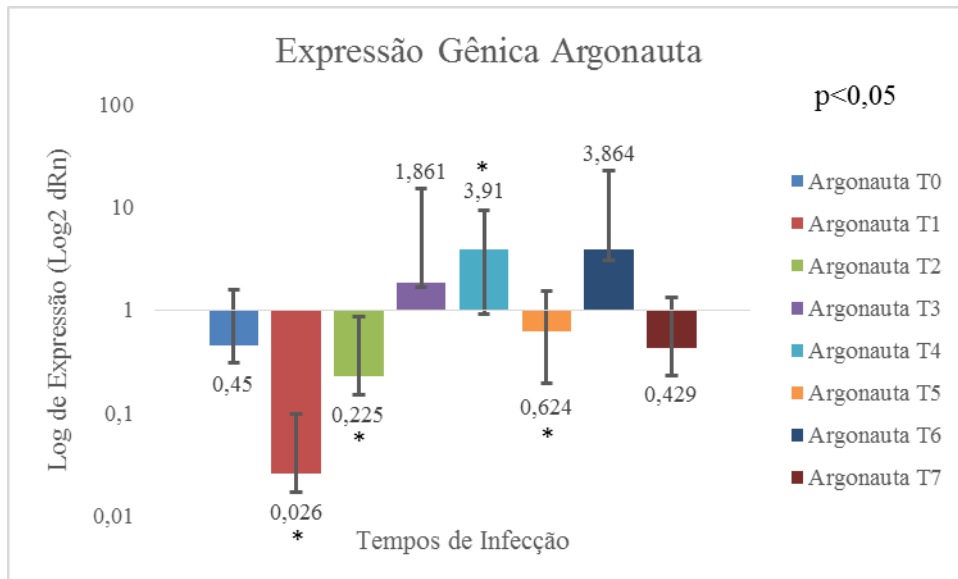


FIGURA 25: Expressão relativa do gene Argonauta nos diferentes tempos de infecção dos caramujos *B. glabrata* com o *S. mansoni*. T0 caramujos não infectados coletados momentos antes da infecção; T1 caramujos após 4 horas de infecção; T2 após 12 horas de infecção; T3 após 24 horas de infecção; T4 após 7 dias de infecção; T5 após 15 dias de infecção; T6 após 21 dias de infecção e T7 após 30 dias de infecção. Como calibrador foi considerado os grupos não infectados em cada tempo. Observa-se que a expressão do alvo diferiu consideravelmente entre os tempos estudados. Os níveis de expressão com significância estatística entre os grupos ($p < 0,05$) estão destacados com asterisco (*).

TABELA 16: Expressão gênica relativa para Argonauta nos diferentes tempos de infecção.

Gene	Tempo	Expressão	Erro Padrão	95% C.I.	P	Conclusão
Argonauta	T0	0,45	0,140 - 1,134	0,040 - 3,980	0,432	Argonauta T0 não é diferente do grupo controle.
	T1	0,026	0,009 - 0,073	0,007 - 0,116	0,015	Argonauta T1 está sub expressa em relação ao controle. Argonauta T1 é diferente do grupo controle.
	T2	0,225	0,074 - 0,641	0,062 - 0,851	0,001	Argonauta T2 está sub expressa em relação ao controle. Argonauta T2 é diferente do grupo controle.
	T3	1,861	0,201 - 13,437	0,194 - 27,721	0,498	Argonauta T3 não é diferente do grupo controle.
	T4	3,91	2,993 - 5,422	2,518 - 5,699	0,015	Argonauta T4 está super expressa em relação ao controle. Argonauta T4 é diferente do grupo controle.
	T5	0,624	0,432 - 0,886	0,410 - 0,929	0,025	Argonauta T5 está sub expressa em relação ao controle. Argonauta T5 é diferente do grupo controle.
	T6	3,864	0,833 - 18,814	0,731 - 18,964	0,146	Argonauta T6 não é diferente do grupo controle.
	T7	0,429	0,196 - 0,883	0,160 - 1,177	0,099	Argonauta T7 não é diferente do grupo controle.

O gene Droscha, mostrado na figura 26 e com perfil de expressão gênica relativa detalhado na tabela 17, apresentou variação no perfil de expressão gênica menor que seus controles não infectados nos tempos T1 e T7, com 0,111 e 0,243 vezes respectivamente. Já os tempos T2, T3, T5 e T6 mostraram-se mais expressos que seus controles 7,439, 2,947, 7,087 e 3,93 vezes respectivamente. Os grupos T0 e T4 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas dos seus controles não infectados.

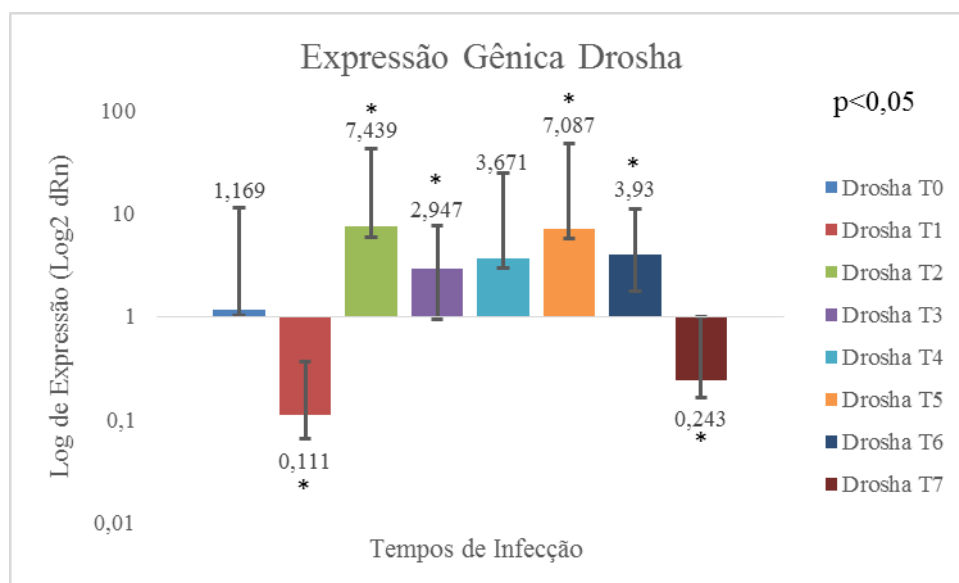


FIGURA 26: Expressão relativa do gene Droscha nos diferentes tempos de infecção dos caramujos *B. glabrata* com o *S. mansoni*. T0 caramujos não infectados coletados momentos antes da infecção; T1 caramujos após 4 horas de infecção; T2 após 12 horas de infecção; T3 após 24 horas de infecção; T4 após 7 dias de infecção; T5 após 15 dias de infecção; T6 após 21 dias de infecção e T7 após 30 dias de infecção. Como calibrador foi considerado os grupos não infectados em cada tempo. Observa-se que a expressão do alvo diferiu consideravelmente entre os tempos estudados. Os níveis de expressão com significância estatística entre os grupos ($p < 0,05$) estão destacados com asterisco (*).

TABELA 17: Expressão gênica relativa para Drosha nos diferentes tempos de infecção.

Gene	Tempo	Expressão	Erro Padrão	95% C.I.	P	Conclusão
Drosha	T0	1,169	0,146 - 10,204	0,105 - 11,647	0,583	Drosha T0 não é diferente do grupo controle.
	T1	0,111	0,046 - 0,250	0,041 - 0,322	0,000	Drosha T1 está sub expressa em relação ao controle. Drosha T1 é diferente do grupo controle.
	T2	7,439	1,566 - 35,187	1,211 - 44,041	0,029	Drosha T2 está super expressa em relação ao controle. Drosha T2 é diferente do grupo controle.
	T3	2,947	2,007 - 4,556	1,343 - 6,183	0,015	Drosha T3 está super expressa em relação ao controle. Drosha T3 é diferente do grupo controle.
	T4	3,671	0,680 - 20,750	0,574 - 22,462	0,162	Drosha T4 não é diferente do grupo controle.
	T5	7,087	1,361 - 39,967	1,127 - 41,005	0,001	Drosha T5 está super expressa em relação ao controle. Drosha T5 é diferente do grupo controle.
	T6	3,93	2,173 - 6,968	1,906 - 8,553	0,025	Drosha T6 está super expressa em relação ao controle. Drosha T6 é diferente do grupo controle.
	T7	0,243	0,078 - 0,762	0,061 - 1,049	0,033	Drosha T7 está sub expressa em relação ao controle. Drosha T7 é diferente do grupo controle.

Para o gene Piwi, disposto na figura 27 e com seu perfil de expressão gênica detalhado na tabela 18, no tempo T0 apresentou valor de (p) significativo para afirmar que este não é diferente do seu controle. As quatro horas e doze horas após infecção o gene Piwi se mostrou 0,036 e 0,196 vezes menos expresso que seus controles não infectados, o que demonstra que no início do processo infeccioso, a expressão deste gene se encontra sub regulada. Já as 24 horas, 7 dias e 30 dias após a infecção, Piwi está 3,908, 18,832 e 2,075 vezes mais regulada que em seu grupo controle, o que sugere uma maior necessidade dessa proteína nesses estágios da infecção de *B. glabrata* por *S. mansoni*. Aos 15 e 21 dias após infecção não houve diferenças estatisticamente significativa de Piwi em relação aos seus controles não infectados.

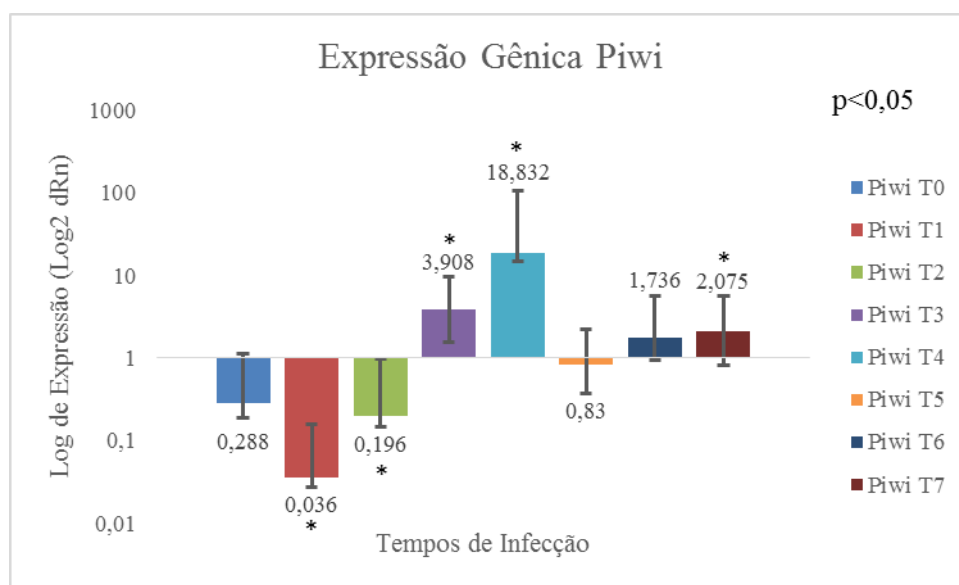


FIGURA 27: Expressão relativa do gene Piwi nos diferentes tempos de infecção dos caramujos *B. glabrata* com o *S. mansoni*. T0 caramujos não infectados coletados momentos antes da infecção; T1 caramujos após 4 horas de infecção; T2 após 12 horas de infecção; T3 após 24 horas de infecção; T4 após 7 dias de infecção; T5 após 15 dias de infecção; T6 após 21 dias de infecção e T7 após 30 dias de infecção. Como calibrador foi considerado os grupos não infectados em cada tempo. Observa-se que a expressão do alvo diferiu consideravelmente entre os tempos estudados. Os níveis de expressão com significância estatística entre os grupos ($p < 0,05$) estão destacados com asterisco (*).

TABELA 18: Expressão gênica relativa para Piwi nos diferentes tempos de infecção.

Gene	Tempo	Expressão	Erro Padrão	95% C.I.	P	Conclusão
Piwi	T0	0,288	0,099 - 0,853	0,077 - 1,084	0,059	Piwi T0 não é diferente do grupo controle.
	T1	0,036	0,009 - 0,121	0,009 - 0,156	0,006	Piwi T1 está sub expressa em relação ao controle. Piwi T1 é diferente do grupo controle.
	T2	0,196	0,051 - 0,784	0,042 - 0,869	0,028	Piwi T2 está sub expressa em relação ao controle. Piwi T2 é diferente do grupo controle.
	T3	3,908	2,362 - 5,679	2,240 - 8,616	0,003	Piwi T3 está super expressa em relação ao controle. Piwi T3 é diferente do grupo controle.
	T4	18,832	4,023 - 88,526	3,633 - 97,928	0,004	Piwi T4 está super expressa em relação ao controle. Piwi T4 é diferente do grupo controle.
	T5	0,83	0,465 - 1,368	0,446 - 1,711	0,555	Piwi T5 não é diferente do grupo controle.
	T6	1,736	0,782 - 3,829	0,728 - 4,027	0,418	Piwi T6 não é diferente do grupo controle.
	T7	2,075	1,263 - 3,592	0,978 - 4,009	0,054	Piwi T7 não é diferente do grupo controle.

O perfil de expressão gênica de Exportina 5, detalhado na tabela 19 e esquematizado na figura 28, demonstra que este gene está sub regulado nos grupos T1, T2, T3, T5 e T7, com valores 0,046, 0,371, 0,299, 0,42 e 0,304 vezes menor que seus controles não infectados respectivamente. Os grupos T4 e T6 apresentam expressão 10,096 e 7,587 vezes maior que seus controles não infectados, o que sugere uma elevada demanda dessa proteína nesses tempos de infecção. No grupo T0 não houve diferença estatística significativa em relação ao grupo controle.

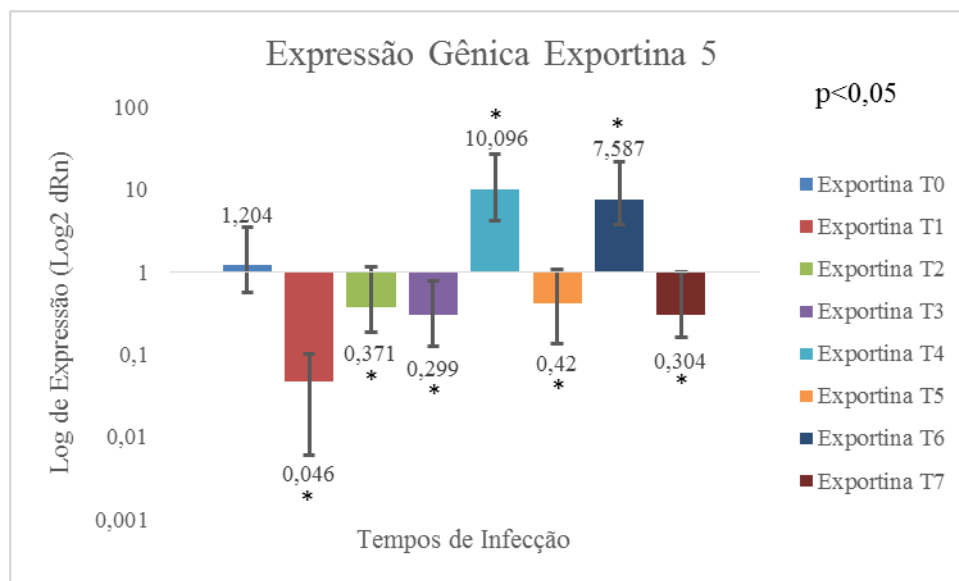


FIGURA 28: Expressão relativa do gene Exportina 5 nos diferentes tempos de infecção dos caramujos *B. glabrata* com o *S. mansoni*. T0 caramujos não infectados coletados momentos antes da infecção; T1 caramujos após 4 horas de infecção; T2 após 12 horas de infecção; T3 após 24 horas de infecção; T4 após 7 dias de infecção; T5 após 15 dias de infecção; T6 após 21 dias de infecção e T7 após 30 dias de infecção. Como calibrador foi considerado os grupos não infectados em cada tempo. Observa-se que a expressão do alvo diferiu consideravelmente entre os tempos estudados. Os níveis de expressão com significância estatística entre os grupos ($p < 0,05$) estão destacados com asterisco (*).

TABELA 19: Expressão gênica para Exportina 5 nos diferentes tempos de infecção.

Gene	Tempo	Expressão	Erro Padrão	95% C.I.	P	Conclusão
Exportina	T0	1,204	0,645 - 2,235	0,498 - 2,950	0,548	Exportina T0 não é diferente do grupo controle.
	T1	0,046	0,040 - 0,056	0,036 - 0,060	0,001	Exportina T1 está sub expressa em relação ao controle. Exportina T1 é diferente do grupo controle.
	T2	0,371	0,184 - 0,801	0,154 - 0,944	0,005	Exportina T2 está sub expressa em relação ao controle. Exportina T2 é diferente do grupo controle.
	T3	0,299	0,175 - 0,477	0,143 - 0,498	0,014	Exportina T3 está sub expressa em relação ao controle. Exportina T3 é diferente do grupo controle.
	T4	10,096	5,969 - 17,107	5,692 - 17,836	0,007	Exportina T4 está super expressa em relação ao controle. Exportina T4 é diferente do grupo controle.
	T5	0,42	0,287 - 0,656	0,283 - 0,717	0,028	Exportina T5 está sub expressa em relação ao controle. Exportina T5 é diferente do grupo controle.
	T6	7,587	3,845 - 14,006	3,563 - 17,264	0,000	Exportina T6 está super expressa em relação ao controle. Exportina T6 é diferente do grupo controle.
	T7	0,304	0,142 - 0,694	0,101 - 0,881	0,004	Exportina T7 está sub expressa em relação ao controle. Exportina T7 é diferente do grupo controle.

Já para Tudor, disposto na figura 29 e detalhado na tabela 20, os grupos T1 e T2 apresentaram expressão 0,267 e 0,23 vezes menor que seus controles não infectados respectivamente. No grupo T3 Tudor está 3,612 vezes mais expresso que seu controle não infectado. Nos grupos T0, T4, T5, T6 e T7 não houve diferença estatística significativa em relação aos seus respectivos controles.

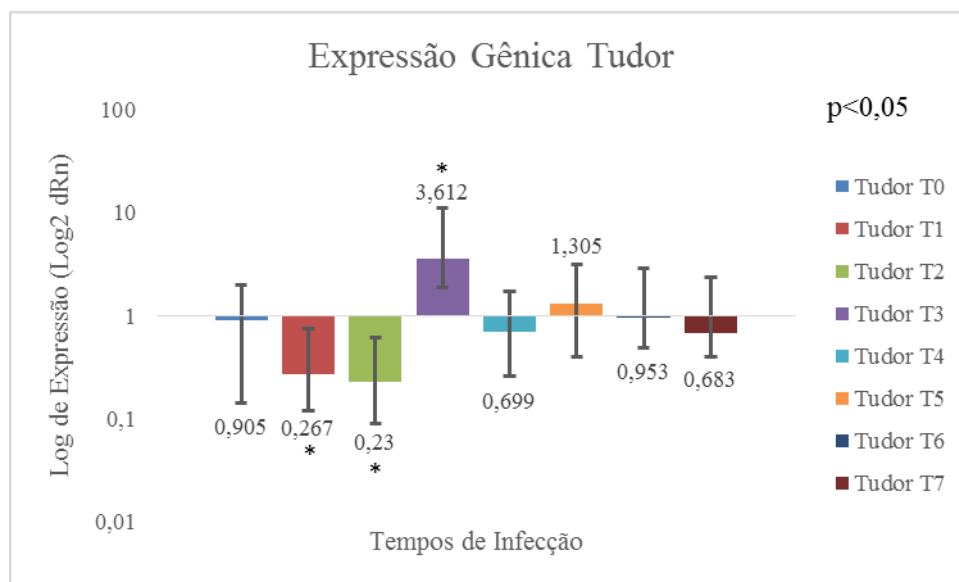


FIGURA 29: Expressão relativa do gene Tudor nos diferentes tempos de infecção dos caramujos *B. glabrata* com o *S. mansoni*. T0 caramujos não infectados coletados momentos antes da infecção; T1 caramujos após 4 horas de infecção; T2 após 12 horas de infecção; T3 após 24 horas de infecção; T4 após 7 dias de infecção; T5 após 15 dias de infecção; T6 após 21 dias de infecção e T7 após 30 dias de infecção. Como calibrador foi considerado os grupos não infectados em cada tempo. Observa-se que a expressão do alvo diferiu consideravelmente entre os tempos estudados. Os níveis de expressão com significância estatística entre os grupos ($p < 0,05$) estão destacados com asterisco (*).

TABELA 20: Expressão gênica relativa para Tudor nos diferentes tempos de infecção.

Gene	Tempo	Expressão	Erro Padrão	95% C.I.	P	Conclusão
Tudor	T0	0,905	0,764 - 1,052	0,744 - 1,218	0,270	Tudor T0 não é diferente do grupo controle.
	T1	0,267	0,148 - 0,484	0,142 - 0,506	0,031	Tudor T1 está sub expressa em relação ao controle. Tudor T1 é diferente do grupo controle.
	T2	0,23	0,140 - 0,389	0,131 - 0,396	0,006	Tudor T2 está sub expressa em relação ao controle. Tudor T2 é diferente do grupo controle.
	T3	3,612	1,732 - 7,545	1,565 - 8,327	0,006	Tudor T3 está super expressa em relação ao controle. Tudor T3 é diferente do grupo controle.
	T4	0,699	0,443 - 1,015	0,417 - 1,298	0,192	Tudor T4 não é diferente do grupo controle.
	T5	1,305	0,911 - 1,856	0,862 - 1,977	0,153	Tudor T5 não é diferente do grupo controle.
	T6	0,953	0,471 - 1,881	0,450 - 2,012	0,704	Tudor T6 não é diferente do grupo controle.
	T7	0,683	0,281 - 1,637	0,236 - 2,023	0,405	Tudor T7 não é diferente do grupo controle.

6 DISCUSSÃO

6.1 ANÁLISE *IN SILICO*

O estudo *in silico* é fundamental para se encontrar possibilidades e até mesmo confirmar e/ou prever possíveis resultados. É um conjunto de ferramentas de valor inestimável para ensaios em biologia molecular e genética entre outros. Em nossos estudos, o uso de ferramentas de bioinformática foi fundamental para analisar o genoma e transcriptoma de *B. glabrata* (Adema *et al.*, 2006). Isso permitiu prever a presença dos genes relacionados à maquinaria de processamento de pequenos RNAs, caracterizar utilizando vários bancos de dados referência, a homologia das proteínas preditas e sintetizar iniciadores para esses transcritos, afim de avaliar o nível de expressão desses genes em *B. glabrata* e comprovar que esse caramujo possui a via de miRNAs e piRNAs presente.

Nossos ensaios foram capazes de demonstrar que Argonauta e Piwi de *B. glabrata* possuem o tamanho predito de 855 e 854 aminoácidos respectivamente, além de apresentarem o domínio PIWI com 292 resíduos de aminoácidos e que este apresenta, em ambas, os resíduos catalíticos D-D-H, que são altamente conservados entre os clados (Song *et al.*, 2004). Estes resíduos são importantes para a atividade “Slicer” do domínio PIWI, responsável por clivar a fita complementar do RNA de fita dupla, deixando apenas a fita guia, que será utilizada pelo complexo RISC como miRNA (Liu *et al.*, 2004; Parker *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008).

Para que Argonauta e Piwi possam clivar a dupla fita de RNA, selecionando assim a fita adequada para a via de silenciamento, miRNA no caso de Argonauta e piRNA em Piwi, é necessário a presença dos resíduos D-D-H, que se associam ao íon divalente Mg^{2+} (Schwarz *et al.*, 2004) e clivam a fita de RNA deixando uma extremidade 3'OH e outra 5' contendo um grupamento fosfato (Wintersberger, 1990; Song *et al.*, 2004). O íon magnésio é limitante para a reação de silenciamento, podendo sua concentração afetar diretamente no sucesso do processo (Nam *et al.*, 2014).

Contudo, para que o processo de silenciamento ocorra de maneira satisfatória, é necessário que, o processamento nuclear do RNA transcrito seja realizado de maneira eficiente. No caso da via de silenciamento por miRNAs essa etapa é desempenhada por Drosha em conjunto com DGCR8, formando o complexo microprocessador responsável

por clivar o pri-miRNA, que normalmente possui mais de mil nucleotídeos na fita. Ao realizar esse processo, Drosha cria o chamado pré-miRNA que possui aproximadamente 65 nucleotídeos (Lee *et al.*, 2003; Gregory *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2004).

Drosha é uma RNase III que possui na sua constituição dois domínios Riboc responsáveis por clivar a dupla fita de RNA, onde cada domínio cliva uma fita específica. O primeiro domínio Riboc cliva a fita 3' enquanto o segundo domínio corta a fita 5' (Blaszczyk *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2004), sendo que ambos os domínios utilizam a junção basal das fitas da estrutura em forma de grampo do RNA para determinar as posições corretas para clivar (Han *et al.*, 2006; Auyeung *et al.*, 2013). Em *B. glabrata* foi possível evidenciar a presença apenas do primeiro domínio Riboc em uma predita proteína de 1128 aminoácidos. Isso nos mostra que provavelmente Drosha em *B. glabrata* está depositada de forma incompleta, uma vez que *Crassostrea gigas* (EKC20603.1), outro molusco analisado neste estudo, apresenta Drosha com 1354 resíduos de aminoácidos e com os dois domínios RIBOC presentes. Contudo, é possível confirmar a presença dos sítios catalíticos D e E no primeiro domínio, assim como em seus ortólogos, que são responsáveis pela atividade catalítica do domínio, que assim como o domínio PIWI, depende da interação com íons Mg^{2+} para atuação adequada (Blaszczyk *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2004).

Outra endonuclease de importância significativa na via de miRNAs é Dicer, que em *B. glabrata* possui 2165 aminoácidos e dois domínios Riboc, bem como seus ortólogos estudados nesse trabalho. Podemos confirmar sem dúvidas, que Dicer de *B. glabrata* é ortóloga das proteínas Dicer dos demais animais analisados. Foi possível confirmar a presença dos domínios E-E-D-D-E no primeiro domínio e Q-E-D-D-E no segundo. A presença dos dois domínios com todos os resíduos importantes para a associação ao íon Mg^{2+} , para uma melhor associação à dupla fita de RNA e desempenhar sua função de clivagem (Blaszczyk *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2004). Normalmente Dicer cliva o RNA a uma distância fixa da extremidade 3' final, o que leva a formação de um RNA dupla fita com aproximadamente 21 nucleotídeos em cada fita que será apresentado a Argonauta para o processamento final e inserção no Complexo RISC. Em mamíferos e moscas existe a possibilidade de reconhecimento também da extremidade 5' fosforilada (Macrae *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2011).

Nossos resultados em *B. glabrata* corroboram com os resultados da literatura, encontrados em outros animais, para a estrutura das preditas proteínas Argonauta, Piwi, Drosha e Dicer, confirmando suas respectivas atividades helicases pela presença dos principais domínios catalíticos, como confirma também a presença dos domínios responsáveis por estabilizar os complexos protéicos formados para o processamento da dupla fita de RNA, e daqueles onde este é reconhecido e estabilizado no complexo, como é o caso dos domínios PAZ em Argonauta e Piwi, além de DSRM em Drosha e Dicer (Ha e Kim, 2014). Ensaios para demonstrar a presença e a estrutura destas proteínas em *B. glabrata*, como “western blotting” e/ou cristalografia, ainda precisam ser realizados, mas conforme confirmado por caracterização *in silico*, é possível dizer que as preditas proteínas são ortólogas das mesmas dos diversos animais referência testados.

6.2 EXPRESSÃO GÊNICA

Os estudos acerca da interação *Biomphalaria/S. mansoni* apresentou ao longo dos anos um crescimento substancial. Esta relação está intimamente relacionada com a resistência e/ou susceptibilidade do caramujo frente ao trematódeo. Esse mecanismo de resistência está controlado por diversos genes localizados em diversos Loci no genoma (Richards e Merritt, 1972; Woolhouse e Webster, 2000). Recentemente Larson e colaboradores demonstraram a relação entre o número de hemócitos em conjunto com a expressão gênica diferencial de transcritos relacionados à cascata oxidativa em *B. glabrata*, como sendo fundamental para os mecanismos de resistência do caramujo frente ao *S. mansoni* (Larson et al., 2014).

A expressão gênica de inúmeros genes relacionados ao processo de resistência dos caramujos é de fundamental importância para o sucesso do hospedeiro em combater a infecção pelo trematódeo (Zahoor *et al.*, 2014). Neste contexto, a participação dos pequenos RNAs não codificadores de proteínas, como reguladores do processo pós-transcricional, podem ser a chave para o entendimento do processo de resistência dos caramujos *Biomphalaria* frente ao *S. mansoni*. Já existem estudos demonstrando a presença de alguns pequenos RNAs e proteínas da sua via de síntese em *S. mansoni*, porém, nada ainda foi publicado no que diz respeito à presença desses espécimes em *Biomphalaria* (Gomes *et al.*, 2009; De Souza Gomes *et al.*, 2011). Contudo, técnicas de silenciamento gênico utilizando siRNAs não são novidade em *B. glabrata* (Knight *et al.*, 2011; Hanington *et al.*, 2012).

Nós criamos a hipótese de que a maquinaria de processamento de pequenos RNAs não codificadores de proteínas está presente em *B. glabrata*. Para testarmos essa hipótese, desenhamos “primers” correspondentes aos genes da via de processamento dos pequenos RNAs utilizando dados de transcriptoma e ESTs de *B. glabrata*, descritos na tabela 12. Estes foram submetidos a PCR em tempo real e os amplicons obtidos, quando analisados ao gel de agarose 2% (Figura 7), demonstraram tamanho compatível com o predito. Esses amplicons foram submetidos ainda ao sequenciamento tipo sanger (Sanger *et al.*, 1977) para uma análise *in silico* mais consistente, onde foi possível estabelecer a identidade dos produtos, comparando-os contra o banco de dados RefSeq do NCBI. Assim foi possível encontrar homologia com as proteínas relacionadas presentes no referido banco, as sequências obtidas do sequenciamento estão disponíveis na tabela 13.

Na análise utilizando o banco de dados “reference proteins” do NCBI, as sequências foram confrontadas com o banco de dados de *D. melanogaster* e *C. elegans*, confirmando que os produtos gerados pelos “primers” na PCR se tratam verdadeiramente dos preditos genes Argonauta, Dicer, Drosha, Piwi, Tudor, Exportina 5, TDRD, FMR, Loquacious (Partner de Dicer), “Partner de Drosha”, SPN (Spindle E) e Mioglobina, Principais genes relacionados ao processamento de pequenos RNAs em animais (Ha e Kim, 2014).

Dos genes acima citados apenas Argonauta (Figura 8), Drosha (Figura 9), Exportina 5 (Figura 10), Piwi (Figura 11) e Tudor (Figura 12) apresentaram resultados satisfatórios nos ensaios de eficiência o que possibilitou seguir com as análises de expressão gênica. Todos apresentaram valores de eficiência compreendidos entre 90 % e 110 % e valores de R^2 superiores a 0,985 (Bustin *et al.*, 2009). O par de iniciadores desenhados para o gene Mioglobina (Figura 13), aqui utilizado com controle endógeno para normalizar a reação de qRT-PCR, por conferir níveis de expressão pouco variáveis nas amostras, e, portanto, consistentes na amostra testada, apresentou valor de eficiência igual a 96,238 e R^2 de 0,995.

Os demais iniciadores desenhados para Dicer (Figura 14), SPN (Figura 15), Loquacious (Figura 16), “Partner de Drosha” (Figura 17), TDRD (Figura 18) e FMR (Figura 19), não demonstraram resultados aceitáveis nos ensaios de eficiência (Bustin *et al.*, 2009), mesmo após os ensaios terem sido repetidos exaustivamente, variando técnicas de pipetagem e amostras de caramujos em diferentes estágios de desenvolvimento. Isso

foi condição para que estes não fossem utilizados nos ensaios de expressão gênica, devendo ser redesenhados e novamente testados quanto a eficiência para posterior análise da expressão destes alvos.

6.2.1 EXPRESSÃO GÊNICA DOS GENES DA MAQUINARIA DE PEQUENOS RNAs NOS DIFERENTES TEMPOS DE DESENVOLVIMENTO

A idade e principalmente o tamanho dos caramujos *B. glabrata* são diretamente relacionados com a eficiência da infecção pelo *S. mansoni*, bem como o tempo no qual o caramujo permanece liberando cercarias (Anderson e Crombie, 1984; Niemann e Lewis, 1990). Onde caramujos jovens com a concha medindo entre 7 e 9 mm apresentam uma maior taxa de infecção pelo *S. mansoni* (Theron et al., 1998). Para determinar os perfis naturais de expressão dos genes da maquinaria de processamento de pequenos RNAs em *B. glabrata*, ensaio de PCR em tempo real contemplando amostras advindas de caramujos em diferentes tempos de desenvolvimento foi desenvolvido, onde foi possível determinar o padrão de expressão para Argonauta, Drosha, Piwi, Exportina 5 e Tudor nos tempos de desova, 5 dias após nascimento, 10 dias, 20 dias e 40 dias de vida. Neste contexto, o tempo de desova foi definido arbitrariamente como nosso controle calibrador, onde todos os demais tempos foi comparado.

Regulador chave do processo de silenciamento gênico, Argonauta participa tanto da via de miRNAs quanto siRNAs (Meister e Tuschl, 2004; Ha e Kim, 2014). É muito bem conservada ao longo dos clados evolutivos representando uma família de três grandes proteínas, AGO, PIWI e WAGO que é uma argonauta exclusiva de vermes (Yigit et al., 2006; Swarts et al., 2014). Na espécie humana é representada por oito membros (Sasaki et al., 2003). Em nossos testes foi possível comprovar (Figura 20) que caramujos de 10 e 20 dias apresentam uma superexpressão de argonauta em relação ao controle desova. Nesses estágios os caramujos são juvenis e ainda não maduros sexualmente. Isso sugere que pode existir uma participação de miRNAs e/ou siRNAs no processo de desenvolvimento natural dos caramujos *B. glabrata*, uma vez que a participação de miRNAs nos processos vitais de animais e plantas é bem documentado e sua falta gera inúmeros problemas que podem comprometer a viabilidade do indivíduo (Liu et al., 2004; Su et al., 2009; Modzelewski et al., 2012; Ha e Kim, 2014).

A RNase III nuclear, denominada Drosha, apresenta papel determinante na via de processamento de miRNAs em animais. Juntamente com DGCR8, Drosha é responsável por ligar-se ao pri-miRNA e promover o corte das extremidades 5' e 3' da molécula de RNA, gerando uma estrutura em forma de grampo com aproximadamente 65 nucleotídeos (Lee *et al.*, 2003; Denli *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2004). Em *B. glabrata*, Drosha (Figura 21) apresentou uma expressão elevada aos 10 e 20 dias de desenvolvimento, 2,471 e 2,642 vezes maior que o controle respectivamente, sugerindo que a expressão desse gene, bem como em Argonauta, possui papel importante no desenvolvimento do animal, principalmente na etapa de crescimento e amadurecimento sexual. Chong (2010) trabalhando com camundongos deficientes em Drosha, demonstrou que estes morriam na ausência desta, confirmando assim a importância desse gene no desenvolvimento dos animais (Chong *et al.*, 2010).

Relacionada inicialmente a linhagens germinais, Piwi é uma proteína que faz parte da família Argonauta (Lin e Spradling, 1997; Cox *et al.*, 1998; Carmell *et al.*, 2002). Piwi é a principal proteína na via de processamento de piRNAs em *D. melanogaster* com papel fundamental nos processos relacionados ao desenvolvimento e fertilidade animal, além de participar ativamente do controle das atividades de transposons no genoma (Aravin *et al.*, 2006; Brennecke *et al.*, 2007; Carmell *et al.*, 2007; Aravin *et al.*, 2008; Brennecke *et al.*, 2008). É relativamente conservada em animais (Filippov *et al.*, 2000; Fortin *et al.*, 2002). Em *B. glabrata* Piwi (Figura 22) está naturalmente superexpressa, exceção é feita nos primeiros dias de vida, onde aos 5 dias de desenvolvimento apresentou-se 0,455 vezes menos expressa que a desova. Já aos 10, 20 e 40 dias está mais expressa 2,429, 2,041 e 3,293 vezes respectivamente, reforçando a ideia de que Piwi apresenta papel fundamental no desenvolvimento animal (Aravin *et al.*, 2008). Esses dados nos faz acreditar que piRNAs interferem na biologia de *B. glabrata* naturalmente. Como é sabido que em *S. mansoni* a maquinaria de piRNAs não está presente, acreditamos que essas moléculas estão envolvidas diretamente na susceptibilidade do caramujo a infecção pelo trematódeo (Gomes *et al.*, 2009; De Souza Gomes *et al.*, 2011).

Assim que o pri-miRNA é processado em pré-miRNA por Drosha (Lee *et al.*, 2003), este precisa ser exportado para o citoplasma onde deverá sofrer atuação de Dicer. Para isso é necessário a participação de Exportina 5, que associada a RAN-GTP, forma um complexo de exportação, responsável por se associar ao pré-miRNA recém formado e através de vários poros na membrana, o guia até o citoplasma (Yi *et al.*, 2003; Bohnsack

et al., 2004; Kim, 2004; Lund *et al.*, 2004). Nossos resultados demonstram que Exportina 5 (Figura 23), está superexpressa aos 10 e 40 dias de vida em *B. glabrata*, 5,143 e 3,723 vezes mais que o tempo desova respectivamente, o que nos leva a crer que, mesmo com poucos dados na literatura, Exportina 5 desempenha papel fundamental no desenvolvimento dos moluscos, uma vez que é fundamental para a produção de miRNAs (Lund *et al.*, 2004), e esses já estão consolidados como importantes em processos celulares.

Descoberta em 1985 por Boswell and Mahowald, durante estudos de fatores maternos com influência no desenvolvimento embrionário ou na fertilidade de *D. melanogaster* (Boswell e Mahowald, 1985), Tudor foi associada a inúmeros processos celulares, entre eles a associação a aminoácidos metilados presentes nas histonas, com papel significativo no controle epigenético da transcrição gênica (Anderson e Kedersha, 2009). Tudor pode participar tanto da via de miRNAs, siRNAs e principalmente piRNAs. Nos primeiros faz parte do complexo de silenciamento induzido de RNA (RISC) (Caudy *et al.*, 2003), onde possui além do domínio Tudor, quatro domínios nucleases. Em piRNAs Tudor está associada a PIWI para o processamento destes. Essa associação é feita através da ligação de Tudor a arginina metilada de PIWI (Chen *et al.*, 2009; Liu, H. *et al.*, 2010; Liu, K. *et al.*, 2010). Essa associação também é benéfica graças ao domínio DEAD-box helicase presente em Tudor necessária a PIWI para o processamento primário de piRNAs e repressão de transposons (Olivieri *et al.*, 2010; Saito *et al.*, 2010; Saito e Siomi, 2010; Qi *et al.*, 2011). Tudor em *B. glabrata* apresenta um perfil constante ao longo do desenvolvimento do animal (Figura 24). Em nossos ensaios foi possível observar diferença estatisticamente significativa apenas aos 10 dias, com um valor de expressão 0,263 vezes menor que a desova. Isso nos leva a crer que a participação de Tudor no desenvolvimento do animal se mantém bem regulado durante todos os estágios de vida, podendo ter sua demanda reduzida durante o período de crescimento do caramujo até seu amadurecimento sexual.

6.2.2 EXPRESSÃO GÊNICA DOS GENES DA MAQUINARIA DE PEQUENOS RNAs NOS DIFERENTES TEMPOS DE INFECÇÃO

Para os experimentos de infecção foram utilizados caramujos de aproximadamente 7 a 9 mm de comprimento da concha e 40 dias de vida, padrão ideal para este tipo de ensaio, onde existe uma elevada taxa de sucesso infectivo e menor perda

de caramujos por morte devido ao processo (Niemann e Lewis, 1990; Theron *et al.*, 1998; Lewis *et al.*, 2003). Como os experimentos relacionados ao tempo de desenvolvimento demonstraram que, em *B. glabrata*, nesta faixa etária não existe expressão diferencial de argonauta, todas as alterações significativas estatisticamente encontradas nos ensaios de infecção são decorrentes do processo de infecção.

É interessante perceber que quatro horas após a infecção, argonauta sofre uma grande subexpressão que ainda se mantém em menor nível 12 horas após infecção (Figura 25). Essa evidência demonstra que as primeiras horas de infecção de *B. glabrata* por *S. mansoni* são extremamente traumáticas para o molusco e mesmo não o levando a morte (Basch, 1976), o força a se ajustar à nova condição. Isto pode ser comprovado 24 horas após a infecção, onde é possível perceber um aumento na expressão de argonauta, sugerindo que mesmo após a injúria, a transcrição desse gene é fundamental para as funções biológicas de *B. glabrata*. Aos 7 dias decorridos da infecção, ocorre um aumento significativo nos níveis de expressão desse alvo, período no qual o esporocisto primário está movimentando-se ativamente pelo tecido do caramujo (Maldonado e Acosta Matienzo, 1947; Jourdane *et al.*, 1980; Theron e Touassem, 1989; De Souza *et al.*, 1995). Aos 15 dias ocorre uma nova subexpressão de argonauta, provavelmente em decorrência da transformação do trematódeo em esporocisto secundário, que normalmente ocorre aos 14 dias após infecção (Maldonado e Acosta Matienzo, 1947; Negro-Correa *et al.*, 2012). Esses dados sugerem que argonauta possui papel direto na recuperação do caramujo e que o processo de infecção é provavelmente favorecido por uma diminuição no processamento de miRNAs e/ou siRNAs de *B. glabrata* pela falta de argonauta, já que a falta de Argonauta está associada com inúmeras desordens e controla a homeostase de miRNAs em condições fisiológicas (Adams *et al.*, 2009; Romero-Cordoba *et al.*, 2014; Swarts *et al.*, 2014).

O gene Droscha (Figura 26), bem como Argonauta (Figura 25), apresentaram uma subexpressão acentuada no tempo T1, com 0,111 vezes menos expresso que o controle não infectado. O que demonstra que o período inicial do processo infeccioso é prejudicial ao caramujo (Chernin, 1972; Basch, 1976). Porém, 12 horas após a infecção já foi possível notar uma elevada expressão de Droscha, 7,439 vezes maior que o controle. Esse aumento foi notado até os 21 dias, mostrando que mesmo com a injúria, o caramujo depende desse gene ativo para a manutenção de suas atividades vitais. Aos trinta dias de infecção, uma nova subexpressão de Droscha foi evidenciada, 0,243 vezes menor que seu

controle não infectado, confirmando que em momentos de grande injúria, a expressão gênica desse gene em *B. glabrata* é seriamente prejudicado, uma vez que se trata da época de produção e eliminação de cercarias, processo traumático que pode ocasionar a morte do caramujo (Olivier e Mao, 1949).

Confirmando as dificuldades encontradas pelo caramujo durante o processo de penetração dos miracídios de *S. mansoni*, percebeu-se uma subexpressão acentuada de Piwi às 4 horas e que persistiu até às 12 horas após infecção (Figura 27), com valores iguais a 0,036 e 0,196 vezes menores que seus controles não infectados. Já às 24 horas, 7 dias e 30 dias após a infecção, Piwi esteve 3,908, 18,832 e 2,075 vezes mais expresso que em seu grupo controle. Nossos resultados sugerem que Piwi desempenha papel fundamental na relação *B. glabrata* / *S. mansoni*, uma vez que a maquinaria de processamento de piRNAs não se encontra disponível no trematódeo e Piwi está superexpressa durante os principais momentos de diferenciação do parasito no molusco, como no processo de transformação dos miracídios em esporocisto primário, após as 48 horas iniciais e excepcionalmente elevado aos 7 dias, período de crescimento deste até se transformar em esporocisto secundário, por volta dos 14 dias, além da eliminação de cercarias aos 30 dias (Maldonado e Acosta Matienzo, 1947).

Não é possível com esses dados afirmar que Piwi esteja relacionada ao perfil de susceptibilidade de *B. glabrata* em relação ao *S. mansoni*. Mais estudos precisam ser realizados para apontar a participação real de Piwi nesta relação e conseqüentemente dos prováveis piRNAs produzidos pelo caramujo, uma vez que a simples expressão do gene não significa que sua tradução ocorra adequadamente. Rajasethupathy e colaboradores (2012) demonstraram a presença de piRNAs em células do sistema nervoso e outros tecidos somáticos de *A. californica*, molusco marinho (Rajasethupathy *et al.*, 2012), o que reforça a possibilidade da ocorrência dessas moléculas também em *B. glabrata*.

O perfil de expressão gênica de Exportina 5 (Figura 28), demonstra que este gene esteve subexpresso praticamente durante todos os momentos da infecção de *B. glabrata* por *S. mansoni*, com destaque especial às primeiras 4 horas, onde esteve 0,046 vezes menos expresso que seu controle não infectado, o que nos leva a crer que o processo de penetração do miracídio no caramujo provoca sérios distúrbios no hospedeiro. Nos grupos T2, T3, T5 e T7, os caramujos permaneceram incapazes de aumentar significativamente os transcritos de Exportina 5, apresentando valores 0,371, 0,299, 0,42 e 0,304 vezes

menor que seus controles não infectados respectivamente. Esses resultados podem refletir uma menor demanda de miRNAs durante os momentos infecciosos, embora para fazer tal afirmação novos ensaios devam ser conduzidos. Contudo, aos 7 e aos 21 dias de infecção, houve uma superexpressão significativa de Exportina 5, com valores de expressão 10,096 e 7,587 vezes maiores que seus controles não infectados respectivamente, demonstrando que durante o crescimento do esporocisto primário e a migração dos esporocistos secundários até a glândula digestiva do caramujo (Maldonado e Acosta Matienzo, 1947), Exportina 5 desempenha papel fundamental. Yi e colaboradores (2003) sugeriram que Exportina 5 não controla apenas a quantidade de miRNAs dentro do núcleo, mas os protege de ações nucleases que por ventura possam comprometer sua integridade. Como esta é uma proteína compartilhada também por shRNAs, que competem com miRNAs pelos seus alvos, causando inibição destes, uma superexpressão de Exportina 5 é necessária para controlar as atividades de miRNAs (Yi *et al.*, 2003). Novos estudos precisam ser conduzidos para afirmar que este é o mecanismo por trás da superexpressão de Exportina 5 aos 7 e 21 dias de infecção de *B. glabrata* pelo trematódeo *S. mansoni*.

Confirmando nossas observações anteriores, Tudor também apresenta um perfil de expressão gênica característico das horas iniciais após a infecção (Gráfico 10), demonstrando uma significativa subexpressão nas primeiras 4 e 12 horas, com valores 0,267 e 0,23 vezes menores que seus controles não infectados respectivamente. 24 horas após a infecção, mesmo com as intensas modificações sofridas pelos miracídios no corpo do caramujo até se transformarem em esporocisto primário (Maldonado e Acosta Matienzo, 1947), Tudor apresenta uma superexpressão 3,612 vezes maior que seu controle não infectado. Nos demais momentos da infecção Tudor não demonstrou diferenças estatísticas dos seus controles não infectados, mesmo quando o dano físico causado pelo trematódeo ao molusco parece ser severo e que normalmente leva grande quantidade de caramujos à morte, a intensa movimentação do esporocisto secundário após o 14 dia de infecção até as glândulas digestivas e a saída das cercarias para o meio externo (Maldonado e Acosta Matienzo, 1947). Isso nos demonstra que a participação de Tudor na relação parasito hospedeiro parece não ser fundamental para determinar o caráter de resistência ou susceptibilidade. A Superexpressão ocorrida após 24 horas de infecção pode ser mais um evento de recuperação do caramujo as lesões sofridas nas primeiras horas que uma resposta efetiva contra a atuação do trematódeo.

7 CONCLUSÕES

O estudo dos pequenos RNAs não codificantes de proteínas é amplo e já demonstrou em inúmeras frentes ser promissor e em alguns casos a resposta para alguns questionamentos na ciência. Nosso grupo de trabalho acredita que estes estejam ligados diretamente com o processo de interação parasito/hospedeiro invertebrado na esquistossomose mansoni. De Souza Gomes e colaboradores em 2011 demonstraram a existência de miRNAs maduros, além de precursores miRNA em *S. mansoni* (De Souza Gomes *et al.*, 2011), porém, piRNAs não são encontrados neste parasita, o que abre precedentes para estudos na relação *Biomphalaria/S. mansoni*, que demonstrem a participação dessas espécies na resistência/susceptibilidade do molusco frente ao trematódeo, uma vez que nossos resultados demonstram que a maquinaria de piRNAs está ativa em *B. glabrata*, com expressão diferencial durante a infecção.

Nossos resultados demonstram que as vias de miRNAs, siRNAs e piRNAs estão ativas, a nível de transcriptoma, em *B. glabrata*, com os principais genes da via apresentado transcritos compatíveis com os encontrados para organismos modelo no banco de dados do NCBI, confirmando assim que a transcrição dos principais genes da maquinaria de processamento de pequenos RNAs em *B. glabrata* ocorre. Porém, como a presença do transcrito não garante a tradução deste em proteína, mais estudos são necessários para comprovar a presença destas no caramujo.

Além de comprovar a presença dos transcritos no caramujo, conseguimos confirmar para as preditas proteínas Argonauta, Piwi, Drosha e Dicer de *B. glabrata*, que elas são ortólogas das encontradas em organismos referência como *D. melanogaster*, *C. elegans*, *M. musculus*, *D. rerio* entre outros. Conseguimos ainda, determinar que os genes Argonauta, Piwi, Drosha, Exportina 5 e Tudor sofrem influência do processo de infecção de *B. glabrata* pelo *S. mansoni*, apresentando expressão diferencial em diversos tempos de infecção que abordaram os diversos tempos de desenvolvimento do trematódeo no molusco. Determinamos ainda o nível de expressão basal destes genes nos mais diferentes tempos de desenvolvimento do molusco e podemos confirmar que, as alterações ocorridas a nível de expressão gênica durante o processo de infecção, decorrem exatamente em função da relação parasita/hospedeiro.

Portanto, podemos afirmar que *B. glabrata* expressa os principais genes envolvidos no processamento de miRNAs e piRNAs e a infecção por *S. mansoni* interfere diretamente na expressão de alguns destes genes.

8 PERSPECTIVAS

Com a confirmação em *B. glabrata*, organismo referência para os estudos relacionados à interação parasito-hospedeiro invertebrado na esquistossomose mansoni, da presença da maquinaria de processamento de pequenos RNAs não codificadores de proteínas, nos resta agora caracterizar esses pequenos RNAs em *Biomphalaria sp* e identificar aqueles com participação na relação resistência/susceptibilidade do caramujo frente ao *S. mansoni*.

Para estes estudos prosseguiremos com estudos de identificação e caracterização dos pequenos RNAs em duas linhagens geográficas de caramujos *B. tenagophila*, uma sabidamente resistente ao processo de infecção pelo *S. mansoni*, oriunda da reserva ecológica do Taim no Rio Grande do Sul, e outra muito susceptível, oriunda de Joinville no estado de Santa Catarina. Com estes estudos esperamos elucidar a participação dos pequenos RNAs na relação resistência/susceptibilidade e caracterizar quais estão relacionados a resistência do caramujo ao parasito.

9 REFERÊNCIAS

ADAMS, B. D.; CLAFFEY, K. P.; WHITE, B. A. Argonaute-2 expression is regulated by epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase signaling and correlates with a transformed phenotype in breast cancer cells. **Endocrinology**, v. 150, n. 1, p. 14-23, Jan 2009. ISSN 0013-7227 (Print) 0013-7227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18787018> >.

ADEMA, C. M. et al. A bacterial artificial chromosome library for *Biomphalaria glabrata*, intermediate snail host of *Schistosoma mansoni*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101 Suppl 1, p. 167-77, Sep 2006. ISSN 0074-0276 (Print) 0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17308766> >.

ANDERSON, P.; KEDERSHA, N. RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 10, n. 6, p. 430-6, Jun 2009. ISSN 1471-0080 (Electronic) 1471-0072 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19461665> >.

ANDERSON, R. M.; CROMBIE, J. Experimental studies of age-prevalence curves for *Schistosoma mansoni* infections in populations of *Biomphalaria glabrata*. **Parasitology**, v. 89 (Pt 1), p. 79-105, Aug 1984. ISSN 0031-1820 (Print) 0031-1820 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6472887> >.

ARAVIN, A. et al. A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. **Nature**, v. 442, n. 7099, p. 203-7, Jul 13 2006. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16751777> >.

ARAVIN, A. A. et al. A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to de novo DNA methylation in mice. **Mol Cell**, v. 31, n. 6, p. 785-99, Sep 26 2008. ISSN 1097-4164 (Electronic) 1097-2765 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18922463> >.

AUYEUNG, V. C. et al. Beyond secondary structure: primary-sequence determinants license pri-miRNA hairpins for processing. **Cell**, v. 152, n. 4, p. 844-58, Feb 14 2013. ISSN 1097-4172 (Electronic) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23415231> >.

AZEVEDO, C. M.; BORGES, C. C.; ANDRADE, Z. A. Changes induced in *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) following trials for artificial stimulation of its internal defense system. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101 Suppl 1, p. 199-203, Sep 2006. ISSN 0074-0276 (Print) 0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17308770> >.

BARRACCO, M. A.; STEIL, A. A.; GARGIONI, R. Morphological characterization of the hemocytes of the pulmonate snail *Biomphalaria tenagophila*. **Mem Inst Oswaldo**

Cruz, v. 88, n. 1, p. 73-83, Jan-Mar 1993. ISSN 0074-0276 (Print) 0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8246758> >.

BASCH, P. F. Intermediate host specificity in *Schistosoma mansoni*. **Exp Parasitol**, v. 39, n. 1, p. 150-69, Feb 1976. ISSN 0014-4894 (Print) 0014-4894 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/767127> >.

BAYNE, C. J. Successful parasitism of vector snail *Biomphalaria glabrata* by the human blood fluke (trematode) *Schistosoma mansoni*: a 2009 assessment. **Mol Biochem Parasitol**, v. 165, n. 1, p. 8-18, May 2009. ISSN 0166-6851 (Print) 0166-6851 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19393158> >.

BAYNE, C. J.; BUCKLEY, P. M.; DEWAN, P. C. Macrophagelike hemocytes of resistant *Biomphalaria glabrata* are cytotoxic for sporocysts of *Schistosoma mansoni* in vitro. **J Parasitol**, v. 66, n. 3, p. 413-9, Jun 1980a. ISSN 0022-3395 (Print) 0022-3395 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7391885> >.

BAYNE, C. J.; BUCKLEY, P. M.; DEWAN, P. C. *Schistosoma mansoni*: cytotoxicity of hemocytes from susceptible snail hosts for sporocysts in plasma from resistant *Biomphalaria glabrata*. **Exp Parasitol**, v. 50, n. 3, p. 409-16, Dec 1980b. ISSN 0014-4894 (Print) 0014-4894 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7428914> >.

BAYNE, C. J.; LOKER, E. S.; YUI, M. A. Interactions between the plasma proteins of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) and the sporocyst tegument of *Schistosoma mansoni* (Trematoda). **Parasitology**, v. 92 (Pt 3), p. 653-64, Jun 1986. ISSN 0031-1820 (Print) 0031-1820 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2426650>.

BEREZIKOV, E. et al. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. **Cell**, v. 120, n. 1, p. 21-4, Jan 14 2005. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15652478>.

BERNSTEIN, E. et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. **Nature**, v. 409, n. 6818, p. 363-6, Jan 18 2001. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11201747>.

BEZERRA, F. S. et al. Quantification of the population and phagocytary activity of hemocytes of resistant and susceptible strains of *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* infected with *Schistosoma mansoni*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 39, n. 4, p. 197-201, Jul-Aug 1997. ISSN 0036-4665 (Print) 0036-4665 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9640781> >.

BLASZCZYK, J. et al. Crystallographic and modeling studies of RNase III suggest a mechanism for double-stranded RNA cleavage. **Structure**, v. 9, n. 12, p. 1225-36, Dec

2001. ISSN 0969-2126 (Print) 0969-2126 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11738048> >.

BOEHMLER, A. M.; FRYER, S. E.; BAYNE, C. J. Killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by *Biomphalaria glabrata* hemolymph in vitro: alteration of hemocyte behavior after poly-L-lysine treatment of plastic, and the kinetics of killing by different host strains. **J Parasitol**, v. 82, n. 2, p. 332-5, Apr 1996. ISSN 0022-3395 (Print) 0022-3395 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8604109> >.

BOHNSACK, M. T.; CZAPLINSKI, K.; GORLICH, D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. **RNA**, v. 10, n. 2, p. 185-91, Feb 2004. ISSN 1355-8382 (Print) 1355-8382 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14730017> >.

BORGES, C. M.; AZEVEDO, C. M.; ANDRADE, Z. A. A contribution to the pathobiology of *Biomphalaria glabrata* hemocytes. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101 Suppl 1, p. 193-8, Sep 2006. ISSN 0074-0276 (Print) 0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17308769> >.

BOSWELL, R. E.; MAHOWALD, A. P. tudor, a gene required for assembly of the germ plasm in *Drosophila melanogaster*. **Cell**, v. 43, n. 1, p. 97-104, Nov 1985. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3935320> >.

BRASIL. Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: diretrizes técnicas: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE). **Editora do Ministério da Saúde**, n. 2ª edição, p. 177, 2008.

BRENNECKE, J. et al. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. **Cell**, v. 128, n. 6, p. 1089-103, Mar 23 2007. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17346786> >.

BRENNECKE, J. et al. An epigenetic role for maternally inherited piRNAs in transposon silencing. **Science**, v. 322, n. 5906, p. 1387-92, Nov 28 2008. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19039138> >.

BRENNECKE, J. et al. Principles of microRNA-target recognition. **PLoS Biol**, v. 3, n. 3, p. e85, Mar 2005. ISSN 1545-7885 (Electronic) 1544-9173 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15723116> >.

BRODERSEN, P.; VOINNET, O. Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 10, n. 2, p. 141-8, Feb 2009. ISSN 1471-0080 (Electronic)

1471-0072 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19145236>.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clin Chem**, v. 55, n. 4, p. 611-22, Apr 2009. ISSN 1530-8561 (Electronic)0009-9147 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19246619> >.

CALDEIRA, R. L.; JANNOTTI-PASSOS, L. K.; CARVALHO, O. S. Molecular epidemiology of Brazilian Biomphalaria: a review of the identification of species and the detection of infected snails. **Acta Trop**, v. 111, n. 1, p. 1-6, Jul 2009. ISSN 1873-6254 (Electronic) 0001-706X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19426656> >.

CARMELL, M. A. et al. MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline. **Dev Cell**, v. 12, n. 4, p. 503-14, Apr 2007. ISSN 1534-5807 (Print) 1534-5807 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17395546> >.

CARMELL, M. A. et al. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. **Genes Dev**, v. 16, n. 21, p. 2733-42, Nov 1 2002. ISSN 0890-9369 (Print) 0890-9369 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12414724> >.

CARTHEW, R. W.; SONTHEIMER, E. J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 642-55, Feb 20 2009. ISSN 1097-4172 (Electronic) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19239886> >.

CAUDY, A. A. et al. A micrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes. **Nature**, v. 425, n. 6956, p. 411-4, Sep 25 2003. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14508492> >.

CHEN, C. et al. Mouse Piwi interactome identifies binding mechanism of Tdrkh Tudor domain to arginine methylated Miwi. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 48, p. 20336-41, Dec 1 2009. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19918066> >.

CHERNIN, E. Penetrative activity of Schistosoma mansoni miracidia stimulated by exposure to snail-conditioned water. **J Parasitol**, v. 58, n. 2, p. 209-12, Apr 1972. ISSN 0022-3395 (Print) 0022-3395 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5022853> >.

CHONG, M. M. et al. Canonical and alternate functions of the microRNA biogenesis machinery. **Genes Dev**, v. 24, n. 17, p. 1951-60, Sep 1 2010. ISSN 1549-5477 (Electronic) 0890-9369 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20713509> >.

COELHO, J. R.; BEZERRA, F. S. Compatibility of *Biomphalaria tenagophila* with *Schistosoma mansoni*: a study of homologous plasma transference. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 111-2, Feb 2006. ISSN 0074-0276 (Print) 0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16699720> >.

COELHO, P. M. et al. Use of a saline gradient for the diagnosis of schistosomiasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 5, p. 720-3, Aug 2009. ISSN 1678-8060 (Electronic) 0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19820832> >.

COELHO, P. M. et al. Transmission control of schistosomiasis mansoni by introduction of a resistant strain of *Biomphalaria tenagophila* in areas where transmission is maintained by this species. **Acta Trop**, v. 108, n. 2-3, p. 245-8, Nov-Dec 2008. ISSN 1873-6254 (Electronic) 0001-706X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18598664> >.

COELI, R. et al. Praziquantel treatment decreases *Schistosoma mansoni* genetic diversity in experimental infections. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 12, p. e2596, 2013. ISSN 1935-2735 (Electronic) 1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24367712> >.

COSTA, M. C.; LEITAO, A. L.; ENGUITA, F. J. Biogenesis and Mechanism of Action of Small Non-Coding RNAs: Insights from the Point of View of Structural Biology. **Int J Mol Sci**, v. 13, n. 8, p. 10268-95, 2012. ISSN 1422-0067 (Electronic) 1422-0067 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22949860> >.

COX, D. N. et al. A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal. **Genes Dev**, v. 12, n. 23, p. 3715-27, Dec 1 1998. ISSN 0890-9369 (Print) 0890-9369 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9851978> >.

DAVIS-DUSENBERY, B. N.; HATA, A. Mechanisms of control of microRNA biogenesis. **J Biochem**, v. 148, n. 4, p. 381-92, Oct 2010. ISSN 1756-2651 (Electronic) 0021-924X (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20833630>.

DE SOUZA, C. P.; CUNHA RDE, C.; ANDRADE, Z. A. Development of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria tenagophila*, *Biomphalaria straminea* and *Biomphalaria glabrata*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 37, n. 3, p. 201-6, May-Jun 1995. ISSN 0036-4665 (Print) 0036-4665 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8525264> >.

DE SOUZA GOMES, M. et al. Genome-wide identification of novel microRNAs and their target genes in the human parasite *Schistosoma mansoni*. **Genomics**, v. 98, n. 2, p. 96-111, Aug 2011. ISSN 1089-8646 (Electronic) 0888-7543 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21640815> >.

DENLI, A. M. et al. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. **Nature**, v. 432, n. 7014, p. 231-5, Nov 11 2004. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15531879> >.

DIKKEBOOM, R. et al. The production of toxic oxygen metabolites by hemocytes of different snail species. **Dev Comp Immunol**, v. 12, n. 3, p. 509-20, Summer 1988. ISSN 0145-305X (Print) 0145-305X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3169350> >.

DOS SANTOS, A. F. et al. The lethality of *Euphorbia conspicua* to adults of *Biomphalaria glabrata*, cercaria of *Schistosoma mansoni* and larvae of *Artemia salina*. **Bioresour Technol**, v. 98, n. 1, p. 135-9, Jan 2007. ISSN 0960-8524 (Print) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16458000> >.

DURAND, P.; SIRE, C.; THERON, A. Isolation of microsatellite markers in the digenetic trematode *Schistosoma mansoni* from Guadeloupe island. **Mol Ecol**, v. 9, n. 7, p. 997-8, Jul 2000. ISSN 0962-1083 (Print) 0962-1083 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10886664> >.

ESAU, C. et al. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. **J Biol Chem**, v. 279, n. 50, p. 52361-5, Dec 10 2004. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15504739> >.

ESPIRITO-SANTO, M. C. et al. Evaluation of real-time PCR assay to detect *Schistosoma mansoni* infections in a low endemic setting. **BMC Infect Dis**, v. 14, n. 1, p. 558, 2014. ISSN 1471-2334 (Electronic) 1471-2334 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25338651> >.

ESQUELA-KERSCHER, A.; SLACK, F. J. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 4, p. 259-69, Apr 2006. ISSN 1474-175X (Print) 1474-175X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16557279> >.

EVAN SECOR, W. Water-based interventions for schistosomiasis control. **Pathog Glob Health**, v. 108, n. 5, p. 246-54, Jul 2014. ISSN 2047-7732 (Electronic) 2047-7724 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25175875> >.

FABRI, R. L. et al. Chromatographic fingerprint analysis and effects of the medicinal plant species *Mitracarpus frigidus* on adult *Schistosoma mansoni* worms. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 941318, 2014. ISSN 2314-6141 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24901000> >.

FERNANDEZ, M. A.; PIERI, O. S. Infection by *Schistosoma mansoni* Sambon 1907 in the first four months of life of *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) in Brazil. **Mem**

Inst Oswaldo Cruz, v. 96 Suppl, p. 185-92, 2001. ISSN 0074-0276 (Print) 0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11586448> >.

FILIPPOV, V. et al. A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes. **Gene**, v. 245, n. 1, p. 213-21, Mar 7 2000. ISSN 0378-1119 (Print) 0378-1119 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10713462> >.

FONSECA, C. T. et al. Schistosoma tegument proteins in vaccine and diagnosis development: an update. **J Parasitol Res**, v. 2012, p. 541268, 2012. ISSN 2090-0031 (Electronic) 2090-0023 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23125917> >.

FORTIN, K. R.; NICHOLSON, R. H.; NICHOLSON, A. W. Mouse ribonuclease III. cDNA structure, expression analysis, and chromosomal location. **BMC Genomics**, v. 3, n. 1, p. 26, Aug 21 2002. ISSN 1471-2164 (Electronic) 1471-2164 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12191433> >.

FU, Q.; WANG, P. J. Mammalian piRNAs: Biogenesis, function, and mysteries. **Spermatogenesis**, v. 4, p. e27889, 2014. ISSN 2156-5554 (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25077039> >.

GIRARD, A. et al. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. **Nature**, v. 442, n. 7099, p. 199-202, Jul 13 2006. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16751776>.

GOMES, M. S. et al. Preliminary analysis of miRNA pathway in Schistosoma mansoni. **Parasitol Int**, v. 58, n. 1, p. 61-8, Mar 2009. ISSN 1383-5769 (Print) 1383-5769 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19007911> >.

GRANATH, W. O., JR.; YOSHINO, T. P. Schistosoma mansoni: passive transfer of resistance by serum in the vector snail, Biomphalaria glabrata. **Exp Parasitol**, v. 58, n. 2, p. 188-93, Oct 1984. ISSN 0014-4894 (Print) 0014-4894 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6479289> >.

GREGORY, R. I. et al. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. **Nature**, v. 432, n. 7014, p. 235-40, Nov 11 2004. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15531877> >.

GRENFELL, R. F. et al. Newly established monoclonal antibody diagnostic assays for Schistosoma mansoni direct detection in areas of low endemicity. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e87777, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24498191> >.

GRENFELL, R. F. et al. Acute schistosomiasis diagnosis: a new tool for the diagnosis of schistosomiasis in a group of travelers recently infected in a new focus of *Schistosoma mansoni*. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 46, n. 2, p. 208-13, Mar-Apr 2013. ISSN 1678-9849 (Electronic) 0037-8682 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23740077> >.

GRENFELL, R. F. et al. *Schistosoma mansoni* in a low-prevalence area in Brazil: the importance of additional methods for the diagnosis of hard-to-detect individual carriers by low-cost immunological assays. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 3, May 2013. ISSN 1678-8060 (Electronic) 0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23778663> >.

HA, M.; KIM, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 15, n. 8, p. 509-24, Aug 2014. ISSN 1471-0080 (Electronic) 1471-0072 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25027649> >.

HAHN, U. K.; BENDER, R. C.; BAYNE, C. J. Production of reactive oxygen species by hemocytes of *Biomphalaria glabrata*: carbohydrate-specific stimulation. **Dev Comp Immunol**, v. 24, n. 6-7, p. 531-41, Sep-Oct 2000. ISSN 0145-305X (Print) 0145-305X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10831788> >.

HAHN, U. K.; BENDER, R. C.; BAYNE, C. J. Involvement of nitric oxide in killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*. **J Parasitol**, v. 87, n. 4, p. 778-85, Aug 2001a. ISSN 0022-3395 (Print) 0022-3395 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11534641> >.

HAHN, U. K.; BENDER, R. C.; BAYNE, C. J. Killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*: role of reactive oxygen species. **J Parasitol**, v. 87, n. 2, p. 292-9, Apr 2001b. ISSN 0022-3395 (Print) 0022-3395 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11318558> >.

HAN, J. et al. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. **Genes Dev**, v. 18, n. 24, p. 3016-27, Dec 15 2004. ISSN 0890-9369 (Print) 0890-9369 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15574589> >.

HAN, J. et al. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. **Cell**, v. 125, n. 5, p. 887-901, Jun 2 2006. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16751099>.

HANINGTON, P. C.; FORYS, M. A.; LOKER, E. S. A somatically diversified defense factor, FREP3, is a determinant of snail resistance to schistosome infection. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 3, p. e1591, 2012. ISSN 1935-2735 (Electronic) 1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22479663> >.

HARRIS, K. R. The fine structure of encapsulation in *Biomphalaria glabrata*. **Ann N Y Acad Sci**, v. 266, p. 446-64, 1975. ISSN 0077-8923 (Print) 0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1072605> >.

HERTEL, J. et al. The expansion of the metazoan microRNA repertoire. **BMC Genomics**, v. 7, p. 25, 2006. ISSN 1471-2164 (Electronic) 1471-2164 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16480513> >.

HONEYCUTT, J. et al. Controversies and challenges in research on urogenital schistosomiasis-associated bladder cancer. **Trends Parasitol**, v. 30, n. 7, p. 324-32, Jul 2014. ISSN 1471-5007 (Electronic) 1471-4922 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24913983> >.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Res**, v. 9, n. 9, p. 868-77, Sep 1999. ISSN 1088-9051 (Print) 1088-9051 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10508846> >.

IPSARO, J. J. et al. The structural biochemistry of Zucchini implicates it as a nuclease in piRNA biogenesis. **Nature**, v. 491, n. 7423, p. 279-83, Nov 8 2012. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23064227> >.

JOHNSTON, L. A.; YOSHINO, T. P. Larval *Schistosoma mansoni* excretory-secretory glycoproteins (ESPs) bind to hemocytes of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) via surface carbohydrate binding receptors. **J Parasitol**, v. 87, n. 4, p. 786-93, Aug 2001. ISSN 0022-3395 (Print) 0022-3395 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11534642> >.

JONES, C.; LEDAY, T. V. Schistosomal eggs identified on bone marrow biopsy. **Blood**, v. 124, n. 8, p. 1219, Aug 21 2014. ISSN 1528-0020 (Electronic) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25285348> >.

JOURDANE, J.; THERON, A.; COMBES, C. Demonstration of several sporocyst generations as a normal pattern of reproduction of *Schistosoma mansoni*. **Acta Trop**, v. 37, n. 2, p. 177-82, Jun 1980. ISSN 0001-706X (Print) 0001-706X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6106352> >.

KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in *Schistosomiasis mansoni*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 14, n. 6, p. 397-400, Nov-Dec 1972. ISSN 0036-4665 (Print) 0036-4665 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4675644> >.

KIM, V. N. MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export. **Trends Cell Biol**, v. 14, n. 4, p. 156-9, Apr 2004. ISSN 0962-8924 (Print) 0962-8924 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15134074> >.

KIM, V. N. Small RNAs: classification, biogenesis, and function. **Mol Cells**, v. 19, n. 1, p. 1-15, Feb 28 2005. ISSN 1016-8478 (Print) 1016-8478 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15750334> >.

KIM, V. N.; HAN, J.; SIOMI, M. C. Biogenesis of small RNAs in animals. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 10, n. 2, p. 126-39, Feb 2009. ISSN 1471-0080 (Electronic) 1471-0072 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19165215> >.

KNIGHT, M. et al. Polyethyleneimine (PEI) mediated siRNA gene silencing in the Schistosoma mansoni snail host, Biomphalaria glabrata. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 7, p. e1212, Jul 2011. ISSN 1935-2735 (Electronic) 1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21765961> >.

KOLENDA, T. et al. The mystery of let-7d - a small RNA with great power. **Contemp Oncol (Pozn)**, v. 18, n. 5, p. 293-301, 2014. ISSN 1428-2526 (Print) 1428-2526 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25477749> >.

KOZOMARA, A.; GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. **Nucleic Acids Res**, v. 42, n. Database issue, p. D68-73, Jan 2014. ISSN 1362-4962 (Electronic) 0305-1048 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24275495> >.

LARSON, M. K.; BENDER, R. C.; BAYNE, C. J. Resistance of Biomphalaria glabrata 13-16-R1 snails to Schistosoma mansoni PR1 is a function of haemocyte abundance and constitutive levels of specific transcripts in haemocytes. **Int J Parasitol**, v. 44, n. 6, p. 343-53, May 2014. ISSN 1879-0135 (Electronic) 0020-7519 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24681237> >.

LEE, Y. et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. **Nature**, v. 425, n. 6956, p. 415-9, Sep 25 2003. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14508493> >.

LEE, Y. et al. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. **EMBO J**, v. 21, n. 17, p. 4663-70, Sep 2 2002. ISSN 0261-4189 (Print) 0261-4189 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12198168> >.

LEE, Y. et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **EMBO J**, v. 23, n. 20, p. 4051-60, Oct 13 2004. ISSN 0261-4189 (Print) 0261-4189 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15372072> >.

LEHR, T. et al. Localization of carbohydrate determinants common to Biomphalaria glabrata as well as to sporocysts and miracidia of Schistosoma mansoni. **Parasitology**, v. 135, n. 8, p. 931-42, Jul 2008. ISSN 1469-8161 (Electronic) 0031-1820 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18507884> >.

LEWIS, F. A.; PATTERSON, C. N.; GRZYWACZ, C. Parasite-susceptibility phenotypes of F1 Biomphalaria glabrata progeny derived from interbreeding Schistosoma mansoni-resistant and -susceptible snails. **Parasitol Res**, v. 89, n. 2, p. 98-101, Jan 2003. ISSN 0932-0113 (Print) 0932-0113 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12489007> >.

LIN, H.; SPRADLING, A. C. A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the Drosophila ovary. **Development**, v. 124, n. 12, p. 2463-76, Jun 1997. ISSN 0950-1991 (Print) 0950-1991 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9199372> >.

LIU, H. et al. Structural basis for methylarginine-dependent recognition of Aubergine by Tudor. **Genes Dev**, v. 24, n. 17, p. 1876-81, Sep 1 2010. ISSN 1549-5477 (Electronic) 0890-9369 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20713507>.

LIU, J. et al. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. **Science**, v. 305, n. 5689, p. 1437-41, Sep 3 2004. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15284456> >.

LIU, K. et al. Structural basis for recognition of arginine methylated Piwi proteins by the extended Tudor domain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 43, p. 18398-403, Oct 26 2010. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20937909> >.

LOCKYER, A. E. et al. Biomphalaria glabrata transcriptome: cDNA microarray profiling identifies resistant- and susceptible-specific gene expression in haemocytes from snail strains exposed to Schistosoma mansoni. **BMC Genomics**, v. 9, p. 634, 2008. ISSN 1471-2164 (Electronic) 1471-2164 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19114004> >.

LOKER, E. S.; BAYNE, C. J. Molecular studies of the molluscan response to digenean infection. **Adv Exp Med Biol**, v. 484, p. 209-22, 2001. ISSN 0065-2598 (Print) 0065-2598 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11418987> >.

LOVERDE, P. T.; GHERSON, J.; RICHARDS, C. S. Amebocytic accumulations in Biomphalaria glabrata: fine structure. **Dev Comp Immunol**, v. 6, n. 3, p. 441-9, Summer 1982. ISSN 0145-305X (Print) 0145-305X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7128891> >.

LUND, E. et al. Nuclear export of microRNA precursors. **Science**, v. 303, n. 5654, p. 95-8, Jan 2 2004. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14631048> >.

MACRAE, I. J. et al. Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. **Science**, v. 311, n. 5758, p. 195-8, Jan 13 2006. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16410517> >.

MALDONADO, J. F.; ACOSTA MATIENZO, J. The development of *Schistosoma mansoni* in the snail intermediate host, *Australorbis glabratus*. **PR J Public Health Trop Med**, v. 22, n. 4, p. 331-73, Spanish transl, 374-404, Jun 1947. ISSN 0370-1506 (Print) 0370-1506 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20264246>.

MALONE, C. D. et al. Specialized piRNA pathways act in germline and somatic tissues of the *Drosophila* ovary. **Cell**, v. 137, n. 3, p. 522-35, May 1 2009. ISSN 1097-4172 (Electronic) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19395010> >.

MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD: NCBI's conserved domain database. **Nucleic Acids Res**, v. 43, n. Database issue, p. D222-6, Jan 28 2015. ISSN 1362-4962 (Electronic) 0305-1048 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25414356>.

MARQUES, D. P. et al. Reduced susceptibility of a *Biomphalaria tenagophila* population to *Schistosoma mansoni* after introducing the resistant Taim/RS strain of *B. tenagophila* into Herivelton Martins stream. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e99573, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24941324> >.

MARTINS-SOUZA, R. L. et al. Silica treatment increases the susceptibility of the Cabo Frio strain of *Biomphalaria tenagophila* to *Schistosoma mansoni* infection but does not alter the natural resistance of the Taim strain. **Parasitol Res**, v. 91, n. 6, p. 500-7, Dec 2003. ISSN 0932-0113 (Print) 0932-0113 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14530969> >.

MARTINS-SOUZA, R. L. et al. Differential lectin labelling of circulating hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* resistant or susceptible to *Schistosoma mansoni* infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101 Suppl 1, p. 185-92, Sep 2006. ISSN 0074-0276 (Print) 0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17308768> >.

MARTINS, M. C. et al. Usnic Acid Potassium Salt: An Alternative for the Control of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. e111102, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25375098> >.

MCCLURE, E. M. et al. The association of parasitic infections in pregnancy and maternal and fetal anemia: a cohort study in coastal Kenya. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 2, p. e2724, Feb 2014. ISSN 1935-2735 (Electronic) 1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24587473> >.

MEISTER, G.; TUSCHL, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 343-9, Sep 16 2004. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15372041> >.

MELO, S. A.; ESTELLER, M. Disruption of microRNA nuclear transport in human cancer. **Semin Cancer Biol**, v. 27, p. 46-51, Aug 2014. ISSN 1096-3650 (Electronic) 1044-579X (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24607282>.

MOAZED, D. Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. **Nature**, v. 457, n. 7228, p. 413-20, Jan 22 2009. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19158787> >.

MODZELEWSKI, A. J. et al. AGO4 regulates entry into meiosis and influences silencing of sex chromosomes in the male mouse germline. **Dev Cell**, v. 23, n. 2, p. 251-64, Aug 14 2012. ISSN 1878-1551 (Electronic) 1534-5807 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22863743> >.

NACIF-PIMENTA, R. et al. Schistosoma mansoni in susceptible and resistant snail strains Biomphalaria tenagophila: in vivo tissue response and in vitro hemocyte interactions. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e45637, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23049828> >.

NAM, S. et al. Mg²⁺ effect on argonaute and RNA duplex by molecular dynamics and bioinformatics implications. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e109745, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25330448> >.

NEGRAO-CORREA, D. et al. Interaction of Schistosoma mansoni Sporocysts and Hemocytes of Biomphalaria. **J Parasitol Res**, v. 2012, p. 743920, 2012. ISSN 2090-0031 (Electronic) 2090-0023 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22811885> >.

NIEMANN, G. M.; LEWIS, F. A. Schistosoma mansoni: influence of Biomphalaria glabrata size on susceptibility to infection and resultant cercarial production. **Exp Parasitol**, v. 70, n. 3, p. 286-92, Apr 1990. ISSN 0014-4894 (Print) 0014-4894 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2311711> >.

OLIVIER, L.; MAO, C. P. The early larval stages of Schistosoma mansoni Sambon, 1907 in the snail host, Australorbis glabratus (Say, 1818). **J Parasitol**, v. 35, n. 3, p. 267-75, Jun 1949. ISSN 0022-3395 (Print) 0022-3395 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18153098> >.

OLIVIERI, D. et al. An in vivo RNAi assay identifies major genetic and cellular requirements for primary piRNA biogenesis in Drosophila. **EMBO J**, v. 29, n. 19, p.

3301-17, Oct 6 2010. ISSN 1460-2075 (Electronic) 0261-4189 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20818334> >.

OMS. Schistosomiasis. **Fact sheet N°115**, 2014 2014. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/> >. Acesso em: 21 de Outubro de 2014.

PAN, C. T. Generalized and Focal Tissue Responses in the Snail, *Australorbis Glabratus*, Infected with *Schistosoma Mansoni*. **Ann N Y Acad Sci**, v. 113, p. 475-85, Dec 30 1963. ISSN 0077-8923 (Print) 0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14088711> >.

PARAENSE, W. L.; CORREA, L. R. Susceptibility of *Australorbis tenagophilus* to infection with *Schistosoma mansoni*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 5, p. 23-9, Jan-Feb 1963a. ISSN 0036-4665 (Print) 0036-4665 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13941356> >.

PARAENSE, W. L.; CORREA, L. R. Variation in susceptibility of populations of *Australorbis glabratus* to a strain of *Schistosoma mansoni*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 5, p. 15-22, Jan-Feb 1963b. ISSN 0036-4665 (Print) 0036-4665 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13941355> >.

PARK, J. E. et al. Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. **Nature**, v. 475, n. 7355, p. 201-5, Jul 14 2011. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21753850>.

PARKER, J. S.; ROE, S. M.; BARFORD, D. Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. **Nature**, v. 434, n. 7033, p. 663-6, Mar 31 2005. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15800628> >.

PEREIRA, C. A. et al. Participation of cell-free haemolymph of *Biomphalaria tenagophila* in the defence mechanism against *Schistosoma mansoni* sporocysts. **Parasite Immunol**, v. 30, n. 11-12, p. 610-9, Nov-Dec 2008. ISSN 1365-3024 (Electronic) 0141-9838 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19067842> >.

PEREIRA FILHO, A. A. et al. EVALUATION OF THE MOLLUSCICIDAL POTENTIAL OF HYDROALCOHOLIC EXTRACTS OF *Jatropha gossypifolia* Linnaeus, 1753 ON *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 56, n. 6, p. 505-10, Dec 2014. ISSN 1678-9946 (Electronic) 0036-4665 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25351545> >.

PETERS, L.; MEISTER, G. Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. **Mol Cell**, v. 26, n. 5, p. 611-23, Jun 8 2007. ISSN 1097-2765 (Print) 1097-2765 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17560368> >.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**, v. 29, n. 9, p. e45, May 1 2001. ISSN 1362-4962 (Electronic) 0305-1048 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11328886>.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Res**, v. 30, n. 9, p. e36, May 1 2002. ISSN 1362-4962 (Electronic) 0305-1048 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11972351> >.

PLOWS, L. D. et al. Carbohydrates that mimic schistosome surface coat components affect ERK and PKC signalling in *Lymnaea stagnalis* haemocytes. **Int J Parasitol**, v. 35, n. 3, p. 293-302, Mar 2005. ISSN 0020-7519 (Print) 0020-7519 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15722081> >.

QI, H. et al. The Yb body, a major site for Piwi-associated RNA biogenesis and a gateway for Piwi expression and transport to the nucleus in somatic cells. **J Biol Chem**, v. 286, n. 5, p. 3789-97, Feb 4 2011. ISSN 1083-351X (Electronic) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21106531> >.

RAJASETHUPATHY, P. et al. A role for neuronal piRNAs in the epigenetic control of memory-related synaptic plasticity. **Cell**, v. 149, n. 3, p. 693-707, Apr 27 2012. ISSN 1097-4172 (Electronic) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22541438> >.

RICHARDS, C. S.; MERRITT, J. W., JR. Genetic factors in the susceptibility of juvenile *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection. **Am J Trop Med Hyg**, v. 21, n. 4, p. 425-34, Jul 1972. ISSN 0002-9637 (Print) 0002-9637 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5050093> >.

ROMERO-CORDOBA, S. L. et al. miRNA biogenesis: Biological impact in the development of cancer. **Cancer Biol Ther**, v. 15, n. 11, p. 1444-55, Nov 2 2014. ISSN 1555-8576 (Electronic) 1538-4047 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25482951> >.

ROSA, F. M. et al. *Biomphalaria tenagophila*: dominant character of the resistance to *Schistosoma mansoni* in descendants of crossbreedings between resistant (Taim, RS) and susceptible (Joinville, SC) strains. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 1, p. 19-23, Feb 2005. ISSN 0074-0276 (Print) 0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15867958> >.

SAITO, K. et al. A regulatory circuit for piwi by the large Maf gene traffic jam in *Drosophila*. **Nature**, v. 461, n. 7268, p. 1296-9, Oct 29 2009. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19812547> >.

SAITO, K. et al. Roles for the Yb body components Armitage and Yb in primary piRNA biogenesis in *Drosophila*. **Genes Dev**, v. 24, n. 22, p. 2493-8, Nov 15 2010. ISSN 1549-5477 (Electronic) 0890-9369 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20966047> >.

SAITO, K. et al. Pimet, the *Drosophila* homolog of HEN1, mediates 2'-O-methylation of Piwi- interacting RNAs at their 3' ends. **Genes Dev**, v. 21, n. 13, p. 1603-8, Jul 1 2007. ISSN 0890-9369 (Print) 0890-9369 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17606638> >.

SAITO, K.; SIOMI, M. C. Small RNA-mediated quiescence of transposable elements in animals. **Dev Cell**, v. 19, n. 5, p. 687-97, Nov 16 2010. ISSN 1878-1551 (Electronic) 1534-5807 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21074719>.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol Biol Evol**, v. 4, n. 4, p. 406-25, Jul 1987. ISSN 0737-4038 (Print) 0737-4038 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3447015>.

SANGER, F.; COULSON, A. R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **J Mol Biol**, v. 94, n. 3, p. 441-8, May 25 1975. ISSN 0022-2836 (Print) 0022-2836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1100841> >.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 74, n. 12, p. 5463-7, Dec 1977. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/271968> >.

SASAKI, T. et al. Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome. **Genomics**, v. 82, n. 3, p. 323-30, Sep 2003. ISSN 0888-7543 (Print) 0888-7543 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12906857> >.

SCHWARZ, D. S. et al. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. **Cell**, v. 115, n. 2, p. 199-208, Oct 17 2003. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14567917> >.

SCHWARZ, D. S.; TOMARI, Y.; ZAMORE, P. D. The RNA-induced silencing complex is a Mg²⁺-dependent endonuclease. **Curr Biol**, v. 14, n. 9, p. 787-91, May 4 2004. ISSN 0960-9822 (Print) 0960-9822 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15120070> >.

SECOR, W. E. The effects of schistosomiasis on HIV/AIDS infection, progression and transmission. **Curr Opin HIV AIDS**, v. 7, n. 3, p. 254-9, May 2012. ISSN 1746-6318

(Electronic) 1746-630X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22327410>>.

SILVA-NETO, A. et al. Ultrastructural characterization of cells in primary cultures from different adult tissues of *Biomphalaria tenagophila* TAIM, a strain that is absolutely resistant to *Schistosoma mansoni* infection. **Micron**, v. 67, p. 37-49, Dec 2014. ISSN 1878-4291 (Electronic) 0968-4328 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25016171>>.

SIMOES, M. C. et al. Identification of *Schistosoma mansoni* microRNAs. **BMC Genomics**, v. 12, p. 47, 2011. ISSN 1471-2164 (Electronic) 1471-2164 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21247453>>.

SIRE, C. et al. Genetic diversity of *Schistosoma mansoni* within and among individual hosts (*Rattus rattus*): intrapopulation differentiation at microspatial scale. **Int J Parasitol**, v. 31, n. 14, p. 1609-16, Dec 2001. ISSN 0020-7519 (Print) 0020-7519 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11730788>>.

SONG, J. J. et al. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. **Science**, v. 305, n. 5689, p. 1434-7, Sep 3 2004. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15284453>.

SOUZA, C. P.; PASSOS, L. K. Resistance of *Biomphalaria occidentalis* from Varzea das Flores dam, Minas Gerais, to *Schistosoma mansoni* infection detected by low stringency polymerase chain reaction. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 3, p. 381-3, Apr 2001. ISSN 0074-0276 (Print) 0074-0276 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11313648>>.

SOUZA SDOS, S.; ANDRADE, Z. A. On the origin of the *Biomphalaria glabrata* hemocytes. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101 Suppl 1, p. 213-8, Sep 2006. ISSN 0074-0276 (Print) 0074-0276 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17308772>>.

SU, H. et al. Essential and overlapping functions for mammalian Argonautes in microRNA silencing. **Genes Dev**, v. 23, n. 3, p. 304-17, Feb 1 2009. ISSN 1549-5477 (Electronic) 0890-9369 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19174539>>.

SWARTS, D. C. et al. The evolutionary journey of Argonaute proteins. **Nat Struct Mol Biol**, v. 21, n. 9, p. 743-53, Sep 2014. ISSN 1545-9985 (Electronic) 1545-9985 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25192263>>.

TAMURA, K. et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Mol Biol Evol**, v.

28, n. 10, p. 2731-9, Oct 2011. ISSN 1537-1719 (Electronic) 0737-4038 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21546353> >.

THERON, A.; COUSTAU, C. Are Biomphalaria snails resistant to Schistosoma mansoni? **J Helminthol**, v. 79, n. 3, p. 187-91, Sep 2005. ISSN 0022-149X (Print) 0022-149X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16153311> >.

THERON, A.; ROGNON, A.; PAGES, J. R. Host choice by larval parasites: a study of Biomphalaria glabrata snails and Schistosoma mansoni miracidia related to host size. **Parasitol Res**, v. 84, n. 9, p. 727-32, Sep 1998. ISSN 0932-0113 (Print) 0932-0113 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9766901> >.

THERON, A.; TOUASSEM, R. Schistosoma rodhaini: intramolluscan larval development, migration and replication processes of daughter sporocysts. **Acta Trop**, v. 46, n. 1, p. 39-45, Jan 1989. ISSN 0001-706X (Print) 0001-706X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2566260> >.

THIVIERGE, C. et al. Tudor domain ERI-5 tethers an RNA-dependent RNA polymerase to DCR-1 to potentiate endo-RNAi. **Nat Struct Mol Biol**, v. 19, n. 1, p. 90-7, Jan 2012. ISSN 1545-9985 (Electronic) 1545-9985 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22179787> >.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. **Curr Protoc Bioinformatics**, v. Chapter 2, p. Unit 2 3, Aug 2002. ISSN 1934-340X (Electronic) 1934-3396 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18792934> >.

TREYVAUD, V. et al. Molluscicidal saponins from Phytolacca icosandra. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 603-9, Nov 2000. ISSN 0031-9422 (Print) 0031-9422 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11130671> >.

VALENCIA-SANCHEZ, M. A. et al. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. **Genes Dev**, v. 20, n. 5, p. 515-24, Mar 1 2006. ISSN 0890-9369 (Print) 0890-9369 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16510870> >.

VAN DER KNAAP, W. P.; LOKER, E. S. Immune mechanisms in trematode-snail interactions. **Parasitol Today**, v. 6, n. 6, p. 175-82, Jun 1990. ISSN 0169-4758 (Print) 0169-4758 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15463334>.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol**, v. 3, n. 7, p. RESEARCH0034, Jun 18 2002. ISSN 1465-6914 (Electronic) 1465-6906 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12184808> >.

WANG, Y. et al. Structure of the guide-strand-containing argonaute silencing complex. **Nature**, v. 456, n. 7219, p. 209-13, Nov 13 2008. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18754009> >.

WEICK, E. M.; MISKA, E. A. piRNAs: from biogenesis to function. **Development**, v. 141, n. 18, p. 3458-71, Sep 2014. ISSN 1477-9129 (Electronic) 0950-1991 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25183868> >.

WINTER, J. et al. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. **Nat Cell Biol**, v. 11, n. 3, p. 228-34, Mar 2009. ISSN 1476-4679 (Electronic) 1465-7392 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19255566>.

WINTERSBERGER, U. Ribonucleases H of retroviral and cellular origin. **Pharmacol Ther**, v. 48, n. 2, p. 259-80, 1990. ISSN 0163-7258 (Print) 0163-7258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1963496> >.

WOOLHOUSE, M. E.; WEBSTER, J. P. In search of the red queen. **Parasitol Today**, v. 16, n. 12, p. 506-8, Dec 2000. ISSN 0169-4758 (Print) 0169-4758 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11121843> >.

XIOL, J. et al. RNA clamping by Vasa assembles a piRNA amplifier complex on transposon transcripts. **Cell**, v. 157, n. 7, p. 1698-711, Jun 19 2014. ISSN 1097-4172 (Electronic) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24910301> >.

YI, R. et al. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. **Genes Dev**, v. 17, n. 24, p. 3011-6, Dec 15 2003. ISSN 0890-9369 (Print) 0890-9369 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14681208> >.

YIGIT, E. et al. Analysis of the *C. elegans* Argonaute family reveals that distinct Argonautes act sequentially during RNAi. **Cell**, v. 127, n. 4, p. 747-57, Nov 17 2006. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17110334> >.

YOU, H.; MCMANUS, D. P. Vaccines and diagnostics for zoonotic schistosomiasis japonica. **Parasitology**, p. 1-19, Oct 31 2014. ISSN 1469-8161 (Electronic) 0031-1820 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25359506> >.

ZAHOOR, Z. et al. Differences in the gene expression profiles of haemocytes from schistosome-susceptible and -resistant *Biomphalaria glabrata* exposed to *Schistosoma mansoni* excretory-secretory products. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e93215, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24663063> >.

ZHANG, C. Novel functions for small RNA molecules. **Curr Opin Mol Ther**, v. 11, n. 6, p. 641-51, Dec 2009. ISSN 2040-3445 (Electronic) 1464-8431 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20072941> >.

ZHANG, H. et al. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. **Cell**, v. 118, n. 1, p. 57-68, Jul 9 2004. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15242644> >.