

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

ESTUDO FUNCIONAL DE PROTEÍNAS DA FAMÍLIA DAS GELSOLINAS DE
Schistosoma mansoni

Por

JULIANO MICHEL DE ARAÚJO

Belo Horizonte
2018

DISSERTAÇÃO MCS-IRR

J.M. ARAÚJO

2018

Juliano Michel de Araújo

ESTUDO FUNCIONAL DE PROTEÍNAS DA FAMÍLIA DAS GELSOLINAS DE
Schistosoma mansoni

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde - área de concentração Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Marina Moraes Mourão
Coorientação: Rosiane Aparecida da Silva Pereira

Belo Horizonte
2018

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do IRR
CRB/6 1975

A663e Araújo, Juliano Michel de.
2018

Estudo funcional de proteínas da família das gelsolinas de *Schistosoma mansoni* / Juliano Michel de Araújo – Belo Horizonte, 2018.

XII, 84 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 76 – 84

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. *Schistosoma mansoni* 2. RNAi 3. Gelsolina I. Título. II. Mourão, Marina de Moraes (Orientação). III. Silva Pereira, Rosiane Aparecida da (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.963

Juliano Michel de Araújo

ESTUDO FUNCIONAL DE PROTEÍNAS DA FAMÍLIA DAS GELSOLINAS DE
Schistosoma mansoni

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde - área de concentração Biologia Celular e Molecular.

Banca Examinadora

Dra. Marina de Moraes Mourão (IRR- FIOCRUZ MINAS) Presidente

Dr. Wander de Jesus Jeremias (IRR- FIOCRUZ MINAS) Titular

Dr. William de Castro Borges (UFOP) Titular

Dr. Élio Hideo Babá (IRR- FIOCRUZ MINAS) Suplente

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 28 de fevereiro de 2018.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por mais uma conquista e por ter me sustentado nessa longa caminhada.

À minha querida esposa que vivenciou toda esta trajetória e que me deu apoio e suporte nos momentos decisivos.

À Dra. Marina de Moraes Mourão por todo o suporte técnico, orientação e pelas diversas oportunidades de crescimento.

À Dra. Rosiane A. S. Pereira pelos ensinamentos e pela dedicação principalmente nesse final de trabalho.

À aluna de iniciação científica Isabela T.S. Dutra pela ajuda, força e principalmente a amizade.

Ao Dr. Omar dos Santos Carvalho por toda a infraestrutura do laboratório HMM que foi determinante neste trabalho.

Aos Drs. Cristiano Massara, Roberta Caldeira, Cristiane Lafetá e a Lídia Ferreira pela amizade e excelente convivência no laboratório.

À Sandra Grossi a quem sou eternamente grato por todos os ensinamentos, pela convivência amiga e por sua disponibilidade em sempre nos ajudar.

Às alunas de Doutorado Izabela Cristina, Naiara Clemente e Fernanda Sales pela ajuda em muitas ocasiões de dificuldades e pelos momentos de descontração que não foram poucos.

Aos ICs Felipe Lunkes, João Henrique, Clara Ênia e Ana Alice pela amizade e por proporcionar um ambiente agradável e prazeroso.

À Amanda Domingues, Cíntia Marília e Núbia por todo auxílio, apoio e pela amizade.

Ao IC. Pedro Paim pela confiança e colaboração no início desse trabalho.

À Dra. Cristina Fonseca (BIP) pelo apoio na pesquisa e por disponibilizar toda a estrutura do laboratório.

Aos amigos Patrícia, Rafaela, Gabriela e Poliane por toda ajuda, consideração e pelos momentos de alegria que passamos.

À Neuza Araújo e a Suelene pelas perfusões que foram fundamentais ao trabalho.

Aos amigos do Ibesq Áureo e Jussara pela amizade e companheirismo.

Aos laboratórios Moluscário, as plataformas, Prorec e suas equipes por todo apoio.

RESUMO

Técnicas de genética reversa como RNA de interferência (RNAi) são um conjunto de ferramentas poderosas utilizadas em caracterizações funcionais. Essas técnicas têm sido aplicadas na identificação e validação de proteínas de *Schistosoma mansoni*, possibilitando uma melhor compreensão da interação hospedeiro-parasito e a identificação de alvos vacinais e de drogas. Proteínas imunorreativas a soro de indivíduos infectados e não infectados, ou naturalmente resistentes, de área endêmica para esquistossomose foram identificadas, dentre elas, proteínas da família das gelsolinas. Em alguns organismos as gelsolinas desempenham funções na regulação dos filamentos de actina que participam na formação do citoesqueleto, motilidade celular e estimulação da apoptose. Devido a importância das gelsolinas, elas foram escolhidas para caracterização por RNAi. Os níveis de transcritos e proteínas foram analisados nas diferentes fases do ciclo de vida do *S. mansoni* e também em esquistossômulos silenciados, nesses, também foi feita a análise de fenótipo. O papel das gelsolinas na interação parasito-hospedeiro foi estudado através da infecção de camundongos com parasitos silenciados. Sua localização foi determinada e níveis proteicos também foram acessados por imunofluorescência. Os resultados mostraram que os genes são mais expressos em vermes adultos fêmeas e, a proteína, é expressa em todas as fases do ciclo de vida do verme sendo mais abundante nas fases de cercária e esquistossômulo. Foi constatada uma distribuição difusa das gelsolinas por todo o esquistossômulo e co-localização com filamentos de actina, principalmente no tegumento. Assim, é possível que gelsolinas de *S. mansoni* estejam envolvidas em mecanismos de organização do citoesqueleto. Seis dias depois do tratamento com dsRNA foram verificados os níveis de silenciamento dos transcritos para esquistossômulos expostos à dsRNA-gelsolina (77%), vilina (93%) e para ambos, gel/vil (71%-gel e 89%- vil). A análise por densitometria óptica das bandas mostrou que esquistossômulos expostos ao dsRNA-gelsolina, -gelsolina/vilina e -vilina não apresentaram diminuição nos níveis proteicos em relação aos parasitos tratados com dsRNA-GFP, apesar de que em ensaio de imunofluorescência, esquistossômulos silenciados para os mesmos genes apresentaram uma diminuição na intensidade de fluorescência, respectivamente de: 9,9%, 11,9% e 39,1%.

O fenótipo e viabilidade permaneceram inalterados para todos os tratamentos. Camundongos infectados com esquistossômulos silenciados foram perfundidos e não houve relação entre número de vermes e número de ovos retidos no fígado e intestino. Este trabalho traz importantes conhecimentos acerca da expressão de gelsolina e vilina nas diferentes fases

do ciclo de vida de *S. mansoni*, suas localizações e entendimento sobre a importância destas proteínas no desenvolvimento do parasito. É necessário ressaltar a importância de estudos de caracterização funcional de genes na era pós-genômica, uma vez que, até hoje; há poucas proteínas caracterizadas em *S. mansoni*.

Palavras Chave: *Schistosoma mansoni*, RNAi, Gelsolina

ABSTRACT

Reverse genetics techniques, such as RNA interference (RNAi), are a powerful set of tools for functional characterization. The application of those techniques in the identification and validation of proteins of the *Schistosoma mansoni*, enables a better comprehension of the host-parasite interaction and the identification of vaccines and drugs. Serum immunoreactive proteins from infected and uninfected or naturally resistant, individuals from endemic area for schistosomiasis were identified, among those, proteins from the gelsolin family. In some organisms, gelsolins play roles in the regulation of actin filaments that participate in the cytoskeleton formation, cellular motility and apoptosis stimulation. Due to gelsolin importance, they are chosen for characterization using RNA interference. The levels of transcripts and proteins were analyzed in the different phases of the life cycle of the *S. mansoni* and also in knockdown schistosomule, in these; a phenotypic analysis was also carried out. The role of gelsolins in the host-parasite interaction was studied by the infection of mice with knockdown parasites. Its location was determined and proteins levels were also assessed by immunofluorescence. The results evidenced that both genes are more expressed in female adult worms and, the proteins, are present in all phases of the parasite life cycle, being more abundant in cercariae and schistosomule. The localization of gelsolins was determined by immunofluorescence and was verified the diffuse distribution throughout the schistosomule and co-localization with actin filaments, especially in the tegument. Thus, it is possible that the *S. mansoni* gelsolins are involved in mechanisms of cytoskeleton organization. Six days after dsRNA exposure, transcriptional levels of knockdown parasites were verified for schistosomules exposed to dsRNA-gelsolin (77%), vilin (93%) and, for both, gel/vil (71% -gel and 89% -vil). The analysis of the optical densitometry of the bands showed that schistosomules exposed to dsRNA-gelsolin, -gelsolin / vilin and -vilin presented no decrease in protein levels in comparison to parasites treated with dsRNA-GFP, although in immunofluorescence assays, schistosomules knockdown for those genes showed a decrease in fluorescence intensity, respectively: 9.9% (gelsolin), 11.9% (vilin) and 39.1% (both), respectively.

The phenotype and viability remained unchanged for all treatments. Mice infected with knockdown schistosomule were perfused and there was no correlation between number of worms and number of eggs retained in the liver and intestine. This work presents important knowledge regarding the expression of gelsolin and vilin in the different life stages of the *S. mansoni*, their localization and understanding of the importance of these proteins in the

parasite development. It is necessary to emphasize the importance of gene functional characterization studies in the post-genomic era, since, up to now; there are few characterized proteins in the *S. mansoni*.

Key Words: *Schistosoma mansoni*, Gelsolin and RNAi

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição global da esquistossomose em 2012.....	13
Figura 2: Prevalência observada da esquistossomose no Brasil de 2005 a 2009.....	14
Figura 3: Ciclo de vida de <i>Schistosoma mansoni</i>	16
Figura 4: Mecanismo do silenciamento gênico por RNAi	26
Figura 5: Representação esquemática da estrutura da gelsolina humana.....	27
Figura 6: Ilustração do mecanismo de ligação da gelsolina à actina.....	29
Figura 7: Padronização dos iniciadores dos genes constitutivos.....	47
Figura 8: Padronização dos iniciadores de gelsolina e vilina.....	48
Figura 9: Análise comparativa dos níveis de transcritos de gelsolina e de vilina nas diferentes fases de <i>Schistosoma mansoni</i>	49
Figura 10: Níveis de expressão das gelsolinas nas diferentes fases de <i>Schistosoma mansoni</i> .	50
Figura 11: Imunolocalização da proteína gelsolina em esquistossômulos.....	53
Figura 12: Imunolocalização da gelsolina em esquistossômulos utilizando a sonda TO-PRO3	54
Figura 13: Análise da qualidade dos dsRNA-gelsolina, -vilina e -GFP sintetizados <i>in vitro</i> .	55
Figura 14: Níveis de transcritos de gelsolina e vilina em esquistossômulos mantidos na presença de dsRNAs por até 7 dias.....	58
Figura 15: Níveis de transcritos de gelsolina e vilina em esquistossômulos após 6 dias de exposição aos dsRNAs	60
Figura 16: Determinação da viabilidade de esquistossômulos silenciados.....	61
Figura 17: Avaliação fenotípica de esquistossômulos expostos aos dsRNAs por 6 dias.....	62
Figura 18: Área da superfície corporal dos esquistossômulos expostos por 6 dias com dsRNA-GFP, -gelsolina, -vilina e -gelsolina/-vilina	63
Figura 19: Níveis de expressão das gelsolinas em esquistossômulos após 6 dias de exposição aos dsRNAs	65
Figura 20: Comparação da sequência de aminoácidos das gelsolinas humana e de <i>Schistosoma mansoni</i>	66
Figura 21: Detecção de proteínas da família de gelsolina de <i>Schistosoma mansoni</i> por imunofluorescência em esquistossômulos silenciados.....	68
Figura 22: Número de vermes adultos recuperados de camundongos infectados com esquistossômulos silenciados.....	71

Figura 23: Número de ovos no fígado de camundongos infectados com esquistossômulos silenciados.....	72
Figura 24: Número de ovos no intestino de camundongos infectados com esquistossômulos silenciados.....	73

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Sequência dos iniciadores utilizados para a amplificação do cDNA molde para a síntese dos dsRNAs.....	34
Quadro 2: Sequência dos iniciadores utilizados nos experimentos de RT-qPCR.....	35

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ago2 – argonauta 2
cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar
Ct – *Threshold cycle*
dNTP – Deoxiribonucleotídeos
dsRNA – RNA de fita dupla
g – Gravidade
GAPDH – gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase
GFP – *Green Fluorescent Protein*
IRR – Instituto René Rachou
kDa – Quilodalton
MEM – *Minimum Essential Medium*
mL – Mililitro
mRNA – RNA mensageiro
nM – Nanomolar
°C – Graus Celsius
OD – Densidade óptica
pb – Pares de base
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
PZQ – Praziquantel
qRT-PCR – *Reverse transcription PCR*
RISC – *RNA-induced silencing complex*
RNAi – RNA de interferência
RNAseq – Sequenciamento de RNA
siRNA – Pequeno RNA de interferência
 Δ Ct – Variação de *threshold cycle*
 $\Delta\Delta$ Ct – Variação da variação do Ct
 μ L – Microlitro
 μ m² – Micrômetros quadrados

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. A esquistossomose no mundo e no Brasil.....	12
1.2. Ciclo biológico de <i>Schistosoma mansoni</i>	14
1.3. Patologia da doença.....	17
1.4. Diagnóstico	188
1.5. Tratamento	19
1.6. Busca por alvos vacinais	20
1.7. Proteoma	23
1.8. RNA de interferência (RNAi).....	244
1.9. Gelsolina e vilina - Proteínas ligadoras de actina	277
2. JUSTIFICATIVA.....	31
3. OBJETIVOS.....	32
3.1. Objetivo geral.....	32
3.2. Objetivos específicos	32
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1. Declaração de ética no uso de animais.....	33
4.2. Desenho dos iniciadores utilizados para síntese de dsRNA e RT-qPCR.....	33
4.3. Síntese de RNAs de fita dupla	36
4.4. Exposição dos parasitos aos dsRNAs	37
4.4.1. Grupos experimentais	37
4.4.2. Obtenção dos esquistossômulos.....	37
4.4.3. Exposição dos esquistossômulos aos dsRNAs	38
4.5. Quantificação do nível dos transcritos de gelsolina e vilina em esquistossômulos silenciados.....	38
4.5.1. Extração de RNA total de esquistossômulos.....	38
4.5.2. Tratamento e purificação do RNA	39
4.5.3. Quantificação do RNA	39
4.5.4. Síntese de cDNA.....	39
4.5.5. PCR quantitativo em Tempo Real.....	40
4.6. Análises fenotípicas de esquistossômulos expostos aos dsRNAs.....	40
4.7. Análise por imunofluorescência dos esquistossômulos expostos aos dsRNAs	41
4.8. Quantificação da expressão das gelsolinas em esquistossômulos silenciados	42
4.9. Quantificação do nível dos transcritos de gelsolina e vilina nas diferentes fases do ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i>	43
4.10. Quantificação da expressão das gelsolinas nas diferentes fases do ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i>	43
4.11. Infecção de camundongos com esquistossômulos silenciados.....	44

4.11.1. Contagem do número de ovos retidos no fígado e intestino	45
4.11.2. Oograma de fragmento do intestino	45
5. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	46
5.1. Padronização dos iniciadores utilizados nos ensaios de RT-qPCR	46
5.2. Caracterização da expressão de gelsolina e vilina em <i>Schistosoma mansoni</i>	49
5.2.1. Análise de expressão gênica ao longo do ciclo de vida do parasito....	49
5.2.2. Análise de expressão proteica ao longo do ciclo de vida do parasito...	50
5.3. Imunolocalização das gelsolinas de <i>Schistosoma mansoni</i>	51
5.4. Caracterização funcional das proteínas gelsolina e vilina por RNAi.....	54
5.4.1. Síntese de dsRNAs.....	55
5.4.2. Cinética de silenciamento de gelsolina e vilina em esquistossômulos tratados com dsRNAs	56
5.5. Investigação do papel biológico de gelsolina e vilina - Experimentos <i>in vivo</i>	58
5.6. Análises fenotípicas de esquistossômulos silenciados.....	60
5.6.1. Viabilidade.....	60
5.6.2. Morfologia dos esquistossômulos silenciados	61
5.6.3. Análise dos níveis proteicos das gelsolinas em parasitos silenciados...	64
5.7. Recuperação de vermes e contagem de números de ovos.....	69
5.8. Avaliação do desenvolvimento dos ovos (oograma)	74
6. CONCLUSÕES	74
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

1. INTRODUÇÃO

1.1. A esquistossomose no mundo e no Brasil

A esquistossomose está presente em 78 países distribuídos, principalmente, nas regiões tropicais e subtropicais, cuja população tem acesso restrito à água tratada e ao saneamento básico. É considerada a segunda doença parasitária mais prejudicial socioeconomicamente do mundo (WHO, 2009). A transmissão da esquistossomose é relacionada, além das condições sanitárias, à presença do hospedeiro intermediário, moluscos do gênero *Biomphalaria*, *Oncomelania* e *Bulinus*, respectivamente vetores dos parasitos *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum* e *Schistosoma haematobium*. Estima-se que cerca de 207 milhões de pessoas se encontram infectadas no mundo e mais de 600 milhões correm o risco de contraírem a doença, sendo que 90% dessas pessoas vivem no continente africano (STEINMANN et al., 2006) (Figura 1).

Por ser uma doença negligenciada relacionada a países pobres, raramente existem relatos de casos em países desenvolvidos (GROBUSCH et al., 1999). No entanto, foi descrita recentemente a situação da esquistossomose na Europa e há relatos de pacientes franceses e alemães diagnosticados com a doença (HOLTFRETER et al., 2014), bem como o estabelecimento da infecção no continente (KINCAID-SMITH et al., 2017). Diante desse cenário, especialistas se encontram incapazes de traçar um prognóstico futuro da doença na Europa.

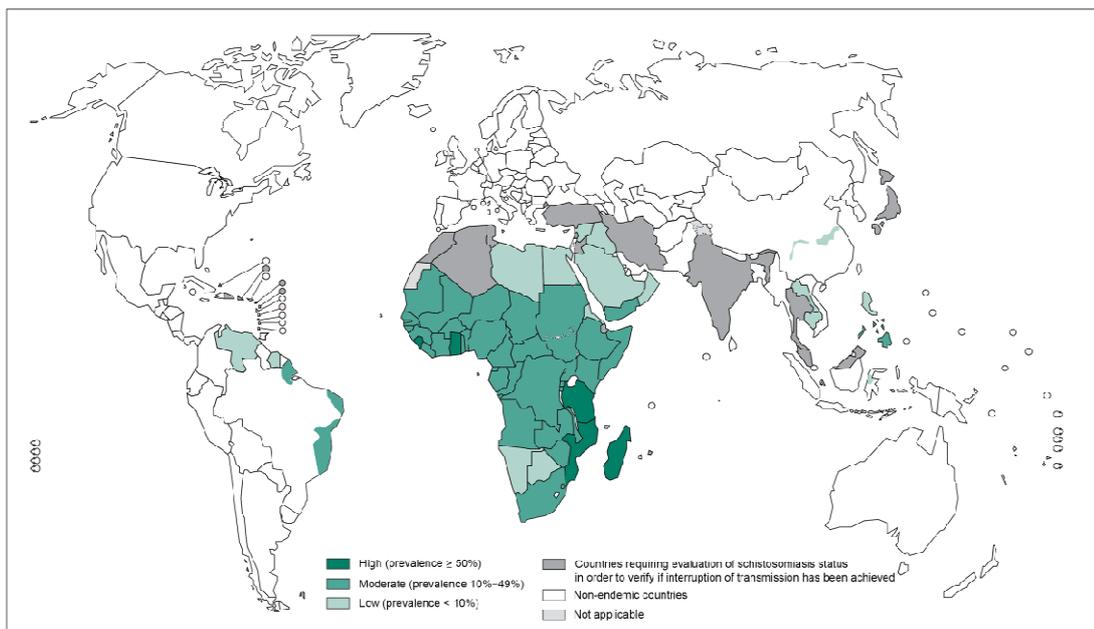


Figura 1: Distribuição global da esquistossomose em 2012. Em verde escuro, países com alta prevalência. Em verde mais claro, com moderada prevalência e em verde claro, com baixa prevalência da esquistossomose. Em cinza escuro, países que necessitam de avaliação sobre o *status* da esquistossomose a fim de verificar se a interrupção da transmissão foi alcançada. Em branco, países que não são de área endêmica. Cinza claro, não aplicável. Fonte: <http://www.who.int/schistosomiasis/en/>

No Brasil a esquistossomose está presente em quase todos os estados da federação afetando cerca de seis milhões de pessoas e outras vinte e cinco milhões vivem em áreas de alto risco de transmissão (WHO, 2009), sendo ainda uma doença negligenciada e de grande problema de saúde pública (KATZ e PEIXOTO, 2000). A maior prevalência da doença e consequentemente o maior número de mortes se encontram nas áreas altamente endêmicas para esquistossomose ao longo da costa leste da região Nordeste do Brasil, particularmente nos estados de Alagoas, Pernambuco, Sergipe e Bahia e estendendo-se para o Norte dos estados de Minas Gerais e Espírito Santo no Sudeste do país (Figura 2). Isto se deve ao fato de estas áreas apresentarem condições ecológicas e geográficas favoráveis como: presença e proliferação do hospedeiro intermediário, condições de vida precária e saneamento inadequado (RESENDES; SOUZA-SANTOS e BARBOSA, 2005).

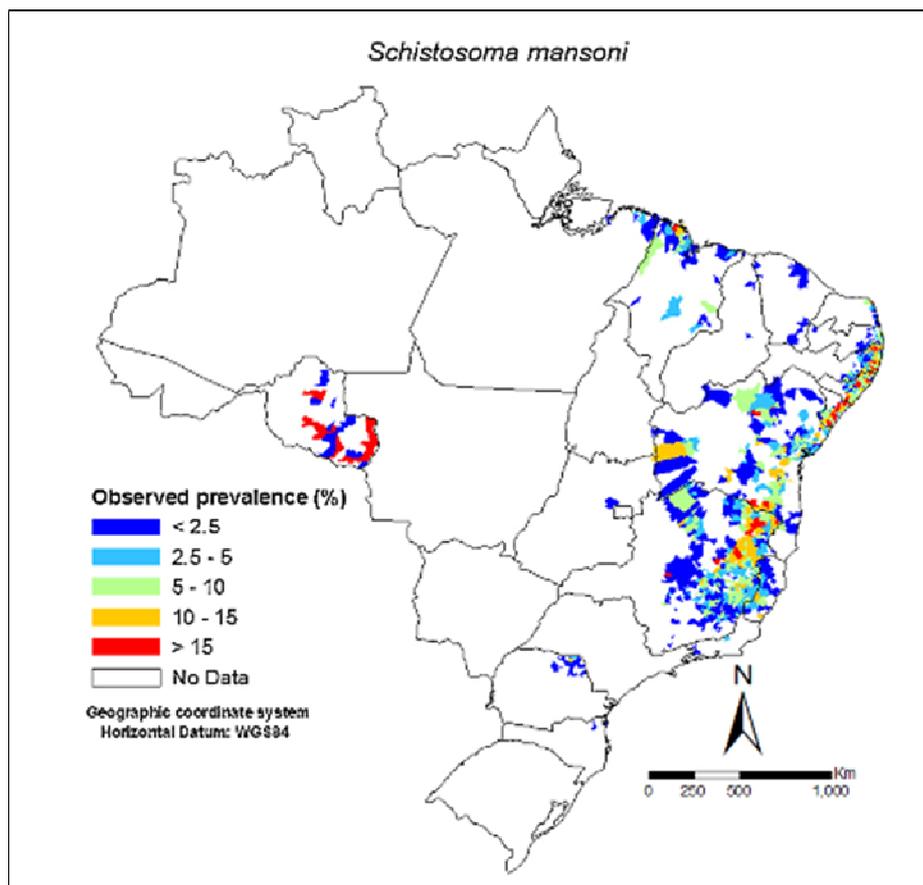


Figura 2: Prevalência observada da esquistossomose no Brasil de 2005 a 2009. O mapa mostra áreas de mais baixa prevalência, em azul, até áreas de alta prevalência (acima de 15%), em vermelho. Fonte: SCHOLTE et al., 2014.

1.2. Ciclo biológico do *Schistosoma mansoni*

O ciclo de vida do *S. mansoni* envolve duas fases: uma no hospedeiro definitivo vertebrado, no qual ocorre a reprodução sexuada, e outra no hospedeiro intermediário invertebrado, no qual ocorre a reprodução assexuada.

Esta espécie desenvolve sua fase adulta como parasito da luz dos vasos sanguíneos do homem ou de outros mamíferos habitando as vênulas do plexo hemorroidário superior e as ramificações mais finas das veias mesentéricas, particularmente da mesentérica inferior, onde as fêmeas põem seus ovos (JORDAN, 1988).

Os ovos levam cerca de uma semana para tornarem-se maduros e para que parte deles atravesse a mucosa intestinal. Ao atravessarem a mucosa, caem na luz do intestino de

onde serão eliminados nas fezes. Os prováveis fatores que promovem esta passagem pela parede do intestino são:

- 1- reação inflamatória: um processo importante, já que em animais imunossuprimidos ocorre acúmulo de ovos nas paredes intestinais;
- 2- pressão dos ovos colocados posteriormente (pressão física);
- 3- enzimas proteolíticas produzidas pelo miracídio, causando lesão aos tecidos (KLOETZEL, 1967);
- 4- adelgaçamento da parede do vaso, provocado pela distensão do mesmo com a presença do casal na sua luz;
- 5- perfurações da parede venular já debilitada pelos fatores acima citados.

Os ovos eliminados pelo hospedeiro através das fezes eclodirão caso encontrem condições adequadas como: água fresca com temperatura morna, baixa hipotonicidade e iluminação adequada, liberando assim o miracídio de dentro da casca do ovo. Os miracídios que eclodirem, ao encontrar os hospedeiros intermediários, penetram por movimentos rotatórios e ação lítica e vão se alojar em diversos tecidos do molusco. Estes se transformam em esporocistos que, por poliembrionia, geram esporocistos filhos e depois cercárias. Várias gerações de esporocistos podem suceder-se em várias cercárias (KING, 2015).

A saída das cercárias do hospedeiro intermediário é induzida pela luz. Portanto a liberação ocorre preferencialmente nas horas mais claras do dia. Quando madura, a cercária sai do caramujo para a água, estando apta a infectar hospedeiros vertebrados. Quando encontram um hospedeiro apropriado, as cercárias penetram pela sua pele ou mucosa liberando a cauda. A capacidade invasora das larvas depende de um esforço mecânico e da ação química exercida pela secreção de proteases pelas glândulas cefálicas de penetração. Após penetrar, a cercária começa a passar por mudanças na conformação da membrana, que se torna heptalaminada, e no metabolismo, que se torna principalmente anaeróbio (ROLLINSON e SIMPSON, 1987). Inicia-se o processo de transformação em esquistossômulos. Alguns esquistossômulos são detidos pelo sistema imunológico do hospedeiro na pele. Aqueles que não forem destruídos caem na circulação geral e vão para o coração em 5 dias tornando-se mais longos e delgados, o que facilita a sua migração através da rede vascular pulmonar. Do pulmão, os esquistossômulos voltam ao coração e são enviados pela circulação geral a todas as partes do corpo do hospedeiro. Somente quando alcançam o sistema porta intra-hepático podem completar seu desenvolvimento.

Quatro semanas após a infecção, a maioria dos vermes encontra-se maduros e prontos para se acasalar. Os vermes adultos acasalam-se, deslocam-se ativamente contra a corrente circulatória do sistema porta e migram para as veias mesentéricas (BLOCH, 1980).

A fêmea é mais fina, cilíndrica e longa que o macho, existindo também diferenças fisiológicas e antigênicas entre machos e fêmeas. Ambos dependem do contato para completar a maturação (ARMSTRONG, 1965). O par está em constante associação, encontrando-se a fêmea no canal ginecóforo do macho. Alimentando-se de plasma e células do sangue a maior parte da energia das fêmeas é gasta na produção de ovos. A fêmea inicia a postura dos ovos de 4 a 6 semanas após a penetração (ABATH et al., 2006). Centenas de ovos são liberados a cada dia por casal de vermes em camundongos, sendo que este número aumenta em primatas.

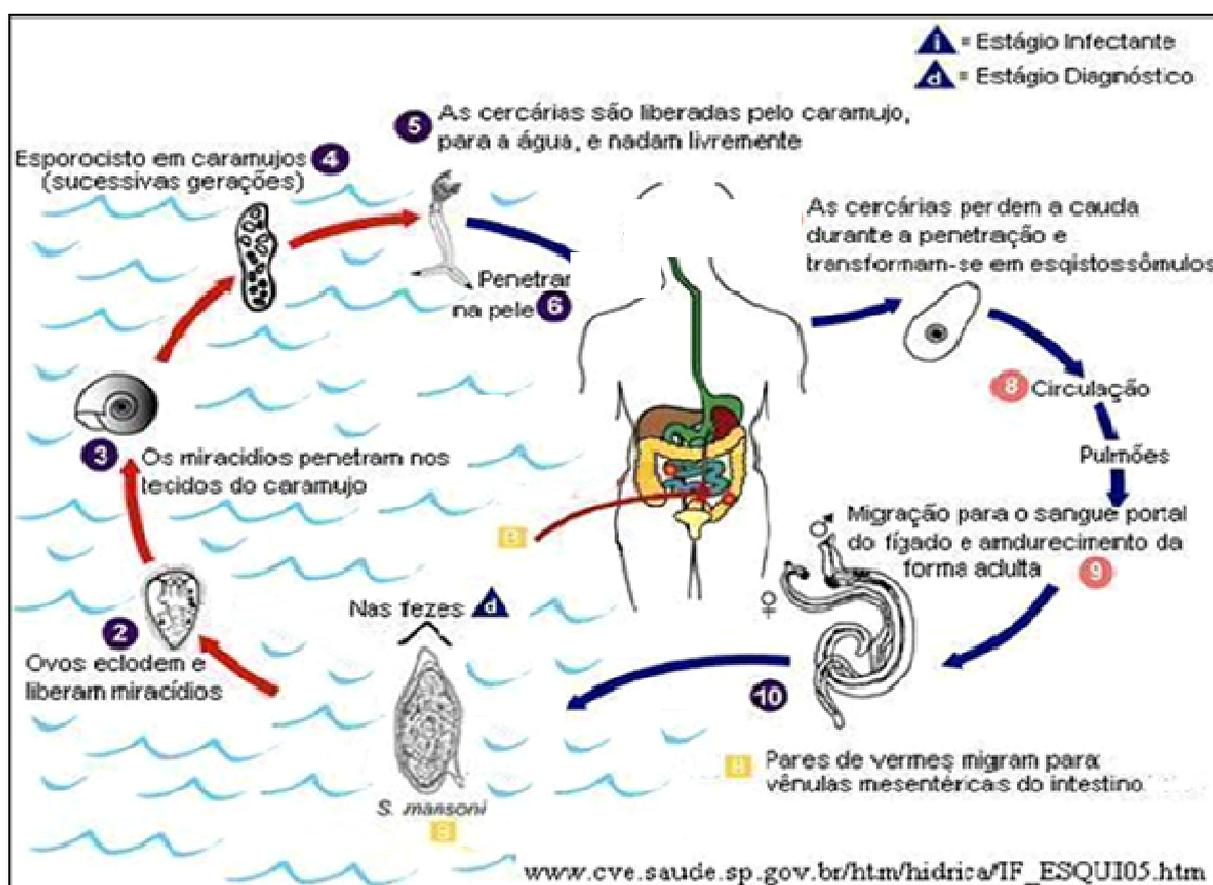


Figura 3: Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*. A figura representa o complexo ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*, evidenciando a fase de reprodução assexuada do hospedeiro intermediário (caramujos pertencentes ao gênero *Biomphalaria*), e a fase de reprodução sexuada do hospedeiro vertebrado (homem). Fonte: adaptado de CDC: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Schistosomiasis.htm>.

1.3. Patologia da doença

A esquistossomose pode apresentar-se sob a forma aguda e forma crônica relacionada ao estágio de desenvolvimento do parasito no hospedeiro e varia dependendo da intensidade do parasitismo e da resposta imunológica do indivíduo (COLLEY e SECOR, 2014).

A fase clínica aguda acomete, geralmente, indivíduos não residentes, provenientes de áreas endêmicas, que entram em contato com águas contaminadas por cercárias de *S. mansoni* pela primeira vez. A fase aguda inicia-se com a penetração das cercárias no hospedeiro definitivo, seguida da migração dos esquistossômulos, do estabelecimento dos vermes adultos no sistema porta e do início da ovoposição. A maioria dos sintomas apresentados durante essa fase está associada à carga parasitária e ao desenvolvimento de uma resposta imunológica exacerbada, como a eosinofilia acentuada e leucocitose, além de outros sintomas (LAMBERTUCCI, 2010). Algumas manifestações podem surgir tardiamente, coincidindo com o começo da eliminação de ovos nas fezes. Os casos agudos podem apresentar-se assintomáticos, e paradoxalmente, podem desencadear um quadro invasivo com distribuição sistêmica de ovos.

A fase crônica se instala aproximadamente quatro meses após a exposição (Haas et al., 2002). A doença acomete diferentes órgãos, incluindo intestino, fígado, baço e até mesmo o sistema nervoso central e está associada ao aprisionamento de um grande número de ovos nos tecidos do hospedeiro e à formação de granulomas. O granuloma é uma consequência da reação inflamatória aos ovos que não foram excretados nas fezes e ficam retidos no parênquima hepático e nos tecidos do hospedeiro. As lesões no fígado podem levar a um quadro de fibrose periportal que pode atingir diferentes graus de intensidade, desencadeando alterações hepáticas e esplênicas (ANDRADE, 2009). A forma branda acontece em 90% dos casos e geralmente está relacionada com baixa carga parasitária e apresenta reação inflamatória granulomatosa de menor intensidade no fígado e intestino. Uma pequena porcentagem evolui para as formas crônicas mais graves: hepatointestinal e hepatoesplênica (CALDAS et al., 2008). Os sintomas mais comuns da forma intestinal são dores abdominais crônicas ou intermitentes, perda de apetite e diarreia. As formas hepáticas estão associadas a uma infecção duradoura, de alta intensidade, com fibrose severa e com consequente oclusão da veia-porta, hipertensão-portal, esplenomegalia, circulação venosa colateral e varizes gastro-intestinais podendo levar à morte (GRYSEELS et al., 2006). As lesões do sistema

nervoso central são devidas à localização ectópica dos ovos, sendo a mielorradiculopatia esquistossomótica a forma mais grave (FERRARI e MOREIRA, 2011).

A maioria das pessoas com esquistossomose no Brasil não apresentam as formas graves, e sim lesões mais brandas, apresentando problemas de crescimento, anemia, dor abdominal, intolerância a exercícios, baixo desempenho escolar e reduzida capacidade de trabalhar (ROLLINSON et al., 2013).

1.4. Diagnóstico

A esquistossomose apresenta diversas formas clínicas que se assemelham a outras patologias, em função das variadas manifestações clínicas da doença que ocorrem durante sua evolução no hospedeiro definitivo. Sendo assim, um diagnóstico específico é de suma importância para que não se confunda com outras enfermidades.

Considerando o extenso espectro clínico da doença, o diagnóstico é feito por meio de exames laboratoriais e informações complementares que auxiliem no diagnóstico da doença nesses pacientes.

Os métodos diagnósticos atualmente disponíveis dividem-se em dois grupos, métodos diretos e métodos indiretos. O método direto consiste na visualização de ovos de *S. mansoni* nas fezes ou na identificação de antígenos circulantes do parasito. A técnica de Kato-Katz consiste na detecção de ovos presentes nas fezes, é a mais utilizada pelos programas de controle por ser de baixo custo, pela sua praticidade e por permitir quantificar a intensidade da infecção. Porém apresenta limitações quando o indivíduo possui baixa carga parasitaria, além de possuir baixa reprodutibilidade quando se examinam lâminas diferentes do mesmo indivíduo (GENTILE et al., 2011).

Os métodos indiretos são baseados em mecanismos imunológicos, envolvendo reação de antígeno-anticorpo (JIN et al., 2010). Estes métodos, quando positivos, não indicam obrigatoriamente a infecção por *S. mansoni* devido à permanência de anticorpos por muitos anos no indivíduo infectado, mesmo após a cura da infecção. Além disso, pode ocorrer reação cruzada de anticorpos, principalmente contra antígenos de outros helmintos. Um dos métodos indiretos utilizados é o ensaio imunoenzimático (ELISA), que consiste na detecção de antígenos do *Schistosoma* por anticorpos específicos. Como antígeno pode ser utilizada uma preparação de antígenos solúveis de ovos (SEA), a qual apresenta quantidades limitadas de

antígenos solúveis, e a preparação de antígenos solúveis de vermes adultos (SWAP), que contém maior quantidade de antígenos, também solúveis (CARVALHO; COELHO; LENZI, 2008). O teste imunológico comercialmente disponível e de grande importância é o POC-CCA (*Point-of-care*-antígeno catódico circulante). Este teste é utilizado para detecção do antígeno catódico circulante encontrado em amostras de urina e que quando é liofilizada, ou seja, concentrada, a sensibilidade do teste aumenta e a reação cruzada com antígenos de outros helmintos diminui. O teste se resume em pingar gotas de urina sob o material de teste e o aparecimento de uma linha vermelha indica a presença de antígenos do verme. Ao avaliar a sensibilidade, em comparação com o teste de Kato-Katz, o POC-CCA se mostrou mais sensível (COLLEY et al., 2013). Porém em regiões de baixa endemicidade a sensibilidade do POC-CCA foi questionada. Portanto, a utilização desse teste não seria para substituir os testes parasitológicos, principalmente os de fezes, e sim como teste complementar (ALLAM, 2006).

1.5. Tratamento

O Praziquantel (PZQ) é a única droga disponível para o tratamento da esquistossomose. É efetiva contra todas as espécies de *Schistosoma* e tem sido usada em tratamentos individuais e em massa. O mecanismo pelo qual o PZQ atua não é totalmente entendido. O mesmo é considerado um agonista do canal Ca^{2+} interrompendo a interação das subunidades $\alpha 1$ e β , o que permite que mais canais de Ca^{2+} se abram levando à perda da homeostase (MEYER et al., 2009). A droga afeta tanto os vermes machos quanto as fêmeas, provocando alterações no tegumento (REDMAN et al., 1996) e redução na concentração de glutatona no verme (RIBEIRO et al., 1998). A glutatona é um tripeptídeo de suma importância para a sobrevivência da célula, estando envolvida em processos vitais, como a síntese do DNA e proteínas, atividade enzimática, transporte e proteção contra oxidação (MEISTER e ANDERSON, 1983).

O tegumento do *S. mansoni* é uma estrutura de grande importância para a sobrevivência dos vermes, uma vez que está envolvido na absorção de nutrientes, na secreção de metabólitos, no equilíbrio osmótico dos vermes e na defesa contra o sistema imunológico do hospedeiro. Deformações no tegumento, causadas pela droga, podem ser vistas tanto no verme macho quanto na fêmea. Nos machos há presença de vacúolos do lado interno para o externo da camada sincicial (MEHLHORN et al., 1981), já nas fêmeas as camadas subtegumentares são mais afetadas. Em adição, a exposição de moléculas antigênicas, devido

à instabilidade do tegumento, propicia a ação de células de defesa do hospedeiro resultando em lesão e morte do parasito (HARNETT e KUSEL, 1986).

Entretando, a quimioterapia com PZQ como estratégia para o controle da doença revelou-se ineficaz na interrupção da transmissão em áreas endêmicas, tendo pouco efeito na re-infecção e na redução da endemia. Conseqüentemente, a necessidade de tratamentos sucessivos se mantém. Atualmente, há uma grande preocupação com o desenvolvimento de resistência do parasito ao PZQ, uma vez que cepas resistentes já foram identificadas (ALMEIDA et al., 2016). Sendo assim, intervenções devem ser realizadas rapidamente para prevenir a propagação de linhagens resistentes, principalmente nas regiões endêmicas para a esquistossomose (MENDONÇA et al., 2016).

Portanto, além do desenvolvimento de novas drogas, torna-se necessário buscar medidas de controle complementares, tais como a vacinação, medidas de controle do molusco hospedeiro e também um teste de diagnóstico sensível (BERGQUIST et al., 2005). Considera-se que seja possível obter uma vacina eficiente contra esquistossomose, uma vez que a imunização de animais experimentais com cercárias irradiadas foi capaz de induzir até 90% de proteção em camundongos (LI HSÜ et al., 1981).

1.6. Busca por alvos vacinais

O parasito *S. mansoni* não se replica no hospedeiro mamífero. Portanto, uma redução parcial da carga parasitária seria eficiente para o controle da doença, fortalecendo o argumento de que uma vacina pode ser um método de controle eficaz da esquistossomose (HEWITSON e MAIZELS, 2014). A vacinação contra *Schistosoma* pode ser direcionada para a prevenção da infecção e/ou para a redução da fecundidade parasitária. Uma redução no número de vermes seria o "padrão-ouro" esperado para o desenvolvimento de uma vacina, sendo o esquistossômulo o principal alvo da vacina, por ser o primeiro estágio a entrar em contato com o sistema imunológico do hospedeiro.

A imunização com cercária atenuada por raio-x ou raios-gama promoveu altos níveis de proteção em modelo murino e em outros organismos, como: chimpanzés (EBERL et al., 2001) e babuínos (KARIUKI et al., 2006). O mecanismo de ação dessa vacina ainda não foi completamente esclarecido, mas uma hipótese é que esteja associada a um retardo na migração e desenvolvimento do esquistossômulo atenuado. Desta forma os parasitos estariam expostos por mais tempo ao sistema imunológico do hospedeiro, que reconheceria antígenos

essenciais para sobrevivência do verme e, assim, pudesse montar uma resposta imune protetora (JONES et al., 2008).

Portanto, a busca por antígenos que sejam imunogênicos e que possam ser usados em formulações vacinais ainda está em andamento. Vários antígenos estão sendo estudados, porém poucos alcançaram as fases de testes clínicos. A grande maioria dos estudos visa o desenvolvimento de vacinas compostas por antígenos nativos purificados, por antígenos recombinantes ou por DNA (ALVES et al., 2015).

Vários antígenos testados como candidatos à vacina não tem induzido proteção acima de 50% sendo relacionado possivelmente à instabilidade do antígeno e à necessidade de formulações adjuvantes padronizadas e efetivas (BERGQUIST; LEONARDO e MITCHELL, 2005). Dentre os antígenos promissores amplamente testados, estão: glutational-*S*-transferase 28 [Sm28-GST], paramiosina, Ir-V5, triosefosfato isomerase, Sm23, e Sm14. Destes seis antígenos, apenas o Sm23 é exposto na superfície da membrana apical do parasita (WRIGHT et al., 1991), embora não seja uma das proteínas de membrana apical mais abundantes na superfície do parasito (BRASCHI e WILSON, 2006). A dificuldade de se produzir uma vacina eficaz contra o parasito pode ser atribuída aos complexos mecanismos de evasão utilizados para driblar a ação do sistema imunológico do hospedeiro e migrar para o sistema porta (PEARCE e MACDONALD, 2002).

O *S. mansoni* não possui uma via dependente de oxigênio para a síntese de esteróis e ácidos graxos. Portanto, este parasito é inteiramente dependente do hospedeiro mamífero para fornecer esses lipídios essenciais. Os parasitos usam proteínas de ligação de ácidos graxos para absorver, transportar e compartimentar ácidos graxos do hospedeiro e, por causa desta função biológica, a Sm14 tem sido considerada potencial candidata à vacina (TENDLER e SIMPSON, 2008). A utilização da Sm14 na sua forma recombinante foi capaz de reduzir em 67% a carga parasitária em camundongos *Swiss outbred* sem o uso de adjuvante (TENDLER et al., 1996). Devido aos resultados preliminares promissores, a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) deu início aos estudos clínicos de Fase II da vacina em parceria público-privada. É a primeira vez no mundo que uma vacina parasitária produzida com tecnologia brasileira de última geração chega à Fase II de estudos clínicos (<https://portal.fiocruz.br/pt-br/content/vacina-inedita-contr-esquistossomose-fiocruz-anuncia-nova-fase-de-estudos>).

Outras duas proteínas, Sm29 e tetraspanina-2 (TSP-2), que estão presentes no tegumento de vermes adultos e esquistossômulos, promoveram proteção de 51% e 57%, respectivamente, utilizando adjuvante de Freund (TRAN et al., 2006 e CARDOSO et al., 2008). Porém quando essas mesmas proteínas foram utilizadas como vacina de DNA com suas sequencias codificadoras inseridas em plasmídeo (pUMVC3), os níveis de redução da carga parasitária foram de 17-22% para Sm29 e de 22% para TSP-2. Quando foram avaliados os níveis de anticorpos presentes no soro dos camundongos imunizados, apenas os camundongos imunizados com pUMVC3/Sm29 e a combinação do pUMVC3/Sm29/TSP-2 apresentaram títulos elevados de IgG anti-Sm29 quando comparados com o grupo controle (pUMVC3). O mesmo não se observou no soro de camundongos imunizados com pUMVC3/TSP-2 (GONÇALVES et al., 2015).

A glutathione S-transferase é uma proteína de 28 kDa (Sm28GST) presente em *S. mansoni* e é um dos candidatos vacinais mais promissores. O Sm28-GST foi identificada no tegumento e órgãos genitais de esquistossômulos e vermes adultos (LIU et al., 1996). Esta proteína purificada foi capaz de reduzir significativamente o número de vermes, tanto em ratos quanto em camundongos, sugerindo que esta proteção pode estar relacionada à resposta citotóxica, uma vez que na presença de anticorpos anti-Sm28-GST os esquistossômulos foram mortos por meio da citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (BALLOUL et al., 1987). Um estudo realizado por Boulanger e colaboradores (1991) demonstrou que houve até 80% de proteção em babuínos imunizados com esta proteína na sua forma recombinante, na presença de hidróxido de alumínio como adjuvante.

Para o desenvolvimento de uma vacina, que seja capaz de promover proteção, é importante compreender os mecanismos imunológicos envolvidos na eliminação dos parasitos durante uma infecção. Portanto, o papel biológico que o antígeno alvo desempenha na sobrevivência do parasito e os componentes imunológicos provocados por uma formulação protetora, podem indicar quais mecanismos imunológicos devem estar envolvidos na eliminação do parasito (FONSECA et al., 2015).

A probabilidade de se obter uma vacina na próxima década não é algo impossível e a descoberta de antígenos que sejam capazes de promover proteção e reduzir a morbidade associada à doença é o objetivo final. Obviamente ainda são necessárias mais pesquisas sobre o desenvolvimento de novos veículos adjuvantes, bem como de formulações de vacinas

compostas por mais de um antígeno para aumentar os níveis de proteção alcançados (SIDDIQUI et al., 2011).

1.7. Proteoma

A proteômica, associada à espectrometria de massas e bioinformática, é uma ferramenta poderosa, utilizada para a caracterização de proteínas em larga escala. Análises utilizando essa técnica têm sido usadas para identificação de proteínas de vários organismos, inclusive nas diferentes fases do *S. mansoni*, possibilitando assim uma melhor compreensão da interação hospedeiro-parasito e a identificação de alvos vacinais (DRUMMOND et al., 2009 e LUDOLF et al., 2014).

Curwen e colaboradores (2004) utilizaram essa metodologia para estudar a biologia do *Schistosoma*. Neste trabalho, ele comparou, por meio de eletroforese bidimensional, a abundância de proteínas solúveis de *S. mansoni* ao longo do ciclo de vida do parasito, em quatro diferentes estágios, sendo eles cercárias, esquistossômulos, vermes adultos e ovos. Este tipo de análise comparativa entre estágios de vida livre pode identificar proteínas que desempenham funções específicas importantes para o desenvolvimento e para a adaptação do parasito nos diferentes ambientes.

Castro-Borges e colaboradores (2011), trabalhando com vermes de *S. mansoni* mantendo-os em cultura na presença de tripsina e também de fosfolipase C específica para fosfatidilinositol (PiPLC), identificaram proteínas provenientes tanto do parasito quanto do hospedeiro. Dentre elas destacam-se a candidata vacinal Sm29 e duas proteínas ortólogas a CD59 humana, que são potenciais inibidores de fixação do sistema do complemento. Além destas, anidrase carbônica, ADP-ribosil ciclase, Sm200 e fosfatase alcalina também foram identificadas. Os autores sugerem que estas proteínas podem ser possíveis alvos vacinais, principalmente contra os vermes que se encontram ainda migrando pelo sistema circulatório.

Em um trabalho realizado por nosso grupo, foi comparado o perfil de reatividade de proteínas de vermes adultos de *S. mansoni* frente a anticorpos presentes no soro de indivíduos infectados e não infectados, ou naturalmente resistentes, de área endêmica para esquistossomose utilizando a metodologia de eletroforese bidimensional associada a *Western blotting*. Um total de 47 diferentes proteínas imunorreativas foram identificadas por espectrometria de massas. Todas as 47 proteínas são de localização intracitoplasmática, não

sendo identificadas proteínas imunorreativas presentes na membrana de células localizadas principalmente no tegumento do parasito (LUDOLF et al., 2014).

Das proteínas imunorreativas de *S. mansoni* identificadas por Ludolf e colaboradores (2014), a gelsolina foi reconhecida tanto pelo soro de indivíduos infectados quanto de indivíduos não infectados de área endêmica para esquistossomose. Outra evidência que reforça o potencial antigênico de gelsolina é que esta proteína possui 18 possíveis epítomos antigênicos, com tamanho mínimo de 6 aminoácidos, com um valor percentil de 90,2, de acordo com o programa *EMBOSS Antigenic*. Este programa prediz as regiões potencialmente antigênicas de uma determinada sequência de aminoácidos. De acordo com dados disponíveis no banco de dados SchistoDB, isto significa que a gelsolina é uma das proteínas dentre as 9,8% proteínas preditas do genoma do *S. mansoni* que mais possuem peptídeos antigênicos.

Não apenas os dados de proteômica, mas sua integração com os dados de transcriptômica e genômica, juntamente com as técnicas de manipulação de genes, têm fornecido uma visão global sobre a biologia do parasito, a patogenia por ele causada e sobre a interação parasito-hospedeiro. Estes dados constituem a base para o desenvolvimento de vacinas anti-Schistosoma, bem como a identificação de alvos de drogas e marcadores de diagnóstico para o tratamento e controle de esquistossomose (HAN et al., 2009).

1.8. RNA de interferência (RNAi)

A interferência por RNA (RNAi) é um mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional que atua sobre RNAs mensageiros (mRNA) específicos. A sua descoberta revolucionou o entendimento sobre a regulação de genes, revelando vias relacionadas com pequenos RNAs de 20 a 30 pb e suas proteínas associadas no controle da expressão da informação genética (CARTHEW e SONTHEIMER, 2009).

O RNAi foi descrito pela primeira vez em plantas (petúnias) no início da década de 1990 e até hoje é rotineiramente utilizado como ferramenta molecular na pesquisa biológica para silenciamento de genes e sua caracterização funcional e, em alguns casos, é aplicada como uma modalidade terapêutica contra diversas doenças humanas (BAULCOMBE, 2004 e FILIPOWICZ, 2005).

RNAi é responsável por controlar processos vitais, tais como o crescimento celular, diferenciação dos tecidos, formação de heterocromatina e proliferação celular. Em

conformidade, a disfunção do mecanismo de RNAi está associada a doença cardiovascular, distúrbios neurológicos, e diversos tipos de câncer (LU et al., 2008).

Algumas vias (micro RNA-miRNA, *short hairpin* RNA-shRNA, *small interfering* RNA-siRNA) compartilham um mecanismo de ação comum: utilizam o complexo *RNA-induced silencing complex* (RISC) para degradação de mRNA e silenciamento de genes após sua transcrição e têm o potencial de atingir o mRNA de interesse (WILSON e DOUDNA, 2013).

Os siRNAs são pequenas moléculas de RNA de dupla fita com cerca de 20-25 nucleotídeos cuja ação está na interferência na expressão de genes alvos (FIRE et al., 1998). Os siRNAs podem ser artificiais sendo introduzidos na célula por vários mecanismos para gerar um *knockdown* gene-específico. Um dos mecanismos é a transfecção de um longo RNA de fita dupla (dsRNA) exógeno que, de forma transitória, promove o silenciamento do gene alvo pela degradação do mRNA ou pela repressão da sua tradução na célula. Os siRNAs também podem ser endógenos ou surgir via uma infecção viral. O mecanismo de RNAi envolve um complexo protéico, chamado DICER, que possui atividade de ribonuclease III e cliva os dsRNAs que entram nas células, produzindo siRNAs. Os siRNAs se ligam a outro complexo, RISC, que contém uma helicase, que seleciona e separa uma das fitas do siRNA de acordo com sua energia livre para permanecer ligada a esse complexo. O complexo RISC-siRNA seleciona e pareia à mRNAs com sequência complementar à fita de RNA ligada e uma endonuclease, chamada argonauta 2 (Ago2), cliva o mRNA, desestabilizando-o (HAMILTON e BAULCOMBE, 1999) (Figura 4).

A técnica de RNAi tem sido utilizada por vários grupos de pesquisa a fim de elucidar a função de genes. Os primeiros relatos de RNAi em *Schistosoma* foram de 2003. Em um trabalho, utilizou-se cultura de esquistossômulos de *S. mansoni* para suprimir a expressão do gene da catepsina B (SKELLY, DA'DARA, e HARN, 2003). Simultaneamente BOYLE e colaboradores (2003), tinham como objetivo silenciar o gene do transportador de glicose por difusão facilitada (SGTP1), bem como o da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Para isso, esporocistos de *S. mansoni* foram expostos *in vitro* a dsRNAs específicos durante 6 dias. Os resultados mostraram uma redução de 70-80% no nível dos transcritos de GAPDH e SGTP1, mas não de transcritos não alvo, com conseqüente redução de 40% na captação de glicose nos parasitos expostos ao dsRNA de SGTP1, mas não aos expostos ao dsRNA de GAPDH.

Desde então nosso grupo vem utilizando esta ferramenta única e poderosa de manipulação genética em diferentes fases do ciclo de vida do *Schistosoma mansoni* para o estudo de função de vários genes, incluindo de potenciais alvos de drogas e antígenos para o desenvolvimento de vacinas (MOURÃO et al, 2009; ANDRADE et al., 2014; e PRATA, 2016). Ainda, nosso grupo vem estudando os diversos efeitos da utilização desta ferramenta em diferentes fases do ciclo de vida do parasito (GAVA et al., 2017). Mourão e colaboradores (2009), selecionaram 33 genes expressos em esporocistos de *S. mansoni* para avaliar, em média escala, os efeitos e variações do tratamento com dsRNA no parasito e para caracterizar fenótipos morfológicos associados ao potencial efeito do RNAi.

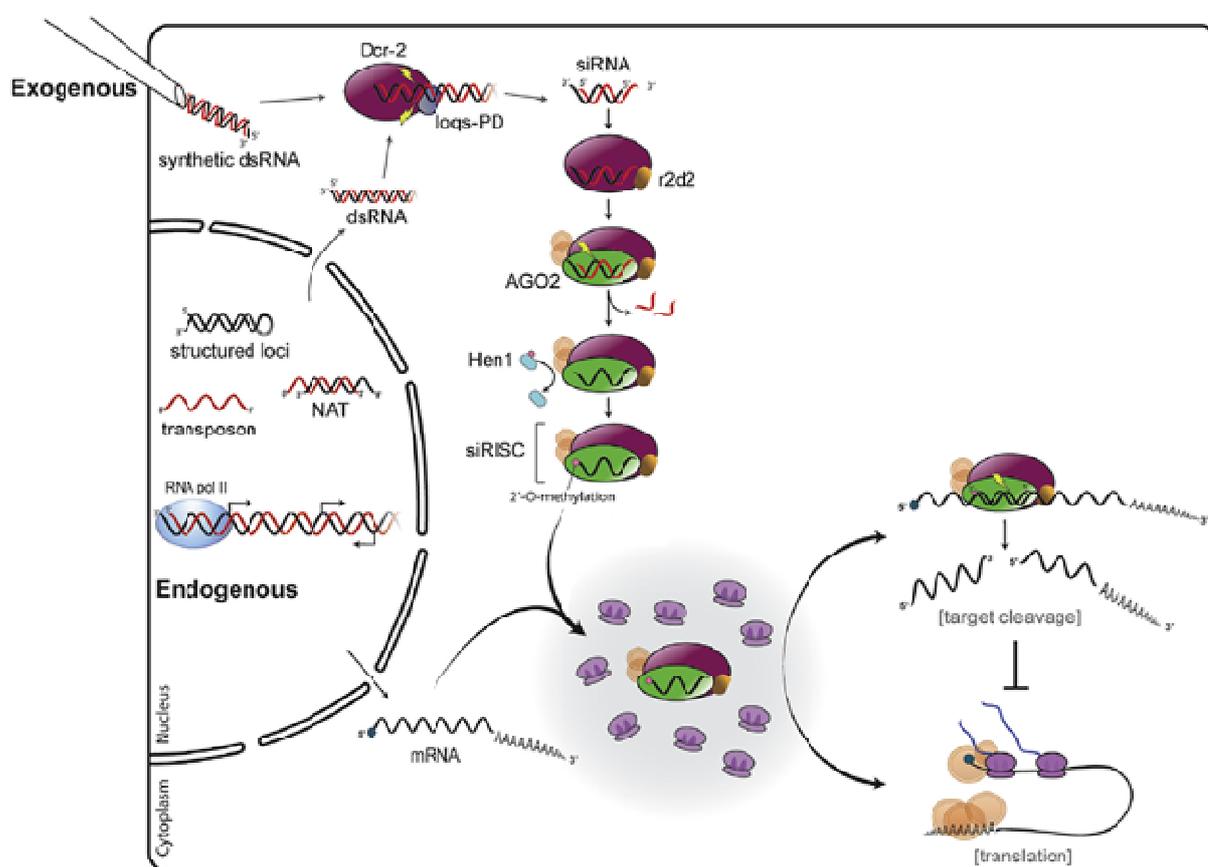


Figura 4: Esquema do mecanismo do silenciamento gênico por RNAi. Longos dsRNAs são degradados pela enzima Dicer (DCR-2) em pequenos RNAs (siRNAs). Os siRNAs se ligam ao complexo RISC e são utilizados como molde para a ligação no mRNA complementar. Esse mRNA é então clivado pela enzima argonauta (AGO2), impedindo assim, a sua tradução em proteína. Imagem adaptada de SOARES et al., 2014.

1.9. Gelsolina e vilina - Proteínas ligadoras de actina

O citoesqueleto interno das células é formado de microfilamentos de actina, microtúbulos e filamentos intermediários. A interação entre essas três fibras proteicas promove ao citoesqueleto força e dinamismo tornando-o apto a responder às exigências da célula. Uma propriedade importante da actina é a sua capacidade de produzir movimento na ausência de proteínas motoras (COOPER et al., 1988; ATHMAN et al., 2002 e WINDER, 2005).

A actina é encontrada somente em eucariotos. Compreende uma família de proteínas altamente conservada que se enquadra em três grandes classes: isoformas α , β e γ . Está localizada principalmente no citoplasma, mas também no núcleo, onde pode ou não ter funções motoras. As maiores concentrações da actina estão nos músculos estriados, apesar de quantidades significativas de actina estarem presentes em células não musculares, onde desempenham uma variedade de papéis, incluindo mudanças na forma de células, transporte de organelas, regulação do transporte de íons (REMEDIOS et al., 2003).

A superfamília das gelsolinas é composta por proteínas ligadoras de actina encontradas em todos os eucariotos. Este grupo inclui a gelsolina, vilina, *adseverin*, *CapG*, *advillin*, *supervillin* e *flightless*. Todas contêm 3 ou 6 repetições homólogas de um domínio chamado *gelsolin-like* (G) (Figura 5) (SILACCI et al., 2004).

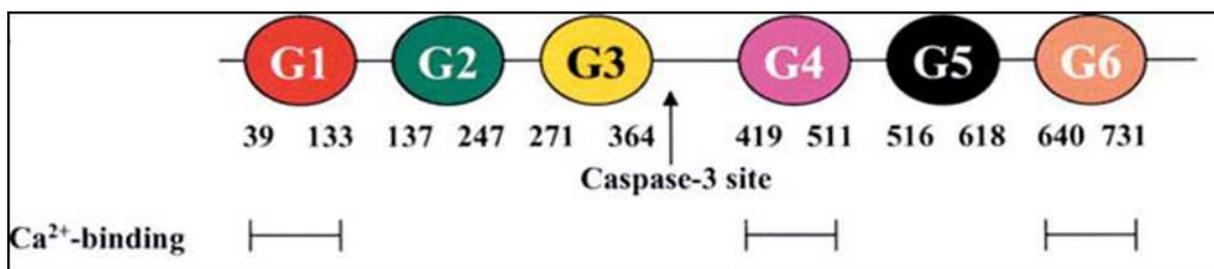


Figura 5: Representação esquemática da estrutura da gelsolina humana. G1 a G6 são os domínios e os números são os resíduos numerados de acordo com os domínios da gelsolina de plasma humano (SILACCI et al., 2004).

A vilina é uma proteína que possui seis domínios *gelsolin-like* e está envolvida com a regulação, organização e manutenção do citoesqueleto de actina nas microvilosidades (REVENU et al., 2004). A afinidade por filamentos de actina é regulada pela fosforilação de

resíduos de tirosina presentes em vilina, o que causa diminuição da sua afinidade pelos filamentos de actina (ZHAI et al., 2001).

A gelsolina é uma proteína que está associada a regiões ricas em filamentos de actina (COOPER et al., 1988). Por ser uma proteína ligadora de actina ela é dependente de Ca^{2+} . Desempenha um papel regulador na agregação e desagregação dos filamentos de actina de forma dependente de cálcio, pH e lipídio (MÉRÉ et al., 2005a). De acordo com o banco de dados *The Gene Ontology* (GO:0003779), a gelsolina é uma proteína que interage seletivamente e não covalentemente com monômeros de actina (actina G) e com filamentos de actina (actina F), associada à membrana celular. Sendo assim, tem sido relacionada com a regulação da motilidade celular, distribuição e organização de filamentos de actina no citoesqueleto e, por fim, com a estimulação da apoptose em certas células de vertebrados (MCGOUGH et al., 2003).

A ligação da gelsolina ativada a dois monômeros adjacentes de actina de um filamento promove a clivagem deste filamento por meio de mudança de conformação, dobramento e por fim desfazendo as interações não covalentes entre as duas subunidades da actina no filamento (SELDEN et al., 1998). Ao clivar o filamento de actina em dois filamentos menores, a gelsolina se mantém ligada preferencialmente à extremidade da actina+, que é a extremidade de crescimento rápido pela adição de monômeros de actina. A nova extremidade, ligada à gelsolina, está potencialmente disponível para polimerização, caso a gelsolina se dissocie após interação com fosfoinositóis (Figura 6). Por outro lado, a gelsolina pode iniciar a polimerização da actina ligando simultaneamente os dois monômeros de actina. Estes monômeros formam a extremidade final, servindo como um núcleo de montagem de filamentos, ao qual os próximos monômeros de actina se ligarão (JANMEY et al., 1985). A dissociação da gelsolina do filamento de actina ocorre através da sua ligação a fosfoinositóis *mono* (PIP), *bi* (PIP2) e trifosfatados (PIP3). Desta forma, este processo controla a polimerização da actina e conseqüentemente a forma e a mobilidade da célula.

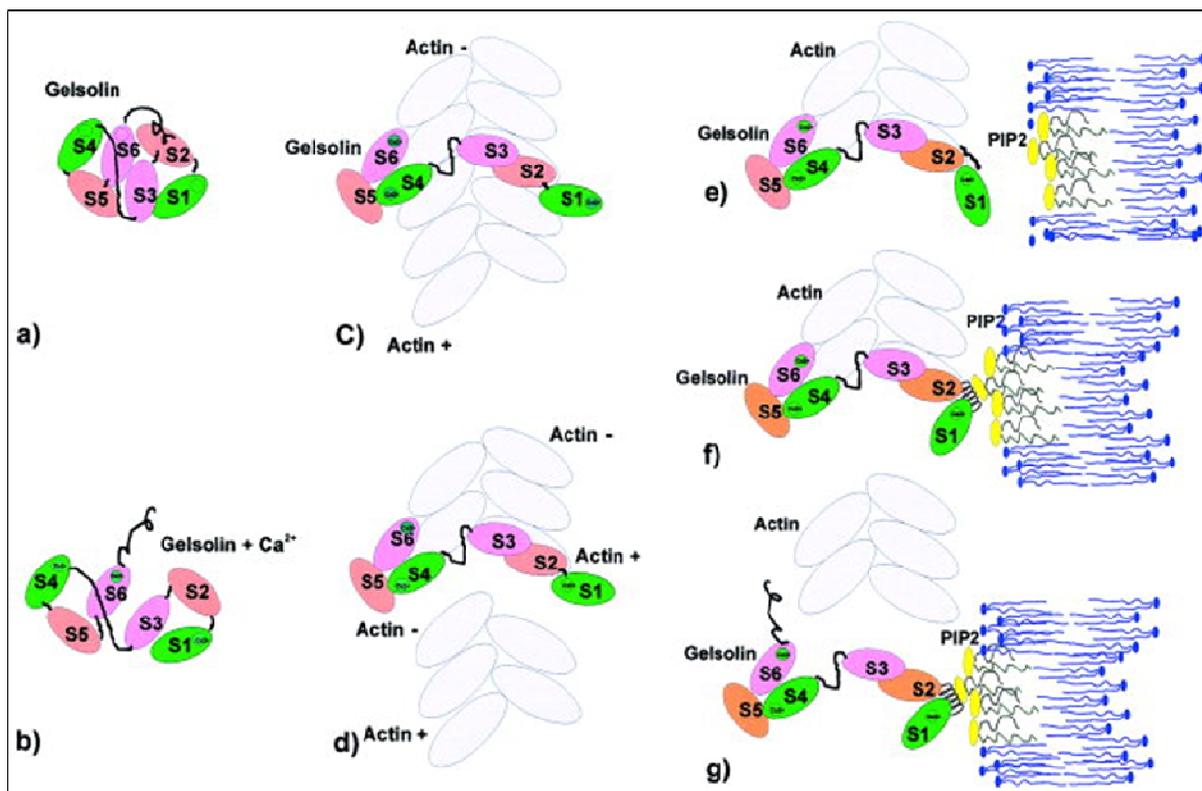


Figura 6: Ilustração do mecanismo de ligação da gelsolina à actina: (a) arranjo dos domínios da gelsolina na forma livre de cálcio (fechada); (b) arranjo dos domínios gelsolina na forma ligada ao cálcio (aberta); (c) ligação da forma aberta de gelsolina a um filamento de actina, o que causa o rompimento do filamento; (d) o filamento rompido com gelsolina ligada na extremidade da actina+; (e) ligação do fosfolípido PIP2 ao complexo gelsolina-actina; (f) alteração da conformação do fragmento 150-169 da gelsolina, promovendo a dissociação de gelsolina do filamento de actina; (g) dissociação da gelsolina do filamento de actina após sua ligação ao PIP2. Fonte: LIEPIŃA et al., 2003.

Camundongos transgênicos, *knockout* para gelsolina, apresentaram função plaquetária reduzida, migração retardada de neutrófilos no sítio da inflamação e na cicatrização de feridas os fibroblastos se movem mais lentamente (WITKE et al., 1995). A gelsolina também serve de substrato para enzimas apoptóticas caspase-3 (KOTHAKOTA et al., 1997) que cliva os domínios de ligação a actina da gelsolina a partir de seus domínios de ligação ao cálcio.

O papel da gelsolina em *S. mansoni* ainda não está completamente elucidado. Um estudo realizado por Siddiqui e colaboradores (1991), utilizando extrato proteico de verme de *S. mansoni*, identificou, por meio de *Western blotting*, duas proteínas envolvidas na interação actina/Ca²⁺, dentre elas a gelsolina. Devido à afinidade da actina pelo cálcio, estes filamentos,

em *Schistosoma*, podem estar envolvidos na restrição do acesso dos precursores de membrana à superfície até serem requeridos para exocitose e renovação da membrana (ZHOU e PODESTA, 1989). Portanto, a gelsolina pode estar envolvida nesses processos.

Estudos de Linder e Thors (1992) mostraram que o tratamento de vermes adultos de *S. mansoni* com PZQ expõe o sítio de ligação da actina à gelsolina presente nos espinhos e tubérculos do tegumento, permitindo a ligação da gelsolina.

2. JUSTIFICATIVA

A transmissão da esquistossomose ocorre em uma vasta área, principalmente nos estados do nordeste e norte de Minas Gerais e o elevado número de pessoas infectadas e os efeitos negativos da morbidade têm um impacto significativo no número de anos de vida produtiva perdidos devido à doença, o que justifica os esforços para o melhor entendimento da doença e para a busca de soluções adequadas. O uso de uma única droga, o praziquantel, é a principal forma de controle da esquistossomose e as tentativas de controle da doença no Brasil reduziram a ocorrência de sua forma grave. No entanto, há altas taxas de reinfecções nas áreas endêmicas e a possibilidade do surgimento de cepas resistentes à droga. Por estas razões, o sucesso da estratégia baseada apenas na quimioterapia é limitado. Os dados de genômica, transcriptômica e proteômica, juntamente com as técnicas de manipulação de genes têm fornecido uma visão global sobre a biologia do parasito, a patogenia por ele causada e sobre a interação parasito-hospedeiro.

Uma vez que experimentos de *Western blotting* bidimensional *spots* proteicos correspondentes à gelsolina reagiram ao soro de indivíduos naturalmente resistentes à infecção pelo *S. mansoni* e análises *in silico* mostraram que gelsolina tem um forte potencial antigênico, selecionamos esta proteína, e também a vilina, outro membro da família das gelsolinas, para serem testadas como antígeno vacinal para esquistossomose. Além disso, uma vez que o tratamento com PZQ expõe o sítio de ligação da actina à gelsolina presente no tegumento de vermes adultos, as proteínas gelsolina e vilina poderão também ser testadas futuramente como alvos vacinais em associação com a quimioterapia. Entretanto, em *S. mansoni*, a função exercida por estas proteínas ainda não foi elucidada, tendo sido a proteína gelsolina apenas identificada como uma das proteínas ligantes de cálcio associada à membrana plasmática apical do tegumento do parasito.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Caracterizar funcionalmente proteínas da família das gelsolinas de *Schistosoma mansoni* por meio de RNA de interferência, bem como investigar o seu papel na interação parasito-hospedeiro.

3.2. Objetivos específicos

- Analisar a expressão gênica e proteica das gelsolinas de *S. mansoni* ao longo do ciclo de vida do parasito;
- Determinar a localização das gelsolinas em esquistossômulos de *S. mansoni*;
- Expor parasitos a dsRNAs de gelsolina e vilina e analisar os fenótipos resultantes do silenciamento gênico em esquistossômulos;
- Investigar o papel biológico exercido por gelsolina e vilina no parasito *S. mansoni* e na interação parasito-hospedeiro;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Declaração de ética no uso de animais

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - FIOCRUZ) com número de licença LW 13/13 e todos os procedimentos envolvendo animais foram realizados em conformidade com o Manual de Utilização de Animais/FIOCRUZ (2008). Para a realização dos experimentos de infecção com esquistossômulos de *Schistosoma mansoni*, foram utilizadas fêmeas de camundongos Swiss Webster de 4-6 semanas, obtidas do Biotério de Produção do Instituto René Rachou.

4.2. Desenho dos iniciadores utilizados para síntese de dsRNA e RT-qPCR

Iniciadores específicos para síntese dos RNAs de fita dupla (dsRNAs) e para as reações de PCR Quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR) foram previamente desenhados utilizando o software Primer 3 (v. 0.4.0), ou retirados da literatura (ANDERSON et al., 2015 e PICARD et al., 2016), utilizando as sequências dos transcritos de *gelsolina* (Smp_008660.1), *vilina* (Smp_197860), *Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase* [GAPDH (Smp_056970.1)], *Inibidor do ativador do plasminogênio-1* [PAI 1 (Smp_009310)] e *Oxidoredutase fad putativa* [Fad (Smp_089880)] depositadas no banco de dados GeneDB. Quando este trabalho foi iniciado, a sequência Smp_197860 estava anotada como vilina. Atualmente a mesma está anotada também como gelsolina no GeneDB. Entretanto, neste trabalho foi mantida a anotação anterior, como vilina. O gene que codifica a proteína verde fluorescente (GFP), inserido no plasmídeo pCR2.1/T7-GFP (*Invitrogen*), foi utilizado como controle negativo inespecífico nos experimentos de silenciamento gênico. Os iniciadores foram desenhados para amplificar fragmentos de aproximadamente 360-540pb para síntese dos dsRNAs (Quadro 1) e de 50 a 150pb para reações de RT-qPCR (Quadro 2). A sequência do promotor da T7 RNA polimerase (taatacgaactcactataggg) foi adicionada na extremidade 5' de cada um dos iniciadores utilizados para a amplificação do cDNA molde para a síntese de dsRNA.

Quadro 1: Sequência dos iniciadores utilizados para a amplificação do cDNA molde para a síntese dos dsRNAs.

Transcrito alvo (número de pares de bases do dsRNA)	Sequência dos iniciadores
GFP (360 pb)	fwd 5' - taatacgactcactatagggGTGTTCAATGCTTTGCGAGA – 3'
	rev 5' - taatacgactcactatagggCTTTTCGTTGGGATCTTTTCG – 3'
gelsolina (541 pb)	fwd 5' - taatacgactcactatagggGTGGATATGCAAGCGGATTT – 3'
	rev 5' - taatacgactcactatagggAACGCATCCAATTTTTCTCG – 3'
vilina (470 pb)	fwd 5' - taatacgactcactatagggCTGGTTTCCGACGAACAAC – 3'
	rev 5' - taatacgactcactatagggTCCTGCATCGATGAGAAAGAC – 3'

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

Transcrito alvo (número de pares de bases do amplicon)	Sequência dos iniciadores
GAPDH (53 pb)	fwd 5' - TCGTTGAGTCTACTGGAGTCTTTACG - 3'
	rev 5' - AATATGAGCCTGAGCTTTATCAATGG - 3'
gelsolina (125 pb)	fwd 5' - GCAAATTCTTCCGTGGTGAC – 3'
	rev 5' - GGCTGCTGTTCCGTATTCAT – 3'
vilina (148 pb)	fwd 5' - GATCAAAAAGCACACCGGAA – 3'
	rev 5' - ATGCGGAAACATGAAAAGTAG – 3'
Fad (71 pb)	fwd 5' - CATGGACCTGCTGCATTTAC – 3'
	rev 5' - ACGACCTCGACCAAACATTC – 3'
PAI 1 (119 pb)	fwd 5' - TAGCTCCGACAGAAGCACCT – 3'
	rev 5' - ACGACCTCGACCAAACATTC – 3'

4.3. Síntese de RNAs de fita dupla

Uma etapa essencial para síntese dos dsRNAs foi a amplificação por PCR da sequência de cDNA que foi utilizada como molde para a síntese dos dsRNAs. Para isso foram utilizados os iniciadores que apresentaram em sua extremidade 5' a sequência correspondente ao promotor da T7 RNA polimerase (Quadro 1) e cDNAs sintetizados a partir de RNA total extraído de esquistossômulos de *S. mansoni*. Para amplificação da sequência molde de GFP foi utilizado o plasmídeo pCR2.1/T7-GFP. Os protocolos de extração, tratamento, purificação e quantificação de RNA de esquistossômulos, bem como o de síntese de cDNAs, serão descritos posteriormente nos itens: 4.5.1 a 4.5.4.

As reações de PCR foram realizadas utilizando o kit *PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen)*. Nestas reações foram utilizados 18 μ L de SuperMix; 1 μ L da reação de síntese de cDNA e 0,5 μ L de cada iniciador (10 pMoles/ μ L), para um volume total de reação de 20 μ L. Para amplificação da sequência molde de GFP foi utilizado ~100ng do plasmídeo pCR2.1/T7-GFP. As reações de PCR foram realizadas em termociclador, nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos; 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento dos iniciadores: GFP a 55°C; gelsolina e vilina a 57°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto; extensão final a 72°C por 10 minutos e 4°C ∞ . Os produtos de amplificação foram submetidos à análise em géis de agarose 1%.

As bandas de DNA foram extraídas do gel e purificadas utilizando o Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (*Promega*), segundo orientações do fabricante. Para confirmar a sequência dos produtos amplificados, os produtos de PCR de gelsolina e vilina foram inseridos no vetor de clonagem pGEM-T Easy e submetidos à análise por sequenciamento utilizando *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific)*. As sequências foram obtidas no sequenciador capilar de DNA ABI 3730 (*Life Technologies*).

Os dsRNAs específicos para cada transcrito alvo foram sintetizados utilizando o kit T7 RiboMAX™ Express RNAi System (*Promega*), seguindo o protocolo do fabricante, com algumas alterações. O mix contendo 8 μ L do DNA molde (com um total de 400 a 720ng do produto de PCR purificado), 10 μ L RiboMAX™ Express T7 2X Buffer e 2 μ L Enzyme Mix T7 Express foi mantido a 37°C por 16 horas. Em seguida, a reação foi incubada a 70°C por 10 minutos e mantida a temperatura ambiente por 20 minutos para anelamento das fitas e formação dos dsRNAs. O próximo passo foi adicionar à amostra 1 μ L de RQ1 RNase-Free

DNase (1 unidade/ μ L) e incubá-la por 30 minutos a 37°C. Em seguida foi adicionado 2,1 μ L de acetato de sódio 3M (pH 5,2) e 21 μ L de isopropanol PA gelado. A mistura foi incubada no gelo por 5 minutos, posteriormente foi centrifugada por 10 minutos a 10.000g e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi lavado com 0,5mL de etanol 70% e, após remoção e total evaporação do álcool, o dsRNA foi ressuscitado com 45 μ L de água pura livre de nucleases. Por fim, 1 μ L da amostra foi submetida a uma eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo para confirmação do tamanho de cada dsRNA e sua integridade. A concentração do dsRNA foi obtida em Nanodrop (*Thermo Scientific*).

4.4. Exposição dos parasitos aos dsRNAs

4.4.1. Grupos experimentais

Os grupos experimentais foram formados por esquistossômulos expostos ao dsRNA dos genes em estudo: gelsolina e vilina, separadamente, e de um outro grupo no qual os esquistossômulos foram expostos aos dsRNAs de gelsolina e vilina concomitantemente. Os grupos controles foram compostos por esquistossômulos expostos aos dsRNAs de GFP, que é um gene que não está presente no genoma do *S. mansoni*, sendo, portanto, utilizado como um controle negativo inespecífico, e pelo grupo de esquistossômulos que não foram expostos a dsRNA algum, chamado de controle negativo. Os experimentos contaram com, pelo menos, três réplicas biológicas.

4.4.2. Obtenção dos esquistossômulos

Os esquistossômulos utilizados neste trabalho foram obtidos por meio de transformação mecânica *in vitro* de cercárias de *S. mansoni* da cepa LE (Belo Horizonte), de acordo com o protocolo descrito por Ramalho-Pinto e colaboradores (1974). O ciclo do parasito foi mantido rotineiramente em caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* no moluscário Lobato Paraense do Instituto René Rachou/ FIOCRUZ - MG. As cercárias, gentilmente cedidas, foram mantidas no gelo por 1 hora em tubos de 50mL e em seguida foram centrifugadas a 218g, 4°C, por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e as cercárias provenientes de cada 5 tubos foram reunidas em um único tubo contendo meio MEM (*Minimum Essential Medium Eagle – Sigma-Aldrich*) com 1% de penicilina-estreptomicina. Logo em seguida as caudas das cercárias foram quebradas utilizando seringa de 20mL com agulha de 21G. Após decantação dos esquistossômulos, o sobrenadante foi descartado, eliminando as caudas liberadas das cercárias. Os esquistossômulos foram transferidos para

garrafas de cultura de 50mL em meio MEM e incubados em estufa com 5% de CO₂ por 1 hora a 37°C. Os esquistossômulos foram transferidos para tubos de 15mL onde permaneceram em decantação por 7 minutos para nova descontaminação das caudas. Esta etapa de lavagem e eliminação das caudas foi realizada novamente e esse passo foi repetido por mais 4 vezes com tempos de sedimentação cada vez menores (6 min, 5 min, 4 min e 3 minutos). Após a completa eliminação das caudas, o material foi ressuspensionado em 2 mL de meio MEM e feita a contagem dos esquistossômulos em triplicata de 10µL em microscópio invertido com aumento de 10x. Em seguida, os mesmos parasitos foram acondicionados em estufa de CO₂ 5%, a 37°C, em meio MEM suplementado (Hidrocortisona 1µM; Hipoxantina 0,5µM; T3 0,2µM; Schneider's 5%; MEM Vitamina 0,5%; Soro fetal bovino 2% e estreptomicina/penicilina 2%) para serem utilizados nos procedimentos posteriores.

4.4.3. Exposição dos esquistossômulos aos dsRNAs

Após obtenção dos esquistossômulos, os dsRNAs sintetizados foram adicionados às culturas na concentração de 200nM. A exposição simultânea de esquistossômulos aos dsRNAs de gelsolina e vilina foi realizada utilizando 200nM de cada dsRNA. As culturas foram estabelecidas com aproximadamente 3 mil parasitos/mL de meio MEM suplementado e foram mantidas em placas de 6 poços em estufa a 37°C e 5% CO₂.

4.5. Quantificação do nível dos transcritos de gelsolina e vilina em esquistossômulos silenciados

4.5.1. Extração de RNA total de esquistossômulos

Cerca de 2000 esquistossômulos foram utilizados para extração de RNA total no experimento de cinética e 4000 nos experimentos de silenciamento. Os esquistossômulos foram macerados com auxílio de um pistilo em tubos de 1,5mL contendo 50µL de TRIzol® Reagent (*Thermo Fisher Scientific*) por 3 minutos e, em seguida, o volume foi completado para 500µL de TRIzol. Foram adicionados 100µL de clorofórmio e a mistura foi agitada vigorosamente. Em seguida a mistura foi centrifugada a 12000g por 15 min, a 4°C. Nesse momento ocorreu a separação em três fases: a aquosa (superior), a interfase e a fase orgânica (inferior). A fase superior, na qual se encontra o RNA, foi transferida para tubos novos e a fase orgânica, onde se encontram as proteínas, foi mantida a -70°C para realização de ensaios de *Western blotting*. Para precipitação do RNA foram adicionados 250µL de isopropanol 100% gelado aos tubos contendo o RNA e esta mistura foi mantida a -20°C por cerca de 16

horas. Em seguida os tubos foram centrifugados a 12000g por 15 minutos, a 4°C e o sobrenadante foi removido. O *pellet*, contendo o RNA, foi lavado com 1mL de álcool etílico 75% gelado. Nova etapa de centrifugação foi realizada a 7500g por 5 min, a 4°C. O sobrenadante foi novamente descartado e o *pellet* de RNA foi ressuscitado em 20 µL de água ultrapura, livre de RNase, após completa evaporação do álcool.

4.5.2. Tratamento e purificação do RNA

A fim de eliminar uma possível contaminação do RNA extraído com DNA genômico do parasito, aos 20µL de RNA obtido conforme descrito acima foi acrescentado 1µL de Turbo DNase da Ambion® (2 unidades/µL) e 2,1µL do seu tampão 10x. A mistura foi homogeneizada com cuidado e incubada por 40 minutos a 37°C. Em seguida, foram adicionados 2,3µL do inativador da DNase e os tubos foram mantidos por 5 minutos à temperatura ambiente, sendo invertidos ocasionalmente. Por fim, os tubos foram centrifugados por 1,5 minutos a 10000g, para remoção do inativador da DNase, e o sobrenadante contendo o RNA foi transferido para novos tubos.

4.5.3. Quantificação do RNA

A concentração das amostras de RNA purificadas foi determinada utilizando o kit Qubit RNA HS (*Thermo Fisher Scientific*). Para cada 1µL de RNA foi adicionado 198µL do tampão RNA HS e 1µL de Qubit RNA HS Reagent para um volume final de 200µL. Em seguida a leitura foi realizada no Qubit® 2.0 Fluorometer (*ThermoFisher Scientific*) e a concentração das amostras de RNA foi determinada de acordo com a fórmula: Concentração amostra = valor de QF x 200/X, onde QF é um valor medido pelo próprio equipamento e X é o volume utilizado para quantificação.

4.5.4. Síntese de cDNA

O RNA purificado e quantificado foi utilizado para síntese de cDNA utilizando o kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Uma primeira etapa da reação de síntese de cDNA foi realizada com 1µL de Oligo(dt)₁₅ (500µg/mL), 1µL de Random Primer Hexamer (50ng/µL) e até 1µg de RNA em um volume final de 10,6µL. Esta mistura foi incubada por 5 minutos a 70°C, sendo resfriada logo após em banho de gelo por mais 5 minutos. Uma segunda etapa da reação foi realizada adicionando-se à primeira etapa da reação 4µL do ImProm-II Reaction Buffer 5X, 2,4µL

MgCl₂ 25mM, 1μL dNTP mix 10mM, 1μL Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor na concentração de 20 unidades/μL e 1μL ImProm-II Reverse Transcriptase para um volume final de 20μL. A reação foi mantida por 5 minutos a 25°C para anelamento dos iniciadores, seguidos de 60 minutos a 42°C para extensão, e por fim, por 15 minutos a 70°C para inativação da enzima. Em seguida foi adicionado 0,5μL de RNase H (2,1 unidades/μL) e a mistura foi incubada por 20 minutos a 37°C. Os cDNAs obtidos foram utilizados imediatamente nas reações de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) ou armazenados a -20°C para serem utilizados posteriormente.

4.5.5. PCR quantitativo em Tempo Real

Para verificação do silenciamento gênico, foi feita a amplificação dos transcritos alvos em esquistossômulos tratados com dsRNA para cada alvo. Foram utilizados 5μL do reagente Power SYBR™ Green Master Mix (*Applied Biosystems*), 2μL de cDNA das amostras e o volume dos iniciadores variando conforme a concentração que se obteve melhor eficiência, cada uma otimizada segundo recomendações do MIQE (BUSTIN et al., 2009), sendo: 400nM para gelsolina, 600nM para vilina, 1500nM para GAPDH, 400nM Fad e 900nM PAI. O volume total de cada reação foi de 10μL. As amostras foram amplificadas utilizando o equipamento ViiA7 Real-Time PCR System (*Thermo Fischer Scientific*). Para determinar o nível de expressão dos genes de interesse foram utilizados os valores de *threshold cycle* (Ct), fornecidos pelo software QuantStudio™ Real-Time PCR Software Version 1.2. O cálculo foi realizado pelo método de $\Delta\Delta Ct$, no qual o valor do Ct de cada amostra foi subtraído do Ct do normalizador GAPDH (ΔCt). Em seguida, os valores correspondentes aos ΔCt s encontrados para cada gene nas diferentes amostras analisadas foram subtraídos pelos ΔCt s do controle GFP (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Para analisar os níveis de expressão dos genes nas diferentes fases foi realizada a média geométrica entre os *housekeeping genes*: *Fad*, *PAI* e *GAPDH*. A análise estatística posterior foi realizada utilizando GraphPad (versão 5.01) com o teste Unpaired t test ($P < 0,05$).

4.6. Análises fenotípicas de esquistossômulos expostos aos dsRNAs

Com o objetivo de verificar possíveis alterações fenotípicas decorrentes da exposição aos dsRNAs, foram avaliados o tamanho e a viabilidade dos esquistossômulos. Para análise do tamanho, as culturas foram avaliadas a cada 2 dias, durante 30 dias e imagens dos parasitos foram registradas utilizando uma câmera de alta resolução *Axiocam MRc Ver.3* (*Carl Zeiss*)

acoplada a um microscópio invertido *Axio Observer* (*Carl Zeiss*). Foram capturadas, aleatoriamente, 3 imagens com aumento 5x e 1 imagem com aumento 10x em cada poço. Utilizando as imagens com aumento de 5x, a área (μm^2) de cerca de 100 parasitos foi medida utilizando-se o programa *AxionVision 40 V 4.8.0.0*. Os resultados foram analisados no GraphPad Prism (versão 5.01) pelo teste de Mann-Whitney ($P < 0,05$).

Para análise de viabilidade dos parasitos, a cada 2 dias, e por até 30 dias, foram retirados cerca de 100 vermes de cada cultura e estes foram transferidos para placas de 96 poços contendo 200 μL de meio de cultura acrescido de 5 μL de iodeto de propídeo 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (*Sigma-Aldrich*). A análise foi realizada por microscopia de fluorescência utilizando microscópio invertido *Axio Observer* (*Carl Zeiss*). Os vermes mortos e vivos são diferenciados de acordo com a fluorescência avermelhada que apresentam. A membrana plasmática íntegra impede que o iodeto de propídeo (agente intercalante de DNA) penetre na célula, indicando que o verme se encontra viável. Em cada poço foram contados todos os vermes e a porcentagem de mortos foi determinada em cada grupo avaliado.

4.7. Análise por imunofluorescência dos esquistossômulos expostos aos dsRNAs

De acordo com o melhor nível de silenciamento dos genes constatado no RT-qPCR, os esquistossômulos expostos aos diferentes dsRNAs e do grupo controle negativo foram coletados no 5º dia após o início da exposição aos dsRNAs. Os parasitos foram incubados por 16 horas a 4°C, sob agitação constante, em uma solução fixadora e permeabilizante contendo 2% Triton X-100 (diluído em PBS 1x, pH 7.4) e 4% de paraformaldeído (diluído em PBS 1x, pH 7.4) na proporção 1:1. Em seguida os vermes foram lavados 3 vezes com PBS e mantidos em solução de bloqueio (5% de SFB inativado e 0,02% de azida sódica diluídos em PBS) por 16 horas a 4°C. Após o bloqueio os esquistossômulos foram incubados por 16 horas a 4°C, sob agitação, com anticorpo monoclonal IgG1 de camundongo anti-gelsolina (clone GS-2C4 – *SIGMA*) diluído 1:100 em solução de diluição dos anticorpos (0,1% Triton X-100, 0,1% de BSA e 0,2% de azida sódica diluídos em PBS). Após esse período os parasitos foram lavados 3 vezes em PBS e em seguida foram incubados com anticorpo secundário anti-IgG1 de camundongo conjugado à Alexa Fluor 488, diluído 1:200 na solução de diluição dos anticorpos, por 16 horas a 4°C. Os mesmos parasitos foram incubados também com Faloidina-Alexa 594 (1:80), para marcação dos filamentos de actina, e com uma sonda para marcar núcleo, TO-PRO3 (1:800), juntamente com o anticorpo secundário. Como controle de especificidade, esquistossômulos do grupo controle negativo foram incubados apenas com o

anticorpo secundário, na ausência do anticorpo monoclonal anti-gelsolina. As demais etapas foram realizadas nas mesmas condições. Após a última incubação, os esquistossômulos foram lavados 3 vezes com PBS e ressuspensos em 40µL de PBS. Os parasitos foram analisados em aumento de 20 e 63 vezes, incluindo cortes Z, e as imagens foram adquiridas em microscópio de sistema confocal Zeiss LSM 710 do *Calcium Lab* - Laboratório de Sinalização de Cálcio – UFMG com o auxílio do estudante de iniciação científica Rodrigo Machado, sob orientação da Dra Maria de Fátima Leite.

A quantificação dos níveis proteicos das gelsolinas em esquistossômulos expostos aos diferentes dsRNAs foi realizada utilizando o *software ImageJ 1.51*. Foi medida a intensidade de sinal de no mínimo vinte parasitos de cada grupo experimental. Os resultados foram apresentados em porcentagem de níveis proteicos das gelsolinas em cada grupo experimental em relação aos valores obtidos no grupo do controle inespecífico GFP.

4.8. Quantificação da expressão das gelsolinas em esquistossômulos silenciados

As proteínas foram extraídas da fase orgânica obtida da extração de RNA com TRIzol de esquistossômulos silenciados. Para isso foi adicionado 1mL de isopropanol 100% nas amostras e estas foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 12000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi lavado com 1mL de solução de lavagem (Cloridrato de Guanidina 0,3M em etanol 95%) e incubado por 20 minutos à temperatura ambiente. Assim, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 7500g e 4°C, e a solução de lavagem foi descartada. Esta etapa de lavagem foi repetida por mais duas vezes. Em seguida foi acrescentado 1mL de etanol 100% ao *pellet* que foi misturado com uso de vortex e incubado em temperatura ambiente por 20 minutos. Mais uma etapa de centrifugação foi realizada (5 minutos a 7500g e 4°C), o etanol foi descartado e o *pellet* foi parcialmente seco. Aos *pellets* de proteína foram adicionados 25µL de tampão contendo ureia 8M, tiouréia 2M, CHAPS 4%, Tris 20mM, DTT 500mM. Todo volume foi aplicado em gel SDS-PAGE 12%. Após a eletroforese, foi realizada a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose utilizando o sistema *Mini-Trans-Blott Cell (Bio-Rad)* a 100V, durante 120 minutos, a 4°C em tampão de transferência (Tris 25mM, glicina 192mM e metanol 20%). As condições do ensaio de *Western blotting* foram as mesmas descritas abaixo no item 4.10. Para quantificação dos níveis de expressão das gelsolinas foi medida a intensidade de sinal obtida com o anticorpo anti-gelsolina e com o anticorpo anti-GST, como normalizador, utilizando o *software ImageJ*

1.51. Foram consideradas as 3 bandas com massa molecular próxima a esperada de 41kDa que foram reconhecidas pelo anticorpo anti-gelsolina. O fator de normalização foi determinado dividindo o valor do sinal da proteína GST-26 de cada amostra pelo maior sinal de GST-26 observado no experimento. Em seguida a intensidade de sinal detectada das bandas correspondentes às gelsolinas de cada amostra foi multiplicada pelo fator de correção do normalizador da respectiva amostra. Obtidos os valores normalizados, os resultados foram apresentados em porcentagem de níveis proteicos das gelsolinas em cada grupo experimental em relação aos valores obtidos no grupo do controle inespecífico GFP. Os resultados foram analisados no GraphPad Prism (versão 5.01) pelo teste de Mann Whitney ($P < 0,05$).

4.9 Quantificação do nível dos transcritos de gelsolina e vilina nas diferentes fases do ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*

RNA total de vermes machos, vermes fêmeas, ovos e esquistossômulos mantidos por três horas e por sete dias em meio de cultura foi extraído utilizando TRIzol® Reagent (*Thermo Fisher Scientific*) como descrito no item 4.5.1. A partir do RNA purificado e quantificado foram sintetizados cDNAs das amostras, seguido pela amplificação dos fragmentos dos transcritos de interesse e controles endógenos por RT-qPCR. A análise dos dados para determinação dos níveis dos transcritos de gelsolina e vilina foi realizada também pelo método de $\Delta\Delta C_t$ e normalizados com a utilização da média geométrica de três genes (GAPDH, Fad, e PAI) com expressão constitutiva, conforme descrito por Anderson et al., 2015 e Picard et al., 2016. Os resultados das réplicas biológicas foram analisados utilizando o GraphPad Prism (versão 5.01) e as análises estatísticas foram feitas utilizando o teste de Mann-Whitney ($P < 0,05$).

4.10 Quantificação da expressão das gelsolinas nas diferentes fases do ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*

Os extratos proteicos de diferentes fases do ciclo de vida do *S. mansoni*: cercárias, esquistossômulos, vermes adultos e ovos foram obtidos por meio da lise direta dos parasitos em tampão de lise composto por ureia 8M, tiouréia 2M, CHAPS 4%, Tris 20mM, DTT 500mM e inibidor de proteases (*GE Healthcare*). As amostras foram mantidas nessa solução por 2 horas a temperatura ambiente sob agitação. Após esse período, as amostras foram passadas em agulha de fino calibre (31G) por aproximadamente 10 vezes e os ovos foram esmagados com pistilo para melhor solubilização das proteínas. As amostras foram

centrifugadas a 20000g por 30 minutos, a temperatura ambiente. A concentração de proteínas presente no sobrenadante foi determinada pelo método de Bradford, utilizando BSA diluída na mesma solução como padrão e controle da quantificação. Foram confeccionados 2 géis SDS-PAGE 12%, sendo um corado com Azul de Comassie R-250 para análise do perfil dos extratos proteicos e o outro transferido para membrana de PVDF (*Bio-Rad*). Todas as amostras foram aplicadas em quantidade aproximada de 10µg de proteína. Após a eletroforese, foi realizada a transferência das proteínas para a membrana utilizando o sistema *Mini-Trans-Blott Cell* (*Bio-Rad*) a 100V, durante 120 minutos a 4°C em tampão de transferência (Tris 25mM, glicina 192mM e metanol 20%). A membrana foi bloqueada com BSA 3% diluída em TBS-T (0,5M NaCl; 0,02M Tris pH 7,5; 0,05% Tween-20) sob agitação, por 16 horas à temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes em TBS-T 0,05% e cortada de modo que a parte inferior fosse incubada com anticorpo anti-GST (91G1) Rabbit mAb conjugado a HRP (*Cell Signaling Technology*®) na diluição 1:5000 em TBS-T 0,05% e BSA 1% e a parte superior com anticorpo monoclonal IgG1 de camundongo anti-gelsolina (clone GS-2C4 – SIGMA) na diluição 1:400, ambos por 16 horas. Após nova etapa de lavagem, a parte da membrana que foi incubada com anticorpo anti-gelsolina foi incubada com anticorpo anti-IgG1 de camundongo conjugado a HRP (*SouthernBiotech*) na diluição 1:7500 por 5 horas. Após novas lavagens, foi feita a revelação das duas partes da membrana utilizando substrato quimioluminescente com o kit ECL Prime (*GE Healthcare*). As imagens foram adquiridas no ImageQuant LAS 4000 (*GE Healthcare*). A análise da expressão das gelsolinas foi realizada por densitometria conforme descrito no item 4.8 e os resultados foram apresentados em porcentagem de níveis proteicos das gelsolinas em cada fase em relação aos valores obtidos na fase de cercária. Foram representadas 3 réplicas biológicas e a análise estatística foi realizada utilizando o teste *Kruskal-Wallis 1-way ANOVA* com *Dunn's multiple comparison test* ($P \leq 0,05$).

4.11 Infecção de camundongos com esquistossômulos silenciados

No 6º dia após a exposição de esquistossômulos aos dsRNAs de gelsolina e vilina, separados e concomitantemente, 12 camundongos/grupo foram infectados pela via subcutânea com cerca de 500 esquistossômulos. Além dos grupos experimentais, outros dois grupos de animais foram formados por camundongos infectados com esquistossômulos expostos ao dsRNA de GFP e com esquistossômulos que não foram expostos a dsRNAs. Após a contagem dos parasitos em cultura, a infecção foi realizada utilizando uma seringa de insulina acoplada a uma agulha 20G. O teste estatístico realizado foi o Unpaired t-test ($P < 0,05$).

4.11.1 Contagem do número de ovos retidos no fígado e intestino

Após a perfusão dos camundongos, o intestino e o fígado foram retirados, lavados com salina 0,8%, pesados e acondicionados em tubos de 15mL contendo 10mL de KOH 10%, por 16 horas a 4°C. Em seguida as amostras foram incubadas em banho a 37°C por 1 hora ou até a completa digestão dos órgãos. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 350g e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi ressuspensionado em salina 0,8%, seguido de nova centrifugação nas mesmas condições. Esta etapa foi repetida até a completa retirada do muco. Posteriormente, o sedimento final foi ressuspensionado em 1mL de salina 0,8% e os ovos foram contados em triplicata em lâmina contendo 10µL. Os resultados das réplicas biológicas foram analisados utilizando o GraphPad Prism (versão 5.01) e a análise estatística foi realizada empregando o teste de Unpaired t test ($P < 0,05$).

4.11.2 Oograma de fragmento do intestino

Cerca de 0,5cm do íleo terminal de cada animal foi retirado, colocado entre uma lâmina de vidro e uma lamínula de plástico transparente grosso e esmagado por uma prensa para visualizar os estádios de desenvolvimento dos ovos. Os estádios dos ovos consistem em 4 níveis de desenvolvimento do embrião até o estágio maduro com a formação do miracídio. As lâminas foram mantidas a 4°C e a análise qualitativa das mesmas foi realizada em no máximo 24 horas em microscópio óptico com aumento de 10x.

5. RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1. Padronização dos iniciadores utilizados nos ensaios de RT-qPCR

Primeiramente foi feita a padronização de todos os iniciadores utilizados neste trabalho com o intuito de estabelecer os parâmetros com quais cada iniciador atingiria maior eficiência nas reações de RT-qPCR. Os iniciadores padronizados foram: GAPDH, Fad, PAI I, gelsolina e vilina. Ao analisar os iniciadores de GAPDH, as concentrações analisadas foram: 600, 900, 1200 e 1500nM, sendo que a concentração ideal encontrada para a máxima eficiência da reação foi de 1500nM, em que a curva padrão gerada apresentou uma inclinação de -3,636 e coeficiente de correlação (R^2) igual a 0,997 (Figura 7A). A curva de dissociação do produto amplificado, denominada de curva de *melting*, apresentou somente um pico (Figura 7D). A curva de dissociação é fundamental para verificar a formação de um único produto amplificado ou se produtos inespecíficos foram também amplificados, ou a eventual formação de dímeros de *primers*, denominados *primer-dimers*. Os iniciadores de Fad e PAI I também foram padronizados utilizando diferentes concentrações, sendo obtida maior eficiência com 400nM para Fad (Figura 7B) e 900nM para PAI I (Figura 7C). Nessas concentrações, a inclinação da curva padrão e o coeficiente de correlação foram: -3,32 e 0,989 para Fad e para PAI I: -3,37 e 0,996, respectivamente. As curvas de *melting* dos iniciadores Fad e PAI I apresentaram somente um pico (Figura 7E e F).

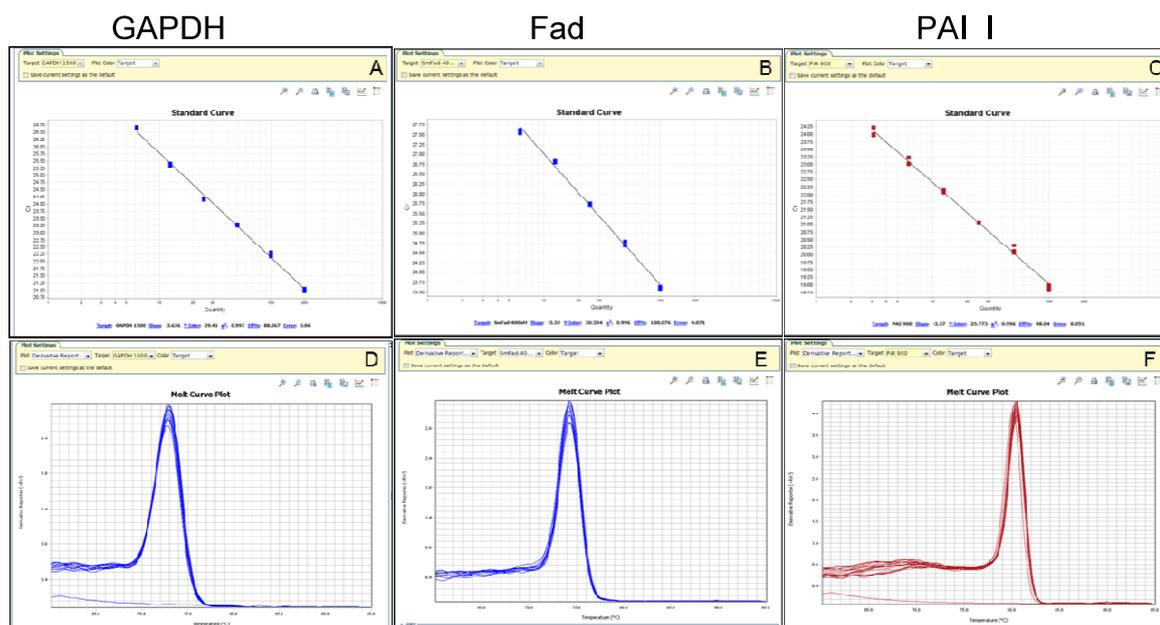


Figura 7: Padronização dos iniciadores dos genes constitutivos. A, B e C - Curva de eficiência de GAPDH a 1500nM, Fad a 400nM e PAI I a 900nM, respectivamente, geradas utilizando quantidades decrescentes de cDNA obtidas por diluição da reação de síntese de cDNA. D, E e F – Curva de dissociação de GAPDH, Fad e PAI I. O eixo-y representa o $-\Delta F/\Delta T$ (Mudança na fluorescência/mudança na temperatura) e o eixo-x representa a temperatura ($^{\circ}\text{C}$).

Para os pares de iniciadores específicos para os transcritos de gelsolina e vilina, a concentração ideal determinada foi de 400 nM e 600 nM, respectivamente. Nessas concentrações, a inclinação da curva padrão foi de -3.324 para o par de iniciadores de gelsolina e -3,24 para vilina e o R^2 foi igual a 0,989 e 0,996, respectivamente (Figura 8A e B). As curvas de *melting* também foram analisadas e apresentaram somente um pico característico de amplificação de um único produto (Figura 8C e D).

O coeficiente de determinação, também chamado de R^2 , é uma medida de ajuste de modelo estatístico linear, como a regressão linear. O R^2 varia entre 0 e 1, que indica o quanto o modelo explica os valores observados. Quanto maior o R^2 , mais explicativo é o modelo e melhor se ajusta à amostra.

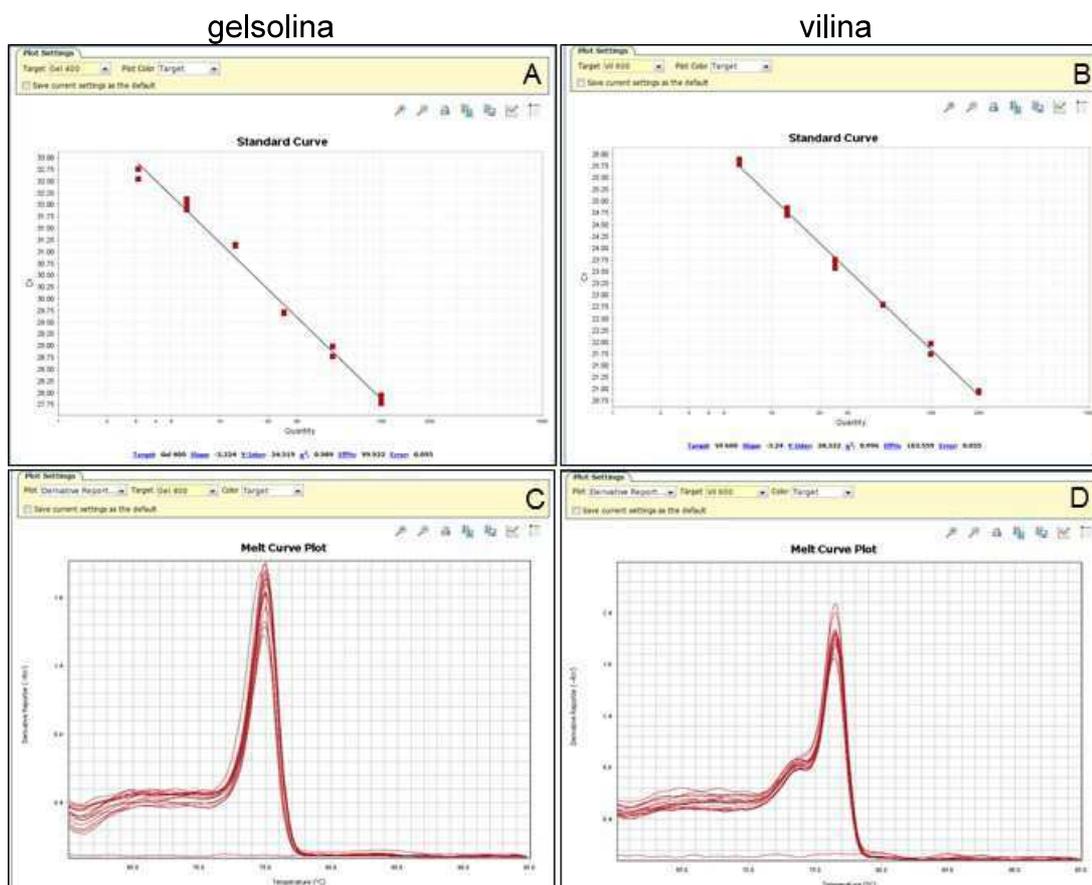


Figura 8: Padronização dos iniciadores de gelsolina e vilina. A e B- Curvas de eficiência de gelsolina a 400nM e vilina a 600nM, respectivamente, obtidas por diluição da reação de síntese de cDNA. C e D - Curvas de dissociação de gelsolina e vilina. O eixo-y representa o $-\Delta F/\Delta T$ (Mudança na fluorescência/mudança na temperatura) e o eixo-x representa a temperatura ($^{\circ}\text{C}$).

Dessa forma, os iniciadores foram devidamente validados e, portanto, utilizados para a realização dos ensaios de RT-qPCR para análise dos transcritos de gelsolina e vilina nos parasitos silenciados e entre as diversas fases do ciclo de vida.

É preciso ressaltar também que para os experimentos de silenciamento gênico todos os iniciadores utilizados para RT-qPCR foram desenhados para amplificar uma pequena região do gene que se encontra fora da região utilizada para síntese do dsRNA. Dessa forma evita-se a detecção de amplicons gerados a partir dos próprios dsRNAs como molde.

5.2. Caracterização da expressão de gelsolina e vilina em *Schistosoma mansoni*

Para caracterizar os níveis de transcritos e das proteínas alvo deste estudo nas diferentes fases do ciclo de vida do parasito, foram feitos RT-qPCR e *Western blotting* com o intuito de determinar os níveis de mRNA e de proteínas nas seguintes fases: cercárias, esquistossômulos 3 horas e 7 dias, vermes fêmeas e machos adultos, e ovos.

5.2.1. Análise de expressão gênica ao longo do ciclo de vida do parasito

Foi analisada a expressão dos mRNAs de gelsolina e vilina nas diferentes fases do ciclo de vida do *S. mansoni* por RT-qPCR. Os transcritos foram detectados em todos os estágios no ciclo de vida do *S. mansoni* analisados, sendo que os maiores níveis foram detectados em vermes adultos fêmeas, tanto para gelsolina (Figura 9A) quanto para vilina (Figura 9B), seguidos por vermes adultos machos (88% menor para gelsolina e 41% menor para vilina) e ovos (91% menor para gelsolina e 73% menor para vilina), em relação à expressão detectada dos mesmos transcritos em vermes adultos fêmeas. Os menores níveis de expressão de ambos os transcritos, novamente em relação à expressão detectada em vermes adultos fêmeas, foram observados em esquistossômulos de 3 horas (96% menor para gelsolina e 98% menor para vilina) e de 7 dias (95% menor para gelsolina e 98% menor para vilina). Foi observado um perfil similar de expressão de ambos os transcritos nas diferentes fases do ciclo de vida do parasito. Não foi detectada a expressão dos mesmos transcritos em cercárias.

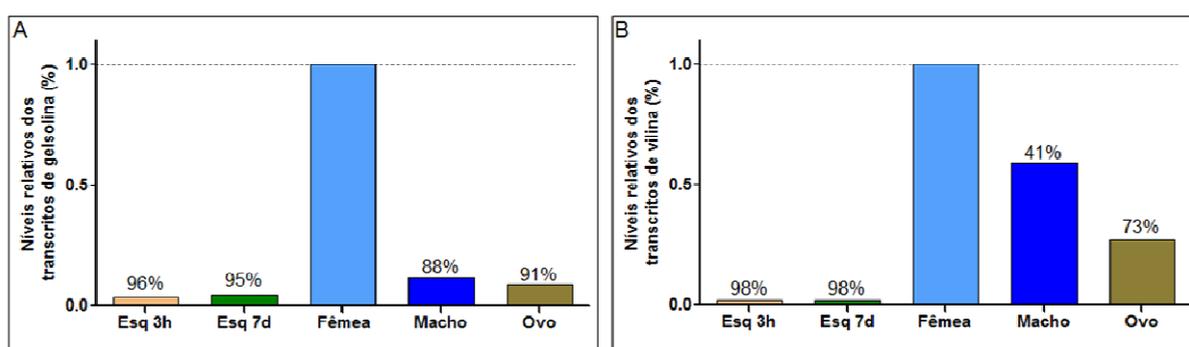


Figura 9: Análise comparativa dos níveis de transcritos de gelsolina e de vilina nas diferentes fases do *Schistosoma mansoni*. Análise dos níveis de transcritos de gelsolina (A) e de vilina (B) nas fases de esquistossômulos 3 horas e 7 dias, vermes fêmeas e machos adultos, e ovos. A linha pontilhada representa o nível normalizado dos transcritos de gelsolina e vilina nos vermes adultos fêmeas. Acima de cada barra está sendo mostrada a porcentagem de inibição da expressão dos respectivos transcritos nas diferentes fases.

5.2.2. Análise de expressão proteica ao longo do ciclo de vida do parasito

A quantificação dos níveis proteicos foi realizada somente para gelsolina em todas as fases do ciclo de vida do *S. mansoni*, devido à disponibilidade do anticorpo comercial apenas para esta proteína. Ao analisar os níveis proteicos entre as diferentes fases do parasito observou-se a expressão das gelsolinas em todas as fases do ciclo de vida analisadas, conforme verificado no ensaio de *western blotting*, e também uma relação direta entre níveis de mRNA e de proteína. Da mesma forma que foi observado para os níveis de transcritos, os maiores níveis de expressão da proteína gelsolina foram observados nas fases de vermes adultos e ovos. Por outro lado, os menores níveis de expressão foram observados em cercárias, esquistossômulos 3 horas e 7 dias com uma redução de 52,61%, 55,51% e 63,90%, respectivamente, em relação a vermes adultos (Figura 10).

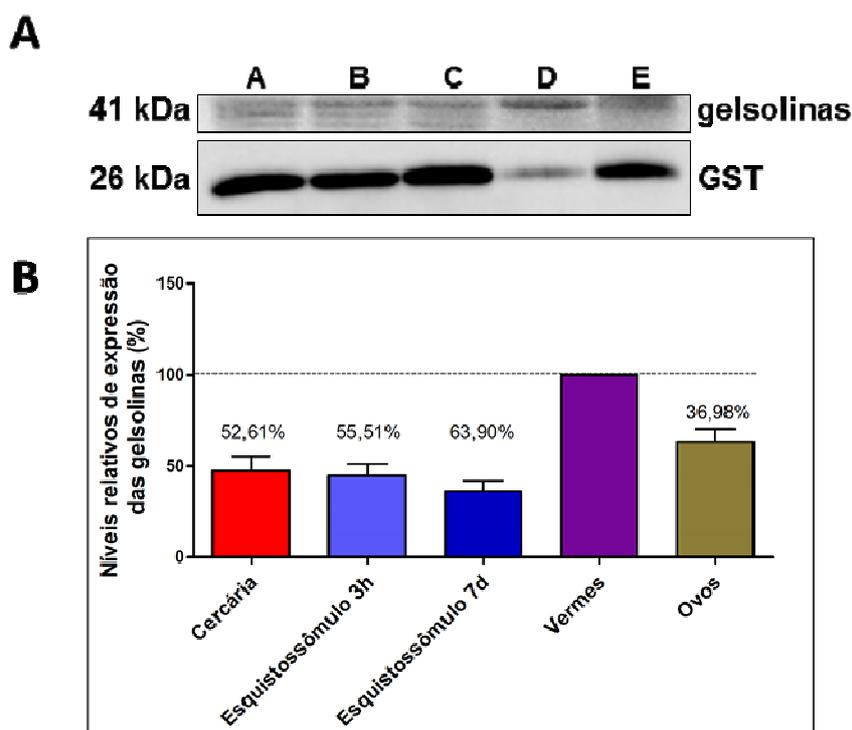


Figura 10: Níveis de expressão das gelsolinas nas diferentes fases do *Schistosoma mansoni*. (A) *Western blotting* representativo de 3 réplicas biológicas utilizando 10 μ g de extrato proteico de cada fase. A: Cercárias, B: Esquistossômulos de 3 horas, C: Esquistossômulos de 7 dias, D: Vermes adultos e E: Ovos. Foi utilizado o anticorpo monoclonal IgG1 de camundongo anti-gelsolina (1:400) e o anticorpo secundário anti-IgG1 de camundongo conjugado a HRP (1:7500). O anticorpo anti-GST conjugado a HRP (1:5000) foi utilizado como normalizador. As reações foram reveladas com o kit ECL Prime (*GE Healthcare*) e as imagens foram adquiridas no ImageQuant LAS 4000 (*GE Healthcare*). Em

(B) está representada a quantificação dos níveis proteicos das gelsolinas em cada fase em relação aos valores obtidos na fase de cercária (%). Foram analisadas 3 réplicas biológicas e a análise estatística foi realizada utilizando o teste *Kruskal-Wallis 1-way ANOVA* com *Dunn's multiple comparison test* ($P \leq 0,05$).

Várias mudanças no tegumento do parasito ocorrem durante seu ciclo de vida, tendo esse que ser remodelado completamente diversas vezes (LEOW et al., 2015). Assim, seria possível que a gelsolina de *Schistosoma mansoni*, associada ao citoesqueleto, pudesse ser fundamental para o desenvolvimento e manutenção do tegumento. Vários estudos têm sido relatados sobre a dinâmica do citoesqueleto em células eucarióticas e as proteínas envolvidas na reorganização, renovação e, principalmente, na imuno-invasão (JONES et al., 2004). A Paramiosina é um exemplo de proteína associada ao citoesqueleto que desempenha um importante papel na imuno-invasão e outras como a Sj22.6 de *Schistosoma japonicum* estão envolvidas na ativação das células do sistema imune do hospedeiro (KEENIHAN, 2001).

Ao analisar os níveis de transcritos de gelsolina e vilina em esquistossômulos de 3 horas e de 7 dias foi observada uma expressão 96% e 95% (gelsolina) e de 98% (vilina) menor em relação à fêmea. Semelhantemente os níveis proteicos das gelsolinas, nesses mesmos estágios do ciclo de vida do parasito, apresentaram o mesmo perfil, porém com uma expressão menor de 55,51% e 63,9% em relação aos vermes adultos.

A alta expressão proteica das gelsolinas no estágio adulto pode ser devido ao aumento da sua biomassa. Por outro lado, o fato da proteína ter sido detectada em altos níveis nos ovos sugere que ela pode apresentar função estrutural ou ser excênica na passagem para o lúmen intestinal antes de serem excretados com as fezes para o ambiente externo como demonstrado por Ranasinghe e colaboradores (2015) que ao analisar a proteína SmKI-1 presente na casca de ovos de *S. mansoni* observou-se o papel fundamental na proteção contra enzimas proteolíticas no intestino (RANASINGHE et al., 2015).

5.3. Imunolocalização das gelsolinas de *Schistosoma mansoni*

Ainda como parte da caracterização de expressão das gelsolinas em *S. mansoni*, foi feita a sua imunolocalização em esquistossômulos. Como mostrado na figura 11A, a gelsolina foi localizada nas camadas mais externas do tegumento do esquistossômulo de *S. mansoni*. Na figura 11B estão marcados os filamentos de actina com faloidina. Como mostrado na figura

11C, sobreposição das imagens A e B, gelsolina se co-localiza com os filamentos de actina em toda superfície do corpo, supostamente na camada muscular longitudinal localizada na zona interna do tegumento, como evidenciado no detalhe da figura 11D. Em células de vertebrados, eucariotos inferiores e plantas a gelsolina tem a função de distribuir e organizar os filamentos de actina (MÉRÉ et al., 2005). Outro potencial papel funcional da gelsolina seria ligar proteínas da membrana superficial com proteínas do citoesqueleto, como a actina (KURTIS et al., 1997). Portanto, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que gelsolina de *S. mansoni* também esteja envolvida em mecanismos de organização do citoesqueleto do parasito.

Além disso, como observado na figura 12A, a utilização de cortes em vários níveis mostrou que gelsolina também está dispersa no citoplasma de células localizadas no parênquima do parasito. Por meio da utilização de uma sonda para localização de núcleo (Figura 12C), foi possível observar que gelsolina não se localiza no núcleo celular (Figura 12D). Zeraik e colaboradores (2013), estudando um grupo de proteínas presentes no citoesqueleto de esquistossomulos, denominadas septinas, reportaram também a distribuição difusa dessas proteínas no interior dos parasitos.

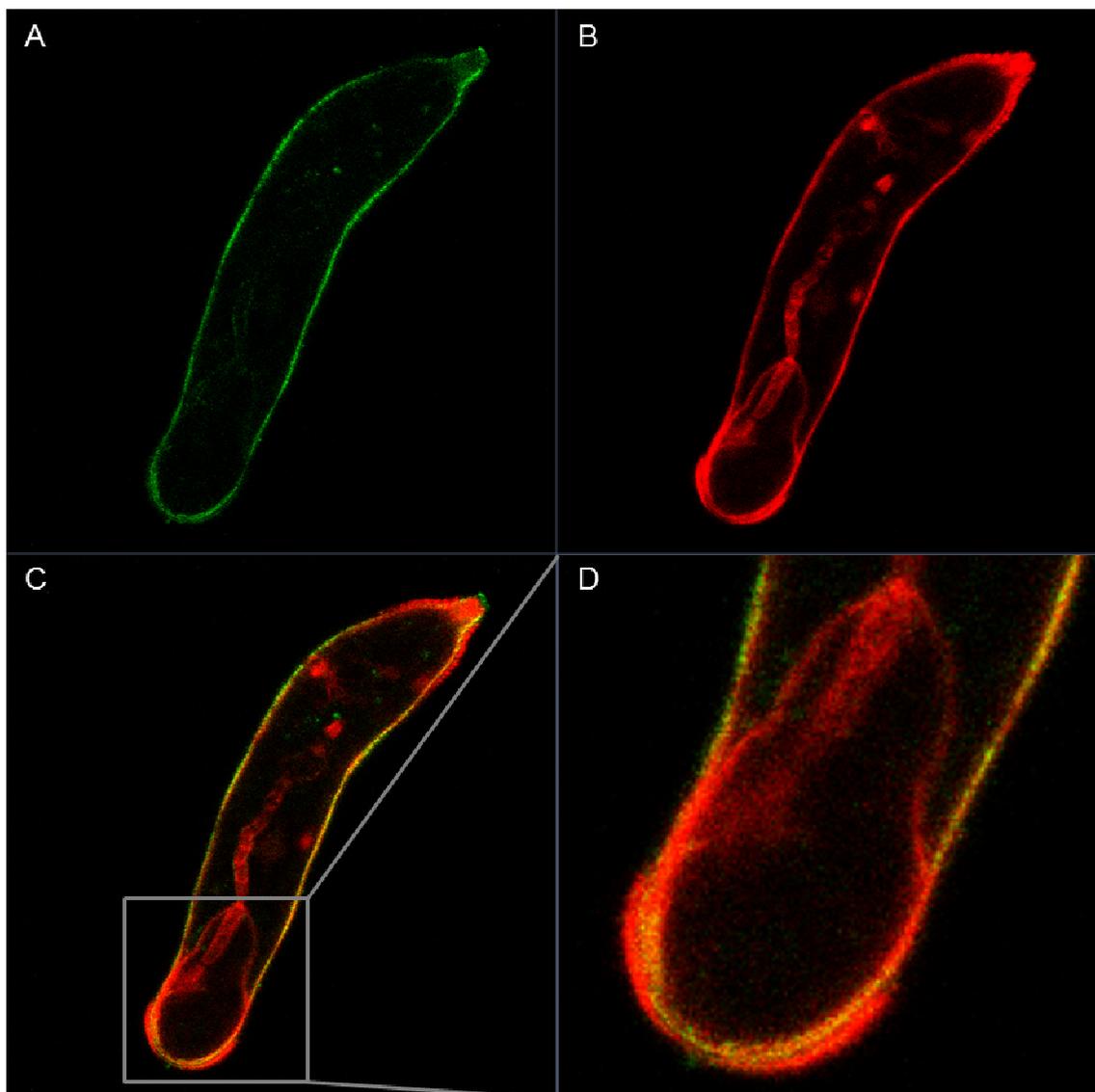


Figura 11: Imunolocalização da proteína gelsolina em esquistossômulos. A: Imagem em corte Z longitudinal de um esquistossômulo marcado com o anticorpo monoclonal IgG1 de camundongo anti-gelsolina (1:100) e o anticorpo secundário anti-IgG1 de camundongo conjugado a Alexa Fluor 488 diluído 1:200 (verde). B: Filamentos de actina marcados com Faloidina-Alexa 594 diluída 1:80 (vermelho). C: Sobreposição de A e B. Em A, B e C aumento de 63x. D: Detalhe de uma região de co-localização de gelsolina e actina (aumento 190x).

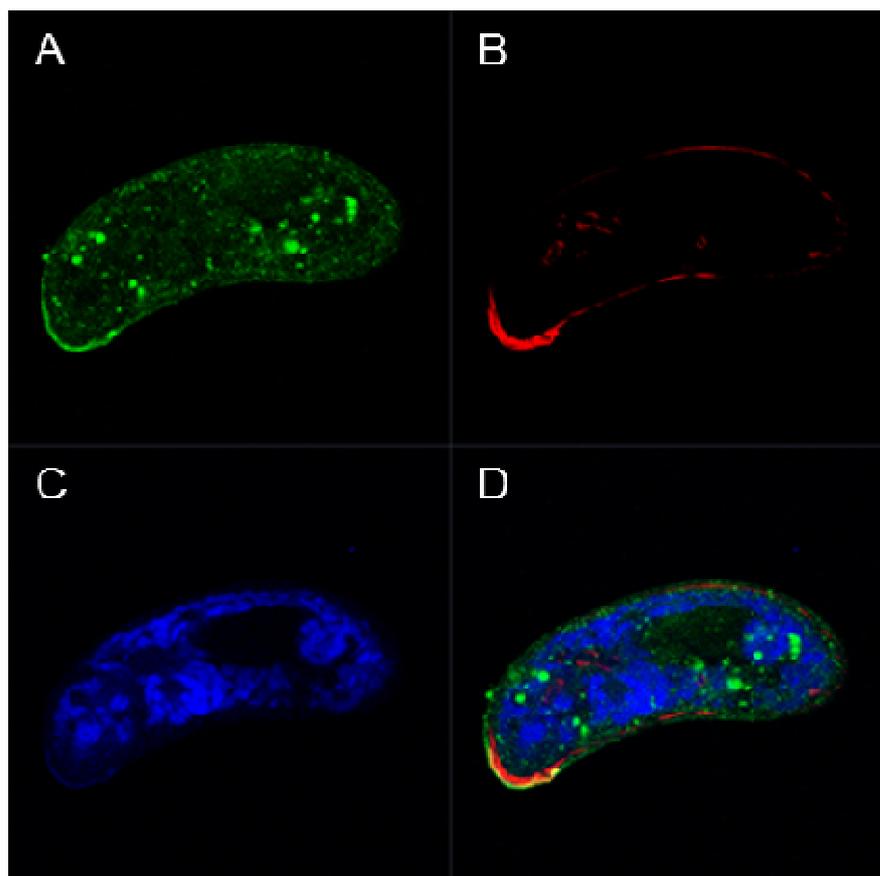


Figura 12: Imunolocalização da gelsolina em esquistossômulos utilizando a sonda TO-PRO3. A: Imagem em corte Z longitudinal de um esquistossômulo marcado com o anticorpo monoclonal IgG1 de camundongo anti-gelsolina (1:100) e o anticorpo secundário anti-IgG1 de camundongo conjugado a Alexa Fluor 488 diluído 1:200 (verde). B: Filamentos de actina marcados com Faloidina-Alexa 594 diluída 1:80 (vermelho). C: Marcação com a sonda para núcleo TO-PRO3 (1:800). D: Sobreposição das três imagens. Aumento de 63x.

5.4. Caracterização funcional das proteínas gelsolina e vilina por RNAi

Uma vez verificada a expressão da gelsolina e vilina em esquistossômulos, a próxima etapa deste trabalho foi avaliar o papel de gelsolina e vilina pela única ferramenta de genética reversa disponível em *Schistosoma*, RNA de interferência. Esta fase do ciclo de vida do parasito tem grande importância, pois é quando este organismo entra em contato com o sistema imunológico do hospedeiro definitivo pela primeira vez. Desta forma, os esquistossômulos constituem uma fase importante para intervenção no ciclo de vida do parasito, e conseqüentemente, para a interrupção da esquistossomose, posto que neste momento da infecção ainda não houve grandes danos nos tecidos do hospedeiro e ainda não se iniciou a postura de ovos, interrompendo a manutenção do ciclo do parasito. Além disso, a única droga disponível para tratamento da doença é menos efetiva em esquistossômulos.

5.4.1. Síntese de dsRNAs

Para a realização dos experimentos de silenciamento gênico por RNAi foram utilizados dsRNAs sintetizados a partir dos produtos de PCR que contêm parte da sequência da região codificadora dos genes alvo, *gelsolina* e *vilina*, e também do controle negativo inespecífico, GFP. Estes produtos de PCR foram previamente sequenciados e as sequências geradas comprovaram a identidade dos genes. Posteriormente, cada dsRNA foi purificado, quantificado e analisado em gel de agarose 1% não desnaturante corado com brometo de etídeo. Verificou-se que os três dsRNAs sintetizados apresentaram o tamanho esperado: dsRNA-GFP, dsRNA-gelsolina e dsRNA-vilina apresentaram um tamanho aproximado de 360pb, 541pb e 470pb, respectivamente (Figura 13). A diferença observada na intensidade das bandas, principalmente do dsRNA-GFP em relação às outras amostras, pode estar relacionada à quantidade de produto de PCR utilizada na reação de síntese do dsRNA ou a algum fator intrínseco da síntese do dsRNA. Inibidores típicos incluindo SDS residual, sais, EDTA e RNase podem inibir a atividade da RNA polimerase em até 50%. A concentração de todos os dsRNAs utilizada nos experimentos de silenciamento em esquistossômulos foi de 200nM.

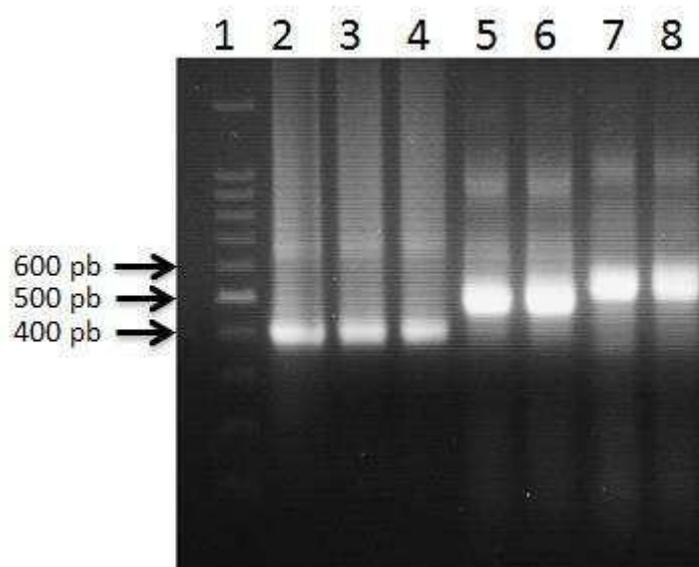


Figura 13: Análise da qualidade dos dsRNA-gelsolina, -vilina e -GFP sintetizados *in vitro*. Os produtos das reações de síntese de dsRNA (1 μ L da reação) foram analisados em gel de agarose 1%, não desnaturante, corado com brometo de etídeo. Canaleta 1: PPM - Padrão de Peso Molecular - 100bp *DNA Ladder*. Canaletas 2, 3 e 4: dsRNA-GFP; canaletas 5 e 6: dsRNA-vilina; canaletas 7 e 8: dsRNA-gelsolina.

5.4.2. Cinética de silenciamento de gelsolina e vilina em esquistossômulos tratados com dsRNAs

A realização de uma cinética para avaliação do tempo-resposta ao RNAi de cada gene é de suma importância, pois cada gene apresenta expressão diferenciada e seus transcritos apresentam particularidades, tais como: estabilidade, localização na célula e no parasito, o que afeta significativamente a resposta ao tratamento com dsRNAs. Portanto, averiguar o tempo de exposição que resulta em um maior nível de redução da expressão gênica é fundamental para determinar a eficiência do silenciamento.

Assim, o nível dos transcritos de gelsolina e vilina foi avaliado por até sete dias após a adição dos respectivos dsRNAs, juntos ou separadamente, à cultura de esquistossômulos. Durante os 7 dias, 2000 esquistossômulos de cada grupo foram retirados de cada cultura e a avaliação do silenciamento induzido pelo RNAi foi realizada por RT-qPCR. Os resultados obtidos mostraram que houve uma redução significativa nos níveis de transcritos de gelsolina (60%) e de vilina (70%) no primeiro dia de exposição dos parasitos aos seus respectivos dsRNAs separadamente, em relação aos níveis dos mesmos transcritos expressos no grupo de parasitos expostos ao dsRNA-GFP (controle negativo inespecífico) (Figura 14 A e B). Os níveis destes transcritos se mantiveram baixos até o sétimo dia de exposição aos dsRNAs. Entretanto, os maiores níveis de silenciamento obtidos foram de 95% para gelsolina, no segundo dia de exposição, e de 97% para vilina, no sétimo dia de exposição aos respectivos dsRNAs.

Devido à similaridade de amino ácidos entre a gelsolina e vilina e, na hipótese de que na ausência de um gene o outro poderia exercer sua função, foi necessária a realização de experimentos de silenciamento gênico utilizando concomitantemente os dsRNA-gelsolina e dsRNA-vilina no tratamento dos esquistossômulos.

Ao avaliar os transcritos de gelsolina e vilina em esquistossômulos expostos concomitantemente aos dsRNAs destes dois genes, observou-se que o nível do transcrito de gelsolina começou a diminuir significativamente a partir do segundo dia de exposição aos dsRNAs, sendo menor no sexto dia, no qual foi observada uma redução de 88%. Já o nível do transcrito de vilina apresentou valores de redução maiores a partir do quarto dia de exposição a ambos os dsRNAs, sendo maior no sétimo dia, apresentando 95% de redução (Figura 14C).

Como observado na figura 14, o tempo de exposição aos diferentes dsRNAs que resultou no maior nível de silenciamento foi diferente quando se compara gelsolina e vilina. Este resultado era esperado, uma vez que diferentes transcritos podem apresentar diferentes tempos de meia-vida (*turnovers*). A meia-vida dos mRNAs é determinada por uma multiplicidade de fatores, como os pequenos RNAs que atuam em elementos ricos em AU, outras proteínas desestabilizadoras ligantes de RNA, tamanho da cauda poliA, modificação no CAP 5', embora a contribuição relativa desses componentes não seja conhecida (LARSSON; SANDER e MARKS, 2010). Além disso, de acordo com Larsson e colaboradores (2010), a eficiência do silenciamento de um determinado mRNA alvo pode variar utilizando diferentes siRNAs, mostrando que certos transcritos permanecem refratários.

Na figura 14, também se observou que o tempo de exposição que levou a maior redução do nível do transcrito de gelsolina ou vilina também variou dependendo se a exposição aos dsRNAs ocorreu separada ou concomitantemente a ambos os dsRNAs. Observando a dinâmica do silenciamento ao analisar os níveis de expressão de diversos genes, Andrade e colaboradores (2014) observaram uma variação de 29% a 92% nos níveis de transcritos avaliados em diferentes dias.

Os dsRNAs- gelsolina e -vilina são considerados grandes moléculas que apresentam 541 e 470 pb, respectivamente. Ao serem capturados pela maquinaria do RNAi do verme geram siRNAs com cerca de 21 pb e certos siRNAs podem ser mais eficientes do que outros na dinâmica de silenciamento dos mRNAs específicos. Pereira e colaboradores (2008) utilizaram três siRNAs diferentes, simultaneamente, dirigidos contra o gene alvo e observaram que pequenas quantidades de siRNAs foram suficientes para reduzir em 60% os níveis de transcritos do gene *hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase* (HGPRTase) em relação ao controle. Isso nos mostra que dependendo da especificidade dos siRNAs gerados pela maquinaria de RNAi aos mRNAs, a eficiência do silenciamento gênico pode ser afetada.

Resultados observados por Tran e colaboradores (2010) demonstraram o efeito transiente da técnica de RNA de interferência. Além disso, como observado por Bartlett e Davis (2006), a variação da eficiência no silenciamento gênico pode ser influenciada também pelo tempo de exposição aos dsRNAs específicos e pela localização dos tecidos nos quais o gene de interesse é expresso.

Em vários trabalhos com *S. mansoni* foi possível verificar o efeito da variação da meia-vida dos transcritos e/ou acessibilidade para entrega de dsRNA na eficácia do *knockdown* dos genes de interesse, como: as proteínas quinase, tetraspaninas, enzimas antioxidantes e fatores de transcrição (MOURÃO et al., 2009; TRAN et al., 2010; ANDRADE et al., 2014 e PRATA, 2016).

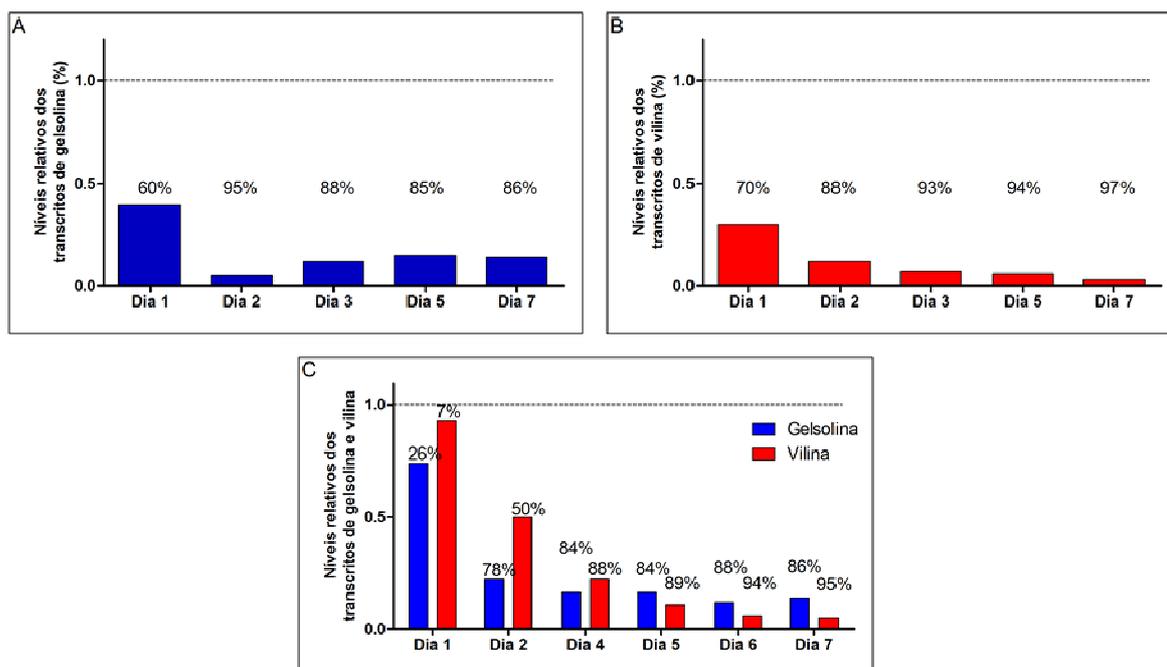


Figura 14: Níveis de transcritos de gelsolina e vilina em esquistossômulos mantidos na presença de dsRNAs por até 7 dias. Durante os 7 dias de exposição com 200nM de dsRNA de cada gene alvo, separadamente (A e B) ou concomitantemente (C), 2.000 esquistossômulos foram coletados para determinar o nível dos respectivos transcritos em relação ao nível dos mesmos transcritos em parasitos expostos ao dsRNA-GFP (controle negativo inespecífico) por RT-qPCR. Os resultados foram analisados pelo método de $\Delta\Delta CT$. A linha pontilhada representa o nível dos transcritos de gelsolina e vilina nos parasitos expostos ao dsRNA-GFP. Acima de cada barra está sendo mostrada a porcentagem de inibição dos respectivos transcritos.

5.5. Investigação do papel biológico de gelsolina e vilina - Experimentos *in vivo*

A partir da avaliação da cinética de expressão dos transcritos de gelsolina e vilina em esquistossômulos expostos aos respectivos dsRNAs, separados ou concomitantemente, foi determinado que os experimentos subsequentes seriam realizados com esquistossômulos mantidos por 6 dias na presença dos diferentes dsRNAs, uma vez que este tempo de exposição resultou em altos níveis de silenciamento dos genes alvo.

O objetivo dos próximos experimentos foi avaliar a participação das proteínas gelsolina e vilina no estabelecimento e no desenvolvimento da infecção em camundongos. Para isso, antes da infecção com esquistossômulos tratados com dsRNA, foi confirmada por RT-qPCR a redução do nível dos transcritos de gelsolina e vilina em esquistossômulos expostos aos dsRNAs, separados ou concomitantemente, nas 3 réplicas biológicas realizadas. Assim como no experimento de cinética, a expressão do transcrito de cada alvo dos dsRNAs foi comparada com a expressão do mesmo transcrito em esquistossômulos expostos ao dsRNA-GFP (controle negativo inespecífico). A análise de RT-qPCR, representada na figura 15A, mostrou uma redução de 77% na expressão dos transcritos de gelsolina e de 93% na expressão dos transcritos de vilina em esquistossômulos expostos separadamente por 6 dias aos respectivos dsRNAs. Uma eficiência de silenciamento semelhante foi obtida nos experimentos nos quais os esquistossômulos foram expostos concomitantemente aos mesmos dsRNAs, sendo observada uma redução de 71% nos níveis do transcrito de gelsolina e de 89%, nos de vilina (Figura 15B).

Apesar de satisfatória, a média dos níveis de redução da expressão de gelsolina e vilina obtida nos esquistossômulos expostos aos dsRNAs não alcançou os níveis máximos observados no experimento de cinética de silenciamento. Isso se deve a variação inerente a cada réplica biológica. Recentemente, foi demonstrado em análises de RNAseq que há maior variação na expressão gênica em esquistossômulos entre réplicas biológicas do que entre os controles sem exposição ao dsRNA e controles inespecíficos (GFP e mCherry) (GAVA et al., 2017).

Os níveis de transcritos podem variar entre genes e entre réplicas. Vários fatores podem ser levados em consideração, tais como: a função e a expressão tecido-específica do gene alvo, temperatura, acidez do meio, entre outros fatores (GAVA et al., 2017). Yang e colaboradores (2003) observaram que as taxas de decaimento de mRNA podem variar entre grupos funcionais ou devido a associação com complexos de proteínas. Assim, uma eficácia baixa do silenciamento pode ser devido a uma propriedade inerente ao mRNA (LARSSON et al., 2010).

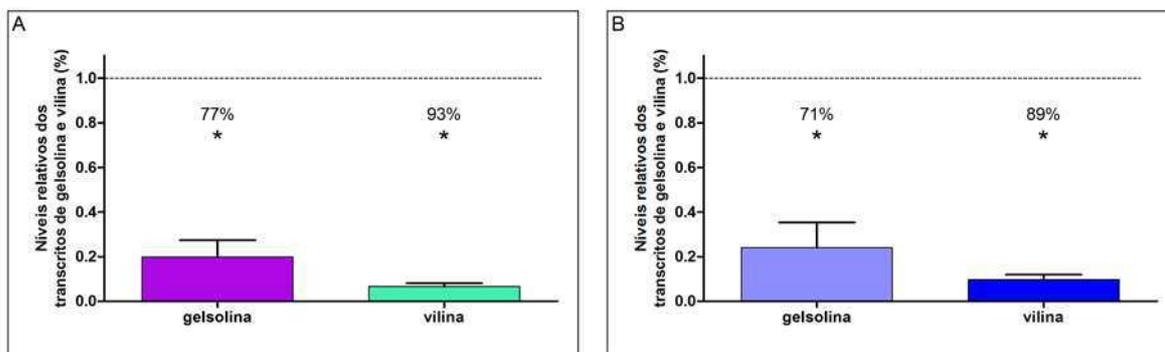


Figura15: Níveis de transcritos de gelsolima e vilina em esquistossômulos após 6 dias de exposição aos dsRNAs. Durante os 6 dias de tratamento com 200nM de dsRNA de cada gene alvo, separados (A) ou combinados (B), 4000 esquistossômulos foram coletados para determinar o nível dos respectivos transcritos em relação ao nível dos mesmos transcritos em parasitos tratados com dsRNA-GFP (controle negativo inespecífico) por RT-qPCR. A linha representa o nível dos transcritos de gelsolima e vilina nos parasitos expostos ao dsRNA-GFP. Acima de cada barra está sendo mostrada a porcentagem de inibição da expressão de cada gene. Os resultados representam a média de 3 experimentos, seguido de análise estatística *Unpaired t test* ($P < 0,05$). Os asteriscos “*” representam diferenças estatisticamente significativas.

5.6. Análises fenotípicas de esquistossômulos silenciados

5.6.1. Viabilidade

A falta de métodos apropriados para determinar de maneira eficiente alterações no fenótipo do parasito é fonte de muitas pesquisas. O desenvolvimento de métodos que possam ser reprodutíveis e não subjetivos para determinar a viabilidade do parasito é de grande interesse na comunidade científica, principalmente para aqueles que empregam técnicas relacionadas à triagem de drogas (KUNTZ et al., 2007 e AGUIAR et al., 2017), análises por RNAi, efeitos dose-resposta e manipulações gerais no desenvolvimento de parasitos (GOLD, 1997; MARCELLINO et al., 2012 e ASARNOW et al., 2015).

Neste trabalho, a viabilidade dos esquistossômulos expostos ou não aos dsRNAs foi avaliada por até trinta dias após a exposição aos dsRNAs utilizando o corante Iodeto de Propídeo (IP). O IP apresenta a propriedade de marcar ácido nucléico quando há dano no tegumento do verme ou quando ocorre a morte do mesmo (PEAK et al., 2010). A avaliação da viabilidade por microscopia é o padrão ouro estabelecido até o momento e o uso do IP ajuda na redução da subjetividade (TAVARES et al., 2016).

Os resultados mostraram que a porcentagem de vermes silenciados mortos não ultrapassou os 5% ao longo do período analisado. É importante ressaltar que no 6º dia (dia em que os esquistossômulos foram utilizados para infecção) a porcentagem de parasitos mortos variou apenas de 1 a 3% entre os diferentes grupos de tratamento (Figura 16), garantindo que no momento de infecção dos camundongos os vermes se mantinham viáveis.

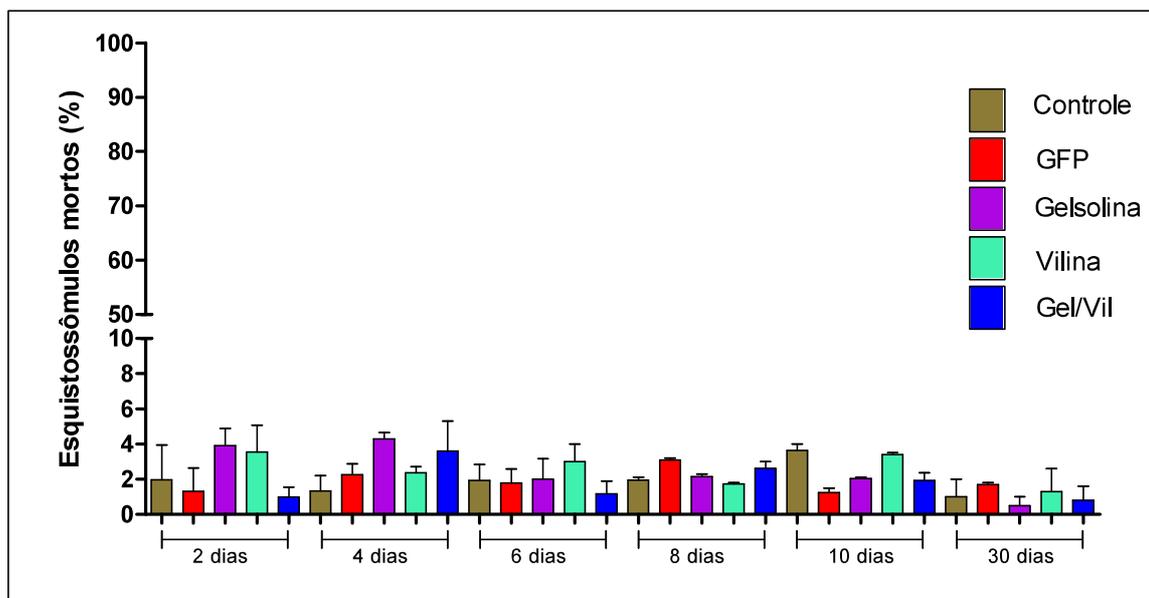


Figura 16: Determinação da viabilidade de esquistossômulos silenciados. Esquistossômulos mantidos em cultura por até 30 dias expostos aos dsRNAs-gelsolina, -vilina, -gel/vil, -GFP e grupo controle negativo foram corados com iodeto de propídeo 5 μ g/ μ L. Foram realizadas no mínimo 2 réplicas biológicas.

5.6.2. Morfologia dos esquistossômulos silenciados

Além da análise de viabilidade dos parasitos, foram avaliados outros fenótipos resultantes do silenciamento, são eles: alteração de tamanho ou área, mudança na coloração, movimentação e/ou forma dos parasitos. Para isso, foram registradas imagens em microscópio invertido dos esquistossômulos mantidos em cultura e expostos aos diferentes dsRNAs. Como observado na figura 17, não houve alterações significativas na coloração ou na forma dos esquistossômulos quando comparados os grupos controles e tratados com os dsRNAs.

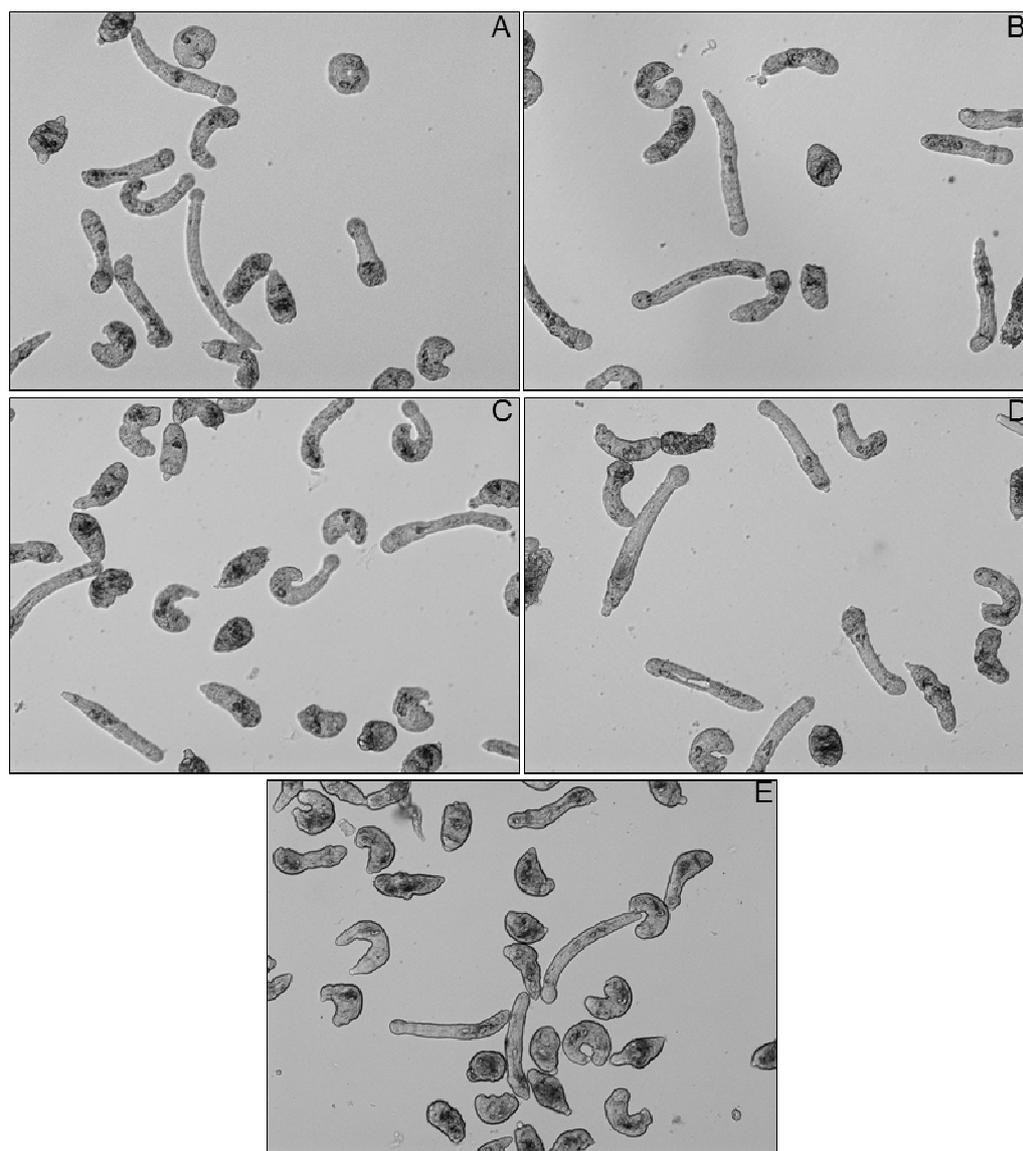


Figura 17: Avaliação fenotípica de esquistossômulos expostos aos dsRNAs por 6 dias. Imagens de campo claro, obtidas em microscópio invertido, de esquistossômulos mantidos em cultura por 6 dias após exposição aos dsRNA. A: grupo controle, B: dsRNA-GFP, C: dsRNA-dsRNA-gelsolina, D: dsRNA-vilina e E: dsRNA-gel/vil (aumento 10x). Imagens representativas de 3 réplicas biológicas.

Simultaneamente, com o intuito de se observar mudanças fenotípicas mais sutis, a área de superfície corporal dos esquistossômulos foi mensurada. Com exceção do primeiro experimento (Figura 18A), em que houve uma diminuição significativa de 5,4% na área dos vermes analisados que foram expostos ao dsRNA-vilina quando comparado aos expostos ao dsRNA-GFP, as outras réplicas não apresentaram diferenças significativas na área dos esquistossômulos dos diferentes grupos (Figuras 18B e C). Este resultado é congruente com a

análise dos demais fenótipos dos esquistossômulos avaliados por microscopia óptica, na qual não foram observadas mudanças aparentes.

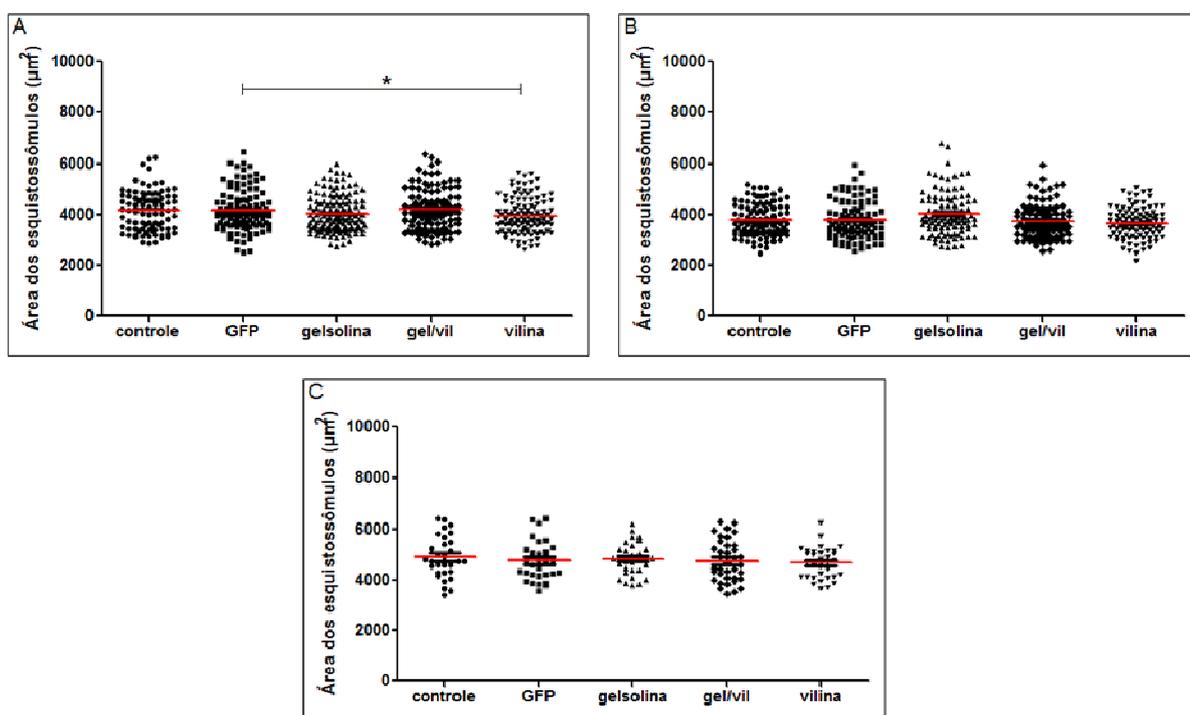


Figura 18: Área da superfície corporal dos esquistossômulos expostos por 6 dias com dsRNA-GFP, -gelsolima, -vilina e -gelsolima/-vilina. Cada ponto representa a área de um esquistossômulo (μm^2). A linha em vermelho representa a mediana. Gráficos A, B e C representam os resultados de cada réplica biológica. Análise estatística foi realizada utilizando o *Mann Whitney test* e o asterisco “*” representa diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

A ausência de mudanças nos fenótipos avaliados pode indicar que os níveis proteicos se mantiveram estáveis após o silenciamento gênico nos parasitos tratados com dsRNAs ou que o efeito do silenciamento pode estar ocasionando mudanças fenotípicas não detectáveis com os métodos utilizados. Já foi descrito que alguns genes são mais acessíveis e respondem melhor à técnica de RNAi do que outros (MOURÃO et al, 2009 e LARSSON et al., 2010). A análise de fenótipos após o silenciamento de genes que ainda não foram caracterizados completamente pode ser algo laborioso. Após o silenciamento em larga escala, somente 10% dos fenótipos podem ser associados à depleção gênica (KAMATH e AHRINGER, 2003). Na maioria das vezes, é necessário que se façam testes muito específicos para identificação de alterações, o que por vezes, é mais factível em estudos envolvendo enzimas (MOURÃO et al., 2009).

Alterações fenotípicas sutis podem ser imperceptíveis utilizando algumas técnicas. Portanto, em alguns casos, a utilização de microscopia confocal de varredura pode auxiliar na detecção de mudanças fenotípicas provenientes do silenciamento gênico. Carneiro e colaboradores (2014) utilizaram esta técnica para observar mudanças fenotípicas nos ovos dentro do oótipo, tais como: invaginações na superfície do ovo e espinhos laterais anormais. He e colaboradores (2018), ao silenciar o gene VASA de *Schistosoma japonicum*, observaram alterações nos testículos e ovários dos vermes tratados com dsRNAs específicos por meio de microscopia de varredura a *laser*. Assim, adicionalmente, esta técnica poderá ser utilizada em ensaios futuros para analisar fenótipos em esquistossômulos silenciados para os genes *gelsolina* e *vilina*.

5.6.3. Análise dos níveis proteicos das gelsolinas em parasitos silenciados

Uma vez que não foi observada alteração nos fenótipos avaliados e por haver um anticorpo comercial anti-gelsolina humana, foram realizados experimentos para verificação dos níveis proteicos em esquistossômulos tratados com os diferentes dsRNAs. Para isso, extrato proteico de vermes expostos aos dsRNAs *in vitro* por 6 dias foi analisado por *Western blotting*. O anticorpo anti-gelsolina humana utilizado neste ensaio pode não ser específico para uma das proteínas da família das gelsolinas de *S. mansoni*. Portanto, é possível que as 3 bandas detectadas com a massa molecular próxima a esperada de 41 kDa corresponda a diferentes membros de proteínas dessa família (Figura 19A).

Após análise por densitometria óptica das bandas foi visto que esquistossômulos expostos ao dsRNA-gelsolina, dsRNA-vilina e o tratamento combinado com dsRNAs-gelsolina/vilina não apresentaram diminuição nos níveis proteicos em relação aos parasitos tratados com dsRNA-GFP (Figura 19B).

Ao comparar a sequência para a qual o anticorpo anti-gelsolina humana foi produzido com as sequências de gelsolina (Figura 20A) e vilina (Figura 20B) de *S. mansoni*, foi possível identificar regiões de similaridade da gelsolina e vilina com a proteína humana, sendo as regiões destacadas alguns dos possíveis epítomos reconhecidos com maior afinidade pelo anticorpo utilizado.

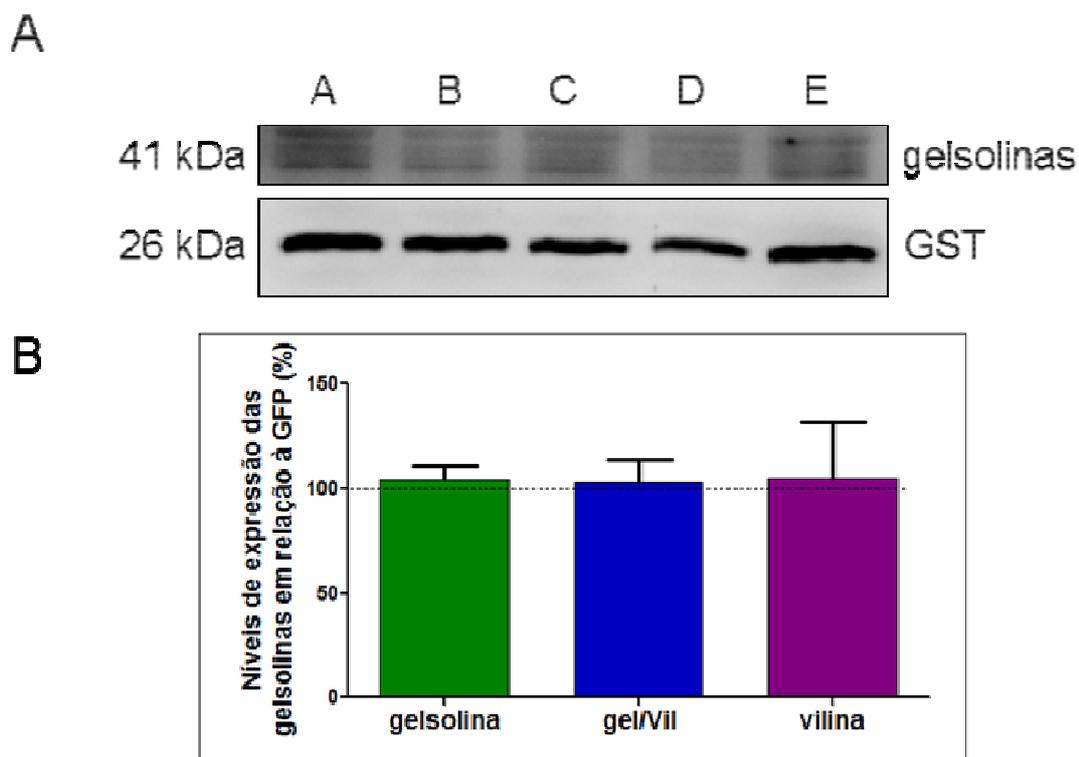


Figura 19: Níveis de expressão das gelsolinas em esquistossômulos após 6 dias de exposição aos dsRNAs. (A) *Western blotting* representativo de 3 réplicas biológicas utilizando 10 μ g de extrato proteico de esquistossômulos (10 μ g) A- controle branco; B- expostos com dsRNA-GFP; C- dsRNA-gelsolina; D- dsRNA-gel/vil e E: dsRNA-vilina. Foi utilizado o anticorpo monoclonal IgG1 de camundongo anti-gelsolina (1:400) e o anticorpo secundário anti-IgG1 de camundongo conjugado a HRP (1:7500). O anticorpo anti-GST conjugado a HRP (1:5000) foi utilizado como normalizador. As reações foram reveladas com o kit ECL Prime (*GE Healthcare*) e as imagens foram adquiridas no ImageQuant LAS 4000 (*GE Healthcare*). Em (B) está representada a quantificação por densitometria dos níveis proteicos das gelsolinas em esquistossômulos expostos aos diferentes dsRNAs em relação à expressão das gelsolinas em esquistossômulos expostos ao dsRNA-GFP (%). Os valores de intensidade foram normalizados com sinal de GST-26 (26kDa). Estão representados 3 réplicas biológicas e a análise estatística foi realizada utilizando o *Mann Whitney test* ($P \leq 0,05$).

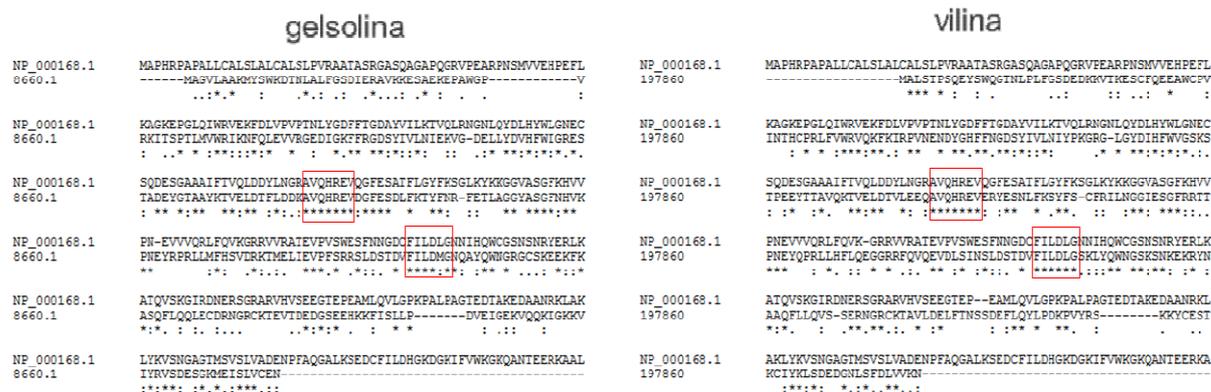


Figura 20: Comparação da sequência de aminoácidos das gelsolinas humana e de *Schistosoma mansoni*. Alinhamento das sequências de aminoácidos de gelsolina humana utilizada para produção do anticorpo comercial utilizado e das proteínas da família das gelsolinas de *S. mansoni*: (A) gelsolina (Smp_008660.1) e (B) vilina (Smp_197860). Regiões com maior similaridade entre gelsolina humana e gelsolina e vilina de *S. mansoni* estão destacadas nos retângulos.

Independente do alvo analisado foi observada uma ausência de correlação entre níveis de transcritos e de proteínas. Este resultado é comumente observado (VOGEL e MARCOTTE, 2012), ou seja, nem sempre a diminuição dos transcritos reflete em níveis proteicos alterados, podendo, por sua vez, não resultar em mudanças fenotípicas observáveis. Há vários mecanismos de regulação pós-transcricional que podem explicar o resultado observado. Assim como transcritos que possuem meia-vida curta são de difícil silenciamento, transcritos traduzidos em proteínas muito estáveis são alvos cujos fenótipos induzidos pelo silenciamento são dificilmente observados (LARSSON et al., 2010). A gelsolina parece ser uma proteína estável, uma vez que, apesar de exibir alta supressão dos níveis de transcrito, logo no primeiro dia após exposição aos dsRNAs, não foi observada redução nos níveis de proteínas. Sendo assim, a proteína detectada pode ser um produto traduzido antes do silenciamento.

Por outro lado, foi observada a existência de uma terceira banda não esperada no experimento de *Western blotting*, utilizando o anticorpo anti-gelsolina humana, que apresenta massa molecular próxima da observada para os dois membros da família de gelsolina analisados. Esta banda pode corresponder a um terceiro membro da família destas proteínas, que uma vez reconhecida pelo anticorpo utilizado, contribuiu para a manutenção dos níveis proteicos observados, mesmo no grupo de esquistossômulos expostos concomitantemente com os dsRNA-gelsolina e dsRNA- vilina (Figura 19B).

Em um experimento preliminar de imunofluorescência utilizando o mesmo anticorpo anti-gelsolina humana, esquistossômulos silenciados para gelsolina, gelsolina/vilina e vilina apresentaram uma diminuição na intensidade de fluorescência, respectivamente de: 9,9%, 11,9% e 39,1% (Figura 21F). Foi observada ainda, grande heterogeneidade na marcação das gelsolinas em esquistossômulos de um mesmo grupo de tratamento, como melhor exemplificado na figura 21A - E. Esta variação já foi previamente descrita em experimentos utilizando dsRNAs marcados com rodamina, nos quais foi observada uma variação na absorção de dsRNAs por parasitos tratados de um mesmo grupo (MOURÃO et al., 2009). Sendo assim, é possível que o nível de transcrito remanescente seja decorrente de parasitos refratários ao tratamento. Esse fato pode também contribuir para a manutenção dos níveis de proteína.

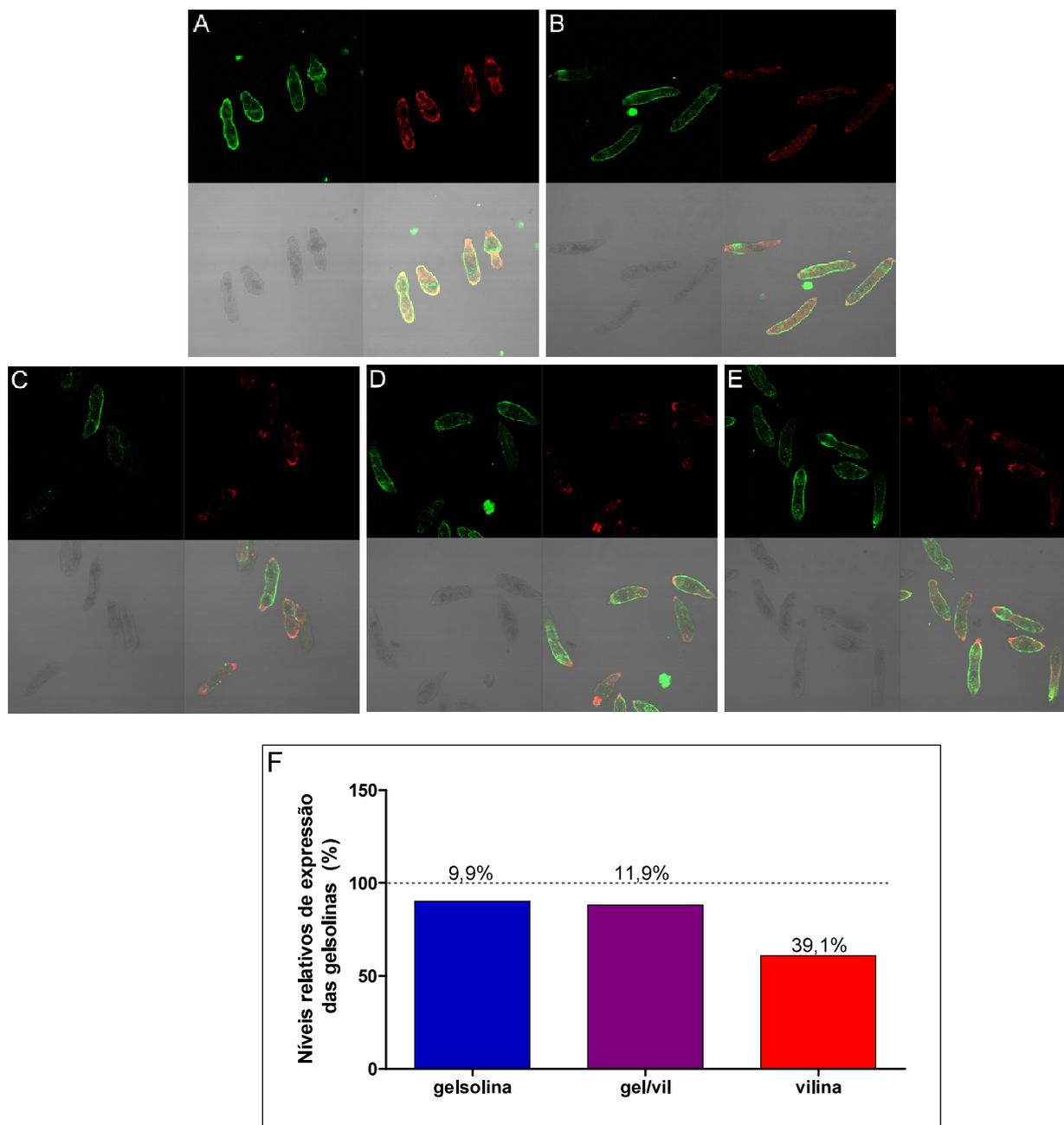


Figura 21: Detecção de proteínas da família de gelsolina de *Schistosoma mansoni* por imunofluorescência em esquistossômulos silenciados. Os vermes foram mantidos em cultura por 6 dias, expostos aos dsRNAs- gelsolina (C), -vilina (D), -gel/vil (E) e ao controle inespecífico –GFP (B) e controle branco (A). Foi utilizado o anticorpo monoclonal IgG1 de camundongo anti-gelsolina humana (1:100) e o anticorpo secundário anti-IgG1 de camundongo conjugado a Alexa Fluor 488 diluído 1:200 (verde). Filamentos de actina foram marcados com Faloidina-Alexa 594 diluída 1:80 (vermelho) mostrados nos painéis superiores à direita. Os painéis inferiores à esquerda representam as imagens em campo claro e os painéis inferiores à direita, as imagens sobrepostas. As imagens dos esquistossômulos estão mostradas no aumento de 20x. Em (F) está representada a quantificação dos níveis proteicos das gelsolinas em esquistossômulos expostos aos diferentes dsRNAs em relação à expressão das gelsolinas em esquistossômulos expostos ao dsRNA-GFP (%) obtida pela intensidade de sinal nos experimentos de imunofluorescência.

5.7. Recuperação de vermes e contagem de números de ovos

O papel biológico de gelsolina e de vilina na relação parasito-hospedeiro foi avaliado mediante infecção em camundongos. Assim, foi possível observar a transformação dos esquistossômulos em vermes adultos e o desenvolvimento dos parasitos *in vivo* durante as fases do seu ciclo de vida no hospedeiro definitivo. Como mostrado na figura 11, a gelsolina está presente também no tegumento dos esquistossômulos. Desta forma, é possível que uma alteração no conteúdo de proteínas do tegumento dos vermes pudesse aumentar a sua susceptibilidade à ação de moléculas de defesa do hospedeiro humano (JONES, et al., 2004).

Uma preocupação importante nos experimentos de RNAi é a utilização de esquistossômulos que realmente estejam silenciados e em boas condições “morfológicas”. Portanto, os vermes utilizados na infecção foram mantidos nas mesmas condições de cultura daqueles que foram utilizados para confirmar os níveis de silenciamento e a viabilidade, garantindo assim, que qualquer fenótipo observado nos testes *in vivo* fosse um efeito do silenciamento e não de fatores externos. Conforme os resultados observados no experimento de viabilidade (Figura 16), os vermes estavam viáveis e aptos para serem inoculados nos camundongos.

No 50º dia de infecção os camundongos foram perfundidos e os vermes adultos foram coletados do sistema porta e veias mesentéricas. Fígado e intestino foram retirados e os ovos contidos nesses órgãos foram extraídos e contados.

A figura 22 representa o resultado obtido em cada uma das 3 réplicas biológicas realizadas. No primeiro experimento foi observado um aumento estatisticamente significativo no número de parasitos recuperados daqueles camundongos infectados com esquistossômulos silenciados com dsRNA-gelsolina (81%) e -gel/vil (106%) em comparação com o grupo controle (Figura 22A). Ao analisarmos o terceiro experimento (Figura 22C) os mesmos grupos apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Porém, o número de vermes recuperados foi menor em relação ao grupo controle: 35% e 39% respectivamente, para esquistossômulos expostos aos dsRNA-gelsolina e -gel/vil. Apenas nos resultados obtidos do segundo experimento (Figura 22B), foi observado um aumento significativo do número de esquistossômulos silenciados com dsRNA-vilina (112%).

Como descrito acima, os resultados das 3 réplicas não foram reprodutíveis. Portanto, devido a heterogeneidade observada nos resultados, não foi possível inferir o papel das gelsolinas na infecção e no estabelecimento da doença no hospedeiro definitivo. Alguns fatores podem ter interferido nos experimentos *in vivo*, são eles: a linhagem dos camundongos utilizados é geneticamente heterogênea, a absorção dos dsRNAs pelos vermes de forma não uniforme e a ausência de alteração dos níveis proteicos levariam ao desenvolvimento normal dos vermes no hospedeiro definitivo. Esses fatores explicariam apenas em parte o resultado obtido, uma vez que houve diferença no número de parasitos recuperados até mesmo entre os grupos controles (negativos e negativos inespecíficos-GFP). Assim é possível que outros fatores possam estar envolvidos, como por exemplo: a perda de vermes no momento da inoculação ou até mesmo vermes não recuperados no sistema porta e veias mesentéricas no momento da perfusão.

A baixa recuperação de vermes também foi observada por Tran e colaboradores (2010) onde esquistossômulos foram tratados com dsRNA de tetraspaninas seguido de infecção via intramuscular em camundongos. Neste caso houve um agravo, já que a infecção intramuscular não é uma via natural e pode ter contribuído para as baixas taxas de recuperação de parasitos adultos. Outra hipótese levantada é o fato de que alguns vermes podem absorver menos dsRNAs, como observado por Mourão e colaboradores (2009) em esporocistos, e portanto, a eficácia da supressão de genes foi variável entre indivíduos possibilitando o desenvolvimento normal do verme.

O acúmulo de ovos do *S. mansoni* principalmente no fígado é a principal causa da morbidade da doença em humanos e ela determina a sua gravidade através da formação do granuloma (LENZI et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2000 e MAZIGO et al., 2017). Ao contar o número de ovos presentes no fígado (Figura 23) e no intestino (Figura 24) dos camundongos infectados com esquistossômulos silenciados, foi observada a mesma heterogeneidade dos resultados obtidos no número de vermes recuperados por perfusão nas 3 réplicas biológicas realizadas.

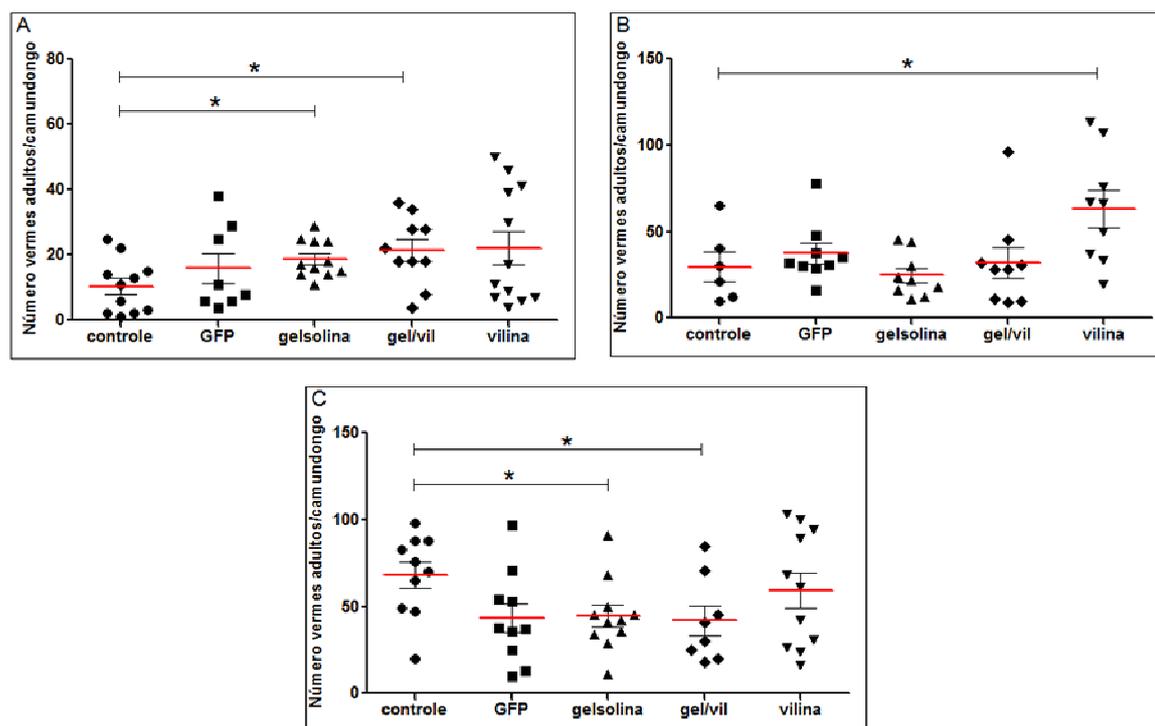


Figura 22: Número de vermes adultos recuperados de camundongos infectados com esquistossômulos silenciados. Cada ponto representa o número de vermes adultos recuperados por camundongo. A linha em vermelho representa a média do número de vermes recuperados por grupo analisado. A, B e C representam cada uma das 3 réplicas biológicas. Os asteriscos “*” representam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle. O teste estatístico aplicado foi o *Unpaired t-test* ($P < 0,05$).

Em concordância com o primeiro experimento de infecção, foi observado um aumento significativo no número de ovos no fígado de camundongos infectados com esquistossômulos silenciados com dsRNA-gelsolina (111,4%), -gel/vil (215,8%) e também -vilina (108,6%), em comparação com o grupo tratado com dsRNA-GFP (Figura 23A). O segundo experimento apresentou um aumento no número de ovos no fígado em todos os tratamentos em relação ao grupo GFP (silenciados com dsRNA-gel/vil, -vilina, respectivamente 122% e 125,5%), mas uma diminuição no número de ovos no fígado em todos os tratamentos em relação ao grupo controle não tratado (silenciados com dsRNA-gelsolina, -gel/vil, -vilina, respectivamente 62%, 35% e 34%) (Figura 23B). Ao analisar o terceiro experimento (Figura 23C), houve um aumento no número de ovos no fígado de camundongos do grupo infectado com parasitos expostos a dsRNAs-gelsolina (51%) em relação ao grupo GFP.

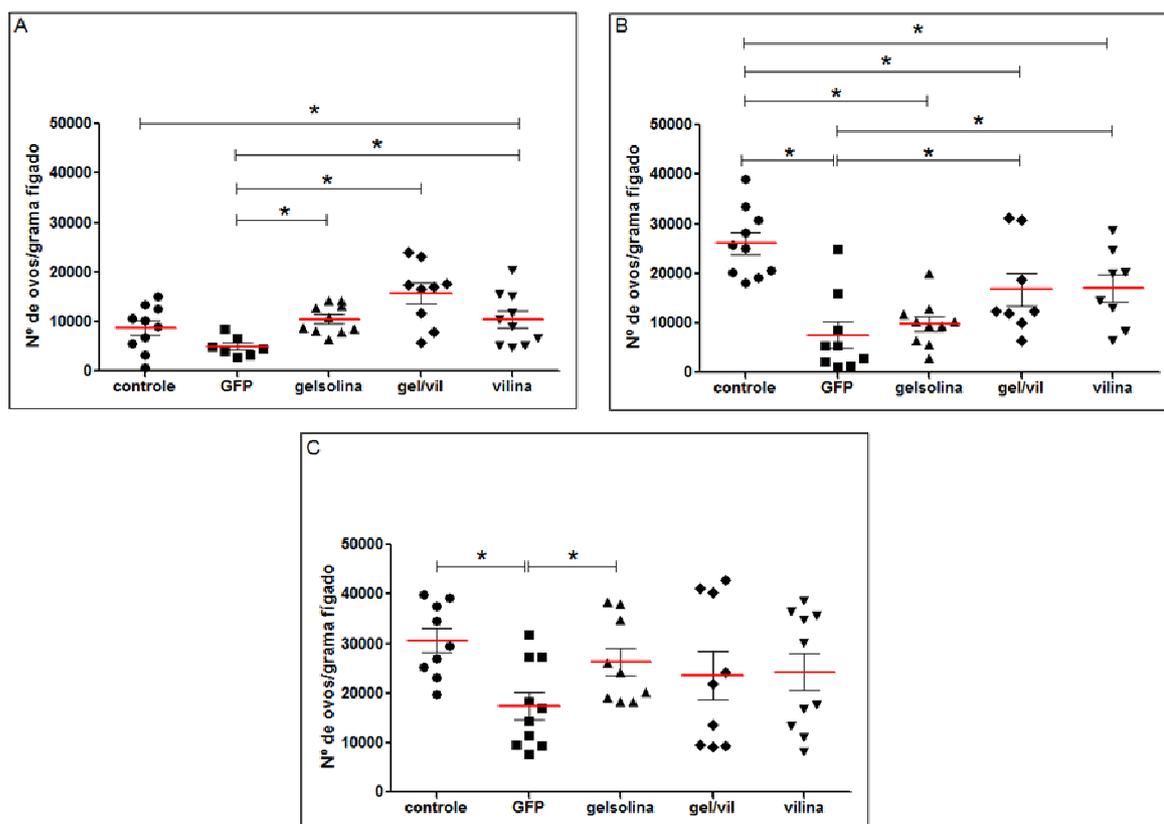


Figura 23: Número de ovos no fígado de camundongos infectados com esquistossômulos silenciados. Cada ponto representa o número de ovos por grama de fígado de camundongos dos diferentes grupos de tratamento. A linha em vermelho representa a média. A, B e C representam cada uma das 3 réplicas biológicas. O teste estatístico realizado foi o *Unpaired t-test* ($P < 0,05$). Os asteriscos (*) representam valores estatisticamente significativos em comparação aos grupos controles.

Ao ser analisado o número de ovos presentes no intestino de camundongos infectados com parasitos silenciados, no primeiro experimento detectou-se um aumento no número de ovos no intestino de camundongos infectados com esquistossômulos silenciados com dsRNA-gelsolina (183%) e -gel/vil (331%) em comparação com o grupo tratado com dsRNA-GFP (Figura 24A). No entanto, houve diferença entre os grupos infectados com parasitos controle sem tratamento e controle inespecífico-GFP (72%). No segundo experimento verificou-se uma diminuição no número de ovos no intestino de camundongos infectados com esquistossômulos expostos ao dsRNA-gel/vil (61%), quando comparado com o grupo infectado com parasitos expostos ao dsRNA-GFP. Esse resultado diferiu dos dados do mesmo grupo, quando se levou em conta o número de vermes adultos recuperados e o número de ovos presentes no fígado (Figura 24B). Nenhuma diferença entre o número de ovos acumulados no intestino foi detectada no terceiro experimento (Figura 24C).

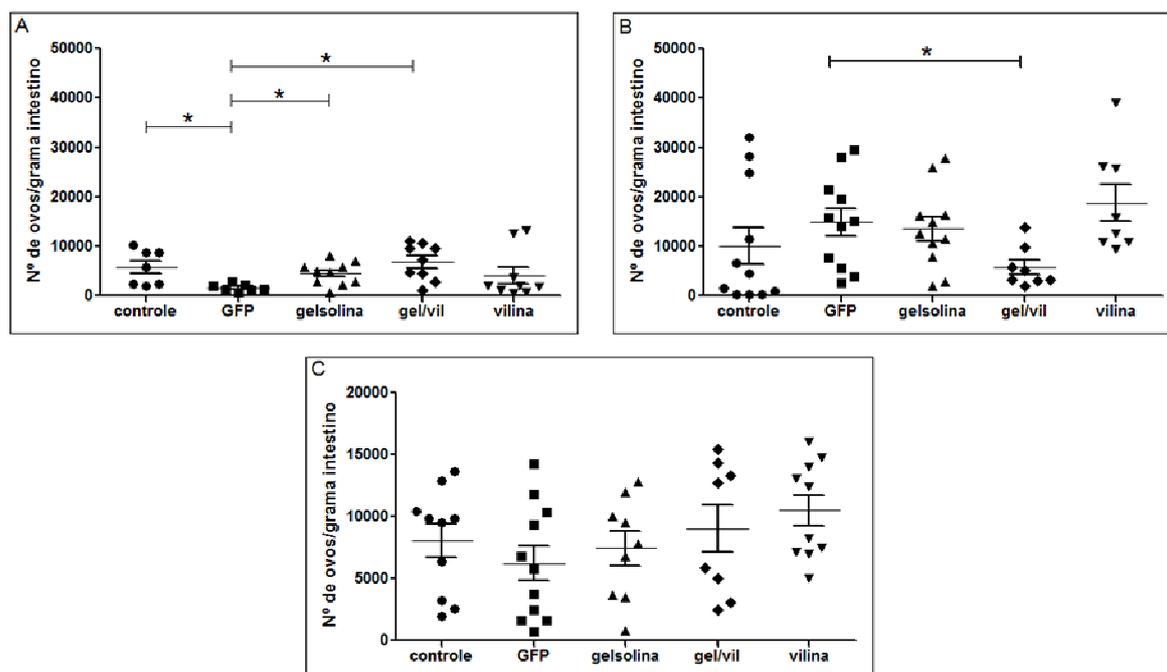


Figura 24: Número de ovos no intestino de camundongos infectados com esquistossômulos silenciados. Cada ponto representa o número de ovos por grama de intestino de camundongos dos diferentes grupos de tratamento. A linha em vermelho representa a média. A, B e C representam cada uma das 3 réplicas biológicas. O teste estatístico aplicado foi o *Unpaired t-test* ($P < 0,05$). Os asteriscos (*) representam valores estatisticamente significativos em comparação aos controles.

Em um trabalho realizado por Andrade e colaboradores (2014) foi observado que para alguns genes alvo de silenciamento o número de vermes estava diretamente relacionado ao número de ovos recuperados do fígado e não com o efeito direto do silenciamento sobre a postura de ovos, maturação da fêmea ou dos ovos. Em outro trabalho realizado por nosso grupo, foi possível relacionar o número de vermes e ovos recuperados do fígado após a perfusão de camundongos silenciados com dsRNA-YB1, um fator de transcrição de *S. mansoni* (manuscrito em preparação).

Mesmo com todo o procedimento cauteloso, é possível que não se tenha conseguido homogeneidade em todos os passos do experimento de infecção. Homogeneidade é de grande importância, uma vez que resulta em dados robustos para análise e possibilita relacionar o número de vermes à ovoposição.

5.8. Avaliação do desenvolvimento dos ovos (oograma)

A metodologia do oograma foi primeiramente descrita para avaliar sutis alterações qualitativas no desenvolvimento de ovos do *S. mansoni* (MATI e MELO, 2013). Muitas vezes o número de ovos pode ser o mesmo, antes e depois de um tratamento. Porém, os ovos podem não se tornarem maduros (ASHTON e WILSON, 2001).

Para avaliação do oograma foram considerados ovos maduros, os que apresentavam miracídio já desenvolvido e, os imaturos, foram classificados em quatro estádios de desenvolvimento diferentes. Estes foram: primeiro estádio, quando o embrião apresentava um terço do comprimento do ovo; segundo estádio, embrião com metade do comprimento do ovo; terceiro estádio, embrião com dois terços do comprimento do ovo; quarto estádio, embrião quase ocupando todo o interior do ovo (PELLEGRINO et al., 1962).

Ao analisar as lâminas contendo o íleo terminal do intestino de camundongos foram encontrados tanto ovos com miracídios maduros, quanto ovos que se encontravam nos quatro estádios de desenvolvimento. Desta forma foi demonstrado que não há diferença na maturação dos ovos presentes no intestino dos camundongos infectados com parasitos silenciados para gelsolina e vilina.

6. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho possibilitaram ampliar o conhecimento sobre gelsolina e vilina nas diferentes fases do ciclo de vida do *S. mansoni* e em esquistossômulos expostos aos dsRNAs:

- Gelsolina e vilina apresentam maior expressão gênica em vermes adultos fêmeas e maior nível proteico em cercárias.
- As gelsolinas estão localizadas de maneira difusa no parênquima dos esquistossômulos e co-localizadas com filamentos de actina no tegumento, podendo participar dos mecanismos envolvidos na organização do citoesqueleto.
- Uma redução significativa nos níveis de transcritos de gelsolina e vilina não resultou em mudanças fenotípicas observadas in vitro.

- Por meio da infecção de camundongos com esquistossômulos silenciados não foi possível inferir o papel das gelsolinas na infecção e no estabelecimento da doença no hospedeiro definitivo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATH, F. G. C. et al. Molecular approaches for the detection of *Schistosoma mansoni*: possible applications in the detection of snail infection, monitoring of transmission sites, and diagnosis of human infection. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101 Suppl, p. 145–8, set. 2006.

AGUIAR, P. H. N. et al. A high-throughput colorimetric assay for detection of *Schistosoma mansoni* viability based on the tetrazolium salt XTT. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 300, 2017.

ALLAM, A. F. Diagnosis of Schistosomiasis in Low Endemic Areas. **Schistosomiasis**, n. 13, p. 9, 2006.

ALVES, C. C. et al. Sm29, but Not Sm22.6 Retains its Ability to Induce a Protective Immune Response in Mice Previously Exposed to a *Schistosoma mansoni* Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 2, p. 1–20, 2015.

ANDERSON, L. et al. *Schistosoma mansoni* Egg, Adult Male and Female Comparative Gene Expression Analysis and Identification of Novel Genes by RNA-Seq. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 12, p. 1–26, 2015.

ANDRADE, L. F. DE et al. Regulation of *Schistosoma mansoni* Development and Reproduction by the Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 6, p. e2949, 2014.

ANDRADE, Z. A. Schistosomiasis and liver fibrosis. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 11, p. 656–663, 2009.

ARMSTRONG, J. C. MATING BEHAVIOR AND DEVELOPMENT OF SCHISTOSOMES IN THE MOUSE. **The Journal of parasitology**, v. 51, p. 605–16, ago. 1965.

ASARNOW, D. et al. The QDREC web server: Determining dose-response characteristics of complex macroparasites in phenotypic drug screens. **Bioinformatics**, v. 31, n. 9, p. 1515–1518, 2015.

ASHTON, P. D.; WILSON, R. A. The schistosome egg: Development and secretions The schistosome egg: development and secretions. v. 6, n. July 2016, p. 329–338, 2001.

ATHMAN, R.; LOUVARD, D.; ROBINE, S. III. How is villin involved in the actin cytoskeleton dynamics in intestinal cells? **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 283, n. 3, p. G496–G502, 2002.

BALLOUL, J. M. et al. A purified 28,000 dalton protein from *Schistosoma mansoni* adult worms protects rats and mice against experimental schistosomiasis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 138, n. 10, p. 3448–53, 15 maio 1987.

BARTLETT, D. W.; DAVIS, M. E. Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging. **Nucleic Acids**

Research, v. 34, n. 1, p. 322–333, 2006.

BAULCOMBE, D. RNA silencing in plants. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 356–363, 2004.

BERGQUIST, N. R.; LEONARDO, L. R.; MITCHELL, G. F. Vaccine-linked chemotherapy: Can schistosomiasis control benefit from an integrated approach? **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 3, p. 112–117, 2005.

BLOCH, E. H. In Vivo Microscopy of Schistosomiasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 29, n. 1, p. 62–70, 1 jan. 1980.

BOYLE, J. P. et al. Using RNA interference to manipulate endogenous gene expression in *Schistosoma mansoni* sporocysts. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 128, n. 2, p. 205–15, maio 2003.

BOULANGER, D. et al. Immunization of mice and baboons with the recombinant Sm28GST affects both worm viability and fecundity after experimental infection with *Schistosoma mansoni*. **Parasite Immunology**, v. 13, n. 5, p. 473–490, set. 1991.

BRASCHI, S.; WILSON, R. A. Proteins exposed at the adult schistosome surface revealed by biotinylation. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 5, n. 2, p. 347–56, 2006.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–22, abr. 2009.

CALDAS, I. R. et al. Human schistosomiasis mansoni: Immune responses during acute and chronic phases of the infection. **Acta Tropica**, v. 108, n. 2–3, p. 109–117, 2008.

CARDOSO, F. C. et al. *Schistosoma mansoni* tegument protein Sm29 is able to induce a Th1-type of immune response and protection against parasite infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 10, 2008.

CARNEIRO, V. C. et al. Epigenetic Changes Modulate Schistosome Egg Formation and Are a Novel Target for Reducing Transmission of Schistosomiasis. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 5, 2014.

CARTHEW, R. W.; SONTHEIMER, E. J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 642–655, 2009.

CARVALHO, O. DOS S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. *Schistosoma Mansoni* e Esquistossomose: Uma Visão Multidisciplinar. **Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar**, p. 960, 2008.

CASTRO-BORGES, W. et al. Enzymatic shaving of the tegument surface of live schistosomes for proteomic analysis: A rational approach to select vaccine candidates. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 3, 2011.

COLLEY, D. G. et al. A five-country evaluation of a point-of-care circulating cathodic antigen urine assay for the prevalence of *Schistosoma mansoni*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 3, p. 426–432, 2013.

COLLEY, D. G.; SECOR, W. E. Immunology of human schistosomiasis. **Parasite Immunology**, v. 36, n. 8, p. 347–357, 2014.

COOPER, J. A. et al. Localization and Mobility of Gelsolin in Cells Fluorescence Photobleaching Recovery : Data Analysis Fluorescence Photobleaching Recovery : **Cell**, v. 106, n. April, p. 1229–1240, 1988.

CORRÊA-OLIVEIRA, R. et al. Analysis of the effects of treatment of human *Schistosoma mansoni* infection on the immune response of patients from endemic areas. **Acta tropica**, v. 77, n. 1, p. 141–6, 2000.

CURWEN, R. S. et al. The *Schistosoma mansoni* soluble proteome: A comparison across four life-cycle stages. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 138, n. 1, p. 57–66, 2004.

DE MORAES MOURÃO, M. et al. Phenotypic screen of early-developing larvae of the blood fluke, *Schistosoma mansoni*, using RNA interference. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 8, 2009.

DOS REMEDIOS, C. G. et al. Actin Binding Proteins: Regulation of Cytoskeletal Microfilaments. **Physiological Reviews**, v. 83, n. 2, p. 433–473, 2003.

DRUMMOND, M. G. et al. Molecular characterization of the *Schistosoma mansoni* zinc finger protein SmZF1 as a transcription factor. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 11, p. 1–10, 2009.

EBERL, M. et al. Cellular and humoral immune responses and protection against schistosomes induced by a radiation-attenuated vaccine in chimpanzees. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 9, p. 5352–5362, 2001.

FERRARI, T. C. A.; MOREIRA, P. R. R. Neuroschistosomiasis: Clinical symptoms and pathogenesis. **The Lancet Neurology**, v. 10, n. 9, p. 853–864, 2011.

FILIPOWICZ, W. RNAi: The nuts and bolts of the RISC machine. **Cell**, v. 122, n. 1, p. 17–20, 2005.

FIRE, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 806–811, 1998.

FONSECA, C. T.; OLIVEIRA, S. C.; ALVES, C. C. Eliminating schistosomes through vaccination: What are the best immune weapons? **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. MAR, p. 1–8, 2015.

GAVA, S. G. et al. *Schistosoma mansoni*: Off-target analyses using nonspecific double-stranded RNAs as control for RNAi experiments in schistosomes. **Experimental Parasitology**, v. 177, p. 98–103, 2017.

GENTILE, R. et al. Evaluation of immunological, parasitological and molecular methods for the diagnosis of *Schistosoma mansoni* infection before and after chemotherapy treatment with praziquantel in experimentally infected *Nectomys squamipes*. **Veterinary Parasitology**, v. 180, n. 3–4, p. 243–249, 2011.

GOLD, D. Assessment of the viability of *Schistosoma mansoni* schistosomula by comparative uptake of various vital dyes. **Parasitology Research**, v. 83, n. 2, p. 163–169, 1997.

GONÇALVES DE ASSIS, N. R. et al. DNA vaccine encoding the chimeric form of *Schistosoma mansoni* Sm-TSP2 and Sm29 confers partial protection against challenge infection. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–15, 2015.

GROBUSCH, M. P. et al. Imported schistosomiasis in Europe: sentinel surveillance data from TropNetEurop. **Journal of travel medicine**, v. 10, n. 3, p. 164–169, 1999.

GRYSEELS, B. et al. Human schistosomiasis. **Lancet**, v. 368, n. 9541, p. 1106–1118, 2006.

HAAS, W. et al. Recognition and invasion of human skin by *Schistosoma mansoni* cercariae: the key role of L-arginine. *Parasitology*, 124: 153–167, 2002.

HAMILTON, A.; BAULCOMBE, D. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. **Science**, v. 286, n. 5441, p. 1997–2000, 1999.

HARNETT, W.; KUSEL, J. R. Increased exposure of parasite antigens at the surface of adult male *Schistosoma mansoni* exposed to praziquantel in vitro. **Parasitology**, v. 93 (Pt 2), p. 401–5, out. 1986.

HE, S. et al. Functions of the Vasa gene in *Schistosoma japonicum* as assessed by RNA interference. **Gene**, v. 638, n. September 2017, p. 13–19, 2018.

HEWITSON, J. P.; MAIZELS, R. M. Vaccination against helminth parasite infections. **Expert Review of Vaccines**, v. 13, n. 4, p. 473–487, 2014.

HOFFMANN, K. F.; STRAND, M. Molecular Characterization of a 20 . 8-kDa *Schistosoma mansoni* Antigen. v. 272, n. 23, p. 14509–14515, 1997.

HOLTFRETER, M. C. et al. *Schistosoma haematobium* infections acquired in Corsica, France, August 2013. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 22, p. 2013–2015, 2014.

JANMEY, P. A. et al. Interactions of gelsolin and gelsolin-actin complexes with actin. Effects of calcium on actin nucleation, filament severing, and end blocking. **Biochemistry**, v. 24, n. 14, p. 3714–23, 2 jul. 1985.

JIN, Y. M. et al. Comparison of recombinant proteins from *Schistosoma japonicum* for schistosomiasis diagnosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 3, p. 476–480, 2010.

JONES, M. K. et al. The cytoskeleton and motor proteins of human schistosomes and their roles in surface maintenance and host-parasite interactions. **BioEssays**, v. 26, n. 7, p. 752–765, 2004.

JONES, M. K. et al. Correlative and dynamic imaging of the hatching biology of *Schistosoma japonicum* from eggs prepared by high pressure freezing. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 11, 2008.

JORDAN, P. The biology of schistosomes; from genes to Latrines. **Parasitology Today**, v. 4, n. 12, p. 361–362, dez. 1988.

KAMATH, R. S.; AHRINGER, J. Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. **Methods**, v. 30, n. 4, p. 313–321, 2003.

KARIUKI, T. M. et al. Previous or ongoing schistosome infections do not compromise the efficacy of the attenuated cercaria vaccine. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 7, p. 3979–3986, 2006.

KATZ, N.; PEIXOTO, S. V. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 3, p. 303–308, 2000.

KEENIHAN, S. H. Receptor for Fc on the surface of schistosomes. **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 6, p. 468, 2001.

KINCAID-SMITH, J. et al. Emerging Schistosomiasis in Europe: A Need to Quantify the Risks. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 8, p. 600–609, 2017.

KING, C. H. Human Schistosomiasis. **HHS Public Access**, v. 383, n. 9936, p. 2253–2264, 2015.

KLOETZEL, K. A collagenase-like enzyme diffusing from eggs of *Schistosoma mansoni*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 4, p. 608–609, jan. 1967.

KOTHAKOTA, S. et al. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: Effector of morphological change in apoptosis. **Science**, v. 278, n. 5336, p. 294–298, 1997.

KUNTZ, A. N. et al. Thioredoxin glutathione reductase from *Schistosoma mansoni*: An essential parasite enzyme and a key drug target. **PLoS Medicine**, v. 4, n. 6, p. 1071–1086, 2007.

KURTIS, J. D. et al. Identification and molecular cloning of a 67-kilodalton protein in *Schistosoma japonicum* homologous to a family of actin-binding proteins. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 1, p. 344–347, 1997.

LAMBERTUCCI, J. R. Acute schistosomiasis mansoni: Revisited and reconsidered. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 4, p. 422–435, 2010.

LARSSON, E.; SANDER, C.; MARKS, D. mRNA turnover rate limits siRNA and microRNA efficacy. **Molecular Systems Biology**, v. 6, n. 433, p. 1–9, 2010.

LENZI, H. L. et al. Histoarchitecture of Schistosomal Granuloma Development and Involution: Morphogenetic and Biomechanical Approaches. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93 SUPPL., n. Mariano 1995, p. 141–151, 1998.

LEOW, C. Y. et al. Structure-function analysis of apical membrane-associated molecules of the tegument of schistosome parasites of humans: Prospects for identification of novel targets for parasite control. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 7, p. 1653–1663, 2015.

LI HSŪ, S. Y.; HSŪ, H. F.; BURMEISTER, L. F. *Schistosoma mansoni*: Vaccination of mice with highly X-irradiated cercariae. **Experimental Parasitology**, v. 52, n. 1, p. 91–104, 1981.

LIEPIŃA, I. et al. Molecular dynamics study of a gelsolin-derived peptide binding to a lipid bilayer containing phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. **Biopolymers - Peptide Science Section**, v. 71, n. 1, p. 49–70, 2003.

LINDER, E.; THORS, C. *Schistosoma mansoni*: praziquantel-induced tegumental lesion exposes actin of surface spines and allows binding of actin depolymerizing factor, gelsolin. **Parasitology**, v. 105 (Pt 1, p. 71–9, ago. 1992.

LIU, J. L. et al. Ultrastructural localization of Sm28 GST protective antigen in *Schistosoma mansoni* adult worms. **Parasitology**, v. 113 (Pt 4, p. 377–91, out. 1996.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LU, M. et al. An analysis of human microRNA and disease associations. **PLoS ONE**, v. 3, n. 10, p. 1–5, 2008.

LUDOLF, F. et al. Serological Screening of the *Schistosoma mansoni* Adult Worm Proteome. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 3, 2014.

MARCELLINO, C. et al. WormAssay: A novel computer application for whole-plate motion-based screening of macroscopic parasites. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 1, 2012.

MATI, V. L. T.; MELO, A. L. Current applications of oogram methodology in experimental schistosomiasis; fecundity of female *Schistosoma mansoni* and egg release in the intestine of AKR/J mice following immunomodulatory treatment with pentoxifylline. **Journal of Helminthology**, v. 87, n. July 2017, p. 115–124, 2013.

MAZIGO, H. D. et al. *Schistosoma mansoni* Infection and Its Related Morbidity among Adults Living in Selected Villages of Mara Region , North-Western Tanzania : A Cross-Sectional Exploratory Study. v. 55, n. 5, p. 533–540, 2017.

MCGOUGH, A. M. et al. The gelsolin family of actin regulatory proteins: modular structures, versatile functions. **FEBS letters**, v. 552, n. 2–3, p. 75–81, 25 set. 2003.

MEHLHORN, H. et al. In vivo and in vitro experiments on the effects of praziquantel on *Schistosoma mansoni*. A light and electron microscopic study. **Arzneimittel-Forschung**, v. 31, n. 3a, p. 544–54, 1981.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Further 1983.52:711–60. 1983.

MENDONÇA, A. M. B. et al. The susceptibility of recent isolates of *Schistosoma mansoni* to praziquantel. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 58, n. 1, p. 1–6, 2016.

MÉRÉ, J. et al. Gelsolin binds to polyphosphoinositide-free lipid vesicles and

simultaneously to actin microfilaments. **The Biochemical journal**, v. 386, p. 47–56, 2005a.

MÉRÉ, J. et al. Gelsolin binds to polyphosphoinositide-free lipid vesicles and simultaneously to actin microfilaments. **Biochemical Journal**, v. 386, n. 1, p. 47–56, 15 fev. 2005b.

MEYER, T. et al. Taste, a new incentive to switch to (R)-praziquantel in schistosomiasis treatment. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 1, p. 3–7, 2009.

MOURÃO, M. DE M. et al. Role of the Endogenous Antioxidant System in the Protection of *Schistosoma mansoni* Primary Sporocysts against Exogenous Oxidative Stress. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 11, p. e550, nov. 2009a.

MOURÃO, M. DE M. et al. Role of the Endogenous Antioxidant System in the Protection of *Schistosoma mansoni* Primary Sporocysts against Exogenous Oxidative Stress. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 11, p. e550, 17 nov. 2009b.

PEAK, E.; CHALMERS, I. W.; HOFFMANN, K. F. Development and validation of a quantitative, High-throughput, Fluorescent-based bioassay to detect schistosoma viability. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 7, 2010.

PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 7, p. 499–511, 2002.

PELLEGRINO, J. et al. New Approach to the Screening of Drugs in Experimental Schistosomiasis *Mansoni* in Mice *. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 11, n. 2, p. 201–215, 1 mar. 1962.

PEREIRA, T. C. et al. *Schistosoma mansoni*: Evaluation of an RNAi-based treatment targeting HGPRase gene. **Experimental Parasitology**, v. 118, n. 4, p. 619–623, 2008.

PICARD, M. A. L. et al. Sex-Biased Transcriptome of *Schistosoma mansoni*: Host-Parasite Interaction, Genetic Determinants and Epigenetic Regulators Are Associated with Sexual Differentiation. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 9, p. 1–28, 2016.

PINTO-ALMEIDA, A. et al. Morphological characteristics of *Schistosoma mansoni* PZQ-resistant and -susceptible strains are different in presence of Praziquantel. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. APR, p. 1–11, 2016.

PRATA, I. O.; PRATA, I. O. Caracterização funcional do fator de transcrição SmZF1 de *Schistosoma mansoni* por interferência de RNA (RNAi) Caracterização funcional do fator de transcrição SmZF1 de *Schistosoma mansoni* por interferência de RNA (RNAi). p. 1–110, 2016.

RAMALHO-PINTO, F. J. et al. *Schistosoma mansoni*: Defined system for stepwise transformation of cercaria to schistosomule in vitro. **Experimental Parasitology**, v. 36, n. 3, p. 360–372, 1974.

RANASINGHE, S. L. et al. Functional expression of a novel Kunitz type protease inhibitor from the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2015.

REDMAN, C. A. et al. Praziquantel: An urgent and exciting challenge. **Parasitology Today**, v. 12, n. 1, p. 14–20, 1996.

RESENDES, A. P. D. C.; SOUZA-SANTOS, R.; BARBOSA, C. S. Internação hospitalar e mortalidade por esquistossomose mansônica no Estado de Pernambuco, Brasil, 1992/2000. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n. 5, p. 1392–1401, 2005.

REVENU, C. et al. The co-workers of actin filaments: From cell structures to signals. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 8, p. 635–646, 2004.

RIBEIRO, F. et al. The effect of praziquantel treatment on glutathione concentration in *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, v. 116 (Pt 3, p. 229–236, 1998.

ROLLINSON, D. et al. Time to set the agenda for schistosomiasis elimination. **Acta Tropica**, v. 128, n. 2, p. 423–440, 2013.

SCHOLTE, R. G. C. et al. Predictive risk mapping of schistosomiasis in brazil using bayesian geostatistical models. **Acta Tropica**, v. 132, n. 1, p. 57–63, 2014.

SELDEN, L. A. et al. Severing of F-actin by the amino-terminal half of gelsolin suggests internal cooperativity in gelsolin. **Biophysical Journal**, v. 75, n. 6, p. 3092–3100, 1998.

SIDDIQLJI, A. A.; PODESTA, R. O. N. B.; CLARKE, M. W. *Schistosoma mansoni* : Characterization and Identification of Proteins Associated with the Apical Plasma Membrane and Envelope tion between phenyl-Sepharose and CaBPs was utilized to isolate CaBPs from *Schistosoma mansoni* . Radiolabeled samples were patt. v. 68, p. 63–68, 1991.

SIDDIQUI, A. A.; SIDDIQUI, B. A.; GANLEY-LEAL, L. Schistosomiasis vaccines. **Human Vaccines**, v. 7, n. 11, p. 1192–1197, 2011.

SILACCI, P. et al. Gelsolin superfamily proteins: Key regulators of cellular functions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, n. 19–20, p. 2614–2623, 2004.

SKELLY, P. J.; DA'DARA, A.; HARN, D. A. Suppression of cathepsin B expression in *Schistosoma mansoni* by RNA interference. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 4, p. 363–369, 2003.

SOARES, Z. G. et al. Viral RNA recognition by the *Drosophila* small interfering RNA pathway. **Microbes and Infection**, v. 16, n. 12, p. 1013–1021, 2014.

STEINMANN, P. et al. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **Lancet Infectious Diseases**, v. 6, n. 7, p. 411–425, 2006.

SUN, H. Q. et al. Regulatory Protein *. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 32, p. 33179–33182, 1999.

TAVARES, N. C. et al. Schistosomiasis: Setting Routes for Drug Discovery. In: **Special Topics in Drug Discovery**. [s.l.] InTech, 2016.

TENDLER, M. et al. A *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein, Sm14, is the

potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 1, p. 269–73, 1996.

TENDLER, M.; SIMPSON, A. J. G. The biotechnology-value chain: Development of Sm14 as a schistosomiasis vaccine. **Acta Tropica**, v. 108, n. 2–3, p. 263–266, 2008.

TRAN, M. H. et al. Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis. **Nature Medicine**, v. 12, n. 7, p. 835–840, 2006.

TRAN, M. H. et al. Suppression of mRNAs Encoding Tegument Tetraspanins from *Schistosoma mansoni* Results in Impaired Tegument Turnover. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 4, p. e1000840, 2010.

VOGEL, C.; MARCOTTE, E. M. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 4, p. 227–232, 2012.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Elimination of schistosomiasis from low transmission areas. p. 1–31, 2009.

WILSON, R. C.; DOUDNA, J. A. Molecular Mechanisms of RNA Interference. **Annual Review of Biophysics**, v. 42, n. 1, p. 217–239, 2013.

WINDER, S. J. Actin-binding proteins. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. 4, p. 651–654, 2005.

WITKE, W. et al. Hemostatic, inflammatory, and fibroblast responses are blunted in mice lacking gelsolin. **Cell**, v. 81, n. 1, p. 41–51, 1995.

WRIGHT, M. D. et al. Serologic reactivities of the 23-kDa integral membrane proteins of schistosomes. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 147, n. 12, p. 4338–42, 15 dez. 1991.

YANG, E. et al. Decay rates of human mRNAs: correlation with functional characteristics and sequence attributes. **TL - 13. Genome research**, v. 13 VN-r, n. 8, p. 1863–1872, 2003.

ZERAIK, A. E. et al. Septins of Platyhelminths: Identification, Phylogeny, Expression and Localization among Developmental Stages of *Schistosoma mansoni*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 12, p. 1–14, 2013.

ZHAI, L. et al. Tyrosine Phosphorylation of Villin Regulates the Organization of the Actin Cytoskeleton. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 39, p. 36163–36167, 2001.

ZHOU, Y.; PODESTA, R. B. Effects of Serotonin (5HT) and Complement C 3 on the Synthesis of the Surface Membrane Precursors of Adult *Schistosoma mansoni*. **The Journal of Parasitology**, v. 75, n. 3, p. 333, jun. 1989.