

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

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE ASPARTIL PROTEASES CATEPSINA D-LIKE DE
Schistosoma mansoni NO DESENVOLVIMENTO DO PARASITO E NO
ESTABELECIMENTO DA INFECÇÃO EM MODELO MURINO**

por
Felipe Miguel Nery Lunkes

Belo Horizonte
2023

DISSERTAÇÃO MCS-IRR

F.M.N. LUNKES

2023

FELIPE MIGUEL NERY LUNKES

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE ASPARTIL PROTEASES CATEPSINA D-LIKE DE
Schistosoma mansoni NO DESENVOLVIMENTO DO PARASITO E NO
ESTABELECIMENTO DA INFECÇÃO EM MODELO MURINO**

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 em Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática.

Orientação: Dra. Marina de Moraes Mourão

Coorientação: Dra. Sandra Grossi Gava

Belo Horizonte

2023

O presente trabalho foi realizado com apoio de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) - Código de Financiamento 001.

L96a Lunkes, Felipe Miguel Nery.
2023

Avaliação funcional de aspartil proteases catepsina d-like de *Schistosoma mansoni* no desenvolvimento do parasito e no estabelecimento da infecção em modelo murino / Felipe Miguel Nery Lunkes. - Belo Horizonte, 2023.

132 f. : il. color.

Orientador: Marina de Moraes Mourão.

Coorientador: Sandra Grossi Gava.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências da Saúde), Belo Horizonte, 2023.

Bibliografia: f. 120 - 130.

1. Esquistossomose mansoni/terapia. 2. *Schistosoma mansoni*/efeitos dos fármacos. 3. Interferência de RNA/efeitos dos fármacos. 4. Ácido Aspártico Proteases/uso terapêutico. 5. Catepsinas/uso terapêutico. I. Título.

CDD 616.963

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Rede de Bibliotecas da Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Bibliotecário responsável pela elaboração da ficha catalográfica:
Segemar Oliveira Magalhães – CRB/6 1975 FIOCRUZ. Instituto René Rachou.
Biblioteca de Ciências da Saúde Prof. Zigman Brener

FELIPE MIGUEL NERY LUNKES

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE ASPARTIL PROTEASES CATEPSINA D-LIKE DE
Schistosoma mansoni NO DESENVOLVIMENTO DO PARASITO E NO
ESTABELECIMENTO DA INFECÇÃO EM MODELO MURINO**

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 em Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática.

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Marina de Moraes Mourão (Instituto René Rachou) - Presidente

Prof. Dr. Rubens Lima do Monte Neto (Instituto René Rachou) - Titular

Prof. Dr. Wander de Jesus Jeremias (Universidade Federal de Ouro Preto) - Titular

Dra. Paula Monalisa Nogueira (Instituto René Rachou) - Suplente

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 28/02/2023

Dedico este trabalho a

meus pais (Miguel e Sheyla), irmãos, tios e avós, que estão comigo e aqueles que já se foram, que nunca soltaram a minha mão ou mediram esforços para que eu tivesse o privilégio de chegar aonde cheguei. Se eu pudesse escolher uma família mil vezes, escolheria vocês todas as vezes.

.....

AGRADECIMENTOS

Este trabalho se iniciou anos antes do início do meu mestrado. Muito aconteceu desde o início, e não cheguei ou chegaria até aqui sozinho. Nesse período, muitas pessoas se fizeram presentes na minha trajetória acadêmica e pessoal, me auxiliando nos meus experimentos, me dando conselhos e simplesmente deixando em mim um pedacinho de cada um. É com grande emoção e gratidão que escrevo esses agradecimentos.

Gostaria de agradecer meus pais, Miguel e Sheyla, que sempre acreditaram no poder transformador da educação e nunca mediram esforços para que eu recebesse a melhor formação possível.

Não posso, nem por um minuto sequer, deixar de agradecer aos meus avós maternos, Gedalva e Jersulino, por estarem sempre ali para todos.

Gostaria de agradecer enormemente minha tia e madrinha, Shirlene, que, assim como minha mãe e pai, sempre fez de tudo para que eu pudesse ser quem eu quisesse.

Quero agradecer também meu tio Evandro, por todo o carinho, cuidado e inspiração durante a minha vida. Você me mostrou que não existe idade para estudar, para mudar de vida e para se encontrar. Posso nunca ter falado isso em voz alta, mas a sua determinação, força, inteligência e vontade sempre me inspiraram a correr atrás dos meus sonhos.

Aos meus irmãos, que, apesar das brigas comuns de irmãos, sempre estiveram ali por mim, e tenho certeza de que sempre estarão, assim como sempre estarei por eles. Sou muito grato pela vida de vocês dois, João Paulo e Luiz Fernando, pois sei, apesar de tudo, nunca estarei só nesse mundo. Imagina a felicidade da família com a minha aprovação no mestrado e a aprovação dos dois para os cursos de Engenharia Química e Letras na UFMG... Com certeza, esse encontro de conquistas foi muito feliz e comemorado a altura.

Gostaria de agradecer ao Gabriel, por ter sempre estado ao meu lado em todos os momentos em que eu não merecia compaixão ou companhia. Nesses quase três anos, você foi uma rocha onde, infelizmente, tive de me apoiar vezes demais. Mas você não saiu dali, sempre me proporcionando um vislumbre de um futuro bonito e feliz. E por

isso, me ajudou a chegar até aqui. Não há como agradecer, senão te lembrando todo dia de como sou grato pela sua existência e por seu amor.

Palavras e adjetivos me faltam para agradecer a duas pessoas extremamente importantes na minha vida acadêmica e pessoal: as doutoras Marina de Moraes Mourão e Sandra Grossi Gava. Marina é muito mais que uma orientadora, e acho que, mesmo que não é seu aluno, percebe isso logo de cara. Você sempre foi além, executou seu papel de orientadora enquanto se preocupa com os seus alunos. Sempre deu liberdade para que pudéssemos escolher o nosso caminho, e não sei como te agradecer por ter confiado a mim inúmeros projetos e responsabilidades desde a minha iniciação científica. Sem sombra de dúvidas, essa confiança me deu bagagem e conhecimento para uma vida, e me fez ver que eu era capaz de fazer qualquer coisa. As oportunidades proporcionadas por você me fizeram crescer de formas que eu não poderia imaginar. Acho que poucos orientadores são como você, permitindo ao aluno fazer tanto e crescer tanto. Gostaria também de agradecer a Sandra, minha coorientadora neste trabalho. Se eu fosse definir a experiência de conviver com você, usaria as palavras cuidado, confiança, força, carinho e inteligência. Você sempre mostra o cuidado que você tem não só com os projetos e com os alunos, mas, assim como Marina, o cuidado com as pessoas que existem atrás da figura de um aluno de iniciação científica ou pós-graduação. Não há quem não confie em sua capacidade, experiência e inteligência. Você é referência. Já disse algumas vezes, mas ainda não conheci alguém mais inteligente e prestativa que você em toda a minha vida. Sou muito grato pela experiência em ter sido orientado, desde a minha iniciação científica, por vocês duas.

Gostaria de agradecer também a doutora Fernanda Sales Coelho que, juntamente a Sandra, me selecionaram para a vaga de aluno de iniciação científica em 2016. Desde então, o grupo de Helminologia e Malacologia Médica me acolheu e foi meu lar até a presente data.

Gostaria de agradecer ao mestre Juliano Michel de Araújo e a doutora Naiara Clemente por todo o auxílio durante a execução do meu projeto.

Ao Juliano, tenho muito a agradecer. Durante esses anos, você deixou de ser um colega de trabalho e se tornou um amigo.

Com muita gratidão, gostaria de agradecer a Cris, Cristhiane Oliveira da Fonseca. Não há como te agradecer por toda a ajuda que você me deu, tanto durante a realização da minha iniciação científica e mestrado, como em minha vida pessoal. Eu nunca vou esquecer da ajuda que você me deu nessa etapa final do mestrado. Sem você, muitos dos meus resultados não se tornariam realidade.

No mesmo espírito, gostaria de agradecer a mestra Amanda Domingues de Araújo. Em meio a todo o caos da vida, reconheci em você uma grande amiga. Sou muito grato pela convivência e pela amizade que desenvolvemos nesse período. De forma alguma quero perder o contato com você. Além de te admirar demais, sou muito feliz e alegre na sua presença.

Gostaria de agradecer também a Ester Santos, por ter dado, junto com a Sandra, um pouco mais de cor e muitas informações relevantes sobre a filogenia e expressão das catepsinas. Junto a isso, gostaria de agradecer ao Dr. Floriano, do IOC, e sua equipe, pela concepção e todo o auxílio para a execução deste trabalho. No grupo do IOC, gostaria de agradecer, principalmente, a Bárbara e o Lauro, que me receberam com muito carinho no verão de 2020 no Rio e me proporcionaram o aprendizado em técnicas que nunca havia tido contato.

Um agradecimento especial à doutora Izabella Cristina Andrade Batista, pela convivência transformadora em minha vida. Você não precisava fazer muito, porque a sua presença já tornava todos a sua volta mais felizes e alegres.

Gostaria de agradecer ao time fantástico do grupo de Helminologia e Malacologia Médica (HMM), liderado pela Dra. Roberta Caldeira e Me. Omar dos Santos Carvalho. Vocês construíram uma potência em pesquisa e em ciência. Sempre me senti orgulhoso do lugar onde estou. Ao ser questionado, em diversas situações, onde desenvolvia o meu projeto de iniciação científica ou mestrado, ao citar o nome de vocês, via o tamanho do reconhecimento que tinham no ambiente acadêmico e científico. O HMM foi meu lar por sete anos. Espero que ele também possa ser o lar de mais estudantes que cheguem aqui, como eu, e saiam formados e prontos para desenvolver o nosso país.

Também gostaria de agradecer aos colegas do HMM, que me auxiliaram durante a execução do meu trabalho, por toda a ajuda e convivência nesse tempo. Sendo assim,

gostaria de agradecer à Flória, Sarah, Eduarda, Maria Alice, Isabela, Gabriella, Gabriela, Vítor e a todos os que passaram pelo grupo de 2016 até hoje.

Gostaria de agradecer aos doutores Floriano Paes e Mário Senger, do IOC, pela estadia no Rio de Janeiro, pelo aprendizado e pela oportunidade de executar técnicas que até então não havia tido contato. Esse agradecimento se expande aos doutorandos Bárbara Gomes e Lauro, que além de toda a atenção, carinho e acolhimento, me auxiliaram na execução dos meus experimentos e me mostraram um pouco do Rio de Janeiro.

Além disso, gostaria de agradecer à Fundação Oswaldo Cruz e ao Instituto René Rachou pela estrutura e investimento financeiro, humano e científico, as agências de fomento CAPES, CNPq (pelo pagamento da minha bolsa), FAPEMIG, FAPERJ, INOVA-Fiocruz e Comissão Europeia que possibilitaram a execução deste trabalho.

Um agradecimento aos sites científicos de acesso aberto também se faz necessário. Na minha opinião, nunca chegaremos a uma verdadeira ciência livre enquanto tivermos que pagar altos valores para termos acesso a trabalhos de nossos pares. Muitas vezes, os pesquisadores devem pagar para terem seus trabalhos publicados, ao mesmo tempo em que os leitores interessados também devem pagar para ter acesso. Esse dinheiro não é revertido para os pesquisadores. Dessa forma, iniciativas como essa são importantes para democratizar o acesso à ciência. Gostaria também de agradecer às plataformas tecnológicas da Fiocruz, como a plataforma de PCR em Tempo Real, plataforma de Microscopia e Microanálise de Imagens e a plataforma de Sequenciamento Capilar (Sanger), lotados no Instituto René Rachou. Um agradecimento especial às doutoras Viviane Santos, da plataforma de PCR em Tempo Real, por todo o apoio, carinho e cuidado, e a Camila de Carvalho, da plataforma de Microscopia e Microanálise de Imagens, pelo carinho e enorme auxílio na captação e análise de imagens. Também gostaria de agradecer a equipe do Biotério de Produção e do Biotério de Experimentação do Instituto René Rachou, pelo fornecimento de animais e infraestrutura adequada para a realização dos meus experimentos. Um agradecimento mais que especial a Rosa, do Biotério de Experimentação, que sempre me ajudou nas rotinas de cuidado dos animais e sempre me tratou com um carinho inigualável.

Um singelo agradecimento ao Pedro Paulo e a Ester, do grupo do Dr. Marcelo Pelajo, do IOC/Fiocruz, pelas horas de discussão para padronizar a análise de dados de microscopia confocal em vermes com fenótipos de subdesenvolvimento. Estendo também esse agradecimento a Giulia, técnica no mesmo grupo, pela captação de imagens em microscopia confocal e por todo o aprendizado sobre a técnica.

Gostaria de agradecer enormemente aos meus amigos, que me acompanharam não só nessa, mas em muitas outras jornadas, como o ensino médio, a graduação e a própria vida. Sendo assim, quero agradecer aos meus amigos Alexandre, Raíssa e Túlio, pelos mais de dez anos de amizade sólida e inabalável, que estiveram comigo em muitos dos momentos mais marcantes da minha vida, bons ou ruins. Vocês foram a rocha onde me apoiei por diversas vezes. Gostaria de agradecer também ao João Henrique, amigo que fiz primeiramente como meu aluno de monitoria, e depois, por sorte do destino, veio integrar, juntamente comigo, o HMM. Foi sensacional acompanhar o seu crescimento junto ao meu. Gostaria de agradecer também meus três presentes da UFMG, Ana Carolina, Keren e Tamires. Não sei o que teria sido da minha graduação sem vocês, bem como minha vida hoje. A todos vocês, só tenho a agradecer pela amizade, carinho e toda a experiência que me proporcionaram.

Gostaria de agradecer também à minha psicóloga, Isabela Vieira, que foi fundamental durante a execução das minhas atividades de mestrado.

Gostaria de agradecer também a todos que estiveram presentes no ato da minha defesa, o que, sem dúvidas, tornou esse momento ainda mais especial. Foi muito importante ver tanta gente reunida ali por mim. Estendo os agradecimentos à banca, cujas valiosas contribuições serviram para melhorar o meu trabalho.

Por fim, gostaria de agradecer aos docentes do Instituto René Rachou pela contribuição na minha formação acadêmica e profissional. À Biblioteca do IRR, em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrando o rol de referências desta dissertação, também pela catalogação e normalização da mesma.

Em 2020, pude finalmente gritar, para mim e para todos, que eu finalmente havia realizado esse sonho. Hoje, três anos depois, posso experimentar novamente essa

sensação, sentindo que concluí mais uma etapa da minha vida. Posso gritar a todos que finalmente eu sou mestre.

RESUMO

A esquistossomose é uma doença tropical negligenciada que acomete mais de 78 países e mais de 200 milhões de pessoas, levando a morte 280.000 pessoas anualmente. Os impactos no Brasil são estimados em 41 milhões de dólares todos os anos. Apesar de sua gravidade e prevalência, apenas uma droga é utilizada para o tratamento, o praziquantel (PZQ). Dentre os alvos que vêm sendo estudados como alternativas para o desenvolvimento de fármacos, estão distintas classes de peptidases. A catepsina D-like de *Schistosoma mansoni* (SmCD1) apresenta 51% de identidade com a ortóloga humana. Além disso, os pontos de clivagem de hemoglobina da catepsina D humana demonstraram ser distintos do ortólogo de *S. mansoni*. Posteriormente, outras SmAPs foram identificadas no genoma do parasito. Este trabalho visa caracterizar funcionalmente SmCDs e validar estes alvos como potenciais alvos terapêuticos. Primeiramente, foi observado que a expressão de *Smcd1* é ubíqua nos tecidos do parasito, enquanto *Smcd2* é expressa apenas em células do intestino. Além disso, análises de bioinformática identificaram duplicações de *Smcd3*. Experimentalmente, verificamos que a expressão de *Smcd1* se dá principalmente em vermes adultos fêmeas, o que corrobora dados da literatura. Para caracterizar funcionalmente os alvos, foi utilizada a técnica de RNA de interferência. Foram observadas reduções significativas de transcritos dos alvos em esquistossômulos (~99,9%) no quinto dia de exposição. Esquistossômulos expostos a dsRNAs foram utilizados em infecções experimentais, para análise de recuperação de vermes e ovos e verificação de fenótipos diferenciais em vermes adultos. Após perfusão foram observadas alterações fenotípicas em vermes adultos fêmeas expostas a dsRNAs específicos, como redução de comprimento e diminuição de formação de pigmento de hemozoína no trato digestivo, além de redução da área do ovário e da maturação de células reprodutivas, ausência de ovos no trato reprodutivo e diminuição considerável de oócitos maduros. Entretanto, não foram observadas alterações no número de vermes recuperados. Ainda, foi observada diminuição significativa de ovos retidos no fígado dos animais, indicando diminuição da ovoposição. Análises de motilidade de vermes adultos, expostos a dsRNAs *in vitro*, evidenciaram uma diminuição de motilidade de vermes adultos machos. Ao avaliar a

formação de hemozoína em esquistossômulos silenciados e expostos a eritrócitos humanos, foi observada uma redução da degradação de hemoglobina. As evidências indicam participação destas SmCDs no metabolismo e ovoposição do parasito, sugerindo que podem ser alvos promissores para desenvolvimento de inibidores a serem utilizados concomitantemente com o PZQ.

Palavras-chave: RNA de interferência, aspartil proteases, *Schistosoma mansoni*, catepsinas.

ABSTRACT

Schistosomiasis is a neglected tropical disease that affects more than 78 countries and more than 200 million people, killing 280,000 people annually. The impact in Brazil is estimated in 41 million dollars every year. Despite its severity and prevalence, only one drug is used for treatment, praziquantel (PZQ). Among the targets that have been studied as alternatives for the development of drugs, there are different classes of peptidases. *Schistosoma mansoni* cathepsin D-like (SmCD1) shows 51% identity with the human ortholog. Furthermore, the hemoglobin cleavage points of human cathepsin D have been shown to be distinct from the *S. mansoni* ortholog. Later, other SmAPs were identified in the parasite genome. This work aims to functionally characterize SmCDs and validate these targets as potential therapeutic targets. First, it was observed that *Smcd1* expression is ubiquitous in parasite tissues, while *Smcd2* is expressed only in intestinal cells. Furthermore, bioinformatics analyzes identified *Smcd3* duplications. Experimentally, we found that *Smcd1* expression occurs mainly in adult female worms, which corroborates the literature data. To functionally characterize the targets, the RNA interference technique was used. Target transcripts were significantly reduced in schistosomula (~99.9%) on the fifth day of exposure. Schistosomula exposed to dsRNAs were used in experimental infections, for analysis of recovery of worms and eggs and verification of differential phenotypes in adult worms. After perfusion, phenotypic changes were observed in adult female worms exposed to specific dsRNAs, such as a reduction in length and a decrease in the formation of hemozoin pigment in the digestive tract, in addition to a reduction in the ovary and in the maturation of reproductive cells, absence of eggs in the tract. reproduction and a considerable decrease in mature oocytes. However, no changes were observed in the number of recovered worms. Furthermore, a significant decrease in the number of eggs retained in the liver of the animals was observed, indicating a decrease in oviposition. Motility analyses of adult worms exposed to dsRNAs in vitro showed a decrease in the motility of adult male worms. When evaluating hemozoin formation in silenced schistosomula and exposed to human erythrocytes, a reduction in hemoglobin degradation was observed. Evidence indicates the participation of these SmCDs in the metabolism and oviposition of the parasite,

suggesting that they may be promising targets for the development of inhibitors to be used concomitantly with PZQ.

Keywords: RNA interference, aspartyl proteases, *Schistosoma mansoni*, cathepsins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Navegador de genoma com representação esquemática da estrutura exón-íntron para o gene <i>Smcd3</i> demonstrando a presença de duplicações em <i>tandem</i>	59
Figura 2 – Modelos tridimensionais preditos para SmCD3 (Smp_018800)	60
Figura 3 – Modelos tridimensionais preditos para SmCD1 (Smp_013040) e SmCD2 (Smp_136730)	61
Figura 4 – Alinhamento das sequências de <i>Smcd1</i> (Smp_013040) e Smp_326170	62
Figura 5 – Expressão das APs em vermes adultos fêmeas e machos	64
Figura 6 – Perfil de expressão das APs em células únicas de vermes adultos do parasito <i>Schistosoma mansoni</i>	65
Figura 7 – Expressão de <i>Smcd1</i> , <i>Smcd2</i> e Smp_346370 nos diversos tipos celulares de vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	67
Figura 8 – Filogenia das APs dentro do filo dos platelmintos	69
Figura 9 – Ampliação da árvore com o ramo contendo <i>Smcd1</i> (Smp_013040)	70
Figura 10 – Ampliação da árvore com o ramo contendo <i>Smcd2</i> (Smp_136730)	71
Figura 11 – Ampliação da árvore com o ramo contendo <i>Smcd3</i> (Smp_018800) e suas duplicações	72
Figura 12 - Perfil de expressão de <i>Smcd1</i> e <i>Smcd2</i> nas diferentes fases do parasito	73
Figura 13 – Perfil eletroforético de fragmentos dos transcritos dos genes <i>Smcd1</i> , <i>Smcd2</i> e <i>Smcd3</i>	74

Figura 14 – Análise dos níveis de transcritos de <i>Smcd1</i> e <i>Smcd2</i> em esquistossômulos expostos aos dsRNA durante sete dias	75
Figura 15 – Análise dos níveis de transcritos de <i>Smcd3</i> em esquistossômulos expostos a dsRNA durante sete dias	76
Figura 16 - Níveis de transcritos de <i>Smcd1</i> , <i>Smcd2</i> e <i>Smcd3</i> em esquistossômulos no segundo, quarto e sétimo dias de exposição aos dsRNAs específicos em combinação	77
Figura 17 - Mortalidade de esquistossômulos expostos a dsRNAs específicos para <i>Smcd1</i> , <i>Smcd2</i> e <i>Smcd3</i>	78
Figura 18 – Área dos esquistossômulos durante exposição a dsRNAs específicos para transcritos de <i>Smcd1</i> , <i>Smcd2</i> e <i>Smcd3</i>	79
Figura 19 – Perfil de expressão de <i>Smcd1</i> e <i>Smcd2</i> nos dias 5, 15 e 20 dias em esquistossômulos expostos ao dsRNA específico em meio contendo eritrócitos	80
Figura 20 – Formação de pigmento de hemozoína em esquistossômulos expostos a dsRNAs específicos de <i>SmCD1</i> e <i>SmCD2</i> e incubados com eritrócitos humanos	81
Figura 21 – Perfil de expressão gênica de <i>Smcd1</i> e <i>Smcd2</i> em vermes adultos após transfecção com dsRNAs específicos e PEI	82
Figura 22 – Avaliação da motilidade de vermes adultos durante exposição a dsRNAs específicos de <i>Smcd1</i> e <i>Smcd2</i>	84
Figura 23 – Perfil de expressão gênica de <i>Smcd1</i> e <i>Smcd2</i> após exposição de esquistossômulos a conjuntos de sequências de siRNA	85

Figura 24 - Níveis de transcritos de <i>Smcd1</i> e <i>Smcd2</i> em esquistossômulos no quarto dia de exposição aos dsRNAs específicos	86
Figura 25 – Avaliação do efeito do silenciamento de <i>Smcd1</i> em esquistossômulos no estabelecimento da infecção <i>in vivo</i> em modelo murino	88
Figura 26 – Avaliação do efeito do silenciamento de <i>Smcd2</i> em esquistossômulos no estabelecimento da infecção <i>in vivo</i> em modelo murino	89
Figura 27 – Avaliação do efeito do silenciamento de <i>Smcd1</i> e <i>Smcd2</i> , em combinação, em esquistossômulos no estabelecimento da infecção <i>in vivo</i> em modelo murino	90
Figura 28 – Avaliação dos ovos retidos no fígado e intestino de animais infectados com esquistossômulos silenciados para <i>Smcd1</i> e <i>Smcd2</i> , de forma individual ou em combinação	91
Figura 29 – Fenótipo de subdesenvolvimento observado em vermes adultos recuperados por perfusão	92
Figura 30 – Exemplo dos fenótipos das fêmeas adultas <i>ex vivo</i> com subdesenvolvimento em cada grupo experimental	93
Figura 31 – Fotomicrografias de microscopia confocal exemplificando alterações fenotípicas no ovário de fêmeas recuperadas após infecção de camundongos com esquistossômulos expostos ao dsRNA- <i>Smcd2</i>	94
Figura 32 – Fotomicrografias de microscopia confocal exemplificando a ausência de ovos no trato de fêmeas subdesenvolvidas recuperadas após infecção de camundongos com esquistossômulos expostos ao dsRNA- <i>Smcd2</i>	95
Figura 33 – Fotomicrografias de microscopia confocal exemplificando a área do ovário e tamanho de fêmeas recuperadas após infecção de camundongos com esquistossômulos expostos ao dsRNA- <i>Smcd1</i> , - <i>Smcd2</i> e - <i>Smcd1/Smcd2</i>	97

Figura 34 – Fotomicrografias de microscopia confocal exemplificando os lobos testiculares de machos recuperados após infecção de camundongos com esquistossômulos controle ou expostos a dsRNA- <i>Smcd2</i>	98
Figura 35 – Fotomicrografias de microscopia confocal exemplificando a área do testículo de machos recuperados após infecção de camundongos com esquistossômulos expostos ao dsRNA- <i>Smcd1</i> , - <i>Smcd2</i> e - <i>Smcd1/Smcd2</i>	99
Figura 36 – Área (μm^2) do ovário e lobos testiculares de vermes adultos recuperados após infecção de camundongos com esquistossômulos controle ou expostos aos dsRNAs de <i>Smcd1</i> e <i>Smcd2</i> , de forma individual ou em combinação	100
Figura 37 – Padronização da atividade residual de proteases utilizando inibidor de cisteíno-protease (E-64) e inibidor de aspartil protease (pepstatina A)	102
Figura 38 – Atividade residual de aspartil protease no extrato de vermes adultos expostos <i>in vitro</i> a dsRNAs específicos para <i>Smcd1</i> e <i>Smcd2</i> , de forma individual ou em combinação, em duas réplicas de vermes adultos mantidos em cultura por cinco e doze dias	103
Figura 39 – Atividade residual de aspartil protease no extrato de vermes adultos recuperados por perfusão (<i>ex vivo</i>) após infecção de camundongos com esquistossômulos expostos aos dsRNAs específicos	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lista de iniciadores desenhados para os alvos.....	46
Tabela 2 - Lista de iniciadores desenhados para os normalizadores endógenos	48
Tabela 3- Identificadores recuperados após comparação com a sequência codificadora de SmCD3, na versão 7.0 do genoma do parasito.....	58

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- 5-HT_{2B} – Receptor 2B de 5-hidroxitriptamina ou receptor 2B de serotonina
- 5'UTR – Região 5' não traduzida
- AGO2 – Argonauta 2
- AP – Aspartil protease
- ARP1 – Aspartil protease 1
- BSA – Albumina sérica bovina, do inglês *bovine serum albumin*
- cDNA – DNA complementar
- CDS – Sequência codificante, do inglês *coding sequence*
- DALYs – anos de vida ajustados por incapacidade, do inglês *disability-adjusted life years*
- DNA – Ácido desoxiribonucleico, do inglês *desoxiribonucleic acid*
- dsRNA – RNA de dupla fita, do inglês *double stranded RNA*
- E-64 - N-[N-(L-3-trans-carboxyirane-2-carbonyl)-L-leucyl]-agmatine; [1-[N-[(L-3-trans-carboxyoxirane-2-carbonyl)-L-leucyl]amino]-4-guanidinobutane]
- FAD – Dinucleótido de flavina e adenina, do inglês *flavin adenine dinucleotide*
- Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz
- FRET – 7-methoxycoumarin-4acetyl-GKPILFFRLK(DNP)-D-R-amide
- GFP – Proteína fluorescente verde, do inglês *green fluorescent protein*
- IOC – Instituto Oswaldo Cruz
- IRR – Instituto René Rachou
- mM – Milimolar
- mRNA – RNA mensageiro
- ng - Nanograma
- nM – Nanomolar
- nm – Nanometro
- OMS – Organização Mundial de Saúde
- pb – Pares de base
- PBS – Salina tamponada com fosfato, do inglês *Phosphate-Buffered Saline*
- PCE – Programa de Controle da Esquistossomose
- PCR – Reação em cadeia da polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*
- pH – Potencial hidrogeniônico

PEI – Polietileneimina

PYLL – Anos potenciais de vida perdidos, do inglês *Potential years of life lost*

PZQ - Praziquantel

qPCR – PCR quantitativa em tempo real

RISC – Complexo de silenciamento induzido por RNA, do inglês *RNA-induced silencing complex*

RNA – Ácido ribonucleico, do inglês *Ribonucleic acid*

RNAi – RNA de interferência

RNAm - Ácido ribonucleico mensageiro

rpm – Rotações por minuto

RT-qPCR – Transcrição reversa seguida de PCR quantitativa em tempo real, do inglês *Quantitative reverse transcription PCR*

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

siRNA – Pequeno RNA interferente, do inglês *small interfering RNA*

SmCD – Aspartil protease catepsina D-like de *Schistosoma mansoni*

SmCOXI – Citocromo oxidase subunidade I de *Schistosoma mansoni*

SmFAD – Oxirredutase dependente de FAD de *Schistosoma mansoni*

SmPAI-RBP1 – Proteína de ligação ao RNAm do inibidor do ativador do plasminogênio do tipo I de *Schistosoma mansoni*

µg - Micrograma

µL – Microlitro

µm – Micrometro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 A ESQUISTOSSOMOSE	23
1.2 EPIDEMIOLOGIA, RESERVATÓRIOS E CONTROLE	24
1.3 CICLO DE VIDA DO PARASITO	25
1.4 PATOGÊNESE	27
1.5 TRATAMENTO	30
1.6 ALIMENTAÇÃO DO PARASITO NO HOSPEDEIRO VERTEBRADO	33
1.7 ASPARTIL PROTEASES	34
1.8 SILENCIAMENTO GÊNICO POR INTERFERÊNCIA DE RNA (RNAi)	38
1.9 JUSTIFICATIVA	40
2 OBJETIVOS	42
2.1 OBJETIVO GERAL	42
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
3 METODOLOGIA	42
3.1 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA	42
3.2 AMOSTRAS BIOLÓGICAS	44
3.3 DESENHO DE INICIADORES ESPECÍFICOS	45
3.4 AMPLIAÇÃO DOS GENES ALVO	46
3.5 QUANTIFICAÇÃO DOS TRANSCRITOS NAS DIFERENTES FASES DO PARASITO.....	47
3.6 INTERFERÊNCIA POR RNA (RNAi)	48
3.7 ANÁLISE DE FENÓTIPOS EM ESQUISTOSSÔMULOS <i>in vitro</i>	50
3.8 INFECÇÃO EXPERIMENTAL UTILIZANDO ESQUISTOSSÔMULOS EXPOSTOS AO dsRNA DE Smcd1, Smcd2 E Smcd1/Smcd2	50
3.9 ANÁLISES HISTOLÓGICAS DO LOBO QUADRADO DO FÍGADO DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM ESQUISTOSSÔMULOS EXPOSTOS AOS dsRNAs	52
3.10 MICROSCOPIA CONFOCAL DE VERMES ADULTOS <i>ex vivo</i> RECUPERADOS DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM ESQUISTOSSÔMULOS EXPOSTOS AOS dsRNAs	52
3.11 SILENCIAMENTO E EXPOSIÇÃO DE ESQUISTOSSÔMULOS A ERITRÓCITOS HUMANOS	53

3.12 TESTES ENZIMÁTICOS COM EXTRATO DE VERMES ADULTOS	54
3.13 COMPARAÇÃO DE EFICIÊNCIA ENTRE DOIS MÉTODOS DE SILENCIAMENTO GÊNICO POR RNA DE INTERFERÊNCIA	56
3.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	56
4 RESULTADOS	57
4.1 AVALIAÇÃO DAS ESTRUTURAS GENÔMICAS E PROTEICAS E DADOS DE EXPRESSÃO DAS SmCDs UTILIZANDO FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA	57
4.2 PADRONIZAÇÃO DE INICIADORES PARA RT-qPCR	72
4.3 PERFIL DE EXPRESSÃO NAS FASES DO PARASITO	73
4.4 AMPLIFICAÇÃO DE DNA COMPLEMENTAR E SÍNTESE DE dsRNA PARA SILENCIAMENTO	74
4.5 AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE SmCD1 E SmCD2 EM ESQUISTOSSÔMULOS	75
4.6 AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE SmCD1 E SmCD2 EM VERMES ADULTOS	82
4.7 COMPARAÇÃO DE EFICIÊNCIA ENTRE DOIS MÉTODOS DE SILENCIAMENTO EM ESQUISTOSSÔMULOS	84
4.8 INFECÇÃO EXPERIMENTAL	86
4.9 MICROSCOPIA CONFOCAL	93
4.10 ENSAIOS DE ATIVIDADE RESIDUAL COM EXTRATO PROTEICO DE VERMES ADULTOS	101
5 DISCUSSÃO	104
6 CONCLUSÕES	117
7 PERSPECTIVAS	118
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120
ANEXOS	131
ANEXO I - LICENÇA LW-12/16	131
ANEXO II - LICENÇA LM-5/18	132

1 INTRODUÇÃO

1.1 A ESQUISTOSSOMOSE

Os helmintos são os parasitos que mais infectam humanos em países em desenvolvimento, acarretando perdas econômicas superiores às causadas pela malária e tuberculose (HOTEZ *et al.*, 2008). Essas perdas motivam um interesse global em pesquisas para controle das infecções causadas pelos helmintos. Entretanto, dos mais de 1.500 novos fármacos comercializados entre 1978 e 2008, somente quatro deles foram desenvolvidos para tratar helmintíases (HOTEZ *et al.*, 2008). Segundo Mullard (2020), a FDA (Food and Drug Administration), órgão responsável pela aprovação de fármacos nos Estados Unidos, aprovou, em 2019, 48 novos fármacos, sendo apenas um deles indicado para o tratamento da fasciolose, o triclabendazol (MULLARD, 2020). Em 2018, dos 59 novos fármacos aprovados, apenas um tinha como alvo o tratamento de uma helmintose, o moxidectin, responsável pelo tratamento da oncocercose (MULLARD, 2019). Assim, em todo o século 21, foram aprovados pela FDA 604 novos fármacos, dos quais apenas dois visavam o tratamento de helmintoses (MORAES & GEARY, 2020).

Nesse contexto, a esquistossomose é um importante agravo de saúde pública. Os dados mais recentes disponibilizados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) evidenciam a esquistossomose como a segunda parasitose, apenas atrás da malária, de maior impacto nas populações acometidas. A esquistossomose humana é causada, principalmente, pelos parasitos *Schistosoma mansoni* (África, Oriente Médio e Américas), *Schistosoma haematobium* (África e Oriente Médio) e *Schistosoma japonicum* (Ásia, principalmente nas Filipinas, e China) (COLLEY *et al.*, 2014). Outras espécies possuem distribuições geográficas mais reduzidas, como *Schistosoma mekongi*, *Schistosoma guineenses* e *Schistosoma intercalatum* (COLLEY *et al.*, 2014). Enquanto a forma adulta de *S. haematobium* reside nos vasos perivesiculares, causando a esquistossomose urinária, as demais espécies realizam a cópula e oviposição nas veias mesentéricas (COLLEY *et al.*, 2014). *S. japonicum* e *S. mekongi* são parasitos zoonóticos, encontrados em uma vasta gama de hospedeiros mamíferos, como porcos e cães e a presença de reservatórios em animais é um fator dificultador na erradicação

da esquistossomose causada por estes parasitos (COLLEY *et al.*, 2014). *S. mansoni* pode infectar humanos, roedores e primatas não humanos, sendo o homem o principal reservatório (COLLEY *et al.*, 2014).

1.2 EPIDEMIOLOGIA, RESERVATÓRIOS E CONTROLE

Atualmente, 78 países são endêmicos para a esquistossomose, isto é, apresentam transmissão ativa do parasito (WHO, 2022). Todos os anos, mais de 220 milhões de pessoas se infectam com parasitos do gênero, das quais 280.000 chegam a óbito em decorrência da infecção (SAVIOLI *et al.*, 2017; CHALA & TORBEN, 2018; FAUST *et al.*, 2020). Dados levantados por Chala & Torben (2018), utilizando relatórios disponibilizados pela OMS no Plano Estratégico 2012-2020, indicam que 779 milhões de pessoas residem em áreas com alta propensão à infecção. Segundo Savioli e colaboradores (2017), no contexto global, a infecção por parasitos do gênero pode ser evidenciada pela debilitação de seus portadores, totalizando cerca de 29 milhões DALYs (do inglês, *Disability Adjusted Life Years* – anos de vida ajustados por incapacidade). Os dados epidemiológicos também evidenciam que as regiões mais afetadas pela presença do parasito são a África e a América do Sul, incluindo o Brasil (KARUAMOORTHI *et al.*, 2018).

Dados obtidos do SINAN (Sistema de Informações de Agravos de Notificação), ligado ao Ministério da Saúde do Brasil, para o ano de 2021, evidenciam que as regiões nordeste e sudeste são endêmicas para a esquistossomose. Dados do PCE (Programa de Controle da Esquistossomose) demonstram que o Brasil apresenta um índice de positividade de 3,15%. Quando se observa cada região, o nordeste apresenta positividade de 3,22% e o Sudeste, de 2,24%, a partir dos inquéritos realizados no ano de 2021 (BRASIL, 2023). Estudos realizados em áreas endêmicas no Brasil evidenciaram a perda de 5.187 PYLL (do inglês, *Potential Years of Life Lost* – anos de vida perdidos devido à morte prematura) de indivíduos em idade economicamente ativa. Os custos diretos e indiretos, como o diagnóstico e tratamento, bem como da morte de indivíduos, foi estimado em US\$ 41.706.337,35 no ano de 2015 (NASCIMENTO *et al.*, 2019).

A transmissão da esquistossomose está diretamente relacionada a problemas de saneamento básico, incluindo consumo de água não tratada ou inadequada e infraestrutura no saneamento (ABERA, 2005). Além disso, a falta de educação em saúde é um fator importante que, juntamente à falta de saneamento, faz com que países em desenvolvimento continuem sendo assolados por infecções helmínticas (ABERA, 2005).

Segundo Nelwan (2019), existem duas alternativas para controlar o número de infecções por parasitos causadores da esquistossomose, sendo elas a prevenção e o tratamento de pessoas infectadas. O autor cita a eliminação de moluscos que atuam como hospedeiros e a expansão do saneamento como formas eficazes de prevenção, enquanto traz novas vacinas promissoras, utilizando a catepsina B1 de *S. mansoni* (SmCB1) e o receptor de insulina 1 recombinante de *S. japonicum* (rSjLD1), bem como novas drogas e alvos em potencial como alternativas para o controle (NELWAN, 2019). Em populações infectadas, a busca combinada de estratégias para prevenção da infecção e tratamento dos doentes são as promessas de um combate efetivo (KING, 2008; DANGERFIELD-CHA, 2008).

Theron e colaboradores (2004) relataram que, em uma amostragem de 18 ratos (*Rattus rattus*) coletados na ilha de Guadeloupe (departamento ultramarino da República Francesa nas Caraíbas-Caribe), 17 animais estavam infectados com *S. mansoni*, resultando em uma prevalência de 94 a 95%, com uma média de 160 vermes adultos por animal (THERON *et al.*, 2004). D' Andrea e colaboradores (2000) e Gentile e colaboradores (2012) indicam, assim como em trabalhos realizados em áreas do Brasil, a participação dos ratos-d'água (*Nectomys*) como reservatórios para o parasito. Foi observado um aumento de prevalência nos roedores quando estes coabitam com populações humanas (D' ANDREA *et al.*, 2000, GENTILE *et al.*, 2012). Catalano e colaboradores (2020) realizaram a captura de diversos roedores na região de Lac de Guiers (Senegal), encontrando 8,2% de positividade para *Mastomys huberti* para *Schistosoma* spp. Ao analisar 290 crianças em idade escolar das proximidades, foi observado que 12,8% delas apresentavam infecção pelo parasito (CATALANO *et al.*, 2020). Isso reforça, segundo os autores, uma ligação entre um ciclo zoonótico do parasito e reinfecção humana após tratamento com praziquantel (CATALANO *et al.*, 2020). No Brasil, os roedores *Holochilus sciurens* e *Nectomys squamipes* já foram

ligados à transmissão da esquistossomose (REY, 1993; MIRANDA *et al.*, 2017). Embora escassos no Brasil, um estudo na região do Maranhão, mostra que, de 76 animais capturados em campo, 20 deles, totalizando 26%, estavam naturalmente infectados com *S. mansoni*, mostrando que esses roedores estão relacionados com a transmissão e manutenção do ciclo silvestre do parasito (RODRIGUES *et al.*, 2022). Estudos envolvendo reservatórios não humanos, no contexto de Saúde Única ainda são muito escassos e são de extrema importância no âmbito do controle e erradicação da esquistossomose como problema de saúde pública no Brasil.

1.3 CICLO DE VIDA DO PARASITO

Os parasitos do gênero apresentam um ciclo de vida complexo que conta com fases de vida livre e fases de vida parasitária, ocorrendo em dois hospedeiros, um molusco permissivo à infecção e um hospedeiro vertebrado (CARVALHO *et al.*, 2008; MOUAHID *et al.*, 2018). A partir de ovos excretados no ambiente por meio de fezes ou urina de animais ou humanos infectados por parasitos do gênero *Schistosoma*, em água doce, ocorre a eclosão da larva, denominada miracídio. Ao encontrar o hospedeiro intermediário, ocorre a penetração ativa do miracídio no tegumento e infecção do molusco (CARVALHO *et al.*, 2008).

A penetração ocorre após a adesão e secreção de glândulas que compõem o terebratorium, auxiliada por movimentos rotatórios. Já foi observado que a invasão pode ocorrer em qualquer região mole exposta do molusco e é rápida, levando de três a 15 minutos (COELHO, 1957). Durante a penetração, o parasito perde a placa ciliar e estruturas externas (em até duas horas pós-infecção) e em até 18 horas se diferencia em um esporocisto primário (CARVALHO *et al.*, 2008). Após a diferenciação de esporocistos secundários no interior do primário, há migração para o hepatopâncreas, onde são geradas as cercarias, forma infectante do parasito para o hospedeiro vertebrado (CARVALHO *et al.*, 2008). Esporocistos podem, por sua vez, dar origem a esporocistos terciários e quaternários, que permanecem no interior do molusco produzindo novas gerações de cercarias (COMBES *et al.*, 1983; CARVALHO *et al.*, 2008). Esses esporocistos terciários e quaternários se desenvolvem dentro do

esporocisto secundário e escapam, invadindo tecidos do molusco, atingindo principalmente o ovotestis e o hepatopâncreas (THÉRON, 1981). São necessárias de quatro a seis semanas entre a infecção do molusco pelo miracídio e o início de liberação das cercarias (LAWSON & WILSON, 1980).

As cercarias, em condições fisiológicas e de maturação adequadas, são liberadas na água doce, após atravessarem o poro de nascimento, e permanecem viáveis por aproximadamente 20 horas a 30 °C (SCHREIBER & SCHUBERT, 1949; CARVALHO *et al.*, 2008). O corpo cercariano apresenta uma região anterior, com as glândulas acetabulares e estruturas de fixação, produzindo uma série de enzimas que atuam na penetração do parasito (DORSEY *et al.*, 2002). Ao localizarem o hospedeiro vertebrado, por estímulos químicos e físicos, as cercarias penetram ativamente na pele por secreção de enzimas e movimento da cauda, atravessando uma série de barreiras que compõem o tegumento do hospedeiro vertebrado (SALADIN, 1982; WILSON, 1987; CARVALHO *et al.*, 2008). Segundo Stirewalt & Hackey (1956), o processo de penetração pode durar de três a 17 minutos na pele humana (STIREWLAT & HACKEY, 1956).

Após a penetração, perda da cauda e adaptação metabólica, o corpo cercariano se transforma em um esquistossômulo, com alterações no tegumento e metabolismo anaeróbico facultativo (COLES, 1972; STIREWALT, 1974). Após 48 horas, é observado que o parasito começa a se alongar e ter os espinhos dérmicos reduzidos (CABTREE & WILSON, 1980). No segundo dia pós infecção, os esquistossômulos já realizaram a invasão dos vasos dérmicos e passam a ser encontrados em linfonodos, permanecendo no tecido até o quinto ou sexto dia (WHETER & WILSON, 1979; GUI *et al.*, 1995; LOZZI *et al.*, 1996; CARVALHO *et al.*, 2008). Após, os esquistossômulos realizam a migração pelos pulmões do hospedeiro vertebrado, sendo recuperados no órgão até o 20º dia, em média, a depender do hospedeiro (WHEATER & WILSON, 1979; MILLER & WILSON, 1980). A chegada ao sítio final de infecção, onde ocorre o pareamento entre macho e fêmea, ocorre normalmente a partir do 20º dia de infecção em camundongos, com posicionamento da fêmea no interior do canal ginecóforo do macho (MILLER & WILSON, 1980). Durante toda a vida dos vermes, eles permanecem acasalados e produzindo ovos que são liberados na corrente sanguínea do hospedeiro. Os ovos atravessam a parede e alcançam a luz do intestino, onde são liberados nas fezes e contaminam o ambiente.

Cerca de 50% dos ovos não conseguem translocar para a luz do intestino e são carregados pela circulação para vários órgãos, onde ficam retidos, sendo o fígado o primeiro e normalmente mais impactado pela infecção (WILSON, 1987; CARVALHO *et al.*, 2008).

1.4 PATOGÊNESE

Cada fêmea de *S. mansoni* produz, diariamente, aproximadamente 300 ovos, que são lançados na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado, na circulação mesentérica (HAMS *et al.*, 2013). Como dito anteriormente, aproximadamente metade dos ovos liberados pelas fêmeas não conseguem ganhar a luz do intestino, sendo depositados em outros órgãos, como fígado, intestinos e pulmão (MOORE & SANDGROUND, 1956; RASO & NEVES, 1965; FAN & KANG, 2003). A infecção por *S. mansoni* e deposição de ovos pode dar origem às diversas formas de esquistossomose: a forma aguda e duas formas crônicas (CARVALHO *et al.*, 2008).

Como evidenciado por Raso e Neves (1965), a esquistossomose aguda pode ser caracterizada pela ocorrência de granulomas com componente exsudativo, grandes e com necrose central frequente em órgãos como fígado, intestinos e pulmão (RASO & NEVES, 1965). Como observado por Hiatt e colaboradores (1979), os sintomas comuns a essa fase são prostração, colite ulcerativa, gastroenterite que pode agravar, resultando em febre reumática. Também é caracterizada por uma extrema eosinofilia. Os sinais clínicos podem levar a diagnósticos incorretos, uma vez que podem mimetizar sintomas de infecção pelo vírus *Influenza*, quando informações epidemiológicas são descartadas (HIATT *et al.*, 1979). Acredita-se que a fase aguda esteja relacionada a uma primo-infecção em áreas com transmissão recente (CARVALHO *et al.*, 2008). Isso contrasta com as menores taxas de esquistossomose aguda em pessoas que habitam áreas com transmissão ativa, o que pode estar relacionado com a sensibilização anterior dos indivíduos com antígenos do parasito, levando à não ocorrência da fase aguda (CARVALHO *et al.*, 2008). Foi observada uma correlação clara entre o número de ovos nas fezes de pacientes infectados e a gravidade dos sintomas observados (HIATT *et al.*, 1979). Como foi observado por Neves & Raso (1965), em casos com alta gravidade, a

forma aguda da esquistossomose pode evoluir rapidamente para a forma hepatoesplênica (NEVES & ROSA, 1965).

Na forma crônica da esquistossomose, temos uma distribuição desigual entre casos graves ou leves, sendo que os leves correspondem a 90% dos casos (CARVALHO *et al.*, 2008). Na forma leve, muitas vezes os pacientes não apresentam qualquer sintoma. Nessa forma, os indivíduos infectados eliminam ovos viáveis nas fezes, que podem contaminar o meio ambiente, mas são assintomáticos ou apresentam sintomas difusos que podem ser confundidos com outras doenças (CHEEVER & ANDRADE, 1967). Segundo o relatado por Andrade e Prata (1963), no fígado de indivíduos infectados é possível identificar granulomas isolados, que apresentam fases distintas de maturação, rumo à cicatrização, evidenciando um equilíbrio entre a formação de novos granulomas provenientes da chegada de novos ovos e a reabsorção dos granulomas anteriores (ANDRADE & PRATA, 1963).

Como relatado por Symmers (1904), a esquistossomose em sua forma grave, também denominada como avançada, é definida morfológicamente pela presença de intensa fibrose hepática periportal (SYMMERS, 1904). Prata (1991) mostra que essas lesões são sistematizadas nos espaços porta, com lesões que podem ser tanto destrutivas quanto obstrutivas (PRATA, 1991). Entretanto, o parênquima do órgão apresenta sua arquitetura preservada. Em muitos casos, essas lesões são sintomáticas, características de hipertensão portal, com esplenomegalia e circulação colateral. Freitas e colaboradores (1999) descrevem a esplenomegalia como um aumento de volume do baço, provocado, em parte, pela proliferação celular e pela congestão causada pela hipertensão portal (FREITAS *et al.*, 1999). Essa forma grave está, normalmente, associada a uma alta carga parasitária (PRATA, 1991). Já a forma hepática avançada é caracterizada pelas lesões no sistema porta, sendo a mesma lesão descrita anteriormente, com os mesmos aspectos histopatológicos, apenas se diferenciando pela ausência da esplenomegalia. Essa se mostrou uma forma bastante frequente (ANDRADE & PRATA, 1963).

1.5 TRATAMENTO

O praziquantel é o único fármaco comercialmente disponível para o tratamento da esquistossomose e é ativo também em parasitos causadores de outras helmintoses (MEISTER *et al.*, 2016). Devido aos custos de se separar os enantiômeros, este fármaco é comercializado na forma de uma mistura racêmica, com os enantiômeros R e S (MEISTER *et al.*, 2016), sendo que apenas o (R)-praziquantel apresenta atividade anti-helmíntica, enquanto o (S)-praziquantel é o responsável pelo gosto amargo (SIQUEIRA *et al.*, 2017; PARK *et al.*, 2021). Sabe-se que esse fármaco pode alterar a homeostase de cálcio intracelular do parasito e que ativa um canal receptor de potencial transitório do parasito (SmTRP) (COLES, 1979; THOMAS & TIMSON, 2018; PARK *et al.*, 2019; PARK & MARCHANT, 2020; PARK *et al.*, 2021). Chan e colaboradores (2017) demonstraram que existe interação do praziquantel com receptores do hospedeiro humano, mostrando que ele pode ser um agonista de 5-HT_{2B}. Assim, a exposição ao praziquantel pode ser responsável pelas contrações observadas nos vermes, bem como contrações nos vasos mesentéricos do hospedeiro.

Depois de vários anos da utilização extensiva de praziquantel sem um mecanismo de ação elucidado, finalmente a base molecular da atividade do fármaco foi proposta. O PZQ atua ativando um canal iônico receptor de potencial transitório do tipo melastatina (SmTRP) por interação a um domínio de ligação hidrofóbico que promove o influxo massivo de cálcio e paralisa o verme (PARK *et al.*, 2021). Foi demonstrado que a adição de análogos do PZQ em cultura de vermes adultos leva a ativação deste mecanismo com paralisia dos vermes, indicando ativação desses canais de cálcio pelo praziquantel (PARK *et al.*, 2021). A expressão dos canais em células HEK (células embrionárias de rim humanas) também demonstrou um influxo de cálcio nas células após a adição de praziquantel. Adicionalmente, foi visto que o enantiômero S apresenta 50 vezes menos atividade que o enantiômero R (PARK *et al.*, 2021).

Le Clec'h e colaboradores (2021) também buscaram identificar alterações genômicas que pudessem estar relacionadas com os fenótipos de resistência encontrados em vermes que sobrevivem a uma alta dose de PZQ. Novamente, foi encontrada associação entre a resistência e o canal iônico SmTRP. Além disso, viram

que o receptor é ativado com concentrações de praziquantel na ordem de nanomolar (LE CLEC'H *et al.*, 2021). Foi observado que a herança genética de resistência ao praziquantel nos parasitos é de caráter recessivo. Os portadores do polimorfismo associado à resistência apresentam uma tolerância ao fármaco de mais de 377 vezes em relação aos parasitos não portadores do polimorfismo (LE CLEC'H *et al.*, 2021). Uma população de parasitos selecionados em laboratório (denominados SmLE-PZQ-R), expostos ao praziquantel por sucessivas gerações, apresentaram uma diferença de 14 vezes no IC₅₀ em relação à parasitos selvagens (SmLE). Enquanto 65% dos parasitos utilizados e expostos ao praziquantel morriam, 35% dos parasitos sobreviviam a doses altas do fármaco (LE CLEC'H *et al.*, 2021). Segundo Le Clec'h e colaboradores (2021), os dados obtidos nesse último ensaio evidenciam que a população SmLE-PZQ-R é composta tanto por portadores do polimorfismo de resistência quanto por parasitos suscetíveis ao praziquantel. Foi identificado, em parasitos mantidos em cultura e expostos ao praziquantel, um polimorfismo na posição 1029621 (troca de uma timina para citosina) no fator de transcrição SOX13 (Smp_345310 – Fator de transcrição HMG-box relacionado a SRY 13), relacionado ao *splicing*, e uma deleção de cerca de 150 kb em SmTRPM. Outra região, no cromossomo 2, aparece como de interesse em parasitos resistentes, mas nenhum dos seus 24 genes, sendo 21 expressos em adultos, parece estar envolvido diretamente com a resposta ao praziquantel (LE CLEC'H *et al.*, 2021). Foi observado também que parasitos homozigotos para o alelo recessivo de SmTRP conseguiram se recuperar da exposição ao praziquantel, enquanto parasitos heterozigotos ou homozigotos para o alelo alternativo não eram capazes de se recuperar do tratamento com o fármaco (LE CLEC'H *et al.*, 2021).

Cioli e colaboradores (2014) ao realizarem uma revisão de alternativas ao uso do PZQ no controle da esquistossomose, concluíram que o fármaco ainda deverá ser utilizado por anos. Entretanto, com o avanço de relatos de casos de resistência que podem impactar negativamente na saúde de milhões de pessoas ao redor do mundo, novos medicamentos devem ser desenvolvidos, bem como medidas de controle e intervenção (CIOLI *et al.*, 2014). Caffrey & Secor (2011) evidenciam a dificuldade em se monitorar o surgimento de fenótipos de resistência entre populações do parasito e que este é um ponto fundamental para o reconhecimento da verdadeira situação da doença

ao redor do mundo (CAFFREY & SECOR, 2011). Já Viana e colaboradores (2017) observaram efeitos causados pela administração de doses subcurativas de praziquantel e alertaram, assim como outros autores, para a possibilidade de emergência de linhagens resistentes ao fármaco (VIANA *et al.*, 2017).

Um estudo desenvolvido por Berger e colaboradores (2021) buscou marcadores genômicos de resistência em parasitos após administração de praziquantel em massa em Uganda. Após uma administração do tratamento, não foi observada redução na diversidade nucleotídica em populações de vermes sob pressão do praziquantel (BERGER *et al.*, 2021). Esses achados sugerem que não há evidências de que o tratamento com praziquantel possa gerar subpopulações resistentes do parasito (BERGER *et al.*, 2021). Entretanto, os achados evidenciaram um forte sinal de seleção no cromossomo 2, onde foi identificado um *locus* com genes responsáveis por proteínas transportadoras de sódio, cálcio e potássio (BERGER *et al.*, 2021). Como mencionado, os canais de cálcio dependentes de voltagem são um dos alvos moleculares do praziquantel no parasito, sendo ativados pela ligação com o fármaco (COLES, 1979; THOMAS & TIMSON, 2018; PARK *et al.*, 2019; PARK & MARCHANT, 2020; PARK *et al.*, 2021).

Crellen e colaboradores (2016) verificaram que a administração em massa de praziquantel reduziu a efetividade do tratamento em indivíduos repetidamente tratados. Foi identificado que a redução de postura de ovos em crianças em idade escolar diminuía conforme aumentava-se o número de tratamentos. Em crianças que recebiam de oito a nove tratamentos com praziquantel, a redução de postura de ovos variava de 88,23 a 93,64%, enquanto crianças que recebiam cinco tratamentos apresentavam redução de 96,13% a 99,08%. Os dados mostram que a efetividade do tratamento com praziquantel pode ser reduzida com a alta exposição ao tratamento (CRELLEN *et al.*, 2016). Os autores sugerem, então, que exista um monitoramento extensivo dos anti-helmínticos utilizados no tratamento em massa, como o praziquantel (CRELLEN *et al.*, 2016). Além disso, a efetividade variável entre os sexos do parasito e a baixa atividade frente a ovos e vermes imaturos (KING, 2008; DANGERFIELD-CHA, 2008; CAFFREY & SECOR, 2011; THÉTIOT-LAURENT *et al.*, 2013) demonstra, mais uma vez, a necessidade de novas pesquisas para o desenvolvimento de alternativas para o tratamento de pessoas

infectadas. Os achados descritos mostram que alternativas ao praziquantel são necessárias, tanto para evitar perdas de eficiência no tratamento, quanto para evitar fenótipos de resistência (KING, 2008; DANGERFIELD-CHA, 2008; CAFFREY & SECOR, 2011; THÉTIOT-LAURENT *et al.*, 2013; CRELLEN *et al.*, 2016; BERGER *et al.*, 2021).

Caffrey & Secor (2011) apresentam uma série de alternativas para o estudo racional de novos alvos terapêuticos e desenvolvimento de fármacos, baseados em trabalhos de diversos autores. Entre elas, temos o reposicionamento de fármacos, o *screening* de compostos com atividade anti-*Schistosoma* baseado em caracteres fenotípicos, o estudo funcional de genes e a predição computacional de alvos de fármacos e compostos ativos (CAFFREY & SECOR, 2011).

1.6 ALIMENTAÇÃO DO PARASITO NO HOSPEDEIRO VERTEBRADO

Schistosoma mansoni apresenta uma série de mecanismos fisiológicos para a obtenção de nutrientes no interior do hospedeiro vertebrado. Os organismos do clado Neodermata (EHLERS, 1985), como *S. mansoni*, apresentam uma especialização que os distingue de outros grupos, como os nematoides. Durante o desenvolvimento da cercaria, células somáticas se fusionam, dando origem a um sincício (CHENG & BIER, 1972). Nesse sincício, existem transportadores específicos de glicose, denominadas proteínas SGTP (do inglês, *Schistosoma glucose transporter*). Existem quatro proteínas SGTP atualmente identificadas no parasito, SGTP1 a SGTP4. Enquanto SGTP4 está localizada exclusivamente na bicamada apical do tegumento, SGTP1 se localiza na membrana basal, facilitando a difusão da glicose obtida pelo tegumento para o restante do corpo do verme. Esse mecanismo para captação de glicose não envolve o trato digestivo do verme (FRIPP, 1967; SKELLY *et al.*, 1994; JIANG *et al.*, 1996; SKELLY *et al.*, 1998). A literatura já mostra que o uso da técnica de RNA de interferência para silenciar a expressão das SGTPs em esquistossômulos impede o estabelecimento de uma infecção robusta em modelo murino (KRAUTZ-PETERSON *et al.*, 2010).

O verme também utiliza seu trato digestivo para a absorção de aminoácidos e outras biomoléculas. O trato digestivo de *S. mansoni* é composto pela boca, um esôfago curto e o intestino. Uma vez que o intestino apresenta fundo cego, ou seja, não apresenta

ânus, também é chamado de ceco. Devido à ausência de ânus, todo o resto da digestão de material ingerido deve ser regurgitado pelo verme (SPENCE & SILK, 1970; LI *et al.*, 2013). Como o tegumento, o intestino é recoberto por uma camada epitelial sincicial, chamada de gastroderme (MORRIS, 1968).

A função de absorção do intestino do parasito foi demonstrada pelo uso de reticulócitos marcados com ^3H -leucina e inoculados em camundongos. Após a perfusão desses animais, foi observado que os vermes haviam incorporado a marcação radioativa. Além disso, as fêmeas haviam incorporado mais que os machos, evidenciando a maior taxa de alimentação das fêmeas. Os machos ingerem cerca de 39.000 eritrócitos por hora, enquanto as fêmeas chegam a ingerir 330.000 eritrócitos no mesmo período (LAWRENCE, 1973). A fêmea de *S. mansoni* pode ingerir cerca de 32,3 vezes o volume de seu intestino em plasma por dia, o que equivale a 4,4 vezes seu volume corporal. Já o macho pode ingerir 7,7 vezes o volume do intestino, totalizando 0,2 vezes seu volume corporal por dia (LAWRENCE, 1973). A marcação também foi encontrada em todos os tecidos do verme, enquanto a maior taxa de marcação radioativa foi detectada na gastroderme, indicando a absorção de aminoácidos por esse tecido (ZUSSMAN *et al.*, 1970). Achados posteriores também indicaram o mesmo em esquistossômulos, confirmando que a gastroderme era responsável pela absorção de aminoácidos provenientes da digestão das hemácias do hospedeiro (FOSTER & BOGITSH, 1986).

A alimentação de sangue do hospedeiro pelo parasito se dá de forma passiva. Desta forma, os parasitos se acomodam contra a direção do sangue, abrindo e fechando a boca para permitir a entrada de sangue no sistema digestivo (BLOCH, 1980). Os movimentos de alimentação podem durar uma hora, seguido de um momento de pausa e descanso, que pode durar, em média, dez minutos, e nova fase de alimentação por uma hora (BLOCH, 1980). Em cultura, foi observado que os vermes adultos se alimentam de hemácias em suspensão utilizando movimentos rápidos das ventosas, gerando sucção e direcionamento das hemácias para a boca (LI *et al.*, 2013).

A degradação do material ingerido pelo parasito se dá no intestino, e a atividade de digestão ocorre quase que totalmente no ambiente extracelular, no lúmen intestinal. Essa região apresenta pH máximo de 5, que facilita a desnaturação de proteínas do hospedeiro e ativação de uma série de proteases intestinais (SENFT, 1976; TORT *et al.*,

1999). Hall e colaboradores (2011) propuseram que os lisossomos do sincício (gastroderme) apresentam um papel importante na digestão, liberando diretamente no lúmen do intestino uma série de enzimas proteolíticas, responsáveis por digerir o material ingerido pelo parasito. Ainda, já foram identificadas uma série de proteases hidrofílicas, ativas no pH do intestino, no material regurgitado pelo parasito (HALL *et al.*, 2011). Essas proteases incluem as cisteíno endopeptidases, a catepsina L, catepsina B, asparaginil endopeptidase e uma catepsina D-like (KASNY *et al.*, 2009). Outras enzimas, como a leucina aminopeptidase, ativa apenas em pH neutro, pode estar relacionada com a clivagem de peptídeos já no interior do sincício (MCCARTHY *et al.*, 2004). Após a digestão, os aminoácidos livres são então absorvidos e distribuídos para o restante dos tecidos do verme (MCCARTHY *et al.*, 2004).

A digestão das hemácias do hospedeiro pelas enzimas intestinais do parasito resulta na liberação dos grupos heme presentes na hemoglobina. Esses grupos prostéticos residuais são polimerizados em uma molécula inerte e insolúvel, a hemozoína, de coloração marrom acastanhada que se acumula no interior dos parasitos até o momento da regurgitação (OLIVEIRA *et al.*, 2005). O parasito também apresenta uma série de ferritinas, que são responsáveis por sequestrar o ferro liberado pela degradação da hemoglobina e permitir a sua absorção pela gastroderme (SMYTH *et al.*, 2006).

1.7 ASPARTIL PROTEASES

As aspartil proteases (APs) são enzimas que atuam no ataque nucleofílico à ligação peptídica e são caracterizadas pela presença de uma molécula de água ativada por dois resíduos de ácido aspártico, essenciais para a atividade enzimática (RAWLINGS & BARRET, 1993). Em todas as enzimas desta família, também é possível identificar um sítio ativo conservado, composto por resíduos de Asp-Thr-Gly (SODERO *et al.*, 2009). Dentre estas, as do clã AA e família A1 apresentam atividade de endopeptidase e homologia com a pepsina, sendo, portanto, sensíveis à inibição por presença de pepstatina (BOGITSH & KIRSCHNER, 1987; RAWLINGS *et al.*, 2007; SODERO *et al.*, 2009). Já foi demonstrado que APs podem ser encontradas em secreções e excreções

de parasitos (BECKER *et al.*, 1995). Além disso, foi detectado, por Timms & Bueding (1959), que essas enzimas estavam presentes em homogenados de esquistossômulos, apresentando atividade em pH ácido (TIMMS & BUEDING, 1959). Notadamente, grande parte das APs similares à pepsina apresentam participação em uma série de processos biológicos. Devido a isso, esforços para validação destas enzimas como potenciais alvos terapêuticos (seja como alvo vacinal ou fármaco) contra a esquistossomose têm sido executados.

Diversos grupos de pesquisa investigaram o papel de peptidases do parasito, envolvidas na degradação de hemoglobina do hospedeiro. Foi demonstrado que as APs participam de forma crucial no processo, sendo mais eficientes que as cisteíno-proteases (GHONEIM & KLINKERT, 1995). Estudos em busca da elucidação das vias bioquímicas utilizadas por *S. mansoni* para a obtenção de aminoácidos levaram à descoberta, por Wong e colaboradores (1997) de uma AP semelhante à catepsina D (catepsina D-like). Comparações de sequências mostraram que a AP descrita (Smp_013040) apresenta 51% de identidade com a ortóloga humana (WONG *et al.*, 1997). Essa enzima apresenta grande importância no metabolismo do parasito, uma vez que participa da degradação da hemoglobina do hospedeiro vertebrado, fonte nutricional do parasito (TIMMS & BUEDING, 1959). Essa atividade é detectada pela formação de hemozoína no interior dos parasitos cultivados na presença de eritrócitos, desaparecendo rapidamente quando eles são transferidos para meio de cultura sem eritrócitos (TIMMS & BUEDING, 1959). Foram testados diversos componentes do sangue que poderiam ser substratos da enzima, sendo identificada a hemoglobina como seu substrato (TIMMS & BUEDING, 1959).

Brindley e colaboradores (2001) demonstraram que catepsina D-like, descrita até então, está localizada em células da gastroderme, sendo mais expressa em fêmeas que em machos. Essas observações corroboram o que foi visto por Timms & Bueding (1959), que demonstraram uma atividade proteolítica 4,8 vezes maior em fêmeas, em relação aos machos (TIMMS & BUEDINGS, 1959). Pode-se relacionar essa maior atividade com as maiores taxas de alimentação de fêmeas em relação aos machos (LAWRENCE, 1973). Além disso, foi visto que os sítios de clivagem da hemoglobina humana são distintos entre a catepsina D-like de *S. mansoni* e sua ortóloga humana, indicando que

ela, aqui denominada SmCD1 (Smp_013040), é um potencial alvo terapêutico a ser validado experimentalmente (BRINDLEY *et al.*, 2001). Neste sentido, Morales e colaboradores (2008) já demonstraram a redução da atividade enzimática de SmCD1, bem como a diminuição da formação de pigmentos de hemozoína e atraso no desenvolvimento dos esquistossômulos silenciados para SmCD1 (MORALES *et al.*, 2008).

Dados de RNA-seq obtidos por Wangwiwatsin e colaboradores (2020) durante os estágios do parasito no hospedeiro vertebrado indicaram a regulação positiva de diversos genes na fase pulmonar, de juvenil circulante e na transição para fase adulta (WANGWIWATSIN *et al.*, 2020). A partir do dia 35 pós-infecção, foi observada uma expressão 2,5 vezes maior de proteases, como catepsinas B, D e L, que já foram relatadas como responsáveis pela alimentação do verme pela quebra de componentes do sangue do hospedeiro, como a hemoglobina (TIMMS & BUEDING, 1959; MORALES *et al.*, 2008; DELCROIX *et al.*, 2006; WANGWIWATSIN *et al.*, 2020). Novamente, esse aumento de expressão foi relacionado com a necessidade nutricional aumentada de fêmeas na fase de oviposição (WANGWIWATSIN *et al.*, 2020).

Por apresentarem importância na alimentação, APs de outros parasitos, como *Necator americanus*, vêm sendo estudadas quanto possíveis antígenos vacinais (HOTEZ *et al.*, 2016), visando os processos nutricionais e metabólicos essenciais para a sobrevivência dos vermes adultos no hospedeiro vertebrado (HOTEZ *et al.*, 2010). A administração de APR1, uma AP de *N. americanus*, resultou em diminuição significativa de recuperação de vermes adultos em hamsters desafiados com o parasito. Isso ocorre devido à ingestão de anticorpos pelo parasito durante sua alimentação, com neutralização da enzima e consequente redução ou perda de atividade enzimática (HOTEZ *et al.*, 2010). Além disso, foi observada a atividade da recombinante ortóloga de *Smcd1* de *S. japonicum* em degradar a imunoglobulina G (IgG) do hospedeiro vertebrado, apontando sua participação em outros processos biológicos (VERITY *et al.*, 2001).

O grupo do Dr. Floriano Paes Silva Júnior, do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ), identificou outros dois genes que codificam duas outras APs de *S. mansoni*, aqui denominadas *Smcd2* e *Smcd3* (dados não publicados). Estas APs

catepsina D-like (*Smcd1*, *Smcd2* e *Smcd3*) pertencem ao clã AA das peptidases e, provavelmente, participam de uma cascata proteolítica envolvida na degradação de hemoglobina, fonte nutricional de diversos helmintos, como o parasito *S. mansoni*, seja por evidências experimentais ou por similaridades de sequências e estruturas (MORALES *et al.*, 2008; BRINDLEY *et al.*, 2001; RAWLINGS & BARRET, 1993).

Uma abordagem evolucionária lançada por Silva e colaboradores (2011) já havia identificado que a família das APs era expandida em *S. mansoni*, no qual 2,5% do proteoma predito está relacionado com peptidases. Além disso, foi sugerido que diversos processos de duplicação ocorreram, sendo responsáveis pela expansão desta família ao longo da história evolutiva do parasito. SmCD2 e SmCD3 foram também identificadas por predição de domínios e outras regiões conservadas (SILVA *et al.*, 2011). Ainda, foram observadas onze APs do parasito apresentando o domínio conservado PF00026 (*Eukaryotic aspartyl protease*), de acordo com o banco de dados PFAM e a versão do genoma utilizada na análise (SILVA *et al.*, 2011). Foi observado que 44 das 61 famílias de peptidases são expandidas no genoma do parasito, sendo que podem apresentar de dois a 26 parálogos (SILVA *et al.*, 2011). Liu e colaboradores (2014), em um estudo aprofundado do degradoma de *S. japonicum*, com construção de filogenias baseadas nas famílias de peptidases, já havia relatado a presença de outros representantes da família das APs em *S. mansoni*, através de busca de domínios conservados (LIU *et al.*, 2014). A existência de expansões nessas famílias de proteínas em *S. mansoni* pode indicar a importância das APs na relação parasito-hospedeiro (TSAI *et al.*, 2013).

1.8 SILENCIAMENTO GÊNICO POR INTERFERÊNCIA DE RNA (RNAi)

A maquinaria de RNA de interferência (RNAi) está relacionada com um mecanismo celular de proteção do genoma, comum à grande maioria de organismos eucariotos. A via atua impedindo a invasão viral e protegendo o genoma de elementos transponíveis (HAMMOND *et al.*, 2001). Além disso, tem papel importante na regulação gênica e programação de desenvolvimento nos organismos que a possuem (HAMMOND *et al.*, 2001; AGRAWAL *et al.*, 2003). No contexto celular, dando foco apenas às vias de regulação gênica, a via se inicia pela expressão de uma molécula de RNA de dupla fita

(dsRNA), pré-miRNA, que é processada por uma enzima com função de RNase III nuclear denominada Drosha, sendo clivada em moléculas de aproximadamente 70 pares de base (pb) e exportada para o citoplasma através de carreadores específicos (LEE *et al.*, 2002). Já no citoplasma, ocorre o processamento da fita de dsRNA madura, clivada em inúmeros fragmentos, que podem variar de 21 a 24 nucleotídeos (ELBASHIR *et al.*, 2001), por uma enzima com função de RNase III denominada Dicer, enzima multi-domínios, apresentando os domínios helicase e PAZ, além de dois domínios RNase III e de ligação a RNA dupla fita (ELBASHIR *et al.*, 2001). Após, ocorre o reconhecimento da molécula de siRNA produzida por um complexo enzimático, dando origem ao complexo de atividade efetora RISC, que é guiado pelo siRNA até o mRNA alvo complementar, que é degradado pela enzima associada Argonata 2 (AGO2) (HAMMOND *et al.*, 2001).

Fire e colaboradores (1998) demonstraram que a técnica de RNAi é extremamente específica em produzir fenótipos próximos ao de animais nocaute para determinado gene alvo (FIRE *et al.*, 1998). A técnica de silenciamento gênico por RNAi para estudos de função gênica em parasitos consiste na introdução de um dsRNA previamente sintetizado, seja por injeção direta no verme ou por adição no meio e absorção pelo parasito (FIRE *et al.*, 1998; TABARA *et al.*, 1998; TIMMONS *et al.*, 1998). A técnica de RNAi é eficiente em estudos que visam entender a expressão de genes e validá-los como potenciais alvos de fármacos em parasitos do gênero *Schistosoma*, mesmo com o surgimento de novas técnicas que visam realizar este papel sendo transpostas de outras áreas e padronizadas para estudos no parasito (ALREFAEI *et al.*, 2011).

Boyle e colaboradores (2003) identificaram uma redução significativa da expressão de genes alvo utilizando a técnica em *S. mansoni*, após avaliação de níveis de transcritos (BOYLE *et al.*, 2003). Stefanic e colaboradores (2010) utilizando dsRNAs marcados que tinham como alvo peptidases expressas no intestino do parasito, evidenciaram um acúmulo do marcador no intestino de parasitos minutos após a adição. Além disso, observaram que a atividade do intestino de esquistossômulos recém obtidos após transformação mecânica já era detectável, através da formação de pigmentos de hemozoína. Desta forma, concluíram que essa pode ser uma rota eficiente para a entrega de moléculas de dsRNA (STEFANIC *et al.*, 2010). Ensaios realizados por Skelly e colaboradores (2003) demonstraram que a atividade proteica da catepsina B em

esquistossômulos expostos a dsRNAs teve uma redução significativa (SKELLY *et al.*, 2003). Ensaio conduzido com eletroporação de esquistossômulos, método também utilizado para entrega de ácidos nucleicos, evidenciaram que o uso desta técnica deve depender do tecido a que se destina a molécula de RNA. Tendo aspartil proteases (incluindo SmCD1) e demais proteases com expressão na gastroderme como alvos, o uso de eletroporação em *Schistosoma* não se mostrou eficiente no que tange à redução do número de transcritos do alvo em relação à exposição aos dsRNAs no meio, resultando em aumentos que variavam de 100 a 85% em relação ao controle inespecífico utilizado (TIMMS & BUEDING, 1959; STEFANIC *et al.*, 2010). Entretanto, para alvos no tegumento, como anexina ou Sm29, a eletroporação pode contribuir com uma redução até 50% superior em comparação com apenas a exposição ao dsRNA (STEFANIC *et al.*, 2010). Nesse contexto, Liang e colaboradores (2013) demonstraram uma forma eficiente para entrega de DNA ou RNA em células do parasito, utilizando o reagente polietileneimina (PEI) em ensaios utilizando vetores de superexpressão (LIANG *et al.*, 2013), uma vez que outros reagentes de transfecção se mostraram tóxicos ao parasito.

Como observado por Mourão e colaboradores (2009), corroborando dados previamente estabelecidos na literatura, a técnica de RNAi é eficiente quanto à avaliação de efeitos relacionados à diminuição da expressão ou perda de função gênica, tanto a nível proteico quanto a níveis de transcritos, podendo ter variabilidade de acordo com o alvo ou mesmo com a localização da expressão em um organismo (MOURÃO *et al.*, 2009; STEFANIC *et al.*, 2010).

1.9 JUSTIFICATIVA

A esquistossomose ainda é um importante agravo de saúde pública que atinge mais de 78 países no mundo, sendo endêmica em vários países da Ásia, África e América do Sul, incluindo o Brasil (WHO, 2022). Em nosso país, a esquistossomose ainda apresenta uma prevalência variando de baixa a alta, se distribuindo, principalmente, nos estados do nordeste e sudeste (BRASIL, 2022). Podemos relacionar sua prevalência nos territórios atingidos com o saneamento básico precário, falta de teste diagnóstico sensível para detecção de baixas cargas e a falta de educação em saúde

(ABERA, 2005). Neste contexto, diversas abordagens devem ser direcionadas para o enfrentamento eficiente dessa parasitose. Entre elas, está o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, uma vez que, atualmente, não existe uma vacina e apenas uma droga está disponível para o tratamento da esquistossomose (MEISTER *et al.*, 2016; SIQUEIRA *et al.*, 2017). Junta-se a isso o fato de que essa droga apresenta em sua composição um enantiômero que dá ao grande comprimido um gosto amargo, dificultando a sua ingestão por crianças e dificultando o tratamento, resultando em falhas terapêuticas (SIQUEIRA *et al.*, 2017). Além disso, há relatos de resistência em campo e em laboratório, que nos mostram que novos alvos terapêuticos, drogas e candidatos vacinais devem ser buscados (CAFFREY & SECOR, 2011; VIANA *et al.*, 2017; BERGER *et al.*, 2021). Estes podem ser buscados por uma abordagem racional, que vai de reposicionamento de drogas já disponíveis e testadas para outras enfermidades e/ou procura de alvos terapêuticos no parasito utilizando homologia com outros organismos ou dados de natureza computacional (CAFFREY & SECOR, 2011). Assim, já foi visto que em outro parasito com hábito semelhante, *N. americanus*, a vacinação de camundongos com a proteína recombinante, ortóloga de SmCD1, se mostrou eficiente em reduzir drasticamente as taxas de infecção (HOTEZ *et al.*, 2016). Isso pode indicar que se trata de um alvo em potencial também em *S. mansoni*. Soma-se a isso o fato de que *S. mansoni* não apresenta apenas uma representante da família, o que poderia indicar sua importância na relação parasito-hospedeiro (TSAI *et al.*, 2013). A caracterização funcional das APs de *S. mansoni* é importante para entendermos o papel delas na nutrição do parasito no hospedeiro vertebrado, permitindo a futura busca por inibidores específicos e o desenho de novos fármacos.

A inexistência de dados experimentais na literatura acerca de SmCD2, uma outra representante da família, mostra que, junto de SmCD1, podemos ter dois alvos terapêuticos em potencial. Apesar de trabalhos que já descrevem SmCD1, a atividade combinada das duas em modelo murino nunca foi determinada. Desta forma, faz-se necessário avaliar o papel de cada uma delas, SmCD1 e SmCD2, de forma individual e comparada, para compreender mais a biologia do parasito, visto que SmCD1 já foi previamente ligada à alimentação de *S. mansoni*, e encontrar novas abordagens terapêuticas para essa doença negligenciada.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar funcionalmente as aspartil proteases SmCD1 e SmCD2 de *Schistosoma mansoni* em esquistossômulos e vermes adultos e no estabelecimento da infecção em modelo murino.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as estruturas genômicas e proteicas das SmCDs;
- Analisar filogeneticamente esta família gênica em helmintos parasitos;
- Verificar os níveis de expressão de *Smcd1* e *Smcd2* e *Smcd3* nas diferentes fases e tipos celulares do parasito;
- Avaliar funcionalmente SmCD1 e SmCD2 em esquistossômulos e vermes adultos;
- Caracterizar o papel funcional de SmCD1 e SmCD2 no estabelecimento da infecção em modelo murino;
- Comparar a eficiência da metodologia de RNAi em *S. mansoni* para o silenciamento de *Smcd1* e *Smcd2* utilizando dsRNAs (longos) e siRNAs (pequenos).

3 METODOLOGIA

3.1 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA

Para identificação de catepsinas em *S. mansoni*, a versão 7.0 do genoma do parasito, disponível no WormBase ParaSite (https://parasite.wormbase.org/Schistosoma_mansoni_prjea36577/Info/Index) em 01/02/2020 foi a base de dados utilizada para as análises de bioinformática realizadas. Dados de RNAseq disponíveis no banco de dados também foram utilizados para confirmar a evidência de transcrição de cada alvo deste trabalho. Os identificadores atualizados foram obtidos e as sequências recuperadas e alinhadas utilizando as

ferramentas EMBOSS Water (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/) e Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>), utilizando, para ambos, os parâmetros padrão. O banco de dados PFAM (<https://pfam.xfam.org/>) foi utilizado para identificação de domínios nas sequências e a ferramenta SwissModel (<https://swissmodel.expasy.org/>) para modelagem computacional, utilizando os parâmetros padrão fornecidos pela plataforma. Para tanto, foi utilizada a modelagem por homologia, com estruturas geradas a partir de ortólogos com estrutura resolvida em outros organismos.

Além disso, análises filogenéticas das APs de *S. mansoni* foram realizadas pela aluna Ester Silva Souza dos Santos. Para tanto, foi construída uma biblioteca de 112 sequências obtidas do banco de dados do WormBase ParaSite (versão 9). As sequências compreendiam as 15 sequências com o domínio *Eukaryotic aspartyl protease* (PF00026) identificadas no genoma de *S. mansoni* e 97 potenciais ortólogos no filo Platyhelminthes. As sequências tiveram seus domínios trimados para as análises filogenéticas utilizando programa MegaX (versão 10.2.4) (KUMAR *et al.*, 2018), com base nas coordenadas de início e fim do domínio catalítico. As sequências foram então alinhadas utilizando o MUSCLE (EDGAR, 2004), o modelo evolutivo foi avaliado utilizando o *Best fit model*, ambos implementados no PhyloSuite (versão 1.2.2) (ZHANG *et al.*, 2020). As árvores foram inferidas com base em critérios de Máxima Verossimilhança (FELSENSTEIN, 1981) utilizando o IQ-TREE (NGUYEN *et al.*, 2015), também implementado no PhyloSuite, com o modelo evolutivo VT+R4, utilizando 5.000 *ultrafast bootstraps* (MINH *et al.*, 2013) e o teste de Shimodaira-Hasegawa (SH-aLRT) (GUINDON *et al.*, 2010) para determinação dos valores de suporte dos ramos. A árvore foi editada utilizando o TreeGraph (v2.15.0-887 beta) (STÖVER & MULLER, 2010).

Adicionalmente, dados de sequenciamento de RNA (RNAseq) para diferentes estágios de desenvolvimento do verme adulto foram obtidos do WormBase ParaSite (PROTASIO *et al.*, 2017) como as contagens de *reads* alinhadas por gene. Utilizando o R (versão 4.1.2) (R CORE TEAM, 2020), as análises de expressão diferencial foram realizadas pela Dra. Sandra Gava com o pacote DESeq2 (versão 2_1.38.2) ($\text{padj} < 0,05$) (LOVE *et al.*, 2014) e o pacote pheatmap (versão 1.0.12) (KOLDE, 2015) para construção de um mapa de calor que representa as alterações de expressão (\log_2 Fold Change),

para as catepsina D-like em vermes adultos machos e fêmeas, de infecções mistas ou unissexuais, 18, 28, 35 e 38 dias pós-infecção (dpi) em relação a 21 dpi (PROTASIO *et al.*, 2017).

Dados de expressão de diferentes tipos celulares foram extraídos do Gene Expression Omnibus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>, BioProject PRJNA611783, SRA SRP252217; <https://www.collinslab.org/schistocyte/>) (WENDT *et al.*, 2020). O arquivo RDS contendo os dados de expressão nos diferentes tipos celulares foi carregado pela Dra. Sandra Gava no software R (versão 4.1.2) (R CORE TEAM, 2020) utilizando o pacote Seurat (versão 4.1.1) (SATIJA *et al.*, 2015) e usado para construção de um mapa de calor com o pacote ComplexHeatmap (versão 2.10.0) (GU *et al.*, 2016).

3.2 AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Primeiramente, foi obtida a permissão de experimentação animal junto ao Comitê de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/Fiocruz), sob licença LM-05/18 para camundongos Swiss/Webster e LW-02/16 para hamsters Golden. Os camundongos utilizados foram requisitados junto ao Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos da Fiocruz e mantidos em microisoladores no Biotério de Experimentação (Biotex) do IRR durante todo o período de experimentação. Tanto os microisoladores quanto ração e água eram autoclavados pelo Biotex antes do oferecimento aos animais. Já os hamsters Golden foram solicitados junto ao Biotério de Produção do IRR e mantidos em gaiolas no ambiente do Biotex.

As cercarias do parasito da espécie *S. mansoni* da cepa LE utilizadas no projeto foram provenientes do Moluscário Lobato Paraense do Instituto René Rachou/Fiocruz Minas, onde o ciclo do parasito é rotineiramente mantido, e foram transformadas mecanicamente em esquistossômulos adaptando o protocolo descrito por Basch (1981) (BASCH, 1981).

Os esquistossômulos provenientes de transformação mecânica foram mantidos em cultura em placas de 6 e 12 poços, em meio MEM (Gibco, Life Technologies) suplementado com 0,2 µM de Triiodotironina (Sigma-Aldrich), 0,5% de MEM Vitamina (Gibco, Life Technologies), 5% de meio Schneider, 0,5 µM Hipoxantina (Sigma-Aldrich),

1 μM de Hidrocortisona (Sigma-Aldrich), 2% de soro fetal bovino inativado (Gibco, Life Technologies) e 2% de penicilina/estreptomicina (Gibco, Life Technologies), a 37 °C, 95% de umidade e 5% de CO_2 até o momento da adição de dsRNAs.

Para o silenciamento em vermes adultos, parasitos foram recuperados através de perfusão de hamsters Golden após 45 dias da infecção por cercarias (PELLEGRINO & SIQUEIRA, 1956). Após a perfusão dos animais, os parasitos foram lavados com meio RPMI 1640 (Gibco, Life Technologies) suplementado com 2% de penicilina/estreptomicina (Gibco, Life Technologies) fora do fluxo laminar para a eliminação de coágulos e outros contaminantes particulados. Após, foram incubados por 1 hora a 37 °C, 95% de umidade e 5% de CO_2 , lavados com o mesmo meio em cabine de fluxo laminar, com posterior transferência para placas de 6 poços com meio RPMI 1640 suplementado com 2% de penicilina/estreptomicina, 10% de soro fetal bovino inativado (Gibco, Life Technologies) e 12 mM de HEPES, até o momento da adição de dsRNAs.

3.3 DESENHO DE INICIADORES ESPECÍFICOS

Com base nas sequências preditas das proteínas, obtidas dos bancos de dados GeneDB (<http://www.genedb.org/Homepage/Smansoni>) e WormBase ParaSite (https://parasite.wormbase.org/Schistosoma_mansoni_prjea36577/Info/Index), bem como sequências obtidas pelo Dr. Floriano Paes Silva Júnior, iniciadores específicos foram desenhados utilizando as ferramentas Primer Quest Tool (<http://idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index>) e Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) para síntese de dsRNA e para reações de RT-qPCR para amplificação de fragmentos de aproximadamente 500 e 100-150 pb, respectivamente (Tabela 1). A sequência destacada em negrito se refere ao promotor T7, adicionado às extremidades 5' dos iniciadores, necessário à síntese de dsRNA. Como controle inespecífico do silenciamento foi utilizado o gene que codifica a proteína fluorescente verde (GFP), clonado no vetor plasmidial pCRII-GFP com iniciadores (ANDRADE *et al.*, 2014) (Tabela 1). O gene que codifica para a proteína Citocromo C Oxidase subunidade I de *S. mansoni* (*Smcox1*, Smp_900000), bem como a proteína de ligação ao mRNA do inibidor do

ativador do plasminogênio do tipo 1 (*Smpai-rbp1*, Smp_009310) e oxirredutase dependente de FAD (*Smfad*, Smp_089880), foram utilizados como normalizadores endógenos para as reações de RT-qPCR, utilizando iniciadores previamente descritos (ANDRADE *et al.*, 2014; ANDERSON *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2013) (Tabela 2).

Os iniciadores desenhados para amplificação dos alvos para a síntese de dsRNA, bem como os desenhados para reações de RT-qPCR, foram submetidos à PCR *in silico* utilizando o software Unipro UGENE 1.31 (OKONECHNIKOV *et al.*, 2012) para verificação de ampliações inespecíficas, utilizando como referência a versão disponível mais recente do genoma do parasito.

Tabela 1 – Lista de iniciadores desenhados para os alvos.

Alvo	Identificador	Sequência	Tamanho do amplicon
<i>Smcd1</i> (Smp_013040)	dsRNA Forward	taatacgactataggg TCCCAACCGGAATACTTGA	440 pb
	dsRNA Reverse	taatacgactataggg ATCCACGGAAATTGAGGGG	
	qPCR Forward	CTGGGTGGTGAAGTATGAT	142 pb
	qPCR Reverse	CATCAGGACAAGCCGTCATA	
<i>Smcd2</i> (Smp_136730)	dsRNA Forward	taatacgactataggg TTCGGACGTTGTAAGTGAAGAA	402 pb
	dsRNA Reverse	taatacgactataggg ATATCCATAACGGGCCACTTG	
	qPCR Forward	TGTGATCCTAGTAATTTAGCCTGTC	117 pb
	qPCR Reverse	TGATGCTGTTCCAGTACCATATT	
<i>Smcd3</i> (Smp_018800)	dsRNA Forward	taatacgactataggg CTGGCAAATGGTGTGAATATAGG	524 pb
	dsRNA Reverse	taatacgactataggg GAACCCAAGTGTTCGGAAGTA	
	qPCR Forward	TGGTTCAGTTATCTTGTGAGTT	90 pb
	qPCR Reverse	GGAATCACCAACGAGCCTATT	
GFP	dsRNA Forward	taatacgactataggg TCTTCAAGTCCGCCATG	360 pb
	dsRNA Reverse	taatacgactataggg TGCTCAGGTAGTGGTTGTC	

A sequência destacada em negrito se refere ao promotor T7, adicionado às extremidades 5' de cada iniciador utilizado para a síntese de dsRNA. **FONTE:** elaborado pelo autor.

3.4 AMPLIFICAÇÃO DOS GENES ALVO

Após o desenho, os iniciadores foram sintetizados e fornecido pela IDT. A reação de PCR convencional foi padronizada utilizando o kit GoTaq® (Promega) por diversos testes de eficiência conduzidos pelo grupo de pesquisa com base no protocolo

disponibilizado pela fabricante. Foi utilizado o protocolo para uma reação de 20 μL de volume total. As condições de ciclagem da reação para as APs foram: desnaturação inicial a 97 °C por 2 minutos e 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos; 57 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto. Os alvos foram amplificados e o tamanho dos *amplicons* foram verificados em eletroforese em gel de agarose não desnaturante a 1% corado com brometo de etídio (Sigma) a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As bandas foram analisadas quanto à especificidade dos iniciadores e foram excisadas para a purificação do *amplicon* de interesse de cada alvo. Para isso, foi utilizado o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean Up System* (Promega), seguindo o protocolo fornecido pela fabricante. O material amplificado e purificado foi então utilizado como molde para a posterior síntese de dsRNA.

Para os iniciadores para qPCR foi realizada uma padronização para definir a concentração dos iniciadores necessária para eficiência da reação de RT-qPCR entre 95-105%, conforme padrões descritos por Bustin e colaboradores (2009), utilizando o equipamento *ViiA 7 Real-Time PCR System* (Thermo Fischer Scientific). Foram testadas as concentrações de 200, 400 e 600 nM por par de iniciadores, utilizando uma curva com seis pontos, com diluições seriadas (1:2) de cDNA iniciadas na quantificação de 10 ng/ μL e terminadas em 0,156 ng/ μL de RNA inicial.

3.5 QUANTIFICAÇÃO DOS TRANSCRITOS NAS DIFERENTES FASES DO PARASITO

Foi realizada a quantificação dos níveis de transcritos em diferentes fases do ciclo de vida do parasito por RT-qPCR, utilizando RNA extraído de parasitos nas fases de miracídios, esporocistos, cercarias, esquistossômulos, três e sete dias após a transformação, e vermes adultos, machos e fêmeas separadamente. Este RNA foi utilizado para a síntese de cDNA utilizando o kit *Illustra Ready-To-Go RT-PCR Beads* (GE Healthcare Life Sciences), após quantificação utilizando *Qubit RNA HS Assay Kit* (Invitrogen) no equipamento *Qubit 4 Fluorometer* (Invitrogen). Como descrito anteriormente, para a normalização, foram utilizados três genes do parasito com expressão estável em diferentes fases, sendo eles *Smcox1*, *Smpai-rbp1* e *Smfad* (Tabela

2). A expressão de cada alvo foi calculada levando em consideração a média geométrica dos três normalizadores, pelo método de $\Delta\Delta Ct$, como descrito por Livak & Schmittgen (2001). Para a normalização, foi selecionada a fase de maior expressão disponível, tanto por dados de atividade na literatura (TIMMS & BUEDING, 1959), quanto por dados de expressão de cada alvo obtidos diretamente no banco de dados WormBase Parasite, seguido de confirmação experimental. Desta forma, a fase de vermes adultos fêmeas foi selecionada para a normalização.

Tabela 2 – Lista de iniciadores desenhados para os normalizadores endógenos.

Alvo	Identificador	Sequência	Tamanho do <i>amplicon</i>	Concentração por reação
<i>Smcx1</i> (Smp_900000)	qPCR Forward	TACGGTTGGTGGTGTCACAG	152 pb	200 nM
	qPCR Reverse	ACGGCCATCACCATACTAGC		
<i>Smpai-rbp1</i> (Smp_009310)	qPCR Forward	TAGCTCCGACAGAAGCACCT	119 pb	900 nM
	qPCR Reverse	ACGACCTCGACCAAACATTC		
<i>Smfad</i> (Smp_089880)	qPCR Forward	TACGGTTTCTCTTCCCAACC	72 pb	400 nM
	qPCR Reverse	CATGGACCTGCTGCATTTAC		

Lista de iniciadores para amplificação dos transcritos de genes usados como normalizadores para RT-qPCR.

FONTE: elaborado pelo autor.

3.6 INTERFERÊNCIA POR RNA (RNAi)

O kit *T7 RiboMAX Express RNAi Systems* (Promega) foi utilizado para síntese de fita dupla de RNA (dsRNA), utilizando os produtos de PCR purificados e seguindo o protocolo disponibilizado pelo fabricante. Os dsRNAs sintetizados foram então submetidos a análise de integridade e anelamento, por eletroforese em gel de agarose não desnaturante a 1% corado com brometo de etídio (Sigma) a 500 $\mu\text{g/mL}$, e quantificados posteriormente utilizando espectrofotometria no equipamento NanoDrop 1000 (Thermo Fisher). Após a quantificação, os dsRNAs foram armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a sua utilização.

Para o silenciamento em esquistossômulos, os dsRNAs foram posteriormente inseridos nas culturas de esquistossômulos logo após a transformação na concentração de 200 nM. Os parasitos foram mantidos em meio MEM (*Gibco, Life Technologies*) suplementado como descrito anteriormente (Item 3.1). Foi também realizado um

tratamento combinado com os dsRNAs de *Smcd1*, *Smcd2* e *Smcd3*, onde dsRNAs específicos para cada alvo foram adicionados em concentração equimolar de 66,6 nM para cada alvo, totalizando 200 nM. Já para o tratamento em combinação com dsRNA-*Smcd1* e dsRNA-*Smcd2*, foram utilizados 100 nM de cada dsRNA, totalizando 200 nM. As culturas foram mantidas por sete dias a 37 °C, 95% de umidade e 5% de CO₂, e, a cada dia, foi realizada a retirada de aproximadamente 4000 parasitos para a extração de RNA total e síntese de cDNA para avaliação de expressão gênica por RT-qPCR.

Para o silenciamento em vermes adultos, oito casais de vermes foram incubados em 3 mL de meio RPMI 1640 (Gibco, Life Technologies) suplementado como descrito anteriormente (Item 3.1), juntamente com 7,2 µg de reagente de transfecção polietileneimina (PEI, *Sigma*) e 9,2 µg dos dsRNAs específicos por mL de meio. Além disso, vermes adultos foram incubados, após separação dos casais, em 1 mL de meio RPMI suplementado com 7,2 µg de PEI e 9,2 µg dos dsRNAs específicos, para análise de motilidade pelo software WormAssay (MARCELLINO *et al.*, 2012). Para tanto, 16 casais foram separados em machos e fêmeas e divididos em duplicatas, dois poços com machos e dois com fêmeas, para cada alvo, além de controles negativo e inespecífico (GFP). Os ensaios foram realizados em três réplicas biológicas.

A extração de RNA foi realizada utilizando o reagente *TRIzol Reagent* (LifeTechnologies), associado à purificação com o *RNeasy mini Kit* (QIAGEN), seguindo protocolo do fabricante, ou por precipitação com isopropanol. Para a precipitação com isopropanol, foi utilizado o protocolo disponibilizado pelo fabricante do reagente *TRIzol Reagent* (LifeTechnologies), com uma adaptação no tempo de incubação com isopropanol, que foi deixado a -20 °C *overnight*. Cada experimento independente foi realizado integralmente com uma das duas abordagens. Utilizando o *Turbo DNA-free kit* (Ambion, Life Technologies) foi realizada a digestão de DNA residual nas amostras, utilizando o protocolo rigoroso do fabricante. As amostras de RNA extraídas e tratadas foram então quantificadas utilizando o *Qubit RNA HS Assay Kit* (Invitrogen), junto ao equipamento *Qubit™ 4 Fluorometer* (Invitrogen). Os kits *ImProm II* (Promega) ou *SuperScript III System RNase H* (LifeTechnologies) foram utilizados para síntese de cDNA. Foram utilizados 0,5 µg dos iniciadores Oligo(dt)₁₅ e Random Primer por reação, além das amostras de RNA normalizadas para uma quantidade final de no mínimo 80 ng

de RNA por experimento. Os níveis de transcritos dos genes alvo foram então avaliados por RT-qPCR utilizando os iniciadores previamente descritos (Tabelas 1 e 2) pelo método de $\Delta\Delta C_t$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Para esquistossômulos, foi utilizado como controle endógeno *Smcox1*. Já para vermes adultos, a normalização foi realizada como a média geométrica de *Smpai-rbp1* e *Smfad*. A expressão de cada alvo foi expressa em relação à mediana dos controles negativo e inespecífico GFP. A significância dos resultados foi conferida pelo teste estatístico Wilcoxon - Sum of Ranks (Mann-Whitney, significância $p < 0,05$).

3.7 ANÁLISE DE FENÓTIPOS EM ESQUISTOSSÔMULOS *in vitro*

Foram também realizadas análises fenotípicas dos parasitos expostos aos dsRNAs de *Smcd1* e *Smcd2*, em comparação aos controles inespecífico (GFP) e negativo. A mortalidade dos parasitos foi quantificada diariamente, a partir da coloração por iodeto de propídeo (Sigma-Aldrich) a 5 $\mu\text{g/mL}$ e análise por microscopia óptica de 100 parasitos, como realizado por Tavares (2016) e Tavares e colaboradores (2020). Para tanto, foi utilizado o microscópio invertido de fluorescência *Axio Vert* (Zeiss) e comprimento de onda de 544 nm para excitação do iodeto de propídeo. Juntamente a isso, os parasitos foram fotografados em ampliação de 50 e 100 vezes e filmados por 30 segundos em ampliação de 100 vezes. Esses dados foram utilizados para avaliação de área e aspectos morfológicos dos parasitos, utilizando o software ZEISS AxioVision 4.8.2.0.

3.8 INFECÇÃO EXPERIMENTAL UTILIZANDO ESQUISTOSSÔMULOS EXPOSTOS AO dsRNA DE *Smcd1*, *Smcd2* E *Smcd1/Smcd2*

Após a determinação do dia de maior redução nos níveis de transcritos para esquistossômulos expostos aos dsRNAs de *Smcd1*, *Smcd2* e *Smcd1/Smcd2*, foi realizada a infecção experimental de camundongos Swiss Webster com os parasitos silenciados e com os grupos controle inespecífico (GFP) e negativo.

Para tanto, culturas de parasitos foram mantidas com adição dos dsRNAs específicos na concentração de 200 nM, bem como em combinação, em que foram adicionadas concentrações iguais de dsRNA para cada alvo, totalizando 200 nM. Parasitos que não foram expostos a dsRNAs constituíram o controle negativo, e o controle inespecífico, continha esquistossômulos expostos   200 nM de dsRNA-GFP. Após a exposição, aproximadamente 450 parasitos em 250 μ L de meio MEM suplementado com penicilina-estreptomicina a 2% foram inoculados por via subcutânea com o auxílio de seringa 26G em dez camundongos Swiss Webster, em cada grupo experimental em três réplicas biológicas (TAVARES & MOURÃO, 2021).

Após o período de 42 a 45 dias, foi realizada a eutanásia dos animais por overdose de anestésicos. Primeiramente, foi administrado em cada animal uma combinação de hidrocloreto de xilazina (10 mg/kg) e hidrocloreto de ketamina (150 mg/kg) com posterior administração de tiopentato de sódio (100-200 μ L por animal), seguido da perfusão para recuperação e contagem dos vermes adultos por camundongo (PELLEGRINO, 1957; TAVARES & MOURÃO, 2021). Os vermes adultos recuperados foram contabilizados e, após a contagem, divididos em grupos para extração de RNA para verificação de silenciamento persistente; congelamento para verificação de atividade enzimática de SmCDs; ou fixados para análise por microscopia confocal. Vermes recuperados também foram fotografados utilizando o equipamento estereomicroscópio M205-C (Leica) acoplado   câmera DMC 2900 (Leica) e ao software LAS V4.9.

Juntamente a isso, o fígado e intestino foram pesados e a porção terminal do intestino foi utilizada para a confecção de lâminas para identificação de fases de maturação dos ovos, seguindo o descrito por Prata (1957). O lobo quadrado do fígado foi preservado em tubo de coleta de fezes contendo 30 mL de formaldeído 4% tamponado com PBS para análises histopatológicas, como descrito por Tavares & Mourão (2021).

Para a contagem de ovos retidos no restante do fígado e intestino dos animais perfundidos, esses órgãos foram digeridos após a perfusão, limpos e pesados (TAVARES & MOURÃO, 2021). Para a realização da digestão, os fígados e intestinos foram acondicionados em tubos de 15 mL c nicos contendo KOH 10% e deixados *overnight* a 4 $^{\circ}$ C. Logo após, foram incubados a 37 $^{\circ}$ C por 30 minutos e centrifugados a

1.500 rpm por 10 minutos, com posterior remoção do sobrenadante. As etapas de centrifugação e remoção do sobrenadante ocorreram até que o *pellet* estivesse livre de muco. Após, o *pellet* foi ressuspenso em 1 mL de solução salina a 0,85% para contagem de ovos (contagem realizada em triplicata de 10 µL em microscopia óptica), segundo o descrito por Tavares & Mourão (2021).

3.9 ANÁLISES HISTOLÓGICAS DO LOBO QUADRADO DO FÍGADO DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM ESQUISTOSSÔMULOS EXPOSTOS AOS dsRNAs

Com o auxílio da Plataforma de Imuno-histoquímica do IRR, foram confeccionadas lâminas com seis secções do lobo quadrado do fígado de cada animal, para quantificação e caracterização dos granulomas presentes no órgão, segundo o protocolo preparado por Tavares & Mourão (2021).

As lâminas foram escaneadas com o auxílio do equipamento Aperio Versa 8 (Leica Biosystems), disponível na Plataforma de Microscopia e Microanálise de Imagens. As imagens já digitalizadas serão utilizadas para quantificar e caracterizar os granulomas presentes nas secções do fígado dos animais.

3.10 MICROSCOPIA CONFOCAL DE VERMES ADULTOS *ex vivo* RECUPERADOS DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM ESQUISTOSSÔMULOS EXPOSTOS AOS dsRNAs

Os vermes recuperados das infecções experimentais com esquistossômulos silenciados para os alvos foram utilizados para análise de fenótipo diferencial utilizando microscopia confocal de varredura a laser. Para tanto, pelo menos 20 casais foram fixados separadamente em AFA (93 mL de etanol absoluto, 5 mL de formaldeído e 2 mL de ácido acético) e depois preparados para a aquisição de imagens. Os vermes adultos foram mergulhados em carmin clorídrico por 30 minutos, seguido de duas lavagens com etanol 70% para remoção do excesso de corante. A seguir, os vermes passaram por um processo de descoloração para diferenciação e obtenção de contraste nos diferentes

órgãos, utilizando etanol clorídrico. Após, foram submetidos à desidratação em série alcoólica, por 5 minutos em etanol 70%, 80%, 95% e etanol absoluto. Após a série, foram mergulhados em solução de salicilato de metila e bálsamo do Canadá, onde permaneceram por 24 horas (TAVARES & MOURÃO, 2021).

Posteriormente, foi realizada a montagem das lâminas, que foram analisadas por microscopia confocal com o auxílio da equipe técnica chefiada pelo Dr. Marcelo Pelajo, da Plataforma de Microscopia Confocal do IOC, lotado no laboratório de Patologia do Instituto, e da Plataforma de Microscopia e Microanálise de Imagens do IRR. Para tanto, foram utilizados dois canais para a aquisição das imagens. O comprimento de 546 nm foi utilizado para excitar a marcação realizada com carmin clorídrico, evidenciando os órgãos dos parasitos e possíveis alterações morfológicas que pudessem estar presentes. Além disso, foi realizada excitação com o comprimento de 488 nm, utilizado para marcar ovos no interior do trato reprodutivo das fêmeas, uma vez que os ovos do parasito apresentam uma autofluorescência neste comprimento de onda (RINALDI *et al.*, 2011; TAVARES, 2020).

As imagens adquiridas no equipamento LS-710 (Zeiss, IOC) foram analisadas utilizando o software *Zen Blue* (Zeiss) em sua versão 2011, enquanto as imagens geradas pelo equipamento Nikon C2+ (Nikon, IRR) foram analisadas utilizando o software NIS Elements (versão 4.20.00). Para fêmeas, a área dos ovários foi avaliada, assim como o desenvolvimento das glândulas vitelínicas, presença de descamações no tegumento e de ovos no trato reprodutivo. Para os machos, foram avaliados os tubérculos (presença ou ausência), assim como área, número e morfologia dos lobos testiculares e presença de descamações no tegumento.

3.11 SILENCIAMENTO E EXPOSIÇÃO DE ESQUISTOSSÔMULOS A ERITRÓCITOS HUMANOS

Culturas de esquistossômulos também foram mantidas com meio MEM suplementado como descrito anteriormente (item 3.1) com adição de eritrócitos humanos, para avaliação da formação de pigmentos de hemozoína, indicativo de proteólise da hemoglobina, segundo protocolo previamente estabelecido (MORALES *et*

al., 2008). Após a determinação do dia de maior redução de transcritos para os alvos, esquistossômulos foram expostos aos dsRNAs específicos na concentração final de 200 nM. Após cinco dias de exposição, o RNA total de 4000 parasitos foi extraído para avaliação dos níveis de transcritos, segundo o protocolo descrito anteriormente. No nono dia de exposição, foram adicionados eritrócitos humanos lavados (sangue recém extraído, em tubo de coleta contendo heparina sódica, foi centrifugado a 1000 x g por 3 minutos e lavados duas vezes com 1,5 mL de meio RPMI 1640 (Gibco, Life Technologies), para remoção do plasma e outros componentes celulares, seguido de centrifugação e remoção das fases celulares) ressuspensos em 1 mL de meio RPMI 1640 com 5 µL de heparina estéril, para evitar coagulação. Para a cultura de esquistossômulos, foi padronizada a utilização de 1,2 µL de eritrócitos humanos lavados para cada 3 mL de meio de cultura. Os eritrócitos foram então mantidos a 4° C e a integridade deles foi verificada a cada sete dias por esfregaço sanguíneo e microscopia óptica.

O RNA dos parasitos também foi extraído nos dias dez, 14 e 20, para avaliação do perfil de expressão dos alvos. Como endógenos para a normalização, foram utilizados dois genes do parasito com expressão estável em diferentes fases, sendo eles *Smcoxi* e *Smfad* (Tabela 2). Para o cálculo da expressão, foi levada em consideração a média geométrica dos dois normalizadores, pelo método de $\Delta\Delta Ct$, como descrito por Livak & Schmittgen (2001).

Durante o período de exposição, os vermes foram fotografados para análise e quantificação de formação de hemozoína. Os parasitos totais e com pigmento de cada campo foram contados utilizando o software ImageJ (<https://imagej.net/ij/index.html>). As análises foram realizadas em triplicata para cada dia de exposição, em três réplicas biológicas.

3.12 TESTES ENZIMÁTICOS COM EXTRATO DE VERMES ADULTOS

Vermes adultos após silenciamento *in vitro*, bem como recuperados por perfusão após infecção de camundongos com esquistossômulos silenciados, foram utilizados para ensaios de atividade enzimática residual de aspartil proteases. Para tanto, parasitos

foram adicionados em tubo de 2 mL com solução de PBS 1x e CHAPS (Sigma, Merck) a 1%, em diluição de 1:6. A seguir, foram macerados por 2 minutos, em gelo, com um dispersor Turrax (IKA). O macerado foi então submetido a centrifugação (20.000 x g a 4 °C) por 1 hora. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de 1,5 mL e a dosagem proteica foi realizada pelo método de Lowry utilizando o kit DC Protein Assay (Bio-Rad) utilizando o protocolo disponibilizado pelo fabricante. Para isso, foi realizada uma diluição seriada de albumina sérica bovina (BSA) em cinco pontos, de 0,2 a 1,5 mg/mL como padrão, e os dados de absorbância a 750 nm dos extratos foram interpolados com a curva padrão de BSA (Promega).

A seguir, foram realizados ensaios de atividade enzimática com os extratos preparados e substrato fluorogênico FRET, segundo o descrito (ARAUJO-MONTOYA *et al.*, 2019). Como utilizado por Leontovyc e colaboradores (2018), foi adicionado a cada reação 5 µM do inibidor de cisteíno-protease E-64 (Sigma), uma vez que essas cisteíno-proteases podem apresentar atividade residual no extrato no pH utilizado para os ensaios (LEONTOVYC *et al.*, 2018). De acordo com a quantificação proteica do extrato, foram utilizados 30 ou 40 mg de extrato e 5 ou 10 mM de substrato. As leituras foram realizadas no equipamento Variskan LUX (ThermoFisher Scientific), por 30 minutos, após incubação do extrato em tampão contendo 5 µM de E-64 a 37 °C por 10 minutos e adição do substrato. Ensaios contendo 1 µM de pepstatina A foram também realizados para comprovar a atividade de aspartil protease no extrato. Os dados de velocidade média foram utilizados para o cálculo de atividade residual em extratos de vermes silenciados em relação aos extratos de vermes dos controles negativo e inespecífico (GFP). Foram utilizadas 10 janelas de leitura e pelo menos 40 leituras para cada reação/amostra, que foram executadas em triplicata em placa óptica de fundo plano de 96 poços.

Após a padronização, foram triados extratos de vermes adultos controle mantidos em cultura por cinco e 12 dias, além de réplicas de vermes provenientes das infecções experimentais. Devido ao baixo número de vermes disponível, foi feito um “*pool*” com as duas réplicas de vermes adultos expostos a dsRNAs por cinco dias e as duas réplicas de vermes recuperados de perfusão após infecção com esquistossômulos silenciados. As triagens ocorreram em condição padrão com 30 mg de extrato e 5 mM de substrato.

Entretanto, algumas amostras foram triadas com 40 mg de extrato e 10 mM de substrato, dependendo da quantificação obtida ou do resultado da primeira triagem.

3.13 COMPARAÇÃO DE EFICIÊNCIA ENTRE DOIS MÉTODOS DE SILENCIAMENTO GÊNICO POR RNA DE INTERFERÊNCIA

Sequências de siRNAs previamente desenhadas para as *Smcd1*, *Smcd2* e *Smcd3*, foram sintetizadas e fornecidas gentilmente pela Anylam Pharmaceuticals (Cambridge, EUA) e utilizadas para os ensaios de silenciamento de esquistossômulos, com o objetivo de comparar experimentalmente a eficiência do silenciamento utilizando siRNAs em relação aos dsRNAs (longos, com ~500pb). Para tanto, dentre as sequências disponibilizadas (135 sequências), foram selecionadas aquelas que coincidiam com a região interna do fragmento utilizado para a síntese de dsRNA (previamente descrito no item 3.3), sendo cinco para *Smcd1*, três para *Smcd2* e 20 para *Smcd3*. A obtenção, cultura e exposição dos esquistossômulos aos siRNAs foi realizada conforme descrito para os dsRNAs. Os siRNAs foram adicionados em conjuntos de três sequências para *Smcd2* e em três e duas sequências para *Smcd1*, sempre na concentração final de 200 nM (66,6 nM ou 100 nM de cada sequência, respectivamente). Foram selecionadas as sequências identificadas como A-172551.1, A-172559.1 e A-172551.2 para o silenciamento utilizando três sequências para *Smcd1*; A-172553.1 e A-172551.2 para os ensaios para duas sequências também visando *Smcd1* como alvo; e A-172614.1, A-172614.2 e A-172624.2 com alvo nos transcritos de *Smcd2*. Como controle inespecífico, foi utilizada a sequência siC-416 (*scrambled*), r(GCAAUAAGAUGGAGUACAA)TT. Após dois, quatro e sete dias de exposição, foi realizada a extração de RNA, síntese de cDNA e avaliação do nível de transcritos por RT-qPCR como descrito anteriormente. Os ensaios foram executados em uma réplica biológica.

3.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram executadas no software GraphPad Prism (Graphpad) em suas versões 5.0, 6.0 e 8.0, sendo os gráficos construídos na versão 8.0

do software. Os dados quantitativos e brutos foram organizados e analisados com o auxílio do pacote Microsoft Office (Microsoft Corporation), em especial Microsoft Office Excel, em suas versões 2010 e 365.

Para cada análise, primeiramente foi realizado o teste de normalidade, para definição da abordagem a ser utilizada. Os outliers foram removidos após utilização do método ROUT, com Q=1%, segundo o descrito por Motulsky e Brown (2006). O teste t de Student foi utilizado para dados que seguem a distribuição normal, enquanto o teste de Mann-Whitney foi utilizado para dados que não seguem a distribuição normal. Dados com dois parâmetros de análise (dia e grupo experimental) foram analisados utilizando o teste 2-WAY ANOVA. O valor de significância foi decidido *a priori* como $p < 0,05$. As análises estatísticas citadas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versões 5.0 e 6.0.

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DAS ESTRUTURAS GENÔMICAS E PROTEICAS E DADOS DE EXPRESSÃO DAS SmCDs UTILIZANDO FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA

Utilizando a versão 7.0 do genoma do parasito, foram realizadas buscas pelas sequências codificantes (CDS) dos genes *Smcd1*, *Smcd2* e *Smcd3* no banco de dados do WormBase ParaSite. As análises realizadas identificaram a existência de outros genes com alta identidade com *Smcd3*, como descrito na tabela abaixo (Tabela 3). Estes genes se encontram duplicados em *tandem* no genoma do parasito (Figura 1), como também relatado por Wang e colaboradores (2017). Todos os genes identificados apresentam, segundo consulta ao banco de dados de estruturas e domínios do PFAM, o domínio aspartil protease (peptidase do clã AA e família A1), denominado pelo identificador PF00026. A porcentagem de identidade entre as sequências de aminoácidos codificadas por cada gene foi avaliada utilizando o programa EMBOSS Water, utilizando *Smcd3* como referência.

Tabela 3 – Identificadores recuperados após comparação com a sequência codificadora de SmCD3, na versão 7.0 do genoma do parasito. Os identificadores foram utilizados para a obtenção das sequências de aminoácidos, ordenadas pelo valor de identidade em comparação à SmCD3, do maior para o menor.

Smp identificado	% de identidade em comparação com SmCD3 (Smp_018800)	Domínio	ID PFAM
Smp_018800	-	Peptidase aspártica Família A1	PF00026
Smp_132470	91%	Peptidase aspártica Família A1	PF00026
Smp_335900	89%	Peptidase aspártica Família A1	PF00026
Smp_309540	85%	Peptidase aspártica Família A1	PF00026
Smp_335890	82%	Peptidase aspártica Família A1	PF00026
Smp_132480	73%	Peptidase aspártica Família A1	PF00026

Utilizando as análises realizadas pelo WormBase, pôde-se observar a predição de ortólogos de *Smcd3* em seis espécies de *Schistosoma*, bem como a presença de duplicações do gene em *S. mansoni*, *S. haematobium* e *S. rodhaini*. Também foi possível observar que não há ortólogos preditos em *Caenorhabditis elegans*. Tanto *Smcd3* quanto suas duplicações estão localizadas no cromossomo 3 do parasito.

Utilizando dados de RNAseq depositados no banco de dados do WormBase ParaSite, buscamos evidência experimental da expressão de cada duplicação de *Smcd3* nas fases de esquistossômulos e vermes adultos fêmeas e machos, como pode ser visto na Figura 1. Foi observado que *Smcd3* (Smp_018800) apresenta baixa expressão em todas as fases analisadas quando comparado às outras duplicações *Smcd3-like*, principalmente em relação à Smp_132470 e Smp_335900.

Figura 1 – Navegador de genoma com representação esquemática da estrutura exón-ínton para o gene *Smcd3* demonstrando a presença de duplicações em *tandem*.

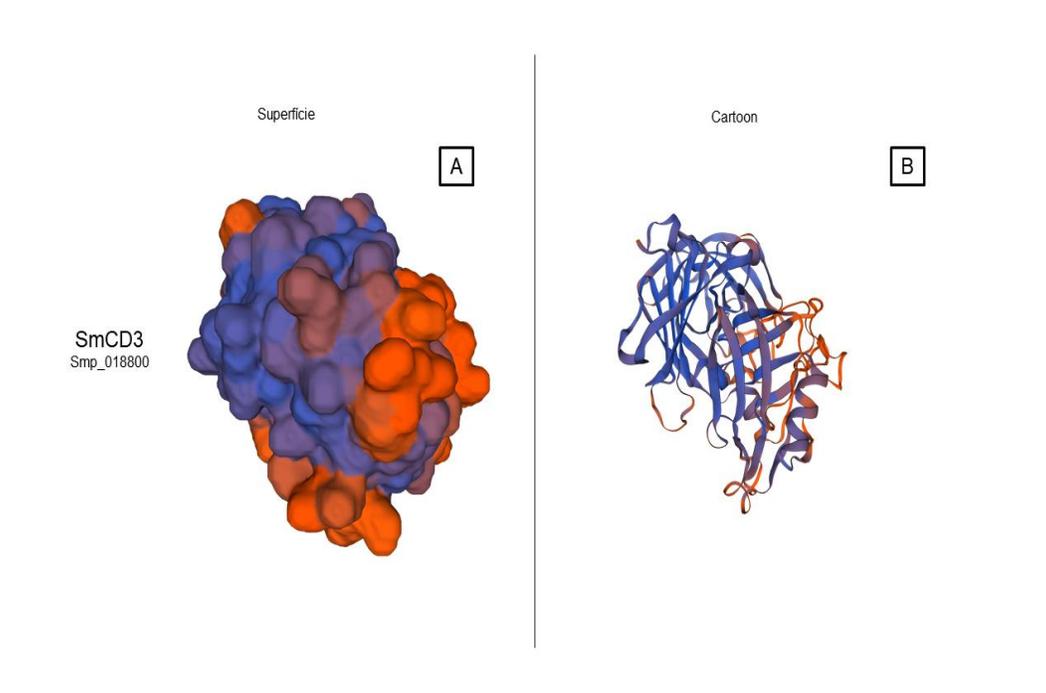


Pode-se observar a localização do gene *Smcd3* (Smp_018800) e outros cinco genes próximos, destacados por retângulos (Smp_335890, Smp_335900, Smp_309540, Smp_132470 e Smp_132480). É possível observar também, por dados de RNAseq (barras azuis), uma baixa expressão de *Smcd3* (Smp_018800) em relação às outras duplicações do gene. **FONTE:** elaborado pelo autor.

As análises também indicaram a presença de isoformas para os genes que codificam proteases SmCD3-like, sendo observadas três isoformas para Smp_335900, três para Smp_335890 e duas para Smp_132480. Já Smp_132470 e Smp_309540 apresentam apenas uma isoforma na versão atual do genoma.

Foi realizada a modelagem computacional da AP SmCD3 (Smp_018800) como pode ser observado abaixo (Figuras 2).

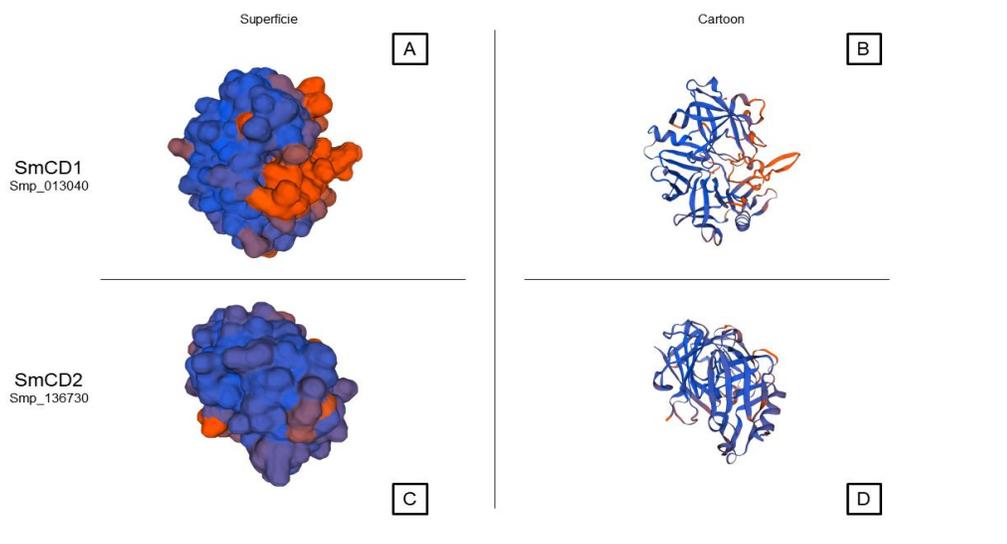
Figura 2 – Modelos tridimensionais preditos para SmCD3 (Smp_018800).



Em (A) temos o modelo para a superfície de SmCD3 e em (B), o modelo de *cartoon*. Modelagem com base na estrutura cristalográfica da catepsina D putativa de *Ixodes ricinus* (5n7n.1.A). As cores indicam a confiança nas regiões do modelo. Regiões em laranja apresentam menor confiabilidade na estrutura, enquanto as regiões em azul, maior confiabilidade. **FONTE:** elaborado pelo autor.

Também foi realizada a modelagem das demais proteínas alvo deste trabalho, SmCD1 e SmCD2, com base nos dados disponíveis na versão 7.0 do genoma do parasito, como observado a seguir (Figura 3).

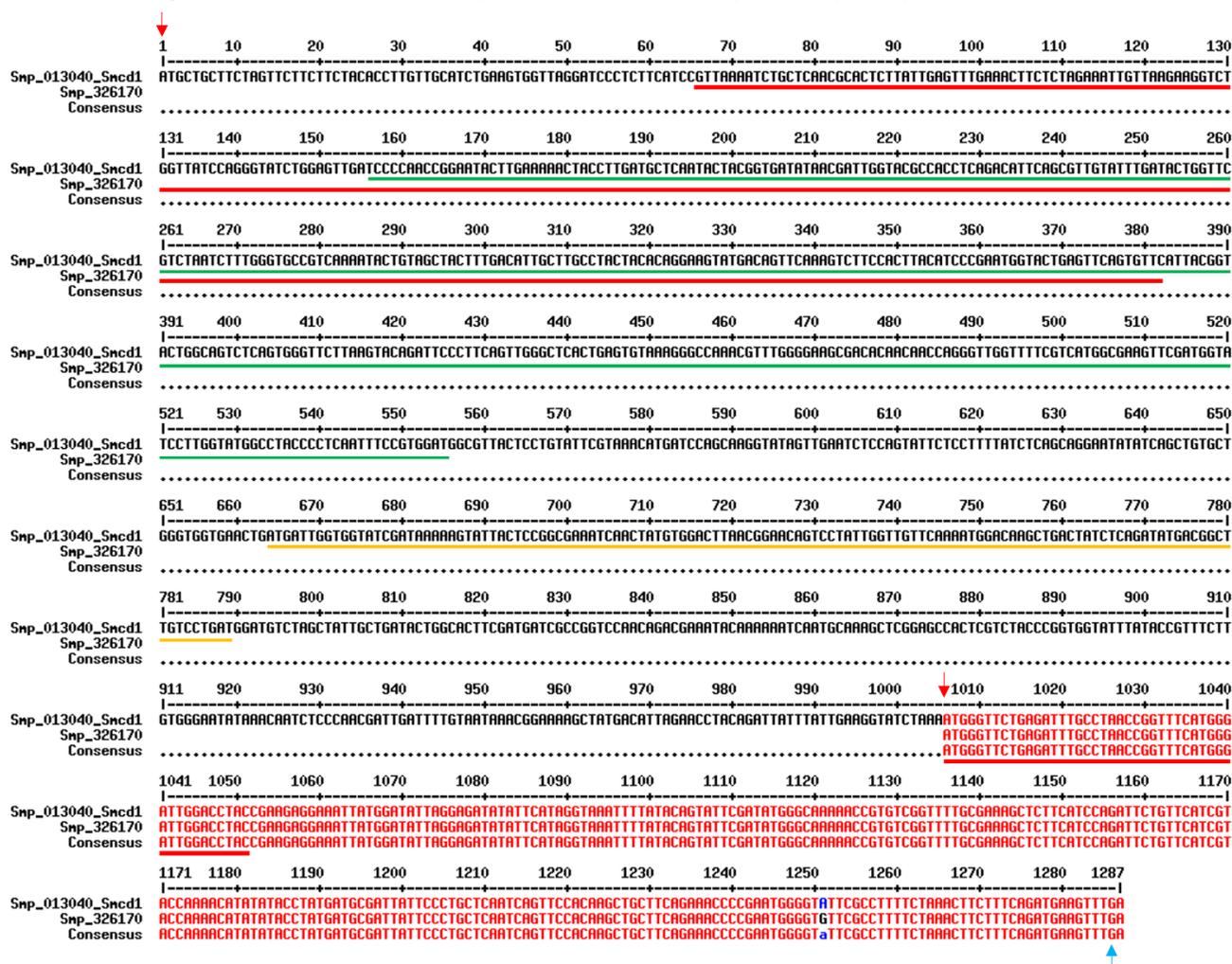
Figura 3 – Modelos tridimensionais preditos para SmCD1 (Smp_013040) e SmCD2 (Smp_136730).



Em (A) e (C) temos os modelos para a superfície de SmCD1 e SmCD2, respectivamente. Em (B) e (D), os modelos de *cartoon* para SmCD1 e SmCD2. O modelo de SmCD1 (Smp_013040) foi construído com base na estrutura cristalográfica do pepsinogênio (2psg.1.A). Já para SmCD2 (136730), foi construído com base na estrutura cristalográfica da prerenina humana (4amt.1.A). As cores indicam a confiança nas regiões do modelo. Regiões em laranja apresentam menor confiabilidade na estrutura, enquanto as regiões em azul, maior confiabilidade. **FONTE:** elaborado pelo autor.

Utilizando as análises genômicas fornecidas pelo WormBase para *Smcd1*, foi observado que ortólogos de *Smcd1* são preditos em seis espécies do gênero. Como para *Smcd3* e suas duplicações, *Smcd1* está localizado no cromossomo 3 do parasito, e apresenta um único ortólogo predito em *C. elegans*, *asp-4*.

As análises realizadas com base na nova versão do genoma do parasito retornaram também a existência de uma duplicação de parte da sequência codificadora de *Smcd1*, como também foi observado para outras espécies (*Schistosoma bovis* e *Schistosoma mattheei*), com duplicações de *Smcd1*. O gene identificado como Smp_326170 é semelhante à última região codificante (éxon) de *Smcd1* (Figura 4), apresentando 99% de identidade de aminoácidos. Foi observado apenas um *mismatch* entre as sequências de nucleotídeos. É possível observar que os iniciadores de qPCR são específicos para *Smcd1*, não amplificando Smp_326170. Desta forma, os dados de expressão de *Smcd1* não refletem os de sua duplicação.

Figura 4 – Alinhamento das sequências de *Smcd1* (Smp_013040) e Smp_326170.

Em vermelho está representado o alinhamento entre as sequências e em azul está destacada a diferença entre as sequências. Em letras maiúsculas, em vermelho, está representada a sequência consenso. As setas vermelhas indicam os códons de iniciação, enquanto a seta azul representa o códon de terminação. A região de *Smcd1* marcada em verde representa a área de complementariedade com a sequência de dsRNA, enquanto a área demarcada pela linha amarela indica a região amplificada pelos iniciadores para a qPCR. As linhas vermelhas demarcam a localização do domíniosPF0026 (aspartil protease) em cada um dos dois genes. **FONTE:** elaborado pelo autor.

O transcrito maduro de Smp_326170 apresenta 345 pb, codificando 93 resíduos de aminoácidos. Análises realizadas no banco de dados PFAM, por predição de domínio, mostram a existência de um domínio aspartil protease truncado, que se encontra na região entre 3-47 pb da sequência. A sequência utilizada para o silenciamento de *Smcd1* não cobre a região codificadora de Smp_326170, sendo, portanto, improvável a ocorrência de silenciamento. Os

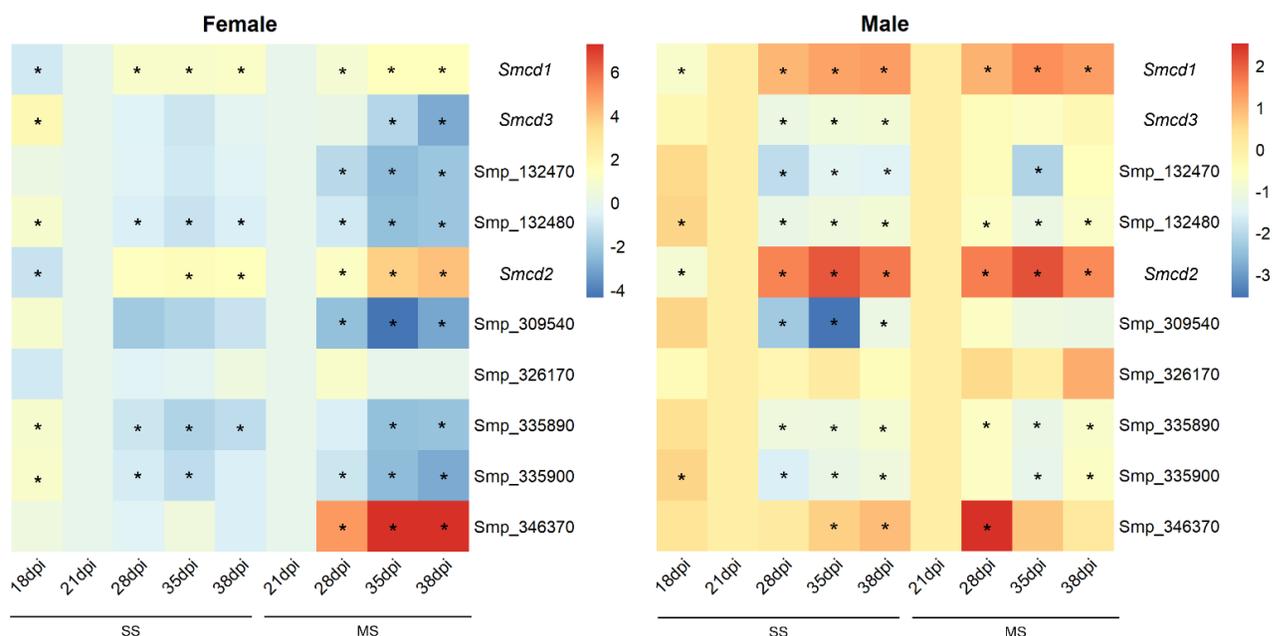
iniciadores de qPCR para avaliação dos níveis de transcrito de *Smcd1* não anelam na sequência de Smp_326170, ou seja, os níveis de transcrito medidos para *Smcd1* não sofrem a interferência da possível expressão de Smp_326170.

Os dados do WormBase também evidenciam a localização de *Smcd2* no cromossomo 3 do parasito. Como para *Smcd3*, não foram preditos ortólogos em *C. elegans*. Entretanto, ortólogos foram identificados em 5 espécies do gênero, como será possível observar adiante. Nenhum ortólogo de *Smcd2* foi predito em *S. haematobium*.

Além das duplicações encontradas para *Smcd3* (Smp_018800), uma outra SmCD foi encontrada no genoma do parasito. Enquanto *Smcd1*, *Smcd2* e *Smcd3* (incluindo todas as suas duplicações) se localizam no cromossomo 3 do parasito, Smp_346370 está localizada no cromossomo 1. Além disso, foi visto que existem ortólogos apenas em *S. haematobium* e *S. curassoni*, mas não em *S. japonicum*. Para este gene, foram identificados 17 ortólogos em *C. elegans*.

Análises realizadas pela então aluna de iniciação científica, Ester Silva Souza dos Santos, juntamente à Dra. Sandra Grossi Gava, demonstraram que para fêmeas provenientes de infecção mista, Smp_346370 apresenta aumento de expressão do 21º ao 38º dias pós-infecção (Figura 5), enquanto o aumento na expressão de *Smcd1* (Smp_013040) e *Smcd2* (Smp_136730) é visto desde o dia 21 pós-infecção, independentemente da presença de machos. Os dados também evidenciam, que as demais apresentam um perfil similar de diminuição da expressão ao longo da evolução da infecção nas fêmeas de infecção mista. Já para machos, foi visto um aumento de expressão estatisticamente significativo de *Smcd1* (Smp_010340) e *Smcd2* (Smp_136730) no decorrer da infecção tanto para machos recuperados de infecção mista quanto para os recuperados de infecções unissexuais. Smp_346370 apresenta um grande aumento de expressão do dia 21 ao dia 28 após a infecção. Novamente, em macho, as demais catepsinas D apresentam perfis similares de diminuição de expressão após 21 dias de infecção, dessa vez, para machos de infecção unissexual, o oposto do perfil de Smp_013040, Smp_136730 e Smp_346370.

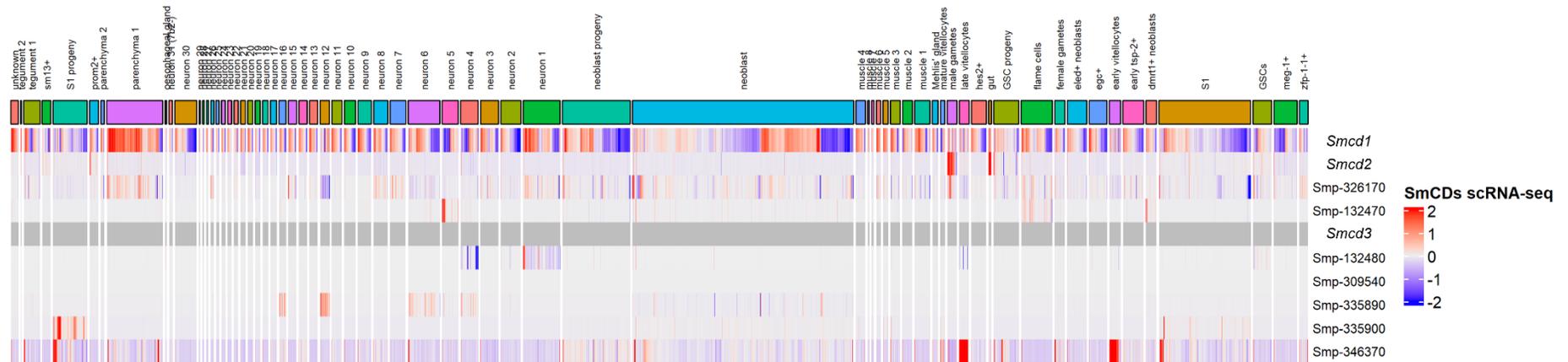
Figura 5 – Expressão das APs em vermes adultos fêmeas e machos.



Padrões de expressão das APs em vermes adultos fêmeas e machos de *S. mansoni* provenientes de infecção unissexual (SS) ou infecção mista (MS). As alterações de expressão são relativas ao 21º dia pós-infecção (dpi). As colunas indicam o estágio de desenvolvimento dos vermes adultos (18, 21, 28, 25 e 38 dpi). A escala de cores indica aumento (vermelho) ou diminuição (azul) dos transcritos analisados com base nos valores log2 Fold Change. Os asteriscos representam os valores com significância estatística ($padj < 0,05$). **FONTE:** elaborado por Ester Silva Souza dos Santos e Sandra Grossi Gava e modificado por Felipe Miguel Nery Lunkes.

Também foi visto, por dados de sequenciamento de RNA de célula única (scRNAseq), que tanto *Smcd1* quanto *Smcd2* são expressas nas células do intestino. Segundo os dados de Wendt e colaboradores (2020), representados na figura 6, *Smcd1* (Smp_013040) apresenta expressão enriquecida nos clusters “gut”, “muscle 5”, “muscle 6”, “parenchyma 1”, “tegument 2” e “unknown”. Já para *Smcd2* (Smp_136730), foi encontrado enriquecimento no cluster “gut”. Para *Smcd3* (Smp_018800), bem como para Smp_326170, Smp_132480, Smp_309540, Smp_335890 e Smp_335900, não foi observada expressão ou enriquecimento em nenhum dos clusters. Já para Smp_346370, foi encontrado enriquecimento nos clusters “late vitellocytes” e “early vitellocytes”.

Figura 6 – Perfil de expressão das APs em células únicas de vermes adultos do parasito *Schistosoma mansoni*.



Perfil de expressão das APs em diversos tipos celulares de *S. mansoni*. As colunas representam cada um dos tipos celulares analisados, enquanto as linhas representam cada uma das APs. Ao lado, a escala representa o nível de expressão de cada gene analisado. A coloração azul indica baixa expressão, enquanto a coloração vermelha representa alta expressão. **FONTE:** elaborado por Ester Silva Souza dos Santos e Sandra Grossi Gava e modificado por Felipe Miguel Nery Lunkes.

De acordo com os dados de Wendt e colaboradores (2020), podemos observar a expressão dos alvos em tipos específicos de células do parasito (Figura 7) por scRNAseq. Para *Smcd1* (Smp_013040), podemos observar que o alvo é expresso em todos os tipos celulares, com foco para células do parênquima, músculo e tegumento (Figura 7A). Quando observamos a expressão de *Smcd2* (Smp_136730), observamos a expressão do alvo no intestino de vermes adultos fêmeas maduras e imaturas e machos (Figura 7B). Por fim, a expressão de Smp_346370 está concentrada na vitelária de fêmeas maduras (Figura 7C).

Figura 7 – Expressão de *Smcd1*, *Smcd2* e *Smp_346370* nos diversos tipos celulares de vermes adultos de *S. mansoni*.

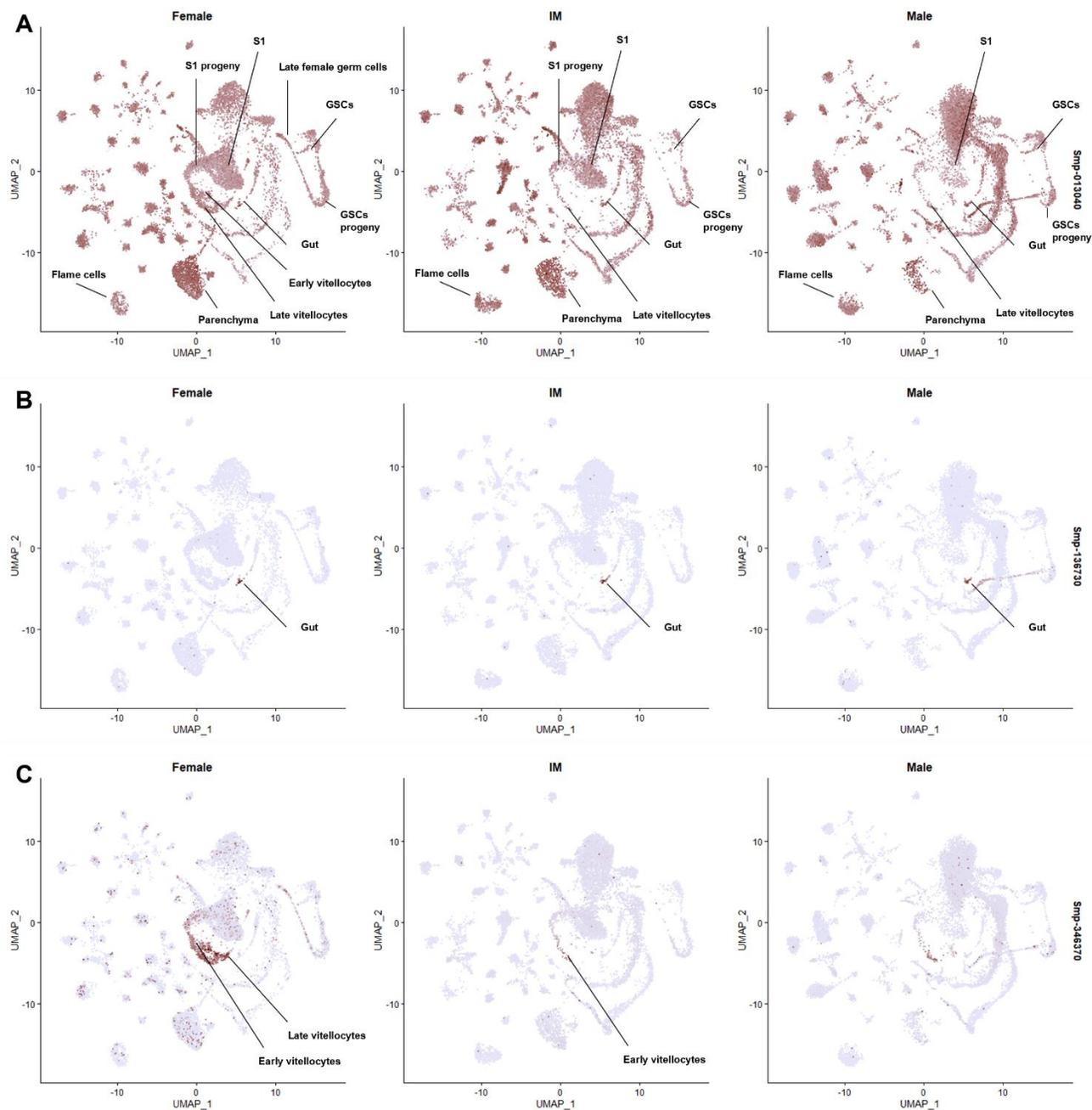


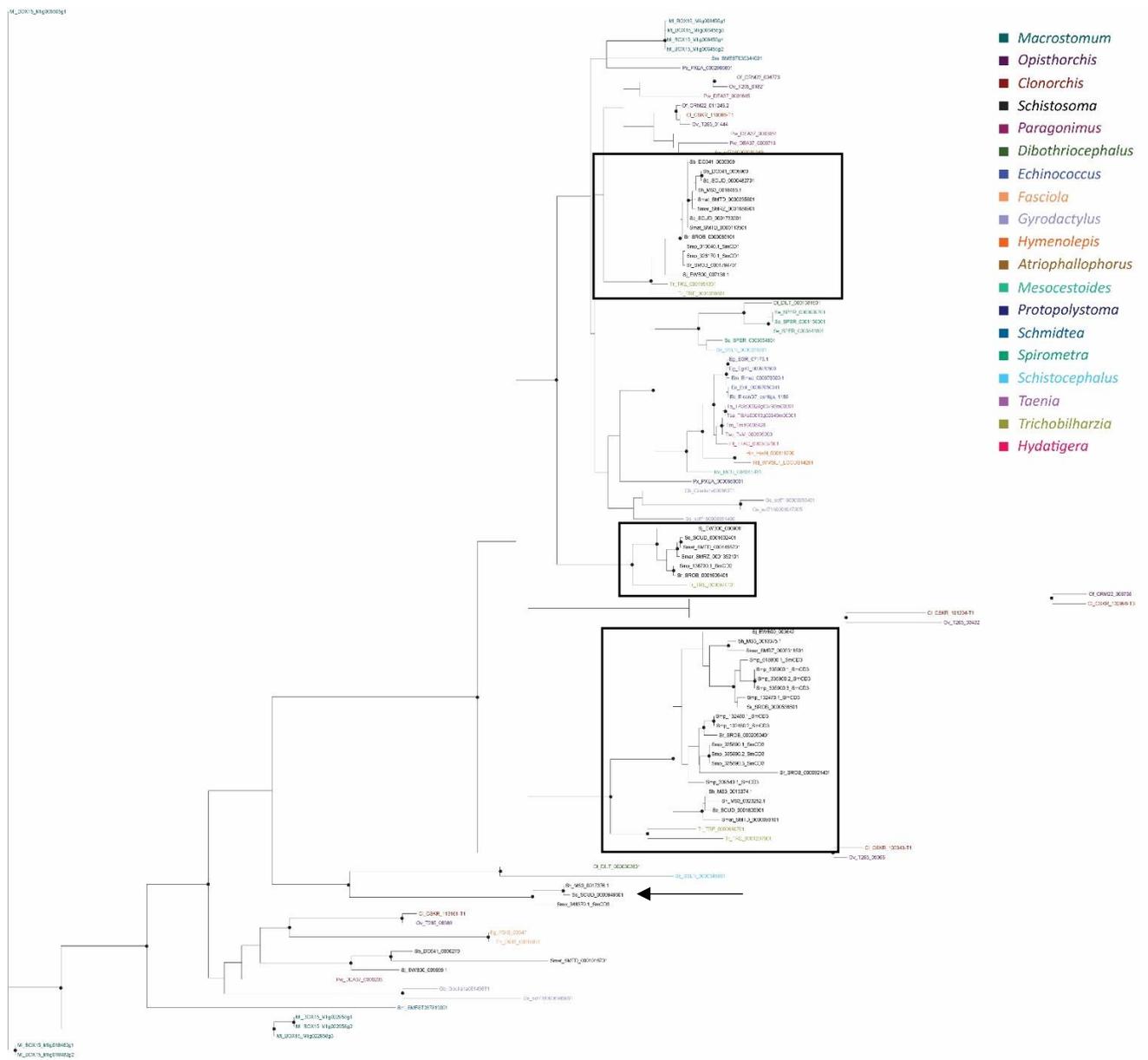
Gráfico *Uniform Manifold Approximation and Projection* (UMAP) representando os 68 clusters de scRNAseq de *S. mansoni*, baseado no atlas desenvolvido por Wendt e colaboradores (2020). Em (A), *Smcd1*, em (B), *Smcd2* e em (C), *Smp_346370*. Os cluster onde existe a expressão de cada alvo estão representados em cores mais fortes. **FONTE:** elaborado por Ester Silva Souza dos Santos e Sandra Grossi Gava e modificado por Felipe Miguel Nery Lunkes.

Quando analisamos a árvore gerada a partir das 112 sequências obtidas de *S. mansoni* e outros platelmintos (Figura 8), *Smcd1* (representado como *Smp_013040*),

Smcd2 (Smp_136730) e *Smcd3* se segregam em três clados diferentes. *Smcd1* e *Smcd2* apresentam uma distância evolutiva menor, enquanto a divergência dos dois e *Smcd3* é maior. A árvore sugere, desta forma, que a divergência entre *Smcd1* e *Smcd2* seja mais recente em relação a *Smcd3*. Todos os três alvos se agrupam em clados contendo representantes do gênero *Trichobilharzia*, outro gênero pertencente à família Schistosomatidae. A topologia da árvore sugere, desta forma, que a divergência que originou *Smcd1* e *Smcd2* é mais recente em relação a *Smcd3*.

A árvore construída também sugere uma distância evolutiva maior entre Smp_346370 e as demais SmCDs, mostrando que o surgimento de *Smcd1*, *Smcd2* e *Smcd3* (com suas duplicações) é mais recente que o surgimento de Smp_346370.

Figura 8 – Filogenia das APs dentro do filo dos platelmintos.

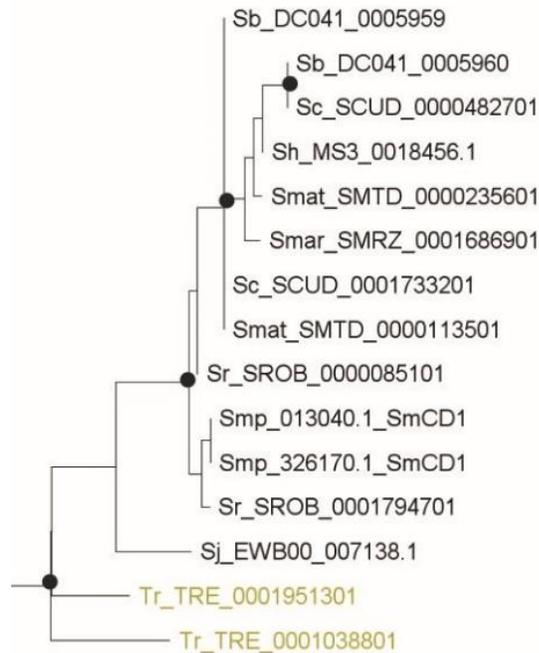


Árvore filogenética de catepsina D-like de platelmintos reconstruída a partir do alinhamento de seqüências de aminoácidos pelo método de máxima verossimilhança. Os valores de suporte foram obtidos pelo teste de *Shimodaira-Hasegawa approximate Likelihood Ratio Test* (SH aLRT) e *UltraFast Bootstrap* (UFBoot) onde as esferas representam SH-aLRT $\geq 80\%$ e UFBoot $\geq 95\%$. Cada quadrado representa um ramo contendo *Smcd1*, *Smcd2* e *Smcd3*, enquanto a seta marca *Smp_346370*. Cada gênero está representado por uma cor. Os ramos que contêm os genes de *Smcd1*, *Smcd2* e *Smcd3* estão demarcados por quadrados. **FONTE:** elaborado por Ester Silva Souza dos Santos e Sandra Grossi Gava e modificado por Felipe Miguel Nery Lunkes.

Abaixo estão ampliações dos ramos onde se localizam *Smcd1* (Figura 9), *Smcd2* (Figura 10) e *Smcd3* e suas duplicações (Figura 11). Como esperado, *Smp_013040*

(*Smcd1*) e Smp_326170 (duplicação do último éxon de *Smcd1*) se agruparam (Figura 9) a outras espécies do gênero *Schistosoma* e de *Trichobilharzia*. Podemos observar a existência de ortólogos de *Smcd1* em *Schistosoma bovis*, *Schistosoma curassoni*, *S. haematobium*, *Schistosoma mattheei*, *Schistosoma rodhaini* e *S. japonicum*.

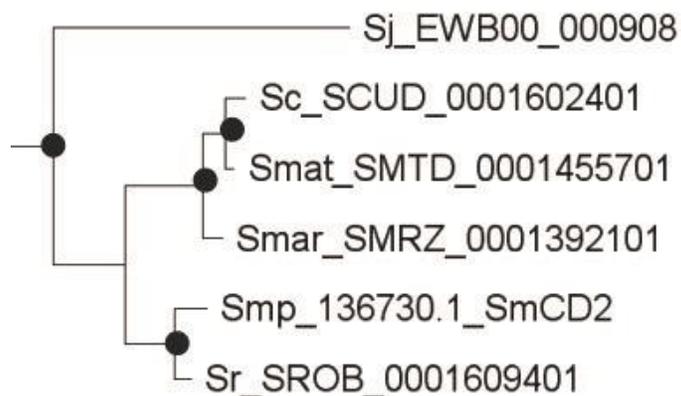
Figura 9 – Ampliação da árvore com o ramo contendo *Smcd1* (Smp_013040).



Árvore filogenética parcial de catepsina D-like de platelmintos reconstruída a partir do alinhamento de sequências de aminoácidos pelo método de máxima verossimilhança, com foco em *Smcd1*. Os valores de suporte foram obtidos pelo teste de Shimodaira-Hasegawa approximate Likelihood Ratio Test (SH aLRT) e UltraFast Bootstrap (UFBoot) onde as esferas representam SH-aLRT $\geq 80\%$ e UFBoot $\geq 95\%$. Cada gênero está representado por uma cor. **FONTE:** elaborado por Ester Silva Souza dos Santos e Sandra Grossi Gava e modificado por Felipe Miguel Nery Lunkes.

Na figura abaixo (Figura 10), é possível observar o ramo onde se encontra *Smcd2*. A árvore sugere que, embora ortólogos sejam encontrados em outras espécies do gênero, o número de espécies que apresentam *Smcd2* no genoma é inferior ao número que apresenta *Smcd1*. Ortólogos de *Smcd2* foram identificados em *S. japonicum*, *S. curassoni*, *S. mattheei*, *Schistosoma margrebowiei* e *S. rodhaini*. Não foram identificados ortólogos em *S. haematobium*, parasito causador da esquistossomose urinária.

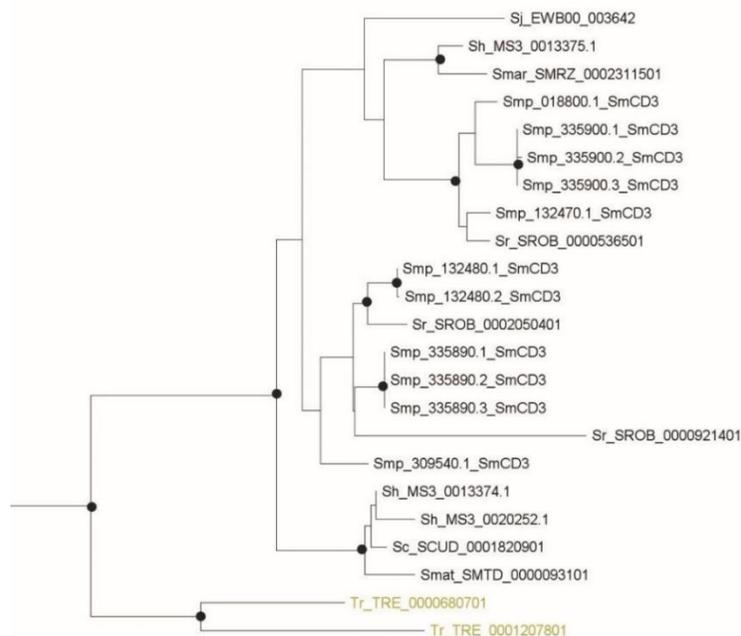
Figura 10 – Ampliação da árvore com o ramo contendo *Smcd2* (Smp_136730).



Árvore filogenética parcial de catepsina D-like de platelmintos reconstruída a partir do alinhamento de sequências de aminoácidos pelo método de máxima verossimilhança, com foco em *Smcd2*. Os valores de suporte foram obtidos pelo teste de *Shimodaira-Hasegawa approximate Likelihood Ratio Test* (SH aLRT) e *UltraFast Bootstrap* (UFBoot) onde as esferas representam SH-aLRT $\geq 80\%$ e UFBoot $\geq 95\%$. Cada gênero está representado por uma cor. **FONTE:** elaborado por Ester Silva Souza dos Santos e Sandra Grossi Gava e modificado por Felipe Miguel Nery Lunkes.

Smcd3 aparenta, na árvore inferida, ter derivado antes de *Smcd1* e *Smcd2*, acumulando mais diferenças em relação a estes. Pode-se observar ortólogos em várias espécies do gênero *Schistosoma*, como visto abaixo (Figura 11). Na figura podemos observar que, dentre as espécies do gênero, uma ortóloga é encontrada em *S. japonicum*, *S. haematobium*, *S. margrebowiei*, *S. curassoni*, *S. mattheei* e *S. rodhaini*. Embora existam ortólogos em todas as espécies citadas, em *S. mansoni* ocorreram diversos processos de duplicação do gene, o que também só foi observado para *S. haematobium* e *S. rodhaini*, que apresentam duas duplicações do ortólogo de *Smcd3* cada.

Figura 11 – Ampliação da árvore com o ramo contendo *Smcd3* (Smp_018800) e suas duplicações.



Árvore filogenética parcial de catepsina D-like de platelmintos reconstruída a partir do alinhamento de sequências de aminoácidos pelo método de máxima verossimilhança, com foco em *Smcd3* e suas duplicações. Os valores de suporte foram obtidos pelo teste de *Shimodaira-Hasegawa approximate Likelihood Ratio Test* (SH-aLRT) e *UltraFast Bootstrap* (UFBoot) onde as esferas representam SH-aLRT $\geq 80\%$ e UFBoot $\geq 95\%$. Cada gênero está representado por uma cor. **FONTE:** elaborado por Ester Silva Souza dos Santos e Sandra Grossi Gava e modificado por Felipe Miguel Nery Lunkes.

4.2 PADRONIZAÇÃO DE INICIADORES PARA RT-qPCR

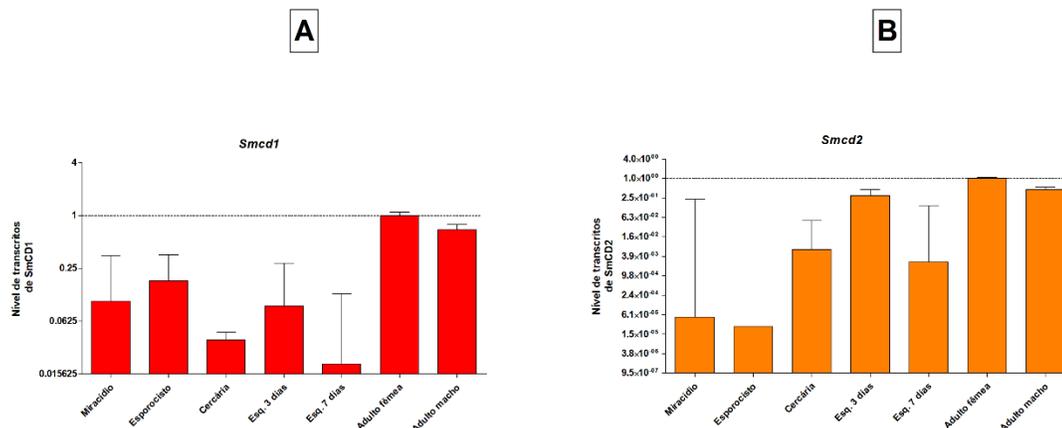
Visamos então validar experimentalmente muitos dos dados analisados *in silico*. Inicialmente foi realizada a padronização dos iniciadores para RT-qPCR, desenhados para os transcritos da aspartil proteases (*Smcd1*, *Smcd2* e *Smcd3*).

Após as análises utilizando múltiplas concentrações, foram padronizadas as concentrações de 400 nM para o iniciador de *Smcd1* ($R^2 = 0,999$, Eficiência = 100,563%), 200 nM para *Smcd2* ($R^2 = 0,997$, Eficiência = 87,551%) e 600 nM para *Smcd3* ($R^2 = 0,963$, Eficiência = 99,35%) para utilização nos ensaios de RT-qPCR posteriores.

4.3 PERFIL DE EXPRESSÃO NAS FASES DO PARASITO

Foi realizada a quantificação dos transcritos de *Smcd1* e *Smcd2* em diferentes fases do parasito: miracídeos, esporocistos, cercarias, esquistossômulos três e sete dias após a transformação e vermes adultos machos e fêmeas, separadamente (Figura 12).

Figura 12 - Perfil de expressão de *Smcd1* e *Smcd2* nas diferentes fases do parasito.



Cada barra representa a expressão de *Smcd1* (A) ou *Smcd2* (B) em diferentes fases do parasito (miracídio, esporocisto, cercária, esquistossômulo três e sete dias após a transformação, verme adulto macho e verme adulto fêmea), normalizada pelos controles endógenos e normalizada em relação à fase com maior expressão de cada alvo, em $-\log_2$. As barras representam o erro padrão. **FONTE:** elaborado pelo autor.

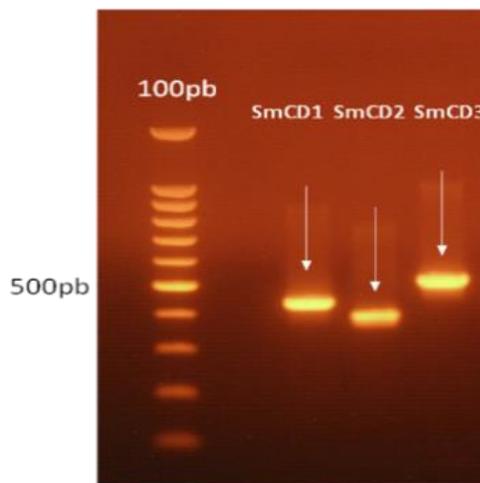
Os resultados evidenciam que os dois alvos são mais expressos na fase de verme adulto, sendo mais expressos em fêmeas. Pode-se observar também que *Smcd2* é pouco expresso nas fases de miracídio, esporocisto, cercária e esquistossômulos sete dias após transformação. Podemos observar que *Smcd1* é 1,42 vezes mais expresso em vermes adultos fêmeas que em machos. Quando comparado com a segunda fase de maior expressão, também vermes adultos machos, a expressão de *Smcd2* em fêmeas é duas vezes maior.

O perfil de expressão de *Smcd3* não foi obtido tendo em vista que foram detectados mais de um pico na curva de dissociação em reações utilizando cDNA obtido a partir de vermes adultos, indicando que os iniciadores desenhados não eram capazes de diferenciar *Smcd3* de suas duplicações.

4.4 AMPLIFICAÇÃO DE DNA COMPLEMENTAR E SÍNTESE DE dsRNA PARA SILENCIAMENTO

Primeiramente, foi realizada uma reação de PCR para a amplificação dos alvos. Foram obtidas bandas de tamanho correspondente ao esperado para todos os genes (Figura 13). É possível observar que os *amplicons* apresentam o tamanho esperado para cada um dos alvos (430 pb para *Smcd1*, 382 pb para *Smcd2* e 504 pb para *Smcd3*).

Figura 13 – Perfil eletroforético de fragmentos dos transcritos dos genes *Smcd1*, *Smcd2* e *Smcd3*.



Gel de agarose não desnaturante a 1% corado com brometo de etídio. Na primeira canaleta foi aplicado o padrão de peso molecular 100 pb (Promega) e nas demais canaletas foram aplicados os produtos de PCR dos genes alvos, *Smcd1* (430 pb), *Smcd2* (382 pb) e *Smcd3* (504 pb). **FONTE:** elaborado pelo autor.

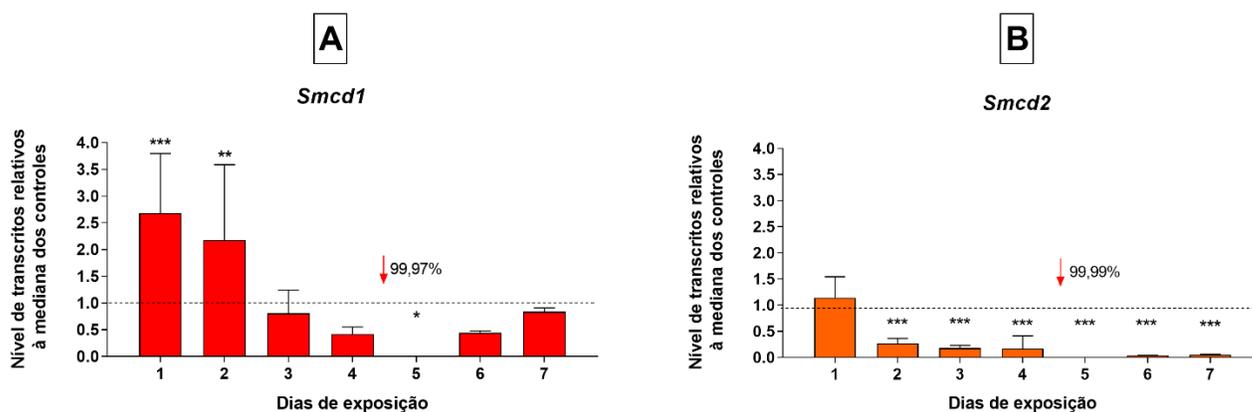
Os produtos de PCR obtidos foram purificados e utilizados como molde para a síntese de dsRNAs.

4.5 AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE *SmCD1* E *SmCD2* EM ESQUISTOSSÔMULOS

4.5.1 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA APÓS EXPOSIÇÃO AOS dsRNAs

A expressão gênica de *Smcd1*, *Smcd2* e *Smcd3* nos esquistossômulos expostos aos dsRNAs foi avaliada diariamente para determinar o dia em que cada um dos genes exibiu maior silenciamento. Para isso os níveis de transcritos foram avaliados por sete dias após à exposição aos dsRNAs específicos. Após análise por RT-qPCR, foi constatado um expressivo aumento de expressão de *Smcd1* nos dois primeiros dias após a exposição aos dsRNAs específicos, com posterior silenciamento, na ordem de 99,9% no quinto dia após exposição para *Smcd1* e *Smcd2*, como evidenciado na Figura 14. Além disso, o silenciamento foi persistente para *Smcd2* até o sétimo dia avaliado (Figura 14B).

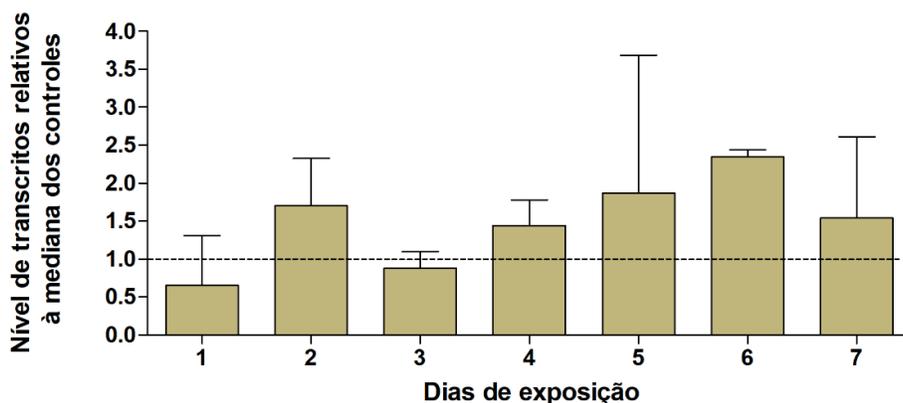
Figura 14 – Análise dos níveis de transcritos de *Smcd1* e *Smcd2* em esquistossômulos expostos aos dsRNA durante sete dias.



As barras representam os níveis de *Smcd1* (**A**), representado em vermelho e *Smcd2* (**B**), representado em alaranjado, expressos em relação à mediana dos níveis de transcritos obtidos para os grupos controle negativo e inespecífico (GFP), representada pela linha pontilhada. Acima das barras está representado o erro padrão, em quatro réplicas biológicas. O teste estatístico utilizado foi 2-Way ANOVA, com significância $p < 0,05$. Os asteriscos representam os valores com significância estatística (** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$). **FONTE:** elaborado pelo autor.

O gene *Smcd3* não apresentou redução significativa nos níveis de transcritos após exposição ao dsRNA específico (Figura 15).

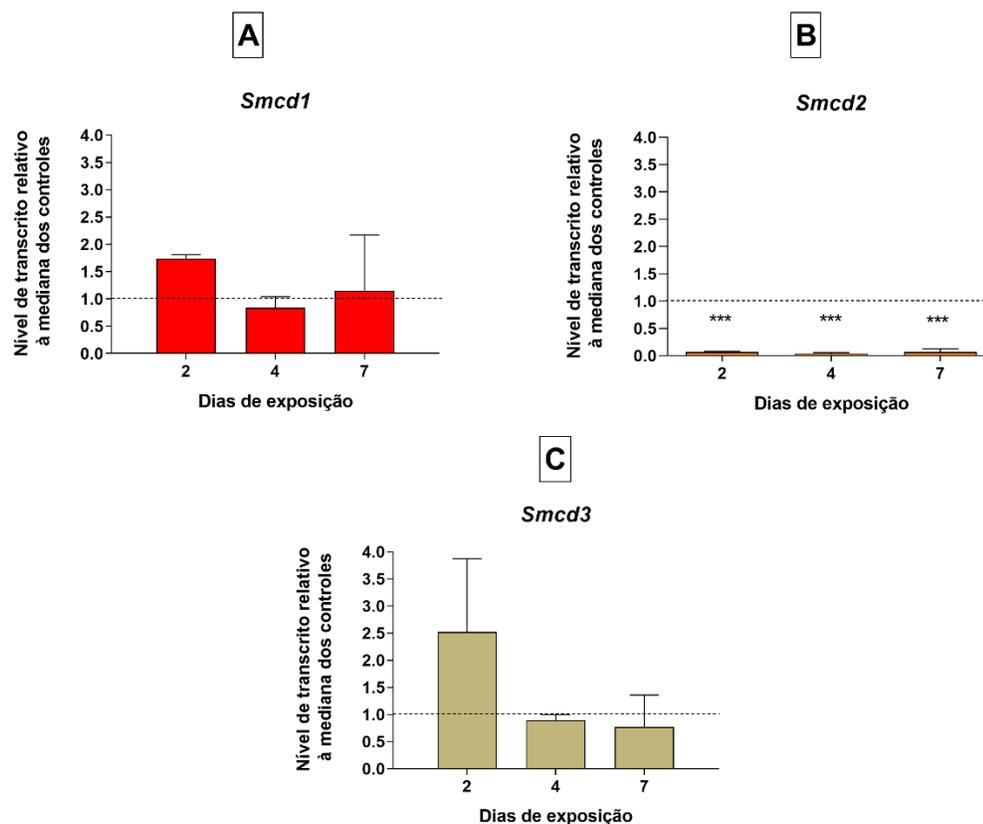
Figura 15 – Análise dos níveis de transcritos de *Smcd3* em esquistossômulos expostos a dsRNA durante sete dias.



As barras representam os níveis de transcritos de *Smcd3*, representado em bege, expressos em relação à mediana dos níveis de transcritos obtidos para os grupos controle negativo e inespecífico (GFP), representada pela linha pontilhada. Acima das barras está representado o erro padrão, em quatro réplicas biológicas. O teste estatístico utilizado foi 2-Way ANOVA, com significância $p < 0,05$. **FONTE:** elaborado pelo autor.

Adicionalmente, foi realizado o silenciamento combinado das três aspartil proteases. O perfil de expressão gênica para cada um dos alvos, verificado por RT-qPCR, está representado a seguir (Figura 16). É possível observar que na exposição combinada ocorreu o silenciamento de 92,7% para *Smcd2* já no segundo dia de exposição, e este persistiu nos demais dias analisados. Em contrapartida, o mesmo não foi observado para *Smcd1* e *Smcd3*. Como na exposição individual com os dsRNAs, apenas *Smcd1* e *Smcd2* apresentaram redução de transcritos, optou-se por realizar novas réplicas biológicas combinando apenas os dsRNAs de *Smcd1* e *Smcd2*.

Figura 16 - Níveis de transcritos de *Smcd1*, *Smcd2* e *Smcd3* em esquistossômulos no segundo, quarto e sétimo dias de exposição aos dsRNAs específicos em combinação.

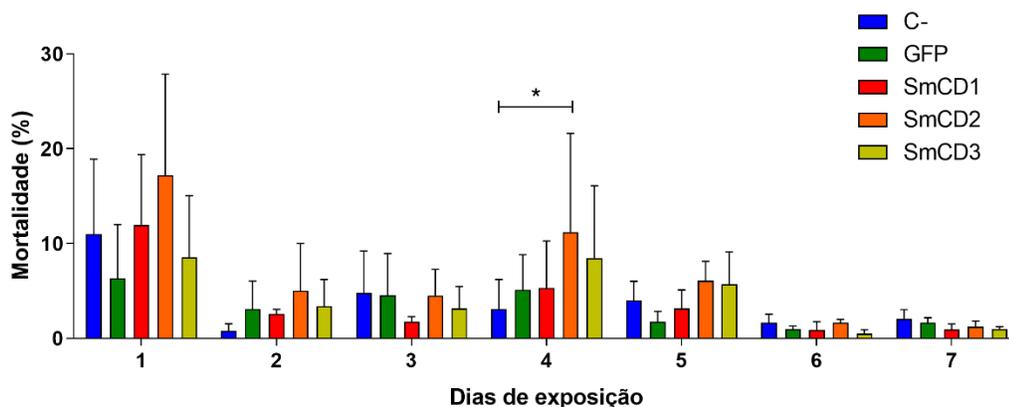


As barras representam os níveis de transcritos de *Smcd1* (A), *Smcd2* (B) e *Smcd3* (C) expressos em relação à mediana dos níveis de transcritos obtidos para os grupos controle negativo e inespecífico (GFP), representada pela linha pontilhada. Acima das barras está representado o erro padrão, em três réplicas biológicas. O teste estatístico utilizado foi 2-Way ANOVA, com significância $p < 0,05$. Os asteriscos representam os valores com significância estatística (** $p < 0,001$). FONTE: elaborado pelo autor.

4.5.2 ANÁLISE DE CARACTERES MORFOLÓGICOS E ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS

Durante as cinéticas de avaliação do silenciamento, a mortalidade dos parasitos foi quantificada utilizando coloração com iodeto de propídeo. Os dados foram agrupados por alvo e dia, como representado na figura abaixo (Figura 17). Foi observado um aumento de mortalidade estatisticamente significativo apenas nos parasitos expostos ao dsRNA-*Smcd2* quatro dias após a exposição.

Figura 17 - Mortalidade de esquistossômulos expostos a dsRNAs específicos para *Smcd1*, *Smcd2* e *Smcd3*.

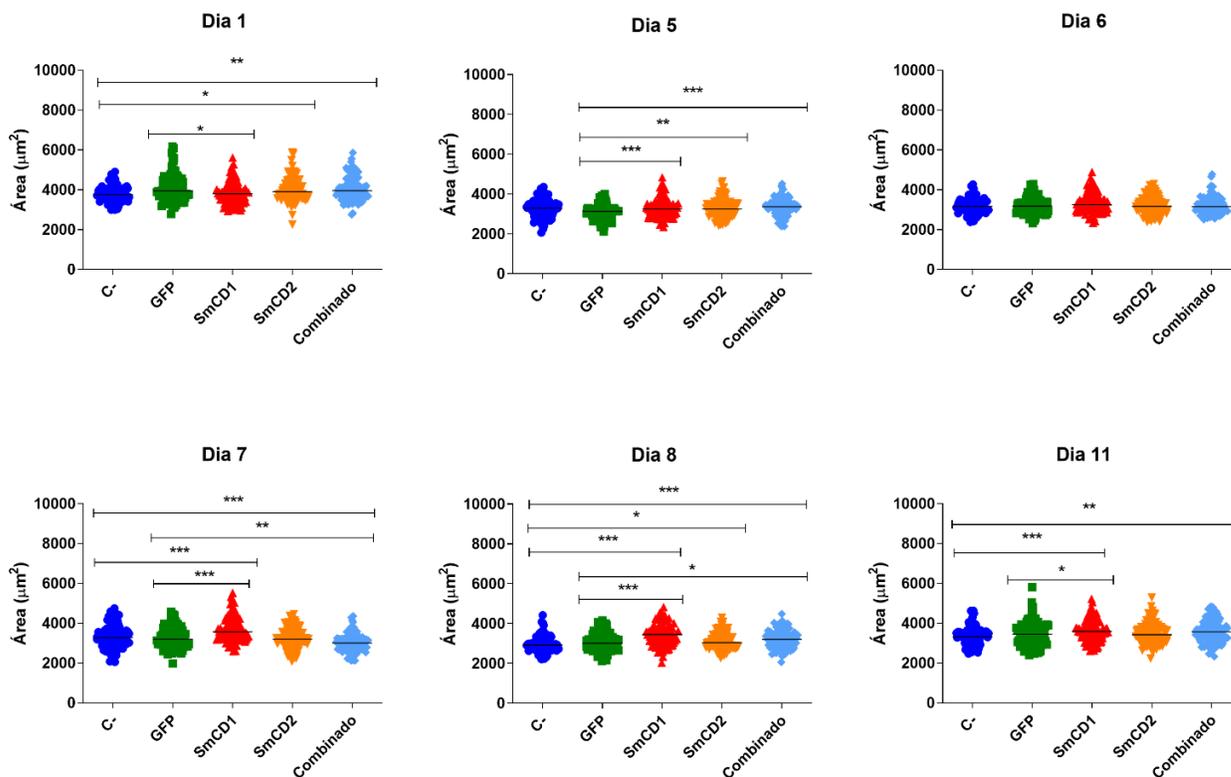


As barras representam a porcentagem de mortalidade em parasitos expostos ao dsRNA-*Smcd1* (vermelho), expostos a dsRNA-*Smcd2* (laranja) e a dsRNA-*Smcd3* (amarelo). O teste estatístico utilizado foi 2-Way ANOVA, com significância $p < 0,05$. Acima das barras está representado o erro padrão, em quatro réplicas biológicas. As linhas horizontais representam a diferença estatisticamente significativa entre os grupos em um mesmo dia. Os asteriscos representam os valores com significância estatística ($*p < 0,05$). Acima das barras está representado o erro padrão.

FONTE: elaborado pelo autor.

A área dos parasitos expostos a dsRNAs também foi analisada, como pode ser observado abaixo (Figura 18). É possível observar um aumento na área dos parasitos expostos aos dsRNAs em relação aos controles até o quinto dia de exposição aos dsRNA *in vitro*. A partir do sexto dia, apenas os parasitos expostos aos dsRNA-*Smcd1* permaneceram com tamanho acima dos esquistossômulos do grupo controle. Os demais grupos, especialmente o grupo exposto à combinação de dsRNAs, passaram a apresentar diminuição de tamanho em relação aos parasitos pertencentes aos grupos controles.

Figura 18 – Área dos esquistossômulos durante exposição a dsRNAs específicos para transcritos de *Smcd1*, *Smcd2* e *Smcd3*.



Em (A), área (μm^2) dos esquistossômulos no primeiro dia de exposição, em (B), no quinto dia, em (C), sexto, em (D), sétimo, em (E) oitavo e em (F), décimo primeiro dia de exposição a dsRNAs específicos. Cada símbolo representa a área de um esquistossômulo e a linhas horizontais representam a mediana. As linhas horizontais acima dos símbolos representam a diferença estatisticamente significativa entre os grupos. O teste estatístico utilizado foi t de Student, com significância $p < 0,05$. Os asteriscos representam os valores com significância estatística (*** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$). **FONTE:** elaborado pelo autor.

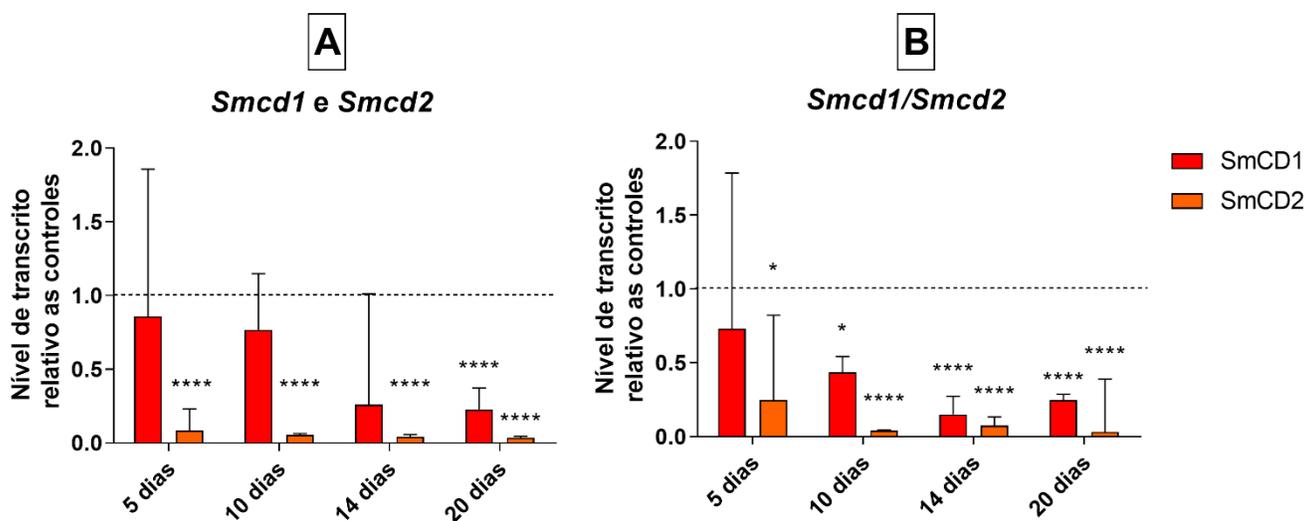
Devido à descoberta de duplicações de *Smcd3*, bem como a dificuldade em silenciar esse gene e suas duplicações, a partir desse ponto, este trabalho focou em caracterizar experimentalmente *Smcd1* e *Smcd2* em *S. mansoni*.

4.5.3 SILENCIAMENTO DE ESQUISTOSSÔMULOS COM ERITRÓCITOS

Posteriormente, ao meio de cultura dos parasitos foram acrescentados eritrócitos, uma vez que a família proteica das catepsinas *D-like* parece estar relacionada à clivagem do grupamento heme. Após o sucesso na padronização da cultura utilizando eritrócitos,

foi realizada uma cinética de silenciamento para os dois alvos, em exposições individuais e em combinação, com a adição de eritrócitos. A cultura foi mantida por 20 dias e eritrócitos foram adicionados conforme eram degradados pelo parasito. Foi observado que os níveis de transcritos de *Smcd1* e *Smcd2* permaneceram reduzidos após 20 dias de exposição aos dsRNAs específicos, tanto em exposição individual como em exposição combinada. Foi observada redução de 77% para *Smcd1* no dia 20, além de 91%, 94%, 95% e 96% para *Smcd2* nos quatro dias avaliados de exposição individual. Para as exposições combinadas, foi observada redução de 56%, 84% e 75% para *Smcd1* nos dias 10, 14 e 20, além de 75%, 95%, 92% e 96% para *Smcd2*, como é possível observar na figura 19.

Figura 19 – Perfil de expressão de *Smcd1* e *Smcd2* nos dias 5, 10, 14 e 20 dias em esquistossômulos expostos ao dsRNA específico em meio contendo eritrócitos.



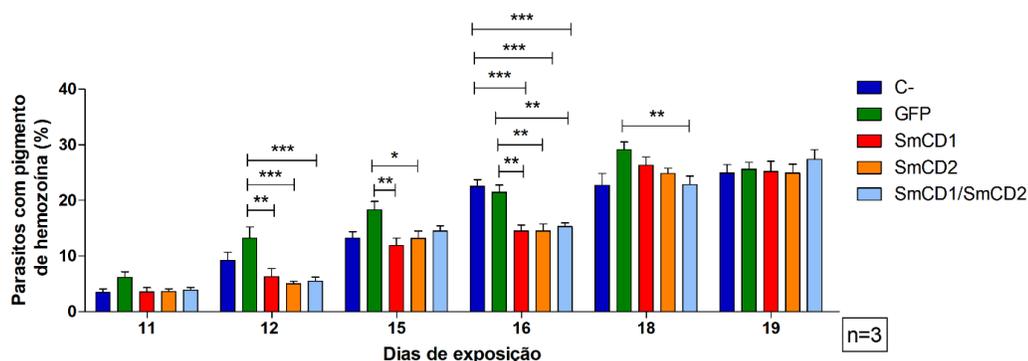
Em (A), a expressão de *Smcd1* e *Smcd2* em silenciamento individual. Em (B), a expressão de *Smcd1* e *Smcd2* em silenciamento combinado. As barras vermelhas representam os níveis de transcritos de *Smcd1* relativos os níveis de transcritos nos grupos controle (inespecífico e negativo) que estão representados como mediana pela linha pontilhada. O teste estatístico utilizado foi t de Student, com significância $p < 0,05$. Os asteriscos representam os valores com significância estatística (**** $p < 0,0001$ e * $p < 0,05$). **FONTE:** elaborado pelo autor.

A mortalidade dos parasitos expostos aos dsRNAs específicos e mantidos em cultura com eritrócitos humanos também foi avaliada. Não foram encontradas taxas de mortalidade significativas que pudessem estar relacionadas com o silenciamento (dados

não mostrados). As taxas de mortalidade se mantiveram baixas para os grupos expostos e controles negativo e inespecífico.

A produção de hemozoína nos parasitos expostos a dsRNAs específicos na presença de eritrócitos humanos também foi avaliada para verificar se existe redução na formação de pigmento em decorrência do silenciamento. Para tanto, a avaliação foi iniciada no 11º dia de exposição aos dsRNAs e segundo dia de exposição aos eritrócitos. Essa escolha reflete o término da formação e maturação do intestino dos parasitos. Como é possível observar na figura abaixo (Figura 20), foi possível identificar redução na formação de pigmento nos dias 12, 15, 16 e 18. No 12º dia, a formação de pigmento significativamente menor nos parasitos silenciados para os alvos, de forma individual ou em combinação, do que o controle inespecífico GFP (52,4% para *Smcd1*, 62,2% para *Smcd2* e 58,8% para *Smcd1/Smcd2*). No 15º, foi observada redução significativa na formação de hemozoína em parasitos silenciados para *Smcd1* e *Smcd2* de forma individual, em relação a GFP (34,89% para *Smcd1* e 27,82% para *Smcd2*). O 16º representa o período de maior redução na formação de pigmento, com redução significativa para todos os grupos de parasitos silenciados em relação aos controles negativo (35,53% para *Smcd1*, 35,44% para *Smcd2* e 32,08% para *Smcd1/Smcd2*) e inespecífico (32,38%, 32,28% e 28,76%, para *Smcd1*, *Smcd2* e *Smcd1/Smcd2*, respectivamente). Já no 18º dia, redução estatisticamente significativa só foi observada entre o grupo silenciado para *Smcd1* e *Smcd2* em combinação e o controle inespecífico GFP (21,74%). Não foi observada redução na formação de pigmentos em nenhum dos grupos silenciados, em relação aos controles, no 19º dia de exposição aos dsRNAs e eritrócitos.

Figura 20 – Formação de pigmento de hemozoína em esquistossômulos expostos a dsRNAs específicos de *SmCD1* e *SmCD2* e incubados com eritrócitos humanos.

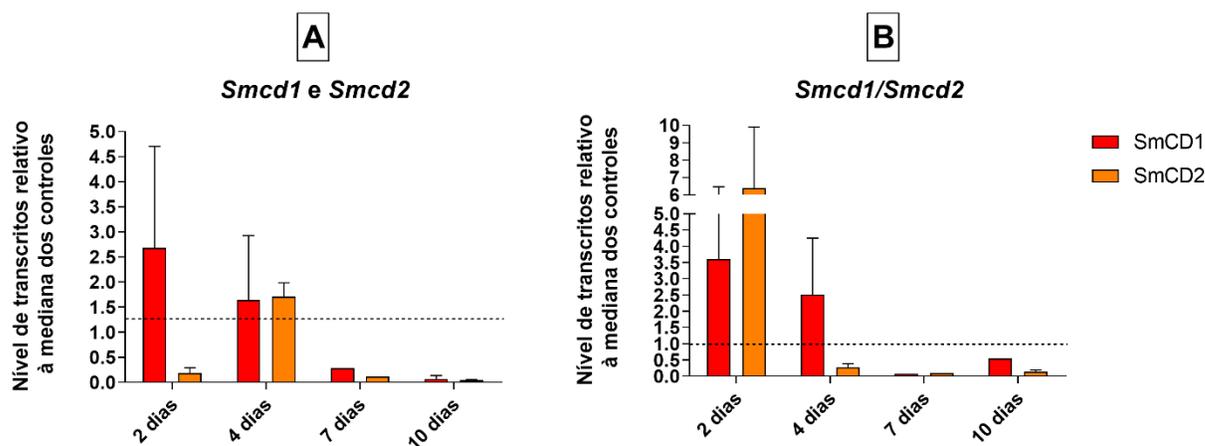


As barras representam a porcentagem de parasitos que apresentam pigmento de hemozoína em parasitos do grupo controle negativo (azul), parasitos do grupo controle inespecífico GFP (verde), parasitos expostos ao dsRNA-*Smcd1* (vermelho), expostos a dsRNA-*SmCD2* (laranja) e a dsRNA-*Smcd1* e -*Smcd2* simultaneamente (azul claro). O teste estatístico utilizado foi 2-Way ANOVA, com significância $p < 0,05$. Acima das barras está representado o erro padrão. As linhas horizontais representam a diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Os asteriscos representam os valores com significância estatística (** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$). **FONTE:** elaborado pelo autor.

4.6 AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE *SmCD1* E *SmCD2* EM VERMES ADULTOS

Para vermes adultos, foi realizada a quantificação da expressão gênica dos alvos após dois, quatro, sete e dez dias após transfecção. Como pode ser visto na figura a seguir, não foi observada redução de transcritos de *Smcd1* durante o silenciamento individual no segundo dia (Figura 21A), bem como na exposição combinada no mesmo dia (Figura 21B). Entretanto, foi observada redução na expressão dos transcritos de *Smcd2* (81%) na exposição individual no segundo dia (Figura 21B), o que não ocorreu no silenciamento em combinação. No quarto dia de exposição aos dsRNAs, não foi observada redução dos transcritos de *Smcd1* e *Smcd2* na exposição individual, enquanto foi observada redução de 71% para *Smcd2* na exposição combinada (Figura 21B). A partir do sétimo dia de exposição, foi observada uma grande redução nos transcritos de todos os alvos, tanto na exposição individual (71% para *Smcd1* e 88% para *Smcd2*) como na exposição em combinação (92% para *Smcd1* e 90% para *Smcd2*). O silenciamento foi persistente e os níveis de transcritos se mantiveram reduzidos até o décimo dia (92,5% e 95,5% para *Smcd1* e *Smcd2* em exposição individual e 45,9% e 85,8% para *Smcd1* e *Smcd2* em exposição combinada).

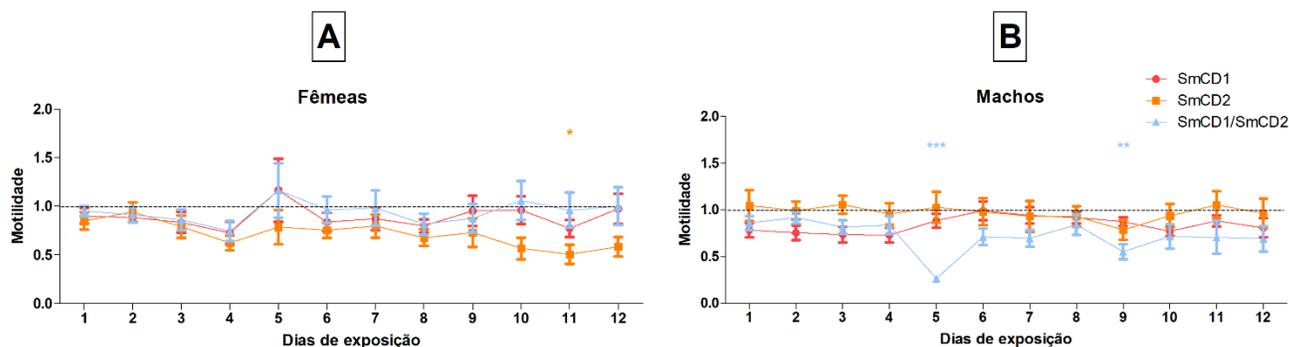
Figura 21 – Perfil de expressão gênica de *Smcd1* e *Smcd2* em vermes adultos após transfecção com dsRNAs específicos e PEI.



Perfil de expressão de *Smcd1* e *Smcd2* em vermes adultos expostos aos dsRNAs de (A) *Smcd1* e *Smcd2* de forma individual ou (B) em combinação. As barras representam os níveis de transcritos de *Smcd1* (vermelho) e *Smcd2* (laranja) relativos aos níveis dos grupos controle (inespecífico e negativo) que estão representados como mediana pela linha pontilhada. **FONTE:** elaborado pelo autor.

A motilidade dos vermes adultos transfectados com dsRNAs específicos para *Smcd1*, *Smcd2* e em combinação (*Smcd1/Smcd2*) está representada a seguir, quantificada em três réplicas biológicas e 12 réplicas técnicas (Figura 22). Pode-se observar uma diminuição significativa de 49,26% na motilidade em fêmeas expostas a dsRNA:PEI para *Smcd2* no 11º dia (Figura 22A). Já em machos (Figura 22B), foi observada uma redução brusca e expressiva na motilidade no quinto dia (73,39%) para o grupo silenciado para *Smcd1/Smcd2*. Após, houve uma recuperação no movimento, com nova queda significativa no nono dia (44,56%). Embora tenha ocorrido a recuperação de movimento a partir do sexto dia, a motilidade sempre se manteve abaixo do comparado com os grupos controle.

Figura 22 – Avaliação da motilidade de vermes adultos durante exposição a dsRNAs específicos de *Smcd1* e *Smcd2*.



Em (A), temos o perfil de motilidade de fêmeas expostas a dsRNA:PEI, enquanto em (B), perfil de motilidade de machos, em três réplicas biológicas. As linhas representam a média da motilidade dos parasitos em unidades de movimento em relação à motilidade dos grupos controle (inespecífico e negativo) (linha pontilhada). Acima dos pontos está representado o erro padrão. O teste estatístico utilizado foi 2-Way ANOVA, com significância $p < 0,05$. Os asteriscos representam os valores com significância estatística ($***p < 0,001$, $**p < 0,01$ e $*p < 0,05$), com a cor do respectivo grupo, *Smcd1* (vermelho), *Smcd2* (laranja) ou *Smcd1/Smcd2* (azul). **FONTE:** elaborado pelo autor.

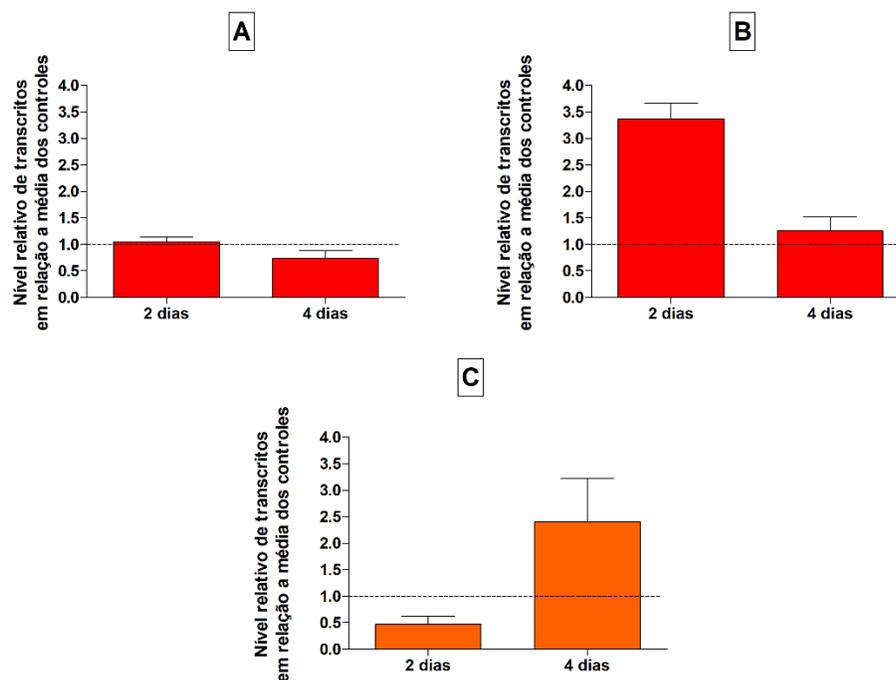
4.7 COMPARAÇÃO DE EFICIÊNCIA ENTRE DOIS MÉTODOS DE SILENCIAMENTO EM ESQUISTOSSÔMULOS

Após o silenciamento utilizando as sequências de dsRNA previamente sintetizadas (Figuras 14 e 16), sequências de siRNAs foram utilizadas para verificar a eficiência deste método frente ao observado com dsRNAs, comparando as metodologias. Foi definida a concentração de 200 nM por grupo experimental, sendo utilizadas, por vez, duas sequências a 100 nM cada. Nesta etapa de padronização, foram selecionados dois conjuntos de dois siRNAs aleatórios cujas sequências não compreendiam a região da sequência de dsRNA utilizada (A-172545.1 e A-172563.1; A-172569.1 e A-172547.2). Foi possível observar uma redução de 87% dos transcritos de *Smcd1* no quarto dia para as primeiras sequências utilizadas e 68% no mesmo dia, com o segundo conjunto de sequências.

Após, foi realizada uma réplica com os siRNAs cujas sequências compreendem parte da região das sequências de dsRNA utilizadas. Foram realizados dois grupos para *Smcd1*, um com duas sequências e outro, com três; e apenas um grupo com três sequências para *Smcd2*. O perfil de expressão pode ser observado a seguir (Figura 23).

Foi possível observar uma redução de 26% dos transcritos de *Smcd1* utilizando o primeiro conjunto de sequências no quarto dia de exposição (Figura 23A), e 53% de redução dos transcritos de *Smcd2* no segundo dia de exposição (Figura 23C). Apesar disso, no quarto dia já foi observado novo aumento de expressão de *Smcd2*. Não foi observada redução significativa de transcritos de *Smcd1* utilizando o segundo conjunto de siRNAs (Figura 23B).

Figura 23 – Perfil de expressão gênica de *Smcd1* e *Smcd2* após exposição de esquistossômulos a conjuntos de sequências de siRNA.



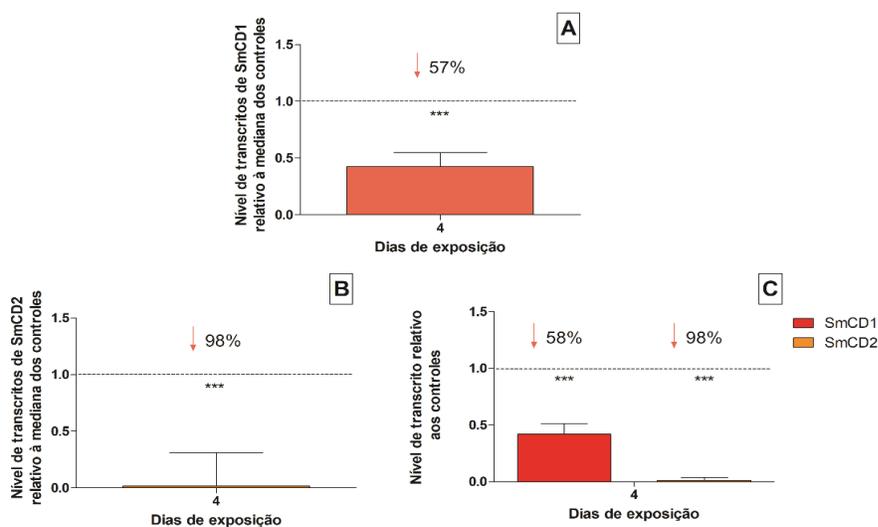
Em (A), perfil de expressão de *Smcd1* em esquistossômulos expostos a três siRNAs, A-172551.1, A172559.1 e A-172551.2, em (B), perfil de expressão de *Smcd1* utilizando dois siRNAs, A-172553.1 e A-172553.2 e em (C), perfil de expressão de *Smcd2* em esquistossômulos expostos aos siRNAs A-172614.1, A-172614.2 e A-172624.2. As barras representam os níveis de transcritos de *Smcd1* (vermelho) e *Smcd2* (laranja) relativos aos níveis dos grupos controle inespecífico e negativo que estão representados como mediana pela linha pontilhada, em uma réplica biológica. Acima das barras está representado o erro padrão e as porcentagens de redução de transcritos. **FONTE:** elaborado pelo autor.

4.8 INFECÇÃO EXPERIMENTAL

Para avaliar a função das catepsinas no estabelecimento da infecção em mamíferos, foram realizadas três réplicas biológicas de infecção experimental em modelo murino. Após 42-45 dias, foram realizadas as perfusões, com contagem de vermes recuperados e ovos retidos no fígado e intestino.

Devido ao maior efeito na diminuição dos transcritos dos longos dsRNAs e à ausência de silenciamento observada para *Smcd3*, a exposição combinada foi realizada apenas utilizando os longos dsRNAs de *Smcd1* e *Smcd2* (100 nM de dsRNA para cada alvo). O dia de cultura utilizado para a infecção foi o quinto dia, que foi selecionado devido à maior redução dos níveis de transcritos, observados nas cinéticas de silenciamento realizadas anteriormente (Figura 14). Assim, os níveis de transcritos foram verificados no quarto dia de exposição aos dsRNAs para todas as réplicas seguido da infecção. Na figura 24 é possível observar os níveis de transcrito, obtidos por RT-qPCR, para cada alvo, em três réplicas biológicas. Foi possível observar a redução de 57% dos transcritos de *Smcd1* em exposição individual e 58% em exposição combinada, além de 98% de redução de transcritos de *Smcd2* em exposição individual e combinada.

Figura 24 - Níveis de transcritos de *Smcd1* e *Smcd2* em esquistossômulos no quarto dia de exposição aos dsRNAs específicos.



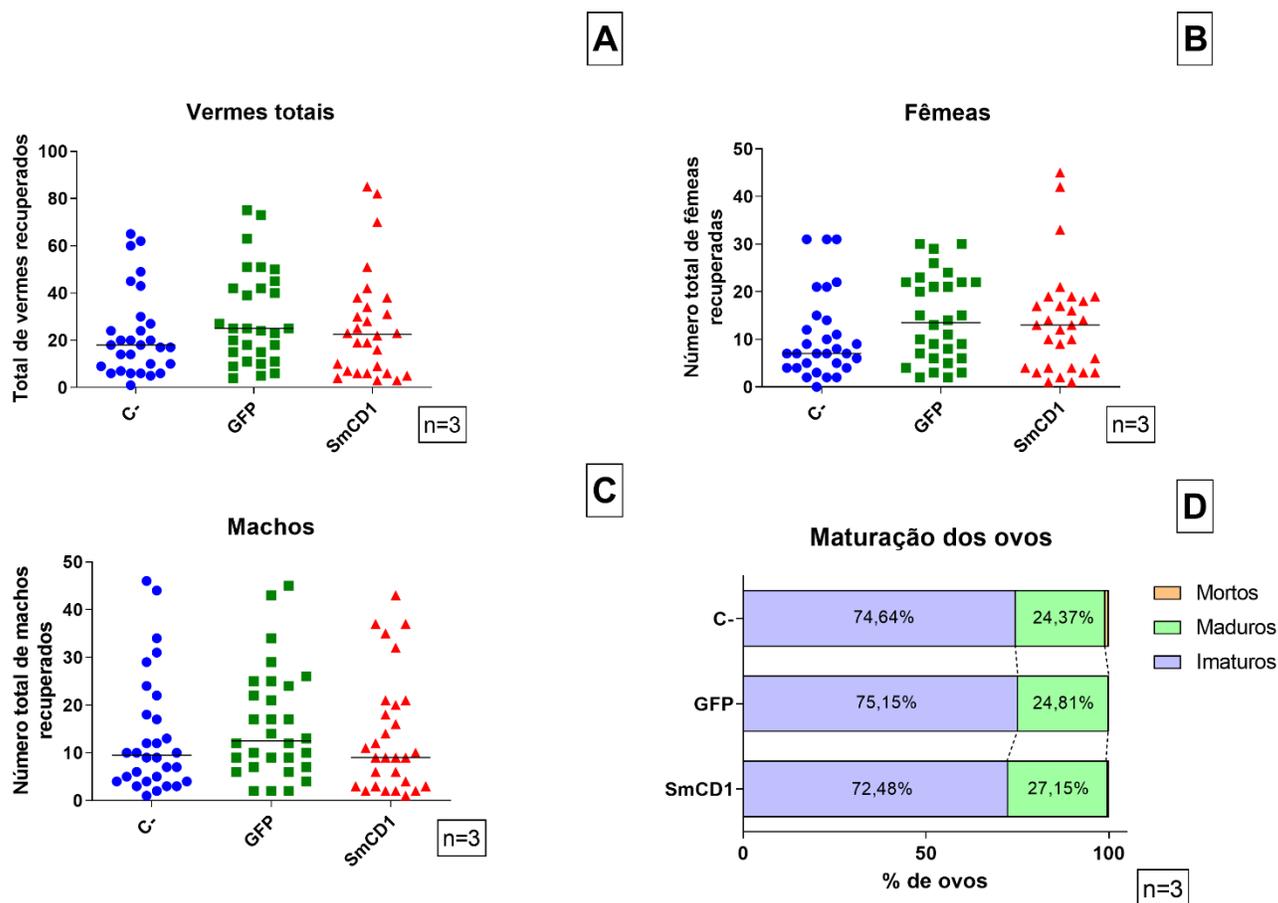
Os níveis de transcritos de *Smcd1* (vermelho) e *Smcd2* (alaranjado) nos parasitos expostos aos dsRNA-*Smcd1* (A), -*Smcd2* (B) e -*Smcd1/Smcd2* (C) estão expressos em relação à mediana dos níveis de transcritos obtidos para os

grupos controle negativo e inespecífico (GFP), representada pela linha pontilhada. Acima das barras está representado o erro padrão e as porcentagens de redução, em três réplicas biológicas. O teste estatístico utilizado foi t de Student, com significância $p < 0,05$. Os asteriscos representam os valores com significância estatística (** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$). **FONTE:** elaborado pelo autor.

Nas figuras a seguir, pode-se observar o perfil de recuperação de vermes adultos nas infecções experimentais, bem como perfil de maturação dos ovos na porção final do intestino delgado, para o grupo de camundongos infectados com esquistossômulos expostos aos dsRNAs-*Smcd1* (Figura 25), -*Smcd2* (Figura 26) e -*Smcd1/Smcd2* (Figura 27).

Não foi observado, para parasitos recuperados após silenciamento para *Smcd1*, alterações significativas na recuperação total de parasitos *ex vivo* (Figura 25A), de fêmeas (Figura 25B) ou machos (Figura 25C) em relação aos grupos controle. Além disso, a análise de maturação dos ovos retidos na porção terminal do intestino delgado também demonstrou uma ausência de diferença nas proporções de ovos mortos, maduros ou imaturos (Figura 25D).

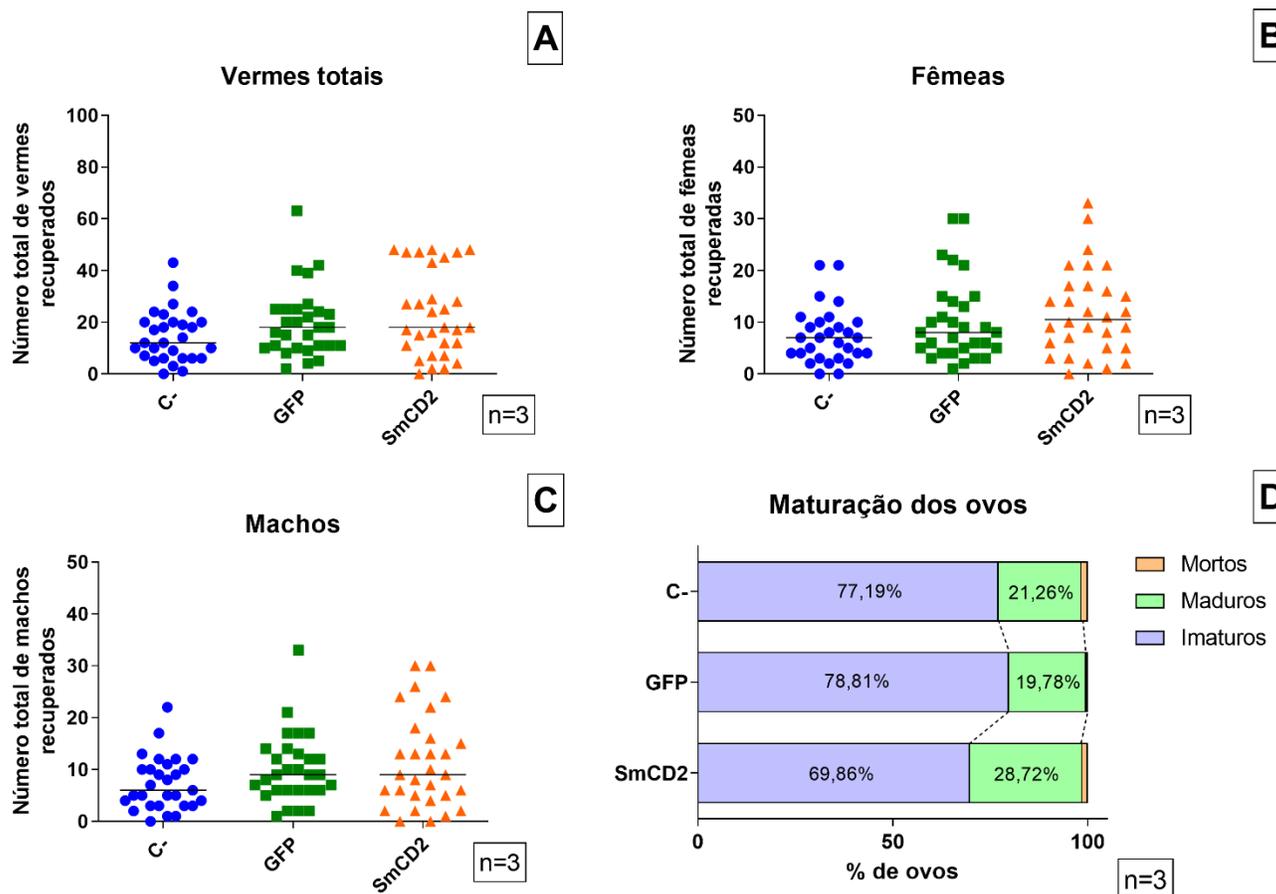
Figura 25 – Avaliação do efeito do silenciamento de *Smcd1* em esquistossômulos no estabelecimento da infecção *in vivo* em modelo murino.



Avaliação do fenótipo de silenciamento de *Smcd1* na recuperação de vermes adultos e maturação de ovos na porção final do intestino delgado de camundongos. Cada símbolo nos gráficos representa o número absoluto de vermes totais (A), fêmeas (B) e machos (C) recuperados de cada camundongo, em três réplicas biológicas. Cada símbolo representa um grupo: (●) controle negativo, (■) controle inespecífico e (▲) *Smcd1*. As linhas horizontais pretas representam as medianas. Em (D) temos o perfil de maturação dos ovos na porção final do intestino delgado com a porcentagem de ovos imaturos (roxo), maduros (verde) e mortos (laranja) observada para cada grupo experimental. Os dados foram analisados por Mann-Whitney, com significância $p < 0,05$. **FONTE:** elaborado pelo autor.

Na figura a seguir, pode-se observar, como em *Smcd1*, a ausência de diferença de recuperação de vermes totais (Figura 26A), fêmeas (Figura 26B) e machos (Figura 26C) para o grupo de parasitos silenciados para *Smcd2*, bem como alterações estatisticamente significativas na composição da população de ovos na porção terminal do intestino delgado (Figura 26D).

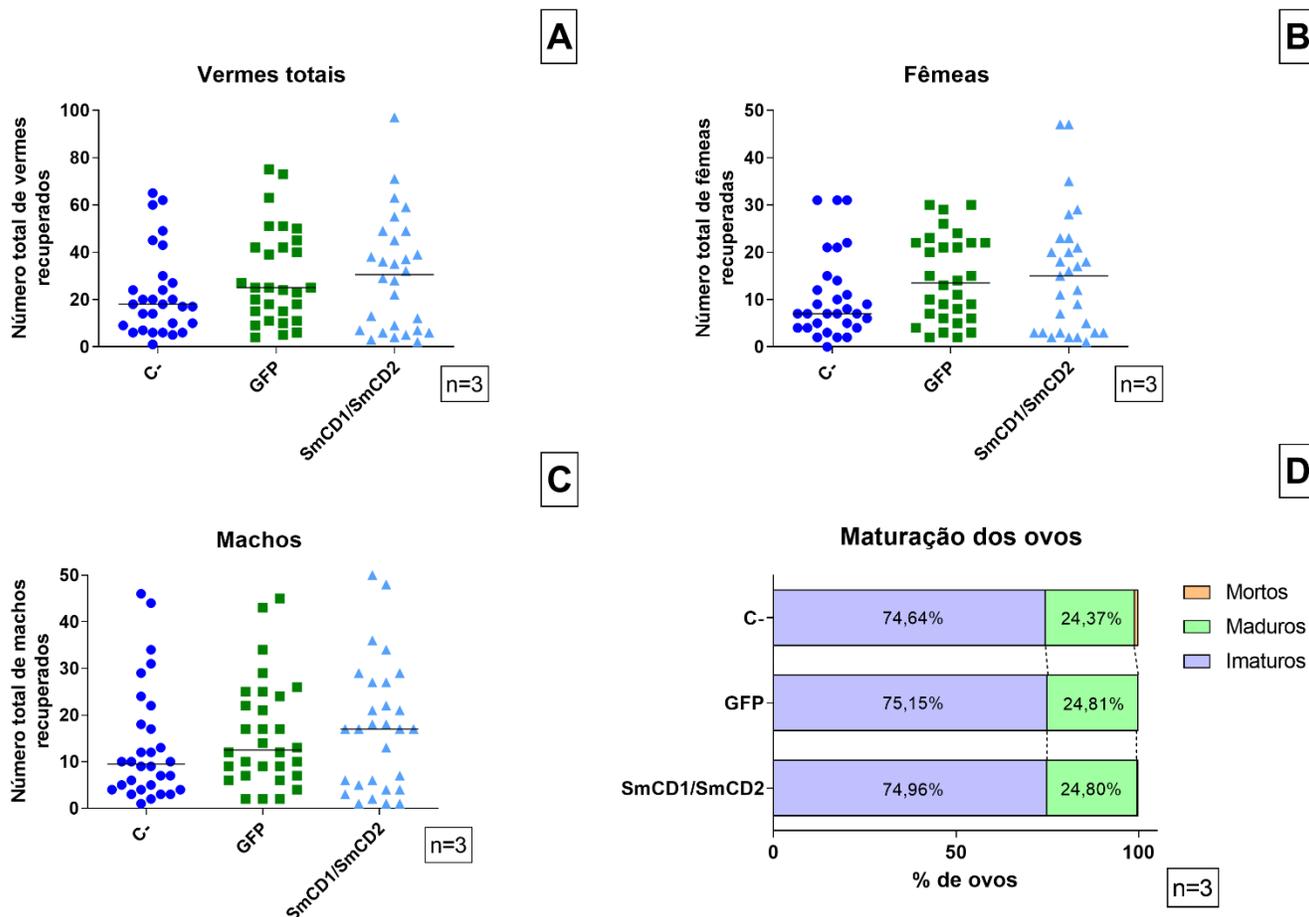
Figura 26 – Avaliação do efeito do silenciamento de *Smcd2* em esquistossômulos no estabelecimento da infecção *in vivo* em modelo murino.



Avaliação do fenótipo de silenciamento de *Smcd2* na recuperação de vermes adultos e maturação de ovos na porção final do intestino delgado de camundongos. Cada símbolo nos gráficos representa o número absoluto de vermes totais (A), fêmeas (B) e machos (C) recuperados de cada camundongo, em três réplicas biológicas. Cada símbolo representa um grupo: (●) controle negativo, (■) controle inespecífico e (▼) *Smcd2*. As linhas horizontais pretas representam as medianas. Em (D) temos o perfil de maturação dos ovos na porção final do intestino delgado com a porcentagem de ovos imaturos (roxo), maduros (verde) e mortos (laranja) observada para cada grupo experimental. Os dados foram analisados por Mann-Whitney, com significância $p < 0,05$. **FONTE:** elaborado pelo autor.

Por fim, não foram observadas alterações na recuperação de vermes do grupo silenciado para *Smcd1/Smcd2*, incluindo vermes totais (Figura 27A), fêmeas (Figura 27B) e machos (Figura 27C). Assim como os demais grupos silenciados já apresentados, não foi observada alteração significativa na composição das populações de ovos encontrados na porção terminal do intestino delgado dos animais infectados, em relação aos controles (Figura 27D).

Figura 27 – Avaliação do efeito do silenciamento de *Smcd1* e *Smcd2*, em combinação, em esquistossômulos no estabelecimento da infecção *in vivo* em modelo murino.

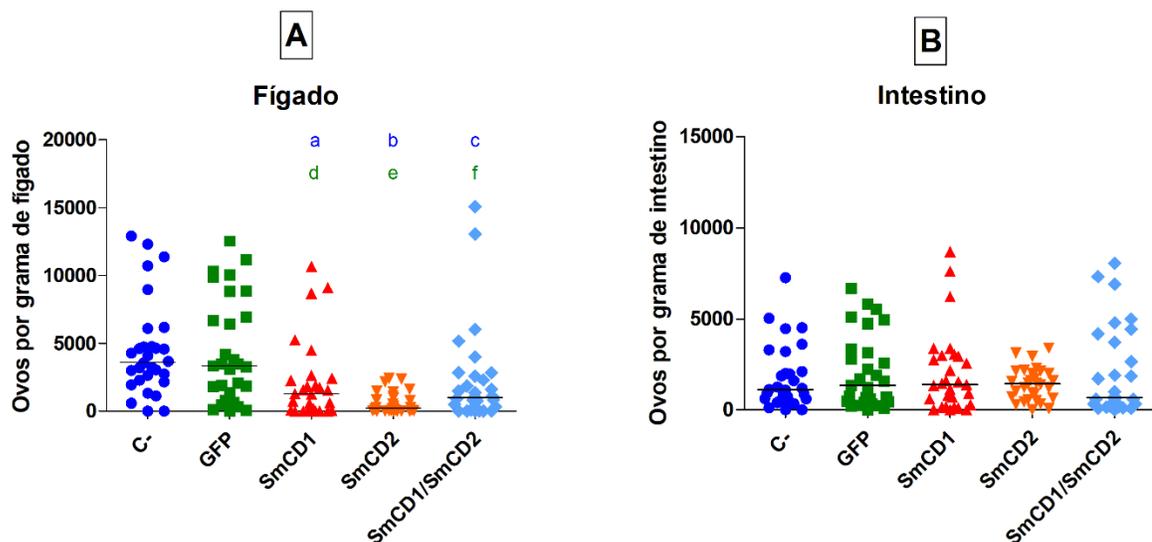


Avaliação do fenótipo de silenciamento de *Smcd1* e *Smcd2* em combinação na recuperação de vermes adultos e maturação de ovos na porção final do intestino delgado de camundongos. Cada símbolo nos gráficos representa o número absoluto de vermes totais (A), fêmeas (B) e machos (C) recuperados de cada camundongo, em três réplicas biológicas. Cada símbolo representa um grupo: (●) controle negativo, (■) controle inespecífico e (▲) *Smcd1/Smcd2*. As linhas horizontais pretas representam as medianas. Em (D) temos o perfil de maturação dos ovos na porção final do intestino delgado com a porcentagem de ovos imaturos (roxo), maduros (verde) e mortos (laranja) observada para cada grupo experimental. Os dados foram analisados por Mann-Whitney, com significância $p < 0,05$. **FONTE:** elaborado pelo autor.

Quando foram avaliados os ovos retidos no fígado e intestino dos animais, por outro lado, foi observada uma redução de 35,51% de ovos retidos por grama de fígado nos animais infectados com os parasitos silenciados para *Smcd1* e 93,58% para *Smcd2*, de forma individual, enquanto foi observada redução de 27,94% para o silenciamento em

combinação (Figura 28A). Entretanto, não foi observada alteração significativa no número de ovos retidos por grama de intestino nos mesmos animais.

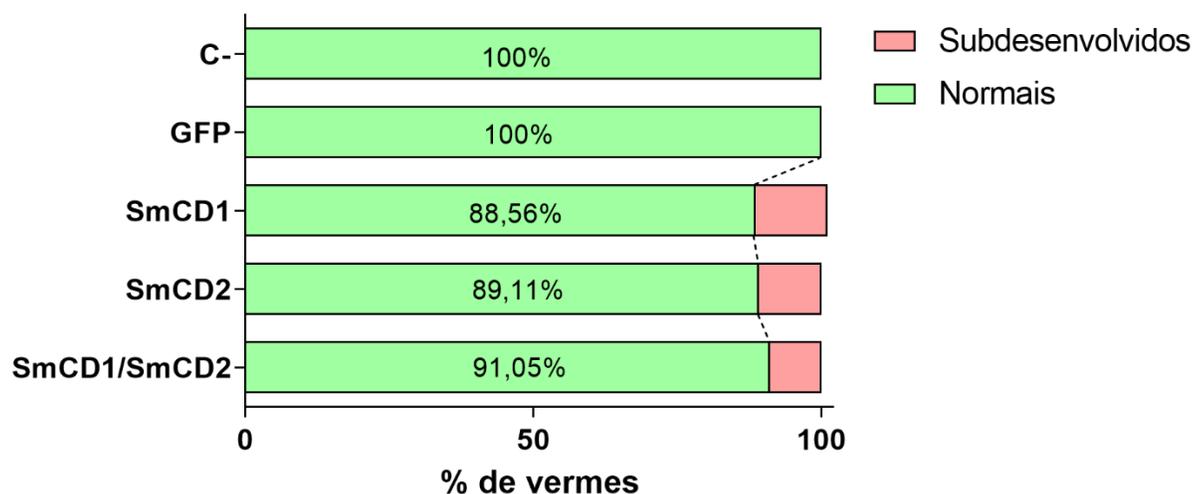
Figura 28 – Avaliação dos ovos retidos no fígado e intestino de animais infectados com esquistossômulos silenciados para *Smcd1* e *Smcd2*, de forma individual ou em combinação.



Em (A) temos os ovos por grama de fígado, enquanto em (B), os ovos por grama de intestino. Cada símbolo representa um grupo: (●) controle negativo, (■) controle inespecífico, (▲) *Smcd1*, (▼) *Smcd2* e (◆) *Smcd1/Smcd2*. As linhas horizontais pretas representam as medianas. O teste estatístico utilizado foi Mann-Whitney, com significância $p < 0,05$. Em (A), cada letra em minúsculo representa diferença estatística entre o grupo analisado e os controles. Letras azuis (a, b e c) representam a diferença estatística entre cada grupo silenciado e o controle negativo, enquanto as letras verdes (d, e e f) representam a diferença estatística em relação ao controle inespecífico (GFP). **FONTE:** elaborado pelo autor.

Durante a contagem dos vermes recuperados, foi observada a existência de, em média, 10% de parasitos que apresentavam um fenótipo de subdesenvolvimento, com tamanho reduzido e diminuição visual do acúmulo de hemozoína no trato digestivo. Esse fenótipo foi observado nos grupos expostos aos dsRNAs de *Smcd1* e *Smcd2*, de forma individual ou em combinação. Vale ressaltar que esse fenótipo não foi observado nos controles. Os vermes foram então quantificados em relação ao número total de vermes recuperados (Figura 29).

Figura 29 – Fenótipo de subdesenvolvimento observado em vermes adultos recuperados por perfusão.



A fração verde da barra representa a média da porcentagem relativa de vermes totais (machos e fêmeas) com fenótipo normal, em três réplicas biológicas. Já a fração laranja, representa a porcentagem relativa de vermes com fenótipo de subdesenvolvimento. Os dados foram analisados por Mann-Whitney, com significância $p < 0,05$. **FONTE:** elaborado pelo autor.

Pode-se observar a redução em tamanho das fêmeas recuperadas (Figura 30B, C e D) em relação aos parasitos recuperados do grupo controle negativo (Figura 30A), bem como redução visual expressiva de acúmulo de pigmento de hemozoína para o grupo exposto a dsRNA-*Smcd1/Smcd2* (Figura 30B) e dsRNA-*Smcd2* (Figura 30D).

Figura 30 – Exemplo dos fenótipos das fêmeas adultas *ex vivo* com subdesenvolvimento em cada grupo experimental.



Em (A) fêmeas do grupo controle negativo, (B) fêmeas expostas aos dsRNAs-*Smcd1/Smcd2* (combinado), (C) *Smcd1* e (D) *Smcd2*. **FONTE:** elaborado pelo autor.

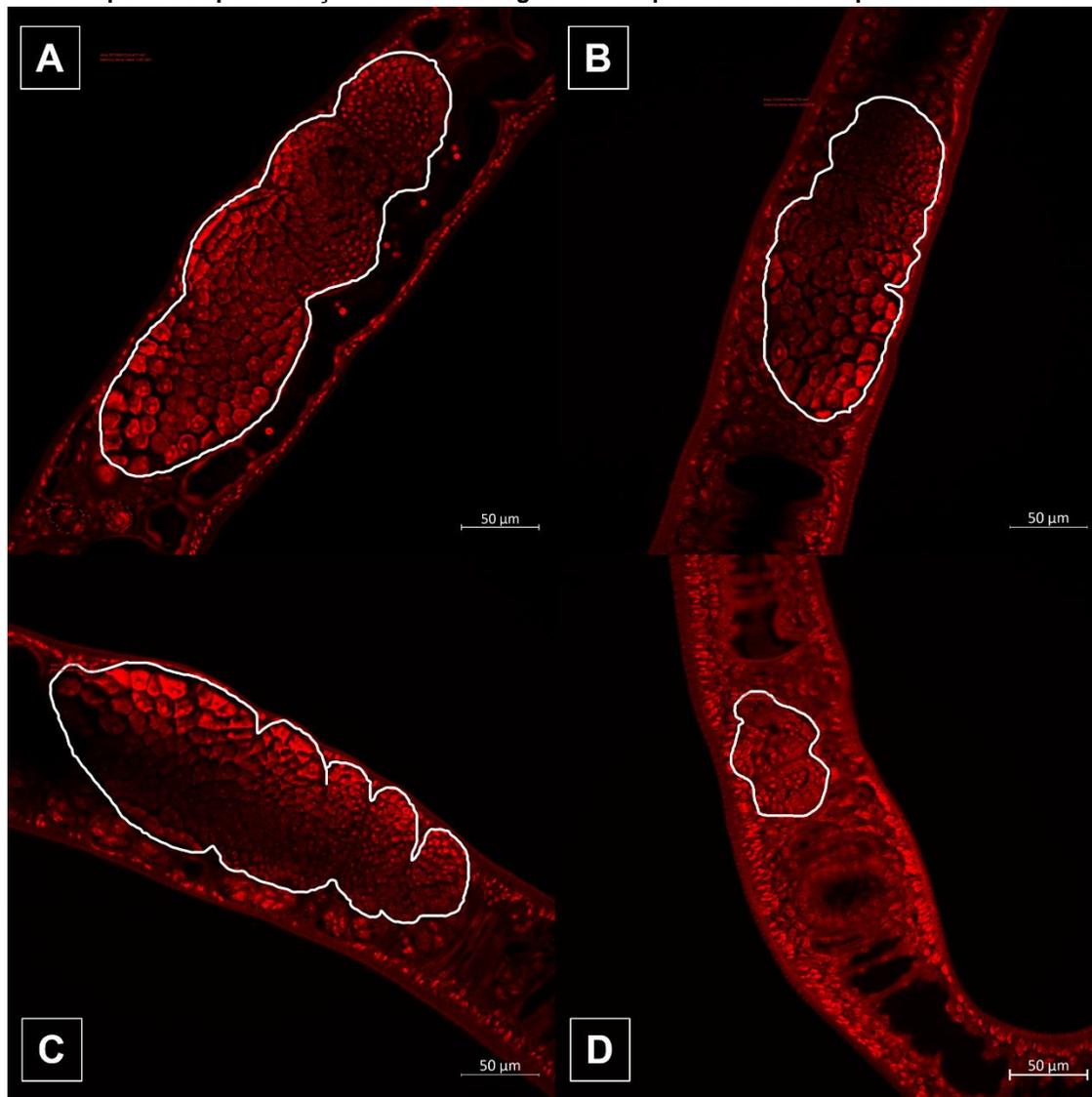
4.9 MICROSCOPIA CONFOCAL

Visando avaliar estruturalmente possíveis alterações morfológicas nos parasitos, parte dos vermes adultos recuperados por perfusão após a infecção experimental com esquistossômulos silenciados foi preparada e utilizada na confecção de lâminas para microscopia confocal.

Foi verificado que todos os vermes recuperados dos grupos expostos a dsRNA-*Smcd1* e -*Smcd2*, de forma individual ou em combinação, que apresentavam fenótipo de subdesenvolvimento, eram fêmeas. Os parasitos recuperados apresentam ovários reduzidos em relação aos grupos controle (Figuras 31D e 36A), além de presença significativa de oócitos imaturos ou células pouco diferenciadas. Em alguns parasitos, o ovário se apresentava muito atrofiado, impossibilitando sua delimitação para análise da

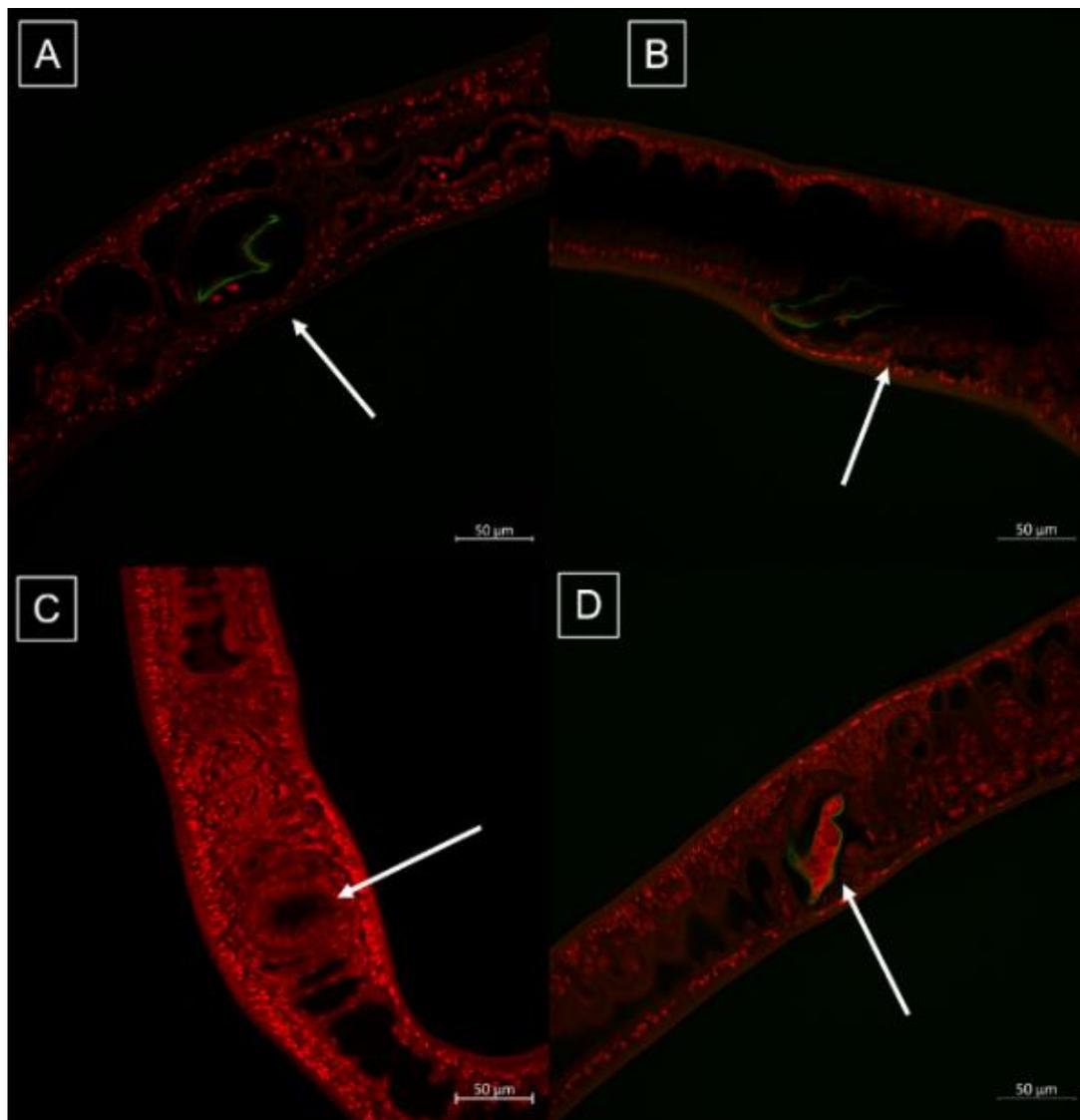
área. Além disso, não foi possível identificar ovos no trato reprodutivo de nenhuma das fêmeas subdesenvolvidas (Figura 32C). Entretanto, em fêmeas recuperadas após infecção com esquistossômulos silenciados que não apresentaram o fenótipo de subdesenvolvimento (Figura 32C), foram observados ovários com áreas de valor similar à dos parasitos dos grupos controle e a presença de ovos (Figuras 32A e 32B).

Figura 31 – Fotomicrografias de microscopia confocal exemplificando alterações fenotípicas no ovário de fêmeas recuperadas após infecção de camundongos com esquistossômulos expostos ao dsRNA-*Smcd2*.



Em (A) fêmea do grupo controle negativo, (B) do grupo controle inespecífico (GFP), (C) exposta ao dsRNA-*Smcd2* sem fenótipo de subdesenvolvimento e (D) exposta a dsRNA-*Smcd2* com fenótipo de subdesenvolvimento. Os ovários estão marcados por uma linha branca. Ampliação de 40x. Fotomicrografia capturada pelo equipamento LS-710 (Zeiss). As barras brancas em cada fotomicrografia representam a escala de 50 µm **FONTE:** elaborado pelo autor.

Figura 32 – Fotomicrografias de microscopia confocal exemplificando a ausência de ovos no trato de fêmeas subdesenvolvidas recuperadas após infecção de camundongos com esquistossômulos expostos ao dsRNA-*Smcd2*.

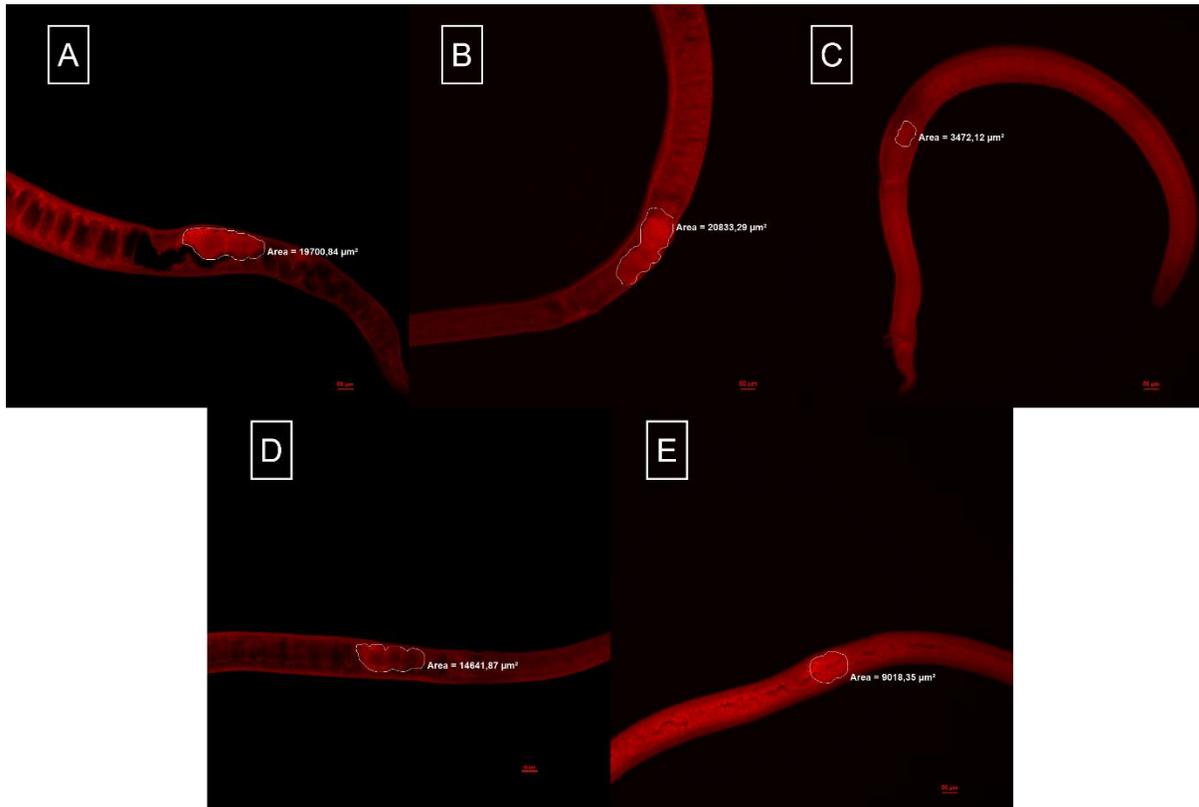


Em (A) fêmea do grupo controle negativo, (B) do grupo controle inespecífico (GFP), (C) exposta ao dsRNA-*Smcd2* com fenótipo de subdesenvolvimento e (D) exposta ao dsRNA-*Smcd2* sem fenótipo de subdesenvolvimento. Os ovos no trato estão marcados por autofluorescência na cor verde (488 nm) e a regiões do trato reprodutivo apontadas pelas setas brancas. Ampliação de 40x. Fotomicrografia capturada pelo equipamento LS-710 (Zeiss). As barras brancas em cada fotomicrografia representam a escala de 50 uM. **FONTE:** elaborado pelo autor.

Também foi possível observar o fenótipo de subdesenvolvimento em fêmeas expostas a dsRNAs específicos de *Smcd1* e *Smcd2* em combinação (Figura 33C). É possível notar, na imagem, que a fêmea fotografada pode ser enquadrada inteiramente

dentro do campo, enquanto o mesmo não pode ser observado para as fêmeas dos demais grupos no mesmo aumento. Além disso, as fêmeas expostas a dsRNA-*Smcd1* e -*Smcd2* em combinação, recuperadas com fenótipo de subdesenvolvimento, apresentam um ovário pouco desenvolvido e sem diferenciação entre oócitos maduros e imaturos, o que não foi visto em fêmeas recuperadas dos grupos controle (Figura 33A e 33B).

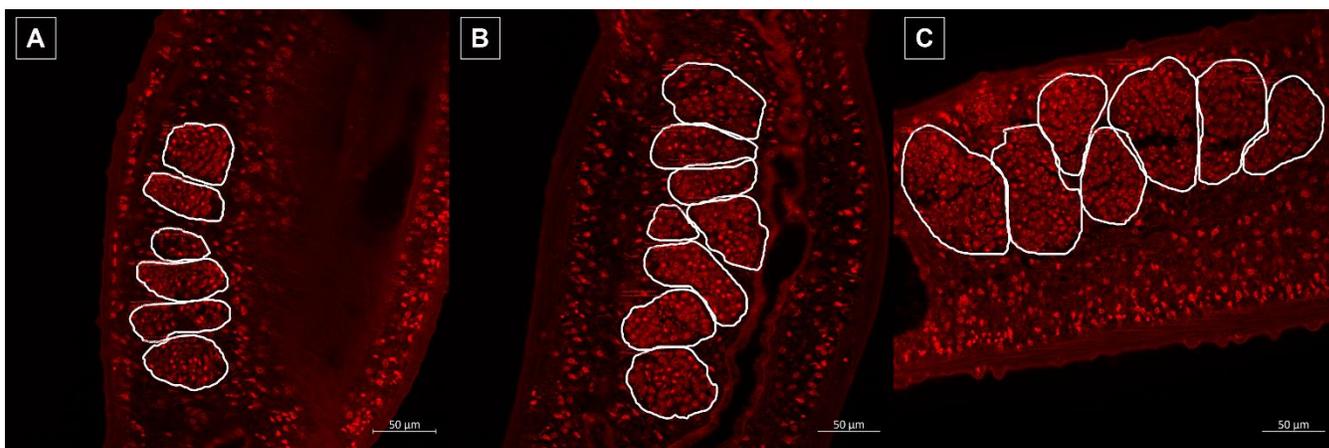
Figura 33 – Fotomicrografias de microscopia confocal exemplificando a área do ovário e tamanho de fêmeas recuperadas após infecção de camundongos com esquistossômulos expostos ao dsRNA-*Smcd1*, -*Smcd2* e -*Smcd1/Smcd2*.



Em (A) fêmea do grupo controle negativo, (B) do grupo controle inespecífico (GFP), (C) exposta a dsRNA-*Smcd1* e -*Smcd2* em combinação com fenótipo de subdesenvolvimento, (D) exposta a dsRNA-*Smcd1* e (E) exposta a dsRNA-*Smcd2*. Os ovários estão marcados por uma linha branca. Ampliação de 10x. Fotomicrografia capturada pelo equipamento Nikon C2+ (Nikon). As barras vermelhas em cada fotomicrografia representam a escala de 50 μM. **FONTE:** elaborado pelo autor.

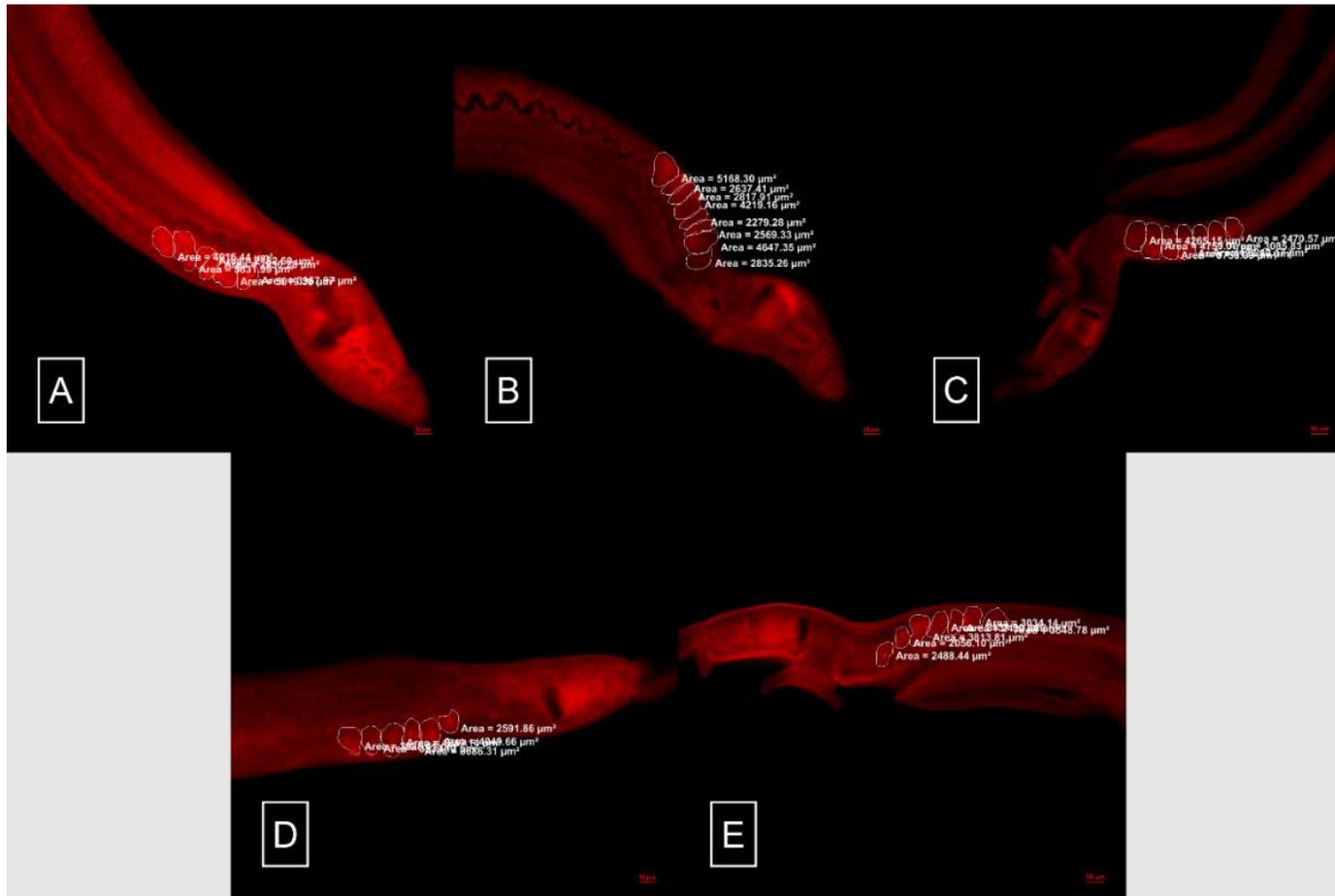
A despeito do observado para as fêmeas, não foram observadas alterações significativas na área dos testículos ou no número de lobos testiculares dos vermes machos recuperados, como pode ser observado abaixo (Figuras 34, 35 e 36B).

Figura 34 – Fotomicrografias de microscopia confocal exemplificando os lobos testiculares de machos recuperados após infecção de camundongos com esquistossômulos controle ou expostos a dsRNA-*Smcd2*.



Em (A) macho do grupo controle negativo, (B) do grupo controle inespecífico (GFP) e (C) exposto a dsRNA-*Smcd2*. Os lobos testiculares estão marcados por linhas brancas. Ampliação de 40x. Fotomicrografia capturada pelo equipamento LS-710 (Zeiss). As barras brancas em cada fotomicrografia representam a escala de 50 µM. **FONTE:** elaborado pelo autor.

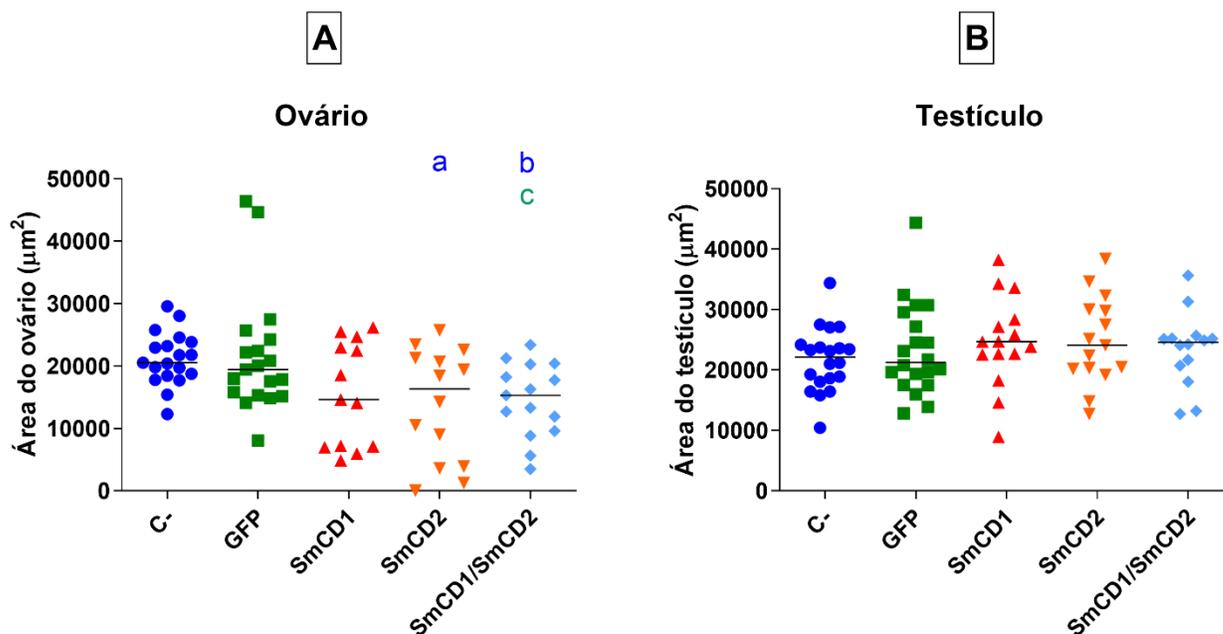
Figura 35 – Fotomicrografias de microscopia confocal exemplificando a área do testículo de machos recuperados após infecção de camundongos com esquistossômulos expostos ao dsRNA-*Smcd1*, -*Smcd2* e -*Smcd1/Smcd2*.



Em (A) macho do grupo controle negativo, (B) do grupo controle inespecífico (GFP), (C) exposto a dsRNA-*Smcd1* e -*Smcd2* em combinação, (D) exposto a dsRNA-*Smcd1* e (E) exposto a dsRNA-*Smcd2*. Os lobos testiculares estão marcados por linhas brancas. Ampliação de 10x. Fotomicrografia capturada pelo equipamento Nikon C2+ (Nikon). As barras vermelhas em cada fotomicrografia representam a escala de 50 µm **FONTE:** elaborado pelo autor.

Abaixo, pode-se observar que houve uma redução estatisticamente significativa na área de ovários de fêmeas recuperadas por perfusão, para os grupos silenciados para *Smcd2* e *Smcd1/Smcd2*. O mesmo não foi observado para *Smcd1*, embora houvesse fêmeas com fenótipo de subdesenvolvimento e área do ovário reduzida em relação aos grupos controle (Figura 36B). Alterações estruturais, numerais e de área nos lobos testiculares não foram, no entanto, identificadas, como pode ser visto a seguir (Figura 36B).

Figura 36 – Área (μm^2) do ovário e lobos testiculares de vermes adultos recuperados após infecção de camundongos com esquistossômulos controle ou expostos aos dsRNAs de *Smcd1* e *Smcd2*, de forma individual ou em combinação.



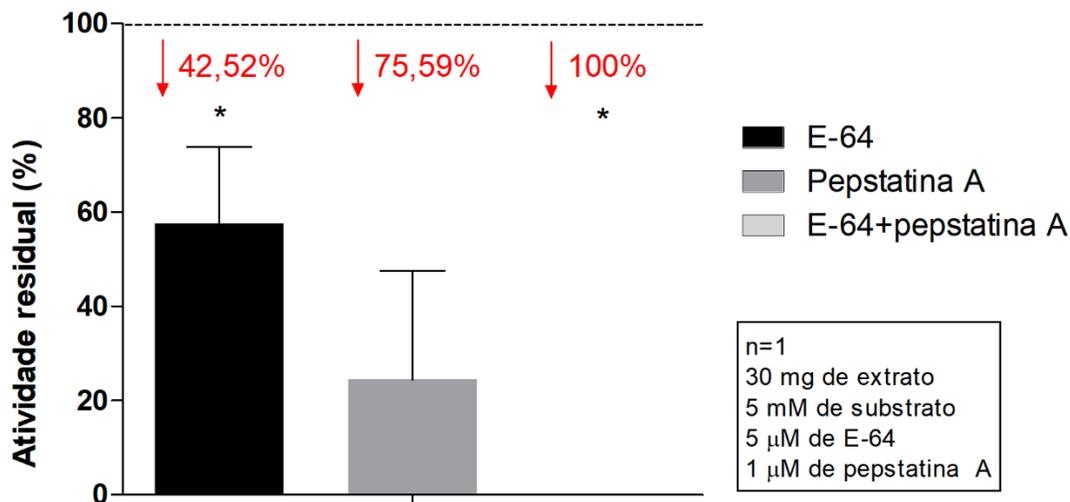
Cada símbolo representa um grupo: (●) controle negativo, (■) controle inespecífico, (▲) *Smcd1*, (▼) *Smcd2* e (◆) *Smcd1/Smcd2*. As linhas horizontais pretas representam as medianas. Em (A) temos a área dos ovários e em (B), dos testículos. O teste estatístico utilizado foi Mann-Whitney, com significância $p < 0,05$. Letras azuis (a e b) representam a diferença estatística entre cada grupo silenciado e o controle negativo, enquanto a letra verde (c) representa diferença estatística em relação ao controle inespecífico (GFP). **FONTE:** elaborado pelo autor.

4.10 ENSAIOS DE ATIVIDADE RESIDUAL COM EXTRATO PROTEICO DE VERMES ADULTOS

Após a exposição aos dsRNA, visamos verificar se a atividade enzimática de vermes adultos estava diminuída. Primeiramente foi realizado um teste para verificar a eficiência de inibição da atividade de cisteíno-protease pelo inibidor E-64. Para tanto, foi gerado um padrão adicionando 5 μM do inibidor E-64 em uma amostra de extrato proteico provenientes de vermes adultos do grupo controle, enquanto outra amostra foi adicionada de 1 μM de pepstatina A, concentração suficiente para inibir 100% da atividade aspartil protease do extrato. Na terceira amostra foram adicionados os dois inibidores (pepstina e E-64), cujo efeito esperado era a ausência de degradação do substrato fluorogênico, enquanto outra amostra não recebeu inibidor e foi utilizada como controle de atividade do extrato. Os ensaios foram repetidos ao menos duas vezes, com triplicata técnica em cada réplica.

Primeiramente foi feito um teste para padronização dos ensaios (Figura 37). Os valores de redução de atividade foram comparáveis a resultados anteriores do grupo do Dr. Floriano Paes (dados não publicados), evidenciando que os inibidores não estavam degradados e eram capazes de inibir seus alvos. Ainda, as triplicatas incubadas com ambos os inibidores apresentaram atividade zero em relação ao controle, evidenciando uma inibição completa e mostrando que apenas estes dois grupos de proteases estão envolvidos no processo de degradação do substrato. Os dados ainda sugerem que a atividade majoritária na degradação do substrato é de aspartil proteases, visto que sua inibição implica em uma diminuição de 75,59% na atividade do extrato, enquanto a inibição de cisteíno-proteases representa uma diminuição de 42,5% na atividade do extrato (Figura 37).

Figura 37 – Padronização da atividade residual de proteases utilizando inibidor de cisteíno-protease (E-64) e inibidor de aspartil protease (pepstatina A).



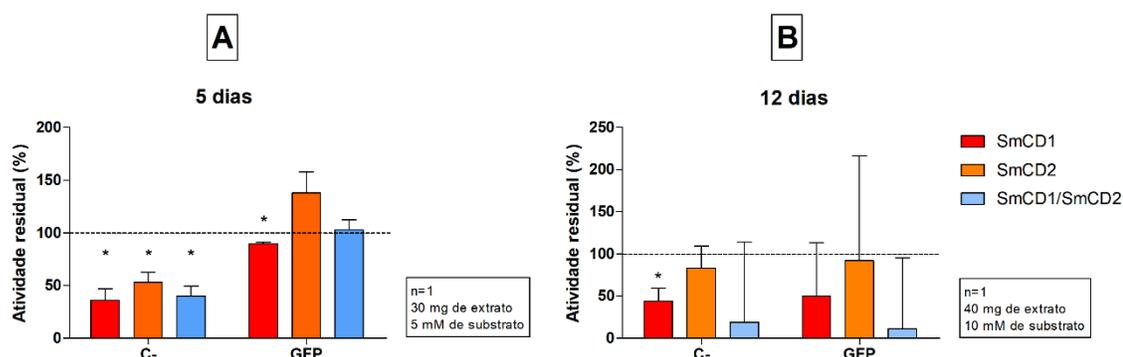
Porcentagem de atividade enzimática representada como a relação da velocidade máxima para cada grupo em relação ao extrato controle que não recebeu nenhum inibidor (representado pela linha pontilhada). O teste estatístico utilizado foi t de Student, com correção de Welch, com significância $p < 0,05$. Os asteriscos representam os valores com significância estatística (** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$). **FONTE:** elaborado pelo autor.

Após, foi utilizado o extrato obtido de vermes adultos expostos aos dsRNAs específicos e mantidos em cultura por cinco dias (Figura 38A). Foi observada uma redução de 64% para SmCD1, 46% para SmCD2 e 59% para SmCD1/SmCD2 comparado com a atividade residual do grupo controle. Em relação ao grupo GFP, entretanto, houve redução de 10% apenas para o grupo silenciado para *Smcd1*.

Ao triar os extratos de vermes adultos mantidos em cultura por 12 dias, foi observada redução na atividade enzimática residual de 55,62% para SmCD1, 16,81% para SmCD2 e 81,17% para SmCD1/SmCD2 comparado com a atividade residual do grupo controle. Em relação ao grupo GFP, as reduções foram de 50,29%, 7,7% e 88,69%, respectivamente, como pode ser observado abaixo (Figura 38B).

Os resultados obtidos indicam uma redução na atividade de SmCD1 e SmCD2 no quinto dia e que é mantida até 12º dia de exposição aos dsRNAs, evidenciando o silenciamento dos alvos. Essa redução na atividade sugere a diminuição na abundância proteica e, por consequência, evidencia o silenciamento.

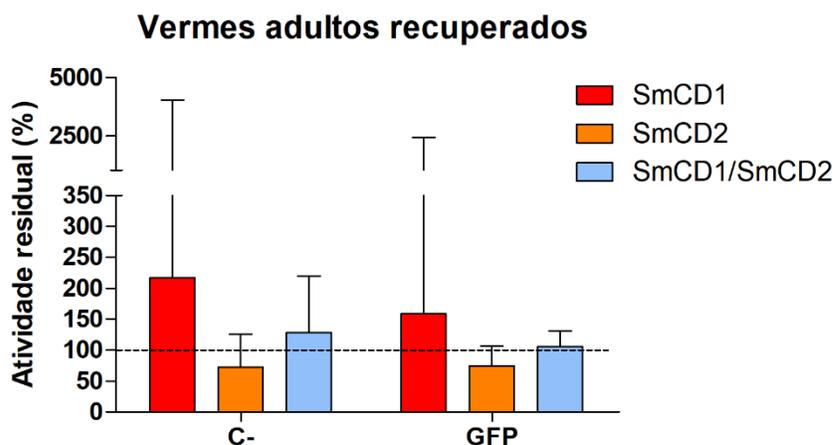
Figura 38 – Atividade residual de aspartil protease no extrato de vermes adultos expostos *in vitro* a dsRNAs específicos para *Smcd1* e *Smcd2*, de forma individual ou em combinação, em duas réplicas de vermes adultos mantidos em cultura por cinco e doze dias.



Em (A), amostras de vermes adultos mantidos em cultura com dsRNAs específicos por cinco dias e em (B), por 12 dias. As barras representam a porcentagem de atividade enzimática residual de uma mesma amostra, triada duas vezes, representada como a relação da velocidade máxima média das duplicatas para cada grupo em relação à mediana das duplicatas dos controles negativo e GFP (representada pela linha pontilhada). O teste estatístico utilizado foi t de Student, com correção de Welch, com significância $p < 0,05$. Os asteriscos representam os valores com significância estatística ($*p < 0,05$). **FONTE:** elaborado pelo autor.

Extrato proteico obtido de vermes adultos recuperados por perfusão a partir da infecção de esquistossômulos silenciados também foi utilizado para as reações de cinética enzimática. Não foi observada diminuição de atividade residual de aspartil protease em parasitos expostos a dsRNA-*Smcd1* e para parasitos expostos aos dsRNAs de *Smcd1* e *Smcd2* em combinação. Entretanto, é possível observar uma pequena redução, de 27,43% (em relação ao controle negativo) e de 25,37% (em relação ao controle inespecífico), para a atividade enzimática residual do grupo exposto a dsRNA-*Smcd2* (Figura 39).

Figura 39 – Atividade residual de aspartil protease no extrato de vermes adultos recuperados por perfusão (*ex vivo*) após infecção de camundongos com esquistossômulos expostos aos dsRNAs específicos.



As barras representam a porcentagem de atividade enzimática residual de uma mesma amostra triada duas vezes, representada como a relação da velocidade máxima média das duplicatas para cada grupo em relação à média das duplicatas dos controles negativo e GFP (representada pela linha pontilhada). O teste estatístico utilizado foi Mann-Whitney, com significância $p < 0,05$. Os asteriscos representam os valores com significância estatística (** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$). **FONTE:** elaborado pelo autor.

Novas análises utilizando extratos proteicos mais concentrados devem ser realizadas para relacionar mais fortemente o observado nos ensaios de atividade residual com os dados de expressão gênica.

5 DISCUSSÃO

A esquistossomose é uma das doenças parasitárias mais debilitantes no mundo (KARUAMOORTHY *et al.*, 2018), entretanto pouco investimento é feito para buscar novos alvos terapêuticos ou vacinas. Neste contexto, apenas uma droga é utilizada para o tratamento da doença, mesmo sob alerta de resistência (CRELLEN *et al.*, 2016; BERGER *et al.*, 2021; LE CLEC'H *et al.*, 2021). Além disso, o gosto amargo e metálico do praziquantel é um fator que muitas vezes impede o tratamento de crianças e provoca as chamadas falhas terapêuticas pela subdosagem absorvida. Ainda, o ciclo de vida do parasito é bastante complexo, exigindo o estudo de sua biologia em suas diversas fases para melhor compreender a relação parasito-hospedeiro e os mecanismos necessários para o estabelecimento da infecção. Dentre esses mecanismos associados à nutrição do verme no hospedeiro vertebrado, temos as APs. Até o momento, SmCD1 foi relacionada

à obtenção de aminoácidos pela clivagem da hemoglobina do hospedeiro (TIMMS & BUEDING *et al.*, 1959; WONG *et al.*, 1997). Entretanto, as outras representantes da família A1 das aspartil proteases recentemente identificadas no parasito ainda não foram relacionadas experimentalmente a uma função biológica. Elucidar os aspectos biológicos do verme e suas interações com o hospedeiro são essenciais para que uma proposta racional de alvos terapêuticos seja realizada (CAFFREY & SECOR, 2011).

A caracterização funcional das APs de *S. mansoni* pode fornecer subsídios para o desenvolvimento de novos fármacos específicos. *S. mansoni* possui 11 APs com o domínio conservado PF00026, com cada família de peptidase apresentando ao menos dois parálogos (SILVA *et al.*, 2011). Ao associar este fato com as observações propostas por Tsai e colaboradores (2013), que relatam o surgimento de duplicações gênicas e as relaciona com adaptações do parasito ao seu hospedeiro, bem como a expressão aumentada de famílias de catepsinas com início na fase de adulto jovem, observada por Wangwiwatsin e colaboradores (2020), há indícios que esse grupo de proteínas seja especialmente importante para o desenvolvimento do parasito. Desta forma, a aquisição de novos dados acerca das funções dessas proteínas no estabelecimento e manutenção da infecção nos seus hospedeiros mamíferos e a análise objetiva de fenótipos dos parasitos silenciados para estes genes, auxiliam na elucidação de seu papel biológico dessa extensa família proteica, permitindo a validação dessas APs como potenciais alvos terapêuticos contra *S. mansoni*. Além disso, trabalhos recentes utilizando sequenciamento de nova geração e de célula única, por Protasio e colaboradores (2017) e Wendt e colaboradores (2020), fornecem informações valiosas de expressão e localização de todos os genes do parasito em infecções uni e bissexuais trazendo luz a importantes questões acerca do desenvolvimento destes parasitos com dimorfismo sexual e sua maturação. A importância desses dados é fortalecida ao possibilitar análises que visam responder questões específicas e bem fundamentadas sobre alvos específicos, incrementados de dados como no caso das aspartil peptidases, auxiliando na elucidação de seu papel biológico.

Após a observação de que os parasitos eram refratários às exposições ao dsRNA-*Smcd3*, tanto em exposição individual ao dsRNA quanto em exposição combinada, os genes alvo do trabalho foram analisados na versão 7.0 do genoma do parasito, que

indicou a presença de duplicações de *Smcd3* (Smp_018800). No início deste trabalho, a versão anterior do genoma, (v. 5.0), era a única disponível e as duplicações não estavam anotadas como APs, tornando *Smcd1*, *Smcd2* e *Smcd3* os únicos representantes da família no parasito. A sequência de dsRNA desenhada originalmente para *Smcd3* (Smp_018800), tendo como base a versão 5.0 do genoma, pode não ter sido eficiente em silenciar todas as duplicações. Entretanto, as sequências de iniciadores específicos para qPCR amplificam *Smcd3* e todos os produtos das duplicações do gene. Desta forma, os resultados de expressão refletem a expressão relativa de suas duplicações, uma vez que os dados de scRNAseq e RNAseq indicam a baixa ou ausente expressão de *Smcd3*. Pela complexidade em se validar todos esses alvos em conjunto e observar seus fenótipos separadamente, optou-se por reservar *Smcd3* e suas duplicações para caracterizações funcionais futuras.

Essa caracterização se torna bastante interessante devido à expressão diferencial observada para Smp_346370, especialmente em fêmeas de infecção mista. Muito tem sido discutido acerca do papel dos machos na maturação das fêmeas de *S. mansoni*. Algumas proteínas já foram demonstradas como essenciais na sinalização e regulação de expressão gênica em fêmeas. O trabalho realizado por Chen e colaboradores (2022), mostrou que machos expressam o fator de transcrição *gli1*, que está diretamente relacionado com indução de desenvolvimento das fêmeas. *gli1* é responsável por controlar a expressão de uma sintetase proteica não ribossomal (NRPS, do inglês *nonribosomal peptide synthetase*). Essa NRPS, por sua vez, sintetiza um dipeptídeo, denominado BATT (β -alanil-triptamina). Esse peptídeo é decretado pelo macho no canal ginecóforo, induzindo o desenvolvimento da fêmea (CHEN *et al.*, 2022). Foi observado também que a secreção de BATT só se inicia após o macho reconhecer a presença da fêmea no canal ginecóforo (CHEN *et al.*, 2022). Ainda, essa *Smcd3-like* apresentou expressão enriquecida em vitelócitos de fêmeas, além de tipos celulares similares em machos, mostrando uma possível participação no processo de oviposição e reprodução dos vermes.

A região 3'-UTR de cada alvo foi utilizada para o desenho de iniciadores para amplificação específica de cada uma das duplicações. Mesmo assim, os iniciadores desenhados não distinguem cada um dos transcritos, devido à presença de duplicações

do gene no genoma do parasito, em uma estrutura em *tandem*. A estrutura de duplicação em *tandem* de *Smcd3* já foi relatada por Wang e colaboradores (2017). Segundo Wagner e colaboradores (2007), fenômenos como o observado para *Smcd3* estão relacionados com a evolução do organismo e com ganho de complexidade (NEI, 1969; WAGNER *et al.*, 2007). Tsai e colaboradores (2013) discutem que essa plasticidade produzida pela duplicação ou deleção de genes possibilita adaptações na interação parasito-hospedeiro, indicando a importância dos genes envolvidos na sobrevivência do organismo (TSAI *et al.*, 2013). Esse fenômeno pode indicar que *Smcd3* e suas duplicações podem desempenhar papel importante nesta interação e com potencial para validação experimental no futuro.

Embora não tenhamos evidenciado a expressão de *Smcd3* no parasito, segundo os dados de Wendt e colaboradores (2020), as duplicações deste gene são expressas e, uma delas, *Smp_346370*, apresenta expressão enriquecida nos vitelócitos. Assim, o desenho de uma molécula de dsRNA para uma região alvo comum às seis sequências pode resultar no silenciamento de todos os genes semelhantes a *Smcd3* (*Smcd3-like*), possibilitando melhor avaliar a função de *Smcd3*. Ainda, como mencionado anteriormente, foi visto que os iniciadores utilizados nas reações de RT-qPCR poderiam amplificá-los. Isso pode explicar a ausência de redução de transcritos de *Smcd3*. Ainda, o desenho de iniciadores para reações de RT-qPCR específicos para *Smcd3*, utilizando a região 5'UTR do transcrito, pode auxiliar na distinção da expressão individual de *Smcd3* (*Smp_018800*).

Para obter mais informações acerca do papel biológico e localização dos alvos no parasito, foram utilizadas ferramentas de bioinformática que possibilitaram identificar os tipos celulares que expressam cada gene. Os dados de scRNAseq obtidos de Wendt e colaboradores (2020) e analisados com foco nas APs de *S. mansoni* evidenciaram que *Smcd1* é expresso em uma ampla gama de tipos celulares, com expressão enriquecida em células do intestino, músculos, parênquima e tegumento. Isso reforça dados anteriores que já ligavam SmCD1 ao processo nutricional do verme. Quanto a *Smcd2*, foi visto uma expressão concentrada e enriquecida no intestino dos parasitos, sugerindo uma participação na obtenção de aminoácidos pelo parasito. Esse primeiro dado demonstra a expressão de *Smcd2* no intestino dos parasitos e sugere que a atividade

biológica do gene é mais restrita à alimentação, não tendo uma expressão em outros tipos celulares do parasito. Ainda, como observado e já discutido anteriormente, Smp_346370, um *Smcd3-like*, está enriquecido em clusters de vitelócitos imaturos e tardios, o que pode indicar a sua participação também no processo reprodutivo dos vermes. Durante as análises, não foram identificados, no entanto, clusters com enriquecimento para *Smcd3* (Smp_018800), Smp_326170, Smp_132480, Smp_309540, Smp_335890 e Smp_335900. Os resultados para *Smcd3* (Smp_018800) coincidem com o que foi observado na figura 1 (ausência de evidência experimental de expressão). Ao atentar para a ausência ou reduzida expressão de *Smcd3* no parasito, os resultados de expressão de *Smcd3* após exposição aos dsRNAs podem refletir apenas a expressão das outras duplicações, incluindo Smp_346370.

Wangwiwatsin e colaboradores (2020), reportaram que na fase pulmonar do ciclo do parasito, foram identificados genes relacionados à transdução de sinal e sinalização neuronal, enquanto na fase juvenil foram identificados genes regulados positivamente relacionados com mitose e tradução proteica, algo esperado para a fase de crescimento do parasito (WANGWIWATSIN *et al.*, 2020). Na fase de adulto jovem, após 28 dias, foram identificados genes diferencialmente expressos relacionados principalmente à produção e maturação de ovos, como tirosinase (Smp_050270, Smp_013540) e proteína da casca (Smp_000430), além da proteína com domínio de síntese de casca de trematódeos (Smp_077890). Entretanto, quando focaram na fase de adulto jovem, 35 dias após infecção, foi observado um perfil de expressão aumentado de várias famílias de proteases, como catepsinas B, D e L. A importância dessas famílias de proteases já foi relacionada com a obtenção nutricional dos parasitos, o que pode estar intimamente ligado com a demanda energética das fêmeas para a oviposição (TIMMS & BUEDING, 1959; LAWRENCE, 1973; MORALES *et al.*, 2008; DELCROIX *et al.*, 2006; KASNY *et al.*, 2009; WANGWIWATSIN *et al.*, 2020). Ensaio realizado com inibidores evidenciaram que a atividade de aspartil protease é mais proeminente que a de cisteíno-proteases, no pH do intestino do parasito, para a degradação da hemoglobina. Isso corrobora dados apresentados por Ghoneim & Klinkert (1995), que relacionam a eficiência da então única aspartil protease identificada, *Smcd1*, frente às cisteíno-proteases do parasito.

Foi observado, por meio de inferência filogenética, que *Smcd1* e *Smcd2* apresentam uma menor distância evolutiva, enquanto *Smcd3* e suas duplicações apresentam uma divergência maior em relação às duas primeiras. Também foi observado que as duplicações de *Smcd3* estão presentes em maior número em *S. mansoni*, quando comparado a outros organismos do mesmo gênero. A existência de duplicações do ortólogo de *Smcd3* também foi observada em *S. haematobium* e *S. rodhaini* embora em menor número. Curiosamente, o mesmo não foi observado para *Smcd2*, cujos ortólogos não são encontrados em todos os platelmintos utilizados na análise. Como mencionado, quando se trata de expansões em família proteicas, Tsai e colaboradores (2013) relacionam o aumento de complexidade do genoma e expansão de famílias como indicativos da importância dos genes na relação parasito-hospedeiro, e dá mais indícios da participação biológica de *Smcd2* e *Smcd3*, assim como todas as suas duplicações. Vale ressaltar que o aparecimento de duplicações de APs também já foi relatado em *S. japonicum*, parasito com hábito de vida parecido com *S. mansoni* (LIU *et al.*, 2014).

Após identificar a localização espacial de expressão de *Smcd1* e *Smcd2*, a próxima etapa foi identificar o papel dos alvos nas diversas fases do parasito. Foi observado experimentalmente, por RT-qPCR, que *Smcd1* e *Smcd2* são mais expressos em vermes adultos fêmeas, corroborando o que foi observado por Timms & Bueding (1959) e por Brindley e colaboradores (2001), que mostraram que o até então único representante, *Smcd1*, era mais expresso em vermes adultos fêmeas, podendo estar diretamente relacionado à alta demanda energética requisitada para a postura de ovos (TIMMS & BUEDING, 1959; BRINDLEY *et al.*, 2001). Pode-se relacionar a isso a alta taxa de alimentação de fêmeas no interior do hospedeiro vertebrado, muitas vezes maior que a taxa de alimentação de machos por ingestão de sangue do hospedeiro (LAWRENCE, 1973). Assim como os dados já disponíveis na literatura para *Smcd1*, foi possível observar que *Smcd2* aparenta ter um perfil bem semelhante, sendo mais expresso em fêmeas. Junta-se a isso a observação anterior que relata o enriquecimento de *Smcd2* em células do intestino de vermes adultos, o que pode indicar uma colocalização de SmCD1 e SmCD2 no intestino de vermes fêmeas. Isso fica mais evidente quando se compara os níveis de expressão de *Smcd2* em vermes adultos

machos e fêmeas. A expressão em fêmeas é duas vezes maior que em machos, além de 40.000 vezes maior que a expressão em esporocistos. *Smcd1* também apresenta esse perfil, sendo 1,42 vezes mais expresso em fêmeas que em machos.

A técnica de RNAi é o método mais eficiente e padronizado para estudos de função gênica e genética reversa em *S. mansoni* (MOURÃO *et al.*, 2009). Entretanto, apresenta grande variabilidade, sendo dependente do alvo estudado e da especificidade do dsRNA utilizado (MOURÃO *et al.*, 2009). Ainda, cada alvo apresenta um *turnover* diferente e, portanto, a realização e análise de uma cinética de silenciamento se faz necessária para determinar qual o período em que há maior diminuição dos níveis de transcritos, assim como a duração do efeito do silenciamento e suas possíveis consequências para o parasito (MOURÃO *et al.*, 2009). Neste contexto, apesar do empenho da comunidade científica, outras técnicas de estudo de função gênica ainda precisam ser padronizadas para o parasito, como a edição gênica por CRISPR/Cas-9. Ittiprasert e colaboradores (2019) demonstraram a possibilidade de edição gênica em ovos do parasito. Entretanto, a eficiência da técnica ainda precisa ser verificada em outras formas evolutivas do parasito. Desta forma, este trabalho optou por realizar a caracterização gênica utilizando a técnica de RNAi. Para isso, esquistossômulos foram mantidos em cultura com adição de dsRNAs específicos, de forma individual ou em combinação, para avaliar, em uma cinética, o dia de maior redução de transcrito. Para todos os casos, o quinto dia se mostrou o dia de maior redução, chegando a 99,9% de redução para os alvos.

A área dos parasitos foi avaliada para verificar se a diminuição da expressão de *Smcd1* e/ou *Smcd2* poderia induzir alterações no desenvolvimento e maturação dos vermes. Assim como observado previamente por Morales e colaboradores (2008), foi observada alterações na área de parasitos expostos aos dsRNAs, em relação aos controles utilizados. A maior redução ocorreu para o grupo exposto aos dsRNAs de *Smcd1* e *Smcd2* em combinação, no sétimo dia. Como também discutido por Morales e colaboradores ao analisar os dados observados de redução da área de parasitos silenciados para *Smcd1*, nem todos os vermes foram afetados pelo silenciamento *in vitro*, bem como as alterações no crescimento não foram observadas em vários momentos da cultura, chegando até o 14^o dia de cultura, onde a alteração foi mais perceptível. Os

resultados deste trabalho, no entanto, evidenciaram que durante os primeiros dias de exposição aos dsRNAs, os parasitos apresentavam área igual ou aumentada em relação aos controles. Isso mudou no sétimo dia, onde os parasitos expostos a dsRNA de *Smcd2* e *Smcd1/Smcd2* apresentaram uma redução significativa na área. Correnti e colaboradores (2005), já evidenciaram, em um trabalho de caracterização de catepsina B de *S. mansoni*, que nem todos os parasitos recebem a mesma dose de dsRNA ou respondem da mesma forma.

Após a confirmação de silenciamento por RT-qPCR, a próxima etapa foi avaliar se a formação de pigmentos de hemozoína diminuía conforme cada alvo era silenciado. Uma forma de avaliar a formação de hemozoína e relacionar a atividade de SmCD1 e SmCD2 na proteólise da hemoglobina *in vitro* é a incubação de parasitos com dsRNAs específicos na presença de eritrócitos humanos, como realizado para SmCD1 por Morales e colaboradores (2008). Como tratado pelos autores e por Correnti e colaboradores (2005), a disfunção na degradação de hemoglobina dos parasitos pelo silenciamento leva ao não aparecimento de pigmentos de hemozoína, mas sim pigmentos avermelhados que são compostos por produtos de clivagem inicial e monômeros de hemoglobina sem degradação completa.

Ao incubar os parasitos silenciados com eritrócitos humanos, foi possível observar uma diminuição da formação de hemozoína nos dias 12, 16 e 18, em relação aos controles utilizados, tanto para *Smcd1* e *Smcd2* em exposição individual quanto em combinação (*Smcd1/Smcd2*). Seguindo o que foi observado previamente na literatura para *Smcd1* (MORALES *et al.*, 2008), os resultados de diminuição de pigmentos de hemozoína não só confirmam a participação de *Smcd1* na degradação da hemoglobina, mas posicionam *Smcd2* nesta via. Provavelmente, a formação de pigmentos de hemozoína não seria zero mesmo que todos os parasitos estivessem completamente silenciados, uma vez que, embora menos eficiente, as cisteíno proteases também são capazes de degradar a hemoglobina do hospedeiro, mesmo que com pontos de clivagem diferentes (GHONEIM & KLINKERT, 1995). Desta forma, pequenos acúmulos de hemozoína poderiam ser vistos, mesmo que a degradação da hemoglobina fosse insuficiente para manter o verme no seu hospedeiro, como foi visto para as fêmeas subdesenvolvidas recuperadas. Isso aponta, mais uma vez, para a importância destes

alvos na nutrição do verme. Esse ensaio fornece mais evidências que apontam para a participação destas proteases na degradação de hemoglobina a hemozoína e fornece um método fácil e simples para avaliar a atividade dessas APs. Nosso trabalho também adiciona dados de clivagem que complementam os dados anteriores, uma vez que o número de parasitos foi quantificado e a análise não foi apenas qualitativa, mas quantitativa. Para atingir esse grau da análise, foram quantificados mais de 1500 parasitos em fotomicrografias retiradas de diferentes réplicas biológicas das culturas de parasitos. Foi observado que nossos dados não corroboram os dados reportados por estudo anterior.

Visamos ainda, avaliar a viabilidade de esquistossômulos e vermes adultos, machos e fêmeas, expostos aos dsRNA-*Smcd1* e *Smcd2*, e não foram observadas alterações em relação aos controles, o que pode ser explicado por diversos fatores. Primeiramente, pode estar relacionado com a ausência de pressão por parte do sistema imunológico do hospedeiro vertebrado. Além disso, a formulação de meio utilizada é bastante completa, apresentando uma composição rica em nutrientes e biomoléculas livres, como glicose, aminoácidos e peptídeos, além de uma série de outros suplementos, como hormônios. Como tratado anteriormente, o parasito apresenta uma série de transportadores de glicose no tegumento e na gastroderme (FRIPP, 1967; SKELLY *et al.*, 1994; JIANG *et al.*, 1996; SKELLY *et al.*, 1998). Esses transportadores permitem que o verme obtenha glicose diretamente do meio sem depender de seu sistema digestivo. No hospedeiro vertebrado, SGTP1 e SGTP4 se localizam no tegumento, capturando glicose dissolvida no sangue. Enquanto SGTP1 está disponível em todas as fases, SGTP4 só é expressa no interior do hospedeiro mamífero (SKELLY & SHOEMAKER, 1996). Enquanto SGTP4 está localizada na membrana apical do tegumento, SGTP1 só está presente na membrana basal, principalmente nas proximidades de músculos (ZHONG *et al.*, 1995). Desta forma, SGTP4 parece estar envolvida na captação de glicose, enquanto SGTP1 está envolvida na distribuição da glicose pelos tecidos do verme (ZHONG *et al.*, 1995). Os resultados obtidos por Skelly e colaboradores (1998), indicam que a expressão de SGTP2 está restrita ao intestino de fêmeas. Entretanto, foi observado que este transportador não é funcional devido a uma mutação recente na história evolutiva do parasito (SKELLY *et al.*, 1994). No hospedeiro

vertebrado, a glicose não está amplamente disponível, o que desafia o verme a obter energia a partir da digestão do material ingerido. Além disso, os aminoácidos e peptídeos livres no meio são absorvidos por outros grupos de proteínas, como a leucina aminopeptidase (MCCARTHY *et al.*, 2004), entregando ao verme aminoácidos não provenientes da digestão direta. Ainda, na fase de esquistossômulos, não há a demanda energética necessária às fêmeas para a realização da postura de ovos.

Desta forma, a interrupção da via proteolítica da hemoglobina pelo silenciamento de *Smcd1* e/ou *Smcd2* pode não impactar diretamente na sobrevivência do verme *in vitro* com os parâmetros de cultura utilizados, visto que ele possui outros mecanismos de obtenção de energia e nutrientes. Na literatura, diversos trabalhos que visam caracterizar experimentalmente vias de obtenção de nutrientes e enzimas envolvidas nesse processo utilizam meios ricos em glicose e aminoácidos livres (MORALES *et al.*, 2005; CORRENTI *et al.*, 2005), o que pode mascarar a observação de fenótipos relacionados com o silenciamento dos genes estudados. Para avaliar corretamente a viabilidade dos parasitos após o silenciamento de genes que codificam enzimas envolvidas no processo de nutrição, entretanto, meios pobres deveriam ser utilizados para desafiar os vermes e assim obter informações mais claras sobre o papel das enzimas no metabolismo energético. Devido a isso, nosso grupo vem desafiando camundongos com esquistossômulos silenciados visando impor as pressões alimentares e imunológicas se fazem presentes no sistema complexo do parasitismo.

A próxima etapa foi avaliar *in vitro* as alterações fenotípicas em vermes adultos expostos aos dsRNAs específicos. Para isso, foi utilizada a técnica de WormAssay (MARCELLINO, 2012), que avalia a motilidade dos vermes como indicativo de sofrimento ou morte do parasito. Neste ensaio, foi observada uma redução significativa de motilidade para fêmeas silenciadas para *Smcd2* no 11^o dia, enquanto machos apresentavam uma alteração de motilidade drástica no quinto dia após silenciamento para *Smcd1* e *Smcd2*. Após esse período, no entanto, os machos recuperaram sua motilidade, com nova redução significativa no novo dia. Vale ressaltar que, mesmo após a recuperação, a motilidade dos machos nunca retornou aos níveis dos controles. Essa diminuição de motilidade, ligada ao sofrimento do parasito, pode indicar a participação de SmCD1 e SmCD2 em uma série de processos biológicos nos vermes adultos.

Novamente aqui, o meio rico em que os parasitos são cultivados poderia mascarar a nutrição dos parasitos e conseqüentemente seu potencial energético.

Após a caracterização *in vitro* dos alvos em parasitos expostos a dsRNAs, as próximas etapas foram os ensaios de caracterização funcional *in vivo*. Para isso, esquistossômulos silenciados foram inoculados em camundongos para avaliação dos fenótipos dos parasitos *ex vivo*. Esse ensaio é de suma importância tendo em vista que a infecção permite que o verme seja desafiado com as pressões imunológicas e alimentares necessárias para avaliar o papel dos alvos no metabolismo energético. Após perfusão e análise de caracteres morfológicos dos vermes recuperados, foi observado que fêmeas apresentam alterações fenotípicas que podem estar relacionadas à redução de expressão dos alvos. A diminuição de área e diferenciação/maturação do ovário nos dão indícios que SmCD1 e SmCD2 estão envolvidas no processo de nutrição do verme e, por conseqüência, no desenvolvimento e maturação dos parasitos. As observações morfológicas apontaram um atraso na diferenciação sexual de fêmeas, o que vai de encontro com o que foi observado *in silico*, que indica a expressão dos alvos em células do intestino dos parasitos. Os dados também se relacionam com o que foi observado experimentalmente, em que *Smcd1* e *Smcd2* são mais expressos na fase de verme adulto fêmea, sugerindo, mais uma vez, a participação e importância destes genes no metabolismo nutricional necessário à essa fase do parasito. Estes resultados são importantes, pois, até o momento, nenhum outro trabalho relacionou experimentalmente a atividade de SmCD2 na via de degradação de hemoglobina do hospedeiro. Além disso, como destacado anteriormente, a expressão de *Smcd2* está restrita a células do intestino. Entretanto, não foram observadas alterações na recuperação de vermes totais, machos e fêmeas.

Como anteriormente observado por Morales e colaboradores (2008) na fase de esquistossômulo, foi observado em nosso trabalho que fêmeas adultas recuperadas que apresentaram fenótipo de subdesenvolvimento e também apresentavam um menor depósito de hemozoína no trato digestivo. Isso pode indicar uma disfunção na cascata proteolítica de digestão da hemoglobina do hospedeiro vertebrado, reforçando um possível papel das proteases nesse processo. Os resultados aqui observados de fêmeas subdesenvolvidas, juntamente com o observado por Wangiwatsin e colaboradores

(2020), além dos dados já consolidados na literatura, podem estar relacionados com a dificuldade na obtenção nutricional, o que levaria a um atraso no desenvolvimento desses vermes.

Alterações morfológicas não foram identificadas em machos nos fenótipos avaliados. Embora os dados evidenciem a expressão dos alvos em machos, a demanda energética inferior à das fêmeas, as taxas de alimentação menores e a maior área corporal com transportadores de glicose podem justificar o não aparecimento de alterações fenotípicas relacionadas ao silenciamento. Soma-se a isso os dados de recuperação de ovos no fígado de camundongos infectados com parasitos silenciados. Foi observada uma redução significativa de ovos nos grupos *Smcd1*, *Smcd1* e *Smcd1/Smcd2*, que podem estar relacionados com a diminuição na postura das fêmeas, enquanto os ovos do grupo controle negativo e inespecífico apresentaram um perfil semelhante. O caso mais extremo foi visto em parasitos silenciados para *Smcd2*. Em diversos animais, não foram encontrados ovos no fígado. Entretanto, ao observar a maturação dos ovos retidos na porção terminal do intestino delgado dos animais, não foi possível identificar alterações nas diferentes fases: ovos mortos, maduros ou imaturos. Isso pode indicar que, embora haja a diminuição da postura, não há atraso no desenvolvimento do miracídio. A digestão total dos intestinos também não indicou redução no número de ovos, apenas uma leve tendência de diminuição para o grupo silenciado para *Smcd1* e *Smcd2* em combinação.

Os vermes recuperados por perfusão foram analisados também por microscopia confocal para identificar possíveis consequências do silenciamento no desenvolvimento e maturação. Como visto, foram identificadas fêmeas subdesenvolvidas apenas nos grupos silenciados. A nível microscópico, foi identificado que as fêmeas subdesenvolvidas apresentam ovário pouco desenvolvido ou indiferenciado. Não é possível diferenciar oócitos maduros ou imaturos. Além disso, não foram encontrados ovos no trato reprodutivo, indicando que essas fêmeas não estavam ativamente liberando ovos, corroborando o fato de que alguns camundongos não apresentavam ovos. A área dos ovários foi quantificada e foi observada uma redução significativa para os grupos de fêmeas expostas a dsRNA-*Smcd2* e dsRNA-*Smcd1* e -*Smcd2* em combinação. Para fêmeas silenciadas para *Smcd2*, foi possível identificar exemplares com ovário tão atrofiado que dificultava a sua delimitação. Alterações fenotípicas não

foram encontradas em machos, que apresentaram número de lóbulos e área do testículo semelhante aos controles. O fenômeno observado pode estar relacionado com a demanda energética e os níveis de expressão de cada alvo, uma vez que, como visto, tanto *Smcd1* como *Smcd2* são 1,42 e duas vezes mais expressos em fêmeas que machos, respectivamente.

Visando otimizar o silenciamento dos genes nos quais não conseguimos um silenciamento ótimo e comparar duas metodologias distintas para silenciamento gênico, comparamos a técnica de RNAi utilizando os dsRNAs aqui descritos e pequenos RNAs desenhados internamente às sequências de dsRNAs. Na literatura, trabalhos utilizam tanto RNAs de fita dupla longos (dsRNA) como curtos (siRNA) para silenciamento gênico. O uso de siRNAs pode ser mais vantajoso pela entrega de uma molécula ativa, além de minimizar a chance de ocorrência de efeitos *off-target* e seu uso é mandatório em células de mamíferos, pois longos RNAs de dupla fita ativam resposta mediada por Interferon (REYNOLDS *et al.*, 2006). Entretanto, os resultados obtidos nos testes de eficiência no presente trabalho demonstraram uma maior redução de transcritos em parasitos expostos aos dsRNAs longos desenhados para cada alvo. Isso vai de encontro com o relatado por Stefanic e colaboradores (2010), que optaram pelo uso de moléculas longas devido a uma maior possibilidade de geração de fragmentos ativos, o que potencializaria o efeito de silenciamento (STEFANIC *et al.*, 2010). Desta forma, apesar das sequências de siRNAs utilizadas para a exposição estarem dentro da região coberta pelos dsRNAs desenhados, estas podem não representar os fragmentos mais ativos para a redução eficiente de transcritos dos alvos.

Os ensaios enzimáticos são uma das formas de se avaliar o silenciamento ao analisar a atividade residual de um extrato e relacionar essa atividade à abundância proteica de cada alvo. Assim, buscou-se relacionar a atividade residual das APs em vermes silenciados *in vitro* e recuperados por perfusão após infecção com esquistossômulos silenciados (*ex vivo*). Foi observada uma redução na atividade residual de aspartil protease no quinto e 12º dias após exposição de vermes adultos aos dsRNAs, indicando a eficácia na técnica de RNAi em reduzir os transcritos e, por consequência, a quantidade de proteína de cada alvo. Isso já não foi observado tão claramente nos ensaios utilizando extrato de vermes recuperados por perfusão após 42-45 dias de

infecção. Embora ainda exista uma pequena redução de atividade de SmCD2, a atividade dos grupos silenciados para *Smcd1* e para *Smcd1* e *Smcd2* em combinação apresenta uma alta atividade residual. Essa alta atividade sugere que o efeito do RNAi não se mantém até os 42-45 dias de infecção, embora tenhamos visto a persistência do silenciamento após 20 dias em esquistossômulos *in vitro*. Embora a atividade de SmCD1 e SmCD2 tenha se normalizado nesse estágio, os níveis das proteínas podem ter permanecido baixos durante o desenvolvimento dos parasitos, levando ao surgimento dos fenótipos de subdesenvolvimento observados na recuperação. Esse fenótipo não seria revertido após o aumento nos níveis de proteínas dos alvos. Embora a técnica de RNAi seja eficiente em reduzir os transcritos de um gene, o silenciamento não é homogêneo entre todos os parasitos (CORRENTI *et al.*, 2005), uma vez que todos os ensaios posteriores (incluindo o RNAi) são executados em *pool* (MOURÃO *et al.*, 2009). Desta forma, novos ensaios serão necessários para possibilitar conclusões mais sólidas com relação à atividade de APs em vermes adultos após a exposição aos dsRNAs específicos. Apesar de sensível, Leippe e colaboradores (2018) observaram que, entre todas as proteases testadas, a pepsina e a catepsina D são as que demonstraram sinais mais fracos e menor reprodutibilidade. Essa observação pode justificar os resultados obtidos, evidenciando também uma necessidade de repetição das triagens para avaliar a atividade residual dos alvos.

6 CONCLUSÕES

Foi observada a existência de duplicações de *Smcd3* em tandem no genoma do parasito, assim como uma duplicação do último éxon de *Smcd1* (Smp_326170), que apresenta um domínio aspartil protease truncado.

Os resultados indicam que *Smcd1* apresenta uma expressão ubíqua no parasito, mas enriquecida em clusters como parênquima, músculo, tegumento e intestino. Enquanto isso, *Smcd2* tem expressão enriquecida apenas no intestino, sugerindo sua participação no processo de alimentação do parasito. Já *Smcd3* (Smp_018800) aparenta ser pouco ou não expressa no parasito. Entretanto, uma duplicação de *Smcd3*,

Smp_346370, é muito expressa em vermes adultos, enriquecida em vitelócitos imaturos e tardios, sugerindo sua participação na reprodução do parasito.

Existe uma expansão do número de cópias de *Smcd3* em *S. mansoni* em comparação com outras espécies do gênero, sugerindo a importância destes genes nos processos biológicos do parasito. Enquanto isso, ortólogos de *Smcd2* foram encontrados em um menor número nas espécies do gênero.

Os genes que codificam as proteínas SmCD1 e SmCD2 são mais expressos em vermes adultos fêmeas em comparação com todas as outras fases do ciclo de vida de *S. mansoni*.

Foi possível observar uma redução de atividade de aspartil protease em extratos de vermes adultos (*in vitro*) confirmando a eficácia e especificidade do silenciamento de *Smcd1* e *Smcd2*. No entanto o silenciamento não parece ser mantido após os 40 dias de infecção.

Não foi observada alteração significativa na viabilidade de parasitos silenciados e mantidos *in vitro*, o que pode ser relacionado com a falta de pressão em cultura devido ao meio rico em nutrientes. Por outro lado, há indícios da importância de *Smcd2* em fêmeas adultas e *Smcd1/Smcd2* em machos adultos no processamento energético do parasito ou diretamente em processos relacionados a motilidade de vermes adultos. No entanto, uma nova plataforma para avaliar a viabilidade de parasitos silenciados para enzimas envolvidas na alimentação deve ser utilizada, com meios pobres em nutrientes.

Foi observada a recuperação de fêmeas subdesenvolvidas, indicando que SmCD1 e SmCD2 parecem ter papel no desenvolvimento e maturação do parasito como também demonstrado pelas alterações fenotípicas nos vermes adultos fêmeas recuperadas *ex vivo*, além do menor número de ovos recuperados no fígado de animais infectados.

O silenciamento utilizando dsRNAs se mostrou mais eficiente que a utilização dos siRNAs em *S. mansoni*.

7 PERSPECTIVAS

O trabalho pretende contribuir para caracterização biológica e validação de novos alvos terapêuticos contra *S. mansoni*. Desta forma, os resultados aqui disponíveis podem embasar a busca por novas alternativas para o tratamento, como o desenvolvimento de inibidores específicos e vacinas tendo como alvo SmCD1 e SmCD2 e avaliar o impacto da inibição destas proteases no desenvolvimento e sobrevivência do parasito. Além disso, abre-se espaço para validar outros alvos envolvidos no metabolismo nutricional, como a participação da leucina aminopeptidase que facilita a absorção e distribuição de peptídeos e aminoácidos pelo parasito.

Atualmente, todas as sequências das aspartil proteases foram obtidas e alinhadas para permitir o desenho de iniciadores para a amplificação de uma região comum a todas as duplicações das SmCDs. Especialmente, um par de iniciadores foi desenhado para amplificar de forma específica *Smcd3* (Smp_018800) por RT-qPCR. Devido à semelhança entre as sequências de todos os seis genes, aqui denominados *Smcd3-like*, a região 5'UTR de *Smcd3* (Smp_018800) foi selecionada, criando um par específico para distinguir a expressão de *Smcd3* das demais. Esses iniciadores poderão ser utilizados no futuro para avaliar o papel de SmCD3 e suas duplicações no metabolismo do parasito, uma vez que Smp_346370, uma *Smcd3-like*, apresentou expressão diferencial em vermes adultos, sendo um promissor alvo para estudos futuros.

Novos ensaios de avaliação de atividade residual em extratos de parasitos deverão ser repetidos.

Parasitos expostos aos dsRNAs e controle serão utilizados para a realização de ensaios de imunolocalização dos alvos, utilizando soros policlonais de coelho gentilmente cedidos pelo grupo do Dr. Floriano Paes, do IOC/Fiocruz. Esses soros também serão utilizados para quantificar a abundância proteica em extratos de vermes já preparados, utilizando a técnica de *Western Blotting*. Além disso, os transcritos de cada alvo deste trabalho serão localizados por hibridização fluorescente *in situ* (FISH), para confirmar os dados de scRNAseq observados e fornecer mais indícios sobre o papel destes genes no metabolismo do parasito.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, N. *et al.* RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 67, n. 4, p. 657-685, dez. 2003.

ALREFAEI, Y. N. Progress with schistosome transgenesis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 106, n. 7, p. 785-793, nov. 2011.

ANDERSON, L. *et al.* *Schistosoma mansoni* Egg, Adult Male and Female Comparative Gene Expression Analysis and Identification of Novel Genes by RNA-Seq. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 9, n. 12, 2015.

ANDRADE, L. F. *et al.* Regulation of *Schistosoma mansoni* Development and Reproduction by the Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 8, n. 6, jun. 2014.

ANDRADE, Z. A.; PRATA, A. Asymptomatic schistosomiasis studied by needle biopsy of the liver. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 5, p. 236-242, 1963.

ARAUJO-MONTOYA, B. O. *Schistosoma mansoni* cathepsin D1: Biochemical and biophysical characterization of the recombinant enzyme expressed in HEK293T cells. **Protein Expression and Purification**. v. 167, 08 nov. 2019.

BASCH, P. F. Cultivation of *Schistosoma mansoni* in vitro. I. Establishment of cultures from cercariae and development until pairing. **J. Parasitol**. v. 2, p. 179-185, 1981.

BECKER, M. M. *et al.* Cloning and Characterization of the *Schistosoma japonicum* Aspartic Proteinase Involved in Hemoglobin Degradation. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 270, n. 41, p. 24496-24501, out. 2013.

BERGER, D. J. *et al.* Whole-genome sequencing of *Schistosoma mansoni* reveals extensive diversity with limited selection despite mass drug administration. **Nature Communications**. v. 12, n. 4776, 2021.

BLOCH, E. H. *In vivo* microscopy of schistosomiasis. II. Migration of *Schistosoma mansoni* in the lungs, liver, and intestine. **Am J Trop Med Hyg**. v. 29, 1980.

BOGITSH, B. J.; KIRSCHNER, K. F. *Schistosoma japonicum*: Immunocytochemistry of Adults using Heterologous Antiserum to Bovine Cathepsin D. **Experimental Parasitology**. v. 64, p. 213-218, 1987.

BOYLE, J. P. Using RNA interference to manipulate endogenous gene expression in *Schistosoma mansoni* sporocysts. **Molecular & Biochemical Parasitology**. v. 128, p. 205-215, 2003.

BRINDLEY, P. J. *et al.* Proteolysis of human hemoglobin by *Schistosoma* cathepsin D.

Molecular and Biochemical Parasitology. v. 112, p. 103-112, 5 jan. 2001.

BRASIL. TabNet. DATASUS, 2023. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sinan/pce/cnv/pcebr.def>>. Acesso em: 19 jan. 2023.

BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G. V. **Invertebrates**. 1^a ed. Massachusetts: Sinauer Associates. 1990.

BUSTIN, S. A *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clin. Chem**. v. 55, 2009.

CAFFREY, C. R.; SECOR, W. E. Schistosomiasis: from drug deployment to drug development. **Current Opinion in Infectious Diseases**. v. 24, p. 410-417, 2011.

CARVALHO, O. S. *et al.* **Schistosoma mansoni & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. 1^a ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008.

CIOLI, D. *et al.* Schistosomiasis control: praziquantel forever?. **Molecular & Biochemical Parasitology**. v. 195, p. 23-29, 2014.

CHALA, B.; TORBEN, W. An Epidemiological Trend of Urogenital Schistosomiasis in Ethiopia. **Front. Public Health**. v. 6, n. 60, 05 mar. 2018.

CHAN, J. D. *et al.* The anthelmintic praziquantel is a human serotonergic G-protein-coupled receptor ligand. **Nature Communications**. v. 8, n. 1910, 2017.

CHEEVER, A. W.; ANDRADE, Z. A. Pathological lesions associated with *Schistosoma mansoni* infection in man. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 61, p. 629-623, 1967.

CHEN, R. *et al.* A male-derived nonribosomal peptide pheromone controls female schistosome development. **Cell**. v. 185, p. 1-15, 28 abr. 2022.

CHENG, T. C.; BIER, J. W. Studies on molluscan schistosomiasis: an analysis of the development of the cercaria of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**. v. 64, 1972.

COELHO, M. V. Aspectos do desenvolvimento das formas larvais de *Schistosoma mansoni* em *Australorbis nigricans*. *Ver. Bras. Biol.* v. 17, 1957.

COLES, G. C. The carbohydrate metabolism of larval *Schistosoma mansoni*. **International Journal for Parasitology**. v. 2, p. 341-352, 1972.

COLLEY, D. G. Human schistosomiasis. **Lancet**. v. 383, n. 9936, p. 2253-2264, 28 jun. 2014.

COMBES, C. *et al.* Mise and évidence de l'intervention de sporocystes répliqueurs dans le cycle biologique de *Schistosoma bovis* (Sonsino, 1876) Blanchard, 1985. **Bulletin de la Société Française de Parasitologie**. v. 1, p. 27-30, 1983.

- COLES, G. C. The effect of praziquantel on *Schistosoma mansoni*. **J. Helminthol.** v. 53, n. 1, p. 31-33, 1979.
- CORRENTI, J. M. *et al.* Long-term suppression of cathepsin B levels by RNA interference retards schistosome growth. **Mol Biochem Parasitol.** v. 2, n. 209, 2005.
- CRABTREE, J. E.; WILSON, R. A. *Schistosoma mansoni*: a scanning electron microscope study of the developing schistosomulum. **Parasitology.** v. 81, 1980.
- CRELLEN, T. *et al.* Reduced Efficacy of Praziquantel Against *Schistosoma mansoni* In Associated With Multiple Rounds of Mass Drug Administration. **Clin Infect Dis.** v. 63, n. 9, 1 nov. 2016.
- D' ANDREA, P. S. *et al.* The parasitism of *Schistosoma mansoni* (Digenea-Trematoda) in a naturally infected population of water-rats, *Nectomys squamipes* (Rodentia-Sigmodontinae) in Brazil. **Parasitology.** v. 120, p. 573-582, 2000.
- DELCROIX, M. *et al.* A Multienzyme Network Functions in Intestinal Protein Digestion by a Platyhelminth Parasite. **Journal of Biological Chemistry.** v. 281, n. 51, p. 39316-39329, 22 dez. 2006.
- DORSEY, C. H. *et al.* Ultrastructure of the *Schistosoma mansoni* cercaria. **Micron,** v. 33, p. 279-323, 2002.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research.** v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 8 mar. 2004.
- ELBASHIR, S. M. *et al.* Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. **The EMBO Journal.** v. 20, n. 23, p. 6877-6888, 2001.
- FAN, P. C; KANG, Y. C. Egg production capacity of one-pair worms of *Schistosoma japonicum* in albino mice. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health.** v. 34, p. 708-712, 2003.
- FELSENSTEIN, Joseph. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. **Journal of Molecular Evolution.** v. 17, n. 6, p. 368–376, nov. 1981.
- FIRE, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature.** v. 391, 19 fev. 1998.
- FOSTER, L. A.; BOGITSH, B. J. Utilization of the heme moiety of hemoglobin by *Schistosoma mansoni* schistosomules in vitro. **J Parasitol.** v. 72, 1986.
- FRIPP, P. J. The sites of (1-14C) glucose assimilation in *Schistosoma haematobium*. **Comp Biochem Physiol.** v. 23, 1967.
- GENTILE, R. *et al.* The Role of Wild Rodents in the Transmission of *Schistosoma*

mansoni in Brazil. Em: ROKNI, M. B. **Schistosomiasis**. Londres: InTechOpen. 2012.

GHONEIM, H.; KLINKERT, M. Biochemical Properties of Purified Cathepsin B from *Schistosoma mansoni*. **International Journal of Parasitology**. v. 25, n. 12, p. 1515-1519, 1995.

GU, Z.; EILS, R.; SCHLESNER, M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. **Bioinformatics**. v. 32, p. 2847–2849, 2016.

GUI, M. *et al.* *Schistosoma japonicum* and *S. mansoni* comparison of larval migration patterns in mice. **Journal of Helminthology**. v. 69, n. 1, 1995.

HAAS, W. *et al.* *Schistosoma mansoni* cercariae: stimulation of acetabular gland secretion is adapted to the chemical composition of mammalian skin. **The Journal of Parasitology**. v. 83, p. 1079-1085, 1997.

HALL, S. L. *et al.* Insights into blood feeding by schistosomes from a proteomic analysis of worm vomitus. **Mol Biochem Parasitol**. v. 179, 2011.

HAMMOND, S. M. *et al.* Argonaute2, a Link Between Genetic and Biochemical Analyses of RNAi. **Science**. v. 293, 10 ago. 2001.

HAMS, E. *et al.* The *Schistosoma* granuloma: friend or foe? **Frontiers in Immunology**. v. 4, n. 89, abr. 2013.

HIATT, R. A. *et al.* Factors in the Pathogenesis of Acute Schistosomiasis Mansoni. **The Journal of infectious Diseases**. v. 139, n. 6, jun. 1979.

HOTEZ, P. J. *et al.* Review series Helminth infections: the great neglected tropical diseases. v. 118, n. 4, p. 1311–1321, 2008.

HOTEZ, P. J. *et al.* Advancing a vaccine to prevent hookworm disease and anemia. **Vaccine**. v. 34, p. 3001-3005, 2016.

ITTIPRASERT, W. *et al.* Programmed genome editing of the omega-1 ribonuclease of the blood fluke, *Schistosoma mansoni*. **eLife**. v. 8, n. e41337, 15 jan. 2019.

JIANG, J. *et al.* *Schistosoma mansoni*: the glucose transport protein SGTP4 is present in tegumental multilamellar bodies, discoid bodies, and the surface lipid bilayers. **Exp Parasitol**. v. 82, 1996.

KANSKY, M. *et al.* Chapter 4. Peptidases of trematodes. **Adv Parasitol**. v. 69, 2011.

KING, C. H.; DANGERFIELD-CHA, M. The unacknowledged impact of chronic schistosomiasis. **Chronic Illness**, v. 4, n. 1, p. 65–79, mar. 2008.

KOLDE, R. Pheatmap: Pretty heatmaps. 2015. Disponível em: <<https://rdrr.io/cran/pheatmap/>>. Acesso: 1 ago. 2021.

KRAUTZ-PETERSON, G. *et al.* Suppressing glucose transporter gene expression in schistosomes impairs parasite feeding and decreases survival in the mammalian host. **PLoS Pathog.** v. 6, 2010.

KUMAR, Sudhir *et al.* MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Molecular Biology and Evolution.** v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 1 jun. 2018

LAWRENCE, J. D. The ingestion of red blood cells by *Schistosoma mansoni*. **J Parasitol.** n. 59, 1973.

LAWSON, J. R.; WILSON, R. A. The survival of the cercariae of *Schistosoma mansoni* in relation to water temperature and glycogen utilization. **Parasitology.** v. 81, p. 337-348, 1980.

LE CLEC'H, W. *et al.* Genetic analysis of praziquantel response in schistosome parasites implicates a Transient Receptor Potential channel. **Sci Transl Med.** v. 13, n. 625, 22 dez. 2021.

LEE, Y. *et al.* MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. **The EMBO Journal.** v. 21, n. 17, p. 4663-4670, 2002.

LEIPPE, D. M. *et al.* A bioluminescent assay for the sensitive detection of proteases. **BioTechniques.** V. 51, n. 2, 3 abr. 2018.

LEONTOVYC, A. *et al.* SmSP2: A serine protease secreted by the blood fluke *Schistosoma mansoni* with anti-hemostatic properties. **PLoS Negl Trop Dis.** v. 12, n. 4, 20 abr. 2018.

Li, X. H. *et al.* The schistosome oesophageal gland: initiator of blood processing. **PLoS Negl Trop Dis.** v. 7, 2013.

LIANG, S. *et al.* Polyethyleneimine Mediated DNA Transfection in Schistosome Parasites and Regulation of the WNT Signaling Pathway by a Dominant-Negative SmMef2. **PLOS Neglected Tropical Diseases.** v. 7, n. 7, p. 1-12, jul. 2013.

LIU, S. *et al.* Expression Profile of the *Schistosoma japonicum* Degradosome Reveals Differential Protease Expression Patterns and Potential Anti-schistosomal Intervention Targets. **PLOS Computational Biology.** v. 10, n. 10, out. 2014.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time Quantitative PCR and the 2-11CT method. **Methods.** v. 25, 2001.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biol.** v. 15, p. 1–21, 2014.

LOZZI, S. P. *et al.* Involvement of regional lymph nodes after penetration of *Schistosoma mansoni* cercariae in naïve and infected mice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** v.

91, n. 4, 1996.

MCCARTHY, E. *et al.* Leucine aminopeptidase of the human blood flukes, *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. **Int J Parasitol.** v. 34, 2004.

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, jan. 2012.

MATI, V. L.; MELO, A. L. Current applications of oogram methodology in experimental schistosomiasis; fecundity of female *Schistosoma mansoni* and egg release in the intestine of ARK/J mice following immunomodulatory treatment with pentoxifylline. **J. Helminthol.** v. 87, n. 1, p. 115-124, mar. 2013.

MEISTER, I. *et al.* Development and Validation of an enantioselective LC-MS/MS method for the analysis of the anthelmintic drug praziquantel and its main metabolite in human plasma, blood and dried blood spots. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.** v. 118, p. 81-88, 2016.

MILLER, P.; WILSON, R. A. Migration of schistosomula of *Schistosoma mansoni* from the lungs to the hepatic portal system. **Parasitology.** v. 80, n. 2, 1980.

MINH, BUI QUANG; NGUYEN, MINH ANH THI; VON HAESELER, A. Ultrafast Approximation for Phylogenetic Bootstrap. **Molecular Biology and Evolution.** v. 30, n. 5, p. 1188–1195, 1 mai. 2013.

MIRANDA, G. S. *et al.* The wild water-rats and their relevance in the context of schistosomiasis mansoni in Brazil: what we know and recommendations for further research. *Helminthologia.* v. 54, n. 2, 2017.

MOORE, D. V.; SANDGROUND, J. H. The relative egg producing capacity of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. **American Journal of Tropical and Medical Hygiene.** v. 5, n. 1, 1 set. 1956.

MORAES, J.; GEARY, T. G. FDA-Approved Antiparasitic Drugs in the 21st Century: A Success for Helminthiasis? **Trends in Parasitology.** v. 36, n. 7, 2020.

MORALES, M. E. *et al.* RNA interference of *Schistosoma mansoni* cathepsin D, the apical enzyme of the hemoglobin proteolysis cascade. **Molecular and Biochemical Parasitology.** v. 157, n. 2, p. 160-168, fev. 2008.

MORRIS, G. P. Fine structure of the gut epithelium of *Schistosoma mansoni*. **Experientia.** v. 24, 1968.

MOTULSKY, H. J.; BROWN, R. E. Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression - a new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate. **BMC Bioinformatics.** v. 7, n. 123, 2006.

MOUAHID, G. Transplantation of schistosome sporocysts between host snails: A video guide. **Wellcome Open Research**. v. 3, n. 3, 07 fev. 2018.

MOURÃO, M. M. *et al.* Phenotypic Screen of Early-Developing Larvae of the Blood Fluke, *Schistosoma mansoni*, using RNA Interference. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v. 3, n. 8, 11 ago. 2009.

MULLARD, A. FDA drug approvals. **Nat. Rev. Drug Discov.** v. 19, 2020.

MULLARD, A. FDA drug approvals. **Nat. Rev. Drug Discov.** v. 18, 2019.

NASCIMENTO, G. L. *et al.* The cost of a disease targeted for elimination in Brazil: the case of schistosomiasis mansoni. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 114, 2019.

NEI, M. Gene Duplication and Nucleotide Substitution in Evolution. **Nature**. v. 221, 4 jan. 1969.

NELWAN, M. L. Schistosomiasis: Life Cycle, Diagnosis, and Control. **Current Therapeutic Research**. v. 91, p. 5-9, 2019.

NGUYEN, LAM-TUNG *et al.* IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**. v. 32, n. 1, p. 268–274, jan. 2015.

OKONECHNIKOV, K.; *et al.* Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. **Bioinformatics**. v. 28, p. 1166-1167, 2012.

OLIVEIRA, M. F. *et al.* Structural and morphological characterization of hemozoin produced by *Schistosoma mansoni* and *Rhodnius prolixus*. **FEBS Lett**. v. 579, 2005.

PARK, S. K., & MARCHANT, J. S. The Journey to Discovering a Flatworm Target of Praziquantel: A Long TRP. **Trends in Parasitology**, n. 36, v. 2, p. 182–194, 2020.

PELLEGRINO, J.; SIQUEIRA, A. F. Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infectadas. **Rev Bras Malariol**. v.8, p. 589-97, 1956.

PRATA, A. Fatores determinantes das formas anátomo-clínicas e evolução da esquistossomose. Em: CASTRO, F. P. *et al.* **Tópicos em Gastroenterologia**. Rio de Janeiro: Medi, 1991.

PRATA, A. **Biópsia retal na esquistossomose mansoni. Bases e aplicações no diagnóstico e no tratamento**. 197. 197 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Infectologia, Universidade Federal de São Paulo. São Paulo, 2010.

PROTASIO, A. V. *et al.* A Systematically Improved High Quality Genome and Transcriptome of the Human Blood Fluke *Schistosoma mansoni*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v. 6, n. 1, p. e1455, 10 jan. 2012.

RASO, P.; NEVES, J. Contribuição ao conhecimento do quadro anatômico do fígado na forma toxêmica da esquistossomose mansônica através de punções-biópsias. **Anais da Faculdade de Medicina de Minas Gerais**. v. 5, p. 147-165, 1965.

R CORE TEAM. A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. 2021. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>> Acesso em: 01 ago. 2021.

RAWLINGS, N. D. *et al.* Evolutionary families of peptidases. **Biochem. J.** n. 209, p. 205-218, 1993.

RAWLINGS, N. D. *et al.* MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, v. 36, 8 nov. 2007.

RINALDI, G. *et a.* Genetic Manipulation of *Schistosoma haematobium*, the Neglected Schistosome. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v. 5, n. 10, 11 out. 2011.

REY, L. Non-human vertebrate hosts of *Schistosoma mansoni* and schistosomiasis transmission in Brazil. **Res Rev Parasitol**. v. 53, n. 1, 1996.

REYNOLDS, A. *et al.* Induction of the interferon response by siRNA in cell type- and duplex length-dependent. **RNA**. v. 12, n.6, jun. 2006.

RODRIGUES, J. G. M. Alterations in blood glucose concentration in wild rodents, *Holichilus sciurens*, naturally infected with *Schistosoma mansoni*. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**. v. 31, n. 2, 2022.

SALADIN, K. S. *Schistosoma mansoni*: cercarial responses to irradiance changes. **The Journal of Parasitology**. v. 68, p. 120-124, 1982.

SATIJA, R., *et al.* Spatial reconstruction of single-cell gene expression data. **Nat. Biotechnol.** v. 33, p. 495–502, 2015.

SCHREIBER, F. G.; SCHUBERT, M. Experimental infection of the snail *Australorbis glabrata* with the trematode *Schistosoma mansoni* and the production of cercariae. **Journal of Parasitology**. v. 35, p. 91-100, 1949.

SENF, A. W. Observations on the physiology of the gut of *Schistosoma mansoni*. In: Bossche HVd, editor. **The biochemistry of parasites and host parasite relationships**. Oxford: North-Holland Publishing Co. 1976.

SILVA, L. L. *et al.* Evolutionary histories of expanded peptidase families in *Schistosoma mansoni*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 107, n. 7, p. 864-877, nov. 2011.

SIQUEIRA, L. P. Schistosomiasis: Drugs used and treatment strategies. **Acta Tropica**. v. 176, p. 179-187, dez. 2017.

SKELLY, P. J. *et al.* Cloning, characterization, and functional expression of cDNAs

encoding glucose transporter proteins from the human parasite *Schistosoma mansoni*. **J. Biol. Chem.** v. 269, 1994.

SKELLY, P. J.; SHOEMAKER, C. B. Rapid appearance and asymmetric distribution of glucose transporter SGTP4 at the apical surface of intramammalian-stage *Schistosoma mansoni*. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 93, 1996.

SKELLY, P. J. *et al.* Glucose transport and metabolism in mammalian-stage schistosomes. **Parasitol. Today.** v. 14, 1998.

SKELLY, P. J. *et al.* Suppression of cathepsin B expression in *Schistosoma mansoni* by RNA interference. **International Journal for parasitology.** v. 33, p. 363-369, 2003.

SMYTH, D. J. *et al.* Two isoforms of a divalent metal transporter (DMT1) in *Schistosoma mansoni* suggest a surface-associated pathway for iron absorption in schistosomes. **J Biol Chem.** v. 281, 2006.

SODERO, A. *et al.* Mecanismo catalítico e estado de protonação do sítio ativo de aspartil proteases pepsina-símiles. **Rev. Virtual Quim.**, p. 128-137, 8 abr. 2009.

SPENCE, I. M.; SILK, M. H. Ultrastructural studies of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. The digestive system. **S Afr J Med Sci.** v. 35, 1970.

STEFANIC, S. *et al.* RNA Interference in *Schistosoma mansoni* Schistosomula: Selectivity, Sensitivity and Operation for Larger-Scale Screening. **PLoS Negl Trop Dis.** v. 4, n. 10, 19 out. 2010.

STIREWALT, M. A. *Schistosoma mansoni*: cercaria to schistosomule. **Advances in Parasitology.** v. 12, p. 115-182, 1974.

STIREWALT, M. A.; HACKEY, J. R. Penetration of host skin by cercariae of *Schistosoma mansoni*. I observed entry into skin of mouse, hamster, rat, monkey and man. **The Journal of Parasitology.** v. 42, n. 6, p. 565-580, dez. 1956.

STÖVER, B. C.; MÜLLER, K. F. TreeGraph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. **BMC Bioinformatics.** v. 11, n. 1, p. 7, 5 dez. 2010.

SYMMERS, W. S. T. C. Note on a new form of liver cirrhosis due to the presence of the ova of *Bilharzia haematobia*. **Journal of Pathology and bacteriology.** v. 9, 1904.

TABARA, H. *et al.* RNAi in *C. elegans*: Soaking in the Genome Sequence. **Science.** v. 282, p. 430-431, out. 1998.

TAVARES, N. C. *et al.* *Schistosoma mansoni* FES Tyrosine Kinase Involvement in the Mammalian Schistosomiasis Outcome and Miracidia Infection Capability in *Biomphalaria glabrata*. **Front. Microbiol.** v. 11, n. 963, p. 1 – 12, 2020.

TAVARES, N. C.; MOURÃO, M. M. Parasitemia Evaluation in Mice Infected with

Schistosoma mansoni. **Bio-protocol**. v. 11, n. 10, p. 1-17, 2021.

TIMMS, A. R.; BUEDING, E. Studies of a proteolytic enzyme from *Schistosoma mansoni*. **Brit. J. Pharmacol.** v. 14, n. 68, 1959.

THERON, A. *et al.* Molecular ecology of *Schistosoma mansoni* transmission inferred from the genetic composition of larval and adult infrapopulations within intermediate and definitive hosts. **Parasitology**. v. 129, p. 571-585, 2004.

THÉRON, A. Dynamics of larval populations of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata* II. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**. v. 75, n. 5, p. 547-554, 1981.

THÉTIOT-LAURENT, S. A.-L. *et al.* Schistosomiasis Chemotherapy. **Medical Chemistry**. v. 52, p. 7936-7956, 2013.

THOMAS, C. M.; TIMSON, D. J. The mechanism of action of praziquantel: six hypotheses. **Curr. Trop. Med. Chem.** v. 18, n. 18, p. 1575-1584, 2018.

TIMMONS, L. *et al.* Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. **Gene**. v. 263, p. 103-112, 2001.

TSAI, I. J. *et al.* The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. **Nature**. v. 496, p. 57-63, 4 abr. 2013.

TORT, J. *et al.* Proteinases and associated genes of parasitic helminths. **Adv Parasitol.** v. 43, 1999.

VIANA, M. *et al.* The effects of subcurative praziquantel treatment on life-history traits and trade-offs in drug-resistant *Schistosoma mansoni*. **Evolutionary Applications**. v. 11, p. 488-500, 2018.

VERITY, C. K. Vaccine efficacy of recombinant cathepsin D aspartic protease from *Schistosoma japonicum*. **Parasite Immunol.** v. 23, 2001.

WAGNER, G. P. *et al.* The road to modularity. **Nature Reviews Genetics**. v. 8, p. 921-931, 2007.

WANG, B. *et al.* Functional genomic characterization of neoblast-like stem cells in larval *Schistosoma mansoni*. **eLife**. v. 2013, n. e00768, 2013.

WANG, S. *et al.* Gene Duplication Analysis Reveals No Ancient Whole Genome Duplication but Extensive Small-Scale Duplications during Genome Evolution and Adaptation of *Schistosoma mansoni*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 7, n. 412, 21 set. 2017.

WANGWIWATSIN, A. *et al.* Transcriptome of the parasitic flatworm *Schistosoma mansoni* during intra-mammalian development. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 14, n. 5, 6 mai. 2020.

WENDT, G. *et al.* A single-cell RNA-seq atlas of *Schistosoma mansoni* identifies a key regulator of blood feeding. **Science**. v. 369, p. 1644–1649, 2020.

WHEATER, P. R.; WILSON, R. A. *Schistosoma mansoni*: a histological study of migration in the laboratory mouse. **Parasitology**. v. 79, 1979.

WILSON, R. A. Cercariae to liver worms: development and migration in the mammalian host. Em: ROLLINSON, D.; SIMPSON, A. J. G. **The Biology of Schistosomes: from genes to latrines**. Londres: Academic Press, 1987.

WONG, J. Y. M. *et al.* Schistosomes express two forms of cathepsin. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1338, p. 156-160, 4 abr. 1997.

ZHANG, D. *et al.* PhyloSuite: An integrated and scalable desktop platform for streamlined molecular sequence data management and evolutionary phylogenetics studies. **Molecular Ecology Resources**. v. 20, n. 1, p. 348–355, 6 jan. 2020.

ZHONG, C. *et al.* Immunolocalization of a *Schistosoma mansoni* facilitated diffusion glucose transporter to the basal, but not the apical, membranes of the surface syncytium. **Parasitology**. v. 110, 1995.

ZUSSMAN, R. A. *et al.* The role of ingested hemoglobin in the nutrition of *Schistosoma mansoni*. **J Parasitol**. n. 56, 1970.

ANEXOS

ANEXO I - LICENÇA LW-12/16



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz

 Vice-presidência de Pesquisa e
 Laboratórios de Referência

**Comissão de Ética
 no Uso de Animais**

LICENÇA

LW-12/16

Certificamos que o protocolo (P-22/15-3), intitulado "Triagem e validação de genes alvos para o desenvolvimento de novas drogas contra esquistossomose", sob a responsabilidade de MARINA DE MORAES MOURAO, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 02/05/2020 e inclui o uso total de :

Mesocricetus auratus

- 279 Fêmeas de Golden, Idade: 6 Semana(s), Peso: 120,000 Grama(s).

Rio de Janeiro, 2 de maio de 2015

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA

ANEXO II - LICENÇA LM-5/18



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz

Vice-Presidência de Pesquisa e
 Coleções Biológicas - VPPCB



Comissão de Ética
 no Uso de Animais

LICENÇA

LM-5/18

Certificamos que o protocolo (P-29/17.2), intitulado "**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E VALIDAÇÃO DE GENES DO PARASITO *Schistosoma mansoni***", sob a responsabilidade de **MARIANA DE MORAES MOURÃO** atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 16/04/2022 e inclui o uso total de:

Mus musculus

- 1.400 fêmeas *Swiss webster*, idade: 4 semanas, peso: 20 gramas;

Rio de Janeiro, 08 de maio de 2018.

Etelcia Moraes Molinaro

Vice-Coordenadora da CEUA/FIOCRUZ

Etelcia M. Molinaro
 Vice - Coordenadora
 CEUA/FIOCRUZ
 SIAPE 0463096