

Fabiano Carlos Pinto de Abreu

**Expressão de microRNAs em formas larvais e adultas de
*Schistosoma mansoni***

Ouro Preto - MG, Fevereiro de 2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

IBBM

**Expressão de microRNAs em formas larvais e adultas de
*Schistosoma mansoni***



AUTOR: FABIANO CARLOS PINTO DE ABREU

ORIENTADORA: PROF^ª. DR^ª. RENATA GUERRA DE SÁ COTA

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação do Núcleo de Pesquisa em Ciências Exatas e Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia, área de concentração Genômica e Proteômica.

Ouro Preto - MG, Fevereiro de 2014

A162e Abreu, Fabiano Carlos Pinto de.

Expressão de microRNAs em formas larvais e adultas de *Schistosoma mansoni* / Fabiano Carlos Pinto de Abreu [manuscrito] – 2014.
vii, 88f. : il. color., graf., tabs, mapas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Renata Guerra de Sá Cota.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia.

Área de concentração: Genômica e Proteômica.

1. MicroRNA – Teses. 2. *Schistosoma mansoni* – Teses. 3. Fosforilação - Teses.
4. Genes - Teses. 5. Sistema ubiquitina-proteassoma – Teses. I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 575.113

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br



Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

“Expressão de microRNAs em formas larvais e adultas de *Schistosoma mansoni*”

Aos quatorze dias do mês de fevereiro de 2014, às 14h00min, na Sala de Seminários do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação do aluno **Fabiano Carlos Pinto de Abreu**. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pelo candidato e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por APROVAR o candidato. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

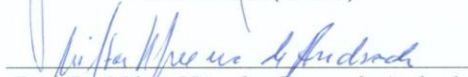
Membros da Banca Examinadora:



Profa. Dra. Renata Guerra de Sá Cota
Presidente



Profa. Dra. Diana Bahia
Examinadora (UFMG)



Prof. Dr. Milton Hércules Guerra de Andrade
Examinador (UFOP)

DATA DA DEFESA: **14/02/2014**



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
NUPEB – ICEB II – sala 49 | Universidade Federal de Ouro Preto
Campus Universitário Morro do Cruzeiro | CEP 35.400-000 – Ouro Preto – MG – Brasil
Tel: 55 (31) 3559 1680 | E-mail: biotec@nupeb.ufop.br | www.nupeb.ufop.br/biotec

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular NUPEB/ICEB/UFOP, com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e FAPEMIG, processo CBB APQ 02101/11.

AGRADECIMENTOS

A Deus;

Aos meus pais, Antônio e Rosângela, por me apoiarem em todos os momentos da minha vida e por me ensinarem a nunca desistir de minhas metas;

Agradeço principalmente ao meu pai, que é o maior exemplo de que com muito esforço e persistência, sem medir esforços, podemos alcançar nossos sonhos;

À minha irmã, Fabíola, pelo apoio e companheirismo;

À minha afilhada, Isabella, que faz meus dias muito mais felizes;

A todos os familiares que me apoiaram e sempre acreditaram no meu esforço e potencial;

À Prof^ª. Dr^ª. Renata Guerra de Sá Cota, por ter me dado essa grande oportunidade, pelos ensinamentos, profissionalismo, companheirismo, bons momentos, e por ter contribuído para a minha formação acadêmica e pessoal;

Aos professores doutores William, Leandro e Elísio, pelo ótimo convívio e ensinamentos;

Ao Prof^º Dr^º. Matheus pela contribuição ao meu trabalho e disponibilidade de sempre ajudar quando necessário;

Aos meus grandes amigos, Yan e Jéssica, pela enorme amizade, consideração e apoio sempre.

À Ana Luíza, pelo companheirismo, sempre me incentivando e torcendo, e também pela paciência e preocupação nas horas difíceis.

Ao meu amigo de república João, pelos ótimos momentos, companheirismo, paciência, amizade, apoio e bom humor em todas as horas.

Aos meus amigos Bijay, Deena, Hellem e Suianne por todos os momentos divertidos que me proporcionaram, pela amizade, apoio e preocupação.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBBM): Roberta, Victor, Karina, Natália, Ester, Soraya, Érica, Marcela, Regina, Priscila, Nayara....Especialmente à Roberta, Victor e Karina, pela grande contribuição profissional e pessoal. Muito Obrigado!

Aos que já passaram pelo LBBM: Cíntia, Walmir, Andréia, Kelvin, Isabel e Raquel;

Aos técnicos Eduardo e Ezequiel pelo auxílio;

A todos os Laboratórios do NUPEB que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho;

Ao Laboratório de Malacologia do Centro de Pesquisas René Rachou (FIOCRUZ-MG) por fornecer cercárias, especialmente à Prof^a Dr^a Liana e Prof^o Dr^o Élio Babá;

E a todos que contribuíram e apoiaram na realização deste trabalho.

“As grandes ocasiões fazem grande o mais vulgar dos homens, porém só é grande aquele cujo caráter é sempre grande, sempre igual em todos os momentos.”

“Agi! Despertai! E não vos detenhais até alcançar a meta!”

.

[Swami Vivekananda]

Sumário

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iv
ABREVIATURAS E SIGLAS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Histórico e epidemiologia da Esquistossomose.....	2
1.2. Ciclo de vida de <i>S. mansoni</i>	4
1.3. Genoma de <i>S. mansoni</i>	7
1.4. Regulação da expressão gênica em <i>S. mansoni</i>	8
1.5. microRNAs	11
1.6. miRNAs no gênero <i>Schistosoma</i>	15
2. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivo Geral	18
2.2. Objetivos Específicos	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1. Análises “ <i>in silico</i> ” dos miRNAs	20
3.1.1. Busca por homologia no miRBase.....	20
3.1.2. Características estruturais dos miRNAs	20
3.1.3. Predição dos possíveis alvos de miRNAs no genoma de <i>S. mansoni</i>	21
3.1.4. Categorização funcional dos alvos.....	22
3.2. Caracterização Experimental de miRNAs	22
3.2.1. Obtenção dos Parasitas.....	22
3.2.2. Esquistossômulos transformados mecanicamente	23
3.2.3. Análise da expressão gênica de miRNAs por qRT-PCR.....	25
3.3. Caracterização dos perfis de expressão de miRNAs no ciclo de vida de <i>S. mansoni</i> ..	25
3.3.1. Extração do RNA total enriquecido com miRNAs	25
3.3.2. Oligonucleotídeos iniciadores (<i>Primers</i>).....	26
3.3.3. Síntese da primeira fita de DNA (cDNA)	27
3.3.4. Expressão dos miRNAs a partir de PCR quantitativa em Tempo Real (qRT-PCR).....	29
3.3.5. Verificação dos produtos amplificados (<i>amplicons</i>).....	30

3.3.6.	Análise da curva de dissociação dos <i>amplicons</i>	30
3.3.7.	Análises estatísticas	31
3.3.8.	Critérios para a caracterização da expressão dos miRNAs	31
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1.	Conservação e características estruturais de miRNAs de <i>S. mansoni</i>	34
4.2.	Caracterização da expressão gênica de miRNAs de <i>S. mansoni</i>	39
4.3.	Análise funcional <i>in silico</i> – Predição e categorização de alvos dos miRNAs	45
4.3.1.	Predição de alvos e rede de interação miRNA-mRNA	45
4.3.2.	Categorização funcional dos alvos.....	50
4.3.3.	miRNAs envolvidos na regulação do processo de fosforilação oxidativa em <i>S. mansoni</i>	53
4.3.4.	miRNAs envolvidos na regulação do sistema ubiquitina-proteassoma em <i>S. mansoni</i>	58
4.3.5.	Outro alvos regulados por miRNAs em <i>S. mansoni</i>	61
5.	CONCLUSÃO	64
6.	PERSPECTIVAS	66
7.	ANEXOS	68
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição mundial da esquistossomose. Áreas, países endêmicos e incidência da esquistossomose (adaptado de WHO, 2012).

Figura 2: Áreas endêmicas da esquistossomose mansônica no Brasil. Prevalência da doença por município (Extraído: Amaral RS, Taiuil, Lima DD, Engels D 2006. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 101 (Supl. I): 79-85).

Figura 3: Ciclo de vida do parasita *S. mansoni*. No hospedeiro definitivo, os esquistossômulos (A) dão origem aos vermes adultos (B), os quais se acasalam e produzem ovos (C) que são liberados no ambiente aquático. Os ovos maduros eclodem liberando os miracídeos (D), que penetram nos caramujos, originando os esporocistos (E). Os esporocistos se diferenciam em cercárias (F) que são liberadas em água, infectando o hospedeiro vertebrado e fechando o ciclo.

Figura 4: Expressão gênica estágio-específica em *S. mansoni* e *S. japonicum*. A figura representa um conjunto de genes diferencialmente expressos durante o desenvolvimento dos parasitas, baseados no projeto de seu transcissoma (Han *et al.*, 2009).

Figura 5: Classificação dos miRNAs de acordo com sua localização no genoma. Os miRNAs podem estar localizados em regiões intergênicas, sendo denominados miRNAs intergênicos, e podem estar localizados em regiões intrônicas de genes codificadores de RNA ou proteína, sendo chamados de miRNA intrônicos ou mirtrons. Ainda, os dois tipos de miRNAs podem estar organizados em clusters (adaptado de Kapinas e Delany (2011)).

Figura 6: Biogênese dos miRNAs. A biogênese dos miRNAs acontece em várias etapas. A via canônica dos miRNAs intergênicos acontece a partir da transcrição do gene do miRNA, gerando um pri-miRNA que será processado pela enzima Drosha, liberando uma estrutura em grampo, o pre-miRNA. O pre-miRNA é translocado para o citoplasma pela Exportina 5, onde sofre outro processamento pela enzima Dicer, gerando o duplex de miRNA. O Complexo RISC interage com o miRNA maduro selecionado e o direciona até o mRNA alvo, onde ocorre a inibição da tradução ou degradação do mRNA através da interação de pares de bases miRNA-mRNA. A via não canônica, descrita para miRNA intrônicos, ocorre a partir da transcrição do gene que hospeda o miRNA, e posterior excisão da sequência que formará o pre-miRNA por splicing. O pre-miRNA então segue o mesmo caminho da via canônica. (Adaptado de Heman-Ackah *et al.* (2013)).

Figura 7: Esquistossômulos cultivados *in vitro*. Os esquistossômulos foram cultivados por 24 horas em estufa de CO₂ 5% a 37°C em meio 169 (Gomes, 2008).

Figura 8: Análise da integridade do RNA. Foram analisados 5µg de RNA total referente a cada estágio analisado, através da técnica de eletroforese em gel de agarose a

2,0%. CER- cercária; E 3,5 H- esquistossômulo no tempo de 3,5 horas; E 24H – esquistossômulo no tempo de 24 horas; OVO – estágio de ovo; V.A – verme adulto.

Figura 9: Síntese de cDNA a partir de miRNA. Inicialmente as moléculas de miRNA sofrem poliadenilação em sua extremidade 3. Um primer oligo-dT fornecido pelo kit é utilizado para sintetizar a fita de cDNA. Esse cDNA posteriormente será submetido ao primeiro ciclo da reação de PCR ao qual o primer específico do miRNA de interesse é utilizado. Os ciclos seguintes ocorrem a partir do primer específico e de um primer universal complementar à sequência da “etiqueta universal” fornecido pelo kit (Adaptado de miScript II RT Kit – QIAGEN).

Figura 10: Curva de dissociação do *sma-miR-new_4-5p*. A curva de dissociação característica é representada com apenas um pico de amplificação.

Figura 11: Estrutura secundária predita do miRNA *sma-miR-new_12*. A estrutura secundária do *sma-miR-new_12* adota uma forma de grampo e pode originar dois miRNAs maduros a partir das sequências localizadas no braço 3p e 5p do precursor.

Figura 12: Perfis de expressão dos miRNAs *sma-miR-2162-3p*, *sma-miR-new_2-5p* e *sma-miR-new_16-3p* durante o ciclo de vida de *S. mansoni*. Os níveis de expressão foram avaliados baseados em 3 réplicas biológicas durante os seguintes estágios: cercária, esquistossômulos mecanicamente transformados (EMT- 3,5 h e EMT-24h), vermes adultos e ovos usando qRT-PCR. Os níveis de expressão foram calibrados de acordo com o método $2^{-\Delta Ct}$. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de ANOVA *oneway* (Tukey) com $p < 0,05$. Sinais de diferenças estatísticas: * diferente de cercaria, ** diferente de EMT-3.5 h, *** diferente de EMT-24 h, # diferente de verme adulto.

Figura 13: Perfis de expressão dos miRNAs *sma-miR-new_12-5p* e *sma-miR-new_13-5p* durante o ciclo de vida de *S. mansoni*. Os níveis de expressão foram avaliados baseados em 3 réplicas biológicas durante os seguintes estágios: cercária, esquistossômulos mecanicamente transformados (EMT- 3,5 h e EMT-24h), vermes adultos e ovos usando qRT-PCR. Os níveis de expressão foram calibrados de acordo com o método $2^{-\Delta Ct}$. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de ANOVA *oneway* (Tukey) com $p < 0,05$. Sinais de diferenças estatísticas: * diferente de cercaria, ** diferente de EMT-3.5 h, *** diferente de EMT-24 h, # diferente de verme adulto.

Figura 14: Perfis de expressão dos miRNAs *sma-miR-250*, *sma-miR-92a* e *sma-miR-new_4-3p* e *sma-miR-new_4-5p* durante o ciclo de vida de *S. mansoni*. Os níveis de expressão foram avaliados baseados em três réplicas biológicas durante os seguintes estágios: cercária, esquistossômulos mecanicamente transformados (EMT- 3,5 h e EMT-24h), vermes adultos e ovos usando qRT-PCR. Os níveis de expressão foram calibrados de acordo com o método $2^{-\Delta Ct}$. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de ANOVA *oneway* (Tukey) com $p < 0,05$. Sinais de diferenças estatísticas: * diferente de cercaria, ** diferente de EMT-3.5 h, *** diferente de EMT-24 h, # diferente de verme adulto.

Figura 15: Critérios de avaliação para caracterização experimental dos miRNAs.

A) Resultado Positivo – curva de dissociação do *sma-miR-250* apresentando pico definido, valor de ct dentro do intervalo aceito e presença de bandas única em gel de agarose referentes aos amplicons para cada estágio analisado. **B)** Resultado Negativo – curva de dissociação de *sma-miR-212* com picos inespecíficos, valor de ct acima do intervalo aceito e presença de bandas inespecíficas nos estágios de cercária, verme adulto e ovo.

Figura 16: miRNAs não caracterizados experimentalmente:

A) A análise dos amplicons em gel de agarose revelou a presença de produtos inespecíficos que provavelmente são dímeros de primers para os miRNAs *sma-miR-281*, *sma-miR-new_5-5p*, *sma-miR-new_8-5p* e *sma-miR-new_13-p*. **B)** Curva de dissociação dos miRNAs *sma-miR-new_5-5p* e *sma-miR-new_13-3p* dentro dos critérios estabelecidos.

Figura 17: Possibilidades de interação dos miRNAs com a região 3'UTR de mRNAs.

A) Dois miRNAs tendo o mesmo alvo em comum e se ligando a regiões 3'UTR distintas. **B)** O mesmo miRNA interagindo com diferentes regiões 3'UTR de um mesmo mRNA alvo. **C)** O mesmo miRNA interagindo com duas isoformas de um mesmo gene e se ligando na mesma região 3'UTR em ambas. **D)** O mesmo miRNA interagindo com duas isoformas de um gene e se ligando em regiões 3'UTR diferentes.

Figura 18: Rede de interação entre miRNA-mRNAs. A rede ilustra a interação miRNA-mRNA a partir dos valores de ΔG gerados. Quanto menor o valor de ΔG mais próximo o mRNA está do nó central que corresponde ao miRNA, representando maior força de interação entre eles.

Figura 19: Parte da rede de interação de miRNA-mRNA em zoom. Os miRNAs *sma-miR-new_13-3p* e *sma-miR-new_13-5p* compartilham um alvo, sugerindo que miRNAs 3p e 5p oriundos de um mesmo precursor podem apresentar alvos em comum.

Figura 20: Metabolismo energético aeróbico-anaeróbico durante o ciclo de vida de *S. mansoni*. Cercária apresenta metabolismo energético aeróbico (representado por coloração em preto), enquanto esquistossômulo apresenta metabolismo energético anaeróbico (representado em branco). Já os outros estágios apresentam metabolismo aeróbico ou anaeróbico facultativos.

Figura 21: miRNAs preditos envolvidos na regulação da fosforilação oxidativa em *S. mansoni*. Os miRNAs *sma-miR-new_2-5p*, *sma-miR-new_4-5p*, *sma-miR-new_12-5p* e *sma-miR-new_13-13p* regulam em nível pós-transcricional a expressão de genes que participam dos complexos enzimáticos e de proteínas acessórias na cadeia transportadora de elétrons que ocorre na membrana interna da mitocôndria. As entradas dos genes estão demonstradas na Tabela 10.

Figura 22: Perfil de expressão do *sma-miR-new_4-5p* e seu alvo *Sm β 1* durante os estágios de desenvolvimento de *S. mansoni*. O miRNA apresenta uma correlação negativa em sua expressão em relação ao seu alvo nos estágios de cercária e vermes adultos.

Figura 23: miRNAs preditos envolvidos na regulação do sistema ubiquitina-proteassoma. os miRNAs *sma-miR-new_2-5p*, *sma-miR-new_4-5p*, *sma-miR-new_12-5p*, *sma-miR-new_13-5p* atuam regulando genes envolvidos nos processos de ubiquitinação e na degradação de proteínas pelo proteassoma.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Meio 169 com seus componentes e concentração.

Tabela 2: Sequências dos *primers* referentes aos miRNAs maduros.

Tabela 3: Condições da reação de qRT-PCR.

Tabela 4: Análise “*in silico*” de miRNAs em *S. mansoni*.

Tabela 5: miRNAs precursores intrônicos e seus genes hospedeiros em *S. mansoni*.

Tabela 6: miRNAs e suas sequências precursoras em *S. mansoni*.

Tabela 7: Características estruturais e termodinâmicas dos miRNAs precursores de *S. mansoni*.

Tabela 8: miRNAs maduros que foram caracterizados experimentalmente no genoma de *S. mansoni* e seus alvos preditos.

Tabela 9: miRNAs e ontologia gênica de seus genes alvos que apresentam relevância biológica para *S.mansoni*

ABREVIATURAS E SIGLAS

BLASTn: do inglês, *Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool*

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTPs: Desoxirribonucleosídeos trifosfatados

EMT: Esquistossômulos mecanicamente transformados

ESTs: do inglês, *Expressed Sequence Tags*

Kb: Kilobases

MFE: Energia mínima livre

Mb: Megabases

miRNA: microRNA

mRNA: RNA mensageiro

NCBI: National Center for Biotechnology Information

nt: Nucleotídeos

PCR: do inglês, *Polymerase Chain Reaction*

pb: Pares de bases

pre-miRNA: microRNA precursor

pri-miRNA: microRNA maduro

qRT-PCR: do inglês, *Quantitative Reverse Transcription PCR*

RISC: do inglês, *RNA-induced silencing complex*

RT-PCR: do inglês, *Reverse Transcription PCR*

SAGE: do inglês, *Serial Analysis of Gene Expression*

UTR: Untranslated Region (Região não traduzida)

WHO: do inglês, *World Health Organization*

RESUMO

A esquistossomose é uma doença debilitante causada por platelmintos do gênero *Schistosoma*. Devido ao seu ciclo de vida complexo, posição evolutiva e dimorfismo sexual, o parasita *Schistosoma mansoni* é um modelo interessante para investigar mecanismos de regulação da expressão gênica. MicroRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNA endógeno que regulam a expressão gênica em nível pós-transcricional pela interação específica a RNA mensageiros alvos. O conhecimento atual de miRNAs em *S. mansoni* é limitado e baseado em predições computacionais e sequenciamento de nova geração a partir de bibliotecas de vermes adultos. No presente estudo, nós caracterizamos os perfis de expressão de nove microRNAs maduros nas formas larvais e adultas do parasita usando qRT-PCR. Além disso, foram identificados os genes alvos desses miRNAs utilizando abordagens computacionais. Nossos resultados mostraram padrões de expressão diferenciais para os miRNAs: *sma-miR-2162-3p*, *sma-miR-250*, *sma-miR-92a*, *sma-miR-new_2-5p*, *sma-miR-new_4-3p*, *sma-miR-new_4-5p*, *sma-miR-new_12-5p*, *sma-miR-new_13-5p* e *sma-miR-new-16-3p*. A análise computacional revelou alvos de miRNAs envolvidos em processos celulares importantes como a via de sinalização TGF- β , metabolismo de glicose e lipídeos, proteína Tetraspanina (TSP), proteína Catepsina B1 (CB1) e proteína VAL-6 (“Venom-allergen-like 6 protein”). Além disso, grande parte dos genes preditos estão envolvidos com o processo de fosforilação oxidativa, sugerindo que pelo menos em parte a expressão dos genes que codificam para subunidades do complexo NADH desidrogenase, citocromo c oxidase e ATP sintase são regulados por miRNAs. Observamos também, seis alvos associados ao sistema ubiquitina-proteassoma, sugerindo que esses miRNAs possam regular esse importante processo biológico no parasita. Tomados em conjunto, podemos concluir que os miRNAs analisados são diferencialmente expressos e atuam fortemente como reguladores da expressão gênica em nível pós-transcricional.

Palavras Chave: microRNA, *Schistosoma mansoni*, fosforilação oxidativa, sistema ubiquitina-proteassoma, genes alvos de miRNAs.

ABSTRACT

Schistosomiasis is a debilitating disease that is caused by Platyhelminths of the genus *Schistosoma*. Due to its complex life cycle, evolutionary position and sexual dimorphism, schistosomes can serve as an interesting model to investigate mechanisms of gene regulation. MicroRNAs (miRNAs) are short endogenous RNA molecules that regulate gene expression at the post-transcriptional level by targeting mRNA transcripts. Current knowledge of *Schistosoma mansoni* miRNAs is limited and is based on computational predictions and next-generation sequencing through adult worms libraries. In this study, we validated the expression profiles of thirteen mature miRNAs in different life cycle stages of the parasite using qRT-PCR and identified the miRNA target genes using a computational approach. Our results showed differential expression patterns of the miRNAs: *sma-miR-2162-3p*, *sma-miR-250*, *sma-miR-92a*, *sma-miR-new_2-5p*, *sma-miR-new_4-3p*, *sma-miR-new_4-5p*, *sma-miR-new_12-5p*, *sma-miR-new_13-5p* e *sma-miR-new-16-3p*. The computational analysis revealed miRNA target genes that are related to important biological processes, such as TGF- β signalling, glucose and lipid metabolism, tetraspanin protein (TSP), cathepsin B 1 protein (CB1) and Venom allergen-like 6 protein (VAL-6). Furthermore, most of the target genes that were found are linked to oxidative phosphorylation, suggesting that at least in part the expression of NADH dehydrogenase, cytochrome c oxidase e ATP synthase genes are regulated by microRNAs. We also observed six miRNA target genes that are involved in the proteasome-ubiquitin protein degradation pathway, suggesting that miRNAs can regulate this important biological process in the parasite. Together, our results lead us to conclude that the microRNAs analysed are differentially expressed and act in post-transcriptional regulation of genes.

Keywords: microRNA, *Schistosoma mansoni*, oxidative phosphorylation, proteasome-ubiquitin pathway microRNA target genes

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico e epidemiologia da Esquistossomose

A esquistossomose é uma doença crônico-debilitante endêmica em mais de 70 países de regiões tropicais e subtropicais, afetando atualmente mais de 240 milhões de indivíduos (Hotez *et al.*, 2008; Montresor *et al.*, 2012). Ela foi descoberta em 1851, pelo patologista alemão Theodor Bilharz, o qual identificou a presença de vermes adultos da espécie *Schistosoma haematobium* nas veias mesentéricas de um camponês egípcio que sofreu autópsia. Contudo, referências históricas indicam que ovos foram encontrados em múmias egípcias por volta de 3.500 a.C. Posteriormente, em 1902, o médico escocês Patrick Manson (Manson, 1902) observou diferenças morfológicas em ovos de *Schistosoma* africanos, indicando a existência de uma nova espécie, a qual foi descrita como *Schistosoma mansoni* em 1907 por Louis Sambon (Sambon, 1907).

Sendo considerada uma doença negligenciada, afetando principalmente comunidades pobres, sem água potável e saneamento básico, a esquistossomose ocupa o segundo lugar no ranking de doenças com maior impacto socioeconômico (Who, 2008). Aproximadamente 700 milhões de indivíduos vivem em áreas endêmicas e sua prevalência é maior no continente africano, onde estão 90% dos indivíduos infectados (**Figura 1**) (Utzinger *et al.*, 2011; Who, 2012). Dentre as 27 espécies conhecidas do gênero *Schistosoma*, sete podem infectar o homem desencadeando a doença, sendo estas: *S.mansoni*, *S. japonicum*, *S. haematobium*, *S. mekongi*, *S. intercalatum*, *S. guineensis* e *S. indicum* (Lawton *et al.*, 2011).

No Brasil prevalece apenas a espécie *S. mansoni*, ocasionando a esquistossomose mansônica, popularmente conhecida como barriga d'água. Acredita-se que o parasita foi trazido da África no século XVI, no período colonial, em decorrência do tráfico de escravos africanos portadores da doença, tendo como porta de entrada o nordeste brasileiro. O fluxo migratório aliado às condições ambientais propícias, falta de saneamento básico, larga distribuição dos hospedeiros invertebrados e falta de educação em saúde, garantiram a propagação da doença para outras regiões (Coura e Amaral, 2004). Somente em 1908, foi registrado o primeiro caso de infecção no Brasil pelo médico Pirajá da Silva (Pirajá Da Silva, 1908).

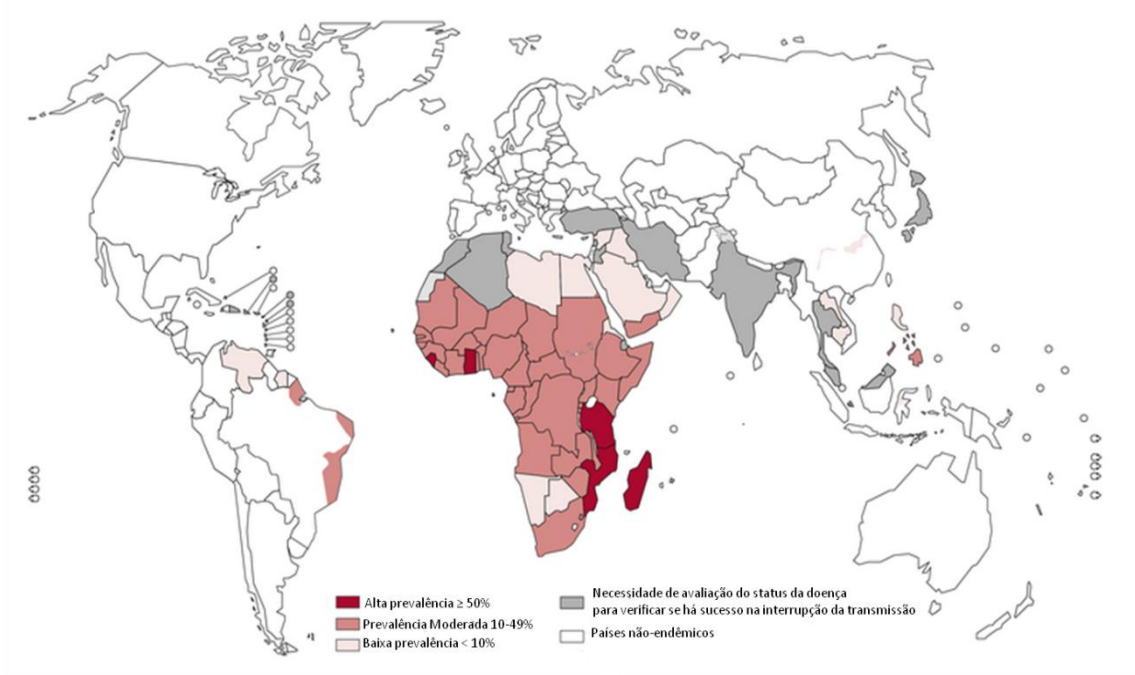


Figura 1 – Distribuição mundial da esquistossomose. Áreas, países endêmicos e incidência da esquistossomose (adaptado de WHO, 2012).

Os estudos epidemiológicos da esquistossomose no Brasil foram iniciados somente em 1940, pelo pesquisador Adolfo Frederico Simões Barbosa que posteriormente, na década de 50, dedicou ao estudo da doença através de pesquisas de campo, dando contribuições significativas sobre o conhecimento dos vetores, dinâmicas de transmissão, epidemiologia e estratégias de controle da mesma. Através de um inquérito nacional em 1950, foi relatada a existência da esquistossomose mansônica em 612 das 887 localidades pesquisadas por Pellon & Teixeira na região Nordeste e estado de Minas Gerais (Freitas, 1972; Coimbra, 1997).

Atualmente, estima-se que cerca de 6 milhões de indivíduos estão infectados e 25 milhões expostos ao risco de contaminação em 18 estados brasileiros e Distrito Federal. A esquistossomose está amplamente distribuída nas regiões Nordeste e Sudeste, enquanto nas regiões Sul e Sudeste os focos da doença se encontram mais dispersos e isolados (**Figura 2**). De acordo com o Ministério da Saúde, a doença é mais incidente nos estados da Bahia e Minas Gerais, os quais apresentam 70% dos casos no país (Brasil, 2009).

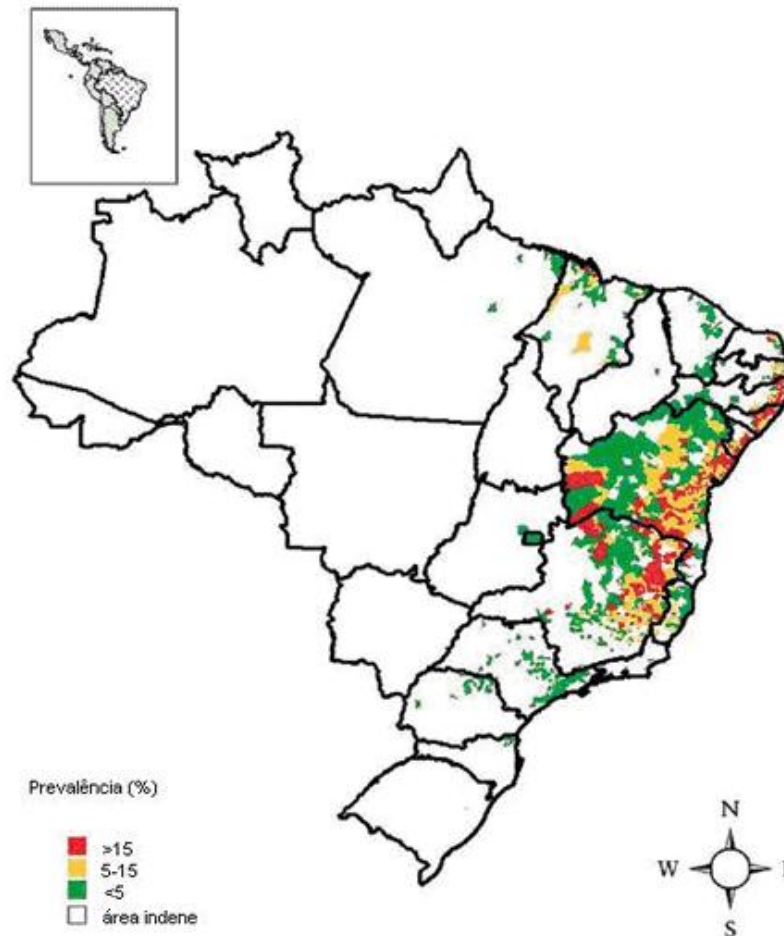


Figura 2: Áreas endêmicas da esquistossomose mansônica no Brasil. Prevalência da doença por município. (Extraído: Amaral RS, Taiuil, Lima DD, Engels D 2006. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 101 (Suppl. I): 79-85).

1.2. Ciclo de vida de *S. mansoni*

O parasita *S. mansoni* é um platelminto pertencente à família Schistosomatidae, classe Trematoda, subclasse Digenea e gênero *Schistosoma*. Ele apresenta um ciclo de vida heteroxênico, passando por duas fases: assexuada, a qual ocorre no hospedeiro intermediário, representado por moluscos do gênero *Biomphalaria* e sexuada ocorrendo no hospedeiro definitivo, que podem ser alguns mamíferos incluindo o homem. O dimorfismo sexual presente nesse gênero os diferencia dos outros da mesma subclasse (Rey, 2001).

O ciclo de vida desse parasita é complexo (**Figura 3**) e inicia-se quando ocorre a liberação de fezes contaminadas com ovos pelo hospedeiro definitivo. Os ovos ao entrarem em contato com a água eclodem sob estímulos de luz e temperatura adequados liberando a forma larval infectante, os miracídios (Neves, 2005). Nesse estágio de vida livre, os miracídios nadam ativamente no meio aquático através de sua estrutura ciliada até encontrarem com o hospedeiro invertebrado. Ao entrar em contato com o tegumento do caramujo, o miracídio inicia a penetração, que dura de 10 a 15 minutos, através de suas glândulas líticas, com auxílio dos movimentos ciliares e musculares larvais (Cunha, 1970). Após a penetração, o miracídio se diferencia em esporocisto primário, o qual se multiplica através da reprodução assexuada originando os esporocistos secundários, os quais migram para as glândulas digestivas e hepatopâncreas do caramujo onde se diferenciam por expansão clonal dando origem à terceira geração de larvas, denominadas cercárias (Wilson, 1979).

Na presença de estímulos externos, como luz e calor, as cercárias abandonam o hospedeiro intermediário, permanecendo em água e nadando ativamente com movimentos desencadeados por sua cauda bifurcada. Ao entrar em contato com o hospedeiro definitivo, a cercária inicia a infecção penetrando ativamente na pele, num processo dependente das ventosas cercarianas, além da secreção de proteínas das glândulas acetabulares e movimentos vibracionais da cauda (Cunha, 1970). A penetração leva a perda da cauda cercariana, e algumas horas após a infecção, o corpo cercariano restante começa a se adaptar as condições fisiológicas do hospedeiro, sofrendo uma série de modificações bioquímicas e morfológicas, culminando em sua transformação em esquistossômulo. Em torno de 24 a 72 horas, os esquistossômulos atravessam a epiderme e derme do hospedeiro e por volta do quarto dia chegam ao sistema sanguíneo ou linfático iniciando a migração para os pulmões. Nessa etapa, os esquistossômulos sofrem um grande alongamento do corpo sem sofrer divisões celulares, e a partir do oitavo dia passam por diversos órgãos até chegarem ao sistema porta-hepático onde se alimentam do sangue do hospedeiro e iniciam a divisão celular (Clegg, 1965).

Após 45 dias infecção, os esquistossômulos atingem a maturidade e se transformam em vermes adultos. O macho e a fêmea se acasalam nas veias mesentéricas e as fêmeas iniciam o processo de ovoposição, podendo liberar de 300 a 1000 ovos por dia, completando assim o ciclo do parasita (Neves, 2005). O casal de vermes adultos pode viver por até 20 anos dentro do hospedeiro definitivo. Os ovos são responsáveis pela patologia da doença, uma vez que estes podem ficar retidos nos tecidos do hospedeiro gerando uma reação inflamatória denominada granuloma. O granuloma desencadeia fibrose tecidual e obstrução do plexo venoso, podendo levar à hipertensão portal, esplenomegalia, hepatomegalia, ascite, e formação de varizes esofágicas (Cunha, 1970; Boros, 1989).

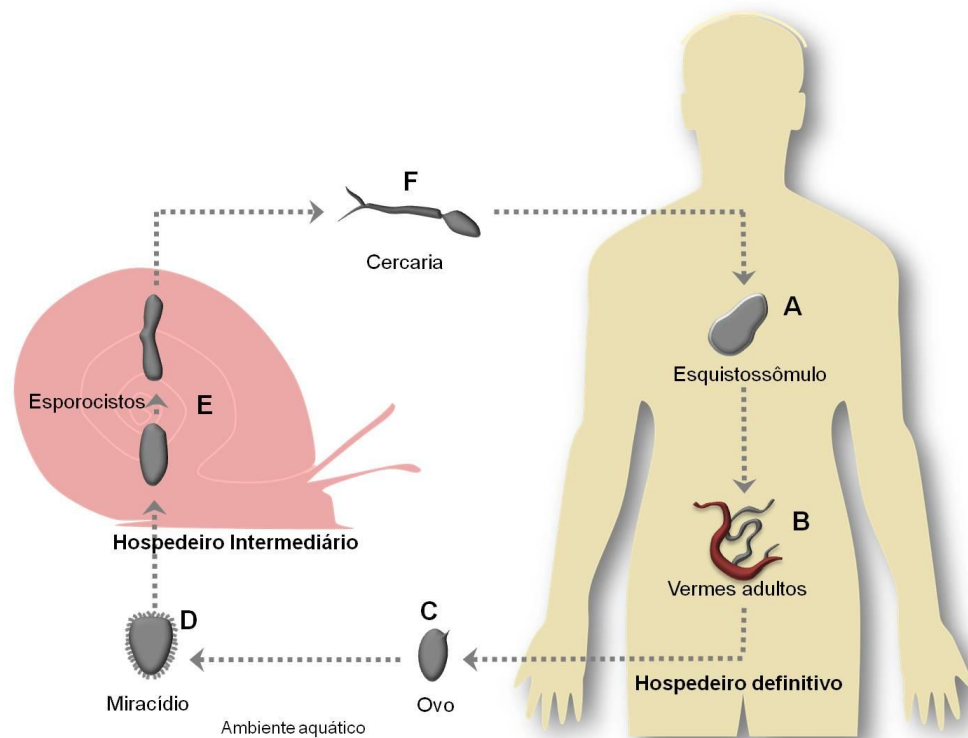


Figura 3: Ciclo de vida do parasita *S. mansoni*. No hospedeiro definitivo, os esquistossômulos (A) dão origem aos vermes adultos (B), os quais se acasalam e produzem ovos (C) que são liberados no ambiente aquático. Os ovos maduros eclodem liberando os miracídeos (D), que penetram nos caramujos, originando os esporocistos (E). Os esporocistos se diferenciam em cercárias (F) que são liberadas em água, infectando o hospedeiro vertebrado e fechando o ciclo (Imagem: Marcela P. Costa).

1.3. Genoma de *S. mansoni*

O genoma de *S. mansoni* está organizado em oito pares de cromossomos, sendo que um par corresponde aos cromossomos sexuais. O sexo é heterogamético para a fêmea (ZW) e homogamético para o macho (ZZ) (Short e Menzel, 1960; Short, Menzel e Pathak, 1979). A primeira estimativa do tamanho do genoma de *S. mansoni* foi feita em 1982, onde este compreendia aproximadamente 270 megabases (Simpson, Sher e Mccutchan, 1982).

O estudo em larga escala do genoma de *S. mansoni* iniciou-se no ano de 1992 com o Projeto Genoma do *Schistosoma mansoni* a partir de esforços de pesquisadores da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Fundação Oswaldo Cruz (Centro de pesquisas René Rachou – CPqRR, FIOCRUZ), da FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais) e o apoio importante logístico do Dr. Craig Venter (Institute for Genomic Research – TIGR, EUA). Quando esse projeto teve início, menos de 100 genes do parasita haviam sido completamente ou parcialmente sequenciados e depositados em bancos de dados. No período de 1994 a 2000, o programa de sequenciamento em *S. mansoni* contou com o financiamento parcial da Organização Mundial da Saúde (WHO/TDR) e diversos laboratórios participantes da “*Schistosoma Genome Network*”; que juntos geraram mais de 17000 ESTs (Franco *et al.*, 1995; Dias Neto *et al.*, 1996; Franco *et al.*, 1997; Rabelo *et al.*, 1997; Franco *et al.*, 2000; Oliveira, 2001).

Em 2001, a partir do projeto em larga escala chamado “*Schistosoma mansoni EST Genome Project*”, foram gerados um total de 180.000 ESTs que foram obtidas de todas as fases do ciclo de vida do parasita, o que levou a estimativa da existência de 14.000 genes no genoma de *S. mansoni* (Verjovski-Almeida *et al.*, 2003). Finalmente, em 2009, com a ajuda do *The Institute for Genomic Research (TIGR)* e do *Wellcome Trust Sanger Institute*, foi finalizada a montagem do genoma do parasita que foi disponibilizado no bando de dados GeneDB (<http://www.genedb.org>) (Berriman *et al.*, 2009). Apesar de todos esses esforços, o genoma de *S. mansoni* ainda está incompleto e uma das características típicas do genoma deste parasita que dificulta a sua montagem é

a presença de aproximadamente 40% de elementos repetitivos. A última anotação do genoma estimou seu tamanho em 380MB contendo 10.852 genes (Protasio *et al.*, 2012) distribuídos em *scaffolds*.

O genoma do *S. mansoni* é dez vezes maior que o genoma de outros parasitas protozoários e apresenta aspectos bem peculiares como a presença de regiões intrônicas grandes, tendo em média 1.692pb, e a presença de MEGs (Micro Exons Genes), que são genes que apresentam pequenos exons (6-36pb) e garantem a maior variabilidade dos seus transcritos por splicing alternativo (Berriman *et al.*, 2009). Os dados de sequenciamento do genoma de *S. mansoni* têm contribuído para diversos estudos utilizando técnicas moleculares modernas para entender a interação do parasita com seus hospedeiros, a interação entre macho e fêmea, a regulação da expressão gênica ao decorrer de seu desenvolvimento, dentro outros aspectos da biologia do parasita. Ainda, a partir da anotação de seus genes, foi possível identificar alvos potenciais e novas estratégias para o desenvolvimento de drogas para combater a doença (Verjovski-Almeida *et al.*, 2003).

1.4. Regulação da expressão gênica em *S. mansoni*

Estudos envolvendo o genoma e transcrito do gênero *Schistosoma* tem demonstrado a presença de um padrão de regulação da expressão gênica complexo nesses parasitas, o que provavelmente está relacionado com o seu ciclo biológico bastante peculiar, visto que o parasita sofre diversas mudanças morfológicas e bioquímicas, decorrente de sua passagem por ambientes variados. Além disso, como endoparasitas, as espécies desse gênero desenvolveram diversas adaptações no decorrer de sua evolução para conseguir sobreviver dentro de seus hospedeiros e interagir com os mesmos (Liu *et al.*, 2006). Assim, acredita-se que um conjunto de genes deve ser expresso coordenadamente em cada estágio do seu ciclo de vida e que mecanismos da regulação gênica em nível transcricional, pós-transcricional e pós-traducional estariam atuando de forma sincronizada para regular a expressão de genes de forma temporal e estágio-específica (Han *et al.*, 2009).

As análises do transcrito em parasitas do gênero *Schistosoma* têm permitido à comunidade científica entender os mecanismos moleculares envolvidos em sua evolução, nutrição, metabolismo, evasão do sistema imune, interação com o hospedeiro, reprodução de vermes adultos, dentre outros aspectos da sua biologia. Vários grupos vêm conduzindo trabalhos envolvendo o transcrito desses parasitas, usando principalmente o sequenciamento de última geração, incluindo a metodologia de RNAseq, para demonstrar os padrões da expressão gênica durante os estágios de desenvolvimento de espécies do gênero (Hu *et al.*, 2003; Verjovski-Almeida *et al.*, 2003; Oliveira, Franco e Verjovski-Almeida, 2008; Portela *et al.*, 2010; Piao *et al.*, 2011; Almeida, G. T. *et al.*, 2012; Marco *et al.*, 2013). Outros estudos envolvendo análise em larga escala do transcrito utilizando as metodologias de SAGE (Serial Analysis of Gene Expression), microarrays e ferramentas de proteômica, também têm demonstrado resultados que ajudam a responder questões a respeito do transcrito gênero-específico, eventos evolucionários, splicing alternativo, sítios de poliadenilação, análise da expressão gênica estágio/tecido-específica, e moléculas candidatas anti-esquistossomose no gênero *Schistosoma*, principalmente em *S. mansoni* (Demarco *et al.*, 2006; Fitzpatrick e Hoffmann, 2006; Ojopi *et al.*, 2007; Verjovski-Almeida *et al.*, 2007; Waisberg *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2007; Fitzpatrick *et al.*, 2009; Han *et al.*, 2009; Nawaratna *et al.*, 2011). Trabalhos recentes evidenciaram um padrão de expressão gênica diferencial para diversos genes durante os estágios de cercária, esquistossômulo e esporocistos (Han *et al.*, 2009; Parker-Manuel *et al.*, 2011).

Recentemente, um estudo demonstrou a comparação da expressão gênica em preparações de esquistossômulo mecanicamente transformados e esquistossômulo transformados *in vivo* em camundongos, através da metodologia de RNAseq. Esse estudo concluiu que as duas preparações diferem apenas em 38 genes (de aproximadamente 11000), o que esclarece a controvérsia em torno da eficiência da transformação mecânica de esquistossômulo, contribuindo para estudos de validação gênica utilizando essa metodologia, uma vez que ela é uma ótima substituta da transformação *in vivo* (Protasio, Dunne e Berriman, 2013).

Existe também uma grande necessidade de investigar as diferenças na expressão gênica no período de transição de cercária para esquistossômulo, uma vez que ocorrem

várias mudanças morfológicas e bioquímicas nesse momento, e já se conhece que a diferenciação na composição de proteínas entre esses dois estágios está diretamente relacionada a alterações na regulação de genes, como proposto Han *et al.* (2009) e apresentado pela **Figura 4**.

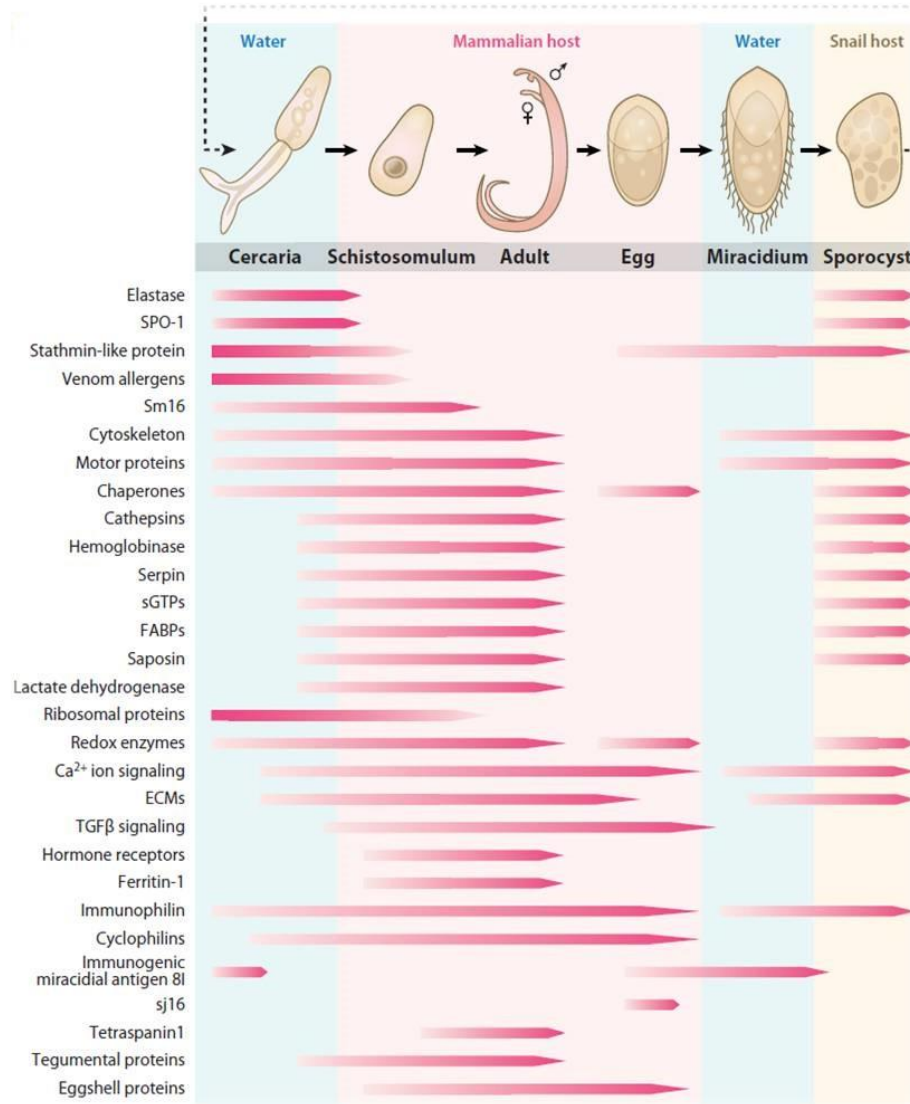


Figura 4: Expressão gênica estágio-específica em *S. mansoni* e *S. japonicum*. A figura representa um conjunto de genes diferencialmente expressos durante o desenvolvimento dos parasitas, baseados no projeto de seu transcissoma (Han *et al.*, 2009).

Na última década, os mecanismos de silenciamento gênico mediados pelo decaimento de mRNAs ou pela inibição de sua tradução tem recebido muita atenção, uma vez que já foi demonstrado a sua participação em processos de regulação da

expressão gênica em nível pós-transcricional. Esses mecanismos envolvem principalmente a participação de RNAs não codificadores, sendo os microRNAs os mais estudados atualmente, estando estes envolvidos na regulação do desenvolvimento de organismos, manutenção do genoma e diversos processos celulares (Bartel, 2009). A partir do conhecimento desses mecanismos de regulação gênica em nível pós-transcricional, foram desenvolvidas várias metodologias baseadas no silenciamento gênico por RNAi (interferência por RNA), promovendo soluções para a genética reversa, genômica funcional, terapia gênica, validação de alvos terapêuticos, dentre outros (Baum e Craig, 2004; Denli *et al.*, 2004).

1.5. microRNAs

O primeiro microRNA (miRNA), *lin-4*, foi descrito em 1993 por Lee, Feinbaum e Ambros (1993). Eles demonstraram que o gene *lin-4*, conhecido por sua função no controle do desenvolvimento no estágio larval de *Caenorhabditis elegans*, não codificava nenhuma proteína. Em contrapartida, esses autores observaram que este gene codificava um pequeno par de pequenos RNAs (22-16nt) que apresentavam complementaridade com várias sequências da região 3' não traduzida (3'UTR) do gene *lin-14*. A partir dessa observação, foi sugerido que esses pequenos RNAs pudessem regular a tradução do mRNA correspondente ao gene *lin-14* através da interação RNA-RNA., evidenciando assim um novo mecanismo de regulação da expressão gênica. Posteriormente, em 2000, foi descoberto o *let-7*, o qual codificava um RNA de 22nt, e reprimia a tradução de *lin-41*, *lin-14*, *lin-28*, *lin-42* e *daf12* durante os estágios de desenvolvimento de *C. elegans* (Ambros, 2000). Pasquinelli *et al.* (2000) também demonstraram a presença do *let-7* em várias espécies, incluindo o homem (*Homo sapiens*). Em 2001, esses pequenos RNAs temporais (*small temporal RNAs – stRNAs*) passaram a ser chamados de miRNAs (Lagos-Quintana *et al.*, 2001).

Durante as duas últimas décadas, os miRNAs emergiram como reguladores críticos da expressão gênica em nível pós-transcricional e estudos demonstraram que eles compreendem cerca de 1% de todo o genoma em humanos, apresentando importantes funções biológicas, estando envolvidos em diversos processos fisiológicos

e na patogênese de diversas doenças. Além disso, acredita-se que eles regulam aproximadamente de um a dois terços de todos os genes da nossa espécie (Ambros, 2004; Lao *et al.*, 2007; Breving e Esquela-Kerscher, 2010; O'connell *et al.*, 2010).

Os miRNAs são definidos como pequenos RNAs endógenos com aproximadamente 22 nucleotídeos que tem a capacidade de se ligar às regiões 3' UTR de um mRNA alvo a partir da complementaridade de bases, levando à inibição da tradução ou sua degradação. Uma característica peculiar dos miRNAs é que esses passam por algumas etapas de processamento enzimático, após sua transcrição, para gerar sua forma madura e funcional. Outra característica comum dos microRNAs é o seu processamento a partir de um precursor em forma de grampo (*hairpin* ou *stem-loop*) que gera um duplex de miRNA, onde qualquer uma das fitas pode ser funcional. A classificação dos miRNAs é baseada na sua localização e biogênese, sendo classificados em intergênicos e intrônicos (mirtrons) (**Figura 5**) (Lee e Ambros, 2001; Westholm e Lai, 2011). Além disso, há a ocorrência de clusters de miRNAs, onde alguns miRNAs estão distanciados a menos de 10 mil pares de bases um dos outros no genoma e podem ser processados a partir de um transcrito policistrônico, formando assim famílias de miRNAs. Vários estudos tem demonstrado que famílias de miRNAs organizadas em clusters contém miRNAs que participam da regulação de genes que apresentam funções relacionadas (Altuvia *et al.*, 2005; Tagawa, 2005; De Lencastre *et al.*, 2010).

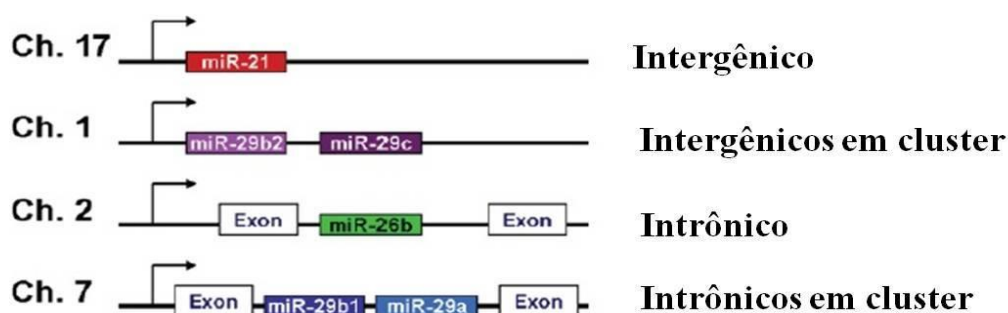


Figura 5: Classificação dos miRNAs de acordo com sua localização no genoma. Os miRNAs podem estar localizados em regiões intergênicas, sendo denominados miRNAs intergênicos, e podem estar localizados em regiões intrônicas de genes codificadores de RNA ou proteína, sendo chamados de miRNA intrônicos ou mirtrons. Ainda, os dois tipos de miRNAs podem estar organizados em clusters (adaptado de Kapinas e Delany (2011)).

A biogênese dos miRNAs é caracterizada por várias etapas: transcrição, processamento do pri-miRNA, transporte para o citoplasma, processamento do precursor do miRNA (pre-miRNA), seleção da fita funcional, associação com o complexo RISC (Complexo de Silenciamento por Interferência por RNA) e interação com o mRNA alvo (**Figura 6**). A via de biogênese canônica, descrita para miRNAs intergênicos, acontece a partir da transcrição desses pela RNA polimerase II ou III (Lee *et al.*, 2004; Borchert, Lanier e Davidson, 2006). O produto transcrito inicialmente gerado é denominado miRNA primário (pri-miRNA), o qual sofre adição de cap em sua extremidade 5' e é poliadenilado na extremidade 3'. Ainda dentro do núcleo, o pri-miRNA sofre o primeiro processamento por uma RNase III chamada de Drosha, com auxílio de seu cofator DGCR8 (Digeorge Critical Region 8), originando uma estrutura precursora com aproximadamente 60-120 nucleotídeos, nomeada pre-miRNA. O pre-miRNA então é exportado para o citoplasma pelo complexo Ran-GTP/Exportina 5 (Han *et al.*, 2004; Lund *et al.*, 2004).

No citoplasma, o pre-miRNA é novamente processado por outra RNase III, denominada Dicer, gerando um duplex de miRNA, com aproximadamente 22 nucleotídeos. Nesse duplex, a fita que será funcional é chamada de miRNA maduro, enquanto a outra é denominada fita passageira, a qual é degradada. Acredita-se que a seleção da fita funcional é feita por abertura do duplex na extremidade 5' de acordo com a presença de ligações de hidrogênio mais fracas e ainda pela preferência do RISC pela fita que apresenta a extremidade livre 5' maior (Li, Tsai, *et al.*, 2012). O RISC inclui a enzima Dicer, a proteína TRBP (“Tar RNA binding protein”), PACT (“protein activator of PKR”) e proteínas da família Argonauta, o qual se associa ao miRNA maduro e o direciona até o mRNA alvo, onde ocorre o pareamento de bases com a região 3'UTR do mRNA, ocorrendo assim a função regulatória do miRNA (Landthaler *et al.*, 2008).

Na biogênese de miRNA intrônicos (mirtrons), o miRNA é processado pelo mecanismo de splicing após a transcrição do gene que o hospeda. Estudos demonstram que esses mirtrons não são processados pela enzima Drosha, sendo removidos pela maquinaria de “splicing” e posteriormente processados por uma enzima desramificadora dando origem ao pre-miRNA. A partir desse ponto, o pre-miRNA segue os mesmos caminhos da biogênese canônica (**Figura 6**). Estudos recentes, sugerem que alguns

miRNAs encontrados em regiões intrônicas possuem a transcrição independente de seu gene hospedeiro, não compartilhando o mesmo promotor (Ozsolak *et al.*, 2008; Marsico *et al.*, 2013).

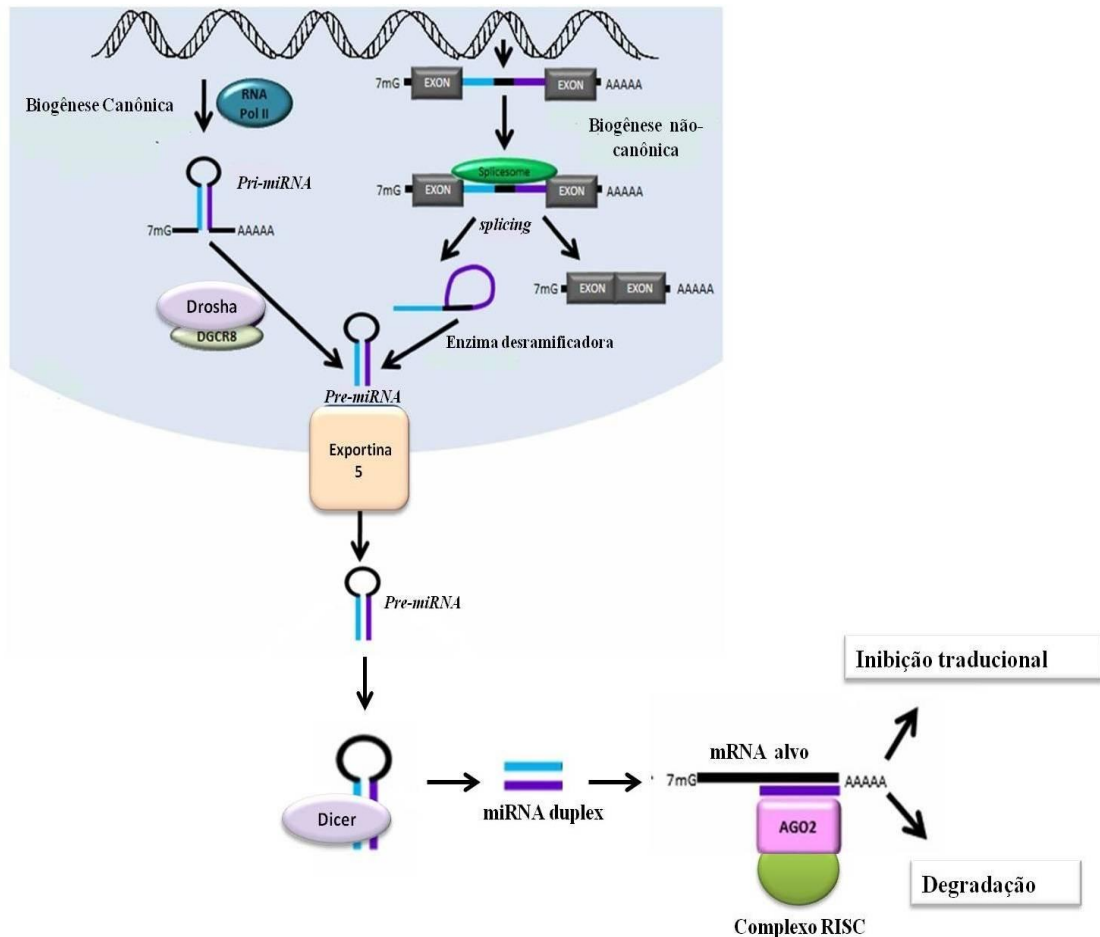


Figura 6: Biogênese dos miRNAs. A biogênese dos miRNAs acontece em várias etapas. A via canônica dos miRNAs intergênicos acontece a partir da transcrição do gene do miRNA, gerando um pri-miRNA que será processado pela enzima Droscha, liberando uma estrutura em grampo, o pre-miRNA. O pre-miRNA é translocado para o citoplasma pela Exportina 5, onde sofre outro processamento pela enzima Dicer, gerando o duplex de miRNA. O Complexo RISC interage com o miRNA maduro selecionado e o direciona até o mRNA alvo, onde ocorre a inibição da tradução ou degradação do mRNA através da interação de pares de bases miRNA-mRNA. A via não canônica, descrita para miRNA intrônicos, ocorre a partir da transcrição do gene que hospeda o miRNA, e posterior excisão da sequência que formará o pre-miRNA por *splicing*. O pre-miRNA então segue o mesmo caminho da via canônica. (Adaptado de Heman-Ackah *et al.* (2013)).

1.6. miRNAs no gênero *Schistosoma*

Vários grupos têm realizado estudos para identificar miRNAs em parasitas do gênero *Schistosoma*, particularmente em *S.japonicum* e *S. mansoni*. Para a identificação e validação desses miRNAs, estratégias computacionais têm sido associadas a metodologias experimentais como *Nothern Blot*, sequenciamento de última geração, PCR em tempo real e clonagem.

Xue *et al.* (2008) relataram pela primeira vez a presença de 5 miRNAs em *S.japonicum* (*Sja-let-7*, *Sja-miR-71*, *Sja-bantam*, *Sja-miR-125* e *Sja-miR-new1*) por clonagem direta e demonstraram a conservação de 4 destes. Posteriormente, através do sequenciamento de última geração, Wang *et al.* (2010) identificaram 20 miRNAs conservados e 16 gênero-específicos e Huang, J. *et al.* (2009) reportaram 176 miRNAs espécie-específicos em esquistossômulos imaturos e maduros, bem como em vermes adultos de *S.japonicum*. Ainda, Hao *et al.* (2010) identificaram 16 miRNAs conservados e 22 gênero-específicos no mesmo organismo.

Em *S. mansoni*, o repertório de miRNAs disponível ainda é baseado em abordagens computacionais e sequenciamento de última geração, entretanto poucas moléculas foram caracterizadas. Estudos prévios do nosso grupo forneceram uma análise sistemática de miRNAs, identificando 67 miRNAs maduros e 42 precursores em *S. mansoni* por abordagem computacional integrada (Gomes *et al.*, 2011). Outro trabalho caracterizou 211 novos miRNAs em *S. mansoni* por clonagem de sequências pequenas de RNAs em vermes adultos (Simoes *et al.*, 2011). Recentemente, Marco *et al.* (2013) usando sequenciamento de última geração relatou 112 miRNAs em vermes adultos e confirmou 20 dos 42 precursores identificados por nosso grupo e 2 dos 211 identificados por Simões *et al.*, (2011). Nosso grupo também demonstrou por abordagens computacionais que o cluster miR-71/2 é muito conservado entre os Protostomios e foi observado que a família miR-2 é completamente ausente em espécies de Deuterostomios, enquanto a família mir-71 é ausente em Vertebrata e Urocordata. Esses resultados corroboram com os dados de Marco *et al.* (2013) que demonstram que a família miR-71 e miR-2 são específicos de Protostomios. Ainda, nosso grupo realizou a predição computacional de 38 miRNAs intrônicos e a caracterização dos perfis de

expressão gênica de 18 destes, além de demonstrar a correlação da expressão desses miRNAs com seus genes hospedeiros (Oliveira, 2013).

Gomes (2012) através de abordagens computacionais identificou 63 miRNAs maduros e 42 precursores em *S. mansoni*, além de demonstrar experimentalmente o padrão de expressão gênica de 8 miRNAs. Dentre esses, 3 apresentaram um padrão de expressão gênero-específico (*sma-miR-61*, *sma-miR-125a* e *sma-miR-124-3p*) e 2 estágio-específicos (*sma-miR-new_10-5p* e *sma-miR-125a*). Dando continuidade a essa investigação, nesse trabalho buscou-se analisar 16 miRNAs precursores que ainda não foram caracterizados dentro do grupo de 42 miRNAs precursores preditos previamente, com a finalidade de obter o padrão de expressão desses miRNAs em *S. mansoni* bem como identificar seus alvos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Caracterizar miRNAs previamente identificados a partir de dados do genoma de *S.mansoni* através da análise comparativa do padrão de expressão gênica de formas larvais e adultas deste parasita, bem como identificar e categorizar os seus respectivos alvos.

2.2. Objetivos Específicos

- Analisar *in silico* a conservação e características estruturais dos miRNAs;
- Caracterizar o padrão de expressão gênica de miRNAs maduros nos diferentes estágios do ciclo de vida do parasita *S. mansoni* a partir da técnica de qRT-PCR;
- Identificar os prováveis alvos dos miRNAs e propor rede de interação miRNA-mRNA;
- Categorizar os alvos identificados em processos celulares.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Análises “*in silico*” dos miRNAs

3.1.1. Busca por homologia no miRBase

Os miRNAs analisados neste trabalho foram previamente identificados em nosso laboratório através de ferramentas computacionais desenvolvidas para predição de miRNAs precursores (Gomes, 2012). Para os 16 miRNAs precursores analisados nesse estudo, utilizamos o programa *MatureBayes web toll* disponibilizado no site (<http://mirna.imbb.forth.gr/MatureBayes.html>) para gerar as sequências maduras (3p e 5p) correspondentes a cada miRNA precursor.

As sequências precursoras e maduras preditas foram comparadas com todas as sequências de miRNAs disponíveis na última versão do banco de dados miRBase (miRBase 20) através da ferramenta BLASTn utilizando o cut-off ≤ 0.05 (Jin *et al.*, 2013). A última versão do banco de dados (Release 20) apresentou 24521 precursores expressando 30424 miRNAs maduros de 206 espécies (<ftp://mirbase.org/pub/mirbase/CURRENT/README>).

3.1.2. Características estruturais dos miRNAs

Os miRNAs em estudo foram classificados de acordo com a sua origem em intergênicos ou intrônicos. Para cada miRNA intrônico, foi realizada uma busca por BLASTn a partir de sua sequência precursora no banco de dados GeneDB 5.0 para verificar em qual gene ele está hospedado. A partir da ferramenta *ClustalX* foi realizado um alinhamento global utilizando a sequência completa do gene hospedeiro, a sequência do transcrito correspondente ao gene hospedeiro e a sequência do miRNA precursor para verificar em qual íntron o miRNA intrônico está localizado. Além disso, a estrutura secundária de cada miRNA precursor foi predita a partir da ferramenta computacional RNAfold proveniente do pacote de *Vienna RNA Package* disponível em <http://www.tbi.univie.ac.at/RNA/>, que além de gerar a estrutura provável do miRNA, fornece dados termodinâmicos como o valor da energia mínima livre (MFE) da molécula. Os parâmetros adotados pela ferramenta RNAfold foram energia mínima

livre da estrutura secundária de RNA dobrada de -20Kcal/mol e opções “-p -d2 -noLp”(Hofacker, 2002).

3.1.3. Predição dos possíveis alvos de miRNAs no genoma de *S. mansoni*.

A predição computacional dos genes alvos dos miRNAs validados experimentalmente foi realizada utilizando a sequência madura de cada miRNA que foi confrontada com as regiões 3`UTR (Regiões da extremidade 3` da fita de RNA mensageiro não traduzidas em proteína) do genoma de *S.mansoni* a fim de avaliar a dinâmica de interação entre miRNA-mRNA.

A partir dos arquivos GFF e GFF3 depositados no banco de dados GeneDB (www.genedb.org) foram recuperadas as sequências 3`UTR dos mRNAs de *S. mansoni*, utilizando as informações posicionais do códon de parada do mRNA e da região não traduzida da molécula de RNA. Para a predição de alvos, utilizou-se o programa miRanda com ajustes em alguns parâmetros baseando-se na identificação de alvos de miRNA em outras espécies (John *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005). Os valores desses parâmetros foram: penalidade de abertura de espaço (“gap opening penalty”) de -8, penalidade sobre a expansão de espaço (“gap extension penalty”) de -2, pontuação mínima aceitável entre o par de miRNA maduro e 3`UTR de 120, energia livre máxima de interação entre o par miRNA maduro e 3`- UTR de -15 kcal/mol (escala utilizada para medir a pontuação de complementaridade entre o par miRNA e 3`UTR), e demanda restrita na região *seed* 5` do miRNA entre o 2º e 8º nucleotídeo. Todos esses comandos foram aplicados em linha de comando na plataforma Linux, e os resultados positivos foram recuperados do arquivo final utilizando um script escrito em Perl (Gomes, 2012).

A rede de interação foi construída a partir da ferramenta *Cytoscape* disponível no site (<http://www.cytoscape.org/>) utilizando os parâmetros padronizados do programa (<http://med.bioinf.mpi-inf.mpg.de/netanalyzer/help/2.7/index.html#complex>). A distância entre os nós na rede de interação foi baseada nos valores de energia livre correspondentes à interação do miRNA e seu gene alvo.

3.1.4. Categorização funcional dos alvos

A partir dos alvos preditos para os miRNAs caracterizados experimentalmente, foram selecionados aqueles que participam de processos celulares importantes na biologia do parasita. A anotação de cada alvo selecionado foi verificada através do GeneDb 5.0 (www.genedb.org) e por BLASTn e BLASTp na plataforma do NCBI. Posteriormente, foi feita a busca por ontologia gênica com ajuda das ferramentas GeneOntology (<http://www.geneontology.org/>), KEEG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (<http://www.genome.jp/kegg/>) e Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>). A seguir, foi realizada a categorização de cada alvo de acordo com sua função molecular e seu processo biológico. A função molecular envolve as atividades de um produto gênico em nível molecular, tendo como exemplo ligação ou catálise, enquanto o processo biológico diz respeito a uma série de eventos moleculares em que o produto gênico participa, como a fosforilação oxidativa ou transporte de lipídeos.

3.2. Caracterização Experimental de miRNAs

3.2.1. Obtenção dos Parasitas

Neste estudo foram utilizados parasitas da espécie *S. mansoni* linhagem LE e optamos em trabalhar com os estágios de: cercária, esquistossômulos transformados mecanicamente com 3,5h e 24h de cultivo *in vitro*, vermes adultos e ovos. Cercárias foram cedidas pelo Moluscário do CPqRR/FIOCRUZ (Centro de Pesquisas René Rachou – Fundação Oswaldo Cruz) de Belo Horizonte/MG e os vermes adultos, pelo Laboratório de Enzimologia e Proteômica (LEP) da UFOP. Os demais estágios de esquistossômulo e ovo foram obtidos através do ciclo mantido na UFOP. Os experimentos envolvendo animais foram autorizados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais CEUA/UFOP, protocolo nº 2011/55.

As cercárias foram obtidas através da infecção do hospedeiro intermediário *Biomphalaria glabrata* com miracídios, e após 27 a 31 dias de infecção foi induzida a liberação de cercárias por exposição à luz branca fria durante 2 horas. As cercárias liberadas foram recuperadas, e para seu armazenamento, estas foram deixadas por 2

horas decantando em banho de gelo e o sobrenadante e impurezas foram retirados. As cercárias foram transferidas para tubos *ependorf* de 1,5 mL e em seguida congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas no freezer a -80° C para posterior uso.

Para obtenção de vermes adultos foi feita a perfusão do sistema porta-hepático de camundongos da linhagem *Swiss Webster* infectados com aproximadamente 100 cercárias por via subcutânea após 50 dias (Basch; Smithers Sr Fau - Terry e Terry). Após a coleta, os vermes adultos foram armazenados em tubo de 1,5 mL a -80°C para posterior utilização.

Os ovos foram obtidos a partir da trituração de cerca de 10 fígados de camundongos infectados com solução tampão (0,9% p/v Na₂HPO₄ e 0,005% p/v KH₂PO₄) e auxílio de um liquidificador. Em seguida, foi adicionado ao homogenato 20mg de tripsina, seguido de incubação por 2,5 horas em banho maria a 37° C, para completa digestão tecidual. Posteriormente, os ovos foram filtrados em peneiras de 0,180mm/80 Tyler e 0,30mm/49 Tyler sucessivamente e recuperados através de lavagem com solução salina. O sobrenadante foi retirado e os ovos foram armazenados em tubo *ependorf* de 1,5 mL a -80° C para posterior uso.

3.2.2. Esquistossômulos transformados mecanicamente

Os esquistossômulos foram obtidos seguindo a metodologia de Harrop e Wilson (Harrop e Wilson, 1993). Após a sedimentação das cercárias em banho de gelo por 2 horas e retirada de impurezas, estas foram transferidas para tubos *falcon* de 15 mL e ressuspendidas em 10 mL de meio RPMI 1640 (Invitrogen) filtrado, e deixado em gelo por 10 minutos. Esse procedimento de lavagem foi realizado por 3 vezes visando retirar o máximo de impurezas. Tubos contendo aproximadamente 200.000 cercárias em 5 mL de meio RPMI 1640 foram vigorosamente agitados em vórtex, sob velocidade máxima, durante 90 segundos por 3 vezes, para que ocorresse a separação mecânica da cauda do corpo cercariano. Após a ruptura das caudas, o volume dos tubos foi transferido para um novo recipiente de cultura contendo meio RPMI 1640 suplementado com 1% de penicilina cristalina G (1000 UI/mL) e estreptomicina (1000 UI/mL), e incubado em

estufa de CO₂ 5% a 37°C por 3,5 horas. Após este intervalo, foram realizadas em fluxo laminar, várias lavagens com meio RPMI em intervalos de 4 minutos para a sedimentação dos esquistossômulos e remoção das caudas do sobrenadante. Esse processo foi acompanhado pela visualização dos parasitas em microscópio de luz invertida para verificar a completa ausência de caudas no meio. O precipitado de esquistossômulos sem a presença de caudas foi considerado como os esquistossômulos de 3,5 horas (EMT-3,5 horas). Estes foram separados e utilizados para cultivo ou armazenados em tubos de 1,5 mL a -80°C para posterior uso (**Figura 7**)

O cultivo de esquistossômulos por 24 horas (EMT-24 horas) foi realizado em placa de 6 poços contendo 8mL de meio 169 (**Tabela 1**) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) e 1% de penicilina cristalina G (1000 UI/mL) /estreptomicina (1000 UI/mL) por poço (Basch).



Figura 7: Esquistossômulos cultivados *in vitro*. Os esquistossômulos foram cultivados por 24 horas em estufa de CO₂ 5% a 37°C em meio 169 (Gomes, 2008).

Tabela 1: Meio 169 com seus componentes e concentração.

Composição	Concentração
Glicose	0,1%
HEPES	20 mM
Hidrocortisona	1 x 10 ⁻⁶ M
Hipoxantina	5 x 10 ⁻⁷ M
Hidrolisado de lactalbumina	0,1%
Meio mínimo vitamina	0,5%
Meio Schneider	5,0%
Serotonina	1 x 10 ⁻⁶ M
Triiodotironina(T3)	2 x 10 ⁻⁷ M
RPMI 1640 (Invitrogen)	q.s.p 500 mL

3.2.3. Análise da expressão gênica de miRNAs por qRT-PCR

Para a caracterização dos perfis de expressão gênica dos miRNAs, foram utilizadas metodologias já padronizadas e bem estabelecidas no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBBM) e brevemente descritas a seguir. Nesse estudo a análise da expressão gênica dos miRNAs foi realizada a partir das sequências de miRNAs maduros.

3.3. Caracterização dos perfis de expressão de miRNAs no ciclo de vida de *S. mansoni*.

3.3.1. Extração do RNA total enriquecido com miRNAs

Cerca de 100 mg de cercárias, esquistossômulos de 3,5 e 24 horas, vermes adultos e ovos foram utilizados para a extração de RNA total enriquecido com miRNAs utilizando o kit miRNeasy (Qiagen) seguindo o protocolo do fabricante.

Cada amostra biológica foi homogeneizada em 700µL de *QIAzol Lysis Reagent* em tubos *eppendorf* de 1,5 mL com auxílio de um homogeneizador do tipo politron. O homogenato foi incubado por 5 minutos a temperatura ambiente para a complexa dissociação dos complexos nucleoprotéicos. Em seguida, foram adicionados 140µL de clorofórmio (Sigma- St. Louis, MO, USA) em cada amostra. A mistura foi homogeneizada vigorosamente em vórtex, e em seguida as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12.000g a 4° C. A fase aquosa contendo o RNA foi transferida para um novo tubo *eppendorf*, e em seguida, foram adicionados 500µL de etanol 100% (Sigma). As amostras foram homogeneizadas suavemente por inversão dos tubos, para a precipitação do RNA. Posteriormente, o RNA total enriquecido com miRNAs foi purificado conforme instrução do boletim técnico do fabricante. O RNA total purificado e enriquecido com miRNAs foi mantido a -80°C até seu uso.

A qualidade do RNA total extraído foi avaliada em gel de agarose/formaldeído. A pureza e concentração do RNA referente a cada amostra foi determinada utilizando o

aparelho Nano Vue Spectrophotometer (GEHealthcare) avaliando as relações entre as leituras nos comprimentos de onda 260/280nm e 260/230nm que são indicativos da pureza da amostra. As preparações foram consideradas boas, quando o valor da razão A: 260/280 variou entre 1,6-2,3 (**Figura 8**)

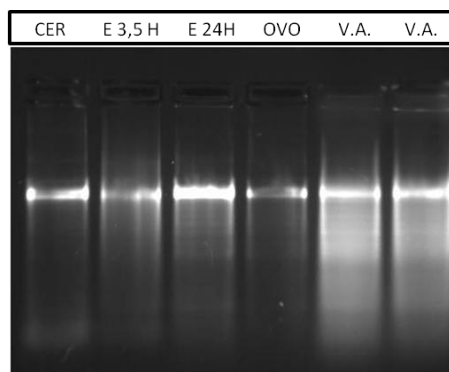


Figura 8: Análise da integridade do RNA. Cerca de 5µg de RNA total foram fracionados em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo. CER- cercária; E 3,5 H- esquistossômulo no tempo de 3,5 horas; E 24H – esquistossômulo no tempo de 24 horas; OVO – estágio de ovo; V.A – verme adulto.

3.3.2. Oligonucleotídeos iniciadores (*Primers*)

Os oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada miRNA foram idealizados com base nas sequências maduras dos miRNAs analisados nesse trabalho (**Tabela 2**). Estes primers foram utilizados para a caracterização da expressão dos miRNAs por qRT-PCR.

Tabela 2: Sequências dos *primers* referentes aos miRNAs maduros.

microRNA	Tamanho	Fita	Sequência do primer
sma-miR-212	21	3'	TAACAGTCTACAGTCATGGAT
sma-miR-2162-3p	21	3'	TATTATGCAACGTTTCACTCT
sma-miR-250	22	3'	CCTTCAGTTGACTCATGATCTC
sma-miR-281	22	3'	TGTCATGGAGTTGCTCTCTATA
sma-miR-92a	22	5'	GATTGCACTAGTCACGGCTTTT
sma-miR-9c	22	3'	TCTTTGGTATTCAATCTGAAGA

sma-miR-new_2-3p	22	3`	AGTGTTTCCAAGTTTCCATGG
sma-miR-new_2-5p	22	5`	TGGAAAACCTGTGAAAGTACTG
sma-miR-new_3-3p	22	3`	GATTTTCTTCCTGATGCTTCTG
sma-miR-new_3-5p	22	5`	ATATTTTCAGATATTGATTTTCT
sma-miR-new_4-3p	22	3`	TCGCTTTACCCATATCTGCTAG
sma-miR-new_4-5p	22	5`	TGCAGGTAAAGTAATGCTTGTT
sma-miR-new_5-3p	22	3`	ATAATTTCAATCTCTGAGATTA
sma-miR-new_5-5p	22	5`	TCCAAAGTTTCGTCCAGCAAAC
sma-miR-new_6-3p	22	3`	TCAATCTCCACAATCTCATACT
sma-miR-new_6-5p	22	5`	CTCAGTATGTGGTTGTGGAGGT
sma-miR-new_8-3p	22	3`	TCATACTGATTCAGTATGACTA
sma-miR-new_8-5p	22	5`	AAACATAATCAGTGTA AACCTG
sma-miR-new_12-3p	22	3`	TTTGTTATTGTGTTGAGCATAT
sma-miR-new_12-5p	22	5`	ATCACAGCTCACACACAATTAA
sma-miR-new_13-3p	22	3`	TTTTCTATGATGGTCTAGCTTC
sma-miR-new_13-5p	22	5`	AGCTAGACTACCATGGAAAAC
sma-miR-new_15-3p	22	3`	TTCCAGGTTTCCAATGGTGACC
sma-miR-new_15-5p	22	5`	TGTAAACCATCATTGTAAACT
sma-miR-new_16-3p	22	3`	ATTACAAGCGATCACTTTTATA
sma-miR-new_16-5p	22	5`	TGAACGTTTCATTTTATGAACAT

3.3.3. Síntese da primeira fita de DNA (cDNA)

A primeira fita do cDNA foi sintetizada a partir de 1µg de RNA total extraído dos diferentes estágios do *S. mansoni* utilizando o Kit miScript Reverse Transcription (miScript II RT Kit – QIAGEN), seguindo as recomendações fornecidas pelo fabricante. A reação ocorre através de uma transcrição reversa por RT-PCR onde inicialmente ocorre a poliadenilação das moléculas de RNA. A próxima etapa envolve a hibridação de um primer oligo-dT na cauda poli-A para a síntese da primeira fita de cDNA que será utilizada na reação de qRT-PCR. O primer oligo-dT contém uma sequência

chamada de “etiqueta universal” que serve como molde para anelamento do primer universal na reação de qRT-PCR. (Figura 9).

Para cada 1µg de RNA total enriquecido com miRNAs, foram utilizados 4µL de miScript HiSpec buffer 5x, 2µL de miScript Nucleics Mix 10x, 2µL de transcriptase reversa (miScript Reverse Transcriptase Mix) e água livre de RNase para um volume final de 20µL. A mistura foi incubada em um termociclador (Biocycler, version 3.2) a 35°C por 60 minutos, seguidos de 5 minutos a 95° C. As amostras de cDNA foram estocadas a -80°C e utilizadas em no máximo 2 semanas.

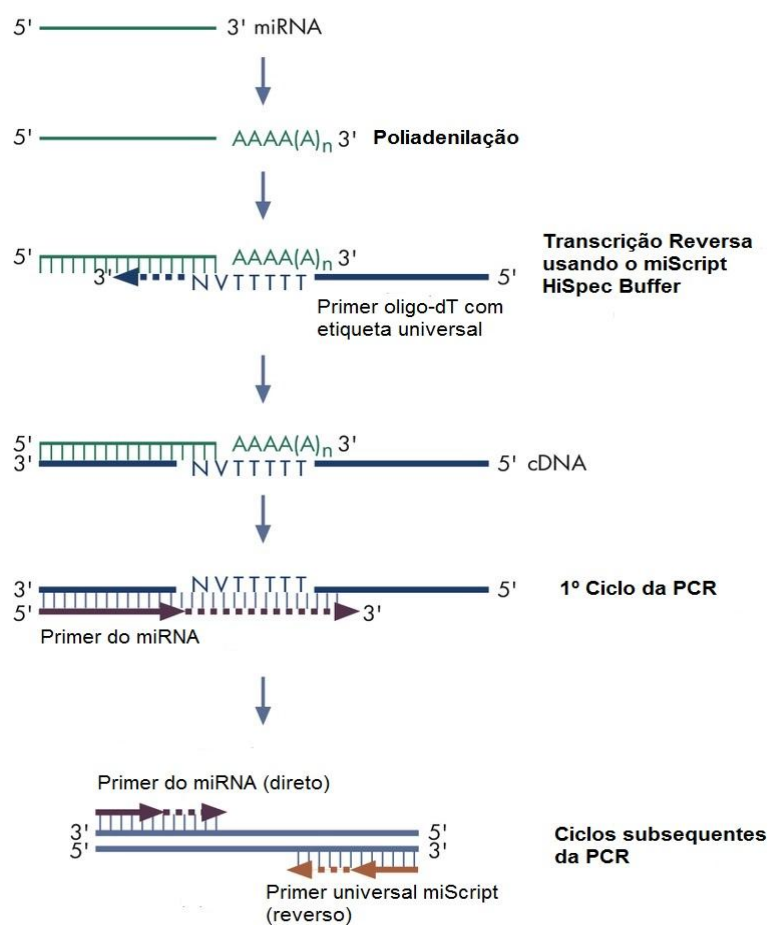


Figura 9: Síntese de cDNA a partir de miRNA. Inicialmente as moléculas de miRNA sofrem poliadenilação em sua extremidade 3'. Um primer oligo-dT fornecido pelo kit é utilizado para sintetizar a fita de cDNA. Esse cDNA posteriormente será submetido ao primeiro ciclo da reação de PCR ao qual o primer específico do miRNA de interesse é utilizado. Os ciclos seguintes ocorrem a partir do primer específico e de um primer universal complementar à sequência da “etiqueta universal” fornecido pelo kit (Adaptado de miScript II RT Kit – QIAGEN).

3.3.4. Expressão dos miRNAs a partir de PCR quantitativa em Tempo Real (qRT-PCR)

Para análise da expressão gênica dos miRNAs em estudo foi utilizada a técnica de PCR em tempo real. As reações foram realizadas utilizando o kit miScript SYBR® Green PCR (QIAGEN) em placas de 96 poços (MicroAmp® Optical 96 Well Reaction Plate – Applied Biosystems) e seladas com adesivo óptico (MicroAmp® Optical Adhesive Film – Applied Biosystems) ao final do procedimento. A metodologia adotada para amplificação dos miRNAs é baseada na utilização de um único primer para o miRNA, que no caso é a sua própria sequência madura, e um primer universal que se liga à “etiqueta universal” de cada cDNA correspondente ao miRNA.

Para cada reação foram pipetados 2µL dos oligonucleotídeos iniciadores (na concentração de 2,5µM), 2µL de cDNA diluído 10x, 1µL de 10x miScript Universal Primer e 5µL de 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, totalizando um volume final de reação de 10µL. Todos os ensaios foram realizados em triplicata biológica e técnica para cada miRNA analisado, utilizando como controle endógeno o pequeno RNA nuclear U6. Os valores de *baseline* (ciclos iniciais em que há pequenas alterações na fluorescência) foram ajustados para 3-15 ciclos. O *threshold*, desvio padrão médio do repórter normalizado (Rn) para os ciclos iniciais da PCR multiplicado por um fator ajustável, foi ajustado à região associada ao crescimento exponencial do produto de PCR e, portanto, fixado em 0,02 para todas as amostras, uma vez que se comparou o mesmo miRNA em diferentes estágios. O Rn refere-se à relação entre intensidade de fluorescência emitida pelo corante repórter pela intensidade de fluorescência emitida pelo corante da referência passiva (ROX).

As análises foram conduzidas utilizando o método de quantificação relativa da expressão gênica (ΔCT), que permite quantificar diferenças no nível de expressão de um alvo específico entre as diferentes amostras. Os níveis de expressão dos miRNAs foram normalizados pelos níveis de expressão do controle endógeno. Os resultados foram alcançados por uma fórmula aritmética que considera a quantidade do alvo, normalizado ($2^{-\Delta CT}$), fornecendo assim dados quantitativos da expressão gênica relativa a cada miRNA em estudo. A Tabela 3 mostra a programação utilizada na reação de qRT-PCR.

Tabela 3: Condições da reação de qRT-PCR.

Etapa	Tempo	Temperatura
Etapa Inicial de ativação da PCR	15 min	95°C
3 etapas de ciclagem		
Desnaturação	15 s	94°C
Anelamento	30s	55°C
Extensão	30s	70°C
Número de ciclos	40	-----

3.3.5. Verificação dos produtos amplificados (*amplicons*)

Os produtos amplificados na reação de qRT-PCR foram verificados em gel de agarose a 2,0% juntamente com o padrão de peso molecular de 100pb *DNA Ladder* (Invitrogen) a 90 volts por 40 minutos. A finalidade dessa metodologia foi confirmar a presença de uma única banda próxima a 100pb referente aos miRNAs. O tamanho de 100pb é justificado pelo tamanho final do cDNA obtido na reação de RT-PCR, uma vez que os miRNAs são poliadenilados e posteriormente utiliza-se um primer oligo-dT com uma sequência chamada de “etiqueta universal” para a síntese do cDNA, o que faz o cDNA ter um tamanho próximo à 100pb segundo o fabricante.

3.3.6. Análise da curva de dissociação dos *amplicons*

A análise da curva de dissociação dos *amplicons* teve como objetivo observar a presença de apenas um pico característico de miRNA com ausência de possíveis ampliações inespecíficas. Ao final dos 40 ciclos da programação da reação de qRT-PCR para miRNAs, a temperatura foi elevada gradualmente de 60°C à 95°C, mantendo-se por 15 segundos em cada temperatura, durante a qual é feita a leitura da emissão de fluorescência.

O gráfico resultante permite verificar se há um ou mais produtos de PCR presentes em cada reação devido às diferenças de temperatura de dissociação da sequência (*Melting temperature* – T_m). A **Figura 10** mostra um exemplo de um amplicon específico na temperatura entre 75°C e 80°C.

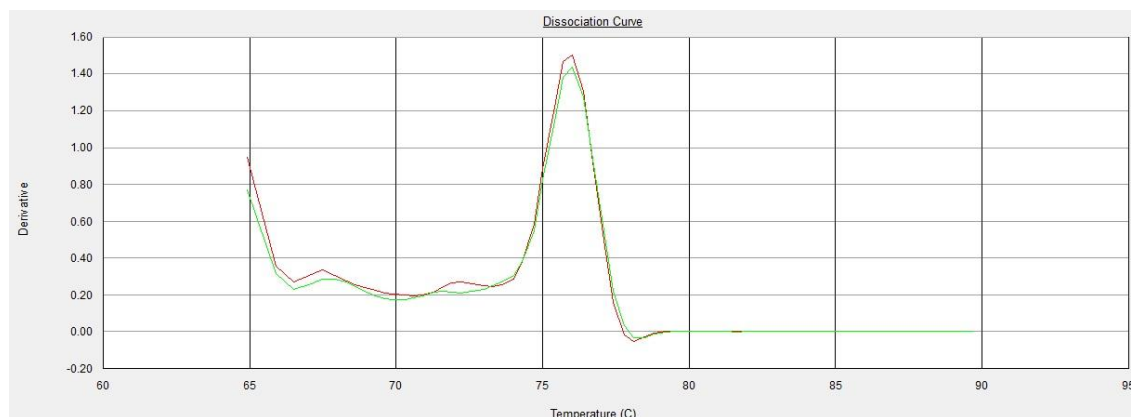


Figura 10: Curva de dissociação do *sma-miR-new_4-5p*. A curva de dissociação característica é representada com apenas um pico de amplificação.

3.3.7. Análises estatísticas

A expressão gênica relativa dos miRNAs nos diferentes estágios do parasita foi comparada utilizando a análise da variância por ONE-WAY (Teste de Tukey ou T-Student). A significância estatística foi considerada com $p < 0.05$. A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 5.

3.3.8. Critérios para a caracterização da expressão dos miRNAs

Para caracterizar efetivamente a expressão dos miRNAs nos diferentes estágios do parasita, foram estabelecidos alguns critérios para garantir que os miRNAs analisados de fato são expressos. O primeiro critério foi a verificação da curva de dissociação de cada miRNA, como já descrito anteriormente (seção 3.3.6). O segundo critério foi a verificação dos valores de ct obtidos a partir dos dados brutos gerados pela reação de qRT-PCR. Optou-se por considerar como miRNAs expressos aqueles que obtiveram valores de $ct \leq 35$ (Becker *et al.*, 2010). O terceiro critério foi verificar a presença de

amplicons inespecíficos para cada miRNA analisado, em gel de agarose como descrito em 3.3.5, de forma que miRNAs que apresentaram ausência de banda ou bandas inespecíficas foram excluídos de posteriores análises.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Conservação e características estruturais de miRNAs de *S. mansoni*

Neste trabalho foram investigados 26 miRNAs maduros que foram obtidos a partir de 16 miRNAs precursores previamente identificados por nosso grupo através de ferramentas computacionais específicas (Gomes *et al.*, 2011). A conservação dos miRNAs foi avaliada a partir de suas sequências maduras e precursoras, utilizando a ferramenta BLASTn, na nova versão do banco de dados miRBase. Dentre os 26 miRNAs maduros analisados, foi verificada homologia entre as sequências depositadas no banco apenas para os miRNAs *sma-miR-212* e *sma-miR-281*. Além disso, o *sma-miR-2162_3p* apresentou homologia apenas para a sequência de *S. japonicum*, sugerindo que esse miRNA seja específico do gênero *Schistosoma*. Contudo, foi demonstrado recentemente através de sequenciamento de última geração e filogenia molecular que o *sma-miR-2162* é específico de Platelminhos (Marco *et al.*, 2013). Os outros 24 miRNAs que não apresentaram conservação evolucionária, possivelmente podem ser gênero-específicos, necessitando de uma avaliação mais minuciosa em bancos de dados específicos de outras espécies do gênero, como *Schistosoma japonicum* e *Schistosoma haematobium*. Tanto os *sma-miR-212*, o *sma-miR-2162-3p* e *sma-miR-281* já foram identificados em outros trabalhos por abordagens computacionais, clonagem e sequenciamento de última geração (Simoes *et al.*, 2011; Marco *et al.*, 2013).

A **Tabela 4** mostra os miRNAs conservados e não conservados e sua classificação em intergênicos e intrônicos. Para os miRNAs que foram classificados como intrônicos, foram feitas buscas utilizando ferramentas como BLASTn e alinhamentos por ClustalX para verificar seus possíveis genes hospedeiros (**Tabela 5**). A Tabela 6 mostra as sequências precursoras dos miRNAs e a **Tabela 7** suas características estruturais e termodinâmicas que garantem que o precursor do miRNA adote uma estrutura secundária estável no sistema biológico. Podemos observar que o tamanho das sequências precursoras variou entre 71 a 100nt e o conteúdo GC entre 30 a 44,74%, caracterizando estruturas de miRNAs. Os parâmetros de energia mínima livre (MFE, AMFE, MFEI, MFEE) indicam a capacidade de dobramento da sequência precursora e a formação de um grampo, o que permite a formação do miRNA precursor. A partir das sequências precursoras dos miRNAs foi possível prever suas estruturas secundárias que formam um grampo, também chamado de *hairpin* ou *stem-loop*, pela

ferramenta computacional RNAfold. A **Figura 11** mostra a estrutura secundária predita para o *sma-miR-new_12*. As demais estruturas estão apresentadas no **Anexo A**.

Tabela 4: Análise “in silico” de miRNAs maduros de *S. mansoni*.

	Conservação		Classificação	
	Conservados	Não conservados	Intergênicos	Intrônicos
Nº miRNAs	2	24	21	5
miRNAs	<i>sma-miR-212</i> <i>sma-miR-281</i>	*	*	<i>sma-miR-212</i> <i>sma-miR-new-6_3p</i> <i>sma-miR-new-6_5p</i> <i>sma-miR-new-8_3p</i> <i>sma-miR-new-8_5p</i>

*Os miRNAs não-conservados e/ou intergênicos não estão demonstrados.

Tabela 5: miRNAs precursores intrônicos e seus genes hospedeiros em *S. mansoni*.

miRNA precursor	Gene hospedeiro	Região	Produto gênico
<i>sma-miR-212</i>	Smp_143490	Íntron 2	DNA replication licensing factor MCM5
<i>sma-miR-new_6</i>	Smp_144770	Íntron 1	Hypothetical protein
<i>sma-miR-new_8</i>	Smp_153410	Íntron 3	Serine: threonine protein phosphatase 2A

Podemos observar que o gene hospedeiro do miRNA precursor *sma-miR-new_6* corresponde a uma proteína hipotética, ou seja, uma proteína que apesar de ter sua sequência depositada em bancos de dados ou sua estrutura caracterizada, essa não apresenta homologia com nenhuma proteína de outro organismo que está bem caracterizada e validada, ou ainda não apresenta resultados experimentais que lhe atribuam uma função no *S. mansoni*.

Tabela 6: miRNAs e suas sequências precursoras em *S. mansoni*.

miRNA	Sequência Precursora
<i>sma-miR-212</i>	CAACUUGGAUUGAU AUGCUGUAUGACAU AUGAGUAGGUAGUGAAAUAAAUAUCUGUACUCAUAGGUAACAGUCUACAGUCAUGGAUA
<i>sma-miR-2162</i>	CUAGGGGAUGAGUGGGAUGGUUGCAU AU AUACA AUGCUGACAAUGUAUUAUGCAACGUUUCACUCUACCCCAGGGA
<i>sma-miR-250</i>	UCCUUUUAGAUUGUUGAGAUCAUGAGUCAAUUCAAGCUAGAACACCAUGGAAAACCGGUCUACCUUCAGUUGACUCAUGAUCUCAACU AUGUAAAUA
<i>sma-miR-281</i>	GUUCUGAUGGAGAGAGACUUUU AUGACGGAAAUAUGAAAUCUUCGAAUUUUAUGAAGUCCAUA AUGUCAUGGAGUUGCUCUAUAUCAGGUU
<i>sma-miR-92a</i>	GGAUUGCACUAGUCACGGCUUUUCACUAGAACUCCAAGAGUUACAUGGUGAAGCUAGUUACUAGUGAACAC
<i>sma-miR-9c</i>	AUUGAGGGAUGUAGCUUAUUUAGAUUAACCAAAGGUUU AU AUAAUUAGAGUUGUGAUAAUCUUUGGUUUCAAUCUGAAGACGAUUCUAAUCCUUCAGC
<i>sma-miR-new_2</i>	ACUACUAUGGAAAACCGUGAAAAGUACUGGAUGGCUGUUUCGUCUU AUUGUGGGAUUUCUCUGUCCAGUGUUCCAAGUUUCCAUGGUGAU
<i>sma-miR-new_3</i>	GGUAAAUGCUUCCCUAACCUAACAGAUAGGAUAGAAAUCAU AUUUCAGAU AUUGAUUUUCUUCUGAUGCUUCUGUGGUUUUGGAAUGGAUU AUGU
<i>sma-miR-new_4</i>	GGUCUCU AACAGUAU AUGGUGUAAGCCCU AUGACUGGAUGCAGGUAAGUA AUGCUUGUUCCACGAUGCUCGCUUACCCAUAUCUGCUAGAGUAU
<i>sma-miR-new_5</i>	GAAAUA AUUCUAGAAACUGAAAUUUAAAUA AUUCCAAAGUUUCGUCCAGCAAACUUGUAUGGACUUCUUCGGGAUAAUUUCAAUUCUGAGAU AUUUC
<i>sma-miR-new_6</i>	AGCACAUGAUAAUUCUCAGUAUGUGGUUGUGGAGGUUGGUCGGUUCAUGAUUCAAUCUCCACAAUCUCAUACUAAAGAUUAGAUGUUUA
<i>sma-miR-new_8</i>	GUGUAGUCAAACAUAAUCAGUGUAAACCGACGCACGUGUGCGUUAGCCCAGGUUGUCAUACUGAUUCAGUAUGACUAGGU
<i>sma-miR-new_12</i>	GCCCCGGGCAGAAUCACAGCUCACACACAAUAAAUCAU UUCUACCACUGACCUCUUGUU AUUGUGUUGAGCAUAUGUAUUUUGUGCCCGUUU
<i>sma-miR-new_13</i>	ACGUCAAUUGAAGCUAGACUACCAUGGAAAACUGUCUAGUGCUUUUAGGUUUUCAUGAUGGUCUAGCUUCAAUUGAUUC
<i>sma-miR-new_15</i>	UUAAUCA AUGUUAAACCAUCAUUGUAAACUUGGAAGCGCAAGUCAUUGAGUUCUUCAGGUUUCCAUGGUGACCUAACAUUUAUCGG
<i>sma-miR-new_16</i>	CGGCAAAAUGAAUAAAAGUGAUCAUUCGAUUU AACUUGUGAACGUUCAUUUUAUGAACAUUACAAGCGAUCACUUUUUAUCAUUUUGUUG

Tabela 7: Características estruturais e termodinâmicas dos miRNAs precursores de *S. mansoni*.

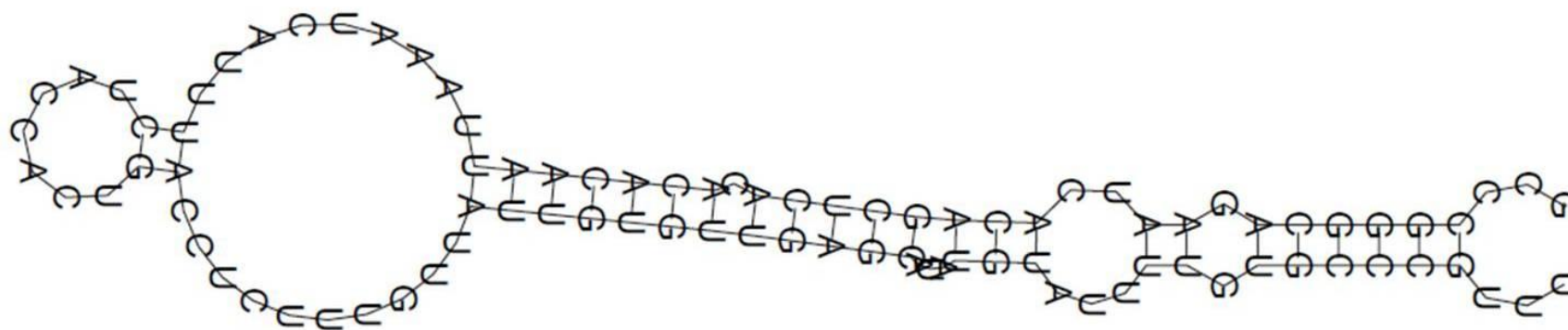
miRNA ID	Tamanho	Conteúdo GC (%)	MFE	AMFE	MFEI	MFEE	Frequência (%)	Diversidade (%)	Cromossomo/ Scaffold	Início	Fim	Fita	Região Genômica
<i>sma-miR-212</i>	87	34.48	-21.50	-24.71	-0.72	-20.50	7.10	6.21	Schisto_mansoni.Chr_2	29111488	29111574	(-)	Intrônica
<i>sma-miR-2162-3p</i>	76	44.74	-33.30	-45.92	-1.03	-34.30	9.12	4.72	Schisto_mansoni. SC_0049	36185	36260	(+)	Intergênica
<i>sma-miR-250</i>	100	36.00	-44.10	-44.40	-1.23	-44.40	20.54	2.83	Schisto_mansoni. SC_0125	24702	24801	(+)	Intergênica
<i>sma-miR-281</i>	98	34.69	-29.00	-37.35	-1.08	-34.40	9.43	15.87	Schisto_mansoni.Chr_4	27195935	27196032	(-)	Intergênica
<i>sma-miR-92a</i>	71	43.66	-23.40	-35.21	-0.81	-25.00	28.79	3.17	Schisto_mansoni.Chr_3	22956805	22956875	(-)	Intergênica
<i>sma-miR-9c</i>	99	31.31	-27.20	-30.51	-0.97	-29.67	8.28	6.21	Schisto_mansoni.Chr_2	21913217	21913315	(+)	Intergênica
<i>sma-miR-new_2</i>	92	41.30	-36.20	-40.76	-0.99	-37.2	14.83	5.81	Schisto_mansoni.Chr_6	4070791	4070882	(+)	Intergênica
<i>sma-miR-new_3</i>	99	34.34	-25.80	-29.19	-0.85	-25.4	3.05	9.67	Schisto_mansoni.Chr_3	13891083	13891181	(+)	Intergênica
<i>sma-miR-new_4</i>	97	43.30	-33.40	-33.91	-0.78	-32.89	5.83	6.08	Schisto_mansoni.Chr_2 .unplaced.SC_0120	6469	6565	(-)	Intergênica
<i>sma-miR-new_5</i>	99	30.30	-32.10	-32.63	-1.08	-32.3	39.36	3.03	Schisto_mansoni.Chr_W	24055623	24055721	(+)	Intergênica
<i>sma-miR-new_6</i>	90	36.67	-32.60	-38.89	-1.06	-34.4	16.07	7.87	Schisto_mansoni.Chr_7 .unplaced.SC_0100	956192	956281	(-)	Intrônica
<i>sma-miR-new_8</i>	81	44.44	-29.90	-38.64	-0.87	-31.3	21.03	2.77	Schisto_mansoni.Chr_5	2556921	2557001	(-)	Intrônica
<i>sma-miR-new_12</i>	93	41.94	-24.10	-28.28	-0.67	-26.11	11.12	9.63	Schisto_mansoni.Chr_W	3892016	3892108	(+)	Intergênica
<i>sma-miR-new_13</i>	80	37.50	-41.60	-52.00	-1.39	-39.9	27.78	3.82	Schisto_mansoni. SC_0041	1513726	1513805	(+)	Intergênica
<i>sma-miR-new_15</i>	89	38.20	-29.10	-33.03	-0.86	-29.2	11.66	5.65	Schisto_mansoni.Chr_W	30576111	30576199	(-)	Intergênica
<i>sma-miR-new_16</i>	90	30.00	-32.30	-35.67	-1.19	-32.1	10.44	4.27	Schisto_mansoni.Chr_W	35229680	35229768	(+)	Intergênica

MFE: Energia Mínima Livre;

AMFE: Energia Mínima Livre Ajustada;

MFEI: Índice de Energia Mínima Livre;

MFEE: Energia Mínima Livre do Conjunto termodinâmico.

**Precursor do *sma-miR-new_12*****MFE = -21.10**

GCCCGGGCAGAAUCACAGCUCACACACAAUUAUAUCAUUUCUACCACUGACCUCUUUGUU
 AUUGUGUUGAGCAUAUGUAUUUUGUGCCCGUUU.

Sequências maduras*sma-miR-new_12-3p*

UUUGUUAUUGUGUUGAGCAUUAU

sma-miR-new_12-5p

AUCACAGCUCACACACAAUUA

Figura 11: Estrutura secundária predita do miRNA *sma-miR-new_12*. A estrutura secundária do *sma-miR-new_12* adota uma forma de grampo e pode originar dois miRNAs maduros a partir das sequências localizadas no braço 3p e 5p do precursor.

4.2. Caracterização da expressão gênica de miRNAs de *S. mansoni*

Embora as predições computacionais de miRNAs apresentem grande utilidade para a identificação e entendimento a cerca da evolução desses pequenos RNAs, metodologias como sequenciamento de nova geração, qRT-PCR, *Northern Blot*, e clonagem são necessárias e tem sido utilizadas para validar a existência desses miRNAs, verificar seus perfis de expressão, assim como detectar novas sequências no gênero *Schistosoma* (Wang *et al.*, 2010; Cai *et al.*, 2011; Simoes *et al.*, 2011; Cai *et al.*, 2013; Marco *et al.*, 2013). Alguns trabalhos já foram realizados mostrando a expressão diferencial de miRNAs entre os estágios de esquistossômulos e vermes adultos de *S. japonicum*; estágios larvais, vermes adultos e ovos de *S. japonicum* (cercária, esquistossômulo, vermes macho e fêmea e ovos), e entre esquistossômulos e vermes adultos de *S. mansoni* (Xue *et al.*, 2008; Hao *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010; Cai *et al.*, 2011).

Nesse trabalho foi utilizada a técnica de qRT-PCR para caracterizar experimentalmente a expressão de 26 miRNAs maduros durante os seguintes estágios do parasita: cercária, esquistossômulos transformados mecanicamente nos tempos de 3,5 horas (EMT-3,5 h) e 24 horas (EMT-24 h), vermes adultos e ovos. Esta técnica apresenta alta sensibilidade e tem a vantagem de utilizar baixas quantidades de RNA. Os resultados foram expressos usando os níveis de expressão dos miRNAs em relação ao controle endógeno U6. Para os 26 miRNAs analisados, observou-se uma expressão considerada real para 9 destes, seguindo os critérios estabelecidos na seção 3.3.8 em materiais e métodos (curva de dissociação, valores de ct e amplicons em gel de agarose). Os valores de ct variaram entre 18 e 35, refletindo variados padrões de expressão encontrados para os miRNAs em análise. Segundo alguns autores, valores de ct próximos a 20 são ideais para miRNAs maduros, enquanto valores entre 25 e 35 são típicos. Valores de ct >35 são muitas vezes considerados *background* ou ruídos da técnica de qRT-PCR (Mestdagh *et al.*, 2008; Becker *et al.*, 2010).

Na **Figura 12** estão agrupados os miRNAs *sma-miR-2162-3p*, *sma-miR-new_2-5p* e *sma-miR-new_16-3p*, onde os dois primeiros não apresentaram diferenças significativas no padrão de expressão gênica entre os estágios analisados. Verificamos que o *sma-miR-2162-3p* apresentou níveis de transcritos em até 36 vezes maiores quando comparado com o *sma-miR-new_2-5p* e *sma-miR-new_16-3p*. Além disso, o

sma-miR-2162-3p se apresentou como o miRNA mais expresso em comparação a todos os outros analisados nesse estudo.

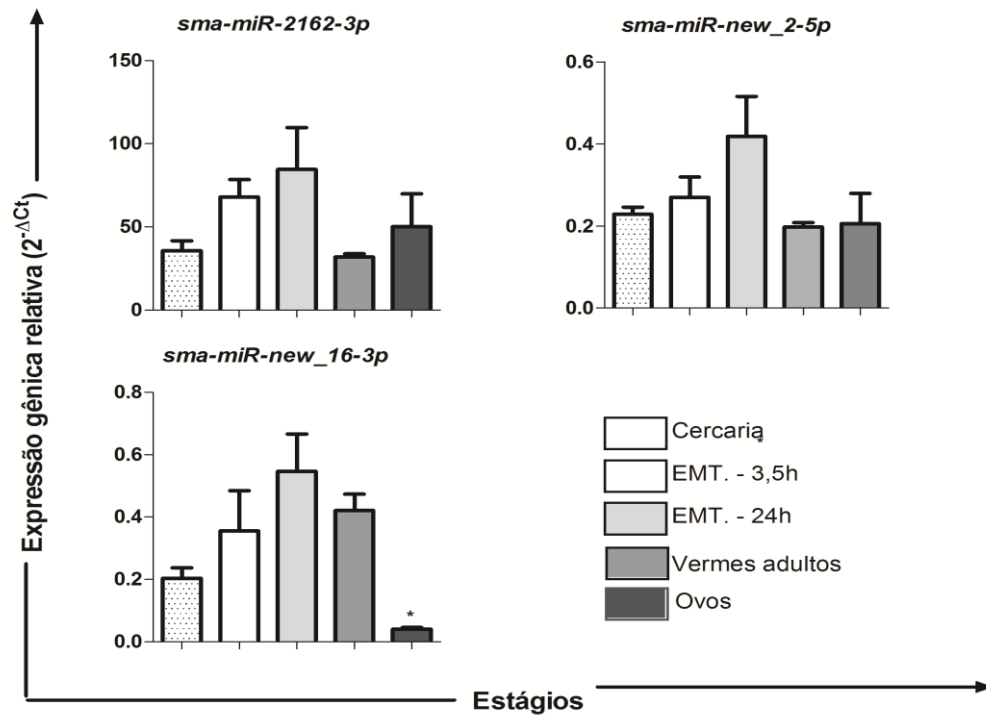


Figura 12: Perfis de expressão dos miRNAs *sma-miR-2162-3p*, *sma-miR-new_2-5p* e *sma-miR-new_16-3p* durante o ciclo de vida de *S. mansoni*. Os níveis de expressão foram avaliados baseados em 3 réplicas biológicas durante os seguintes estágios: cercária, esquistossômulos mecanicamente transformados (EMT- 3,5 h e EMT-24h), vermes adultos e ovos usando qRT-PCR. Os níveis de expressão foram calibrados de acordo com o método $2^{-\Delta Ct}$. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de ANOVA *oneway* (Tukey) com $p < 0,05$. Sinais de diferenças estatísticas: * diferente de cercaria, ** diferente de EMT-3.5 h, *** diferente de EMT-24 h, # diferente de verme adulto.

A **Figura 13** mostra o padrão de expressão dos miRNAs *sma-miR-new_12-5p* e *sma-miR-new_13-5p*, que apresentaram níveis de transcritos mais acentuados nos estágios larvais, principalmente para os estágios de esquistossômulos mecanicamente transformados (EMT-3,5 h e EMT-24h). Observamos também uma *up-regulation* nos níveis de expressão do miRNA *sma-miR-new_13-5p* em até 4 vezes no estágio de esquistossômulos mecanicamente transformados no tempo de 24 h (EMT-24 h) comparado aos estágios de vermes adultos e ovos. Sugerimos que esse grupo de miRNAs tenha uma maior atuação na regulação da expressão gênica nos estágios de cercária e esquistossômulos mecanicamente transformados (EMT-3,5h e EMT-24h) em comparação com vermes adultos e ovos.

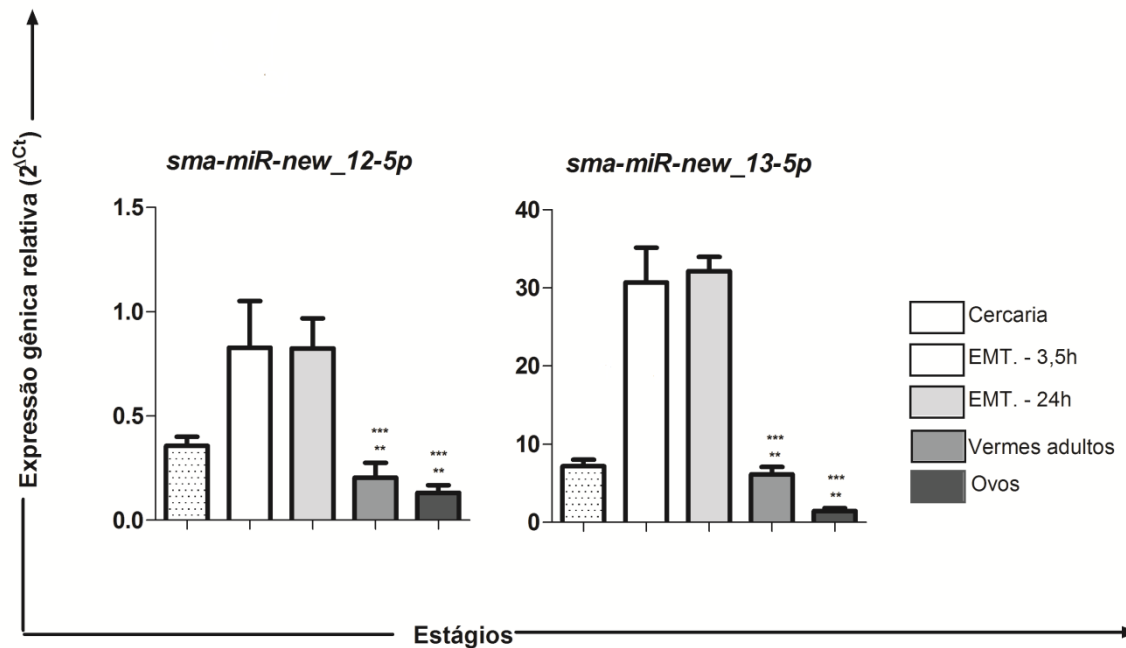


Figura 13: Perfis de expressão dos miRNAs *sma-miR-new_8-5p*, *sma-miR-new_12-5p*, *sma-miR-new_13-3p* e *sma-miR-new_13-5p* durante o ciclo de vida de *S. mansoni*. Os níveis de expressão foram avaliados baseados em 3 réplicas biológicas durante os seguintes estágios: cercária, esquistossômulos mecanicamente transformados (EMT- 3,5 h e EMT-24h), vermes adultos e ovos usando qRT-PCR. Os níveis de expressão foram calibrados de acordo com o método $2^{-\Delta C_t}$. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de ANOVA *oneway* (Tukey) com $p < 0,05$. Sinais de diferenças estatísticas: * diferente de cercaria, ** diferente de EMT-3.5 h, *** diferente de EMT-24 h, # diferente de verme adulto.

Outro grupo de miRNAs (*sma-miR-250*, *sma-miR-92a*, *sma-miR-new_4-3p* e *sma-miR-new_4-5p*) apresentou maior nível de transcritos nos estágios de vermes adultos (**Figura 14**), evidenciando o envolvimento específico desses miRNAs com esse estágio e a possibilidade de exercerem funções importantes em vermes macho e fêmea.

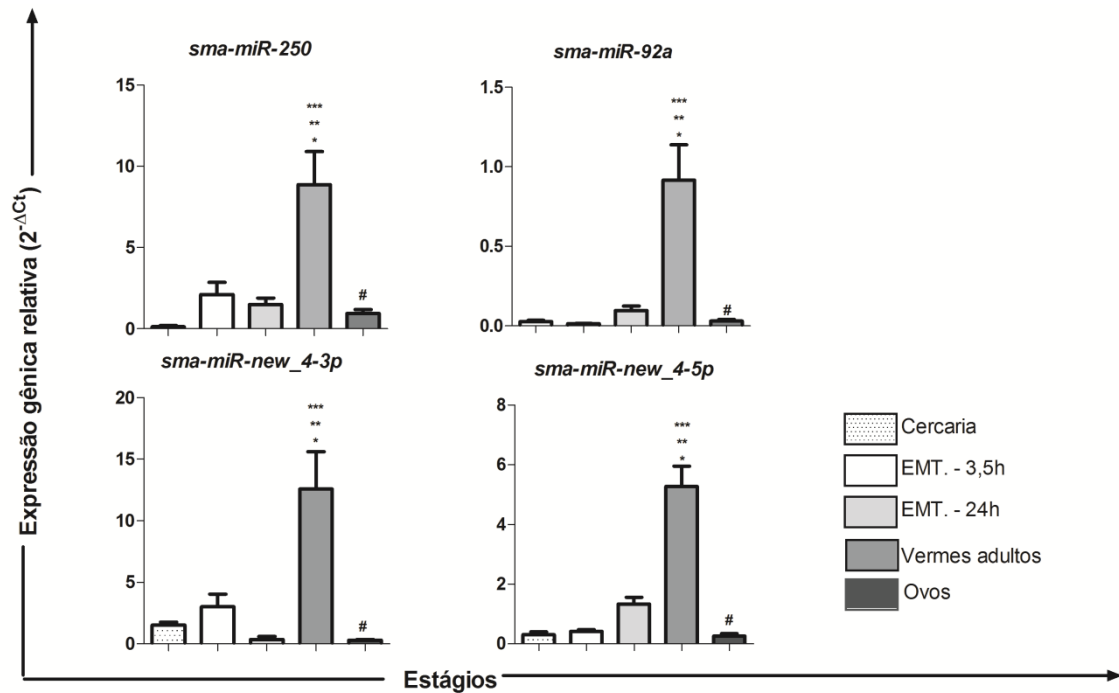


Figura 14: Perfis de expressão dos miRNAs *sma-miR-250*, *sma-miR-92a*, *sma-miR-new_4-3p* e *sma-miR-new_4-5p* durante o ciclo de vida de *S. mansoni*. Os níveis de expressão foram avaliados baseados em 3 réplicas biológicas durante os seguintes estágios: cercária, esquistossômulos mecanicamente transformados (EMT- 3,5 h e EMT-24h), vermes adultos e ovos usando qRT-PCR. Os níveis de expressão foram calibrados de acordo com o método $2^{-\Delta Ct}$. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de ANOVA *oneway* (Tukey) com $p < 0,05$. Sinais de diferenças estatísticas: * diferente de cercaria, ** diferente de EMT-3.5 h, *** diferente de EMT-24 h, # diferente de verme adulto.

Uma observação interessante foi a detecção de expressão de ambos os miRNAs maduros *sma-miR-new_4-3p* e *sma-miR-new_4-5p*, provenientes de um mesmo precursor, corroborando com dados da literatura que mostram que ambos os braços 5p e 3p do mesmo miRNA precursor podem originar miRNAs maduros que atuam na regulação de genes (Li, Tsai, *et al.*, 2012). Li, Liao, *et al.* (2012) demonstraram que miRNA maduros originados do braço 5p e 3p de um mesmo precursor têm diferentes preferências por tecidos, onde alguns são expressos em tecidos normais e outros em tecidos tumorais. Outros trabalhos também já demonstraram que ambos os miRNAs maduros 3p e 5p são expressos em alguns tipos de doenças e podem apresentar efeitos distintos (Jiang *et al.*, 2010; Almeida, M. I. *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2013).

Aqueles miRNAs que não apresentaram curvas de dissociação com picos definidos ou que apresentaram picos inespecíficos, foram desconsiderados dessas

análises. Novos experimentos serão realizados para conhecer o perfil de expressão deste conjunto de miRNAs, a saber: *sma-miR-212*, *sma-miR-9c*, *sma-miR-new_2-3p*, *sma-miR-new_3-3p*, *sma-miR-new_3-5p*, *sma-miR-new_5-3p*, *sma-miR-new_6-3p*, *sma-miR-new_6-5p*, *sma-miR-new_8-3p*, *sma-miR-new_12-3p*, *sma-miR-new_15-3p*, *sma-miR-new_15-5p* e *sma-miR-new_16-5p*. Para a análise dos amplicons em gel de agarose, consideraram-se aqueles miRNAs que apresentaram uma banda única em torno de 100pb. A **Figura 15** exemplifica um resultado de validação positivo e um negativo. Todos os géis referentes aos miRNAs analisados estão apresentados no **Anexo B**.

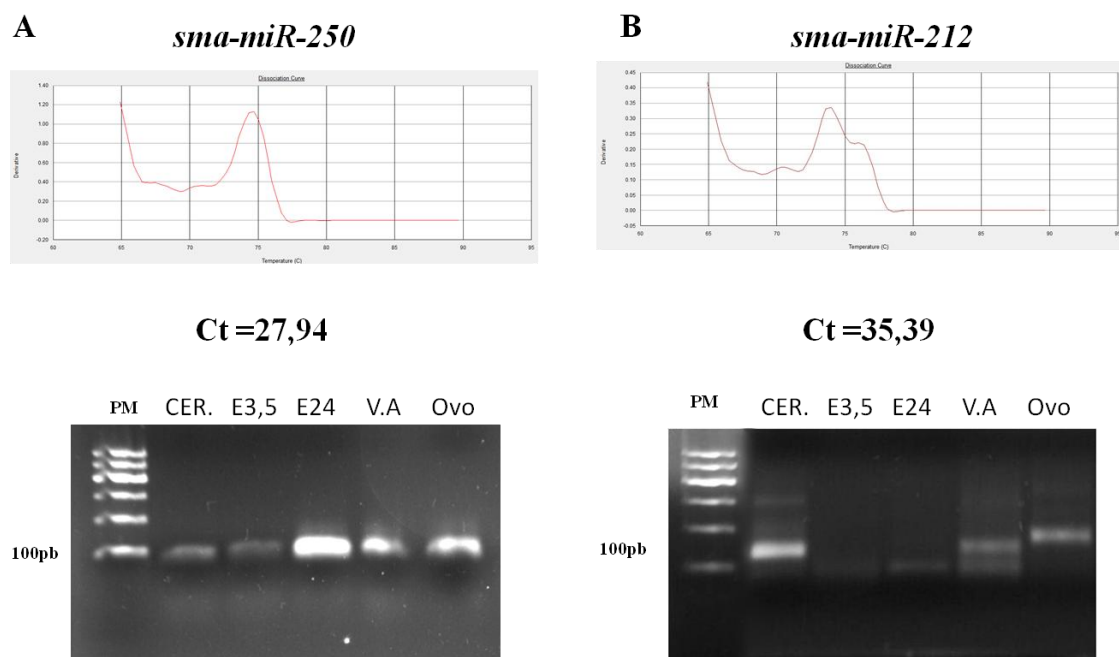


Figura 15: Critérios de avaliação para caracterizar a expressão dos miRNAs. **A)** Resultado Positivo – curva de dissociação do *sma-miR-250* apresentando pico definido, valor de ct dentro do intervalo aceito e presença de bandas única em gel de agarose referentes aos amplicons para cada estágio analisado. **B)** Resultado Negativo – curva de dissociação de *sma-miR-212* com picos inespecíficos, valor de ct acima do intervalo aceito e presença de bandas inespecíficas nos estágios de cercária, verme adulto e ovo.

A **Figura 16** apresenta um grupo de miRNAs (*sma-miR-281*, *sma-miR-new_5-5p*, *sma-miR-new_8-5p* e *sma-miR-new_13-3p*) que apesar de apresentar uma curva de dissociação dentro dos parâmetros estabelecidos, valores de ct adequados e a presença do amplicom correspondente ao miRNA em torno de 100pb, foi observada a presença de bandas inespecíficas abaixo de 100pb, o que provavelmente reflete a presença de dímeros de primers. Portanto não consideramos a caracterização dos perfis de expressão

desses miRNAs, uma vez que os valores de ct podem ser superestimados devido a presença dos dímeros. Entretanto, não descartamos esses miRNAs das análises *in silico*, uma vez que eles são expressos em *S. mansoni*.

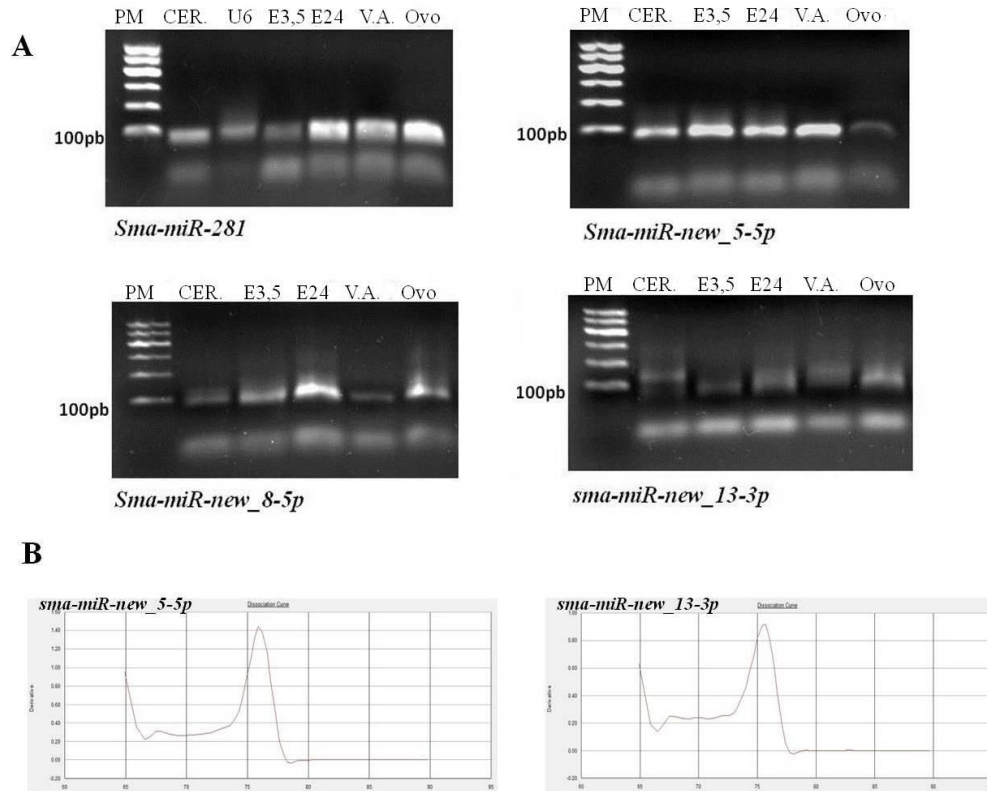


Figura 16: miRNAs não caracterizados experimentalmente: A) A análise dos amplicons em gel de agarose revelou a presença de produtos inespecíficos que provavelmente são dímeros de primers para os miRNAs *sma-miR-281*, *sma-miR-new_5-5p*, *sma-miR-new_8-5p* e *sma-miR-new_13-p*. B) Curva de dissociação dos miRNAs *sma-miR-new_5-5p* e *sma-miR-new_13-3p* dentro dos critérios estabelecidos.

Todos os trabalhos até agora publicados envolvendo os perfis de expressão de miRNAs no gênero *Schistosoma* juntamente com nossas análises, reforçam a hipótese que os miRNAs apresentam um padrão de expressão gênica diferencial no desenvolvimento desses parasitas e podem desempenhar diferentes papéis na modulação do desenvolvimento, maturação e reprodução destes (Xue *et al.*, 2008; Hao *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010; Cai *et al.*, 2011).

4.3. Análise funcional *in silico* – Predição e categorização de alvos dos miRNAs

4.3.1. Predição de alvos e rede de interação miRNA-mRNA

Diferentes algoritmos são utilizados para prever alvos de miRNAs e a maioria deles depende de abordagens baseadas na similaridade de sequências. Esses algoritmos inicialmente buscam por algum grau de complementaridade de sequências entre o miRNA de interesse e a região 3' não traduzida (3'UTR) de mRNAs com ênfase na região *seed* do miRNA (2-8 nucleotídeos). Etapas adicionais são necessárias para refinar a predição de alvos e classificá-los de acordo com a robustez apresentada pelas ferramentas de predição de alvos (Ritchie, Rasko e Flamant, 2013). Neste trabalho, utilizamos o programa de predição miRanda que se baseia na análise da interação do miRNA com regiões 3'UTR de mRNAs, gerando valores de energia livre que representam a força de interação do miRNA com o mRNA (Lindow, 2011). Os parâmetros adotados foram similares aqueles utilizados para prever genes alvos de miRNAs em humanos (John *et al.*, 2004). Alguns ajustes foram feitos com o intuito de aumentar a estringência da predição, sendo considerados apenas valores de $\Delta G \leq -15$ Kcal/mol e dando ênfase apenas à interação com a região *seed* dos miRNAs.

Foram gerados 211 alvos dentro dos genes mapeados para os 13 miRNAs analisados *in silico*. O *sma-miR-new_2-5p* apresentou o maior número de alvos, seguido pelos *sma-miR-new_5-5p* e *sma-miR-new_12-5p* (**Tabela 8**). Além disso, foram observados 61 alvos que codificam proteínas hipotéticas, ou seja, que não demonstram função conhecida ou não apresentam similaridade com outras proteínas descritas em outros organismos. Isso pode ser explicado pelo fato do genoma de *S. mansoni* não estar totalmente anotado e uma grande proporção dos genes codificadores de proteínas tem função desconhecida. Entretanto, como os bancos de dados referentes ao genoma de *S. mansoni* estão em constante atualização e a reanotação de genes acontece com frequência, optamos por fazer buscas periódicas para verificar se nesse grupo de proteínas hipotéticas houve reanotação e/ou a atribuição de função. Dos 61 genes que codificam proteínas hipotéticas, 14 apresentaram reanotação pelo menos no banco de dados GeneDB 5.0. Com relação à interação dos miRNAs com os mRNAs foi possível observar 4 tipos de interação como está descrito na **Figura 17**, demonstrando as várias possibilidades de interação do miRNA com os seus mRNAs alvos.

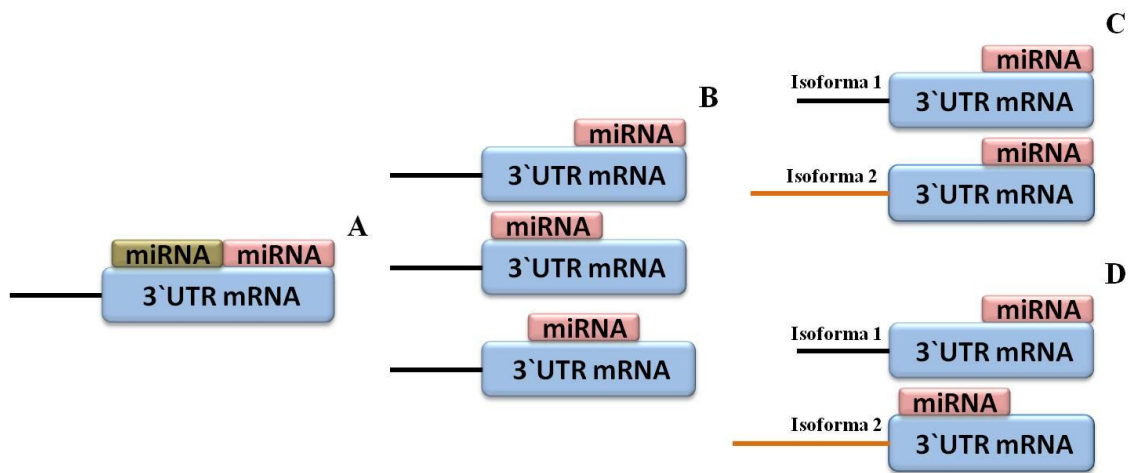


Figura 17: Possibilidades de interação dos miRNAs com a região 3'UTR de mRNAs. A) Dois miRNAs tendo o mesmo alvo em comum e se ligando a regiões 3'UTR distintas. B) O mesmo miRNA interagindo com diferentes regiões 3'UTR de um mesmo mRNA alvo. C) O mesmo miRNA interagindo com duas isoformas de um mesmo gene e se ligando na mesma região 3'UTR em ambas. D) O mesmo miRNA interagindo com duas isoformas de um gene e se ligando em regiões 3'UTR diferentes.

A partir dos resultados obtidos foi possível propor um rede de interação entre cada miRNA e seus alvos a partir da ferramenta Cytoscape 3.0 (**Figura 18**) onde podemos visualizar que os nós centrais correspondem a cada miRNA com seus respectivos alvos circundando sua região. A força de interação do miRNA e seus alvos foi calculada a partir dos valores de ΔG que variaram entre -15,04 a -32,52 Kcal/mol. Quanto menor o valor, maior é a força de interação do miRNA com o seu alvo e mais próximo o alvo está do nó de seu miRNA correspondente. Ao observar a rede de interação, verificamos a presença de alguns alvos que foram preditos para mais de um miRNA, o que reforça a ideia de que um mesmo alvo pode ser regulado por mais de um miRNA. Dos 13 miRNAs demonstrados na rede de interação, 4 não apresentaram alvos em comum com outros miRNAs. A **Figura 19** ilustra em *zoom* uma região da rede de interação em que foi observado a presença de um alvo em comum (*60S_ribosomal_protein_L10*) entre o miRNAs *sma-miR-new_13-3p* e *sma-miR-new_13-5p*, o que sugere que miRNA maduros oriundos do braço 3p ou 5p do mesmo miRNA precursor podem compartilhar alvos. Ao todo, foram contabilizados 9 alvos que são compartilhados por mais de um miRNA. Dois destes alvos em comum são genes de proteínas que participam da composição de subunidades ribossomais (*30S_ribosomal_protein_S12_family* e *60S_ribosomal_protein_L10, putative*).

Tabela 8: miRNAs maduros de *S. mansoni* expressos diferencialmente e seus respectivos alvos preditos.

miRNA ID	Tamanho	Localização	Sequência madura	Região <i>seed</i>	Nº de alvos	Alvo (melhor <i>hit</i> miRanda)
<i>sma-miR-2162-3p</i>	21	3`	UAUUAUGCAACGUUUCACUCU	AUUAUGC	9	Smp_064050.2_ruvb-related_reptin_and_pontin
<i>sma-miR-250</i>	22	3`	CCUUCAGUUGACUCAUGAUCUC	CUUCAGU	12	Smp_167500_ap_endonuclease,_putative
<i>Sma-miR-92a</i>	22	5`	GAUUGCACUAGUCACGGCUUUU	AUUGCAC	15	Smp_162410_dishevelled,_putative
<i>sma-miR-new_2-5p</i>	22	5`	UGGAAAACCUUGUGAAAGUACUG	GGAAAAC	45	Smp_150340_monocarboxylate_transporter
<i>sma-miR-new_4-3p</i>	22	3`	UCGCUUUACCCAUAUCUGCUAG	CGCUUUA	6	Smp_003660_DEAD_box_ATP-dependent_RNA_helicase,
<i>sma-miR-new_4-5p</i>	22	5`	UGCAGGUAAGUAAUGCUUGUU	GCAGGUA	19	Smp_073930.2_rac-alpha_serine_threonine-protein
<i>sma-miR-new_12-5p</i>	22	5`	AUCACAGCUCACACAAUUA	UCACAGC	20	Smp_067990.1_ubiquitin_conjugating_enzyme_E2
<i>sma-miR-new_13-5p</i>	22	5`	AGCUAGACUACCAUGGAAAACU	GCUAGAC	16	Smp_150340_monocarboxylate_transporter
<i>sma-miR-new_16-3p</i>	22	3`	AUUACAAGCGAUCACUUUAUA	UUACAAG	10	Smp_074470_30S_ribosomal_protein_S12

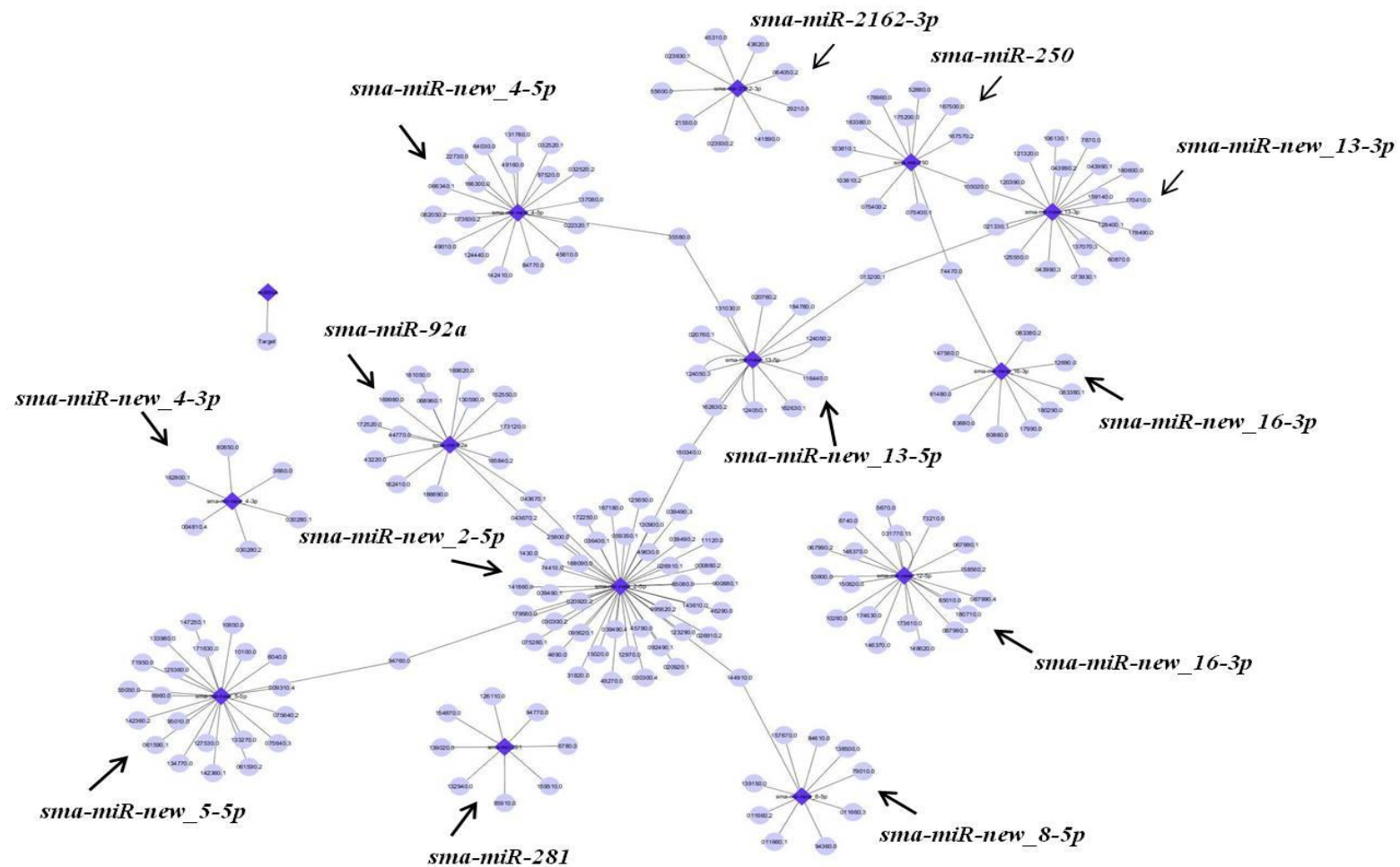


Figura 18: Rede de interação entre miRNA-mRNAs. A rede ilustra a interação miRNA-mRNA a partir dos valores de ΔG gerados. Quanto menor o valor de ΔG mais próximo o mRNA está do nó central que corresponde ao miRNA, representando maior força de interação entre eles.

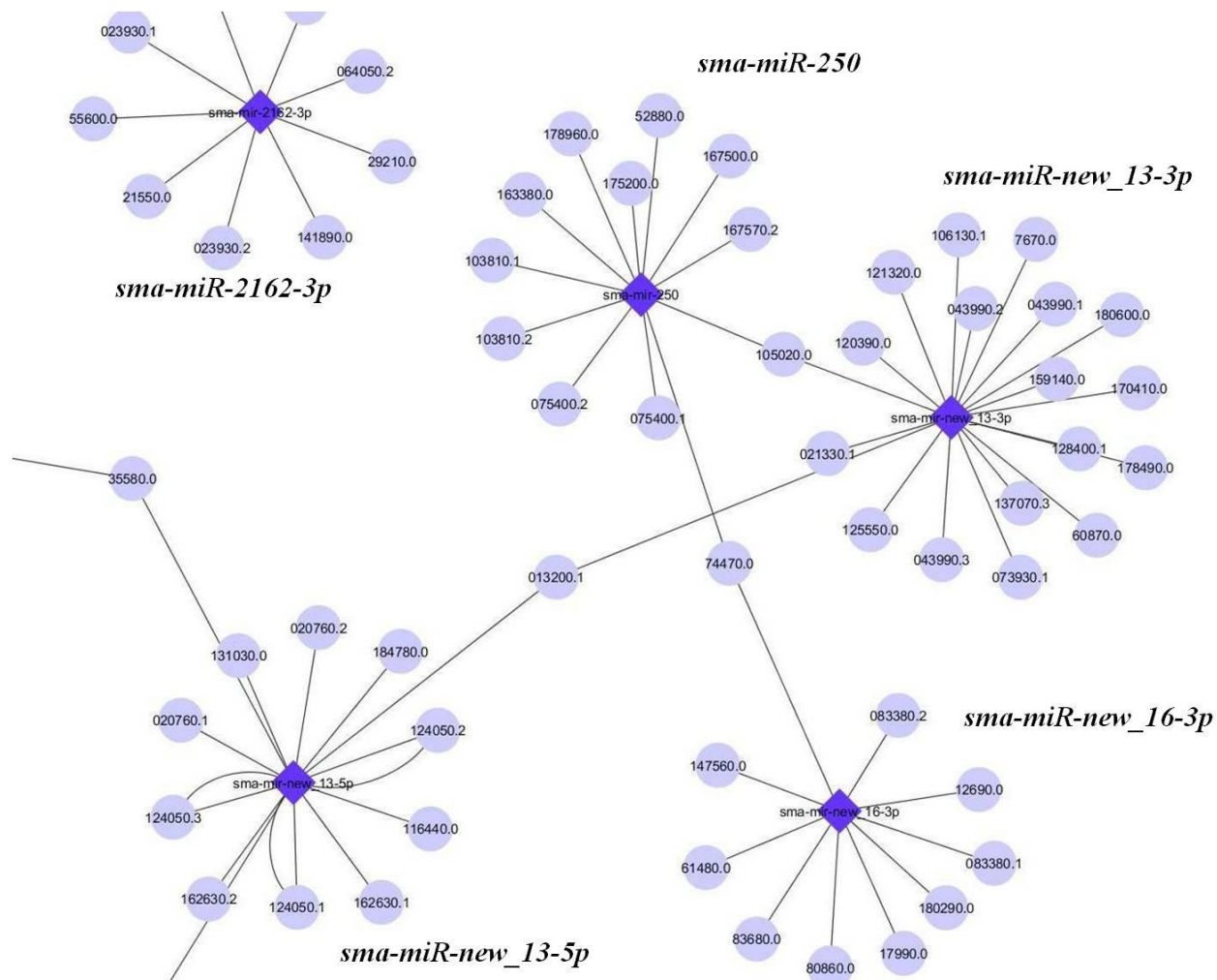


Figura 19: Parte da rede de interação de miRNA-mRNA em zoom. Os miRNAs *sma-miR-new_13-3p* e *sma-miR-new_13-5p* compartilham um alvo, sugerindo que miRNAs 3p e 5p oriundos de um mesmo precursor podem apresentar alvos em comum.

4.3.2. Categorização funcional dos alvos.

Através da ontologia gênica, podemos aferir a correlação dos miRNAs, seus alvos e as vias metabólicas envolvidas, o que nos permite avaliar e anotar funcionalmente um miRNA e ter conhecimento da rota bioquímica em que o gene alvo está relacionado. Para os 9 miRNAs caracterizados experimentalmente nesse trabalho e os outros 4 miRNAs os quais não descartamos das análises *in silico*, foi feita a ontologia dos seus alvos preditos com a finalidade de saber a quais associações estes estariam relacionados (processo biológico, função molecular e componente celular). Os termos de ontologia gênica (“*GO terms*”) de cada gene alvo foram recuperados no banco de dados do parasita (GeneDB) e sua associação com vias metabólicas foi feita através da Enciclopédia de genes KEGG. Além disso, foi feita uma busca através da ferramenta TargetScan para obter miRNAs de outros organismos envolvidos na mesma função biológica que os analisados nesse estudo.

Com os resultados da ontologia gênica observamos alvos envolvidos em diferentes processos celulares e selecionamos 21 genes alvos relacionados a importantes processos biológicos para o parasita, como o metabolismo energético, metabolismo de glicose e lipídeos, via TGF- β , sistema ubiquitina-proteassoma, evasão do sistema imune e regulação da transcrição. Curiosamente, observamos que grande parte dos alvos selecionados está envolvida no processo de fosforilação oxidativa, característico do metabolismo energético aeróbico mitocondrial, o que despertou nosso interesse em investigá-los, uma vez que já é relatada a importância do metabolismo energético durante o ciclo de vida de *S. mansoni* (**Tabela 9**). Além disso, também verificamos a presença de 6 alvos preditos relacionados ao sistema ubiquitina-proteassoma que tem grande importância na biologia do parasita, como será discutido nos tópicos seguintes.

Tabela 9: miRNAs e ontologia gênica de seus alvos em *S.mansoni*.

miRNA ID	Alvo	GeneDB	Processo Biológico	Função Molecular	Localização celular	miRNA com função ortóloga.
<i>sma-mir-281</i>	TGF- β signal transducer Smad2	Smp_085910	TGF- β pathway (GO:0007179)	Sequence-specific DNA binding transcription factor activity (GO:0003700)	Cytoplasm (GO:0005737)	hsa-miR-425 (NM_001003652)
<i>sma-mir-new_2-5p</i>	ATP synthase lipid-binding protein-like protein	Smp_000880.1/2	Oxidative Phosphorylation (GO:0006119)	Proton-transporting ATP synthase activity (GO:0046933)	Mitochondrion (GO:0005739)	hsa-miR-3686(NM_001001937)
	Ubiquinone biosynthesis protein	Smp_001430	Ubiquinone biosynthetic process (GO:0006744)	Protein kinase activity (GO:0004672)	Mitochondrion (GO:0005739)	hsa-miR-548m/hsa-let-7a(NM_016035)
	Lipase maturation factor	Smp_026910.1/2	Protein maturation (GO:0051604)	-----	Endoplasmic reticulum (GO:0005783)	hsa-miR-124/mmu-miR-124(NM_033200)
	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 7	Smp_092490	Oxidative Phosphorylation (GO:0006119)	NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity (GO:0008137)	Mitochondrion (GO:0005739)	hsa-mir-548e/mmu-miR-871-5p (NM_001199981)
	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta	Smp_036400.1	Oxidative Phosphorylation (GO:0006119)	NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity (GO:0008137)	Mitochondrion (GO:0005739)	mmu-miR-541(NM_005004)
	Ubiquitin modifier activating enzyme 5	Smp_045780	Ubiquitin cycle (GO:0006512)	Ubiquitin-like activating enzyme activity (GO:0008642)	Cytoplasm (GO:0005737)	-----
<i>sma-mir-new_4-5p</i>	Cytochrome c type heme lyase	Smp_022320.1	Oxidative Phosphorylation (GO:0006119)	Holocytochrome-c synthase activity (GO:0004408)	Mitochondrion (GO:0005739)	hsa-miR-429/mmu-miR-200c (NM_001122608)
	Proteasome inhibitor PI31 subunit	Smp_066340.1	Regulation of proteasome assembly (GO:0090364)	Endopeptidase inhibitor activity (GO:0004866)	Proteasome core complex (GO:0005839)	hsa-miR-181a/mmu-miR-181b(NM_006814)
	Ubiquitin conjugating enzyme E2	Smp_082050.2	Ubiquitin cycle (GO:0006512)	Ubiquitin-protein ligase activity(GO:0004842)	Cytoplasm (GO:0005737)	-----
	Proteasome_subunit_beta_1 (T01_family)	Smp_025800	Ubiquitin-dependent proteolysis (GO:0006511)	Peptidase activity (GO:0008233)	Cytoplasm (GO:0005737)	

<i>sma-mir-new_5-5p</i>	Lipoic acid synthetase	Smp_010100	Protein lipoylation (GO:0009249)	Lipoate synthase activity (GO:0016992)	Mitochondrion (GO:0005739)	hsa-miR-493(NM_194451)
<i>sma-mir-new_12-5p</i>	Tetraspanin, putative	Smp_174630	-----	-----	Integral to membrane (GO:0016021)	hsa-miR-3189-3p/mmu-miR-3058(NM_147161)
	Ubiquitin conjugating enzyme E2	Smp_067990.1/2/3/4	Ubiquitin cycle (GO:0006512)	Ubiquitin-protein ligase activity(GO:0004842)	Cytoplasm (GO:0005737)	-----
	Acyl coenzyme A thioesterase	Smp_213500	Acyl-CoA metabolic process (GO:0006637)	Acyl-CoA thioesterase activity (GO:0047617)	Peroxisome (GO:0005777)	-----
	Mitochondrial carrier 2	Smp_053800	Transport (GO:0006810)	Transporter activity (GO:0005215)	Mitochondrion (GO:0005739)	hsa-miR-150/mmu-miR-5127(NM_014342)
	Cathepsin B peptidase 1	Smp_085010	Proteolysis (GO:0006508)	Cysteine-type peptidase activity (GO:0008234)	Lysosome (GO:0005764)	hsa-miR-7/mmu-miR-761(NM_001908)
<i>sma-mir-new_13-3p</i>	NADH:ubiquinone oxidoreductase complex I	Smp_170410	Oxidative Phosphorylation (GO:0006119)	NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity	Mitochondrion (GO:0005739)	hsa-miR-4477a(NM_004541)
	Insulin growth factor binding protein 7	Smp_180600	Regulation of cell growth (GO:0001558)	Insulin-like growth factor binding (GO:0005520)	Extracellular region (GO:0005576)	hsa-miR-3935/mmu-miR-688(NM_001553)
<i>sma-miR-new_13-5p</i>	Venom allergen-like (VAL) 6 protein	Smp_124050.1/2/3	Pathogenesis(GO:0009405)	Ion channel inhibitor activity (Go:0008200)	Extracellular region(GO:0005576)	-----
	Ubiquitin activating enzyme E1	Smp_162630.1/2	Ubiquitin cycle (GO:0006512)	Ubiquitin-like activating enzyme activity (GO:0008642)	Cytoplasm (GO:0005737)	-----

4.3.3. miRNAs envolvidos na regulação do processo de fosforilação oxidativa em *S. mansoni*

Desde os anos 70 têm sido relatado que o parasita *S. mansoni* tem a capacidade de mudar seu metabolismo ao longo de seu desenvolvimento, com a finalidade de se adaptar às diversas mudanças ambientais durante um ciclo biológico completo. Esse parasita pode redirecionar o seu metabolismo energético alternando entre o uso de seu estoque de glicogênio e na utilização de glicose proveniente do hospedeiro para abastecer suas necessidades energéticas (**Figura 20**) (Coles, 1972; Skelly e Shoemaker, 1995).

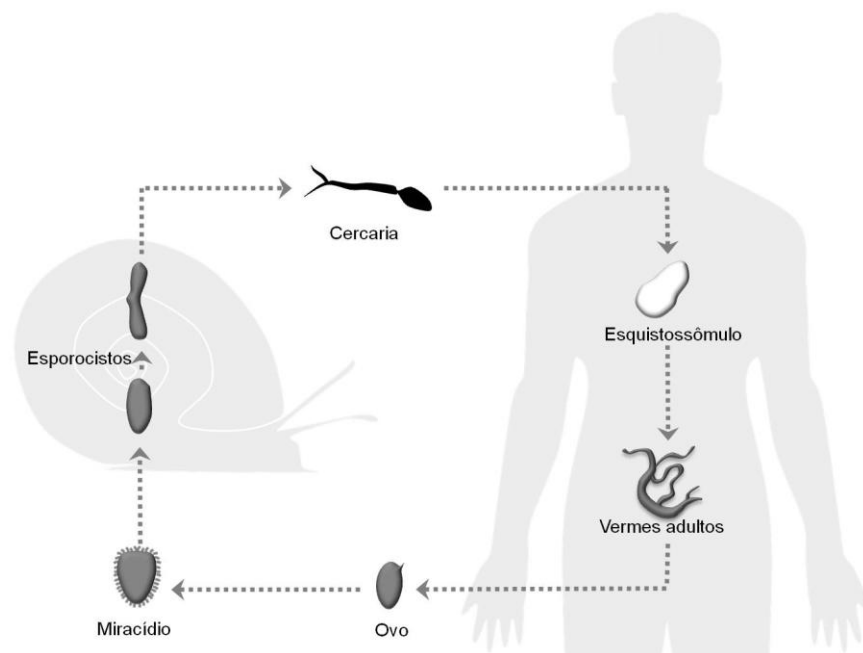


Figura 20: Metabolismo energético aeróbico-anaeróbico durante o desenvolvimento e estágios do ciclo de vida de *S. mansoni*. O estágio de cercária apresenta metabolismo energético aeróbico (representado por coloração em preto), enquanto o estágio de esquistossômulo apresenta metabolismo energético anaeróbico (representado em branco). Já os outros estágios apresentam metabolismo aeróbico ou anaeróbico facultativos (Imagem: Marcela P. Costa).

A literatura estabelece que os estágios de vida livre como ovo, miracídio e cercária dependem principalmente do ciclo de Krebs e da atividade da cadeia respiratória para garantir sua síntese de energia. Contudo, o estágio de miracídio também pode sobreviver na ausência de oxigênio (Tielens, 1994). Uma atenção maior deve ser dada à transição de cercária para esquistossômulo, pois é nessa etapa que ocorre a infecção ao hospedeiro vertebrado, e o parasita se depara com um ambiente

completamente diferente que o meio aquático, necessitando se adaptar rapidamente para garantir o sucesso na infecção. Essa adaptação acontece nos primeiros momentos da penetração da cercária na pele do hospedeiro definitivo, onde esta é exposta às altas taxas de glicose externa, sendo esse o primeiro sinal que irá orientar o parasita a abrir mão de suas reservas de glicogênio e confiar na disponibilidade de glicose oferecida pelo hospedeiro (Thompson *et al.*, 1984; Horemans, Tielens e Van Den Bergh, 1992). Nesse momento, a transformação em esquistossômulo se inicia e o parasita opta por quebrar a glicose em piruvato e lactato, invertendo seu metabolismo energético aeróbico para anaeróbico (Von Kruger *et al.*, 1978; Thompson *et al.*, 1984).

Na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado, cada esquistossômulo mantém o metabolismo anaeróbico até se desenvolver em um verme adulto com sexo definido. Este, gera uma grande quantidade de lactato, embora já seja relatado que um terço do seu metabolismo energético é proveniente do ciclo de Krebs e da cadeia respiratória, sugerindo que os vermes adultos não dispõem do metabolismo aeróbico. Além disso, é relatada a importância do metabolismo aeróbico na produção de ovos pela fêmea (Coles, 1972; Schiller *et al.*, 1975; Vanoordt *et al.*, 1985). Outra comparável transição do metabolismo aeróbico para o anaeróbico ocorre quando o miracídio se diferencia em esporocisto ao penetrar no hospedeiro intermediário (Tielens *et al.*, 1992; Tielens, 1994).

A partir da ontologia gênica, foram selecionados 21 alvos envolvidos em importantes processos celulares para *S. mansoni* que são regulados por sete miRNAs, sendo que quatro (*sma-miR-new_2-5p*; *sma-miR-new_4-5p*; *sma-miR-new_12-5p* e *sma-miR-new_13-3p*) apresentaram pelo menos um ou mais alvos envolvidos na regulação do metabolismo energético do parasita de acordo com suas funções moleculares, processos biológicos e localização celular obtidos por ontologia gênica (**Tabela 9**). Esses genes em sua maioria participam diretamente do processo de fosforilação oxidativa que ocorre na membrana interna mitocondrial. Tendo em vista que o *S. mansoni* enfrenta diversas variações ambientais encontradas principalmente dentro de seus hospedeiros, a habilidade de redirecionar seu metabolismo energético transitando entre o metabolismo aeróbico e anaeróbico é crucial para sua sobrevivência, adaptação e sucesso na infecção aos hospedeiros vertebrados e invertebrados. Sendo assim, mecanismos de regulação da expressão de genes envolvidos no metabolismo energético devem ocorrer nesse parasita, e a partir de nossos resultados sugerimos que

os miRNAs atuam como moléculas que auxiliam a regular os níveis transcricionais desses genes.

Os complexos transportadores de elétrons da cadeia respiratória situados na membrana interna mitocondrial estão funcionalmente ligados por dois carreadores móveis de elétrons, a Coenzima Q e o citocromo C, e a função desses complexos enzimáticos é fazer uma conexão entre a transferência de elétrons com a translocação de prótons para fora da mitocôndria com a finalidade de direcionar a síntese de ATP (Ton *et al.*, 1997). Neste contexto, nossos resultados revelaram 7 genes alvos para os miRNAs analisados, os quais estão envolvidos no processo de fosforilação oxidativa. Desses, 3 são subunidades pertencentes à montagem do Complexo Enzimático I (NADH ubuquinona oxiredutase): *NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 7* e *NADH dehydrogenase (ubiquinone) I beta* como alvos do *sma-miR-new_2-5p* e *NADH ubiquinone oxireductase complex I* como alvo de *sma-miR-new_13-3p*. É possível que para este último alvo (NADH dehydrogenase(ubiquinone) I beta) a anotação no banco de dados GeneDB esteja incorreta, uma vez que no baco de dados NCBI este gene está nomeado como uma proteína hipotética, e ao realizarmos buscas por BLAST e Pfam na tentativa de encontrar outras informações a respeito do gene ou proteína, verificamos que o produto gênico mostrou similaridade com a proteína Complex I intermediate associated protein 30 de *S. japonicum*. Embora não há dados na literatura relatando os perfis de expressão das subunidades do Complexo I no desenvolvimento de *S. mansoni*, o banco de dados de *S. mansoni* (GeneDB) apresenta perfis de expressão baseados em *contigs reading* para a maioria dos genes anotados nos estágios de cercária, esquistossômulo nos tempos de 3,5h e 24h e vermes adultos. Observando esses dados, verificamos que todas as subunidades do Complexo I apresentam baixos níveis transcricionais no estágio de esquistossômulo em comparação com cercária e vermes adultos. Embora não podemos fazer nenhuma correlação de nossos resultados com a expressão desses genes disponível no GeneDB, uma vez que não é adequado comparar dados quantitativos provenientes de metodologias diferentes, ainda sim acreditamos que esses miRNAs devem participar da manutenção dos níveis de expressão destes alvos ao longo dos estágios de desenvolvimento de *S. mansoni*.

Outros genes alvos preditos pelo miRanda foram o *cytochrome C type heme lyase* para o *sma-miR-new_4-5p*, *ATP synthase lipid binding protein-like protein* e *Ubiquinone biosynthesis protein* para o *sma-miR-new_2-5p* e *Mitochondrial carrier 2*

protein para o *sma-miR-new_12-5p*. O *cytochrome C type heme lyase* está diretamente ligado à maturação final do citocromo C1 (Complexo IV) (Skelly, Stein e Shoemaker, 1993) e sua translocação para a membrana interna da mitocôndria, catalisando a adição de um grupo heme e se ligando ao apocitocromo c1 (Nicholson, Stuart e Neupert, 1989). Já o produto do gene *ATP synthase lipid binding protein-like protein* atua no transporte de prótons acoplado à síntese de ATP no Complexo V, enquanto o gene *Ubiquinone biosynthesis protein* está relacionado à síntese de ubiquinona (Coenzima Q), um lipídeo que transporta elétrons pela cadeia respiratória. Tzagoloff e Dieckmann (1990) demonstraram que mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* deficientes na biossíntese de ubiquinona não obtêm sucesso no crescimento em fontes de carbono não fermentáveis, sugerindo que este gene é essencial para o metabolismo energético aeróbico. Finalmente, o gene *Mitochondrial Carrier 2* é um membro de uma família de carreadores mitocondriais que realizam a translocação de ADP/ATP através da membrana mitocondrial (Nury *et al.*, 2006).

Estudos recentes mostraram que a mitocôndria é um dos destinos de pre-miRNAs e miRNAs maduros, o que tem gerado maiores investigações no intuito de desvendar os possíveis papéis dos miRNAs associados à mitocôndria em diferentes processos celulares. A presença de miRNAs em mitocôndrias já foi relatada em fígado de ratos e camundongos, miotubos, células HeLa, 143B, HEK293 e em células musculares humanas (Kren *et al.*, 2009; Bian *et al.*, 2010; Bandiera *et al.*, 2011; Barrey *et al.*, 2011; Mercer *et al.*, 2011; Sripada *et al.*, 2012) e tem sido proposto que estes pequenos RNAs regulam proteínas mitocondriais codificadas pelo núcleo, afetando a homeostase mitocondrial, fosforilação oxidativa, síntese de ATP, apoptose, geração de espécies reativas a oxigênio (ROS) e metabolismo de ácidos graxos em diversas patologias (Aroor *et al.*, 2012). O papel dos miRNAs na regulação da fosforilação oxidativa na mitocôndria ainda não está bem elucidado e o conhecimento disponível é baseado em observações simples. Alguns estudos descreveram o envolvimento do miR-181c no remodelamento do Complexo IV da cadeia transportadora de elétrons em miócitos cardíacos através da regulação do gene *COX1* (*cytochrome oxidase subunit 1*) e a ação do miR-338 agindo como regulador de *COXIV* (*cytochrome oxidase IV*), modulando a oxidação fosforilativa em axônios de neurônios simpáticos (Aschrafi *et al.*, 2008; Das *et al.*, 2012). Ainda, os perfis de expressão alterados do miR-181c e miR-338 reportados em células tumorais indicaram sua importância como possíveis reguladores

do metabolismo energético (Huang, X. H. *et al.*, 2009; Hashimoto *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2011; Lakomy *et al.*, 2011). O miR-210 também tem sido mencionado como um possível regulador da fosforilação oxidativa, apresentando como alvo o gene *COX10*, levando ao decréscimo da função mitocondrial e direcionando altas taxas de glicólise (Chan *et al.*, 2009; Chen, Z. *et al.*, 2010; Favaro *et al.*, 2010). Uma das principais características de células tumorais é sua capacidade de sustentar altas taxas de glicólise para gerar ATP, independente da disponibilidade de oxigênio, o que leva à mudanças fundamentais no seu metabolismo. Muito provavelmente, os miRNAs devem exercer um papel importante na regulação do função mitocondrial assim como supressores tumorais (Tomasetti, Neuzil e Dong, 2013). Assim, o envolvimento de miRNAs como reguladores do metabolismo energético não é exclusivo de *S. mansoni* e já é reportada a participação desses pequenos RNAs na regulação da função mitocondrial em outros modelos de estudo. Um modelo de como seria a regulação da fosforilação oxidativa mediada por miRNA em *S. mansoni* é apresentado pela **Figura 21**.

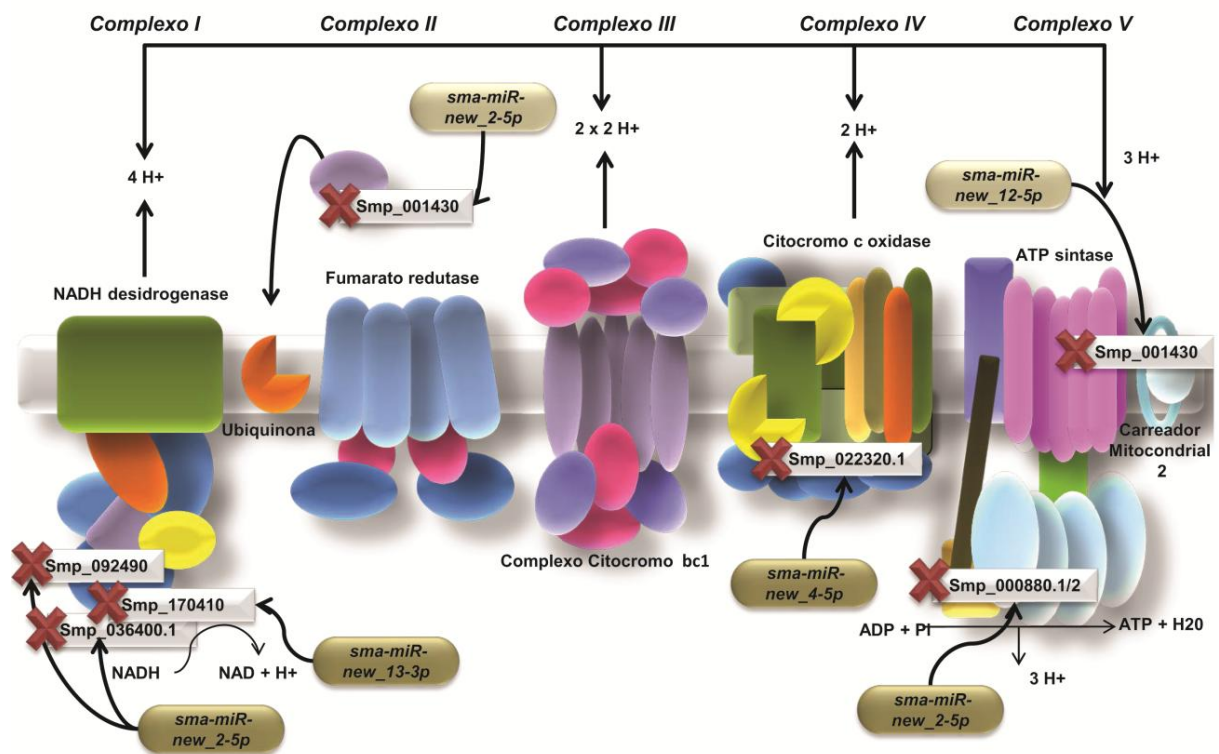


Figura 21: miRNAs preditos envolvidos na regulação da fosforilação oxidativa em *S. mansoni*. Os miRNAs *sma-miR-new_2-5p*, *sma-miR-new_4-5p*, *sma-miR-new_12-5p* e *sma-miR-new_13-3p* regulam em nível pós-transcricional a expressão de genes que participam dos complexos enzimáticos e de proteínas acessórias na cadeia transportadora de elétrons que ocorre na membrana interna da mitocôndria. As entradas dos genes estão demonstradas na Tabela 10.

4.3.4. miRNAs envolvidos na regulação do sistema ubiquitina-proteassoma em *S. mansoni*

O sistema ubiquitina-proteassoma (UPS) é um sistema proteolítico indispensável para a degradação selecionada de proteínas citosólicas intracelulares, nucleares e miofibrilares. Esse sistema controla muitos processos biológicos fundamentais como a proliferação celular, adaptação ao estresse e morte celular, tendo como função principal prevenir o acúmulo de proteínas danificadas, mutantes ou com defeitos de enovelamento.

Diversos trabalhos já descreveram a presença do sistema ubiquitina-proteassoma em uma grande variedade de eucariotos, incluindo parasitas, nos quais desempenha funções importantes no decorrer de seu desenvolvimento (Gantt *et al.*, 1998; Robertson, 1999; Shaw *et al.*, 2000). Em *S. mansoni*, alguns trabalhos já foram realizados demonstrando a existência dos componentes do sistema-ubiquitina proteassoma e sua importância no desenvolvimento do parasita (Guerra-Sá, 2000; Castro-Borges, 2005; Guerra-Sa *et al.*, 2005; Nabhan *et al.*, 2007; Pereira-Júnior *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2013). Guerra-Sa *et al.* (2005) demonstrou que a inibição da atividade catalítica do proteassoma 20S utilizando o inibidor MG-132 em vermes adultos de *S. mansoni*, reduziu o número de esquistossômulos na fase pulmonar, o número de vermes adultos e consequentemente diminuiu a ovoposição em camundongos infectados. O mesmo autor demonstrou pela primeira vez a expressão do gene *SmUbi*, uma poliubiquitina, em todas as formas de desenvolvimento do parasita, o que foi confirmado posteriormente pela presença de conjugados ubiquitinados em extratos proteicos totais de cercária, esquistossômulos e vermes adultos, sendo o nível destes maiores nos estágios larvais, sugerindo que a via de degradação ubiquitina-proteassoma exerce um papel importante nos processos de remodelagem em *S. mansoni* (Guerra-Sá, 2000; Castro-Borges, 2005). Outro trabalho envolvendo os perfis de expressão de subunidades que compõem o proteassoma 26S mostrou que esses componentes são diferencialmente expressos nos estágios de cercária, esquistossômulos e vermes adultos. O mesmo trabalho sugere a ocorrência de uma *down-regulation* do proteassoma durante as fases iniciais de desenvolvimento de esquistossômulos e uma *up-regulation* do mesmo ao atingirem a maturidade para se diferenciarem em vermes adultos. Além disso, foi demonstrado nesse trabalho que o *knockdown* da subunidade SmRPN11/POH1 do proteassoma em

esquistossômulo levou a redução da viabilidade desses parasitas em 78%, indicando que essa subunidade é essencial para a atividade do proteassoma, e que este sistema proteolítico tem um importante papel no desenvolvimento e sobrevivência do parasita (Nabhan *et al.*, 2007). Ainda, foi demonstrado recentemente o funcionamento da via UPS no decorrer do desenvolvimento de ovos de *S. mansoni* e que os componentes morfológicos do ovo totalmente desenvolvido também exibem perfis de expressão diferenciais das subunidades do proteassoma (Mathieson, Castro-Borges e Wilson, 2011).

A partir dos trabalhos publicados demonstrando a importância do sistema-proteassoma e níveis de expressão diferenciais de seus componentes em *S. mansoni*, podemos sugerir que mecanismos de regulação da expressão gênica são necessários para a manutenção desse sistema no decorrer do desenvolvimento de *S. mansoni*. A predição de alvos nesse trabalho revelou dentre os 21 alvos selecionados, 6 alvos envolvidos nos sistema UPS. Tanto o *sma-miR-new_2-5p* e o *sma-miR-new_13-5p* apresentaram como alvos enzimas ativadoras de ubiquitina (*ubiquitin_activating_enzyme 1*). Já a predição de alvos revelou enzimas conjugadoras de ubiquitina (*ubiquitin_conjugating_enzyme 2*) para os miRNAs *sma-miR-new_4-5p* e *sma-miR-new_12-5p*. O *sma-miR-new_4-5p* além de ter como alvo uma E2 também apresentou como alvos uma subunidade beta do proteassoma (proteasome _subunit $\beta 1$ – T01_family) e o inibidor do proteassoma PI31 (proteasome_inhibitor PI31_subunit) (**Tabela 9**). O inibidor do proteassoma PI31 é um gene altamente conservado na evolução dos metazoários e sua atividade na inibição do proteassoma já é bem estabelecida. Botelho-Machado *et al.* (2010) demonstrou que transcritos de *SmPI31* são expressos durante o ciclo de vida de *S. mansoni* e sugeriu que este tem um papel importante como inibidor do proteassoma em vermes adultos. Uma vez que os miRNAs *sma-miR-new_12-5p* e *sma-miR-new_13-5p* apresentaram níveis transcricionais elevados no estágio de esquistossômulo (EMT-3,5 h e EMT-24h) (**Figura 13**) em comparação com vermes adultos e ovos, podemos sugerir que estes dois miRNAs estejam atuando na regulação das enzimas E1 e E2 nesse estágio. Embora seja relatado que nos estágios larvais de cercária e esquistossômulo com pouco tempo de desenvolvimento há acúmulo de proteínas ubiquitinadas, não descartamos a hipótese de que miRNAs participam da regulação negativa dos níveis transcricionais das enzimas ativadoras e conjugadoras de ubiquitina, garantindo o equilíbrio dos níveis de proteínas

ubiquitinadas para não comprometer a viabilidade celular e sobrevivência do parasita, pois deve-se ressaltar que a atividade do proteassoma nesses estágios é reduzida em comparação a vermes adultos como sugerem alguns estudos (Castro-Borges, 2005; Nabhan *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2013).

Observamos também um possível efeito antagonista do *sma-miR-new_4-5p* na atividade do proteassoma, uma vez que esse miRNA apresentou como alvos o inibidor do proteassoma PI31 e ao mesmo tempo a subunidade $\beta 1$ do proteassoma. Esse miRNA apresentou maior nível de expressão no estágio de verme adulto, o que nos leva a crer que este atua regulando tanto positivamente quanto negativamente a atividade do proteassoma nesse estágio, dependendo das condições em que o parasita se encontra. Sendo assim, sugerimos que em vermes adultos o *sma-miR-new_4-5p* possa atuar de duas formas opostas, alterando negativamente os níveis de expressão de PI31 refletindo em uma maior atividade proteassomal ou diminuindo os níveis da subunidade $\beta 1$ do proteassoma, levando ao comprometimento da atividade do mesmo (**Figura 23**). Ainda, Nabhan *et al.* (2007) demonstrou a expressão diferencial de várias subunidades do proteassoma, dentre elas a subunidade $\beta 1$ (*Sm β 1*), e ao compararmos os níveis de expressão de *Sm β 1* com o *sma-miR-new_4-5p*, propomos a presença de uma correlação negativa na expressão desse miRNA com o seu alvo nos estágios de cercária, esquistossômulos e vermes adultos (**Figura 22**).

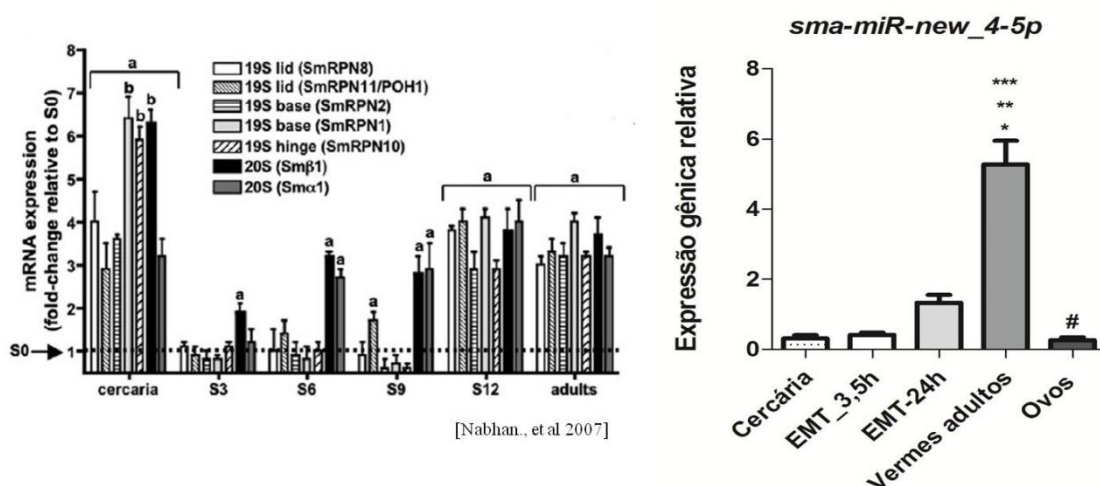


Figura 22: Perfil de expressão do *sma-miR-new_4-5p* e seu alvo *Sm β 1* durante os estágios de desenvolvimento de *S. mansoni*. O miRNA apresenta uma correlação negativa em sua expressão em relação ao seu alvo nos estágios de cercária e vermes adultos.

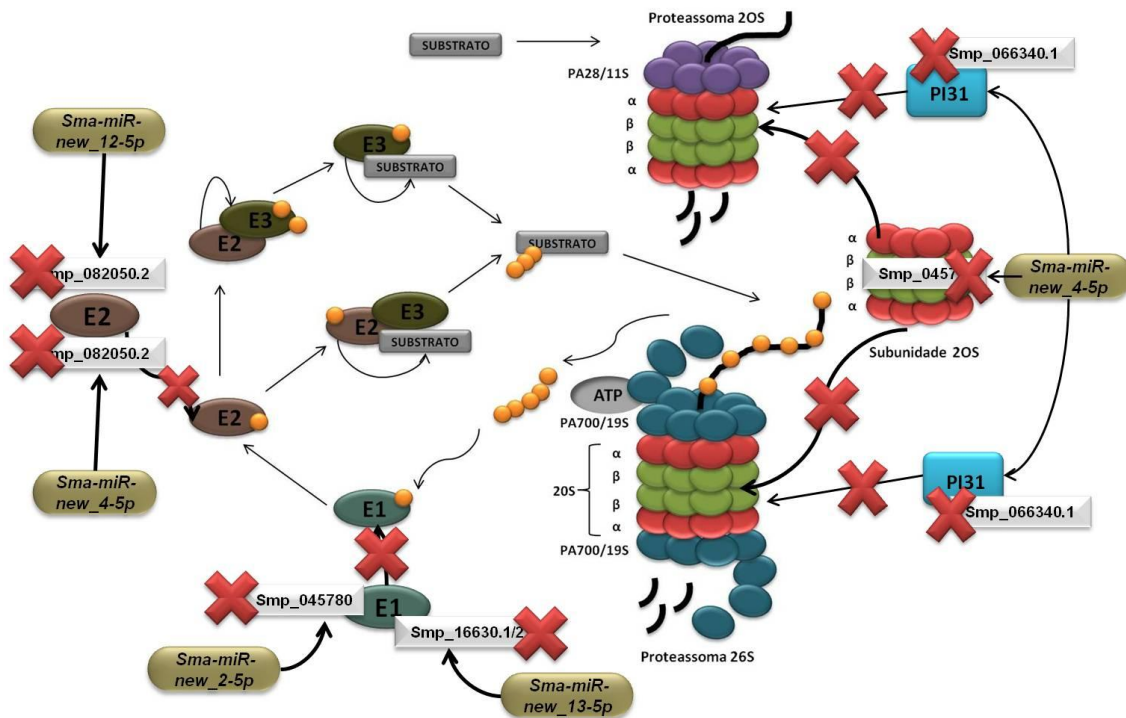


Figura 23: miRNAs preditos envolvidos na regulação do sistema ubiquitina-proteassoma. os miRNAs *sma-miR-new_2-5p*, *sma-miR-new_4-5p*, *sma-miR-new_12-5p*, *sma-miR-new_13-5p* atuam regulando genes envolvidos nos processos de ubiquitinação e na degradação de proteínas pelo proteassoma.

Nesse contexto, propomos que os miRNAs *sma-miR-new_2-5p*, *sma-miR-new_4-5p*, *sma-miR-new_12-5p* e *sma-miR-new_13-5p* atuam na regulação da expressão gênica de componentes do sistema-ubiquitina proteassoma em *S. mansoni* e que também podem atuar em sinergismo para regular essa via garantindo os momentos exatos em que o processo de degradação de proteínas, o qual é essencial para a sobrevivência do parasita, deva funcionar em maiores ou menores taxas.

4.3.5. Outro alvos regulados por miRNAs em *S. mansoni*

Além de nossos resultados mostrarem o papel importante dos miRNAs analisados na regulação da expressão de genes envolvidos tanto no processo fosforilação oxidativa mitocondrial, como no sistema ubiquitina-proteassoma em *S. mansoni*, verificamos também outros genes preditos que são essenciais para a sobrevivência do parasita como um gene da família das tetraspaninas (*tetraspanin*

putative), o gene da catepsina B1 (*cathepsin peptidase B1*) e o gene VAL6 (*venom allergen like 6 protein*) sendo alvos dos miRNAs *sma-miR-new_12-5p*, *sma-miR-new_13-3p* e *sma-miR-new_13-5p* respectivamente. Tetraspaninas representam uma classe de proteínas que são expostas na superfície do tegumento de *S. mansoni* e atuam na evasão do sistema imune através da complexação com o complexo MHC (Complexo de Histocompatibilidade Maior). Estudos com tetraspaninas demonstram que essas são potenciais antígenos candidatos à elaboração de vacinas contra a esquistossomose (Tran *et al.*, 2006). A proteína VAL6 é encontrada no tegumento de vermes adultos e pertence à família de proteínas VAL presente em platelmintos apresentando também um papel como moduladora da evasão do sistema imune (Van Balkom *et al.*, 2005; Chen, J. *et al.*, 2010; Chalmers e Hoffmann, 2012). Já a proteína Catepsina B1 é uma peptidase associada ao intestino de vermes adultos e tem a importante função na digestão de proteínas do sangue que são a fonte de nutrientes para seu crescimento, desenvolvimento e reprodução. Sua inibição representa uma atrativa alternativa para o desenvolvimento de drogas anti-esquistossomomais (Jilkova *et al.*, 2011).

Finalmente, a predição de alvos mostrou também o gene Smad2 (TGF- β signal transducer Smad2) como alvo do miRNA conservado *sma-miR-281*, sendo este um componente da importante via de sinalização TGF- β . A superfamília de proteínas TGF- β é um dos importantes fatores de crescimento produzidos por diversos tipos celulares que participam da regulação de vários processos celulares, incluindo proliferação e diferenciação celular, motilidade, adesão, determinação de linhagens celulares e apoptose (Massague, 1998). Proteínas Smad são componentes essenciais dessa via de sinalização e atuam como receptores de substratos que podem se translocar para o núcleo quando ativadas e interagir com uma série de proteínas regulatórias e acessórias que irão determinar quais genes devem ser regulados (Loverde, Osman e Hinck, 2007).

Como o gênero *Schistosoma* tem a característica de endoparasitar vertebrados, estes desenvolveram mecanismos sensíveis que garantem a resposta a estímulos externos provenientes de moléculas do hospedeiro. O verme macho tem a habilidade de transmitir sinais à fêmea, levando a regulação de vários genes desta. A identificação de vários fatores de crescimento em *S. mansoni*, evidencia que este parasita responde a estímulos do hospedeiro (Loverde, Osman e Hinck, 2007). O gene *SmSmad-2* já foi identificado em *S. mansoni*, apresentando alto grau de homologia com o Smad 2 de *Xenopus laevis* e humanos (Eppert *et al.*, 1996; Graff, Bansal e Melton, 1996; Riggins

et al., 1996; Zhang *et al.*, 1996; Nakao *et al.*, 1997). Ainda, estudos com o homólogo Smad2 em *S. mansoni* mostraram seus perfis transcricionais e proteicos, indicando que o SmSmad-2, ou a via de sinalização TGF- β , atua em importantes papéis no desenvolvimento do parasita em geral e também na maturação sexual de vermes macho e fêmea (Loverde, Osman e Hinck, 2007). Neste contexto, sugerimos que o *sma-miR-281* além de ser um miRNA conservado e expresso em todos os estágios do desenvolvimento de *S. mansoni*, apresenta um papel importante na regulação pós-transcricional de Smad2, principalmente em machos, uma vez que foi demonstrado por Marco *et al.* (2013) através de sequenciamento de última geração que o *sma-miR-281* apresenta expressão gênica sexo-específica, estando ausente em fêmeas. A regulação a níveis pós-transcricionais dos componentes da via de sinalização TGF- β deve refletir diretamente nas interações entre o parasita e hospedeiro e ainda mais na transmissão de sinais do verme macho para a fêmea.

5. CONCLUSÃO

Dentre os principais resultados obtidos nesse trabalho, destacam-se:

- 24 miRNAs maduros não conservados e 2 miRNAs maduros conservados (*sma-miR-212* e *sma-miR-281*) em *S.mansoni*.
- 13 miRNAs maduros validados experimentalmente apresentando um padrão de expressão gênica diferencial nos estágios de desenvolvimento do parasita.
- 21 alvos preditos para os miRNAs validados estão envolvidos em importantes funções biológicas do *S. mansoni*.
- 4 miRNAs (*sma-miR-new_2-5p*, *sma-miR-new_4-5p*, *sma-miR-new_12-5p*, *sma-miR-new_13-3p*) estão envolvidos na regulação do processo de fosforilação oxidativa mitocondrial.
- 4 miRNAs (*sma-miR-new_2-5p*, *sma-miR-new_4-5p*, *sma-miR-new_12-5p*, *sma-miR-new_13-5p*) estão envolvidos na regulação do sistema ubiquitina-proteassoma.

Diante desses resultados, podemos concluir que os miRNAs são moléculas que estão presentes no genoma de *S. mansoni* e atuam fortemente como reguladores da expressão gênica em nível pós-transcricional, podendo atuar em processos biológicos distintos ao longo dos estágios de desenvolvimento do parasita.

6. PERSPECTIVAS

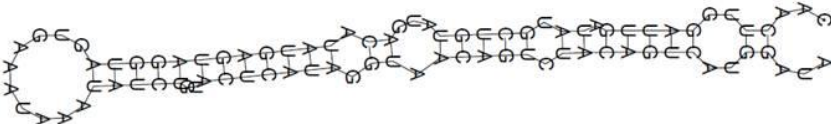
Como perspectivas desse trabalho, análises futuras serão realizadas para:

- 1 – Desenvolver protocolos para caracterizar a expressão de miRNAs precursores.
- 2 - Utilizar novos softwares tanto para predição de miRNAs maduros como de alvos.
- 3 – Estabelecer metodologias para avaliar o efeito do silenciamento e/ou super-expressão de miRNAs na biologia do parasita.

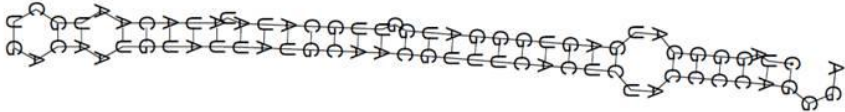
Vale ressaltar que parte dos resultados obtidos neste trabalho foi utilizada para a elaboração do manuscrito “*microRNAs involved in regulation of oxidative phosphorylation in Schistosoma mansoni*” em análise na Molecular and Biochemical Parasitology. Finalmente, no decorrer da realização dessa dissertação, foram realizados em paralelo, experimentos envolvendo o padrão de expressão gênica de 3 exportinas, que são proteínas que participam do transporte de RNAs do núcleo para o citoplasma. Uma delas, a Exportina 5, tem um importante papel no transporte de miRNAs para o citoplasma. Os principais resultados deste trabalho foram compilados no manuscrito “*Characterization of export receptors exportins (XPOs) in the parasite Schistosoma mansoni*”, publicado na *Parasitology Research*(volume 112(12), p.4151-9).

7. ANEXOS

sma-miR-212
MFE = -21,50



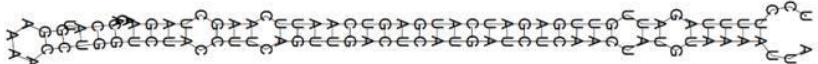
sma-miR-2162
MFE = -33,30



sma-miR-250
MFE = -44,10

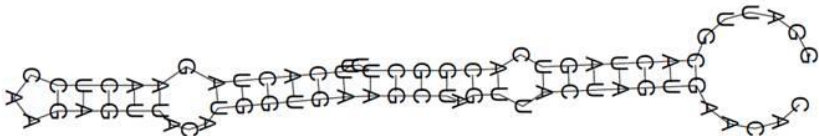


sma-miR-281
MFE = -29,00

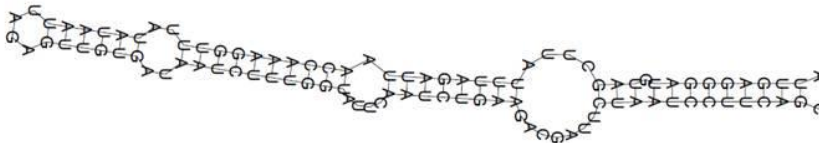


Anexo A: Estruturas secundárias correspondentes a cada miRNA precursor analisado e seu valor mínimo de energia livre (MFE).

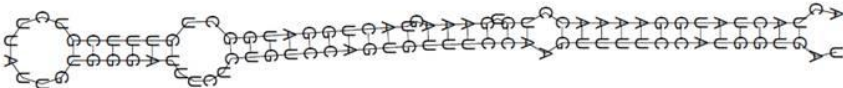
sma-miR-92a
MFE = -23,40



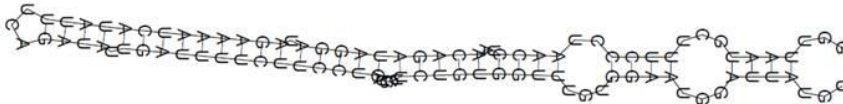
sma-miR-9c
MFE = -27,20



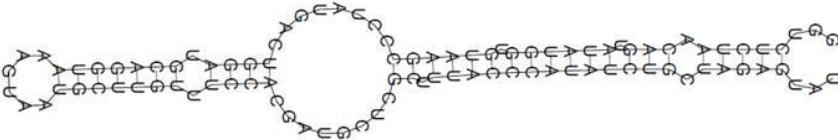
sma-miR-new_2
MFE = -36,20



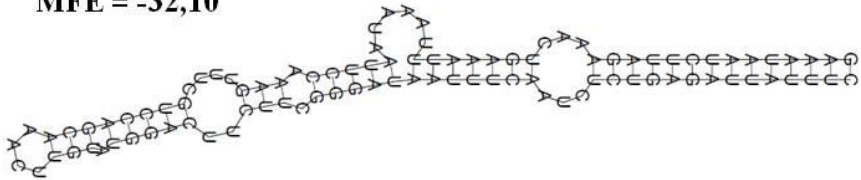
sma-miR-new_3
MFE = -25,80



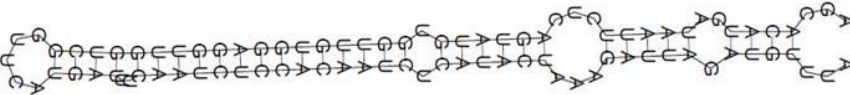
sma-miR-new_4
MFE = -33,40



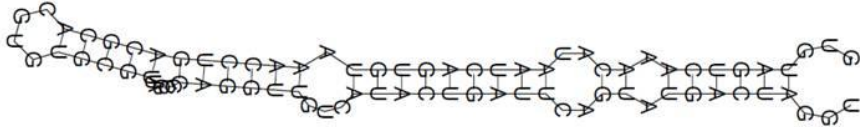
sma-miR-new_5
MFE = -32,10



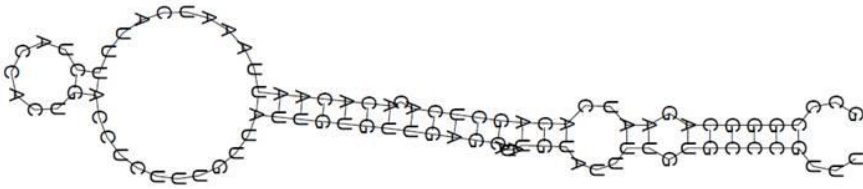
sma-miR-new_6
MFE = -32,60



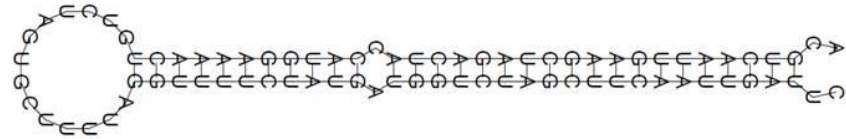
sma-miR-new_8
MFE = -29,90



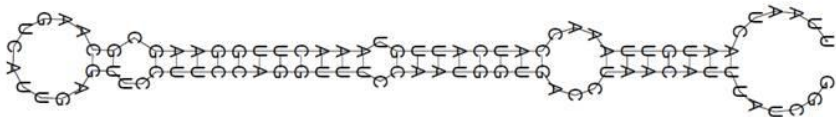
sma-miR-new_12
MFE = -24,10



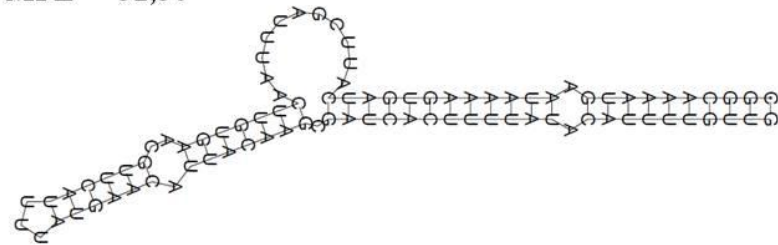
sma-miR-new_13
MFE = -41,60

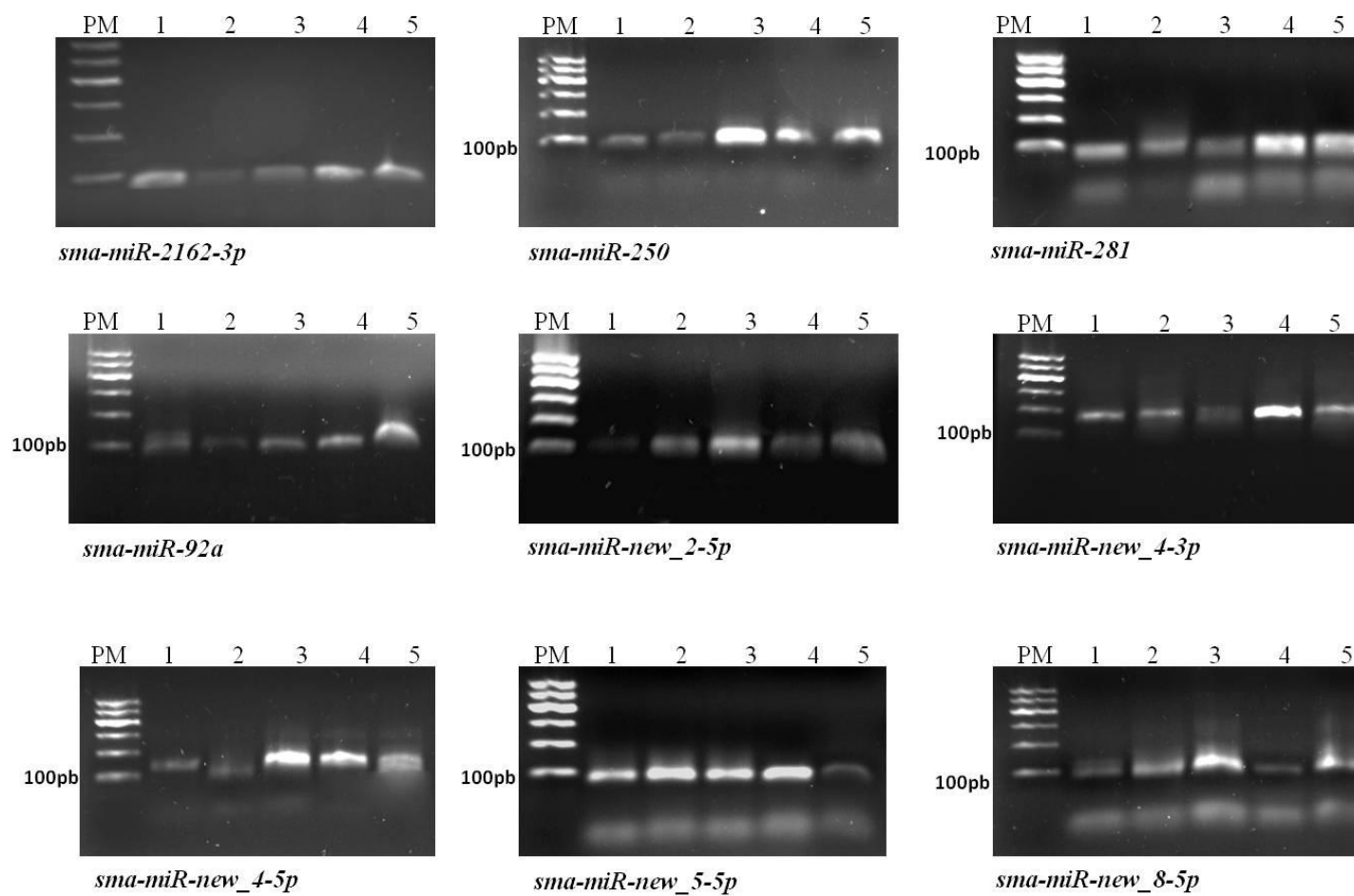


sma-miR-new_15
MFE = -29,10

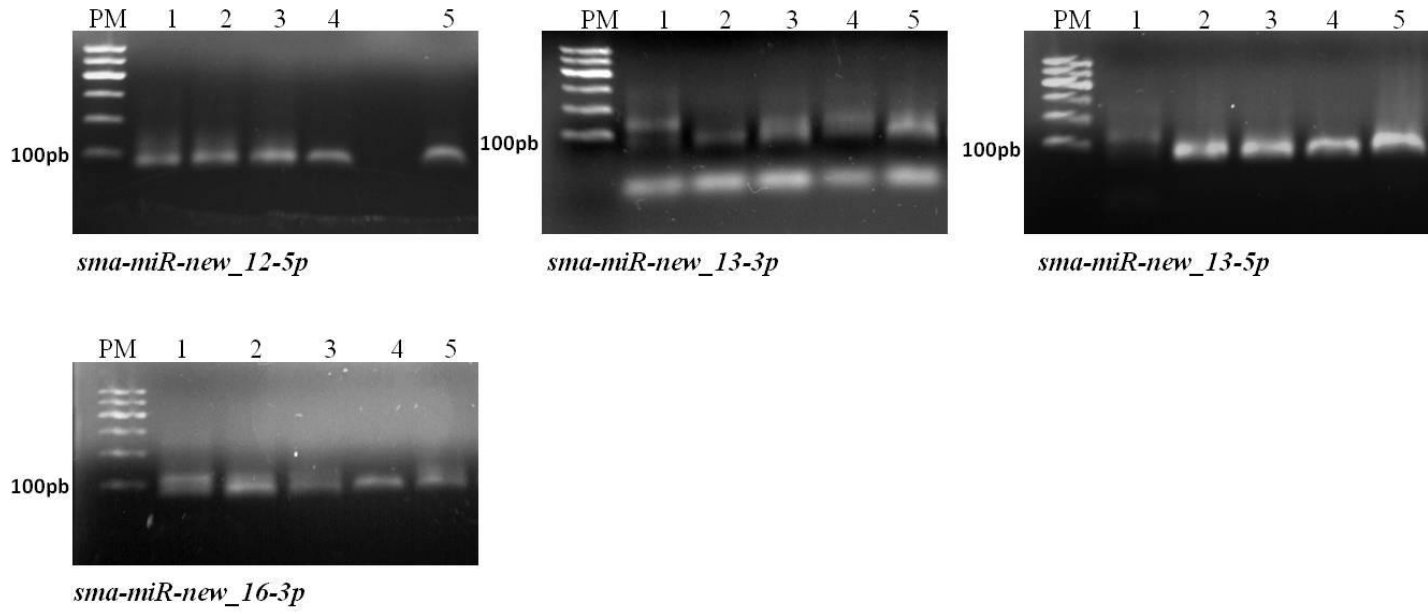


sma-miR-new_15
MFE = -32,30





ANEXO B : Amplicons dos miRNAs maduros analisados em gel de agarose 2% nos estágios de desenvolvimento de *S. mansoni*. 1-Cercária; 2- EMT-3,5h; 3- EMT-24h; 4- Verme adulto; 5- Ovo.



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, G. T. et al. Exploring the *Schistosoma mansoni* adult male transcriptome using RNA-seq. **Exp Parasitol**, v. 132, n. 1, p. 22-31, 2012

ALMEIDA, M. I. et al. Strand-specific miR-28-5p and miR-28-3p have distinct effects in colorectal cancer cells. **Gastroenterology**, v. 142, n. 4, p. 886-896 e9, 2012

ALTUVIA, Y. et al. Clustering and conservation patterns of human microRNAs. **Nucleic Acids Res**, v. 33, n. 8, p. 2697-706, 2005

AMBROS, V. Control of developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. **Curr Opin Genet Dev**, v. 10, n. 4, p. 428-33, 2000

Ambros, V. The functions of animal microRNAs. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 350-5, 2004

AROOR, A. R. et al. Mitochondria and Oxidative Stress in the Cardiorenal Metabolic Syndrome. **Cardiorenal Medicine**, v. 2, n. 2, p. 87-109, 2012

ASCHRAFI, A. et al. MicroRNA-338 Regulates Local Cytochrome c Oxidase IV mRNA Levels and Oxidative Phosphorylation in the Axons of Sympathetic Neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 47, p. 12581-12590, 2008

BANDIERA, S. et al. Nuclear Outsourcing of RNA Interference Components to Human Mitochondria. **PLoS One**, v. 6, n. 6, 2011

BARREY, E. et al. Pre-microRNA and mature microRNA in human mitochondria. **PLoS One**, v. 6, n. 5, p. e20220, 2011

BARTEL, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell**, v. 136, n. 2, p. 215-33, 2009

BASCH, P. F. Cultivation of *Schistosoma mansoni* in vitro. I. Establishment of cultures from cercariae and development until pairing. n. 0022-3395 (Print),

BAUM, B.; CRAIG, G. RNAi in a postmodern, postgenomic era. **Oncogene**, v. 23, n. 51, p. 8336-9, 2004

BECKER, C. et al. mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. **Methods**, v. 50, n. 4, p. 237-43, 2010

BERRIMAN, M. et al. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. **Nature**, v. 460, n. 7253, p. 352-8, 2009

BIAN, Z. et al. Identification of mouse liver mitochondria-associated miRNAs and their potential biological functions. **Cell Research**, v. 20, n. 9, p. 1076-1078, 2010

BORCHERT, G. M.; LANIER, W.; DAVIDSON, B. L. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. **Nat Struct Mol Biol**, v. 13, n. 12, p. 1097-101, 2006

BOROS, D. L. Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection. **Clin Microbiol Rev**, v. 2, n. 3, p. 250-69, 1989

BOTELHO-MACHADO, C. et al. Characterization and mRNA expression analysis of PI31, an endogenous proteasome inhibitor from *Schistosoma mansoni*. **Parasitol Res**, v. 107, n. 5, p. 1163-71, 2010

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**, v. 7ª ed, p. Brasília, DF, 2009

BREVIING, K.; ESQUELA-KERSCHER, A. The complexities of microRNA regulation: mirandering around the rules. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 42, n. 8, p. 1316-29, 2010

CAI, P. et al. Profiles of small non-coding RNAs in *Schistosoma japonicum* during development. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 8, p. e1256, 2011

CAI, P. et al. A deep analysis of the small non-coding RNA population in *Schistosoma japonicum* eggs. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e64003, 2013

CASTRO-BORGES, W. Diversidade do Proteassoma 26S e perfil de ubiquitinação durante o desenvolvimento do parasita *Schistosoma mansoni*: Uma abordagem proteômica. **Tese (Doutorado em Ciências - Área de concentração Bioquímica)**, p. 152f, 2005

CHALMERS, I. W.; HOFFMANN, K. F. Platyhelminth Venom Allergen-Like (VAL) proteins: revealing structural diversity, class-specific features and biological associations across the phylum. **Parasitology**, v. 139, n. 10, p. 1231-45, 2012

CHAN, S. Y. et al. MicroRNA-210 Controls Mitochondrial Metabolism during Hypoxia by Repressing the Iron-Sulfur Cluster Assembly Proteins ISCU1/2. **Cell Metab**, v. 10, n. 4, p. 273-284, 2009

CHEN, J. et al. Expression and immune response analysis of *Schistosoma japonicum* VAL-1, a homologue of vespid venom allergens. **Parasitol Res**, v. 106, n. 6, p. 1413-8, 2010

CHEN, P. Y. et al. The developmental miRNA profiles of zebrafish as determined by small RNA cloning. **Genes Dev**, v. 19, n. 11, p. 1288-93, 2005

- CHEN, Z. et al. Hypoxia-regulated microRNA-210 modulates mitochondrial function and decreases ISCU and COX10 expression. **Oncogene**, v. 29, n. 30, p. 4362-8, 2010
- CLEGG, J. A. In Vitro Cultivation of Schistosoma Mansoni. **Exp Parasitol**, v. 16, p. 133-47, 1965
- COIMBRA, J. R. C., E.A. Uma conversa com Frederico Simões Barbosa. **Cad Saúde Pública**, v. 13, n. 1, p. 564-565, 1997
- COLES, G. C. Oxidative phosphorylation in adult Schistosoma mansoni. **Nature**, v. 240, n. 5382, p. 488-9, 1972
- COURA, J. R.; AMARAL, R. S. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5 Suppl 1, p. 13-9, 2004
- CUNHA, A. S. Esquistossomose mansoni. v. v.1ed, São Paulo, Sarvier, p. 435p, 1970
- DAS, S. et al. Nuclear miRNA regulates the mitochondrial genome in the heart. **Circ Res**, v. 110, n. 12, p. 1596-603, 2012
- DE LENCASTRE, A. et al. MicroRNAs Both Promote and Antagonize Longevity in C. elegans. **Curr Biol**, v. 20, n. 24, p. 2159-2168, 2010
- DEMARCO, R. et al. Gender biased differential alternative splicing patterns of the transcriptional cofactor CA150 gene in Schistosoma mansoni. **Mol Biochem Parasitol**, v. 150, n. 2, p. 123-31, 2006
- DENLI, A. M. et al. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. **Nature**, v. 432, n. 7014, p. 231-5, 2004
- DIAS NETO, E. et al. The schistosome genome project: RNA arbitrarily primed PCR allows the accelerated generation of expressed sequence tags. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 5, p. 655-7, 1996
- EPPERT, K. et al. MADR2 Maps to 18q21 and Encodes a TGF² Regulated MAD Related Protein That Is Functionally Mutated in Colorectal Carcinoma. **Cell**, v. 86, n. 4, p. 543-552, 1996
- FAVARO, E. et al. MicroRNA-210 Regulates Mitochondrial Free Radical Response to Hypoxia and Krebs Cycle in Cancer Cells by Targeting Iron Sulfur Cluster Protein ISCU. **PLoS One**, v. 5, n. 4, 2010

FITZPATRICK, J. M.; HOFFMANN, K. F. Dioecious *Schistosoma mansoni* express divergent gene repertoires regulated by pairing. **Int J Parasitol**, v. 36, n. 10-11, p. 1081-9, 2006

FITZPATRICK, J. M. et al. Anti-schistosomal intervention targets identified by lifecycle transcriptomic analyses. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 3, n. 11, p. e543, 2009

FRANCO, G. R. et al. Identification of new *Schistosoma mansoni* genes by the EST strategy using a directional cDNA library. **Gene**, v. 152, n. 2, p. 141-7, 1995

FRANCO, G. R. et al. Evaluation of cDNA Libraries from Different Developmental Stages of *Schistosoma mansoni* for Production of Expressed Sequence Tags (ESTs). **DNA Research**, v. 4, n. 3, p. 231-240, 1997

FRANCO, G. R. et al. The *Schistosoma* gene discovery program: state of the art. **Int J Parasitol**, v. 30, n. 4, p. 453-463, 2000

FREITAS, C. A. Situação atual da esquistossomose no Brasil. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 24, p. 03-63, 1972

GANTT, S. M. et al. Proteasome inhibitors block development of *Plasmodium* spp. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 42, n. 10, p. 2731-8, 1998

GOMES, M. D. Caracterização inicial dos constituintes da maquinaria de silenciamento gênico mediada por microRNAs em *Schistosoma mansoni*. **Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais**, p. 112, 2008

GOMES, M. D. miRNAs em *Schistosoma mansoni*: biogênese, predição, validação e alvos potenciais. **Tese de Doutorado (Universidade Federal de Ouro Preto), Ouro Preto, Minas Gerais**, 2012

GOMES, M. D. et al. Genome-wide identification of novel microRNAs and their target genes in the human parasite *Schistosoma mansoni*. **Genomics**, v. 98, n. 2, p. 96-111, 2011

GRAFF, J. M.; BANSAL, A.; MELTON, D. A. *Xenopus* Mad Proteins Transduce Distinct Subsets of Signals for the TGF β Superfamily. **Cell**, v. 85, n. 4, p. 479-487, 1996

GUERRA-SÁ, R. Sequenciamento e caracterização de cDNAs codificando para a cadeia leve de miosina, desidrogenase láctica e poliubiquitina em *S. mansoni*. **Tese (Doutorado em Ciências - Área de concentração Bioquímica)**, p. 220f, 2000

GUERRA-SA, R. et al. *Schistosoma mansoni*: functional proteasomes are required for development in the vertebrate host. **Exp Parasitol**, v. 109, n. 4, p. 228-36, 2005

HAN, J. et al. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. **Genes Dev**, v. 18, n. 24, p. 3016-27, 2004

HAN, Z. G. et al. Schistosoma genomics: new perspectives on schistosome biology and host-parasite interaction. **Annu Rev Genomics Hum Genet**, v. 10, p. 211-40, 2009

HAO, L. L. et al. Identification and characterization of microRNAs and endogenous siRNAs in *Schistosoma japonicum*. **BMC Genomics**, v. 11, 2010

HARROP, R.; WILSON, R. A. Protein synthesis and release by cultured schistosomula of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, v. 107 (Pt 3), p. 265-74, 1993

HASHIMOTO, Y. et al. Involvement of epigenetically silenced microRNA-181c in gastric carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 5, p. 777-84, 2010

HEMAN-ACKAH, S. M. et al. RISC in PD: The Impact of MicroRNAs in Parkinson's Disease Cellular and Molecular Pathogenesis. **Front Mol Neurosci**, v. 6, 2013

HOFACKER, I. L. RNA Secondary Structure Analysis Using the Vienna RNA Package. In: (Ed.). **Current Protocols in Bioinformatics**: John Wiley & Sons, Inc., 2002. ISBN 9780471250951.

HOREMANS, A. M.; TIELENS, A. G.; VAN DEN BERGH, S. G. The reversible effect of glucose on the energy metabolism of *Schistosoma mansoni* cercariae and schistosomula. **Mol Biochem Parasitol**, v. 51, n. 1, p. 73-9, 1992

HOTEZ, P. J. et al. Helminth infections: the great neglected tropical diseases. **J Clin Invest**, v. 118, n. 4, p. 1311-21, 2008

HU, W. et al. Evolutionary and biomedical implications of a *Schistosoma japonicum* complementary DNA resource. **Nat Genet**, v. 35, n. 2, p. 139-47, 2003

HUANG, J. et al. Genome-wide identification of *Schistosoma japonicum* microRNAs using a deep-sequencing approach. **PLoS One**, v. 4, n. 12, p. e8206, 2009

HUANG, X. H. et al. miR-338-3p suppresses invasion of liver cancer cell by targeting smoothelin. **J Pathol**, v. 225, n. 3, p. 463-72, 2011

HUANG, X. H. et al. Bead-based microarray analysis of microRNA expression in hepatocellular carcinoma: miR-338 is downregulated. **Hepatol Res**, v. 39, n. 8, p. 786-94, 2009

JIANG, L. et al. Hsa-miR-125a-3p and hsa-miR-125a-5p are downregulated in non-small cell lung cancer and have inverse effects on invasion and migration of lung cancer cells. **BMC Cancer**, v. 10, p. 318, 2010

JILKOVA, A. et al. Structural basis for inhibition of cathepsin B drug target from the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*. **J Biol Chem**, v. 286, n. 41, p. 35770-81, 2011

JIN, X. et al. Comparative analysis of known miRNAs across platyhelminths. **FEBS J**, v. 280, n. 16, p. 3944-51, 2013

JOHN, B. et al. Human MicroRNA targets. **PLoS Biol**, v. 2, n. 11, p. e363, 2004

KAPINAS, K.; DELANY, A. M. MicroRNA biogenesis and regulation of bone remodeling. **Arthritis Res Ther**, v. 13, n. 3, p. 220, 2011

KREN, B. T. et al. microRNAs identified in highly purified liver-derived mitochondria may play a role in apoptosis. **RNA Biol**, v. 6, n. 1, p. 65-72, 2009

LAGOS-QUINTANA, M. et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. **Science**, v. 294, n. 5543, p. 853-8, 2001

LAKOMY, R. et al. MiR-195, miR-196b, miR-181c, miR-21 expression levels and O-6-methylguanine-DNA methyltransferase methylation status are associated with clinical outcome in glioblastoma patients. **Cancer Science**, v. 102, n. 12, p. 2186-2190, 2011

LANDTHALER, M. et al. Molecular characterization of human Argonaute-containing ribonucleoprotein complexes and their bound target mRNAs. **RNA**, v. 14, n. 12, p. 2580-96, 2008

LAO, K. et al. Real time PCR profiling of 330 human micro-RNAs. **Biotechnol J**, v. 2, n. 1, p. 33-5, 2007

LAWTON, S. P. et al. Genomes and geography: genomic insights into the evolution and phylogeography of the genus *Schistosoma*. **Parasit Vectors**, v. 4, p. 131, 2011

LEE, R. C.; AMBROS, V. An Extensive Class of Small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. **Science**, v. 294, n. 5543, p. 862-864, 2001

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843-54, 1993

LEE, Y. et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **EMBO J**, v. 23, n. 20, p. 4051-60, 2004

LI, S. C. et al. miRNA arm selection and isomiR distribution in gastric cancer. **BMC Genomics**, v. 13 Suppl 1, p. S13, 2012

LI, S. C. et al. MicroRNA 3' end nucleotide modification patterns and arm selection preference in liver tissues. **BMC Syst Biol**, v. 6 Suppl 2, p. S14, 2012

LINDOW, M. Prediction of Targets for MicroRNAs. In: NIELSEN, H. (Ed.). **RNA**: Humana Press, v.703, 2011. cap. 21, p.311-317. (Methods in Molecular Biology). ISBN 978-1-58829-913-0.

LIU, F. et al. New perspectives on host-parasite interplay by comparative transcriptomic and proteomic analyses of *Schistosoma japonicum*. **PLoS Pathog**, v. 2, n. 4, p. e29, 2006

LOVERDE, P. T.; OSMAN, A.; HINCK, A. *Schistosoma mansoni*: TGF-beta signaling pathways. **Exp Parasitol**, v. 117, n. 3, p. 304-17, 2007

LUND, E. et al. Nuclear export of microRNA precursors. **Science**, v. 303, n. 5654, p. 95-8, 2004

MANSON, P. Report of a Case of Bilharzia from the West Indies. **Br Med J**, v. 2, n. 2190, p. 1894-5, 1902

MARCO, A. et al. Sex-biased expression of microRNAs in *Schistosoma mansoni*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 9, p. e2402, 2013

MARSICO, A. et al. PROMiRNA: a new miRNA promoter recognition method uncovers the complex regulation of intronic miRNAs. **Genome Biol**, v. 14, n. 8, p. R84, 2013

MASSAGUE, J. TGF-beta signal transduction. **Annual Review of Biochemistry**, v. 67, p. 753-91, 1998

MATHIESON, W.; CASTRO-BORGES, W.; WILSON, R. A. The proteasome-ubiquitin pathway in the *Schistosoma mansoni* egg has development- and morphology-specific characteristics. **Mol Biochem Parasitol**, v. 175, n. 2, p. 118-25, 2011

MERCER, T. R. et al. The human mitochondrial transcriptome. **Cell**, v. 146, n. 4, p. 645-58, 2011

MESTDAGH, P. et al. High-throughput stem-loop RT-qPCR miRNA expression profiling using minute amounts of input RNA. **Nucleic Acids Res**, v. 36, n. 21, p. e143, 2008

MONTRESOR, A. et al. Preventive chemotherapy and the fight against neglected tropical diseases. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 10, n. 2, p. 237-42, 2012

NABHAN, J. F. et al. The 26S proteasome in *Schistosoma mansoni*: Bioinformatics analysis, developmental expression, and RNA interference (RNAi) studies. **Exp Parasitol**, v. 117, n. 3, p. 337-347, 2007

NAKAO, A. et al. Identification of Smad2, a human Mad-related protein in the transforming growth factor beta signaling pathway. **J Biol Chem**, v. 272, n. 5, p. 2896-900, 1997

NAWARATNA, S. S. et al. Gene Atlasing of digestive and reproductive tissues in *Schistosoma mansoni*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 4, p. e1043, 2011

NEVES, D. P. M., A.L.; GENARO, O.; LINARDI, P.M. Parasitologia Humana. v. 11ed, São Paulo, Atheneu, 2005

NICHOLSON, D. W.; STUART, R. A.; NEUPERT, W. Biogenesis of cytochrome c1. Role of cytochrome c1 heme lyase and of the two proteolytic processing steps during import into mitochondria. **J Biol Chem**, v. 264, n. 17, p. 10156-68, 1989

NURY, H. et al. Relations between structure and function of the mitochondrial ADP/ATP carrier. **Annual Review of Biochemistry**, v. 75, p. 713-741, 2006

O'CONNELL, R. M. et al. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 2, p. 111-22, 2010

OJOPI, E. P. et al. A quantitative view of the transcriptome of *Schistosoma mansoni* adult-worms using SAGE. **BMC Genomics**, v. 8, p. 186, 2007

OLIVEIRA, G. The *Schistosoma* gene discovery project: an update. **Trends in Parasitol**, v. 17, p. 108-109, 2001

OLIVEIRA, G.; FRANCO, G.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. The Brazilian contribution to the study of the *Schistosoma mansoni* transcriptome. **Acta Trop**, v. 108, n. 2-3, p. 179-82, 2008

OLIVEIRA, V. F. Identificação e Caracterização de MicroRNAs de Origem Intrônica em *Schistosoma mansoni*. **Dissertação de Mestrado**, v. Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais., 2013

OZSOLAK, F. et al. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. **Genes Dev**, v. 22, n. 22, p. 3172-83, 2008

PARKER-MANUEL, S. J. et al. Gene expression patterns in larval *Schistosoma mansoni* associated with infection of the mammalian host. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 8, p. e1274, 2011

PASQUINELLI, A. E. et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. **Nature**, v. 408, n. 6808, p. 86-9, 2000

PEREIRA-JÚNIOR, O. et al. Investigation on the 19S ATPase proteasome subunits (Rpt1–6) conservation and their differential gene expression in *Schistosoma mansoni*. **Parasitol Res**, v. 112, n. 1, p. 235-242, 2013

PEREIRA, R. V. et al. Conservation and developmental expression of ubiquitin isopeptidases in *Schistosoma mansoni*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 0, p. 0, 2013

PIAO, X. et al. Global expression analysis revealed novel gender-specific gene expression features in the blood fluke parasite *Schistosoma japonicum*. **PLoS One**, v. 6, n. 4, p. e18267, 2011

PIRAJÁ DA SILVA, M. A. Contribuição para o estudo da schistosomiase na Bahia. **Brazil-méd**, v. 22, p. 281-283, 1908

PORTELA, J. et al. Whole-genome in-silico subtractive hybridization (WISH)--using massive sequencing for the identification of unique and repetitive sex-specific sequences: the example of *Schistosoma mansoni*. **BMC Genomics**, v. 11, p. 387, 2010

PROTASIO, A. V.; DUNNE, D. W.; BERRIMAN, M. Comparative study of transcriptome profiles of mechanical- and skin-transformed *Schistosoma mansoni* schistosomula. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 3, p. e2091, 2013

PROTASIO, A. V. et al. A systematically improved high quality genome and transcriptome of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 1, p. e1455, 2012

RABELO, E. M. et al. Update of the gene discovery program in *Schistosoma mansoni* with the expressed sequence tag approach. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 5, p. 625-9, 1997

REY, L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. **Guanabara**, v. 1, p. 856, 2001

RIGGINS, G. J. et al. Mad-related genes in the human. **Nat Genet**, v. 13, n. 3, p. 347-9, 1996

RITCHIE, W.; RASKO, J. E.; FLAMANT, S. MicroRNA target prediction and validation. **Adv Exp Med Biol**, v. 774, p. 39-53, 2013

ROBERTSON, C. D. The Leishmania mexicana proteasome. **Mol Biochem Parasitol**, v. 103, n. 1, p. 49-60, 1999

SAMBON, L. W. Remarks on *Schistosoma mansoni*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 10, p. 303-304, 1907

SCHILLER, E. L. et al. Aerobic and anaerobic carbohydrate metabolism and egg production of *Schistosoma mansoni* in vitro. **J Parasitol**, v. 61, n. 3, p. 385-89, 1975

SHAW, M. K. et al. Proteasome inhibitors block intracellular growth and replication of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, v. 121 (Pt 1), p. 35-47, 2000

SHORT, R. B.; MENZEL, M. Y. Chromosomes of nine species of schistosomes. **J Parasitol**, v. 46, p. 273-87, 1960

SHORT, R. B.; MENZEL, M. Y.; PATHAK, S. Somatic chromosomes of *Schistosoma mansoni*. **J Parasitol**, v. 65, n. 3, p. 471-3, 1979

SIMÕES, M. C. et al. Identification of *Schistosoma mansoni* microRNAs. **BMC Genomics**, v. 12, p. 47, 2011

SIMPSON, A. J.; SHER, A.; MCCUTCHAN, T. F. The genome of *Schistosoma mansoni*: isolation of DNA, its size, bases and repetitive sequences. **Mol Biochem Parasitol**, v. 6, n. 2, p. 125-37, 1982

SKELLY, P. J.; SHOEMAKER, C. B. A Molecular-Genetic Study of the Variations in Metabolic Function during Schistosome Development. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, n. 2, p. 281-284, 1995

SKELLY, P. J.; STEIN, L. D.; SHOEMAKER, C. B. Expression of *Schistosoma mansoni* genes involved in anaerobic and oxidative glucose metabolism during the cercaria to adult transformation. **Mol Biochem Parasitol**, v. 60, n. 1, p. 93-104, 1993

SMITHERS SR FAU - TERRY, R. J.; TERRY, R. J. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. n. 0031-1820 (Print),

SRIPADA, L. et al. Systematic analysis of small RNAs associated with human mitochondria by deep sequencing: detailed analysis of mitochondrial associated miRNA. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e44873, 2012

TAGAWA, H. A microRNA cluster as a target of genomic amplification in malignant lymphoma. **Leukemia**, v. 19, p. 2013-2016, 2005

- THOMPSON, D. P. et al. Changes in glucose metabolism and cyanide sensitivity in *Schistosoma mansoni* during development. **Mol Biochem Parasitol**, v. 13, n. 1, p. 39-51, 1984
- TIELENS, A. G. et al. The facultative anaerobic energy metabolism of *Schistosoma mansoni* sporocysts. **Mol Biochem Parasitol**, v. 56, n. 1, p. 49-57, 1992
- TIELENS, A. G. M. Energy Generation in Parasitic Helminths. **Parasitology Today**, v. 10, n. 9, p. 346-352, 1994
- TOMASETTI, M.; NEUZIL, J.; DONG, L. MicroRNAs as regulators of mitochondrial function: Role in cancer suppression. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, n. 0, 2013
- TON, C. et al. Identification and primary structure of five human NADH-ubiquinone oxidoreductase subunits. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 241, n. 2, p. 589-94, 1997
- TRAN, M. H. et al. Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis. **Nat Med**, v. 12, n. 7, p. 835-40, 2006
- TZAGOLOFF, A.; DIECKMANN, C. L. PET genes of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol Rev**, v. 54, n. 3, p. 211-25, 1990
- UTZINGER, J. et al. From innovation to application: social-ecological context, diagnostics, drugs and integrated control of schistosomiasis. **Acta Trop**, v. 120 Suppl 1, p. S121-37, 2011
- VAN BALKOM, B. W. M. et al. Mass spectrometric analysis of the *Schistosoma mansoni* tegumental sub-proteome. **J Proteome Res**, v. 4, n. 3, p. 958-966, 2005
- VANOORDT, B. E. P. et al. The Energy-Production of the Adult *Schistosoma-Mansoni* Is for a Large Part Aerobic. **Mol Biochem Parasitol**, v. 16, n. 2, p. 117-126, 1985
- VERJOVSKI-ALMEIDA, S. et al. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. **Nat Genet**, v. 35, n. 2, p. 148-57, 2003
- VERJOVSKI-ALMEIDA, S. et al. Use of a 44k oligoarray to explore the transcriptome of *Schistosoma mansoni* adult worms. **Exp Parasitol**, v. 117, n. 3, p. 236-245, 2007
- VON KRUGER, W. M. et al. Oxygen uptake and lactate production by *Schistosoma mansoni* cercaria, cercarial body and tail, and schistosomule. **Comp Biochem Physiol B**, v. 60, n. 1, p. 41-6, 1978
- WAISBERG, M. et al. Microarray analysis of gene expression induced by sexual contact in *Schistosoma mansoni*. **BMC Genomics**, v. 8, p. 181, 2007

WANG, Z. X. et al. An "In-Depth" Description of the Small Non-coding RNA Population of *Schistosoma japonicum* Schistosomulum. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 2, 2010

WESTHOLM, J. O.; LAI, E. C. Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. **Biochimie**, v. 93, n. 11, p. 1897-904, 2011

WHO. Prevention and control of schistosomiasis and soiltransmitted helminthiasis. **Technical Report Series. Geneva: World Health Organization**, 2008

WHO. International travel and health. Geneva: World health Organization. 2012

WILLIAMS, D. L. et al. Profiling *Schistosoma mansoni* development using serial analysis of gene expression (SAGE). **Exp Parasitol**, v. 117, n. 3, p. 246-58, 2007

WILSON, R. A. Introdução à Parasitologia. Ed. EDUSP. 1979

WU, Z. et al. Differential effects of miR-34c-3p and miR-34c-5p on the proliferation, apoptosis and invasion of glioma cells. **Oncol Lett**, v. 6, n. 5, p. 1447-1452, 2013

XUE, X. et al. Identification and characterization of novel microRNAs from *Schistosoma japonicum*. **PLoS One**, v. 3, n. 12, p. e4034, 2008

ZHANG, Y. et al. Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF-beta response. **Nature**, v. 383, n. 6596, p. 168-72, 1996

