

Universidade Federal de Ouro Preto

Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
PPGBIOTEC

Dissertação

**Avaliação de RNAs não
codificadores longos
específicos de *Schistosoma
mansoni*, como candidatos a
biomarcadores da
esquistossomose murina**

Flávia Arêdes Rocha

Ouro Preto
2021



UFOP

Flávia Arêdes Rocha

Avaliação de RNAs não codificadores longos
específicos de *Schistosoma mansoni*, como candidatos a
biomarcadores da esquistossomose murina

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pertencente ao Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Guerra de Sá Cota

Ouro Preto, MG - Brasil
Maio de 2021

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

R672a Rocha, Flavia Aredes .
Avaliação de RNAs não codificadores longos específicos de
Schistosoma mansoni, como candidatos a biomarcadores da
esquistossomose murina. [manuscrito] / Flavia Aredes Rocha. - 2021.
60 f.: il.: color., gráf., tab., mapa.

Orientadora: Profa. Renata Guerra de Sá Cota.
Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro
Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia.

Área de Concentração: Genômica e Proteômica.

1. Esquistossomose. 2. Schistosoma mansoni. 3. Biomarcadores. I.
Cota, Renata Guerra de Sá. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III.
Título.

CDU 616.993.122

Bibliotecário(a) Responsável: Celina Brasil Luiz - CRB6-1589



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
PRO-REITORIA DE PESQUISA, POS-GRADUACAO E
INOVACAO
NUCLEO DE PESQUISAS EM CIENCIAS BIOLOGICAS
PROGRAMA DE POS-GRADUACAO EM BIOTECNOLOGIA



FOLHA DE APROVAÇÃO

Flávia Arêdes Rocha

Expressão e avaliação do potencial de biomarcador de RNAs não codificadores longos em *Schistosoma mansoni*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de mestre

Aprovada em 05 de maio de 2021

Membros da banca

Doutora - Renata Guerra de Sá Cota - Orientadora (Universidade Federal de Ouro Preto)
Doutora - Fernanda Janku Cabral - (Universidade Estadual de Campinas)
Doutora - Glenda Nicioli da Silva - (Universidade Federal de Ouro Preto)

Renata Guerra de Sá Cota, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 22/07/2021



Documento assinado eletronicamente por **Renata Guerra de Sá Cota, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 22/07/2021, às 20:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0167381** e o código CRC **C6A195F5**.

AGRADECIMENTO

Agradeço imensamente às instituições de fomento FAPEMIG, CAPES e CNPQ, por todo o apoio e por darem suporte para o desenvolvimento de pesquisas, que agregam conhecimento e avanços tecnológicos, do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBBM) - NUPEB UFOP. À minha orientadora Profa. Dra. Renata Guerra de Sá Cota, pela oportunidade, pelo incentivo de sempre e por tornar mais claras todas as minhas dúvidas e anseios. Você sempre forneceu um equilíbrio entre a liberdade para caminhar com as próprias pernas e o apoio para se sair do lugar, e ao meu ver, isso é essencial na formação de pesquisadores, muito obrigada!

Grande parte desse trabalho tem uma colaboração de cada uma das pessoas que passaram pelo LBBM, mesmo as que não tive a oportunidade de conhecer, mas principalmente da Thayane, Jennefer, Profa. Silvia e do Yuri, que compartilharam a maior parte do tempo comigo durante esses dois anos, tornando a rotina mais divertida e compartilhando conhecimentos e cafezinhos, muito obrigada a todos!

Agradeço ao Prof. William pela colaboração, e ao Gustavo (Laboratório de Enzimologia e Proteômica – LEP) por ceder seu tempo e paciência para ensinar sobre o processo de infecção. À Dani, pelas risadas nos momentos de desespero e por sempre estar disposta a ajudar com o que foi preciso.

Agradeço a todos àqueles que se fazem presentes sempre na minha vida, dando todo o apoio e carinho para que eu possa cumprir cada objetivo. Aos meus pais, a quem eu devo todo o conhecimento adquirido ao longo dessa vida, e aos meus irmãos pelo incentivo de sempre. Aos anjinhos da República Minas de Ouro por me aturarem desde sempre. A todos os meus amigos de Ouro Preto, por toda a força e por tornarem essa caminhada mais leve, em especial as amigas do mundo da ciência Fran e Lorrana, pela amizade maravilhosa e por serem suporte em todos esses anos de UFOP.

Por fim, agradeço todos os profissionais envolvidos no curso de Pós-Graduação em Biotecnologia – NUPEB/UFOP, pelo conhecimento, experiência e oportunidades ofertadas ao longo desses dois anos, que com certeza, irão perdurar por muito mais.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Situação da esquistossomose em países endêmicos	13
Figura 2 - Distribuição da esquistossomose nos estados endêmicos brasileiros, por faixa de positividade.....	14
Figura 3 - Ciclo de vida do <i>S. mansoni</i>	16
Figura 4 - Funções dos LncRNAs	22
Figura 5 – Visualização da extração de RNA Total em gel de agarose (1,2%)	29
Figura 6 - Visualização da extração de RNA enriquecido de lncRNAs, em gel de agarose (1,2%)	31
Figura 7 - Gene Runner versão desktop.	33
Figura 8 – Resultado da RT-PCR convencional para verificar a funcionalidade dos primers	34
Figura 9 - Curva de dissociação e produto da RT-qPCR dos Sm-lncRNAs	39
Figura 10 - Localização cromossomal dos 47 lncRNAs analisados.....	42
Figura 11 – Mapa de calor referente à expressão relativa dos Sm-lncRNAs nos diferentes estágios evolutivos relacionados com o hospedeiro mamífero	45
Figura 12 – Gráficos da expressão relativa ao eIF4E dos Sm-lncRNAs mais expressos nos diferentes estágios analisados	46
Figura 13 - Gráficos da expressão dos Sm-lncRNAs no fígado de camundongos BALB/c ...	49
Figura 14 – Verificação da integridade dos RNAs extraídos em sangue total.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Conjunto de oligonucleotídeos gerados para os 47 Sm-lncRNAs selecionados.	34
Tabela 2 – Detecção qualitativa da expressão de Sm-lncRNAs no sangue de camundongos BALB/c.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

- BLAST - Análise Bioinformática de Alinhamento Local
- CPqRR/Fiocruz - Centro de Pesquisa René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz
- DEPC - Dietilpirocarbonato
- eIF4E - fator de iniciação eucariota-4A
- ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
- ENCODE - Enciclopédia dos Elementos do DNA
- GAPDH - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
- HPRT1 - hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase1
- LBBM – Laboratórios de Bioquímica e Biologia Molecular
- lncRNAs – RNAs longos não codificadores de proteínas
- miRNAs – micro RNAs não codificadores de proteínas
- mRNAs – RNAs mensageiros
- ncRNAs – RNAs não codificadores de proteínas
- ORFs – Janelas Abertas de Leitura (*Open Reading Frames*)
- PCE – Programa de Controle da Esquistossomose
- PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
- PGH - Projeto Genoma Humano
- RT-PCR – Transcrição Reversa-Reação em Cadeia da Polimerase
- RT-qPCR – Transcrição Reversa-Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
- Sm-lncRNA – RNAs longos não codificadores de proteínas de *Schistosoma mansoni*
- sncRNAs – RNAs pequenos não codificadores de proteínas
- TA – Temperatura ambiente
- V_{máx} – velocidade máxima

RESUMO

RNAs não codificantes longos (lncRNAs) possuem um importante papel na regulação transcricional e pós-transcricional. São classificados como transcritos maiores que 200 nucleotídeos, que não apresentam potencial de codificar proteínas, sendo observados tanto no núcleo como no citoplasma. Estudos recentes vêm demonstrado que, dependendo de sua localização e de suas interações específicas com DNA, RNA e proteínas, os lncRNAs podem modular a função da cromatina, alterar a estabilidade e a tradução de mRNAs citoplasmáticos e interferir nas vias de sinalização. Muitas dessas funções, em última análise, afetam a expressão gênica em diversos contextos biológicos e muito provavelmente estão relacionados aos mecanismos referentes à interação parasito-hospedeiro. Por outro lado, os padrões de expressão estágio-específico sugerem que os lncRNAs são biomarcadores em potencial para a detecção da esquistossomose, uma parasitose debilitante e de grande impacto socioeconômico no mundo, causada por platelmintos do gênero *Schistosoma*. Acredita-se que a complexidade dos programas de diferenciação e desenvolvimento observado entre os diferentes estágios evolutivos e ambientes onde o parasita vive seja dependente da regulação da expressão gênica, e neste cenário os lncRNAs seriam moléculas chave. As hipóteses desse trabalho são que o *S. mansoni* expressa um conjunto de lncRNAs de forma diferencial através da reprogramação de sua expressão gênica em determinados estágios evolutivos, e que esses lncRNAs são importantes na interação parasito-hospedeiro. Recentemente, nosso grupo de pesquisa identificou um conjunto de 170 novos lncRNAs em *S. mansoni* e deste conjunto, quinze mostraram expressão diferencial quando comparado os estágios larvais e adultos do verme, bem como entre machos e fêmeas. Continuando essa linha de investigação, o objetivo desse trabalho foi avaliar a expressão de 47 lncRNAs nos estágios de cercárias, esquistossômulos com 3,5h de cultivo *in vitro*, vermes adultos e ovos, bem como em amostras de fígado e sangue de camundongos BALB/c infectados e não infectados com *S. mansoni*. Do conjunto de 47 lncRNAs avaliados, 29 foram considerados como expressos em vermes adultos, utilizando a técnica de qRT-PCR. A seguir, este conjunto se mostrou diferencialmente expresso entre os estágios evolutivos avaliados. Posteriormente foram realizados testes qualitativos e quantitativos utilizando fígado e sangue de camundongos infectados e não infectados, apresentando detecção de lncRNAs específicos de *S. mansoni* no hospedeiro mamífero. Em conjunto, podemos concluir que os lncRNAs são diferencialmente expressões em *S. mansoni* e com potencial de biomarcador.

Palavras-chave: lncRNAs, esquistossomose, biomarcadores, regulação, parasito-hospedeiro.

ABSTRACT

Long non-coding RNAs (lncRNAs) play an important role in transcriptional and post-transcriptional regulation. They are classified as transcripts larger than 200 nucleotides, which have no potential to encode proteins, being observed both in the nucleus and in the cytoplasm of cells. Recent studies have shown that depending on their location and their specific interactions with DNA, RNA and proteins, lncRNAs can modulate chromatin function, alter the stability and translation of cytoplasmic mRNAs and interfere in the signaling pathways. Many of these functions, ultimately, affect gene expression in various biological contexts and are most likely related to mechanisms related to host-parasite interaction. On the other hand, stage-specific expression patterns suggest that lncRNAs are potential biomarkers for the detection of schistosomiasis, a debilitating parasitosis, of great socioeconomic impact in the world, caused by *Schistosoma* genus. It is believed that the complexity of the differentiation and development programs observed between the different evolutionary stages and environments where the parasite lives is dependent on the regulation of gene expression, and in this scenario the lncRNAs would be key molecules. The hypotheses of this work are that *S. mansoni* expresses a set of lncRNAs in a differential way through the reprogramming of its gene expression in certain evolutionary stages, and that these lncRNAs are important in the parasite-host interaction. Recently, our research group identified a set of 170 new lncRNAs in *S. mansoni* and of this set, fifteen showed differential expression when comparing the larval and adult stages of the worm, as well as between males and females. Continuing this line of investigation, the hypothesis of this work was to evaluate the expression of 47 lncRNAs in the stages of cercariae, schistosomules with 3.5 h of *in vitro* culture, adult worms and eggs, as well as in liver and blood samples from BALB / c mice, infected and not infected with *S. mansoni*. Of the set of 47 lncRNAs evaluated, 29 were considered to be expressed in adult worms, using the qRT-PCR technique. Next, this set was shown to be differentially expressed between the evolutionary stages evaluated. Subsequently, qualitative and quantitative tests were performed using liver and blood of infected and uninfected mice, showing detection of specific *S. mansoni* lncRNAs in the mammalian host. Together, we can conclude that lncRNAs are differentially expressed in *S. mansoni* stages and have a potential for being biomarkers.

Palavras-chave: lncRNAs, schistosomiasis, biomarkers, regulation, host-parasite

Sumário

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Histórico e epidemiologia da esquistossomose	13
2.1.1 <i>Ciclo de vida do S. mansoni e imunopatologia</i>	15
2.1.2 <i>Diagnóstico e tratamento</i>	18
2.2 Genoma e transcritoma do S. mansoni	20
2.3 Os lncRNAs e suas características	21
2.4 lncRNAs como biomarcadores da esquistossomose.....	22
3 JUSTIFICATIVA	24
4 OBJETIVO	26
4.1 Objetivos específicos:	26
5 MATERIAIS E MÉTODOS	27
5.1 Experimentação in vivo.....	27
5.2 Estabelecimento da infecção em camundongos BALB/c	27
5.3 Extração de RNA total de amostra do fígado, sangue (I(100cerc)) e dos diferentes estágios do S. mansoni relacionados ao hospedeiro definitivo.....	28
5.4 Extração de RNA total enriquecido com longos das amostras de sangue dos grupos Controle e I(70cerc).....	30
5.5 Transcrição reversa para obtenção de cDNA.....	31
5.6 Validação experimental dos Sm-lncRNAs.....	32
5.6.1 <i>Estabelecimento dos Oligonucleotídeos dos Sm-lncRNAs selecionados</i>	32
5.6.2 <i>Expressão dos Sm-lncRNAs previstos in silico por RT-qPCR</i>	37
5.6.3 <i>Validação dos primers por curva de dissociação</i>	38
5.7 Expressão relativa dos Sm-lncRNAs em diferentes estágios evolutivos do S. mansoni	39
5.8 Expressão relativa dos Sm-lncRNAs em amostras biológicas de fígado e sangue dos camundongos infectados e não infectados	40
5.9 Análises estatísticas	40
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
6.1 Análise bioinformática das sequências	41
6.2 Validação experimental dos 47 Sm-lncRNAs previamente identificados.....	43
6.3 Expressão dos Sm-lncRNAs nos estágios de cercária, esquistossômulo e verme adulto do S. mansoni	44

6.4 Expressão dos Sm-lncRNAs no fígado dos grupos Controle, I(70cerc) e I(100cerc)..	47
6.5 Expressão dos Sm-lncRNAs no sangue dos grupos Controle, I(70cerc) e I(100cerc)	50
7 CONCLUSÃO.....	53
8 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	54
9 REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

O dinamismo observado nos ecossistemas se revela em uma complexa rede de interação dos seus constituintes, sejam elas harmônicas ou desarmônicas, que os expõem a um constante desbalanço entre a desordem e o equilíbrio. Uma peculiar e recorrente relação dessas redes é o parasitismo, um verdadeiro combo de estratégias e mecanismos, que sustentam uma luta íntima e contínua entre o parasito e seu hospedeiro (KARVONEN; SEEHAUSEN, 2012; ODUM, 2011).

O ser humano, por possuir a homeotermia corporal característica dos mamíferos, torna-se um interessante habitat tanto para ecto quanto para endoparasitos (MORAND; HARVEY, 2000). Um claro exemplo de parasitose humana é a esquistossomose, causada por helmintos do gênero *Schistosoma*, cuja relação com populações humanas possui proporções milenares. De acordo com a filogenética molecular, a estimativa é de que o *Schistosoma mansoni* tenha uma relação com a espécie humana que ultrapasse 100.000 anos (CRELLEN *et al.*, 2016). Já o relato concreto mais antigo existente, é relativo à descoberta de ovos do parasito em múmias encontradas na síria, as quais se estimam mais de 6.000 anos (ANASTASIOU *et al.*, 2014). Tantos anos por trás de uma interação parasito-hospedeiro, tornam a relação cada vez mais específica, sendo um dos grandes fatores capazes de explicar o atual título da esquistossomose de segunda parasitose tropical/subtropical de maior impacto socioeconômico mundial, e um endemismo que alcança 52 países, incluindo o Brasil, onde se encontra prevalência para a espécie *S. mansoni* (WHO, 2018).

A dimensão mundial apresentada pela esquistossomose, fez com que houvesse uma moção generalizada em encontrar um tratamento e métodos de diagnóstico que pudessem mitigar os impactos causados por essa parasitose. Nesse cenário surgem, durante a década de 70, o método diagnóstico Kato-Katz (KATZ; CHAVES; PELLEGRINO, 1972) e o fármaco praziquantel (FENWICK apud MCMANUS *et al.*, 2018). Ambos foram os métodos de melhor custo benefício para o combate da esquistossomose dentre os desenvolvidos à época, e assim permanecem atualmente, pois ainda não se foi capaz de desenvolver métodos que lhes suprissem as falhas. Passado meio século, os números relativos à esquistossomose se mantêm absurdos, evidenciando a negligência em relação a essa parasitose, bem como a baixa eficiência apresentada pela aplicação dos métodos de diagnóstico/tratamento (WILSON, 2020).

No que concerne a interação parasito-hospedeiro, a era da tecnologia e das ciências ômicas, tem sido fundamental para lançar luz sobre as complexidades dos mecanismos dessa

relação. O mundo dos já conhecidos RNAs não codificadores de proteínas (ncRNAs), se ampliou de maneira monumental ao se verificar que 91% da porção transcrita do genoma humano não correspondia a genes codificadores de proteínas. A abundância dessas moléculas, seu papel regulatório e potencial epigenético, elevaram a necessidade de entendê-las mais íntima e detalhadamente, e uma exploração que prevalece há cerca de dez anos sobre o tema, ainda não foi suficiente para fazê-lo (JARROUX; MORILLON; PINSKAYA, 2017).

Dentre as classes de ncRNAs, àqueles com mais de 200 nts de tamanho, classificados como RNAs longos não codificadores de proteínas (lncRNAs), possuem um merecido destaque. Essas moléculas, além de serem relativamente abundantes nos organismos, possuem uma diversidade de funções interessantes, atuando na regulação transcricional e pós-transcricional, transporte, estrutura, entre outras. Essas importantes funções desempenhadas pelos lncRNAs, são consonantes com sua correlação à diversos distúrbios no organismo humano (BOON *et al.*, 2016). Em adição, algumas outras características dos lncRNAs como maior taxa de evolução interespecífica e especificidade de expressão órgão-tecido-células em relação aos demais ncRNAs, os destacam como importantes moléculas dotadas de potencial para biomarcadores, com aplicação em prognósticos, diagnósticos e intervenções terapêuticas (LÓPEZ-JIMÉNEZ; ANDRÉS-LEÓN, 2021).

Todavia, ainda há um vasto campo de conhecimento a ser explorado quando se refere aos lncRNAs, principalmente no que se diz respeito à sua função na interação parasito-hospedeiro. Uma observação clara desse fato, é a verificação de que existem apenas treze trabalhos sobre lncRNAs e esquistossomose publicados, a grande maioria ainda focada na identificação dessas moléculas nas diferentes espécies e fases de desenvolvimento do *Schistosoma*. Três destes trabalhos, pertencem à equipe do LBBM, sendo um deles desenvolvido por Oliveira e colaboradores (2018), em que houve identificação de 170 novos lncRNAs específicos para *S. mansoni*, e têm sido a base para a equipe no desenvolvimento de novas pesquisas e aprofundamento do tema.

Considerando o baixo conhecimento em relação aos lncRNAs de *S. mansoni*, esse projeto surge com o propósito de investigar o potencial de biomarcadores de 47 lncRNAs dos 170 lncRNAs novos identificados (OLIVEIRA *et al.*, 2018). Para tal, o conjunto previsto computacionalmente, passou por um processo de validação experimental, com posterior análise de expressão tanto nas diferentes fases do *S. mansoni* relacionadas com o hospedeiro definitivo, como no fígado e sangue de um modelo murino composto por camundongos BALB/c, não infectados e infectados pelo verme.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

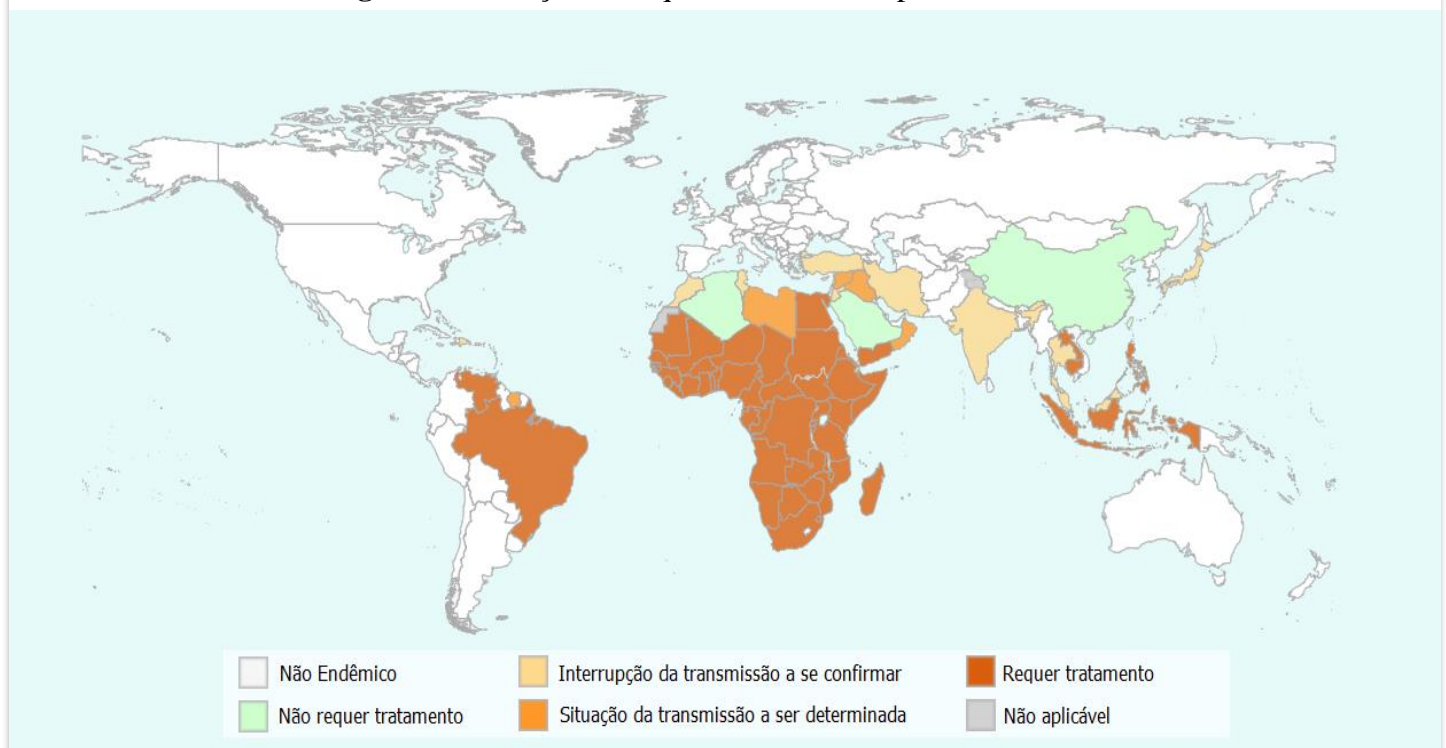
2.1 Histórico e epidemiologia da esquistossomose

Em 1851, ao realizar autópsias em cadáveres de um hospital em Cairo, no Egito, o fisiologista alemão Theodor Maximilian Bilharz encontrou vermes nunca antes descritos, aos quais denominou *Distomum haematobium*, e ligou sua presença a sintomas que hoje se sabem caracterizar a doença, sendo a es

quistossomose denominada bilharziose durante muitos anos em sua homenagem. Pouco depois, em 1858, o zoólogo alemão David Friedrich Weinland, propôs a troca de nomeação do gênero para *Schistosoma* (do grego “*schistos*” = fenda e “*soma*” = corpo), devido à anatomia apresentada pelo macho, e acabou sendo aceito pela Comissão de Nomenclatura Zoológica (DI BELLA *et al.*, 2018).

Após a descoberta do *S. haematobium*, também foram descobertos o *S. mansoni* (MANSON, 1902) e o *S. japonicum* (KATSURADA, 1904 apud WILSON, 2020). Essas três espécies, compreendem as principais responsáveis pelos impactos mundiais verificados em decorrência da esquistossomose. Sua dispersão ao longo do globo, constitui uma distribuição bem demarcada que alcança 52 países endêmicos (Figura 1), sendo o *S. japonicum* prevalente

Figura 1 - Situação da esquistossomose em países endêmicos

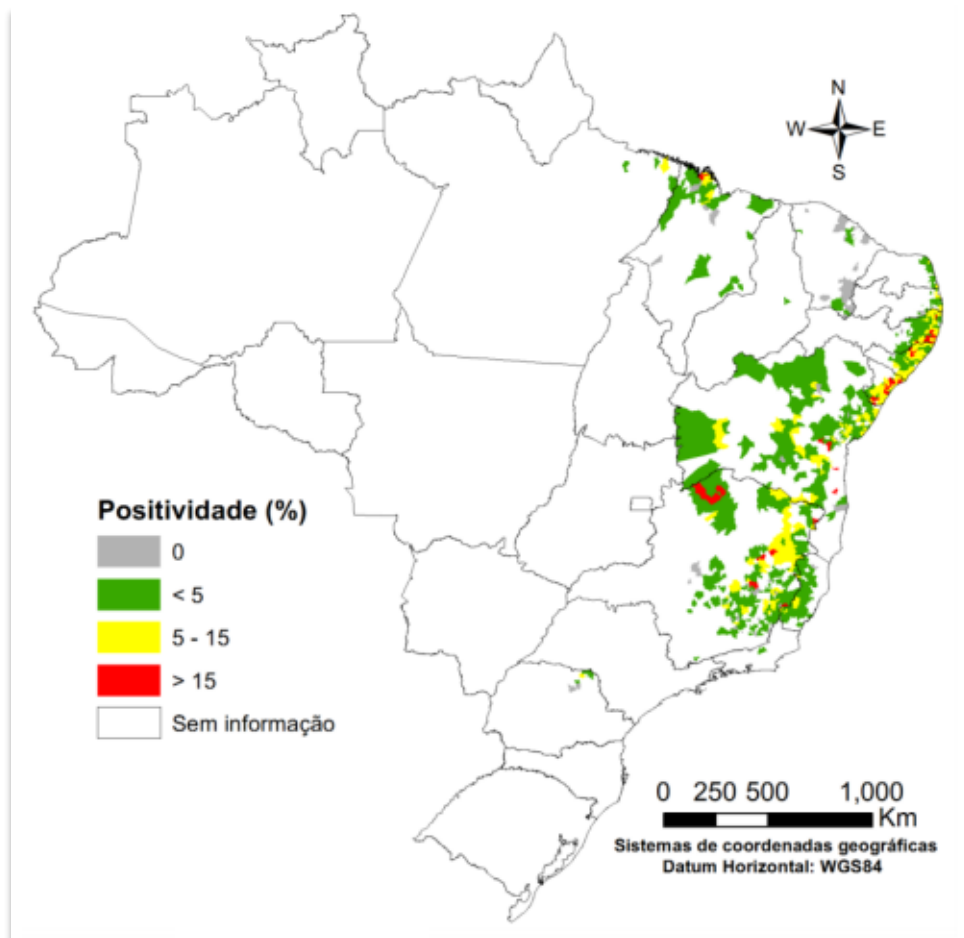


Fonte: Adaptado de Organização Mundial da Saúde (WHO, 2020).

na Ásia, o *S. haematobium* na África, e o *S. mansoni* predominantemente na América do Sul, mas com ocorrência também na África. Além dos locais que apresentam endemismo, há registro da esquistossomose em outros 26 países. Em totalidade, esses locais congregam cerca de 700 milhões de pessoas vivendo em áreas endêmicas, sendo constantemente expostas ao risco de infecção, onde se estima que hajam mais de 200 milhões de pessoas infectadas e cerca de 200 mil mortes anuais em decorrência da esquistossomose (WHO, 2018).

O Brasil é um dos principais países da América do Sul afetados pela esquistossomose mansoni, juntamente com a Venezuela e o Caribe. Pressupõe-se que a parasitose tenha sido introduzida no Brasil durante o tráfico de escravos, mas o primeiro relato do *S. mansoni* no país só aconteceu em 1908 na Bahia, por Pirajá da Silva (FALCÃO, 2008). Levantamentos mais recentes do Programa de Controle da Esquistossomose (PCE), apontam o endemismo da *S. mansoni* em oito dos estados brasileiros: Alagoas, Bahia, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Sergipe, Espírito Santo e Minas Gerais (Figura 2). Também se pode verificar a

Figura 4 - Distribuição da esquistossomose nos estados endêmicos brasileiros, por faixa de positividade



Fonte: Adaptado de Ministério da Saúde - SISPCE/SVS/MS (2006-2017)

transmissão da esquistossomose em outros dez estados brasileiros, apesar de não apresentarem endemismo. Nesses locais, estima-se que existam mais de 1,5 milhões de pessoas infectadas, gerando danos referentes à morbidade e mortalidade, redução do fluxo de turismo e prejudicando o desenvolvimento infantil (BRASIL, 2017; NASCIMENTO *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2017).

2.1.1 Ciclo de vida do *S. mansoni* e imunopatologia

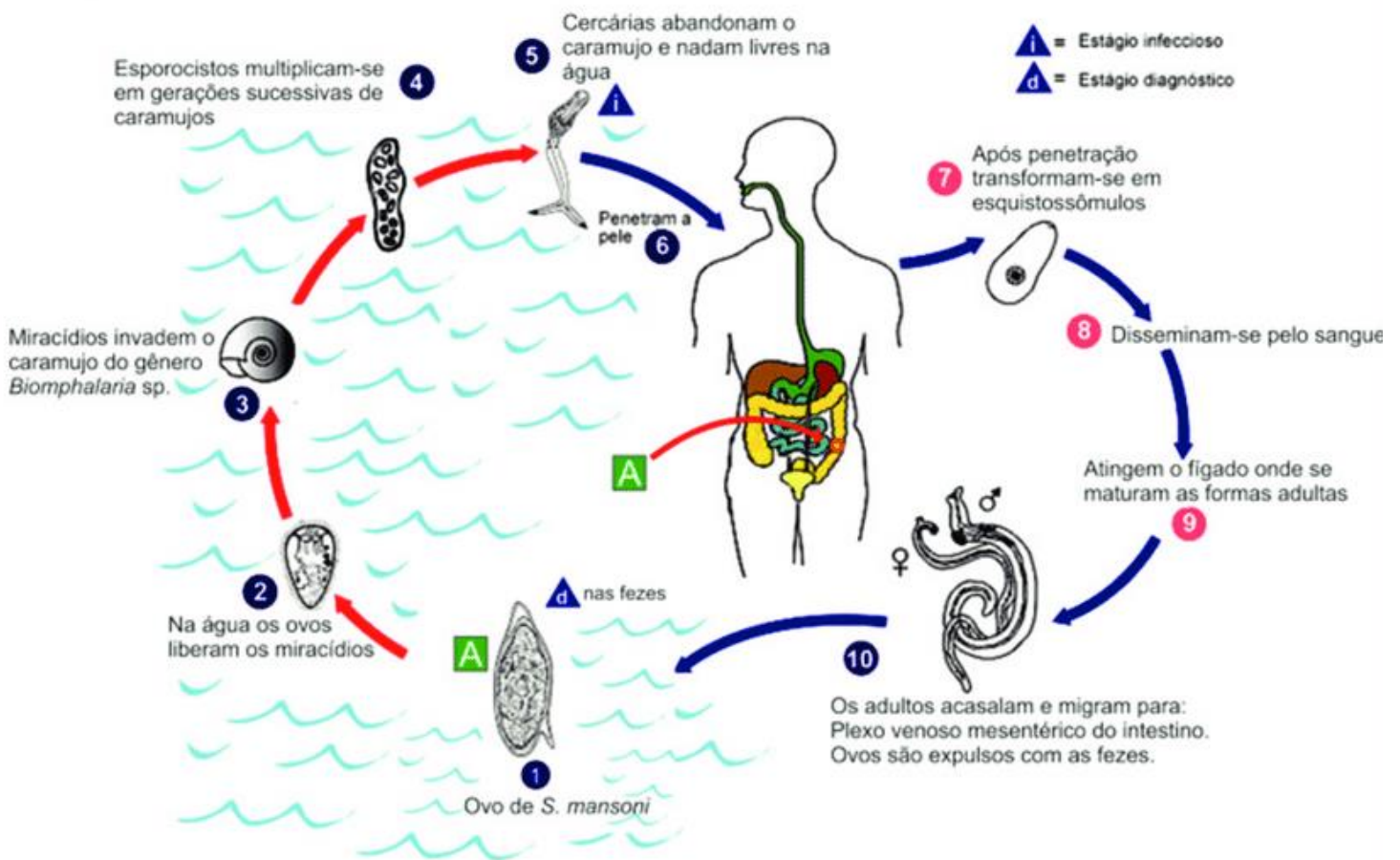
Posteriormente ao feito de Bilharz em descrever a primeira espécie de *Schistosoma*, houve um direcionamento dos esforços para se conhecer melhor esse parasito e entender as consequências de sua infecção em humanos. Ainda assim, o mistério sobre como ocorria a infecção e qual era o ciclo de vida do parasito permaneceu durante muito tempo, prejudicando a prevenção e estratégias de combate à esquistossomose. Apenas em 1913, pesquisadores japoneses identificaram moluscos pomatiopsídeos do gênero *Oncomelania* nos campos de cultivo de arroz, e visualizaram cercárias emergindo desses animais, permitindo a sua ligação direta com a infecção por *S. japonicum* (MIYAIRI; SUZUKI, 2013 apud WILSON, 2020).

Diferentemente do *S. japonicum*, o *S. mansoni* e o *S. haematobium* possuem moluscos planorbídeos como hospedeiro intermediário, relacionando-se com espécies do gênero *Biomphalaria* e *Bulinus*, respectivamente. Essa especificidade de relação das diferentes espécies de *Schistosoma* com os hospedeiros intermediários, explica a distribuição demarcada ao longo do globo, pois depende diretamente da distribuição dos moluscos. No território brasileiro, as principais espécies de *Biomphalaria* encontradas são: *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* (DOS SANTOS CARVALHO; JANNOTTI-PASSOS; CALDEIRA, 2008).

O ciclo completo do *Schistosoma* foi descrito somente dois anos após a descoberta do hospedeiro intermediário (LEIPER, 2015), constatando-se pequenas diferenças entre cada uma das espécies. Em relação ao *S. mansoni*, uma espécie de platelminto membro da família Schistosomatidae e pertencente à classe Trematoda, o ciclo de vida se inicia quando o ovo entra em contato com a água, após ser liberado no ambiente, e encontra os estímulos necessário para a ruptura da casca e emersão do estágio de vida livre natante – o miracídio (Figura 3). Esta fase infecciosa, possui numerosos cílios em suas células epiteliais, por meio dos quais se direcionam aos hospedeiros intermediários, provavelmente orientados por estímulos químicos liberados por estes. Quando os encontram, os miracídios se aderem às partes moles do molusco utilizando uma papila apical que funciona como ventosa, e iniciam a secreção do conteúdo enzimático de

suas glândulas, que juntamente com movimentos mecânicos dos cílios e musculatura, permitem a penetração da larva no epitélio do molusco. Durante a penetração, os miracídeos perdem as placas ciliadas, e iniciam um processo de diferenciação assim que adentram o tegumento, culminando na formação dos chamados esporocistos “mãe”. Esse estágio de vida, tem como característica a reprodução assexuada, dando origem aos esporocistos “filhos”, que por volta da sua terceira geração podem se diferenciar em cercárias (REY, 2010).

Figura 7 - Ciclo de vida do *S. mansoni*



Fonte: Adaptado de Centro de Controle de Doenças, 2017.

As cercárias também compreendem um estágio de desenvolvimento livre natante do *Schistosoma*, responsável pela infecção no hospedeiro definitivo, que compreende alguns vertebrados, incluindo o homem. Elas são compostas por um corpo celular e uma cauda, utilizada para se movimentar ativamente a procura de um hospedeiro definitivo, em geral se direcionando à superfície do corpo d'água. Ao encontrarem um hospedeiro, elas se aderem à superfície da pele, secretam enzimas proteolíticas, e realizam movimentos mecânicos com suas

caudas, permitindo a penetração do corpo celular no epitélio, processo que culminará na perda da cauda. A penetração da cercária no hospedeiro definitivo, ocasiona um processo inflamatório, que corresponde à formação de pequenas pápulas locais (NELWAN, 2019; REY, 2010).

Assim que as cercárias penetram os tecidos da pele do hospedeiro, inicia-se um processo de diferenciação em esquistossômulo, ao mesmo passo em que lida com o sistema imune inato residente. Os esquistossômulos migram ao longo das diferentes camadas de tecidos, visando atingir os vasos sanguíneos, até o quarto dia de infecção. Ao adentrarem os vasos sanguíneos, os esquistossômulos se beneficiam da corrente sanguínea e se dirigem passivamente ao pulmão do hospedeiro. Por volta do oitavo dia após a infecção, saem do pulmão e se dirigem ao sistema porta-hepático, onde começam a se alimentar de hemácias, constituindo um processo importante para a diferenciação em verme adulto. Da infecção até o início da oviposição há a categorização da fase aguda da esquistossomose, em que o hospedeiro aciona a resposta imune do tipo Th1, e é comumente assintomática em indivíduos que vivem em regiões endêmicas. Para indivíduos que apresenta sintomas, é comum a manifestação de febre durante as primeiras semanas de infecção - denominada febre de Katayama. A presença do verme no pulmão pode causar desconforto respiratório e tosse, e no sistema porta, faz com que o hospedeiro apresente quadro anêmico (REY, 2010; SCHWARTZ; FALLON, 2018).

Após o vigésimo oitavo dia de infecção, os vermes adultos machos estão aptos a completar o seu desenvolvimento, porém as fêmeas somente terminam sua maturação quando se associam ao macho. O pareamento se dá quando a fêmea entra no canal ginecóforo do macho, que é formado devido à uma dobradura das laterais do seu corpo, e assim ambos permanecem durante toda a vida. Além do claro dimorfismo sexual, a fêmea é maior do que o macho, e consome consideravelmente mais eritrócitos, principalmente durante a produção dos ovos (LEWIS; TUCKER, 2014).

O casal pareado migra para as veias mesentéricas do intestino do hospedeiro, local em que ocorre a cópula e a posterior oviposição, podendo assim viver, durante 5-15 anos em geral. Cerca de 50% dos ovos liberados, se fixam no endotélio com o auxílio da espícula lateral, e iniciam um processo de transposição ativa dos tecidos até atingir a luz do intestino, sendo posteriormente evacuados juntamente com as fezes, e reiniciando o ciclo. A presença do ovo no organismo hospedeiro, estimula uma súbita troca da resposta imunológica Th1 para Th2, importante para a formação do granuloma que atua no combate aos ovos. Os granulomas tem um aparente papel no alcance da luz intestinal por parte dos ovos, porém, ainda não se sabe porque, uma porcentagem dos ovos não completa o percurso, permitindo a ação do granuloma

na eliminação do embrião. Com esse objetivo cumprido, iniciam-se os processos de calcificação do ovo e fibrose tecidual nos arredores, característicos do início da fase crônica da esquistossomose (LEWIS; TUCKER, 2014; NEVES *et al.*, 2005).

Certa parte dos ovos liberados nos vasos sanguíneos, acaba sendo passivamente carregada pela corrente sanguínea e atingindo outros órgãos. Os órgãos mais comuns quando se considera a esquistossomose mansoni, são o fígado e o baço, mas em casos mais raros pode-se encontrá-los em órgãos ectópicos. A formação do granuloma é o grande responsável pela patologia da parasitose, na qual é comum observar a hepatoesplenomegalia, hipertensão periportal, anemia, diarreia, dores abdominais, e outros sintomas que dependem de fatores como tempo de infecção e carga parasitária (MCMANUS *et al.*, 2018).

2.1.2 Diagnóstico e tratamento

As doenças negligenciadas necessitam de uma verdadeira sistematização de ações para que se possa erradicá-las, exigindo a realização conjunta de campanhas de educação ambiental, melhoria de infraestrutura, e o seu eficiente diagnóstico e tratamento. Para a esquistossomose, as atuais estratégias de combate são focadas principalmente no esforço de detecção e tratamento em massa de indivíduos que habitam regiões endêmicas (ENGELS; ZHOU, 2020; NELWAN, 2019).

Uma das maneiras de se detectar a esquistossomose, consiste em realizar testes imunológicos (ELISA), que podem ser performados tanto com anticorpos anti-*Schistosoma* como para antígenos do verme. A detecção de anticorpos específicos para *Schistosoma* em amostras sorológicas, pode ser uma boa opção para regiões em que há baixa prevalência e para indivíduos sintomáticos com histórico de turismo sugestivo, mas não é idealizado pois esses anticorpos se mantêm durante muitos anos no corpo do hospedeiro, mesmo após o fim da infecção. Além disso, essa técnica não permite a diferenciação da espécie infectante, exigindo testes posteriores (OGONGO; KARIUKI; WILSON, 2018).

Durante a alimentação dos esquistossômulos e vermes adultos, há a liberação de um rico conteúdo de vesículas extracelulares que atuam no rompimento das hemácias do hospedeiro e permitem o acesso ao seu interior substancial. Após a digestão, o residual não digerido é regurgitado na corrente sanguínea, juntamente com vesículas e moléculas do verme. Alguns antígenos catódicos e anódicos circulantes, liberados no corpo do hospedeiro durante esse ato, podem ser detectados por ensaios imunológicos em amostras de sangue e urina. Porém, esse teste não é recomendado para regiões de baixa endemicidade, pois não é eficiente na detecção

de baixas cargas parasitárias, possuindo uma sensibilidade similar ao Kato-Katz (MCMANUS *et al.*, 2018).

O método de detecção Kato-Katz, foi desenvolvido em 1972, e consiste em um método de sedimentação fecal em que há a separação dos ovos do *S. mansoni* do seu conteúdo (KATZ; CHAVES; PELLEGRINO, 1972). Apesar de ser um teste barato e prático, o fato do Kato-Katz ser baseado na busca pelo ovo, implica a uma detecção relacionada com a fase crônica da doença, pois a oviposição em curso indica o alojamento dos ovos no tecido e formação dos granulomas. A sensibilidade do Kato-Katz se limita a 20 ovos por gramas de fezes, o que o torna ineficaz para a detecção de baixas cargas parasitárias. Além disso, para tentar reduzir a probabilidade de resultado falso negativo em razão dessa sensibilidade, o teste de cada indivíduo é realizado cerca de três vezes com coletas em diferentes horários, pois mesmo que a carga parasitária não seja tão baixa, outros fatores aos quais a fêmea está acondicionada podem influenciar nas taxas diárias de oviposição. Portanto, apesar de ser amplamente utilizado na detecção da esquistossomose, o Kato-Katz é um método com grande potencial para subestimar as estatísticas correspondente à parasitose (OGONGO; KARIUKI; WILSON, 2018).

Em relação ao tratamento para a esquistossomose, desde o início do século XX diversos fármacos começaram a ser administrados à indivíduos infectados, mas todos demandavam um longo período de tratamento, além de apresentarem severos efeitos colaterais. Durante a década de 60, a quimioterapia moderna promoveu uma melhora na seleção e produção dos fármacos, e a partir de 1970, os fármacos oxaminiquine e praziquantel demonstraram um bom desempenho contra todas as espécies de *Schistosoma* e baixos relatos de efeitos colaterais. Porém, verificou-se resistência do verme à oxaminiquine, tornando o praziquantel o único fármaco utilizado para tratamento da parasitose até os dias atuais (WILSON, 2020).

Mesmo após tantos anos, o mecanismo de ação do praziquantel ainda não está completamente elucidado, impedindo o desenvolvimento de genéricos e derivados. Se sabe que ele possui efeito somente contra os vermes adultos, sendo os esquistossômulos raramente afetados durante o tratamento. Por compreender o único fármaco aplicado no combate à esquistossomose, a utilização em massa do praziquantel nas campanhas, levanta sérias preocupações quanto a verificação da resistência do verme em campo. Além disso, o fato de as pessoas continuarem vivendo em áreas endêmicas e manterem os antigos hábitos, aumenta a taxa de reinfecção da esquistossomose e exigem o retratamento, o que majora a preocupação acerca da resistência ao fármaco (ANDERSON; ENABULELE, 2020).

Uma solução eficaz frente a todos os métodos de tratamento e detecção da esquistossomose, seria o desenvolvimento de uma vacina. Todavia, apesar de muitos anos

dedicados a esse objetivo, pouco progresso pôde ser observado. A dificuldade do desenvolvimento de uma vacina, está sobretudo na complexidade apresentada pelo tegumento *Schistosoma*, que além de conseguir mimetizar antígenos do hospedeiro, está em constante troca modificando o conteúdo de antígenos superficiais próprios, permitindo uma eficiente evasão ao sistema imune (MCMANUS *et al.*, 2018). Como outra alternativa, a detecção de moléculas de DNA do *Schistosoma* em amostras de sangue do hospedeiro por técnicas de PCR (PONTES *et al.*, 2003), demonstrou que a alta sensibilidade da técnica tem um potencial futuro no desenvolvimento de métodos diagnóstico, tornando promissora a busca por biomarcadores referentes à esquistossomose (OGONGO; KARIUKI; WILSON, 2018).

2.2 Genoma e transcrissoma do *S. mansoni*

O aperfeiçoamento das tecnologias aplicadas a análises moleculares, está permitindo um conhecimento cada vez maior acerca dos indivíduos e de suas interações. Em relação ao *S. mansoni*, o primeiro estudo focado em seu genoma, foi publicado em 1982, revelando um total de oito cromossomos sendo um deles sexual, com o macho homogamético (ZZ) e a fêmea heterogamética (ZW) (SIMPSON; SHER; MCCUTCHAN, 1982).

Um divisor de águas nas análises moleculares foi o projeto genoma humano (PGH), que se iniciou em 1990 com um investimento no sequenciamento total do genoma humano, findando somente em 2001 (CRAIG VENTER *et al.*, 2001). A abertura do PGH foi o pontapé inicial para que outros grupos se concentrassem no sequenciamento gênico de diversas espécies de eucariotos. Dois anos após o início do PGH, surge o Projeto Genoma do *S. mansoni*, publicado quase completo em 2009 (BERRIMAN *et al.*, 2009), já o transcrissoma do *S. mansoni* iniciou-se em 2001 e foi finalizado em 2003 (VERJOVSKI-ALMEIDA *et al.*, 2003).

A principal contribuição do PGH, surgiu como uma enorme surpresa, pois distante das expectativas correspondentes às proporções funcionais do genoma humano, descobriu-se que cerca de 2% correspondia a genes codificadores de proteínas de uma grande porção transcrita. Esse dado abriu inúmeras perguntas acerca da composição do transcrissoma dos organismos, impulsionando a criação do projeto Enciclopédia dos Elementos do DNA (ENCODE), em 2003, visando-se aprofundar os conhecimentos sobre as regiões transcritas do genoma humano (JARROUX; MORILLON; PINSKAYA, 2017; WRIGHT; BRUFORD, 2011).

Ao longo da duração do projeto ENCODE, diversos ncRNAs foram sendo identificados, mas o *boom* de pesquisas sobre o tema só aconteceu após o seu fim, em 2012. Nesse ano, o projeto lançou como resultado, informações sobre cerca de 80% das regiões transcritas do

genoma não condizente à genes codificadores de proteínas, evidenciando àquelas correspondentes a uma importante função regulatória, ressaltando principalmente os ncRNAs (DUNHAM *et al.*, 2012). Dentre as classes dessas moléculas, um destaque inicial foi atribuído aos ncRNAs pequenos (sncRNAs), os mantendo durante certo tempo como foco entre os estudos. Posteriormente, a classe de ncRNAs longos (lncRNAs) foi ganhando destaque, e atualmente estão em grande evidência como alvo de estudos sobre moléculas regulatórias (DHANOA *et al.*, 2018).

2.3 Os lncRNAs e suas características

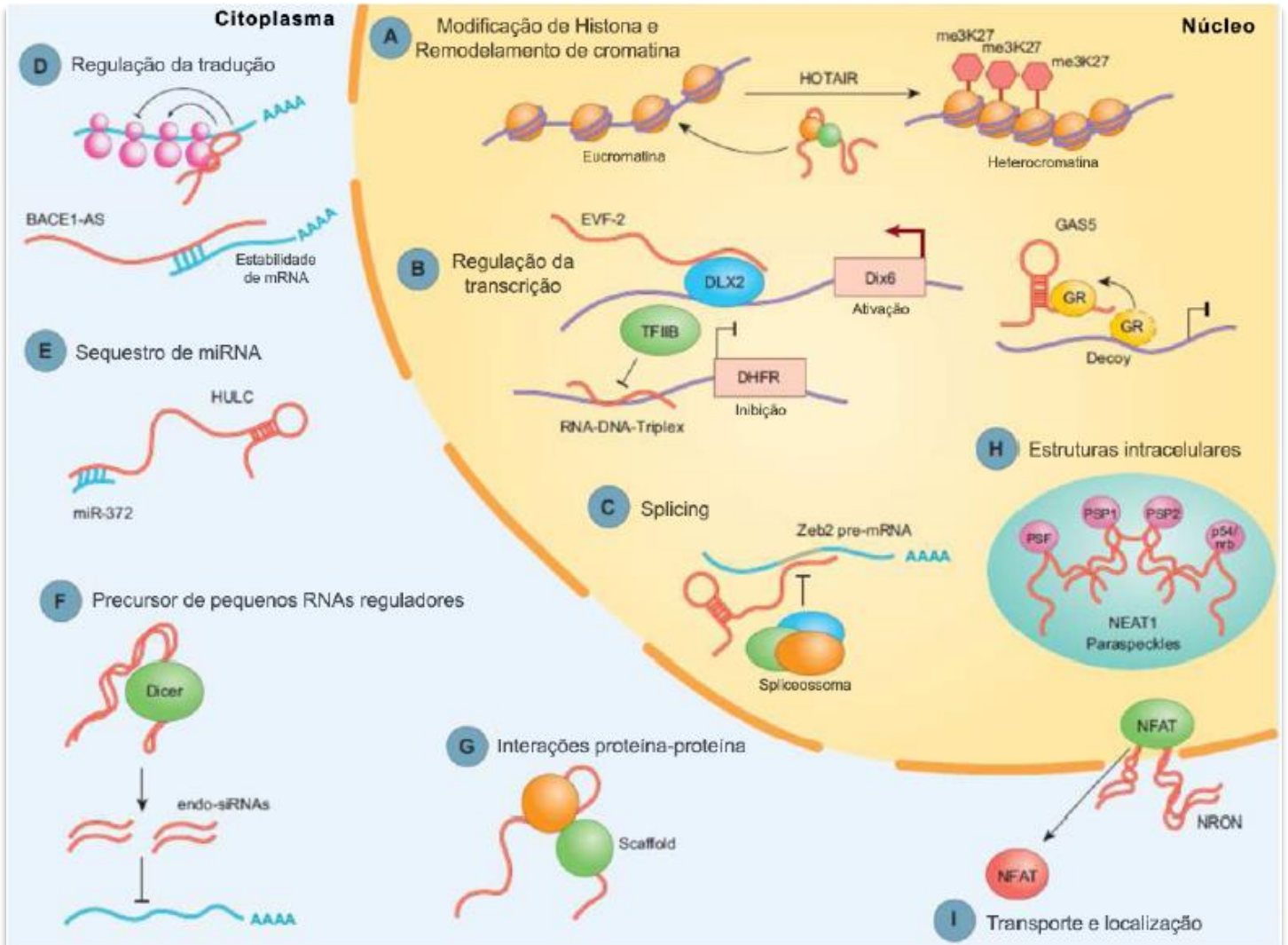
Com o fim do projeto ENCODE, os ncRNAs cujo comprimento ultrapassa 200 nucleotídeos, foram classificados como lncRNA. Esse grupo, compreende ncRNAs que possuem algumas similaridades aos RNAs mensageiros (mRNAs), quanto ao processo de transcrição: são transcritos pela RNA polimerase II e passam por etapas processamento pós-transcricional como *splicing*, adição de CAP-5' e cauda poli-A. Apesar disso, os lncRNAs apresentam algumas peculiaridades que os diferem dos mRNAs, como baixa taxa conservação interespecífica, nível de expressão espécime, tecido e célula específico, além de não possuírem ou apresentarem *Open Reading Frames* (ORFs) pequenas, o que os limita a raros casos de tradução em pequenos peptídeos (DERRIEN *et al.*, 2012; JARROUX; MORILLON; PINSKAYA, 2017).

A classificação dos lncRNAs pode se dar quanto a sua localização, tamanho, elementos regulatórios e função. Dentre estas, a mais utilizada é a classificação quanto à sua localização em relação ao gene codificador de proteína referente, caracterizando-os em: intergênico, intrônico, senso, antisenso e bidirecional. De acordo com essa localização, também se define se a regulação dos lncRNAs tem ação *cis* ou *trans* no genoma (JARROUX; MORILLON; PINSKAYA, 2017).

A localização gênica dos lncRNAs, também permite uma previsão acerca do papel desempenhado por eles nos processos biológicos. Muitas funções dos lncRNAs já puderam ser identificadas, verificando-se atuações como *scaffold* mediando a interação entre proteínas, no sequestro de miRNAs, interagindo com essas moléculas e impedindo sua atuação, como *enhancers* nas regiões promotoras, como guia da interação de fatores de transcrição com o genoma, e também como transportadores e componentes estruturais. Toda essa gama funcional do lncRNAs os torna diretamente relacionados com a regulação da tradução e transcrição, *splicing*, modificação de histonas, remodelamento da cromatina, entre outros (KARLSSON;

BACCARELLI, 2016)(Figura 4).

Figura 10 - Funções dos LncRNAs



Conjunto de funções dos lncRNAs, atualmente conhecidas, com atuação no núcleo (A, B, C e H) e no citoplasma (D, E, F, G e I) das células.

Fonte: Adaptado de Karlsson e Baccarelli (2016).

2.4 LncRNAs como biomarcadores da esquistossomose

A tecnologia de biomarcadores, é utilizada no meio científico, para fins de detecção, prognóstico, tratamento e cura de doenças. A definição de biomarcadores mais aceita atualmente, foi a implementada pelo Grupo de Pesquisadores das Definições de Biomarcadores, que os qualifica como “uma característica que é objetivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, processos patogênicos, ou respostas farmacológicas à intervenção terapêutica” (ATKINSON *et al.*, 2001).

Algumas das principais características para se obter um biomarcador ideal, são a facilidade e a sensibilidade de detecção dessas moléculas, e sobretudo, a especificidade para a característica a qual se analisa. Os lncRNAs, têm sido considerados potenciais biomarcadores por sua importante atuação em processos biológicos e, principalmente, pelo fato de serem moléculas que se destacam quanto a especificidade (KAPUSTA; FESCHOTTE, 2014; ULITSKY, 2016).

Em relação ao *Schistosoma*, sugere-se que a epigenética seja um dos grandes elementos responsáveis pela plasticidade dos estágios do verme, da complexidade do ciclo e da interação parasito-hospedeiro, o que inclui a provável atuação dos lncRNAs. Apesar disso, se somam poucos estudos que foquem nessas moléculas em *S. mansoni*, dos quais a grande maioria resultam na identificação e previsão das funções dos lncRNAs do parasito (DE CARVALHO AUGUSTO; DUVAL; GRUNAU, 2019).

Quanto a interação parasito-hospedeiro, estudos já demonstraram que a infecção por *Schistosoma* modula tanto o padrão da expressão gênica quanto de lncRNAs e miRNAs, no fígado e no baço dos hospedeiros (BURKE *et al.*, 2010; XIA *et al.*, 2020). Outros indícios, como a provável atuação dos antígenos solúveis do ovo na modulação do sistema imune do hospedeiro e o estabelecimento da imunidade concomitante pelo verme adulto, em que uma infecção ativa previne ou reduz as taxas de reinfecção, também sugerem uma comunicação entre as moléculas do parasito e do hospedeiro (BISCHOFBERGER *et al.*, 2020). Apesar do alto potencial de envolvimento dos lncRNAs do verme nessas regulações, dado as suas funções e abundância entre moléculas regulatórias do *S. mansoni*, ainda há poucos estudos que busquem detectar essas moléculas no organismo hospedeiro (MOTA *et al.*, 2020, 2021), mas a detecção já realizada torna potencial a busca por lncRNAs como biomarcadores da esquistossomose no organismo do hospedeiro definitivo.

3 JUSTIFICATIVA

A esquistossomose é a segunda parasitose de maior importância em termos de danos causados no mundo, sendo responsável por consideráveis taxas de mortalidade e altas taxas de morbidade em diversos países. No Brasil, a parasitose é historicamente endêmica, afetando milhões de pessoas há anos. Uma recente pesquisa publicada pela Fundação Oswaldo Cruz, demonstrou que os custos com a doença no país chegam a R\$ 155 milhões de reais por ano de acordo com dados de 2015, evidenciando o impacto socioeconômico da doença no país (NASCIMENTO *et al.*, 2019). Os impactos causados pela parasitose, são garantidos pela falta de infraestrutura, pela utilização do método de diagnóstico Kato-Katz, já que o provimento da detecção tardia favorece o desenvolvimento da patologia da esquistossomose, e pelo tratamento com o praziquantel, que por haver eficácia somente contra os vermes adultos, também favorece o desenvolvimento da patologia (BUSTINDUY *et al.*, 2017; LEWIS; TUCKER, 2014). Além do que, a combinação destes métodos favorecem a subestimação dos dados referentes à parasitose (MCMANUS *et al.*, 2018).

As características dos métodos de combate à esquistossomose e a grande chance da verificação da resistência do *Schistosoma* ao praziquantel, evidenciam a necessidade de métodos diagnóstico e tratamento mais eficientes para quebrar o ciclo de transmissão da parasitose e reduzir seus impactos. Um dos grandes candidatos a substituí-los, consiste na busca por biomarcadores que sejam detectados com alta sensibilidade e especificidade à esquistossomose (OGONGO; KARIUKI; WILSON, 2018).

Os lncRNAs são moléculas que vem sendo consideradas bons candidatos à biomarcadores, por serem abundantes nos organismos e apresentarem uma baixa taxa de conservação interespecífica. Entretanto, essas moléculas ainda são pouco compreendidas em *S. mansoni* e em relação ao seu papel na interação parasito-hospedeiro tanto em modelo murino, como na esquistossomose humana. Nos últimos anos, nossa equipe vem concentrando esforços na identificação de candidatos a lncRNAs específicos de *S. mansoni*, e por meio de ferramentas de bioinformática foi possível identificar um conjunto de 170 novos lncRNAs específicos para essa espécie (OLIVEIRA *et al.*, 2018). Quinze dos lncRNAs preditos, foram selecionados e analisados experimentalmente, demonstrando expressão diferencial nos estágios de cercária, esquistossômulo e verme adulto, bem como, entre os parasitos machos e fêmeas. Alguns apresentaram expressão diferencial em parasitos com resistência ao praziquantel, como também no fígado de camundongos infectados.

Considerando as perspectivas para estudos funcionais focados na identificação de biomarcadores específicos para a esquistossomose, neste trabalho continuamos o estudo detalhado dos outros 155 lncRNAs identificados por Oliveira e colaboradores (OLIVEIRA *et al.*, 2018). Para tal, a prioridade de escolha foi baseada das sequências dos lncRNAs presentes no cromossomo sexuais (Z e W), bem como àquelas correspondentes aos cromossomos 2, 3 e 7, gerando um total de 47 lncRNAs a serem analisadas nesse estudo, com a finalidade de obter uma perspectiva inicial sobre o potencial de biomarcadores para aplicação em uma tecnologia que preencha as lacunas apresentadas pelos métodos diagnóstico e tratamento da esquistossomose mansoni.

4 OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo validar experimentalmente 47 dos 170 novos lncRNAs previstos *in silico*, específicos para *S. mansoni*, verificar seu potencial regulatório nos diferentes estágios de desenvolvimento do parasito e se encaixam como bons biomarcadores para esquistossomose murina.

4.1 Objetivos específicos:

- Estabelecer o processo infeccioso utilizando cercárias da cepa Luiz Evangelista (LE) em camundongos BALB/c, mantendo seus respectivos controles não infectados.
- Validar a expressão dos Sm-lncRNAs em vermes adultos de *S. mansoni* por meio de RT-qPCR;
- Analisar os níveis de expressão dos Sm-lncRNAs validados, nos estágios de desenvolvimento relacionados com o hospedeiro definitivo – cercária, esquistossômulo, verme adulto e ovos;
- Verificar o potencial biomarcador de um conjunto de Sm-lncRNAs, por meio da expressão por RT-qPCR nas amostras de fígado e sangue dos grupos estabelecidos;

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Experimentação *in vivo*

Os experimentos *in vivo* foram realizados em camundongos BALB/c machos, com estabelecimento da infecção na 5ª semana de vida dos animais. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os protocolos e cuidados exigidos para animais laboratoriais e para a manutenção da infecção, com ciência e autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais, seguindo as diretrizes do protocolo 2017/35, sob responsabilidade do Prof. Dr. William Castro Borges.

Os animais foram dispostos em grupos de 5 em mini-isoladores, acondicionados a ciclos claro-escuro de 12h, com disponibilidade contínua de água e comida, compreendendo quatro grupos contendo 10 animais: o primeiro contendo camundongos infectados com 70 cercárias (I(70cerc)); o segundo contendo camundongos infectados com 100 cercárias (I(100cerc)); e seus respectivos controles. As eutanásias para coleta do sangue total e fígado aconteceram por volta da 14ª semana de vida dos camundongos, compreendendo cerca de 9 semanas de infecção, com posterior armazenamento das amostras em freezer -80 °C. Previamente ao armazenamento, as amostras de sangue foram eparinizadas e adicionadas a um volume equivalente de TRIzol Reagent® (Invitrogen™). Já as amostras de fígado, foram seccionadas em seus 3 lobos, sendo que um deles foi imediatamente tratado para fixação em Metanol-DMSO, e armazenados em -20 °C para posterior confecção de lâminas.

5.2 Estabelecimento da infecção em camundongos BALB/c

A infecção foi estabelecida em colaboração com o Laboratório de Enzimologia e Proteômica (LEP-UFOP), utilizando cercárias (cepa Luiz Evangelista - LE) gentilmente fornecidas pelo Centro de Pesquisa René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz (CPqRR/Fiocruz – BH).

O processo infeccioso se deu após os animais serem anestesiados intraperitonealmente com cetamina e xilazina, momento em que suas caudas foram inseridas em anéis de metal, onde se adicionou 1 mL da solução diluída de cercárias, equivalente aos dois grupos - 70 e 100 cercárias -, e assim o permaneceram até o fim do efeito do anestésico. No fim do processo os animais foram colocados nos mini-isoladores, e as cercárias foram neutralizadas com etanol 70% e descartadas.

5.3 Extração de RNA total de amostra do fígado, sangue (I(100cerc)) e dos diferentes estágios do *S. mansoni* relacionados ao hospedeiro definitivo

As amostras correspondentes aos estágios de cercária, verme adulto, esquistossômulo 3,5 h e ovo de *S. mansoni*, foram preparadas anteriormente (MOTA et al. 2020) e estavam separadas em eppendorfs com alíquotas que compreendiam cerca de 50 representantes, armazenadas em freezer -80 °C. O RNA foi extraído das amostras de fígado, dos diferentes estágios evolutivos e do sangue do grupo I(100cerc), utilizando o kit SV total RNA Isolation System – Promega™. Para as amostras de fígado, foi necessário a pesagem anterior de 30 mg de tecido, reservada em eppendorfs de 1,5 mL.

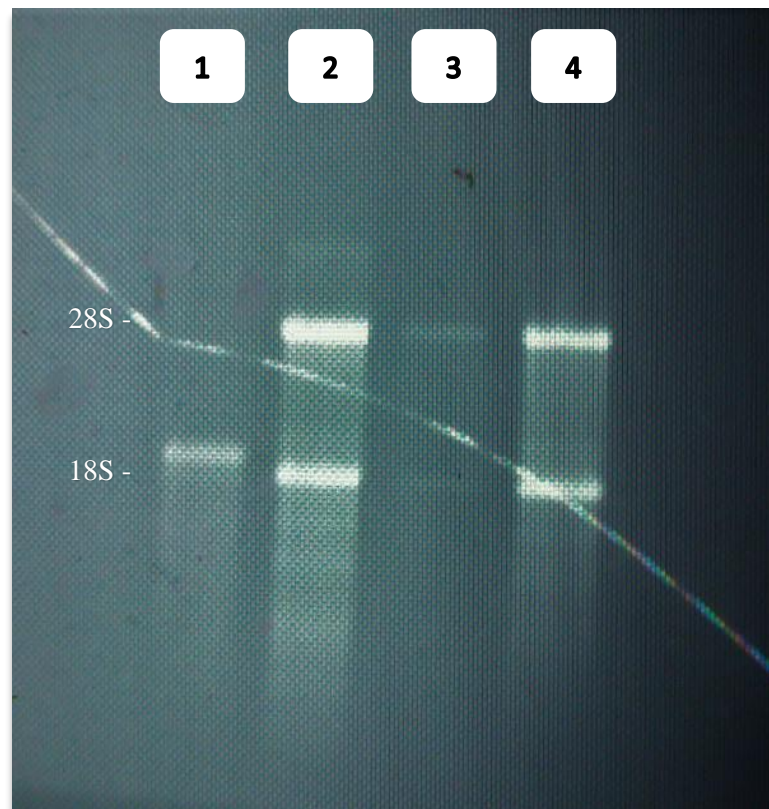
A fim de favorecer a dissociação de complexos nucleoprotéicos, acessados durante a homogeneização mecânica do tecido, foram adicionados 1 mL TRIzol Reagent® (Invitrogen™) às amostras de tecido e aos diferentes estágios. Após a adição dessa solução, as amostras de fígado e dos estágios foram homogeneizadas mecanicamente utilizando-se um politron, em um processo que incluía 3 ciclos com intervalos de 30 s da amostra sob efeito do politron em velocidade máxima (vmáx), e 1 min de incubação em gelo. Já a amostra de sangue foi homogeneizadas mecanicamente com o auxílio de um vórtex, em um processo que incluía 5 ciclos com intervalos de 1 min da amostra sob efeito do vórtex em vmáx, seguido por incubação de 1 min no gelo. Na última sequência de intervalos, as amostras permanecem durante 15 min no gelo, para efeito do trizol.

Finalizado esse tempo, foram adicionados 400 µL de clorofórmio aos eppendorfs com as amostras homogeneizadas, levando-os ao vórtex por 1 min sob vmáx, e armazenando em temperatura ambiente (TA) por 20 min. O clorofórmio auxilia na separação das moléculas em diferentes fases da solução, para tal, se faz necessária uma centrifugação a 12.000 g por 15 min na temperatura de 4 °C. O resultado final é a visível separação em 3 fases: uma inferior contendo o fenol; uma fase orgânica intermediária com clorofórmio, DNA e proteínas; e a fase aquosa superior, onde encontramos o RNA. O volume da fase aquosa foi transferido para um novo *eppendorf*, ao qual adicionou-se 600 µL de etanol 95%, com posterior homogeneização *up and down* para precipitar o RNA.

A solução contendo o RNA foi transferida para uma coluna de extração, que foram submetidas a uma centrifugação a 12.000 g por 2 min em TA, com posterior descarte do material residual no tubo coletor. As colunas de extração possuem uma pequena membrana que interage e retém as moléculas de RNA, sendo necessário para sua purificação, a lavagem das membranas das colunas para remover reagente residuais. O primeiro passo de lavagem, consiste

na adição de 600 μL de *RNA Wash Solution* às colunas e centrifugação a 12.000 g por 2 min em TA. Para dar continuidade a purificação dos RNAs, foi realizado um tratamento das membranas com DNase, utilizando um volume total de 80 μL de solução de digestão de DNA (8 μL de DNase, 8 μL de MnCl_2 e 64 μL de *Yellow core*). As colunas foram incubadas por 20 min em TA para ação das DNases, que passaram por uma posterior inibição com 200 μL de *DNase Stop Solution*, seguido de centrifugação a 12.000 g por 2 min em TA. Finalizados, as colunas foram novamente lavadas duas vezes, primeiramente com 600 μL de *RNA Wash solution* e centrifugação a 12.000 g por 2 min, repetindo o passo com 250 μL de *RNA Wash solution*. Por fim, o RNA na membrana das colunas foi eluído em 100 μL de H_2O tratada com dietilpírocarbonato (DEPC) estéril, coletados em um *ependorf* após centrifugação a 12.000 g por 3 min. As amostras foram quantificadas em nano drop (Thermo Fisher), observando-se a razão 260 nm/280 nm, e armazenadas em freezer $-80\text{ }^\circ\text{C}$. A integridade do RNA extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,2% (Figura 5).

Figura 13 – Visualização da extração de RNA Total em gel de agarose (1,2%)



Representação da extração de RNA total, por meio da visualização das subunidades ribossômicas (28S e 18S) em gel de agarose, referentes às amostras de verme adulto (LE) de *S. mansoni* (1) e sangue total de camundongos do grupo controle (SC): SC1 (2); SC2 (3); SC3 (4). Aplicou-se 2 μg de RNA por canaleta, que foram marcadas com Brometo de etídio.

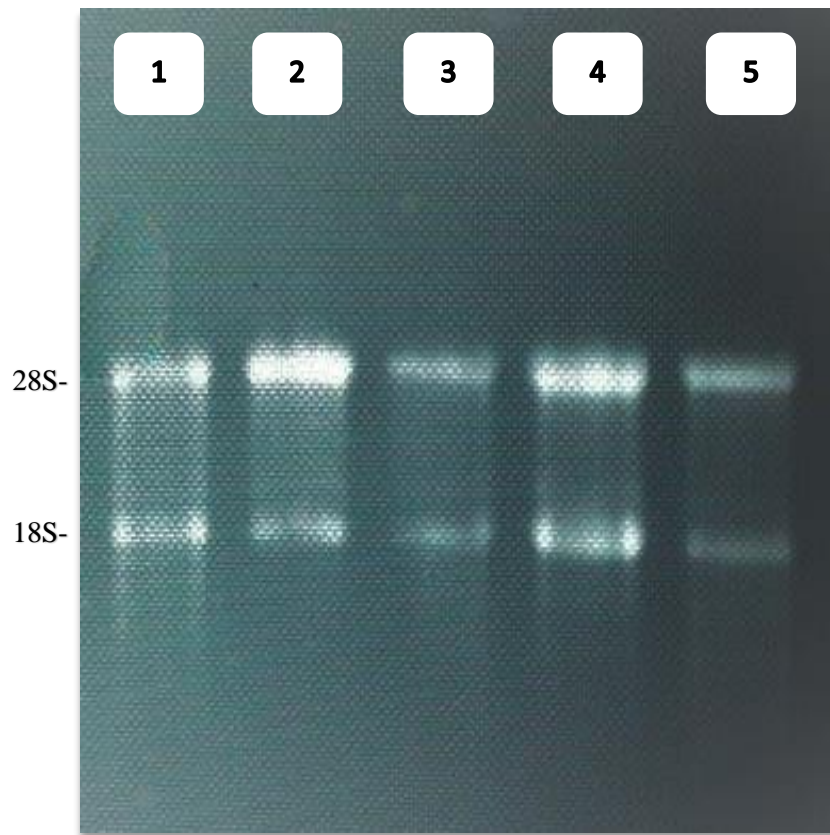
Fonte: Arquivo pessoal.

5.4 Extração de RNA total enriquecido com longos das amostras de sangue dos grupos Controle e I(70cerc)

A extração do RNA das amostras de sangue foi realizada com o kit miRNeasy (Qiagen), com isolamento especificado de moléculas de RNA que possuem mais de 200 nts de tamanho. As amostras, que já haviam sido armazenadas juntamente com o trizol, foram descongeladas e homogeneizadas mecanicamente com o auxílio de um vórtex, em um processo que incluía 5 ciclos com intervalos de 1 min da amostra sob efeito do vórtex em *vmáx*, seguido por incubação de 1 min no gelo. Na última sequência de intervalos, as amostras permanecem durante 15 min no gelo, para efeito do trizol. Finalizado esse tempo, foram adicionados 400 μL de clorofórmio aos *eppendorfs* com as amostras homogeneizadas, para a separação de fases, levando-os ao vórtex por 15 s sob *vmáx*, e armazenando em TA durante 3 min. Posteriormente foi realizada uma centrifugação a 12.000 g por 15 min na temperatura de 4 °C. O volume da fase aquosa foi transferido para um novo *eppendorf*, ao qual adicionou-se 530 μL de etanol 100%, com posterior homogeneização *up and down* para precipitar o RNA. O conteúdo desse *eppendorf* foi transferido para uma coluna de extração, que foi submetida a centrifugação a 8.000 g por 15 s em TA, com posterior descarte do material residual no tubo coletor. Após esse passo, é necessário lavar a membranas das colunas para remover reagente residuais, realizando-o com a adição de 350 μL de RWT buffer às colunas e centrifugando a 8.000 g por 15 s em TA.

A membrana contendo as moléculas de RNA, passaram por uma purificação de por meio do tratamento com DNase, utilizando um volume total de 80 μL de solução de DNase (10 μL de DNase em 70 μL de RDD). As colunas foram incubadas por 20 min em TA para ação das DNases, que foram posteriormente inibidas com 200 μL de DNase *Stop Solution*, seguido de centrifugação a 8.000 g por 5 s em TA, seguida por uma lavagem com adição de 350 μL de *RWT buffer* às colunas e centrifugação a 8.000 g por 15 s em TA. As colunas foram submetidas a duas novas lavagens com 500 μL de RPE com primeira centrifugação a 8.000 g por 15 s, repetindo o passo com centrifugação durante 2 min. Por fim, o RNA na membrana das colunas foi eluído em 80 μL de H₂O DEPC estéril, coletados em um *eppendorf* após centrifugação a 8.000 g por 1 min. As amostras foram quantificadas em nano drop e armazenadas em freezer -80 °C, sendo sua integridade avaliada por eletroforese em gel de agorose 1,2% (Figura 6).

Figura 16 - Visualização da extração de RNA enriquecido de lncRNAs, em gel de agarose (1,2%)



Representação da extração de RNA enriquecida com lncRNAs, por meio da visualização das subunidades ribossomais (28S e 18S) em gel de agarose, referentes às amostra de sangue total dos cinco camundongos do grupo I(70cerc): SI70c1 (1); SI70c2 (2); SI70c3 (3); SI70c4 (4); e SI70c5 (5). Aplicou-se 2 μ g de RNA por canaleta, que foram marcados com Brometo de etídio.

Fonte: Arquivo pessoal.

5.5 Transcrição reversa para obtenção de cDNA

O cDNA foi obtido utilizando o kit *High Capacity RT-PCR System* (Applied Biosystems), seguindo as recomendações do fabricante. Para cada 20 μ L de reação, fracionou-se 10 μ L de RNA concentrado a 1,5 μ g e 10 μ L de Mix de reação, em que foram adicionados 2 μ L de tampão da reação, 2 μ L de primers randômicos, 0,8 μ L de Mix de dNTPs 10 mM, 1,0 μ L de *Transcriptase reversa Multiscribe* e 4,2 μ L de H₂O DEPC estéril.

Os tubos *ependorfs* 0,2 mL contendo a reação foram levados ao termociclador (*ThermoHybaid Px2*), e incubados com uma programação de 10 min a 25 °C, 120 min a 37 °C para produção da primeira fita de DNA (cDNA), 85 °C por 5 min para inativação da enzima e as amostras foram posteriormente armazenadas a 4 °C até o uso.

5.6 Validação experimental dos Sm-lncRNAs

5.6.1 Estabelecimento dos Oligonucleotídeos dos Sm-lncRNAs selecionados

Para a validação da expressão real dos 170 Sm-lncRNAs previamente previstos *in silico* (OLIVEIRA et al., 2018), todas as sequências foram submetidas a uma análise no banco de dados *ShistoDB* (Disponível em: <https://schistodb.net/>) e *WormBase Parasite* (Disponível em: <https://parasite.wormbase.org/index.html>), para verificar a sua localização cromossomal. Da totalidade, foram selecionadas 27 sequências localizadas nos cromossomas ZW, e 20 sequências localizadas nos cromossomas 2, 3 e 7.

Essas sequências foram submetidas à análises no *Gene Runner* (versão *desktop* 6.5.52) para para confecção de oligonucleotídeos utilizados no método da reação em cadeia da polimerase (PCR). Os parâmetros foram ajustados para gerarem primers de 18-20 nts de tamanho, com percentual de GC entre 50-65%, e que gerassem um produto de 70-90 nts de tamanho, podendo ser estendido até 110 nts caso não gere nenhum resultado no intervalo anterior. Dos oligonucleotídeos gerados, foram escolhidos para análise, aqueles que possuíssem o mesmo tamanho e que não obtivessem mais do que três Guaninas e Citosinas entre as cinco últimas bases da região 3'. Por fim, das análises individuais dos oligonucleotídeos que obtiveram todos os requisitos anteriores, selecionou-se aqueles que não apresentassem dímeros ou *loops*, ou caso apresentassem, fossem muito instáveis (Figura 7).

Os primers idealizados (Tabela 1) no *Gene Runner* foram sintetizados e liofilizados pela Invitrogen™, com posterior diluição em uma solução estoque de 100 µM, com hidratação *overnight* antes do uso. Foi realizado um processo de validação experimental, utilizando o cDNA gerado por transcrição reversa, tendo como primeiro passo a realização de uma PCR convencional para verificar a funcionalidade dos primers, por meio da presença do *amplicon* e do seu tamanho, de acordo com os parâmetros estabelecidos no *Gene Runner*. As reações de PCR foram realizadas utilizando o kit *Invitrogen Taq DNA Polimerase*, e preparadas para um volume final de 50 µL. Em cada reação adicionou-se 5 µL de 10X *PCR Buffer*, 2 µL de *MgCl₂*, 1 µL mix de dNTPs 10 mM, 0,5 µL *Taq Polimerase*, 1 µL de cDNA de verme adulto diluído 10X, 1 µL de um mix dos primers da fita *forward* e *reverse*, e completou-se o volume com H₂O DEPC estéril.

Figura 19 - Gene Runner versão desktop.

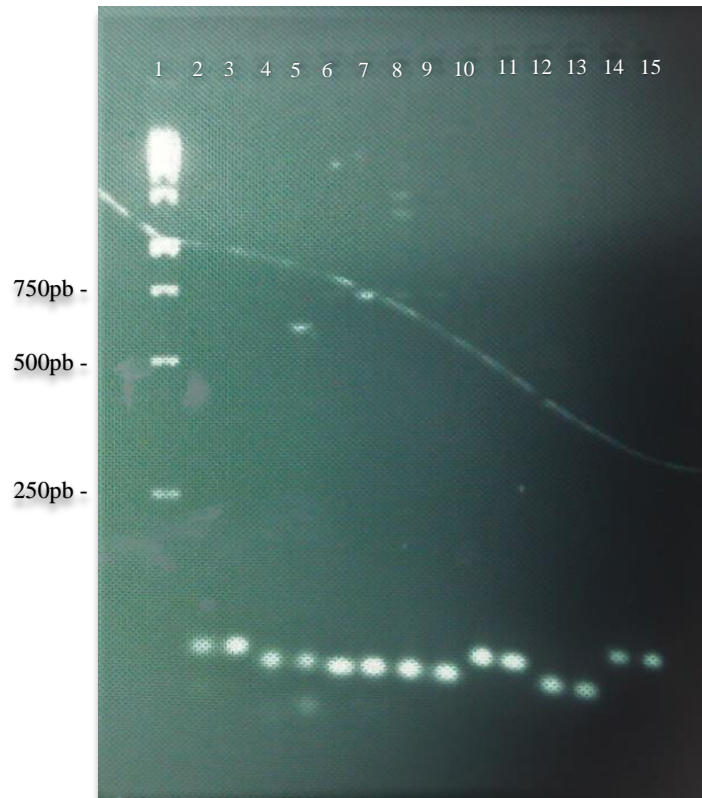
The screenshot displays the Gene Runner desktop application interface. The main window shows a DNA sequence with various annotations. A 'PCR Primers' panel on the right contains settings for primer parameters, search regions, and product characteristics. A table at the bottom left displays a list of generated primers with their respective thermodynamic and sequence quality metrics.

...	A-3...	F	S-Seq	S	S-dG	S-dH	S-dS	F	A-Seq	A-dG	A	
1	-5.01		AACACTGGACGGCCCTCTC	19	-33.43	-147.40	-376.30		TTGGCACACGAGACAGAAG	19	-30.07	-1
2	-4.64		ACTGGACGGCCCTCTCTCC	20	-36.37	-159.50	-407.00		GCATTGGCACACGAGACAG	19	-31.52	-1
3	-5.01		GGACGGCCCTCTCTCCTAG	20	-35.64	-161.00	-414.50		ATTGGCACACGAGACAGAAG	20	-31.54	-1
4	-4.64		GGACGGCCCTCTCTCCTAG	20	-35.64	-161.00	-414.50		GCATTGGCACACGAGACAG	19	-31.52	-1
5	-6.04		GGACGGCCCTCTCTCCTAG	20	-35.64	-161.00	-414.50		AAGCATTGGCACACGAGAC	19	-31.51	-1
6	-6.74		GACGGCCCTCTCTCCTAG	19	-32.57	-150.00	-387.90		GGCACACGAGACAGAAGG	18	-29.24	-1
7	-5.01		GACGGCCCTCTCTCCTAG	19	-32.57	-150.00	-387.90		TGGCACACGAGACAGAAG	18	-28.13	-1
8	-5.01		GACGGCCCTCTCTCCTAG	19	-32.57	-150.00	-387.90		TTGGCACACGAGACAGAAG	19	-30.07	-1
9	-5.01		GACGGCCCTCTCTCCTAG	19	-32.57	-150.00	-387.90		ATTGGCACACGAGACAGAAG	20	-31.54	-1
10	-4.64		GACGGCCCTCTCTCCTAG	19	-32.57	-150.00	-387.90		CATTGGCACACGAGACAG	18	-28.38	-1
11	-4.64		GACGGCCCTCTCTCCTAG	19	-32.57	-150.00	-387.90		GCATTGGCACACGAGACAG	19	-31.52	-1
12	-6.04		GACGGCCCTCTCTCCTAG	19	-32.57	-150.00	-387.90		AGCATTGGCACACGAGAC	18	-29.57	-1
13	-6.04		GACGGCCCTCTCTCCTAG	19	-32.57	-150.00	-387.90		AAGCATTGGCACACGAGAC	19	-31.51	-1
14	-6.42		GACGGCCCTCTCTCCTAG	19	-32.57	-150.00	-387.90		TAAGCATTGGCACACGAG	18	-29.56	-1

Layout da página de trabalho do Gene Runner, com uma sequência exemplo na parte superior esquerda, a caixa de parâmetros para idealização dos primers à direita, e o resultado contendo o conjunto de primers gerado no canto inferior esquerdo.

Fonte: Arquivo pessoal.

Os tubos *ependorfs* 0,2 mL contendo as reações preparadas, foram levados ao termociclador à uma etapa inicial de desnaturação 95 °C durante 3 min, com posterior incubação sob 35 ciclos da programação: 95 °C durante 1 min, para separação da dupla fita de DNA; 60 °C por 1 min, para anelamento dos primers às regiões alvo (temperatura em que todos os primers foram inicialmente testados, pois o termociclador da qPCR tem essa temperatura de anelamento como padrão); e 72 °C por 1 min para extensão da fita complementar pela Taq Polimerase. Os ciclos foram seguidos por uma etapa a 72 °C por 5 min, com posterior armazenamento do produto a 4 °C. As reações foram realizadas em triplicatas técnicas para cada mix de primer correspondente a um Sm-lncRNA, e validação da PCR foi realizada utilizando eletroforese de gel de agarose 2,2% para visualização do produto (Figura 8).

Figura 22 – Resultado da RT-PCR convencional para verificar a funcionalidade dos primers

Gel de agarose (2,2%) representativo, contendo amostras de PCR convencional, constando da esquerda para a direita: Marcador de bases 1kb (ThermoFisher), com banda mínima de 250pb; produto de PCR, em duplicatas, utilizando amostras de verme adulto e os primers dos Sm-lncRNA19 (2, 3); Sm-lncRNA25 (4, 5); Sm-lncRNA27 (6, 7); Sm-lncRNA28 (8, 9); Sm-lncRNA30 (10, 11); Sm-lncRNA31 (12,13); e eIF4E (14, 15). Aplicou-se 8 μ L do produto de PCR e 2 μ L de tampão de corrida por poço. A marcação foi realizada com Brometo de etídio.

Fonte: Arquivo pessoal

Tabela 1 - Conjunto de oligonucleotídeos gerados para os 47 Sm-lncRNAs selecionados.

LncRNA	ID	Oligonucleotídeo	Tamanho
Sm-lncRNA16	TCONS_00013192	F: 5'-ACGTGCCTCCAATCAATC-3' R: 5'-CCACGCCATAAAGAATGC-3'	80
Sm-lncRNA17	TCONS_00011874	F: 5'-GTGTGTTGGTGTGTTTCG-3' R: 5'-CCTCGTCATCATAAAGCC-3'	98
Sm-lncRNA18	TCONS_00013209	F: 5'-TGATCCCGAATGGAGTAC-3' R: 5'-CCAAGGTTTCCGCTATTC-3'	78
Sm-lncRNA19	TCONS_00012078	F: 5'-CCCAGCCTTTGTAAGTACAC-3' R: 5'-TAGCGGCATTTTCGACAGTAC-3'	84
Sm-lncRNA20	TCONS_00012081	F: 5'-GACATCTACCCTGAAACG-3' R: 5'-AGTCCAGCAAGGTTCTTC-3'	87

Sm-lncRNA21	TCONS_00012151	F: 5'-GGATTGTTTGCGGCTATG-3' R: 5'-ATAGAGGCCGCATGTAAC-3'	86
Sm-lncRNA22	TCONS_00012152	F: 5'-GGATTGTTTGCGGCTATG-3' R: 5'-ATAGAGGCCGCATGTAAC-3'	86
Sm-lncRNA23	TCONS_00013464	F: 5'-GTTGTGATCCGCAATGTG-3' R: 5'-CGATTACTGCAGCATGAG-3'	70
Sm-lncRNA24	TCONS_00012271	F: 5'-GTCATGCGTCTGAAGATC-3' R: 5'-GGAAGTAGGCCCATCATC-3'	88
Sm-lncRNA25	TCONS_00012289	F: 5'-CGCGGGTATTCAGCAAGTAG-3' R: 5'-CGGGATATTGACGACGAATC-3'	73
Sm-lncRNA26	TCONS_00012295	F: 5'-CCCTGCGATTGTCTACTG-3' R: 5'-TCTGAGGTGCGTGACTAC-3'	80
Sm-lncRNA27	TCONS_00012375	F: 5'-ACGAGCTGAGGATGTTGAAC-3' R: 5'-ACACTGTGTGATCGCTAGTC-3'	70
Sm-lncRNA28	TCONS_00012376	F: 5'-ACGAGCTGAGGATGTTGAAC-3' R: 5'-ACACTGTGTGATCGCTAGTC-3'	70
Sm-lncRNA29	TCONS_00012476	F: 5'-GCTTTGGAAGTCGGTTTC-3' R: 5'-CCTCTGAACGATGGAATG-3'	82
Sm-lncRNA30	TCONS_00012477	F: 5'-GTGCTTTGGAAGTCGGTTTC-3' R: 5'-GTCCTCTGAACGATGGAATG-3'	86
Sm-lncRNA31	TCONS_00012515	F: 5'-AAGATGGGTGGGCATGTTAG-3' R: 5'-AGACCGTTTCGCACCAGTTC-3'	71
Sm-lncRNA32	TCONS_00013779	F: 5'-CGGCTGTACAAGCTTTATGC-3' R: 5'-GCGAGACGTTTGATGGTAAC-3'	77
Sm-lncRNA33	TCONS_00012537	F: 5'-GCCAGGTCAGTCAACTTC-3' R: 5'-CAGTCACGAGCATTGTTG-3'	89
Sm-lncRNA34	TCONS_00013835	F: 5'-CATTTGCCACCTGCTTTG-3' R: 5'-GTATTCGGCTTCGGATCAC-3'	78
Sm-lncRNA35	TCONS_00012611	F: 5'-TCCCATGAGACGGTAACC-3' R: 5'-CATCAACACCAGCAATGC-3'	70
Sm-lncRNA36	TCONS_00012629	F: 5'-AGCAAGAAGGTCCACAAACC-3' R: 5'-GGTAGGCGTTCCATTCATTG-3'	88
Sm-lncRNA37	TCONS_00013977	F: 5'-GGGCTGACAGTGGTGTAG-3' R: 5'-ATGGGCTTTGACGACTAG-3'	81

Sm-lncRNA38	TCONS_00013978	F: 5'-GTCGTCAAAGCCCATATC-3' R: 5'-GGGCTGCAGAAGCTGAAAC-3'	84
Sm-lncRNA39	TCONS_00014089	F: 5'-GTCGGTCCAGTTCTCTTC-3' R: 5'-CATACCACGGCTAACTTG-3'	86
Sm-lncRNA40	TCONS_00014090	F: 5'-AGTCGGTCCAGTTCTCTTC-3' R: 5'-GCATACCACGGCTAACTTG-3'	88
Sm-lncRNA41	TCONS_00012887	F: 5'-CTTGAGATCCCGACTTTC-3' R: 5'-TGACCAAAGCCCAACATC-3'	71
Sm-lncRNA42	TCONS_00014317	F: 5'-AGGAAACCGGATGCTATG-3' R: 5'-AGCCTTCGACGTTCTTTC-3'	76
Sm-lncRNA43	TCONS_00004194	F: 5'-TACTCTGCTCCTGACAATCG-3' R: 5'-CGCAAATAGTCTCGGCAAAC-3'	74
Sm-lncRNA44	TCONS_00005145	F: 5'-TCGAAGCAGCCTTTATCG-3' R: 5'-TTGGAGCCGGTGAAGTAC-3'	87
Sm-lncRNA45	TCONS_00005182	F: 5'-CTTGAGGACCTGTAAACG-3' R: 5'-TATTGCACGGACGAACAC-3'	83
Sm-lncRNA46	TCONS_00005213	F: 5'-AGAAGCCTGTCAGATTCG-3' R: 5'-AGCGAAGACCTCCAAAGC-3'	73
Sm-lncRNA47	TCONS_00005214	F: 5'-GATTCAGAGACGCATGTC-3' R: 5'-ACCTTGAGTGCTTCTTG-3'	85
Sm-lncRNA48	TCONS_00005215	F: 5'-CATGTCGAGCTGCCACTG-3' R: 5'-TGCTTGAGTGCTTCTTG-3'	73
Sm-lncRNA49	TCONS_00004568	F: 5'-GCGTCCTGTTCTGTTAGC-3' R: 5'-CGCCTTCTGAACTTATCC-3'	78
Sm-lncRNA50	TCONS_00004569	F: 5'-CTGGAGCGTCCTGTTCTG-3' R: 5'-CGCCTTCTGAACTTATCC-3'	83
Sm-lncRNA51	TCONS_00004675	F: 5'-GCGAGTGATGGAGATTTG-3' R: 5'-TGACATCTGCGGAGTATC-3'	85
Sm-lncRNA52	TCONS_00005477	F: 5'-TCTCGGAATGGGAATCTC-3' R: 5'-CCTCCGGAAGTTGATTTG-3'	95
Sm-lncRNA53	TCONS_00005484	F: 5'-CCACACGGAATGAGTATG-3' R: 5'-TGACCTTCCCTCTTTAGG-3'	106

Sm-lncRNA54	TCONS_00006314	F: 5'-GGCGAATGAGGTCAAAGAAG-3' R: 5'-GCAACTGGTTACACGAATGC-3'	108
Sm-lncRNA55	TCONS_00006947	F: 5'-GCTCTCCAGCAGGAATGATG-3' R: 5'-TCGCAGAGAGACCCAAGTAG-3'	78
Sm-lncRNA56	TCONS_00006948	F: 5'-CTCTCCAGCAGGAATGATG-3' R: 5'-CGCAGAGAGACCCAAGTAG-3'	76
Sm-lncRNA57	TCONS_00006328	F: 5'-TTGGTGGTGGTCAAAGTC-3' R: 5'-GTGGCTGCAGTCATCATC-3'	79
Sm-lncRNA58	TCONS_00006986	F: 5'-GCTTGTGAGAGACCGAGATC-3' R: 5'-GCCAGCATGACTAGGATTTG-3'	107
Sm-lncRNA59	TCONS_00006560	F: 5'-CGACAGTGTGAGGATTGG-3' R: 5'-TGCAACACATGCCTTAGG-3'	81
Sm-lncRNA60	TCONS_00006561	F: 5'-GGGTCAGTGCTGAGTTAC-3' R: 5'-CATCACGGAGAGCCATAC-3'	102
Sm-lncRNA61	TCONS_00007851	F: 5'-GCATCTGTGGCACGTTAC-3' R: 5'-GGCTGTCCTTCGTGTTAG-3'	76
Sm-lncRNA62	TCONS_00011454	F: 5'-TTGACGCCGTTACTGAAG-3' R: 5'-AGGAGTGGCAAAGTAAGC-3'	104
Sm-eIF4E	Smp_001500	F: 5'-TGTTCCAACCACGGTCTCG -3' R: 5'-TCGCCTTCCAATGCTTAGG-3'	89
MmuHPRT1	NM_013556.2	F: 5'-GCAGACTTTCCTTGGATC-3' R: 5'-CAACACTTCGAGAGGTCC-3'	115
GAPDH	ENSMUSG0000 0057666	F: 5'-AAGGTCATCCCAGAGCTGAA-3' R: 5'-CTGCTTCACCACCTTCTTGA-3'	138

Informações da esquerda para a direita – nomeação designada ao lncRNA; código (ID) referente à sequência dos lncRNAs (Disponível para consulta em: Materiais suplementares (Oliveira *et al.*, 2018)); par de oligonucleotídeos *Forward*(F) e *Reverse*(R); e tamanho do produto gerado.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.6.2 Expressão dos Sm-lncRNAs previstos *in silico* por RT-qPCR

Como a predição de lncRNAs do *S. mansoni* foi realizada em banco de dados para vermes adultos, as amostras desse estágio de vida do verme foram utilizadas em todas as etapas de validação experimental dos primers idealizados. Todos os conjuntos de primers que

apresentaram *amplicon* com tamanho entre 70-110 pbs, foram selecionados para a próxima etapa de validação dos primers. Esse passo consiste na realização de uma PCR em tempo real (qPCR), em que se verifica se a técnica também detecta o produto de amplificação, já que exige uma menor quantidade de substrato que a PCR convencional, e se é sensível o suficiente para detectar dímeros de primers e subprodutos, fato que invalidaria a utilização dos primers para experimentação com as amostras.

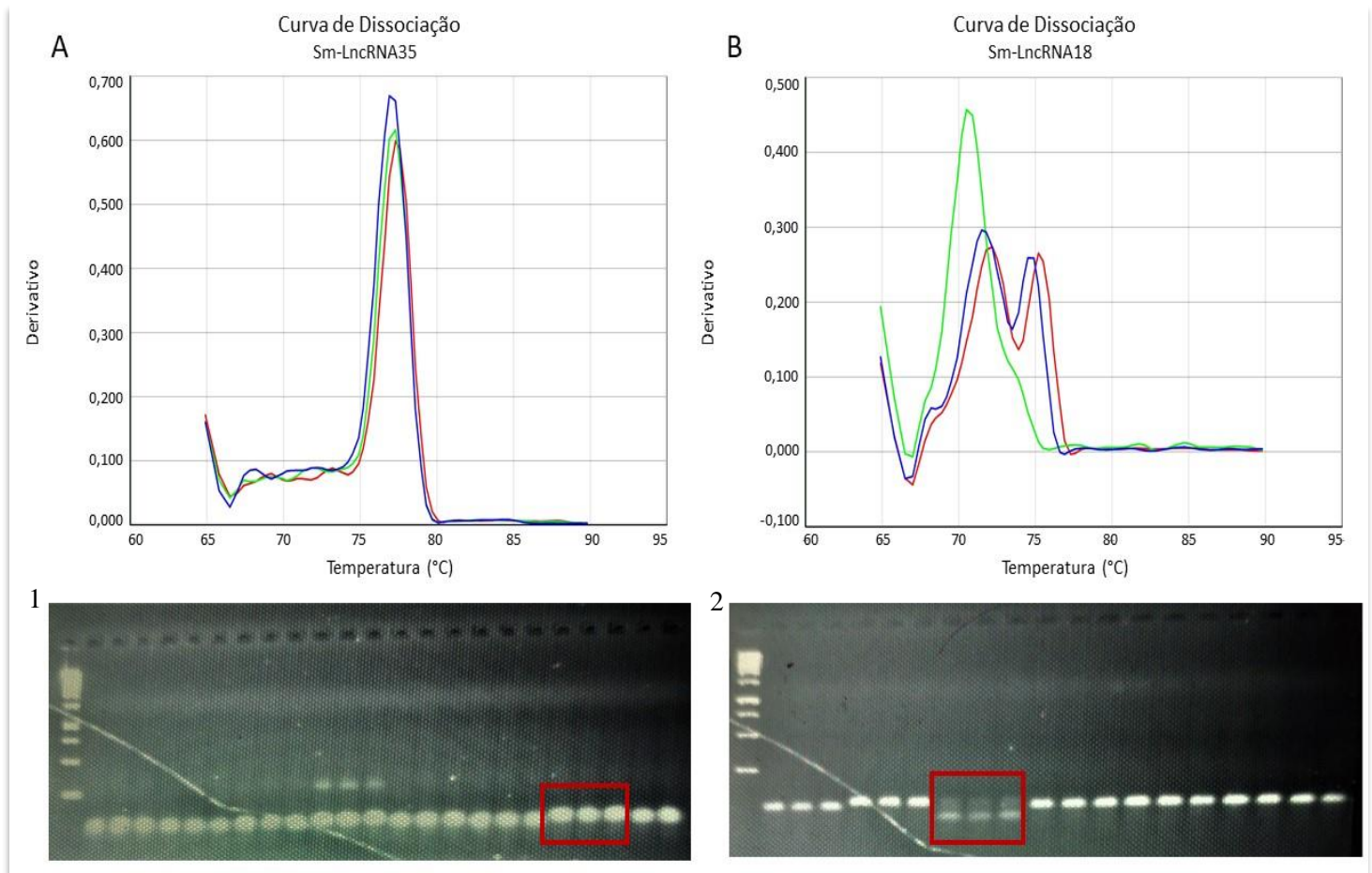
Para as reações de qPCR foram utilizadas placas com 96 poços com capacidade de 0,2 mL (*Uniscience Corporation*), seladas com adesivo óptico (*MicroAmp® Optical Adhesive Film – Applied Biosystems*). As reações foram preparadas utilizando o kit *GoTaq® qPCR Master Mix (Promega)*, com volume por poço total foi ajustado para 10 µL, compostos por: 4,9 µL de Master Mix, 0,1 µL da sonda de referência CXR, 3 µL de cDNA diluído 10X e 2 µL do mix de primers.

As placas foram analisadas no termociclador *ABI 7300 Applied Biosystems*, com configuração da *baseline*, que é o nível de ruído em ciclos iniciais onde não há produtos detectáveis, ajustada para 3-15 ciclos. Os valores do *threshold* foram fixados em 0,2 e foram estabelecidos 40 ciclos programados em etapas de desnaturação por 15 s a 94 °C, anelamento por 30 s a 60 °C e extensão com coleta de fluorescência por 34 s a 70 °C, uma etapa final foi adicionada para detecção da curva de dissociação dos produtos.

5.6.3 Validação dos primers por curva de dissociação

Ao final dos 40 ciclos programados no termociclador, o equipamento passou por uma leitura posterior, em que as amostras são submetidas a um aumento gradual da temperatura de 60 °C a 95 °C, passando 15 s em cada temperatura testada, e há a captação da fluorescência emitida. Sendo assim, haverá um pico de captação correspondente à temperatura em que ocorre a dissociação do produto gerado, obtendo-se uma curva. Portanto, caso haja amplificação de produtos inespecíficos ou a captação de dímeros de primer, poderá se observar a formação de mais de um pico na curva de dissociação.

Para a validação dos primers, as curvas correspondentes as triplicatas de cada Sm-lncRNA foram analisadas, invalidando para as próximas análises utilizando amostras, os primers dos Sm-lncRNAs que não apresentassem uma curva de dissociação ideal (Figura 9). As curvas geradas foram posteriormente validadas com a visualização dos produtos e eventuais subprodutos, por meio da realização de eletroforese em gel de agarose 2,2%.

Figura 25 - Curva de dissociação e produto da RT-qPCR dos Sm-lncRNAs

Conjunto representativo: resultado ideal (A) com curva de dissociação contendo apenas um pico correspondente ao produto do Sm-lncRNA35 e a confirmação do produto da qPCR (1), com triplicatas do Sm-lncRNA35 (retângulo vermelho), verificado em gel de agarose 2,2%; resultado indesejado (B) com curva de dissociação do Sm-lncRNA18 contendo mais de um pico, indicando dímeros de primer, também verificados pela visualização do produto 2,2% (2), com observação de mais de uma banda na triplicata correspondente ao Sm-lncRNA18 (retângulo vermelho). Foram aplicados os 10 μ L do produto da qPCR acrescidos de 3 μ L de tampão de corrida, corado com Brometo de etídio. Utilizou-se um marcador de 1kb contendo banda mínima de 250pb como referência para o tamanho dos produtos.

Fonte: Elaborado pelo autor

5.7 Expressão relativa dos Sm-lncRNAs em diferentes estágios evolutivos do *S. mansoni*

Os longos validados experimentalmente obtiveram a análise da sua expressão realizada posteriormente nos estágios de cercária, esquistossômulo 3,5 h, e nos ovos, com o mesmo protocolo descrito no item 5.6.2. Todas as reações foram realizadas em triplicatas técnicas, e normalizadas com o gene de referência eIF4E (fator de iniciação eucariota-4A), previamente definido como padrão para análises em amostras de *S. mansoni* no LBBM (MOTA *et al.*, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2018).

A análise da expressão foi realizada pelo método de quantificação relativa (ΔCq), em que o nível de expressão nas amostras é normalizado utilizando como gene de referência o eIF4E. Os resultados foram obtidos aplicando os valores de Cq na fórmula aritmética $2^{-\Delta Cq} = 2^{-(Cq_{\text{Gene}} - Cq_{\text{Gene Normalizador eIF4E}})}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

5.8 Expressão relativa dos Sm-lncRNAs em amostras biológicas de fígado e sangue dos camundongos infectados e não infectados

A partir do resultado gerado de acordo com a expressão relativa para cada estágio de desenvolvimento analisado, foram selecionados os lncRNAs mais expressos de cada fase. Escolhendo àqueles mais expressos no ovo para análise nas amostras de fígado, e os mais expressos de cada uma das fases para análise no sangue.

As análises foram feitas seguindo os passos descritos no item 5.6.2. A expressão relativa no fígado, foi realizada com o gene de referência HPRT1 (hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase1) da espécie *Mus musculus*. A expressão no sangue foi analisada qualitativamente, por problemas com o gene de referência GAPDH (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase).

5.9 Análises estatísticas

Foi realizado um teste Shapiro-Wilk, para verificar a normalidade das amostras, considerando $p < 0,05$. A expressão relativa dos lncRNAs nos estágios do *S. mansoni* foram comparadas utilizando ANOVA, com posterior teste de Tukey. Foi considerado estatisticamente significativo $p < 0,01$. A expressão relativa dos lncRNAs no fígado foi realizada utilizando teste de Friedman, com pós-teste de Dunn e correção de Bonferroni. As análises estatística foram realizadas utilizando o *software* R (4.0.3) juntamente com sua interface gráfica R Studio (1.3.1093.0).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Análise bioinformática das sequências

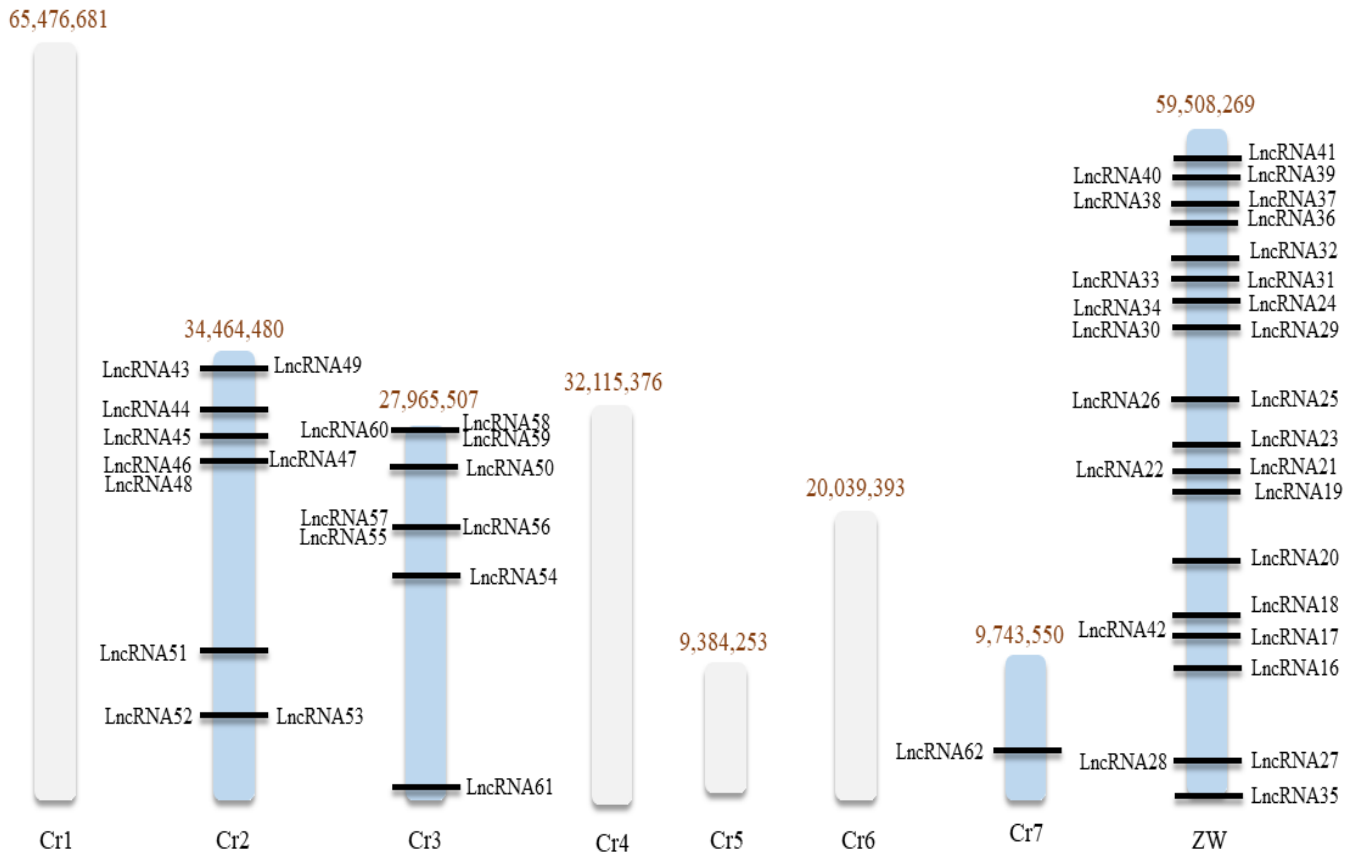
Os lncRNAs compreendem RNAs não codificadores de proteínas, que possuem importantes funções na regulação transcricional e pós-transcricional, cujas características os colocam como potenciais biomarcadores para prognóstico, diagnóstico e tratamento de doenças (XIE *et al.*, 2018; ZOU *et al.*, 2019). Todavia, a recente descoberta dessas moléculas justifica o baixo volume de estudos que explorem o tema, principalmente no que se refere ao seu papel na interação parasito-hospedeiro. Em relação ao *S. mansoni*, somam-se apenas dez trabalhos associados à lncRNAs, em sua grande maioria ainda focada em análises utilizando ferramentas bioinformáticas para identificação e previsão das funções dessas moléculas. Um destes, é pertencente a nossa equipe, e tem como contribuição a identificação computacional de 170 candidatos a lncRNAs específicos de *S. mansoni*, dos quais pôde-se analisar um conjunto de 15 lncRNAs experimentalmente (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Considerando essa totalidade de Sm-lncRNAs que ainda carecem de validação, o presente estudo surge com a proposta de analisar um total de 47 dos 170 Sm-lncRNAs previamente identificados por nosso grupo de pesquisa, verificando seu potencial como biomarcador para esquistossomose murina, por meio da avaliação dos níveis de detecção da expressão dos lncRNAs tanto nos diferentes estágios evolutivos do verme relacionados ao hospedeiro mamífero, quanto no fígado, principal órgão comprometido na esquistossomose mansoni, bem como no sangue total. Como os 170 lncRNAs estão distribuídos dentre todos os oito cromossomos do *S. mansoni*, foram estabelecidos alguns critérios para a seleção daqueles aqui analisados. O primeiro critério, consistiu na seleção das sequências localizadas nos cromossomos sexuais (ZW) do *S. mansoni*, partindo do pressuposto que a probabilidade destas em serem específicas da espécie sejam maiores, visto o gênero compreende os únicos trematódeos com vida dióica (POPIEL; BASCH, 1984).

Para verificar a localização cromossomal e a porção a que corresponde, as sequências foram submetidas a uma análise bioinformática de alinhamento local (BLAST) nos bancos de dados *SchistoDB* e *Wormbase* (Figura 10). Do conteúdo total, houve a seleção de 27 sequências localizadas nos cromossomos sexuais. Posteriormente, as demais 20 sequências foram selecionadas por esgotamento dos cromossomos 2, 3 e 7, pois são os cromossomos que contém maior porcentagem de retrotransposons dentre os demais, o que também aumenta as probabilidades de serem lncRNAs específicos de *Schistosoma*, já que este tem a peculiar

característica de apresentar uma composição de cerca de 40% do genoma total como sequências repetitivas, que aparentam possuir uma importante função na evolução do verme (BERRIMAN *et al.*, 2009; SWAIN *et al.*, 2011).

Figura 28 - Localização cromossomal dos 47 lncRNAs analisados



Localização representativa das sequências dos genes dos Sm-lncRNAs analisados, com o cromossomo 2 contendo os lncRNAs 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 51, 52 e 53; o cromossomo 3 contendo os lncRNAs 50, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 e 61; o cromossomo 7 contendo o lncRNA62; e o cromossomos ZW contendo os lncRNAs 16-42. A localização exata na porção dos cromossomos não pôde ser verificada em todos os lncRNAs, pois o sequenciamento do genoma ainda não foi finalizado, dificultando especificações.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para verificar se as sequências selecionadas ainda estavam classificadas como específicas de *S. mansoni* de acordo com os dados atualizados até então, realizou-se um BLAST em abril do presente ano, no banco de dados RNACentral (<https://rnacentral.org/>). Ao se alinhar as sequências dos Sm-lncRNAs com as sequências anotadas no banco, não se pode encontrar homologia significativa para nenhum deles, tanto referente ao humano quanto referente a camundongo, levando à conclusão que, ao presente momento, os Sm-lncRNAs podem ser considerados específico de *S. mansoni*.

6.2 Validação experimental dos 47 Sm-lncRNAs previamente identificados

A sofisticação das tecnologias aplicadas às ciências biológicas, tornou palpável a análise em massa de dados biológicos e o armazenamento completo do seu conteúdo em banco de dados computacionais, concretizando o surgimento das ciências ômicas. Em concordância com essas novas tecnologias, softwares de grande potência foram sendo criados e atualizados, com a finalidade de filtrar e tratar esse grande contingente de dados de maneira funcional e prática (MANZONI *et al.*, 2018).

A aplicação desses softwares em bancos de dados contendo o transcrito dos organismos, permitiu um profundo mergulho no mundo pouco explorado dos RNAs não codificadores de proteínas. Cada vez mais, novos ncRNAs são identificados e categorizados, e ressalta-se um destaque para os abundantes lncRNAs. Sobretudo sobre essas moléculas, ainda há muito o que ser investigado em relação à esquistossomose, fato que se torna claro quando observa-se que o primeiro estudo sobre o tema foi publicado apenas em 2017 (VASCONCELOS *et al.*, 2017).

As análises *in silico*, apesar de práticas e extremamente eficientes, ainda assim apresentam as limitações de um modelo computacional, tornando necessária a validação experimental dos dados tratados por softwares. Para validar experimentalmente o conjunto de 47 Sm-lncRNAs selecionados para este trabalho, utilizou-se de um método que consiste na realização de RT-PCR convencional, RT-qPCR e validação por eletroforese em gel de agarose. O primeiro passo da validação, consiste em verificar a funcionalidade dos pares de primers idealizados no *GeneRunner* para cada uma das sequências selecionadas, por meio dos produtos de uma RT-PCR. Utilizando essa análise, se confirmou a funcionalidade de 46 dos 47 pares de primers definidos para as sequências de lncRNAs, já que apresentaram *amplicons* dentro dos padrões definidos no *software*, compreendendo um tamanho que variava de 70-110 pbs, excluindo-se apenas o Sm-lncRNA38. Em um passo posterior, as análises dos produtos da RT-qPCR e da curva de dissociação gerada, validou a funcionalidade dos primers e a verificação experimental de 29 dos 47 Sm-lncRNAs analisados: 16, 17, 19, 20, 24, 25, 26, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 37, 41, 42, 43, 44, 47, 48, 52, 54, 55, 56, 57, 59, 61, 62. Esse resultado, permitiu que os primers funcionais para estes parâmetros fossem selecionados para utilização em ensaios nas amostras biológicas, tanto dos diferentes estágios de *S. mansoni* quanto dos camundongos.

Os lncRNAs que não foram selecionados nessa sequência de experimentos, ainda permanecem como candidatos computacionalmente idealizados a longos específicos de *S. mansoni*, mas demandam uma inspeção mais apurada para sua validação concreta, como a

modificação nos parâmetros das técnicas de PCR, teste de outros primers, e sequenciamento do produto, que não puderam ser feitas no presente estudo.

6.3 Expressão dos Sm-lncRNAs nos estágios de cercária, esquistossômulo e verme adulto do *S. mansoni*

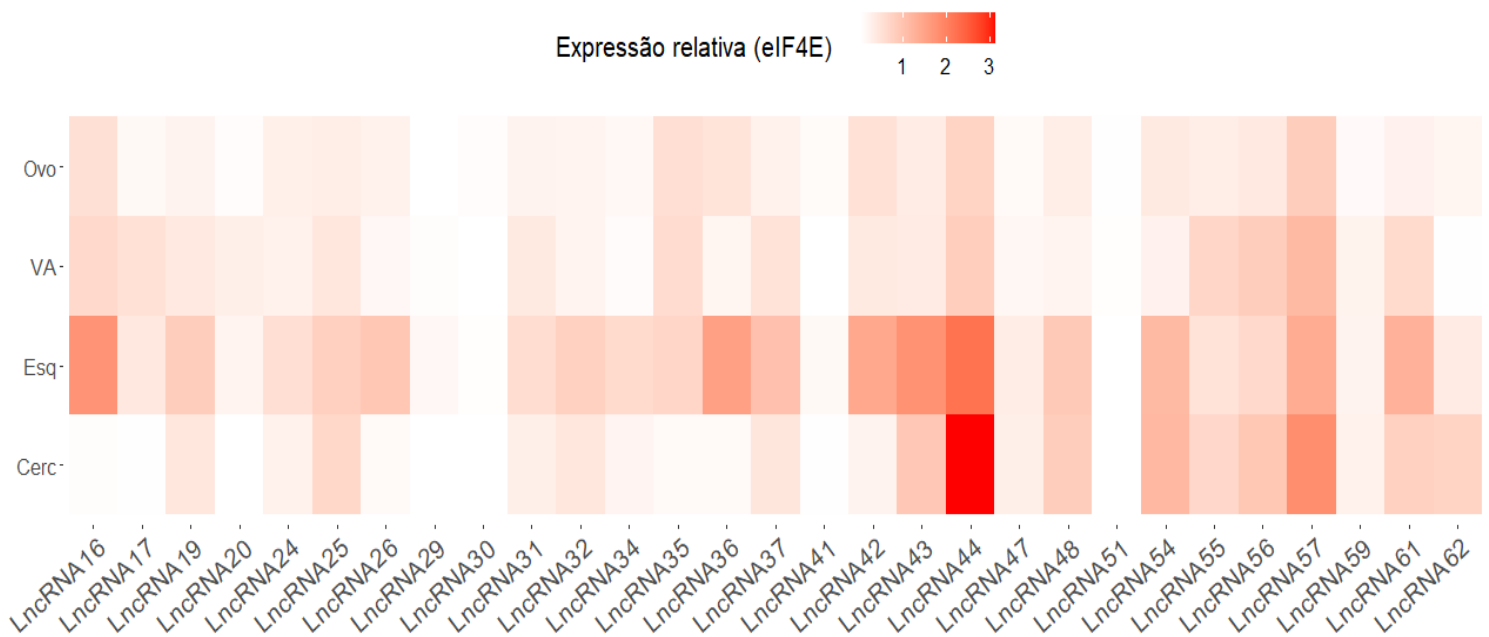
Uma das características mais relevantes do *S. mansoni* compreende seu complexo ciclo de vida, dotado de diferentes estágios evolutivos, que enfrentam diversos meios e pressões ambientais. É certo que a plasticidade dos estágios e o sucesso em enfrentar essas pressões, esteja ligado a um intenso mecanismo de regulação da expressão gênica, o que envolve a epigenética do parasito (DE CARVALHO AUGUSTO; DUVAL; GRUNAU, 2019).

Com o foco do estudo consistindo na esquistossomose murina, elegeu-se os estágios de vida relacionados com o hospedeiro definitivo, para a realização da verificação da expressão dos lncRNAs validados anteriormente. Sendo assim, além do verme adulto, também foram investigados: a cercária, estágio infeccioso; o esquistossômulo; e o ovo, relacionado com a formação dos granulomas.

Nos resultados gerados pela expressão relativa ao eIF4E dos diferentes estágios analisados, pode-se detectar a expressão dos 29 Sm-lncRNAs em todas as amostras (Figura 11). Considerando uma significância de $p < 0,01$, encontrou-se que os Sm-lncRNAs 20, 29, 30, 41, 47, 51, 59 não apresentam diferença significativa na expressão em nenhuma dos estágios, estando também incluídos, dentre os lncRNAs menos expressos de cada estágio. Todo o restante dos Sm-lncRNAs apresentaram diferença significativa na expressão na comparação de pelo menos três estágios, condizente tanto com estudos encontrados na literatura (KIM; KHALIL; JOLLY, 2020; VASCONCELOS *et al.*, 2017) quanto por realizados anteriormente pela equipe (MOTA *et al.*, 2021; OLIVEIRA *et al.*, 2018). A maior probabilidade de encontrar lncRNAs expressos de maneira diferencial entre os estágios do *Schistosoma*, provavelmente tem relação à uma resposta diversa as diferentes adversidades enfrentadas por cada um deles.

Os lncRNAs mais expressos em cada, de acordo com a distribuição dos níveis de expressão, compreendem: Verme Adulto – Sm-lncRNAs 16, 17, 35, 37, 44, 55, 56, 57, 61; Ovo – Sm-lncRNAs 16, 35, 36, 42, 44, 57; Cercária – Sm-lncRNAs 43, 44, 54, 56, 57, 61; e Esquistossômulo – Sm-lncRNAs 16, 36, 42, 43, 44, 54, 57, 61. Neste conjunto de lncRNAs avaliados, apenas os Sm-lncRNAs 44 e o 57 apresentaram expressão detectada em todos os estágios evolutivos analisados. Foi observado que o Sm-lncRNAs 44 tem níveis similares de expressão em ovos e vermes adultos, entretanto, cerca de 4,5 vezes mais abundante em cercária,

Figura 31 – Mapa de calor referente à expressão relativa dos Sm-lncRNAs nos diferentes estágios evolutivos relacionados com o hospedeiro mamífero

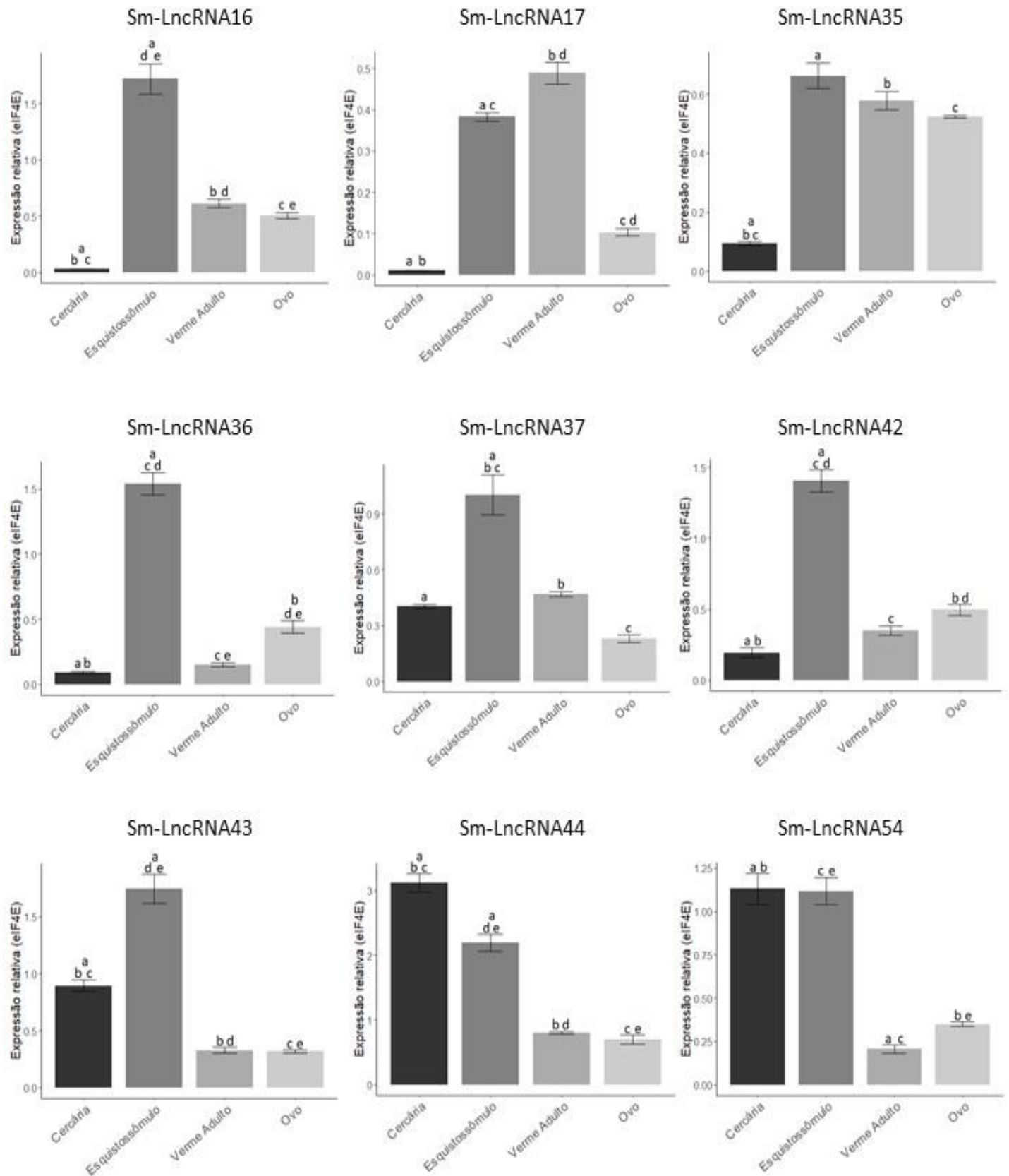


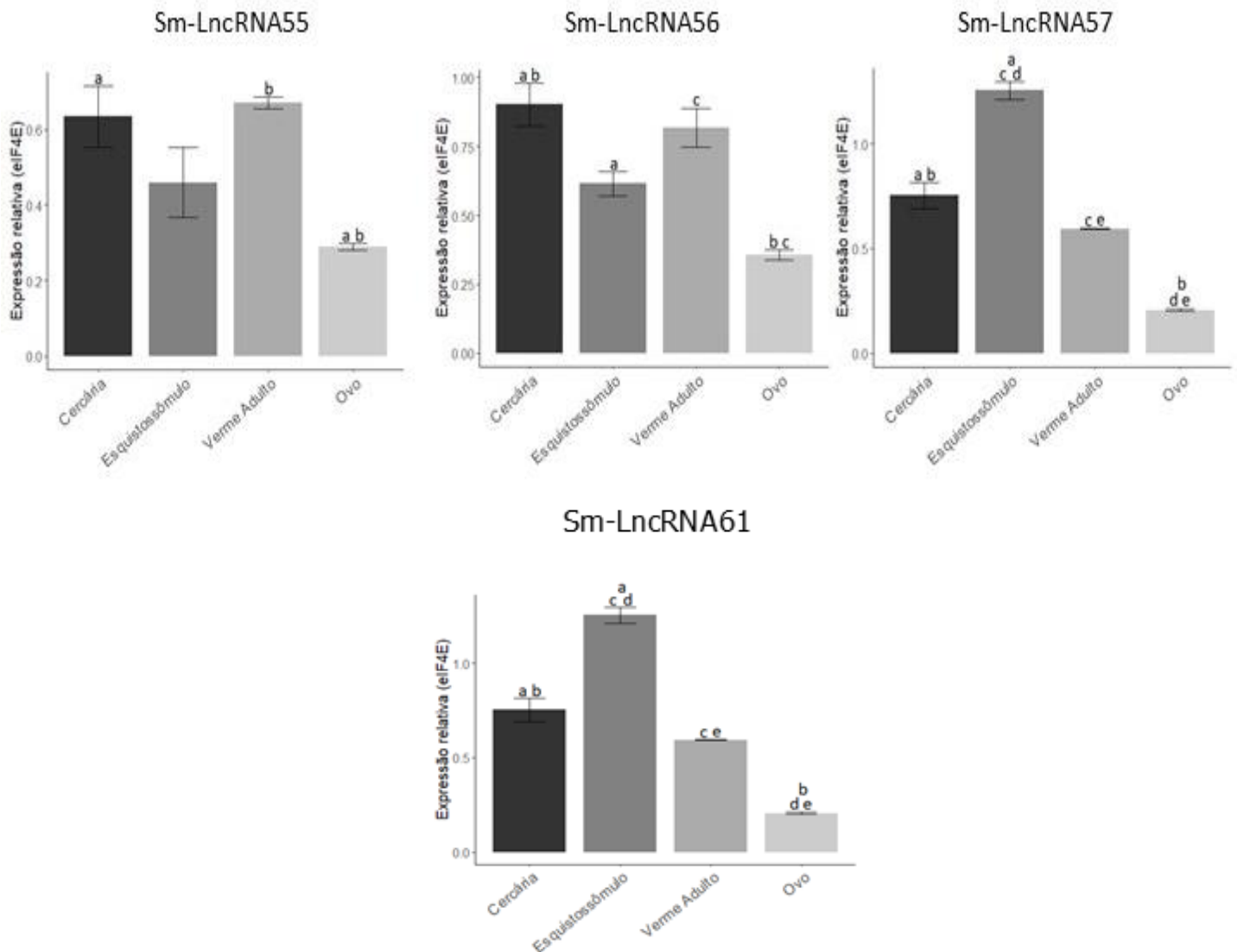
Expressão relativa dos 29 Sm-lncRNAs validados, por RT-qPCR nos estágios evolutivos de *S. mansoni*: cercária (Cerc), esquistossômulo 3,5 h (Esq), verme adulto (VA), e Ovo. O gene constitutivo utilizado para gerar a expressão relativa foi o eIF4E, estabelecendo os intervalos de valores das colorações ente <1 baixa, ente 1-2 média, >3 alta.

comparado a vermes adultos e ovos; 3,5 vezes mais abundante em esquistossômulos recém transformados (3,5 h) comparado a vermes adultos e ovos e 1,25 vezes mais expresso em cercária do que esquistossômulos (3,5 h). Os resultados também mostram expressão do Sm-lncRNAs 57 nos estágios avaliados, entretanto uma expressão 2,3 vezes mais expresso em esquistossômulos (3,5 h) do que em cercária; 3,2 vezes mais expresso em em esquistossômulos (3,5 h) do que em vermes adultos e 6,4 vezes mais expresso esquistossômulos (3,5 h) do que em ovos (Figura 12).

Em um panorama geral, o estágio de esquistossômulo apresentou uma expressão relativa significativamente maior que os demais, o que já pôde ser observado anteriormente (KIM; KHALIL; JOLLY, 2020; MOTA *et al.*, 2021). Esse dado pode ser atribuído ao percurso que os esquistossômulos traçam nos organismos hospedeiro, sendo expostos à diferentes pressões durante o processo de maturação em verme adulto, como o intenso sistema imune pulmonar. Nesse trabalho, analisou-se o esquistossômulo correspondente à 3,5h de cultivo, que seria relativo as primeiras horas de contato com o hospedeiro, em que se enfrenta de imediato tanto um rápido processo de diferenciação, como sistema imune inato (SCHWARTZ; FALLON, 2018).

Figura 34 – Gráficos da expressão relativa ao eIF4E dos Sm-lncRNAs mais expressos nos diferentes estágios analisados





Expressão relativa dos Sm-lncRNAs mais expressos nos estágios de cerária, esquistossômulo (3,5h), verme adulto e ovo, com calibração dos dados obtidos na RT-qPCR com o gene eIF4a. Os dados foram analisados por meio de ANOVA com pós-teste de Tukey, considerando significativo um $p < 0,01$.

6.4 Expressão dos Sm-lncRNAs no fígado dos grupos Controle, I(70cerc) e I(100cerc)

A interação parasito-hospedeiro carrega consigo uma denotação intimista, sendo intuitivo que esses organismos comuniquem constantemente entre si. Afinal de contas, o hospedeiro se empenha a eliminar o parasito, enquanto este possui estratégias para escapar do sistema imune, mantendo seu ciclo. E em seu processo evolutivo, o tempo é crucial para definir as especificidades dessa relação (POULIN, 2019).

Considerando a ocorrência milenar da esquistossomose, é esperado encontrar uma complexa interação entre *Schistosoma*-hospedeiro (CRELLEN *et al.*, 2016). Um exemplo claro

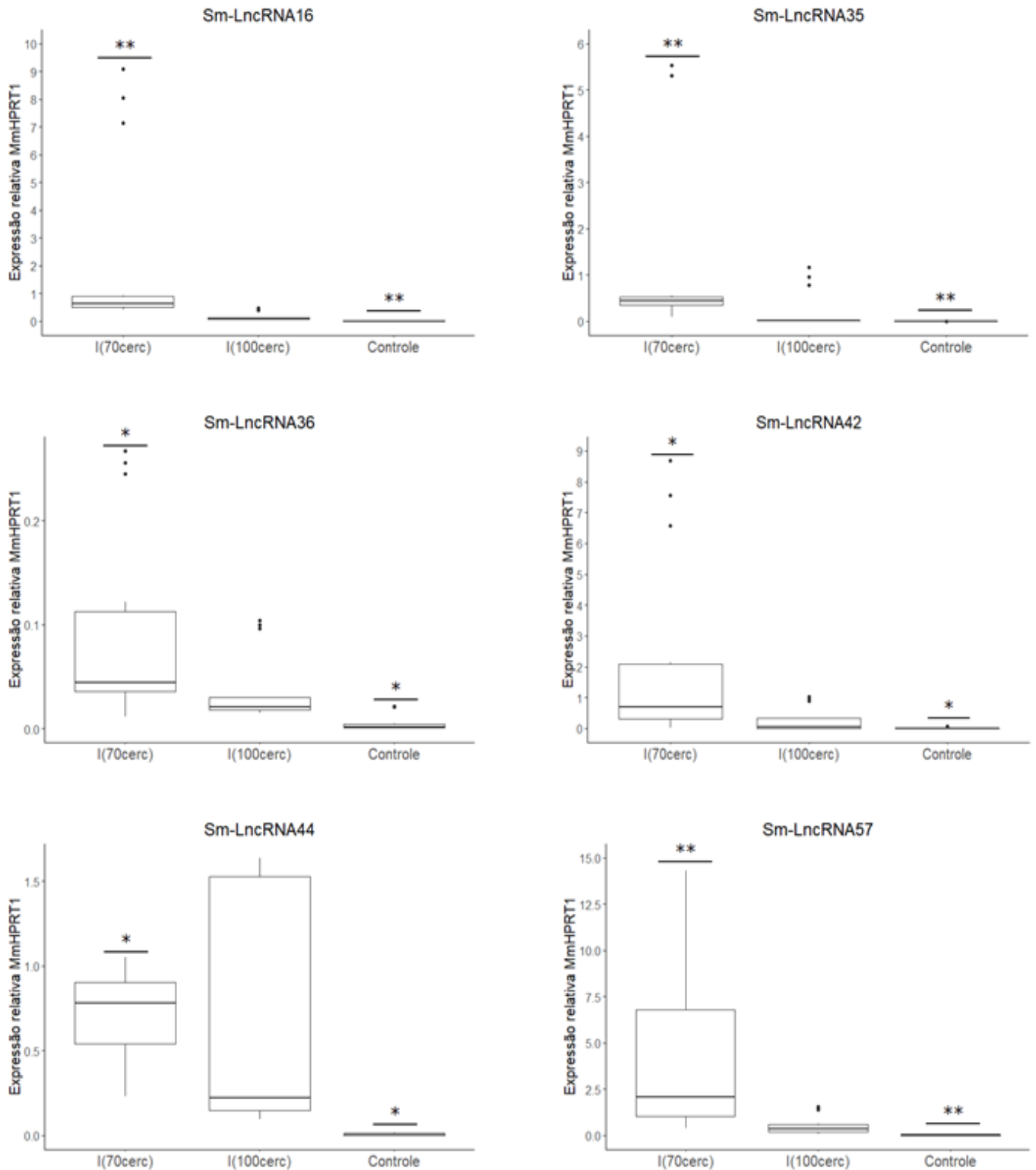
desse fato, são as fortes evidências de que o ovo do *Schistosoma* faz uso do sistema imune do hospedeiro para atingir a luz do intestino e ser eliminado juntamente com as fezes no ambiente, oportunizando a possibilidade de reiniciar o ciclo. Já se pôde identificar diversas moléculas secretadas pelo ovo, dos chamados antígenos solúveis dos ovos, que parecem ter um importante papel nessa mudança. (SCHWARTZ; FALLON, 2018).

A eliminação dos ovos, ao mesmo passo que é importante para o ciclo de vida do verme, também o é para o hospedeiro definitivo, pois quando os ovos se alojam nos tecidos há formação do granuloma e consequente morte do miracídio. Ao final desse processo ocorre fibrose local do tecido, que comumente concentram-se no intestino, fígado e baço do hospedeiro quando se trata da esquistossomose mansoni, e é a grande responsável pela verificação da patologia da doença (MEWAMBA *et al.*, 2021). Considerando a formação dos granulomas, a equipe decidiu analisar a expressão dos lncRNAs do parasito no fígado de camundongos BALB/c, infectados e controle, selecionando para tal, àqueles Sm-lncRNAs que apresentaram maior expressão no ovo do *S. mansoni*.

O primeiro objetivo, consistia em estabelecer infecção correspondente à fase aguda e à fase crônica da esquistossomose no modelo murino, porém, por volta de 60 dias de infecção, os animais começaram a morrer em decorrência da infecção. Portanto, todos os grupos foram eutanasiados com 63 dias de infecção para evitar a perda de todo o grupo experimental.

De acordo com a análise de Friedman com pós-test de Dunn, obteve-se diferença estatística entre a mediana das expressões de todos os Sm-LncRNAs ente o grupo Controle e I(70cerc) (Figura 13), sendo essa diferença ente os grupos, significativamente maior nas comparações dos Sm-lncRNAs 16, 57 e 35, do que nos demais. Não houve diferença significativa entre as expressões dos Sm-lncRNAs entre os grupos infectados I(70cerc) e I(100cerc), nem entre os grupos controle e I(100cerc). A concretização destes resultados ainda depende da análise das lâminas do fígado dos animais, para verificar o número e tamanho dos granulomas, obtendo o percentual de ovos no fígado e correlacionando com os dados encontrados. Por um outro lado, o grupo controle teve sua expressão de modo geral tendendo a zero, a detecção em si não implica na não especificidade dos longos ao *S. mansoni*, pois a concretização do resultado dependeria da normalização dos primers por meio da curva de eficiência, permitindo se fazer de resultados mais conclusivos. Apesar da necessidade de análises posteriores para tornar os dados mais robustos, a detecção dos lncRNAs do *Schistosoma* no fígado do grupo infectado é equivalente à estudos anteriores em de modelos murinos (MOTA *et al.*, 2021; OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Figura 37 - Gráficos da expressão dos Sm-LncRNAs no fígado de camundongos BALB/c



Expressão relativa dos Sm-LncRNAs no fígado dos camundongos BALB/c pertencente aos grupos: infectado com 70 cercárias (I(70cerc), infectado com 100 cercária (I(100cerc) e não infectado (Controle). Dados obtidos por RT-qPCR com calibração do gene MmHPRT1, posteriormente analisados com teste de Friedman seguido por pós teste de Dunn, considerando os níveis de significância das diferenças entre os grupos em: “*” $p < 0,01$ e “**” $p < 0,001$.

6.5 Expressão dos Sm-lncRNAs no sangue dos grupos Controle, I(70cerc) e I(100cerc)

Em relação a comunicação entre parasito-hospedeiro, não só o ovo do *Schistosoma* passou por um processo de categorização de parte conteúdo molecular secretado, como também os estágios de cercária, esquistossômulo e verme adulto. Os dois últimos, ganham certo destaque por serem estágios com desenvolvimento no interior do organismo hospedeiro. Parte importante desse desenvolvimento está relacionado com a alimentação desses estágios do parasito, que vivem livremente em vasos sanguíneos, e se alimentam do conteúdo das hemácias do hospedeiro. Para acessar esse conteúdo, secretam na corrente sanguínea inúmeras vesículas extracelulares e moléculas livres, responsáveis por romper a parede celular das hemácias e permitir sua sucção por parte do verme. Após a digestão da matéria ingerida, eles voltam a secretar vesículas e moléculas, por meio do ato de regurgitar restos não digeridos no sangue do hospedeiro (BISCHOFBERGER *et al.*, 2020).

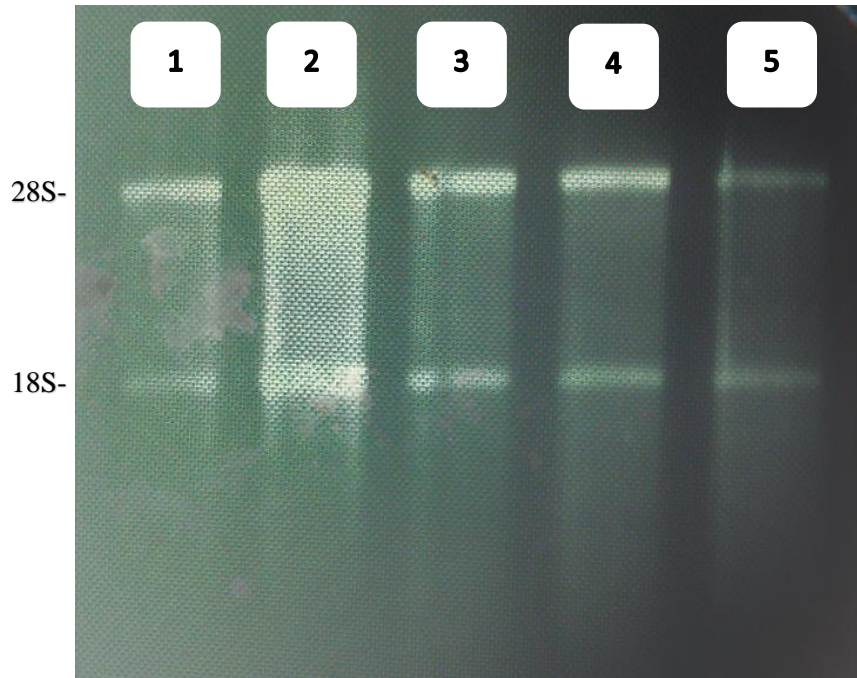
Além disso, as vesículas extracelulares secretadas pelos *S. mansoni* também têm sido relacionadas com vaso dilatação e com o impedimento da coagulação local, importante para que o verme adulto sobreviva nas veias mesentéricas do hospedeiro. Parte do conteúdo proteico e miRNAs das vesículas extracelulares secretadas pelos estágios do *S. mansoni* já foram categorizados, mas ainda não há trabalhos que estudem o conteúdo de lncRNAs destas (BISCHOFBERGER *et al.*, 2020).

Levando em consideração a grande chance do *S. mansoni* em secretar vesículas extracelulares com lncRNAs em seu conteúdo, e o potencial já discutido dessas moléculas, o presente estudo também se esforçou em analisar a expressão dos Sm-lncRNAs selecionados, no sangue dos grupos Controle, I(70cerc) e I(100cerc). Para limitar as análises há um conjunto palpável, se analisou apenas o Sm-lncRNAs mais expressos em cada uma das fases, compreendendo um conjunto total contendo os Sm-lncRNAs: 16, 17, 35, 36, 37, 42, 43, 44, 54, 55, 56, 57, 61.

No sangue dos animais infectados, houve detecção da expressão de Sm-lncRNAs tanto no grupo I(70cerc) quanto no grupo controle. Não houve detecção de Sm-lncRNAs em nenhum dos animais referentes ao grupo infectado com 100 cercárias, e isso provavelmente se deve ao fato de a extração desse grupo ter sido desenvolvida com um kit diferente das demais amostras, o kit SV Total Promega, visto que a integridade do RNA pôde ser verificada (Figura 14). Já nos demais grupos, a extração foi realizada com kit RNeasy Mini Kit (Qiagen), cuja matriz de separação da coluna também é sensível a moléculas de RNA com tamanho a partir de 200 nts, aumentando o espectro de purificação por tamanho. A diferença de performance na extração,

evidencia a importância da padronização dos métodos e da verificação da performance dos produtos disponíveis em mercado, escolhendo aquele que obtenha melhor desempenho para a amostra analisada.

Figura 40 – Verificação da integridade dos RNAs extraídos em sangue total



Gel de agarose (1,2%) contendo as amostras de sangue total dos cinco camundongos do grupo I(100cerc): SI100c1 (1); SI100c2 (2); SI100c3 (3); SI100c4 (4); SI100c5 (5); demonstra a integridade da extração de RNA pelo kit SV Total Promega, pela visualização das bandas das subunidades ribossômicas (28S e 18S). Aplicou-se 2 µg de RNA em cada canaleta, corados com Brometo de etídio.

Fonte: Arquivo pessoal

Os dados foram apresentados em termos qualitativos (Tabela 2), pois houveram problemas com a detecção do gene de referência, não permitindo uma inferência quantitativa. Os Sm-lncRNAs 17, 35, 36, 44, e 54 não apresentaram detecção de expressão nas amostras de sangue de nenhum dos animais nos diferentes grupos. Todos os demais Sm-lncRNAs apresentaram amplificação tanto no grupo controle quanto no I(70cerc), com o primeiro apresentando um panorama geral de detecção em um maior número de animais do que o segundo. O único lncRNA que apresentou uma detecção em todos os animais de um grupo foi o Sm-lncRNA43 no I(70cerc), sendo o que apresentou maior número de amplificação também nos camundongos do grupo controle.

Tabela 2 – Detecção qualitativa da expressão de Sm-lncRNAs no sangue de camundongos BALB/c

LncRNA	N° de animais I(70cerc)	N° de animais I(100cerc)	N° de animais Controle
LncRNA16	1	-	3
LncRNA17	-	-	-
LncRNA35	-	-	-
LncRNA36	-	-	-
LncRNA37	1	-	2
LncRNA42	1	-	1
LncRNA43	5	-	4
LncRNA44	-	-	-
LncRNA54	-	-	-
LncRNA55	2	-	3
LncRNA56	2	-	3
LncRNA57	1	-	2
LncRNA61	1	-	2

Detecção da expressão qualitativa dos Sm-lncRNAs por RT-qPCR realizada em amostras de sangue dos camundongos pertencentes aos grupos: Infectado com 70 cercária (I(70cerc)); Infectado com 100 cercárias (I(100cerc)); e não infectado (Controle).

Os Sm-lncRNAs mais expressos em verme adulto incluem o 44 e o 57, nas amostras de sangue não houve detecção do primeiro e uma detecção baixa do segundo, indicando que os Sm-lncRNAs expressos considerando estágio separadamente, podem não ser correspondentes àqueles liberados no organismo hospedeiro. A amplificação qualitativa dos Sm-lncRNAs nas amostras sanguíneas dos animais, é correspondente com dados anteriores do laboratório (MOTA, 2020).

Estudos anteriores, categorizaram tanto proteínas quanto miRNAs em vesículas extracelulares de diferentes estágios do *Schistosoma* (BISCHOFBERGER *et al.*, 2020) e demonstraram possível detectar miRNAs do verme por RT-qPCR em amostras de soro hospedeiros infectados com sensibilidade maior que 80%, incluindo indivíduos com baixa carga parasitária (HOY *et al.*, 2014). Considerando a maior gama de funções regulatórias e a maior abundância dos lncRNAs em relação aos miRNAs no *S. mansoni*, há uma grande chance de que essas moléculas apresentem uma detecção mais promissora da esquistossomose mansoni. A detecção qualitativa de lncRNAs do verme em amostras de sangue é um passo inicial que demonstra o potencial dessas moléculas como prováveis biomarcadores da esquistossomose.

7 CONCLUSÃO

Manter o complexo ciclo de vida apresentados pelo *S. mansoni*, demanda uma intensa regulação da expressão gênica, o que certamente envolve a atuação dos lncRNAs, apesar da baixa investigação existente sobre a atuação dessas moléculas na esquistossomose. Com este estudo, pôde verificar que de um conjunto de 29 lncRNAs, 22 apresentaram expressão diferencial em pelo menos três das quatro fases analisadas, demonstrando o grande potencial que essas moléculas têm em estar envolvidas na plasticidade dos estágios evolutivos do *S. mansoni*.

A detecção dessas moléculas em amostras de sangue e fígados dos animais analisados, traz um primeiro vislumbre sobre o potencial que os lncRNAs possuem na seleção de biomarcadores para a esquistossomose murina. Porém, ainda serão necessários estudos futuros para a confirmação dos dados aqui apresentados. Encontrar biomarcadores para a esquistossomose futuramente, pode ser crucial para a substituição dos atuais métodos de detecção/tratamento, em métodos mais sensíveis e eficazes, podendo proporcionar a redução dos impactos verificados pela parasitose.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Visto que os resultados aqui apresentados demandam processos posteriores para enriquecimento dos dados, têm-se como perspectivas futuras aumentar o N amostral dos grupos analisados e realizar a curva de eficiência para calibração dos primers analisados, permitindo maior confiabilidade das análises.
- Serão realizadas as confecções e análises das lâminas dos fígados dos camundongos, para determinação de número de granuloma e área, utilizando cortes de fígado do grupo infectado e não infectado corando com HE, permitindo conclusões mais diretas sobre os resultados.
- Considerando a falha com o gene constitutivo selecionado para este trabalho nas amostras de RNA total extraídas do sangue total dos camundongos, serão realizados ensaios de padronização para verificação da eficiência e escolha do melhor gene constitutivo, a fim de quantificar a expressão dos Sm-lncRNAs e buscar por potenciais biomarcadores da esquistossomose.

9 REFERÊNCIAS

- ANASTASIOU, E. *et al.* Prehistoric schistosomiasis parasite found in the Middle East. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 14, n. 7, p. 553–554, 2014. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70794-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70794-7)>.
- ANDERSON, T. J. C.; ENABULELE, E. E. *Schistosoma mansoni*. [S.l: s.n.], 2020. v. 37.
- ATKINSON, A. J. *et al.* Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, v. 69, n. 3, p. 89–95, 2001.
- BERRIMAN, M. *et al.* The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature*, v. 460, n. 7253, p. 352–358, 2009.
- BISCHOFBERGER, M. *et al.* Pathogen-host interaction mediated by vesicle-based secretion in schistosomes. *Protoplasma*, v. 257, n. 5, p. 1277–1287, 2020.
- BOON, R. A. *et al.* Long Noncoding RNAs from Clinical Genetics to Therapeutic Targets? *Journal of the American College of Cardiology*, v. 67, n. 10, p. 1214–1226, 2016.
- BRASIL, M. DA S. S. DE V. EM S. *Esquistossomose Mansoní, Geo-helminthíases, Tracoma*. [S.l: s.n.], 2017. v. 3.
- BURKE, M. L. *et al.* Co-ordinated gene expression in the liver and spleen during schistosoma japonicum infection regulates cell migration. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 4, n. 5, 2010.
- BUSTINDUY, A. L. *et al.* One hundred years of neglect in paediatric schistosomiasis. *Parasitology*, v. 144, n. 12, p. 1613–1623, 2017.
- CRAIG VENTER, J. *et al.* The sequence of the human genome. *Science*, v. 291, n. 5507, p. 1304–1351, 2001.
- CRELLEN, T. *et al.* Whole genome resequencing of the human parasite *Schistosoma mansoni* reveals population history and effects of selection. *Scientific Reports*, v. 6, n. October 2015, p. 1–13, 2016.
- DE CARVALHO AUGUSTO, R.; DUVAL, D.; GRUNAU, C. Effects of the environment on developmental plasticity and infection success of *Schistosoma* parasites - An epigenetic perspective. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, n. JULY, p. 1–9, 2019.
- DERRIEN, T. *et al.* The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: Analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Research*, v. 22, n. 9, p. 1775–1789, 2012.

DHANOVA, J. K. *et al.* Long non-coding RNA: Its evolutionary relics and biological implications in mammals: A review. *Journal of Animal Science and Technology*, v. 60, n. 1, p. 1–10, 2018.

DI BELLA, S. *et al.* History of schistosomiasis (bilharziasis) in humans: from Egyptian medical papyri to molecular biology on mummies. *Pathogens and Global Health*, v. 112, n. 5, p. 268–273, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/20477724.2018.1495357>>.

DUNHAM, I. *et al.* An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, v. 489, n. 7414, p. 57–74, 2012.

ENGELS, D.; ZHOU, X. N. Neglected tropical diseases: An effective global response to local poverty-related disease priorities. *Infectious Diseases of Poverty*, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2020.

FALCÃO, E. C. Pirajá da Silva: o incontestável descobridor do “schistosoma mansoni”. *História da Saúde no Brasil*, p. XX, 2008.

JARROUX, J.; MORILLON, A.; PINSKAYA, M. *Long Non Coding RNA Biology*. [S.l: s.n.], 2017. v. 1008. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-981-10-5203-3>>.

KAPUSTA, A.; FESCHOTTE, C. Volatile evolution of long noncoding RNA repertoires: Mechanisms and biological implications. *Trends in Genetics*, v. 30, n. 10, p. 439–452, 2014.

KARLSSON, O.; BACCARELLI, A. A. Environmental Health and Long Non-coding RNAs. *Current environmental health reports*, v. 3, n. 3, p. 178–187, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s40572-016-0092-1>>.

KARVONEN, A.; SEEHAUSEN, O. The role of parasitism in adaptive radiations-when might parasites promote and when might they constrain ecological speciation? *International Journal of Ecology*, v. 2012, 2012.

KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in Schistosomiasis mansoni. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, v. 14, n. 6, p. 397–400, 1972.

KIM, H. C.; KHALIL, A. M.; JOLLY, E. R. LncRNAs in molluscan and mammalian stages of parasitic schistosomes are developmentally-regulated and coordinately expressed with protein-coding genes. *RNA Biology*, v. 17, n. 6, p. 805–815, 2020.

LEWIS, F. A.; TUCKER, M. S. Digenetic Trematodes. v. 766, p. 47–75, 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-0915-5>>.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LÓPEZ-JIMÉNEZ, E.; ANDRÉS-LEÓN, E. The implications of ncRNAs in the development of human diseases. *Non-coding RNA*, v. 7, n. 1, 2021.

MANSON, P. Report of a case of bilharzia from the west indies. *British Medical Journal*, v. 2, n. 2190, p. 1894–1895, 1902.

MANZONI, C. *et al.* Genome, transcriptome and proteome: The rise of omics data and their integration in biomedical sciences. *Briefings in Bioinformatics*, v. 19, n. 2, p. 286–302, 2018.

MCMANUS, D. P. *et al.* Schistosomiasis. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 4, n. 1, p. 1–19, 2018.

MEWAMBA, E. M. *et al.* The Genetics of Human Schistosomiasis Infection Intensity and Liver Disease: A Review. *Frontiers in Immunology*, v. 12, n. February, 2021.

MORAND, S.; HARVEY, P. H. Mammalian metabolism, longevity and parasite species richness. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 267, n. 1456, p. 1999–2003, 2000.

MOTA, E. A. *et al.* Detection of *Schistosoma mansoni* long non-coding RNAs in the infected C57BL/6 mouse liver. *Experimental Parasitology*, v. 222, n. October 2019, p. 108062, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.108062>>.

MOTA, E. A. *et al.* Epigenetic and parasitological parameters are modulated in EBi3^{-/-} mice infected with *Schistosoma mansoni*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 14, n. 2, p. 1–24, 2020.

MOTA, E. A. *Parâmetros epigenéticos e parasitológicos associados à esquistossomose mansoni em*. 2020. 1–124 f. UFOP, 2020.

NASCIMENTO, G. L. *et al.* The cost of a disease targeted for elimination in Brazil: the case of schistosomiasis mansoni. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 114, p. e180347, 2019.

NELWAN, M. L. Schistosomiasis: Life Cycle, Diagnosis, and Control. *Current Therapeutic Research - Clinical and Experimental*, v. 91, n. 24, p. 5–9, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.curtheres.2019.06.001>>.

NEVES, D. P. *et al.* *Parasitologia Humana - Neves 11^aed.* [S.l.: s.n.], 2005.

ODUM, E. P. Fundamentos em Ecologia .pdf. p. 563–603, 2011.

OGONGO, P.; KARIUKI, T. M.; WILSON, R. A. Diagnosis of schistosomiasis mansoni: An evaluation of existing methods and research towards single worm pair detection. *Parasitology*, v. 145, n. 11, p. 1355–1366, 2018.

OLIVEIRA, V. F. *et al.* Identification of 170 New Long Noncoding RNAs in *Schistosoma mansoni*. *BioMed Research International*, v. 2018, p. 1–9, 2018.

PONTES, L. A. *et al.* Comparison of a polymerase chain reaction and the Kato-Katz technique for diagnosing infection with *Schistosoma mansoni*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 68, n. 6, p. 652–656, 2003.

POPIEL, I.; BASCH, P. F. Reproductive development of female *Schistosoma mansoni* (Digenea: Schistosomatidae) following bisexual pairing of worms and worm segments. *Journal of Experimental Zoology*, v. 232, n. 1, p. 141–150, 1984.

POULIN, R. Best practice guidelines for studies of parasite community ecology. *Journal of Helminthology*, v. 93, n. 1, p. 8–11, 2019.

REY, L. *Bases da Parasitologia Médica*. 3^a ed. Rio de Janeiro: [s.n.], 2010.

SANTOS, A. D. *et al.* Spatial analysis of the prevalence of schistosomiasis in an endemic coastal area in north-eastern Brazil. *Geospatial Health*, v. 12, n. 2, p. 360–368, 2017.

SCHWARTZ, C.; FALLON, P. G. *Schistosoma* “Eggs-iting” the host: Granuloma formation and egg excretion. *Frontiers in Immunology*, v. 9, n. October, p. 1–16, 2018.

SIMPSON, J.; SHER, A.; MCCUTCHAN, T. THE GENOME OF *SCHISTOSOMA MANSONI*: ISOLATION OF DNA, ITS SIZE, BASES AND REPETITIVE SEQUENCES. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 6, p. 125–137, 1982.

SWAIN, M. T. *et al.* *Schistosoma* comparative genomics: Integrating genome structure, parasite biology and anthelmintic discovery. *Trends in Parasitology*, v. 27, n. 12, p. 555–564, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2011.09.003>>.

ULITSKY, I. Evolution to the rescue: Using comparative genomics to understand long non-coding RNAs. *Nature Reviews Genetics*, v. 17, n. 10, p. 601–614, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrg.2016.85>>.

VASCONCELOS, E. J. R. *et al.* The *Schistosoma mansoni* genome encodes thousands of long non-coding RNAs predicted to be functional at different parasite life-cycle stages. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 1–17, 2017.

VERJOVSKI-ALMEIDA, S. *et al.* Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. *Nature Genetics*, v. 35, n. 2, p. 148–157, 2003.

WHO. WHO methods and data sources for country-level causes of death. *Global Health Estimates Technical Paper*, v. 3, n. March, p. 1–83, 2018.

WILSON, R. A. Schistosomiasis then and now: What has changed in the last 100 years?

Parasitology, v. 147, n. 5, p. 507–515, 2020.

WRIGHT, M. W.; BRUFORD, E. A. Naming “junk”: human non-protein coding RNA (ncRNA) gene nomenclature. *Human genomics*, v. 5, n. 2, p. 90–8, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21296742>%0A<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3051107>>.

XIA, T. *et al.* RNA sequencing analysis of altered expression of long noncoding RNAs associated with *Schistosoma japonicum* infection in the murine liver and spleen. *Parasites and Vectors*, v. 13, n. 1, p. 1–15, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13071-020-04457-9>>.

XIE, Y. *et al.* Circulating long noncoding RNA act as potential novel biomarkers for diagnosis and prognosis of non-small cell lung cancer. *Molecular Oncology*, v. 12, n. 5, p. 648–658, 2018.

ZOU, T. *et al.* Long noncoding RNA HOTTIP is a significant indicator of ovarian cancer prognosis and enhances cell proliferation and invasion. *Cancer Biomarkers*, v. 25, n. 2, p. 133–139, 2019.