



UFOP

Universidade Federal
de Ouro Preto

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA



Escola de Farmácia

GABRIELA PINTO

**REANOTAÇÃO E ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE RNAs LONGOS
NÃO CODIFICADORES EM *Schistosoma mansoni***

OURO PRETO
2025

GABRIELA PINTO

**REANOTAÇÃO E ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE RNAs LONGOS
NÃO CODIFICADORES EM *Schistosoma mansoni***

Trabalho de Conclusão de Curso a ser apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharela em Farmácia pela Universidade Federal de Ouro Preto.

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

Coorientador: Me. Flávia Arêdes Rocha

OURO PRETO
2025



FOLHA DE APROVAÇÃO

Gabriela Pinto

**Reanotação e análise do perfil de expressão de RNAs longos não codificadores
em *Schistosoma mansoni***

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal
de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutico Generalista.

Aprovada em 14 de abril de 2025.

Membros da banca

Dra. Ana Carolina Araujo Mengarda- Universidade de São Paulo
Dr. Wander de Jesus Jeremias- Universidade Federal de Ouro Preto
Dra. Renata Guerra de Sá Cota-Universidade Federal de Ouro Preto

Renata Guerra de Sá Cota, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 20/08/2025.



Documento assinado eletronicamente por **Renata Guerra de Sá Cota, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 21/08/2025, às 14:54, 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 **0963545** e o código CRC **10D3CB56**.

Dedico este texto à cidade de Ouro Preto, cuja história
atravessou a minha — e me transformou
permanentemente.

AGRADECIMENTOS

Produzir um trabalho acadêmico é como dirigir um filme. No início, há apenas um conceito abstrato, uma ideia que precisa ganhar forma. O roteiro é reescrito incontáveis vezes, cenas são cortadas, personagens entram e saem, e o processo exige paciência, dedicação e uma equipe incrível nos bastidores. Esse trabalho não é só meu — ele é resultado da orientação, do apoio e do carinho de muitas pessoas que tornaram essa jornada possível.

Agradeço à minha orientadora, **Profa. Dra. Renata Guerra de Sá Cota**, pela paciência e inspiração ao longo de todo o processo. E à minha coorientadora, **Ma. Flávia Arêdes Rocha**, que esteve comigo desde o início, me guiando com sabedoria da teoria à prática e me salvando muitas vezes pelo caminho.

A todos do **LBBM**. Cada conversa, troca de experiência e momento de aprendizado com vocês tornou essa caminhada mais rica, leve e possível. Em especial, à **Thayane**, você me mostrou o verdadeiro significado de irmandade dentro do meio científico.

Aos meus pais, **Evandro e Roseli**, que sempre acreditaram que eu poderia alcançar tudo o que sonhasse. Seu esforço para me dar a melhor educação possível e seu apoio incondicional foram a base para que eu chegasse até aqui.

Ao meu fiel escudeiro, **Pit**, que mesmo sem entender os detalhes do meu trabalho, nunca hesitou em oferecer ajuda e apoio. Seu amor foi essencial nos momentos de ansiedade e dúvida, me fazendo lembrar do meu próprio potencial. Te amo daqui até os confins do universo!

Ao meu tio **Ever**, que sempre acompanhou minhas conquistas com entusiasmo e orgulho. Sua torcida constante foi um impulso importante ao longo desse caminho.

À minha amada **República Indiscreta**. Com vocês, descobri o que é dividir a vida e criar laços que atravessam o tempo e o espaço. Sei que, não importa onde a vida me leve, sempre terei em **Ouro Preto** um lar — e em vocês, uma família para a vida toda.

Agradeço também ao **CNPq**, à **FAPEMIG** e à **UFOP**, por apoiarem e acreditarem na importância da ciência e da pesquisa. Sem esse suporte, esse trabalho não teria saído do papel.

Todo filme tem seu desfecho, mas as histórias que realmente importam permanecem conosco. E essa, sem dúvida, é uma das mais especiais da minha vida.

“Deixe o mundo um pouco melhor do que encontrou”

Robert Baden-Powell

RESUMO

A esquistossomose mansoni, causada pelo parasita *Schistosoma mansoni*, representa um significativo problema de saúde pública, especialmente em regiões tropicais com condições sanitárias precárias. Este estudo teve como objetivo reanotar e caracterizar o perfil de expressão de longos RNAs não codificantes (lncRNAs) em *S. mansoni*, visando elucidar seu papel na biologia do parasita e seu potencial como biomarcadores para diagnóstico e terapia. Para tanto, foram utilizadas ferramentas bioinformáticas, como o BLAST e o ORFFinder, além de bancos de dados especializados, como o RNACentral e o WormBase Parasite, para reanotar lncRNAs previamente identificados, com o objetivo de validar sua conservação evolutiva e seu potencial não codificante. Além disso, a expressão diferencial desses lncRNAs foi analisada nos estágios de cercária e verme adulto do parasita, bem como em amostras de baço de camundongos infectados e não infectados, por meio de qRT-PCR, realizado de acordo com as condições descritas pelo MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments). Os resultados demonstraram que os lncRNAs apresentam expressão estágio-específica, com padrões distintos entre cercárias e vermes adultos, sugerindo um papel regulatório no ciclo de vida do parasita. No baço de camundongos infectados, a detecção de lncRNAs do parasita indicou sua possível participação na modulação da resposta imune do hospedeiro. Esses dados corroboram achados da literatura, que atribuem aos lncRNAs um papel importante na regulação de vias e processos celulares, reforçando sua relevância funcional na interação parasita-hospedeiro. Esses achados destacam o potencial dos lncRNAs como biomarcadores para o diagnóstico precoce da esquistossomose e como alvos para intervenções terapêuticas. O estudo reforça a importância de investigações futuras para validar a função dessas moléculas e explorar sua aplicação no controle da doença.

Palavras-chave: Esquistossomose, *Schistosoma mansoni*, lncRNAs, biomarcadores, bioinformática.

ABSTRACT

Manson's schistosomiasis, caused by the parasite *Schistosoma mansoni*, represents a significant public health problem, particularly in tropical regions with poor sanitation. This study aimed to reannotate and characterize the expression profile of long non-coding RNAs (lncRNAs) in *S. mansoni* to elucidate their role in parasite biology and their potential as biomarkers for diagnosis and therapy. Bioinformatics tools, including BLAST and ORFFinder, as well as specialized databases such as RNACentral and WormBase Parasite, were used to reannotate previously identified lncRNAs, validating their evolutionary conservation and non-coding potential. Additionally, the differential expression of these lncRNAs was analyzed in cercariae and adult worm stages of the parasite, as well as in spleen samples from infected and non-infected mice, using qRT-PCR performed according to MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) guidelines. The results demonstrated stage-specific lncRNA expression patterns, with distinct profiles between cercariae and adult worms, suggesting a regulatory role in the parasite's life cycle. In infected mice, the detection of parasite-derived lncRNAs in the spleen indicated their potential involvement in modulating the host immune response. These findings align with existing literature attributing important regulatory functions to lncRNAs in cellular pathways and processes, reinforcing their functional relevance in parasite-host interactions. The results highlight the potential of lncRNAs as biomarkers for early schistosomiasis diagnosis and as targets for therapeutic interventions. This study emphasizes the need for further research to validate the functions of these molecules and explore their applications in disease control.

Keywords: Schistosomiasis, *Schistosoma mansoni*, lncRNAs, biomarkers, bioinformatics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Distribuição da esquistossomose de acordo com as áreas de endemicidade – Brasil.	14
Figura 2 – Representação da expansão da esquistossomose no Brasil.....	17
Figura 3 – Comparação entre ovos de Schistosoma.	18
Figura 4 – Casal de Schistosoma mansoni, mostrando a fêmea alojada no canal ginecóforo do macho.....	19
Figura 5 – Miracídio de Schistosoma mansoni nadando em água fresca.....	19
Figura 6 – Caramujo Biomphalaria.	20
Figura 7 – Cercária de Schistosoma.	21
Figura 8 – Ciclo de vida do Schistosoma mansoni.	21
Figura 9 – Esquema ilustrativo da anatomia do baço.....	23
Figura 10 – Paciente com esplenomegalia induzida por esquistossomose.....	24
Figura 11 – Dermatite Cercariana.	25
Figura 12 – Granulomas esquistossomóticos no fígado.....	26
Figura 13 – Hiperplasia esplênica da polpa vermelha.....	27
Figura 14 – Esquistossomose hepática.....	28
Figura 15 – Representação esquemática da associação entre o ribossomo, o RNAt e o RNAm para a formação da proteína.....	29
Figura 16 – Representação da extração de RNA por meio da visualização das subunidades ribossomais.	37
Figura 17 – Gel de agarose 2,2% de produto de PCR convencional de cDNA de verme adulto para validação de primers.	41
Figura 18 – Curvas de dissociação dos produtos de qPCR de cDNA de verme adulto.	41
Figura 19 – Heat Map da expressão dos lncRNAs nas fases de cercária e verme adulto do S. mansoni utilizando como referência o gene Eif4a.....	48
Figura 20 – Expressão relativa (LncRNA167632) dos lncRNAs do baço dos camundongos BALB/c infectados e não infectados por S. mansoni.	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência dos primers forward e reverse de cada gene analisado, e os respectivos tamanhos de seus amplicons.....	40
Tabela 2 – Dados de transcritos obtidos no WormBase Parasite.	44
Tabela 3 – Dados de transcritos obtidos no RNACentral.....	45
Tabela 4 – Dados de transcritos obtidos no ORF Finder (NCBI).	46
Tabela 5 – Dados de transcritos obtidos no BLAST (NCBI).	47
Tabela 6 – Possíveis genes alvos dos lncRNAs trabalhados no estudo.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

Ácido desoxirribonucleico (DNA)

Ácido ribonucleico (RNA)

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

Coding Potential Calculator (CPC)

CRISPR-RNA (do inglês Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)

Disability-Adjusted Life Years (DALYs)

DNA complementar (cDNA)

DNA livre circulante (cfDNA)

Desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTPs)

Dietilpirocarbonato (DEPC)

Doença tropical negligenciada (DTN)

Eukaryotic Translation Initiation Factor 4^a (Eif4a)

Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UFOP (LBBM)

Mass Drug Administration (MDA)

Micro RNAs (miRNAs)

Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE)

Open Reading Frames (ORFs)

Organização Mundial da Saúde (OMS)

PCR de transcrição reversa quantitativa (qRT-PCR)

PCR quantitativa (qPCR)

piwi-interacting RNAs (piRNAs)

Programa de Controle da Esquistossomose (PCE)

Programa Nacional de Controle da Esquistossomose (PNCE)

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

RNA mensageiro (mRNA)

RNAs circulares (circRNAs)

RNAs longos não codificantes (lncRNAs)

RNAs não codificantes (ncRNAs)

RNAs ribossomal (rRNA)

RNAs transportador (tRNA)

Sequenciamento de nova geração (NGS)

Sequenciamento de RNA (RNA-seq)

Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Epidemiologia e saúde pública	13
1.2	Aspectos Históricos, Biológicos e Moleculares do <i>Schistosoma mansoni</i>	16
1.3	Baço: Organização Estrutural, Função Imune e Alterações Durante Infecções Parasitárias.....	22
1.4	Fisiopatologia da Esquistossomose	24
1.5	Mecanismos de Atuação dos Diferentes Tipos de RNA	28
1.6	lncRNAs como Moduladores da Expressão Gênica em Doenças Parasitárias.....	30
1.7	O Papel da Bioinformática na Análise Genômica e Molecular.....	31
1.8	Biomarcadores Moleculares e o Potencial Diagnóstico dos lncRNAs na Esquistossomose.....	32
2	JUSTIFICATIVA	33
3	OBJETIVO	34
3.1	Objetivo Geral:	34
3.2	Objetivos Específicos	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1	Reanotação dos candidatos a lncRNAs	35
4.2	Obtenção dos animais infectados	36
4.3	Extração do RNA total	36
4.4	Síntese do cDNA	38
4.5	Validação do primers.....	39
4.6	qRT-PCR	41
4.7	Identificação de possíveis alvos dos lncRNAs	42
4.8	Análise estatística	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1	Reanotação dos lncRNAs preditos de <i>S.mansoni</i>	43
5.2	Validação dos primers	47
5.3	Perfil de expressão nas fases de cercária e verme adulto do <i>S. mansoni</i>	47
5.4	Perfil de expressão de lncRNAs selecionados em amostras de baço	49
5.5	Identificação de possíveis alvos dos lncRNAs de <i>S. mansoni</i>	51
6	CONCLUSÃO.....	53
	REFERÊNCIAS	54

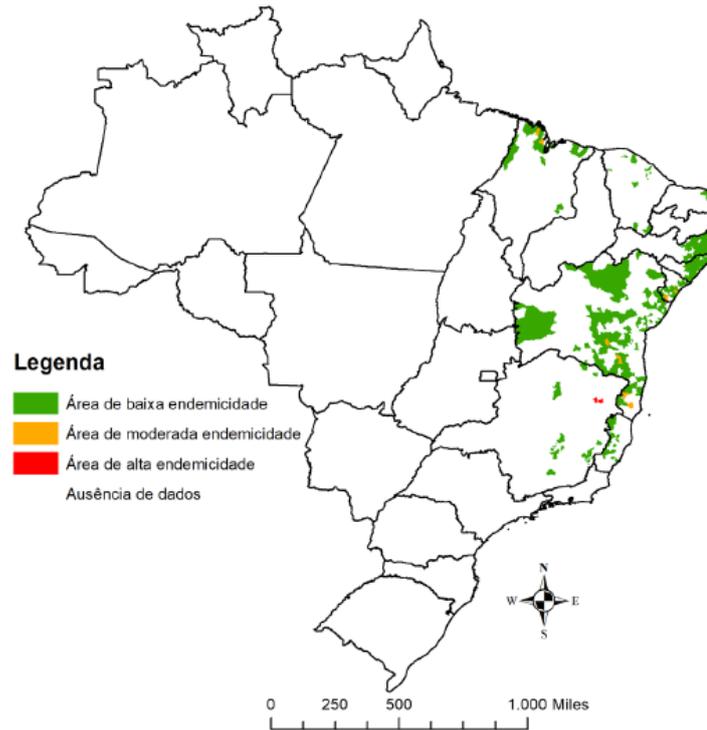
1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia e saúde pública

A esquistossomose humana, parasitose causada por helmintos do gênero *Schistosoma*, está entre as principais doenças parasitárias do mundo, sendo superada em impacto socioeconômico apenas pela malária. Atualmente, 78 países são considerados endêmicos, com mais de 236 milhões de pessoas necessitando de tratamento preventivo em 2019, e aproximadamente 600 milhões vivendo em áreas de risco de infecção (WHO, 2020). A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica a esquistossomose como uma doença tropical negligenciada (DTN), destacando seu impacto na saúde pública e no desenvolvimento socioeconômico, especialmente em regiões com acesso limitado à infraestrutura sanitária (Díaz; Walker; Webster, 1887).

A transmissão ocorre pelo contato com água contaminada por cercárias, liberadas por hospedeiros intermediários moluscos do gênero *Biomphalaria*. Grandes obras de infraestrutura, como barragens e projetos de irrigação, têm favorecido a expansão da esquistossomose, especialmente na África Subsaariana, América do Sul e Sudeste Asiático (Nelwan, 2020). Estima-se que a doença cause cerca de 24.000 mortes anualmente e resulte em 2,5 milhões de anos de vida ajustados por incapacidade (DALYs, do inglês Disability-Adjusted Life Years), uma medida que combina anos de vida perdidos devido à mortalidade prematura e anos vividos com incapacidade. Esses números refletem o impacto total da doença na saúde da população em 2016, embora esses números possam estar subestimados devido à subnotificação e à falta de métodos precisos para avaliar a carga da doença (WHO, 2020).

Figura 1 – Distribuição da esquistossomose de acordo com as áreas de endemicidade – Brasil.



Fonte: Brasil, 2024.

No Brasil, a esquistossomose mansoni foi registrada pela primeira vez no início do século XX e, desde então, permanece como um desafio significativo para a saúde pública (Gazzinelli *et al.*, 2017). O país é considerado a principal área endêmica das Américas, com uma distribuição geográfica que abrange principalmente a região Nordeste (Figura 1), onde condições sanitárias precárias e a presença de caramujos do gênero *Biomphalaria* favorecem a transmissão do parasita.

Entre 1990 e 2022, observou-se uma redução na taxa de positividade, que caiu de 8,4% para 1,2%, refletindo os esforços do Programa de Controle da Esquistossomose (PCE) (Brasil, 2024). No entanto, a doença ainda afeta populações em áreas rurais, ribeirinhas e periféricas de grandes centros urbanos, onde a falta de saneamento básico e o contato frequente com águas contaminadas perpetuam o ciclo de transmissão (Tibiriçá; Guimarães; Teixeira, 2011). Além disso, a expansão da doença para novas áreas, impulsionada por projetos de desenvolvimento econômico, construção de barragens e atividades de ecoturismo, tem aumentado o risco de surtos, especialmente em populações não imunes (Brasil, 2024). Diante disso, a esquistossomose continua a representar um problema de saúde pública, exigindo vigilância constante e estratégias integradas de controle.

Minas Gerais é um dos estados brasileiros mais afetados pela esquistossomose. Entre 2011 e 2020, foram registrados 37.535 casos, com maior prevalência nas macrorregiões Vale do Aço (27,8%), Nordeste (22,2%) e Centro (15,7%) (Cardoso *et al.*, 2021). Municípios como Belo Horizonte, Inhapim e Ipatinga apresentam números expressivos de infecção, o que reforça a necessidade de monitoramento epidemiológico contínuo. Além disso, a detecção de novos focos de transmissão, possivelmente associados a mudanças ambientais e urbanização, reforça a necessidade de uma vigilância ativa (Costa; Filho, 2021).

Ouro Preto, uma cidade histórica de Minas Gerais, apresenta um cenário interessante para a compreensão da esquistossomose em áreas de baixa endemicidade. Um estudo conduzido no distrito de Antônio Pereira, Ouro Preto, demonstrou que, apesar da baixa prevalência detectada pelo método Kato-Katz (4,1%), um percentual significativamente maior de indivíduos testou positivo para esquistossomose usando o teste de antígeno POC-CCA (22,1%) (Marinho *et al.*, 2017). Além disso, 2,8% dos infectados apresentavam a forma hepatoesplênica, e um paciente necessitou de esplenectomia devido a complicações da doença (Marinho *et al.*, 2017). Esses achados destacam a necessidade de métodos mais sensíveis de diagnóstico e de monitoramento contínuo, especialmente em áreas de baixa transmissão.

O tratamento da esquistossomose é baseado no uso do praziquantel, um fármaco eficaz contra a forma adulta do parasita. No entanto, sua administração isolada não impede reinfeções, tornando essencial a adoção de medidas integradas, como controle dos vetores, ampliação do saneamento básico e educação em saúde (Silva; Wanderley, 2022). A OMS recomenda a quimioterapia preventiva em massa (do inglês MDA- Mass Drug Administration) para populações em risco, com foco em crianças em idade escolar e adultos em ocupações que envolvem contato com água contaminada (WHO, 2020). Além disso, o controle de caramujos hospedeiros intermediários, através de moluscidas e modificações ambientais, é uma estratégia complementar importante (WHO, 2020).

O Programa Nacional de Controle da Esquistossomose (PNCE) tem desempenhado um papel fundamental na redução da carga parasitária no Brasil, embora enfrente desafios como subnotificação de casos, dificuldades na distribuição de medicamentos e limitações no diagnóstico (Silva; Wanderley, 2022). A OMS estabeleceu metas ambiciosas para a eliminação

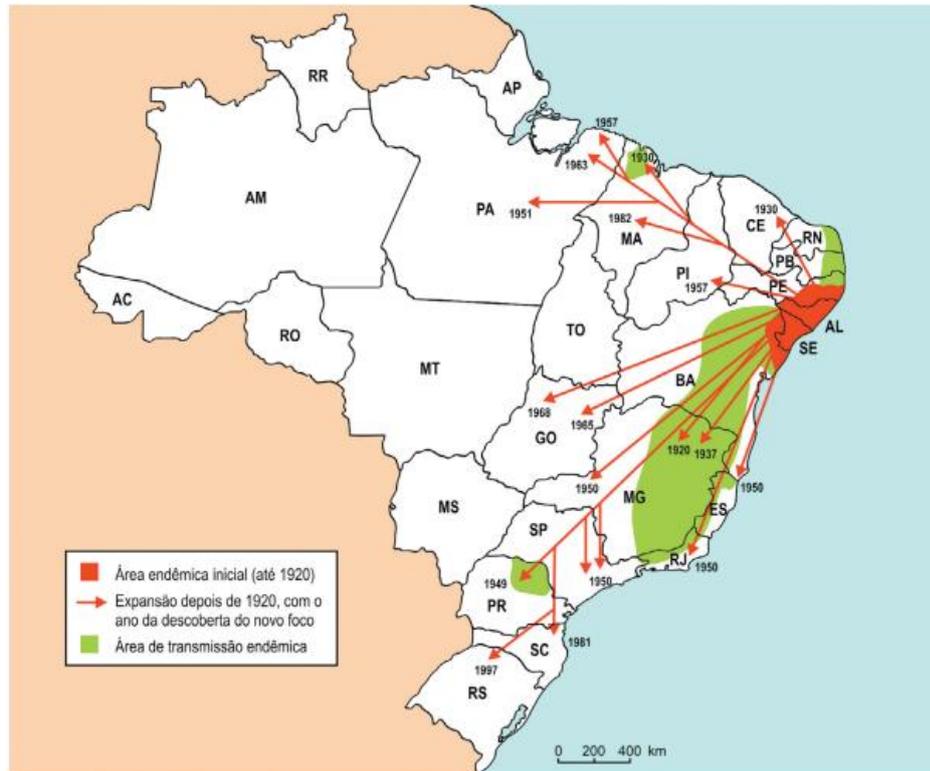
da esquistossomose como um problema de saúde pública até 2030, incluindo a redução da proporção de infecções de alta intensidade para menos de 1% e a ausência de infecção em humanos em 25 países (WHO, 2020).

Apesar dos avanços no controle da doença, a esquistossomose mansoni continua sendo um desafio para a saúde pública global e brasileira. A persistência da transmissão e o ressurgimento de formas graves reforçam a necessidade de estratégias de controle eficazes, baseadas na integração entre pesquisa científica, gestão pública e participação comunitária. Sem investimentos estruturais em saneamento e ampliação do acesso a métodos diagnósticos mais eficazes, a erradicação da doença permanece um desafio distante (Fonseca *et al.*, 2022; Silva; Wanderley, 2022; Sousa *et al.*, 2021).

1.2 Aspectos Históricos, Biológicos e Moleculares do *Schistosoma mansoni*

O *Schistosoma mansoni* é um parasito pertencente ao filo dos platelmintos, classe Trematoda e família Schistosomatidae. Diferente de muitos outros trematódeos, apresenta sexos separados, com um nítido dimorfismo sexual. Sua presença no Brasil foi introduzida por meio do tráfico de escravizados africanos, que trouxeram consigo o parasito, o qual encontrou nos caramujos do gênero *Biomphalaria* hospedeiros intermediários ideais para completar seu ciclo (Neves, 2005).

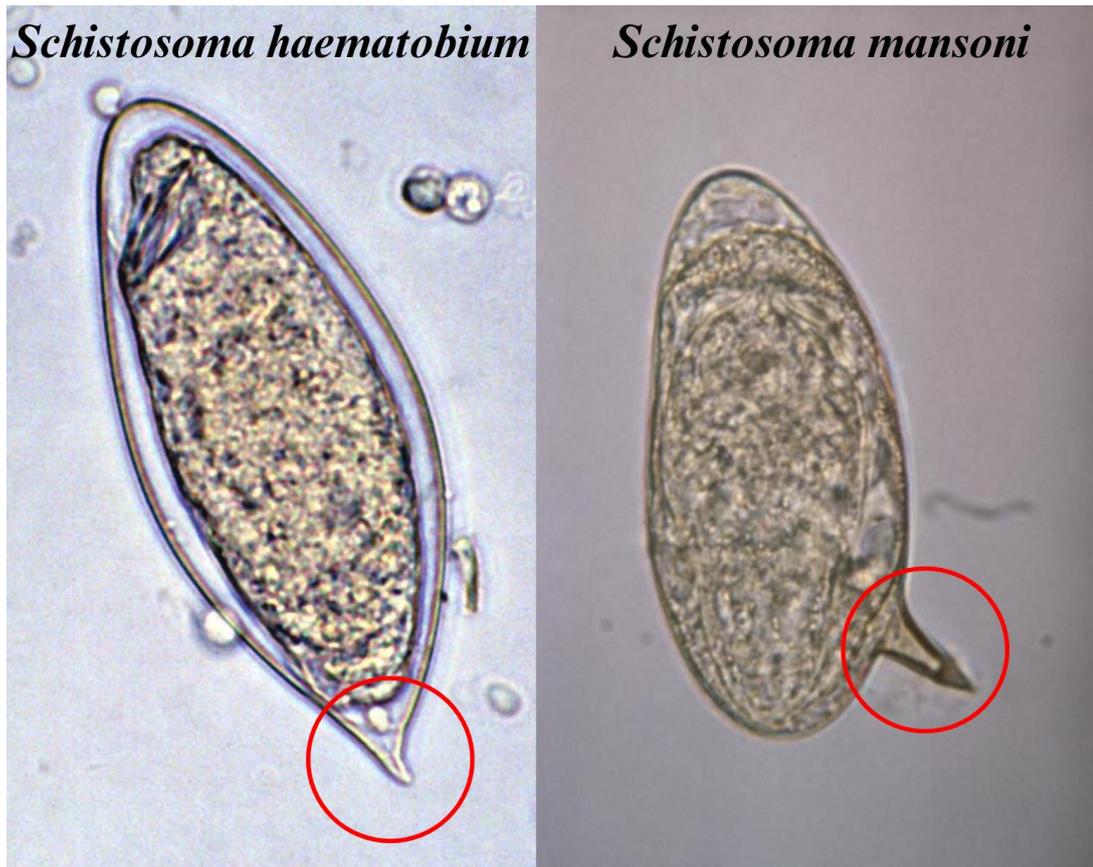
Figura 2 – Representação da expansão da esquistossomose no Brasil.



Fonte: Adaptado por Heloisa M.N. Diniz. Brasil, 2024.

O conhecimento sobre o *S. mansoni* remonta ao século XIX, quando Theodor Bilharz descreveu a espécie *Schistosoma haematobium* ao encontrar vermes no sistema vascular de um paciente durante uma necropsia. No início do século XX, o pesquisador brasileiro Pirajá da Silva foi responsável por identificar e caracterizar o *S. mansoni* no Brasil, diferenciando-o de outras espécies pelo formato dos ovos, que possuem um espinho lateral, ao contrário do espinho terminal do *S. haematobium* (Figura 3) (Machado-Silva; Neves; Gomes, 2011).

Figura 3 – Comparação entre ovos de *Schistosoma*, onde é possível identificar o *S. mansoni* pela presença do espinho lateral.



Fonte: Adaptado de CDC (2006) e Upton.

A história do *S. mansoni* não está restrita apenas às suas descobertas modernas. Evidências arqueológicas indicam que a esquistossomose já afeta populações humanas há mais de 6.000 anos. Estudos em múmias egípcias revelaram a presença de ovos de esquistossomo preservados e referências a sintomas compatíveis com a doença aparecem em antigos papiros médicos egípcios (Di Bella *et al.*, 2018).

Os vermes adultos de *S. mansoni* vivem principalmente nas veias mesentéricas do hospedeiro definitivo, onde se acasalam e produzem ovos. O macho mede cerca de 1 cm e possui um corpo achatado com bordas ventrais curvadas, formando o canal ginecóforo, estrutura onde a fêmea se aloja (Figura 4). Já a fêmea, é mais longa e delgada, com aproximadamente 1,5 cm de comprimento, e apresenta um tubo digestivo escurecido devido à ingestão de sangue (Brasil, 2024).

Figura 4 – Casal de *Schistosoma mansoni*, mostrando a fêmea alojada no canal ginecóforo do macho.



Fonte: Folha de São Paulo, 2018.

Após a cópula, as fêmeas adultas depositam ovos nos vasos sanguíneos mesentéricos do hospedeiro. Esses ovos possuem enzimas líticas que facilitam sua translocação através da parede vascular até chegarem à luz intestinal, onde podem ser eliminados junto às fezes. No ambiente aquático, ocorre a eclosão dos ovos, liberando larvas ciliadas denominadas miracídeos (Figura 5). Essas larvas apresentam motilidade ativa e um tempo de vida limitado, necessitando encontrar rapidamente um caramujo do gênero *Biomphalaria* para dar continuidade ao ciclo (Neves, 2005).

Figura 5 – Miracídio de *Schistosoma mansoni* nadando em água fresca.



Fonte: R. E. Howells.

Os caramujos do gênero *Biomphalaria* são hospedeiros intermediários essenciais para o ciclo de vida do *S. mansoni*. No Brasil, as espécies *Biomphalaria glabrata* (Figura 6), *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila* são os principais vetores da esquistossomose (Nogueira *et al.*, 2024). Além disso, estudos recentes apontam que a prevalência da infecção por *S. mansoni* em *B. glabrata* pode variar entre 0,4% e 6,2%, dependendo do método de análise utilizado (Zanardi *et al.*, 2019).

Figura 6 – Caramujo *Biomphalaria*.



Fonte: Portal Fiocruz, 2017.

A infecção do hospedeiro intermediário ocorre quando o miracídio penetra ativamente no tecido do caramujo, onde o parasita sofre uma série de modificações morfológicas e fisiológicas. Inicialmente, ele se diferencia em esporocisto primário, que se multiplica assexuadamente, originando esporocistos secundários. Estes últimos são responsáveis por gerar cercárias, a forma larval que será liberada no ambiente para infectar o hospedeiro definitivo. Durante esse estágio, há uma intensa replicação do parasita dentro do caramujo, permitindo que um único miracídio dê origem a milhares de cercárias viáveis (Brasil, 2024).

As cercárias (Figura 7) emergem ativamente do caramujo, sendo liberadas em maior quantidade durante o período de maior incidência de luz solar, entre 11h e 15h. Essas larvas possuem um corpo alongado e uma cauda bifurcada que os confere mobilidade na água, permitindo que nadem em busca de um hospedeiro definitivo. Ao entrarem em contato com a pele humana, as cercárias liberam enzimas proteolíticas que facilitam sua penetração nos tecidos epidérmicos, acessando rapidamente a circulação sanguínea (Neves, 2005).

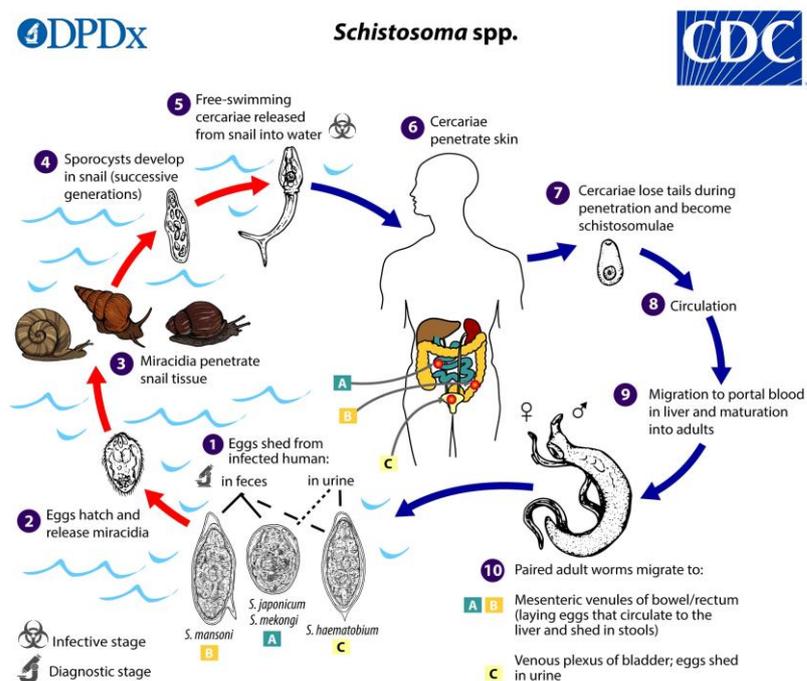
Figura 7 – Cercária de *Schistosoma*.



Fonte: ICB-USP.

Uma vez no sistema circulatório do hospedeiro definitivo, as cercárias perdem a cauda e se transformam em esquistossômulos, uma forma juvenil adaptada à migração pelo organismo. Esses esquistossômulos utilizam a corrente sanguínea para alcançar os capilares pulmonares e, posteriormente, o fígado, onde encontram um ambiente propício para maturação. Durante esse período de aproximadamente quatro a seis semanas, o parasita sofre mudanças estruturais significativas até atingir a fase adulta. Com o desenvolvimento completo, os vermes migram para as veias mesentéricas, onde ocorre a cópula e o ciclo se reinicia (Brasil, 2024).

Figura 8 – Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*.



Fonte: CDC, 2024.

Além do seu ciclo de vida complexo (Figura 8), o *S. mansoni* também apresenta um genoma peculiar. O sequenciamento do seu ácido desoxirribonucleico (DNA) revelou que ele possui cerca de 363 megabases e codifica pelo menos 11.809 genes (Berriman, 2009). Após sucessivas atualizações na montagem do genoma, atualmente seu tamanho corresponde a 391Mb e 10960 genes anotados (WormBase Parasite, 2025)

Um dos processos mais importantes no controle da expressão gênica no *S. mansoni* é o splicing alternativo. Esse mecanismo permite que um único gene produza múltiplas variantes de ácido ribonucleico (RNA) mensageiro (mRNA), gerando proteínas distintas a partir de um mesmo gene. Esse fenômeno ocorre porque os transcritos primários podem sofrer diferentes combinações de corte e emenda de éxons, aumentando a diversidade proteica sem a necessidade de novos genes (Fardilha *et al.*, 2008)

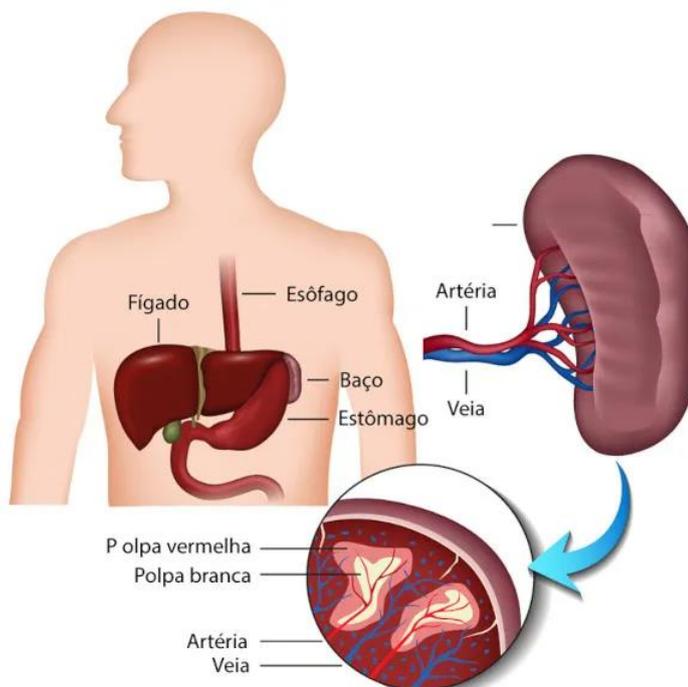
O transcriptoma de *S. mansoni* revela a regulação coordenada de vias metabólicas, sinalização celular e mecanismos epigenéticos essenciais para sua adaptação ao hospedeiro. A expressão diferencial de genes ao longo do ciclo de vida indica estratégias do parasito para modular a resposta imune e estabelecer infecções crônicas (Verjovski-Almeida *et al.*, 2003). Além disso, alterações na metilação do DNA e na modificação de histonas sugerem um controle refinado da expressão gênica, destacando possíveis alvos terapêuticos para o controle da esquistossomose (Verjovski-Almeida *et al.*, 2003).

1.3 Baço: Organização Estrutural, Função Imune e Alterações Durante Infecções Parasitárias

O baço é um órgão linfoide secundário localizado na cavidade abdominal (Figura 9), próximo ao estômago, e desempenha papel essencial na homeostase imunológica e hematológica. Sua estrutura é composta por dois compartimentos funcionais distintos: a polpa branca e a polpa vermelha, que possuem organização histológica e funções diferenciadas (Cesta, 2006). A polpa branca é o principal local de resposta imunológica do órgão, onde linfócitos B e T interagem com células apresentadoras de antígenos, iniciando a ativação da imunidade adaptativa. A polpa vermelha está envolvida na filtração do sangue, remoção de

eritrócitos envelhecidos e reciclagem de ferro, processos essenciais para a homeostase sistêmica (Mebius; Kraal, 2005).

Figura 9 – Esquema ilustrativo da anatomia do baço.

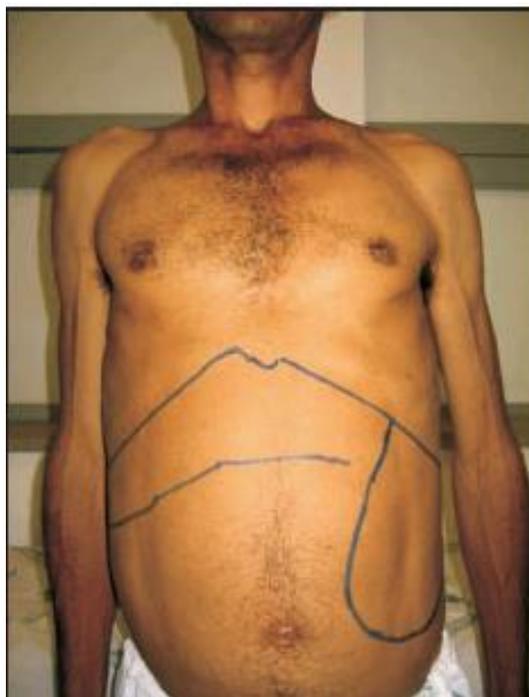


Fonte: Flores.

A circulação esplênica desempenha um papel fundamental para sua função imunológica e hematológica. O sangue entra no órgão através da artéria esplênica, que se ramifica em arteríolas centrais envoltas por bainhas linfoides periarteriolas. Essas estruturas contêm linfócitos T que interagem com células dendríticas e macrófagos, promovendo a captura de antígenos e sua apresentação para a ativação do sistema imune (Lewis; Williams; Eisenbarth, 2019). Entre a polpa branca e a polpa vermelha, encontra-se a zona marginal, uma região especializada no reconhecimento de patógenos, rica em macrófagos e linfócitos B da zona marginal. Essas células desempenham um papel essencial na resposta imune rápida contra microrganismos encapsulados (Mebius; Kraal, 2005).

A resposta do baço a infecções parasitárias é particularmente relevante no contexto da esquistossomose. Durante a infecção, ocorre um remodelamento tissular significativo no baço, caracterizado por esplenomegalia (Figura 10), hiperplasia linfóide e alterações na composição celular do órgão (Riva *et al.*, 2019). Essas mudanças refletem a intensa resposta inflamatória induzida pelos ovos do parasita, que ativam células do sistema imune inato e adaptativo.

Figura 10 – Paciente com esplenomegalia induzida por esquistossomose.



Fonte: Lambertucci, 2009.

Os antígenos parasitários induzem um aumento na ativação e proliferação de linfócitos T e B, levando ao acúmulo dessas células na polpa branca. Esse processo resulta na hiperplasia linfoide, uma característica marcante da resposta esplênica à infecção pelo *S. mansoni*. Essa resposta adaptativa exacerbada pode levar à fibrose esplênica, um processo patológico no qual a deposição excessiva de colágeno compromete a função do órgão, tornando-o mais rígido e menos eficiente na resposta imune (Riva *et al.*, 2019).

O estudo das alterações esplênicas na esquistossomose contribui para uma melhor compreensão da imunopatologia da doença e pode auxiliar na identificação de biomarcadores de progressão da infecção. Além disso, estratégias terapêuticas visando a modulação da resposta inflamatória no baço podem ser promissoras para mitigar os efeitos deletérios da infecção crônica (Lewis; Williams; Eisenbarth, 2019). A compreensão detalhada da fisiologia e das respostas imunes do baço é essencial não apenas para o entendimento da esquistossomose, mas também de outras doenças infecciosas e imunomediadas que afetam esse órgão.

1.4 Fisiopatologia da Esquistossomose

A infecção pelo esquistossomo ocorre através da penetração ativa das cercárias na pele humana durante o contato com água contaminada. Esse processo se inicia com a liberação das cercárias pelo hospedeiro intermediário, os caramujos do gênero *Biomphalaria*, e sua entrada na corrente sanguínea através da pele, a dermatite cercariana (Figura 11), desencadeando uma resposta inflamatória inicial caracterizada pela ativação de mastócitos e liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e TNF- α (Jauréguiberry *et al.*, 2005; LoVerde, 2019; Neves, 2005; Rey, 2009). Através da circulação sanguínea, os esquistossômulos migram para os pulmões antes de se estabelecerem no fígado.

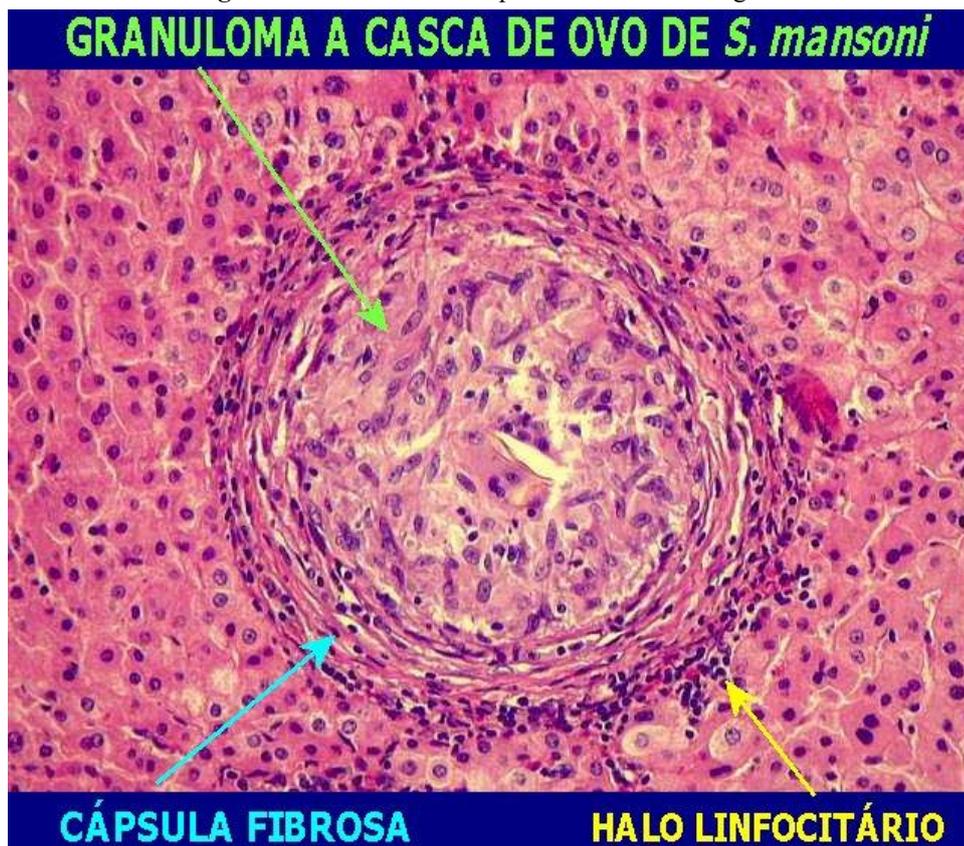
Figura 11 – Dermatite Cercariana.



Fonte: Lambertucci, 2009.

No fígado, os esquistossômulos amadurecem e migram para os vasos do sistema porta, onde os vermes adultos se estabelecem e iniciam a oviposição. Os ovos depositados nos sinusoides hepáticos secretam antígenos solúveis que induzem uma resposta imune celular mediada por linfócitos Th2, culminando na formação de granulomas (Figura12) (Lichtenberg, 1975; LoVerde, 2019; McManus *et al.*, 2018). Esse processo, inicialmente protetor ao isolar os ovos, leva à fibrose periportal, comprometendo o fluxo sanguíneo hepático e gerando hipertensão portal. Estudos indicam que a esquistossomose pode ser diferenciada de outras patologias hepáticas pelo uso da elastografia transitória, permitindo uma melhor classificação da fibrose e predizendo o risco de complicações, como hemorragias varicosas (Masi *et al.*, 2020; Pereira *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2022).

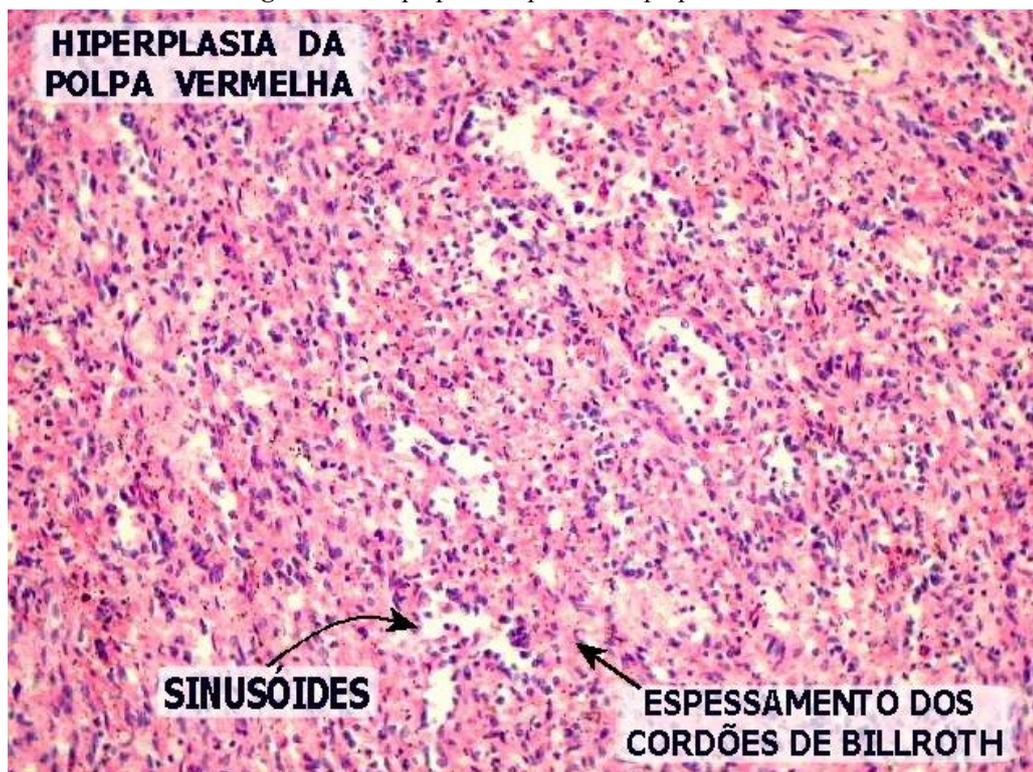
Figura 12 – Granulomas esquistossomóticos no fígado.



Fonte: Anatpat Unicamp.

O baço tem um papel fundamental na resposta imunológica contra a esquistossomose, sendo diretamente afetado pela hipertensão portal. A esplenomegalia progressiva é um dos achados mais frequentes na forma hepatoesplênica da doença, acompanhada por hiperplasia dos folículos linfoides e congestão venosa (LoVerde, 2019; McManus *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2022). Estudos recentes sugerem que a elastografia esplênica pode ser uma ferramenta promissora para avaliação da gravidade da doença, correlacionando-se significativamente com o padrão de fibrose periportal e hipertensão portal, mais do que a elastografia hepática (Pereira *et al.*, 2021). A disfunção esplênica ocorre devido à congestão prolongada e hiperplasia celular (Figura 13), resultando em hiperesplenismo, trombocitopenia e anemia. A resposta imunológica também é impactada, uma vez que o baço atua na filtração de patógenos e células anômalas (Colley; Secor, 2014). Em casos avançados, pode haver comprometimento da função fagocitária esplênica, predispondo a infecções secundárias e aumentando o risco de septicemia.

Figura 13 – Hiperplasia esplênica da polpa vermelha.

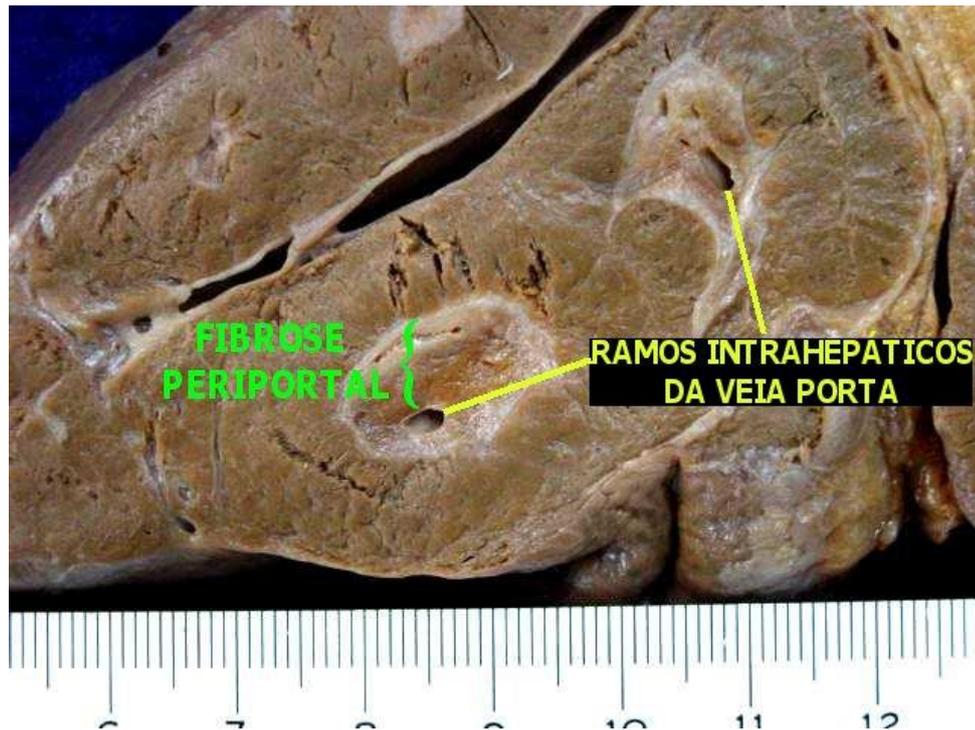


Fonte: Anatpat, Unicamp.

A fase aguda da esquistossomose é caracterizada pela síndrome de Katayama, uma reação de hipersensibilidade aos antígenos liberados pelos ovos. Os sintomas incluem febre alta, calafrios, cefaleia, dor abdominal, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia. A eosinofilia intensa é um achado laboratorial marcante, refletindo a ativação da resposta imune (Colley; Secor, 2014; Jauréguiberry *et al.*, 2005; LoVerde, 2019; McManus *et al.*, 2018). Esse estágio ocorre geralmente entre a 2^a a 8^a semana após a infecção e pode ser confundido com outras doenças febris.

Na fase crônica, a esquistossomose pode evoluir para a síndrome de Symmers, caracterizada pela fibrose hepatoesplênica avançada, hipertensão portal e o desenvolvimento de circulação colateral. A congestão prolongada do baço leva ao agravamento do hiperesplenismo, contribuindo para a pancitopenia. A fibrose periportal (Figura 14) progressiva restringe ainda mais o fluxo sanguíneo hepático, aumentando a pressão nas veias esplênica e porta, favorecendo o surgimento de varizes esofágicas e risco de hemorragia digestiva (Neves, 2005; Osakunor; Woolhouse; Mutapi, 2018).

Figura 14 – Esquistossomose hepática.



Fonte: Anatpat, Unicamp.

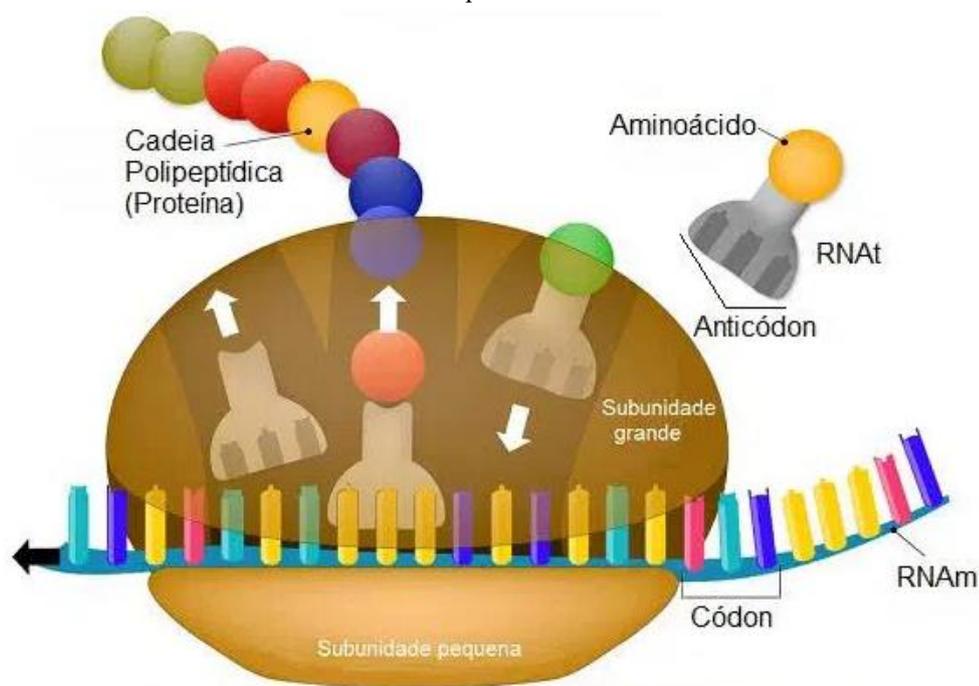
1.5 Mecanismos de Atuação dos Diferentes Tipos de RNA

Os RNAs desempenham um papel central na regulação da expressão gênica e nos processos celulares. O RNA mensageiro (mRNA) atua como intermediário direto entre o DNA e a síntese proteica, conduzindo a informação genética necessária para a produção de proteínas. Já os RNAs ribossômico (rRNA) e transportador (tRNA) participam ativamente da tradução, sendo responsáveis, respectivamente, pela formação da estrutura funcional do ribossomo e pela entrega dos aminoácidos correspondentes aos códons do mRNA (López-Jiménez; Andrés-León, 2021; Wright; Bruford, 2011).

O mRNA é transcrito a partir do DNA pela RNA-polimerase II e sofre modificações pós-transcricionais essenciais, como a adição de um cap 5', poliadenilação na extremidade 3' e splicing, que remove os introns (Dai; Zhang; Zaleta-Rivera, 2020; Dunham et al., 2012). Durante a tradução, os ribossomos leem a sequência do mRNA e recrutam tRNAs, que, por meio de seus anticódons, reconhecem os códons correspondentes e carregam os aminoácidos para a formação da cadeia polipeptídica.

O rRNA constitui a parte estrutural e catalítica do ribossomo, sendo essencial para a interação entre mRNA e tRNAs e para a formação das ligações peptídicas entre aminoácidos (Dai; Zhang; Zaleta-Rivera, 2020; Higgs; Lehman, 2015). Já o tRNA atua como uma molécula adaptadora, garantindo o pareamento correto entre a informação codificada no mRNA e a sequência de aminoácidos da proteína.

Figura 15 – Representação esquemática da associação entre o ribossomo, o RNAt e o RNAm para a formação da proteína.



Fonte: Batista.

Os RNAs não codificantes (ncRNAs) são transcritos a partir do genoma, mas não são traduzidos em proteínas. Eles compreendem diversas classes, como os microRNAs (miRNAs), RNAs longos não codificantes (lncRNAs), piwi-interacting RNAs (piRNAs) e RNAs circulares (circRNAs), cada qual com funções regulatórias específicas (López-Jiménez; Andrés-León, 2021; Wright; Bruford, 2011). Os miRNAs, por exemplo, são pequenas moléculas de aproximadamente 22 nucleotídeos que regulam a expressão gênica ao se ligarem a sequências complementares em mRNAs-alvo, promovendo sua degradação ou inibindo a tradução. Esses RNAs participam de processos celulares fundamentais, como diferenciação, proliferação e apoptose (Dai; Zhang; Zaleta-Rivera, 2020).

Já os lncRNAs, com mais de 200 nucleotídeos, atuam em múltiplos níveis da regulação gênica. No núcleo, podem modular a estrutura da cromatina e influenciar a transcrição gênica,

enquanto no citoplasma atuam na estabilidade do mRNA e na regulação pós-transcricional (Dunham et al., 2012; López-Jiménez; Andrés-León, 2021).

Avanços nas pesquisas sobre ncRNAs têm destacado seu potencial como biomarcadores moleculares e alvos terapêuticos. Os miRNAs, por exemplo, vêm sendo utilizados no diagnóstico e prognóstico de diversos tipos de câncer e doenças cardiovasculares (López-Jiménez; Andrés-León, 2021). Além disso, novas abordagens terapêuticas baseadas em RNA, como a edição gênica via CRISPR-RNA (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) e terapias antisense, têm sido exploradas como estratégias promissoras para modular a expressão gênica de forma precisa (Dai; Zhang; Zaleta-Rivera, 2020).

A diversidade funcional dos diferentes tipos de RNA — desde aqueles envolvidos diretamente na síntese proteica até os que atuam na regulação epigenética — reforça sua importância nos mecanismos celulares. A compreensão aprofundada desses processos tem ampliado as perspectivas para o desenvolvimento de novas abordagens diagnósticas e terapêuticas para doenças complexas.

1.6 lncRNAs como Moduladores da Expressão Gênica em Doenças Parasitárias

Os lncRNAs exibem padrões evolutivos distintos caracterizados por rápida diversificação e baixa conservação de sequência entre espécies (NECSULEA et al., 2014), refletindo sua adaptação a diferentes pressões seletivas e nichos ecológicos. A origem desses lncRNAs está frequentemente associada a elementos transponíveis (TEs), que contribuem significativamente para sua biogênese ao fornecer elementos regulatórios essenciais como promotores e sítios de splicing (KAPUSTA et al., 2013).

Em *Plasmodium falciparum*, os lncRNAs demonstram particular importância na regulação de genes de virulência, como os da família var, que são cruciais para os mecanismos de evasão do sistema imunológico do hospedeiro (GÓMEZ-DÍAZ et al., 2017). Essa regulação ocorre através de mecanismos complexos que envolvem modificações na estrutura da cromatina e interações com outras moléculas regulatórias. A plasticidade desses elementos permite que os parasitos adaptem rapidamente sua expressão gênica em resposta a diferentes pressões ambientais e desafios imunológicos (GÓMEZ-DÍAZ et al., 2017).

Apesar da baixa conservação de sequência primária, muitos lncRNAs parasitários mantêm suas funções através de estruturas secundárias conservadas ou por meio de domínios funcionais específicos. Essa característica é particularmente evidente em tripanossomatídeos, onde lncRNAs estão envolvidos na regulação de proteínas de superfície essenciais para o processo infeccioso. A compreensão desses mecanismos regulatórios tem implicações importantes para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, já que a interferência na função desses lncRNAs pode comprometer processos vitais para a sobrevivência e virulência dos parasitos (KAPUSTA et al., 2013; GÓMEZ-DÍAZ et al., 2017).

A dinâmica evolutiva dos lncRNAs em parasitos, caracterizada por alta taxa de turnover e rápida diversificação, sugere que esses elementos atuam como plataformas para inovação regulatória (NECSULEA et al., 2014). Essa capacidade de rápida adaptação é particularmente vantajosa em contextos de co-evolução com os hospedeiros, permitindo que os parasitos desenvolvam novas estratégias de infecção e evasão imunológica. Estudos recentes têm demonstrado o potencial dessas moléculas como alvos terapêuticos e biomarcadores de infecção, abrindo novas perspectivas para o controle de doenças parasitárias (GÓMEZ-DÍAZ et al., 2017).

NECSULEA, Anamaria et al. The evolution of lncRNA repertoires and expression patterns in tetrapods. *Nature*, v. 505, n. 7485, p. 635-640, 2014.

GÓMEZ-DÍAZ, Elena et al. Epigenetic regulation of *Plasmodium falciparum* clonally variant gene expression during development in *Anopheles gambiae*. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 40655, 2017.

1.7 O Papel da Bioinformática na Análise Genômica e Molecular

A bioinformática tornou-se um campo essencial na biologia molecular, proporcionando ferramentas computacionais para análise de sequências de DNA, RNA e proteínas. Com o advento das tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS), a necessidade de métodos eficientes para armazenar, processar e interpretar grandes volumes de dados genômicos tornou-se evidente (Akalin, 2006).

A análise de sequências biológicas por meio de métodos matemáticos e computacionais tem se mostrado indispensável para a biologia molecular. Entre seus principais objetivos estão

a predição de estruturas proteicas, a identificação de genes em sequências genômicas e a análise funcional de elementos reguladores (Akalin, 2006). Os lncRNAs desempenham papéis cruciais na regulação gênica, sendo assim, diferentes ferramentas são usadas para identificar e caracterizar essas moléculas, como Tophat para mapeamento de sequências, Cufflinks para anotação e CPC (do inglês Coding Potential Calculator) para avaliação do potencial codificante (Iwakiri; Hamada; Asai, 2016).

Ferramentas computacionais têm permitido avanços significativos na detecção de biomarcadores em doenças, na predição de interações proteicas e na reconstrução de redes metabólicas. No estudo de doenças genéticas, ferramentas como sequenciamento de RNA (RNA-seq) ajudam a identificar alterações na expressão de genes associados às patologias (Iwakiri; Hamada; Asai, 2016). A bioinformática revoluciona a pesquisa em biologia molecular ao permitir a análise de grandes volumes de dados genômicos e transcriptômicos. A constante evolução de ferramentas bioinformáticas é essencial para avançar na compreensão dos mecanismos biológicos e na aplicação desses conhecimentos na saúde e na biotecnologia.

1.8 Biomarcadores Moleculares e o Potencial Diagnóstico dos lncRNAs na Esquistossomose

Os biomarcadores são elementos fundamentais na biomedicina, pois permitem a identificação de alterações fisiológicas e patológicas, sendo amplamente utilizados no diagnóstico, prognóstico e monitoramento de doenças. Nos últimos anos, avanços na genômica e transcriptômica revelaram que moléculas de RNA não codificante, como os lncRNAs, podem desempenhar papéis importantes como biomarcadores em diversas condições patológicas, incluindo câncer e doenças infecciosas (Xie *et al.*, 2018). A infecção por *S. mansoni* continua a ser um problema de saúde global, especialmente em regiões tropicais e subtropicais. A necessidade de biomarcadores eficazes para o diagnóstico precoce e monitoramento da doença motiva a investigação do papel dos lncRNAs neste contexto.

Os biomarcadores podem ser classificados em diferentes categorias de acordo com sua função, incluindo biomarcadores diagnósticos, utilizados para detectar uma doença ou condição específica, biomarcadores prognósticos, que fornecem informação sobre o curso esperado da doença, biomarcadores de resposta terapêutica, que auxiliam na previsão da eficácia de um

tratamento, e biomarcadores de suscetibilidade, que indicam predisposição a determinada doença. A elucidação de biomarcadores moleculares vem transformando a medicina personalizada, tornando os diagnósticos mais precisos e permitindo o desenvolvimento de terapias direcionadas (Aronson, 2005).

Estudos demonstram que lncRNAs circulantes podem ser detectados no plasma e em fluidos biológicos, abrindo caminho para seu uso como biomarcadores minimamente invasivos. A capacidade desses RNAs de refletir alterações fisiológicas e patológicas sem a necessidade de procedimentos invasivos os torna candidatos ideais para aplicações clínicas. Além disso, sua estabilidade em fluidos corporais e a possibilidade de detecção por técnicas sensíveis, como PCR em tempo real e sequenciamento de nova geração, reforçam seu potencial diagnóstico e prognóstico em diversas condições patológicas (Xie *et al.*, 2018).

A infecção por *S. mansoni* induz alterações na expressão de pequenos RNAs não codificantes, como os microRNAs (Zhong; Jin, 2022). No entanto, estudos sugerem que os lncRNAs também podem estar envolvidos na resposta imunológica e na progressão da infecção. Pesquisas recentes também destacam o potencial do DNA livre circulante (cfDNA) como biomarcador para esquistossomose (Zhang *et al.*, 2024). Esse conceito pode ser estendido para estudos sobre lncRNAs circulantes como potenciais biomarcadores diagnósticos minimamente invasivos para *S. mansoni*.

Os biomarcadores desempenham papel essencial na detecção e monitoramento de doenças, e os lncRNAs emergem como uma ferramenta promissora para a esquistossomose. O avanço no entendimento do papel desses RNAs pode levar a estratégias diagnósticas mais eficazes e acessíveis, beneficiando regiões endêmicas com alta carga da doença.

2 JUSTIFICATIVA

O baço desempenha um papel fundamental na resposta imunológica e é significativamente afetado pela infecção por *Schistosoma mansoni*, apresentando inflamação, esplenomegalia e fibrose. Essas alterações comprometem sua função imunológica e aumentam a suscetibilidade a infecções secundárias.

A compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na resposta do baço à infecção ainda é limitada, especialmente no que se refere à regulação epigenética. Os lncRNAs emergem como reguladores importantes de processos biológicos, incluindo a resposta imune e a interação parasito-hospedeiro. No entanto, muitos lncRNAs ainda não foram completamente caracterizados, e seu papel na regulação do desenvolvimento de *S. mansoni* e na resposta ao tratamento antiparasitário permanece pouco compreendido.

A reanotação e análise da expressão desses elementos no contexto da infecção podem fornecer insights sobre sua função na biologia do parasito e na resposta do hospedeiro, além de contribuir para a identificação de novos alvos terapêuticos e diagnósticos.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral:

Reanotar e caracterizar o perfil de expressão de um conjunto de lncRNAs em *S. mansoni*, visando ampliar o conhecimento sobre seu papel na biologia do parasito e seu potencial como biomarcadores para diagnóstico e desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra a esquistossomose.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Reanotar lncRNAs previamente identificados em *S. mansoni*, utilizando ferramentas bioinformáticas para aprimorar a curadoria e organização desses elementos genômicos.
- b) Analisar o perfil de expressão diferencial dos lncRNAs em cercárias e vermes adultos.
- c) Investigar a presença e expressão de lncRNAs no baço de camundongos infectados e não infectados com a cepa LE do *S. mansoni*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reanotação dos candidatos a lncRNAs

Os lncRNAs utilizados neste estudo foram desenhados por Vítor Fernandes de Oliveira, um antigo estudante do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UFOP (LBBM) (Oliveira *et al.*, 2018). Como os bancos de dados são constantemente atualizados, foi realizada uma reanotação dessas sequências para verificar se são atualmente reconhecidas como codificadoras de proteínas ou se ainda são classificadas como lncRNAs. Para isso, utilizamos quatro ferramentas e bancos de dados: Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), ORFFinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>), RNACentral (<https://rnacentral.org/>) e WormBase Parasite (<https://parasite.wormbase.org/Tools/Blast?db=core>).

O BLAST, ferramenta disponibilizada pelo National Center for Biotechnology Information (NCBI), foi utilizado para buscar homologia entre os transcritos e sequências já caracterizadas, permitindo identificar similaridades com genes previamente anotados. Para isso, realizamos uma busca utilizando o BLASTN, que compara sequências nucleotídicas em bancos de dados de nucleotídeos. O ORFFinder, também disponibilizado pelo NCBI, foi empregado para a identificação de *Open Reading Frames* (ORFs), que são regiões codificantes dentro dos transcritos. Consideramos apenas ORFs com 60 ou mais nucleotídeos, um critério menos rígido do que o padrão de 100 nucleotídeos encontrado na literatura, pois ajustamos esse valor com base nas características do *S. mansoni*, que codifica pequenas proteínas.

No RNACentral, analisamos a presença dos transcritos em diversas espécies, fator relevante para inferir conservação evolutiva e potencial função biológica. Por fim, no WormBase Parasite, verificamos se esses transcritos estão presentes em espécies ou gêneros próximos ao *S. mansoni*, auxiliando na análise comparativa da conservação gênica. Considerando as recentes atualizações do genoma, essa abordagem combinada possibilitou uma reanotação mais precisa dos lncRNAs, aprimorando sua classificação nos bancos de dados.

4.2 Obtenção dos animais infectados

Em um estudo prévio conduzido pelo LBBM, camundongos machos da linhagem BALB/c foram infectados com 100 cercárias da cepa L.E. do parasita *S. mansoni*. Ao todo, foram utilizados 48 animais, sendo 12 controles e 36 infectados. Os animais infectados foram distribuídos em três grupos de 12: um grupo com 50 dias de infecção, que foi o utilizado no presente trabalho, e outros dois grupos mantidos até 70 e 140 dias de infecção. Após os respectivos períodos, os animais foram eutanasiados e as amostras resultantes devidamente armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para uso futuro (Rocha, 2021). Todos os procedimentos seguiram os protocolos e diretrizes estabelecidos para cuidados e tratamento ético de animais de laboratório. A pesquisa foi conduzida com ciência e autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais, em conformidade com o protocolo 2017/35, sob a supervisão do Prof. Dr. William Castro Borges.

4.3 Extração do RNA total

O RNA foi extraído das amostras de baço utilizando o kit SV total RNA Isolation System - Promega™. Cerca de 30 mg de tecido foram pesadas e posteriormente homogeneizadas com 1 mL de Trizol Reagent (Invitrogen™), para favorecer a dissociação de complexos nucleoproteicos durante a homogeneização mecânica do tecido com auxílio de um homogeneizador tipo Politron (Homogeneizador Ultra 80), em um processo de 3 ciclos com velocidade máxima e intervalo de 30 s entre os ciclos e 1 min de incubação em gelo.

Posteriormente, foram adicionados 400 μL de clorofórmio (Merck, São Paulo, Brasil) aos eppendorfs com as amostras homogeneizadas, levando-os ao vórtex por 1 min e armazenando em temperatura ambiente por 25 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4°C por 15 min em rotação de 12.000 g resultando em um produto com 3 fases: inferior, contendo fenol e restos de tecido; intermediária, com clorofórmio, DNA e proteínas; e a superior, aquosa, onde encontramos o RNA. A fase superior foi transferida para um novo eppendorf, onde foi adicionado 600 μL de etanol 95%, com homogeneização *up and down* para precipitar o RNA.

A solução contendo RNA foi introduzida em uma coluna de extração e submetida a uma centrifugação a 12.000 g por 2 min. Após esse processo, o material residual do tubo coletor foi descartado. As colunas de extração possuem uma membrana que retém o RNA, exigindo uma etapa de lavagem para eliminar quaisquer resíduos remanescentes. Para realizar essa lavagem, foram adicionados 600 μL de RNA *wash solution* nas colunas, seguido de uma nova centrifugação por 2 min, mantendo a mesma velocidade de rotação. Posteriormente, o RNA foi purificado utilizando 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 deixadas em incubação por 20 min para permitir a ação das DNases. Em seguida, foram tratadas com 200 μL de DNase Stop Solution para inibir a ação dessas enzimas, seguido por uma nova centrifugação de 2 min a 12.000 g. Após a conclusão desses procedimentos, a coluna passou por mais duas lavagens, incluindo centrifugações, utilizando RNA *wash solution*.

Finalmente, o RNA ligado à coluna foi eluído em 100 μL de água estéril tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e coletado em um eppendorf após centrifugação por 3 min a 12.000 g. As amostras foram submetidas à quantificação no espectrofotômetro NanoDrop, onde foi medida sua concentração e a relação entre as absorbâncias a 260 nm e 280 nm, antes de serem armazenadas em um freezer a -80°C . A integridade do RNA foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,2% (Figura 16).

Figura 16 – Representação da extração de RNA por meio da visualização das subunidades ribossomais.



Subunidades ribossomais (28S e 18S) em gel de agarose, referentes às amostras de baço de animais do grupo infectado. Cada canaleta continha 2 μg de RNA marcados com brometo de etídio. Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

4.4 Síntese do cDNA

Para a síntese de DNA complementar (cDNA), utilizou-se o kit High Capacity RT-PCR System da Applied Biosystems, seguindo as instruções do fabricante. Foram combinados 10 μL de RNA concentrado 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ com 10 μL do Mix de reação. O Mix de reação incluiu 2 μL de tampão da reação, 2 μL de primers randômicos, 0,8 μL de Mix de desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTPs) 10 mM, 1,0 μL de Transcriptase reversa Multiscribe e 4,2 μL de água estéril tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) para cada 20 μL de reação.

Essa mistura foi transferida para tubos Eppendorf de 0,2 mL e colocada em um termociclador (ThermoHybaid Px2). A reação passou por uma incubação programada de 10 minutos a 25°C para anelamento dos primers randômicos, seguida por 120 min a 37°C para permitir a produção da fita cDNA. Após essa etapa, a enzima foi inativada a 85°C por 5 min. As amostras foram então armazenadas a 4°C até o momento de utilização.

4.5 Validação do primers

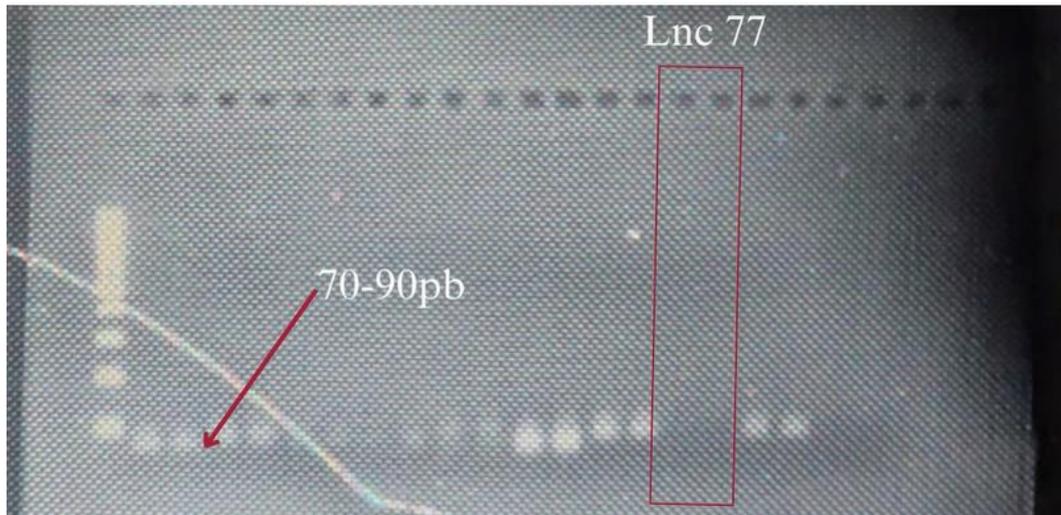
Os primers utilizados para este estudo (Tabela 1), que foram preditos em um banco de dados de RNAseq de Verme Adulto de *S. mansoni*, foram validados por reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional utilizando cDNA de verme adulto para confirmar se existe amplificação. Para a PCR convencional foi utilizado o kit Invitrogen seguindo as concentrações: 2 μ L cDNA diluído 10X, 5 μ L de PCR Buffer 10X, 2 μ L MgCl₂ 50 mM, 1 μ L de dNTP mix, 0,5 μ L de Taq Polimerase, 1 μ L de mix de Primer F + R a 10 μ M, e 38,5 μ L de H₂O DEPC. O tubo de reação foi então colocado em um termociclador, seguindo o seguinte programa: 95°C por 3 min, 35 ciclos de 95°C por 1 min, 60°C por 1 min e 72°C por 1 min, finalizando com 72°C por 5 min, seguido de armazenamento a 4°C. Depois foi realizada a eletroforese em gel de agarose 2,2% (Figura 17) para confirmar se os amplicons obtidos possuem o tamanho esperado, entre 70 e 90 pares de bases.

Tabela 1 – Sequência dos primers forward e reverse de cada gene analisado, e os respectivos tamanhos de seus amplicons.

lncRNA	Sequência	Tamanho do amplicon
Sm-lncRNA17	F: 5'-GTGTGTTGGTGTGTTTCG-3' R: 5'-CCTCGTCATCATAAAGCC-3'	98
Sm-lncRNA19	F: 5'-CCCAGCCTTTGTAAGTACAC-3' R: 5'-AGCGGCATTTGACAGTAC-3'	83
Sm-lncRNA20	F: 5'-GACATCTACCCTGAAACG-3' R: 5'-AGTCCAGCAAGGTTCTTC-3'	87
Sm-lncRNA63	F: 5'-AGCTTACAACGCCACGAGTG-3' R: 5'-TGTAACCTTGACGAACGCAC-3'	70
Sm-lncRNA64	F: 5'-CGTCCCAGTTCCTCTTCAG-3' R: 5'-AACATCCGCGACAGTTTGAC-3'	74
Sm-lncRNA65	F: 5'-CCCTCGTGGAGGAGCATAG-3' R: 5'-ACAGTGTGTAACGCCAGGAC-3'	70
Sm-lncRNA66	F: 5'-GACGACATTGGAGAAGGAC-3' R: 5'-CAGCAACTACGAACACGG-3'	135
Sm-lncRNA67	F: 5'-GCCCTAGCCAAATCATCTG-3' R: 5'-CTTGACCTTGATGAGGATCG-3'	71
Sm-lncRNA68	F: 5'-ACGTATTCTCCTGGAATGGC-3' R: 5'-CACTCGTCCCTTCTGCTTAG-3'	86
Sm-lncRNA69	F: 5'-CTTAGGGCAGTCATTCCATG-3' R: 5'-GCCAACGGCACACATATTAC-3'	71
Sm-lncRNA70	F: 5'-GAGCCAATCAGAAGCTTTCG-3' R: 5'-CGACCGTACGTAAGCATCAG-3'	74
Sm-lncRNA71	F: 5'-AGCAATACCCGGAGGATTC-3' R: 5'-GGCCGTTTGAATCGATACC-3'	87
Sm-lncRNA72	F: 5'-CGACCCTAATGCCCTAACTG-3' R: 5'-TTGCCTGTCTTCTTGAACCC-3'	84
Sm-lncRNA73	F: 5'-TAGCGGTTCGATAGCAGAAAC-3' R: 5'-CACCGATCAATACCACAAGG-3'	81
Sm-lncRNA74	F: 5'-ATCCCTCCTGAATATCCGTG-3' R: 5'-TGCTCTGCTTTCGTCCTTC-3'	95
Sm-lncRNA75	F: 5'-AGCTGACTACCGACTTTCCTCC-3' R: 5'-GATGGAGCCTCAACCACG-3'	75
Sm-lncRNA76	F: 5'-CAGGAAGATGCACCAGAATG-3' R: 5'-GAGACATGAAACGCAGCAAC-3'	89
Sm-lncRNA77	F: 5'-CACGAATTACTGCATACGGG-3' R: 5'-ACGAGAATCATCCGACGAAG-3'	116
Sm-lncRNA78	F: 5'-TCCCTCCAGAATATCGGAAG-3' R: 5'-CAGCCTCCTGCAGATACTCC-3'	90
Sm-eIF4E	F: 5'-TGTTCCAACCACGGTCTCG-3' R: 5'-TCGCCTTCCAATGCTTAGG-3'	89
MmuHPRT1	F: 5'-GCAGACTTTCCTTGATC-3' R: 5'-CAACACTTCGAGAGGTCC-3'	115

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Figura 17 – Gel de agarose 2,2% de produto de PCR convencional de cDNA de verme adulto para validação de primers.



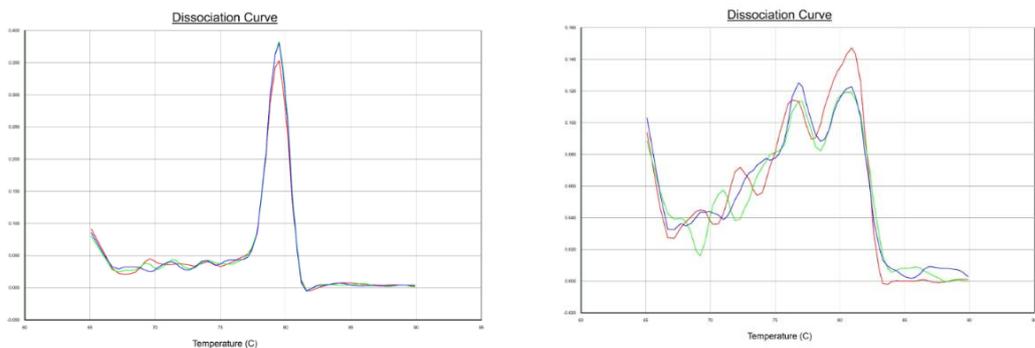
Não houve amplificação para o primer Sm-lncRNA 77, então este foi excluído dos experimentos.
Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

Em seguida foi realizada uma PCR de transcrição reversa quantitativa (qRT-PCR) para com o mesmo material para verificar a existência de dímeros e subprodutos através da análise das curvas de dissociação (Figura 18).

Figura 18 – Curvas de dissociação dos produtos de qPCR de cDNA de verme adulto.

LncRNA 76

LncRNA 70



Na figura da esquerda, uma amplificação sem subprodutos ou dímeros e, na figura da direita, uma curva com subprodutos e dímeros. Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

4.6 qRT-PCR

Inicialmente, empregou-se a técnica de PCR convencional, seguida de eletroforese em gel de agarose a 2%, com o objetivo de verificar se os amplicons apresentavam o tamanho esperado. Essa etapa confirmou a funcionalidade dos primers, conferindo confiabilidade para a continuação dos experimentos.

A amplificação dos genes Sm-lncRNA 17, Sm-lncRNA 19, Sm-lncRNA 20, Sm-lncRNA 63, Sm-lncRNA 64, Sm-lncRNA 65, Sm-lncRNA 66, Sm-lncRNA 67, Sm-lncRNA 68, Sm-lncRNA 69, Sm-lncRNA 73 e Sm-lncRNA 76 foi conduzida utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa por transcriptase reversa (qRT-PCR). Essas amplificações foram realizadas em placas de 96 poços (MicroAmp® Optical 96 Well Reaction Plate da Applied Biosystems), que foram seladas com um adesivo óptico (MicroAmp® Optical Adhesive Film, da Applied Biosystems) após a conclusão do procedimento.

Para cada reação de qRT-PCR, foram pipetados 3 µL de cDNA, 2 µL de um mix contendo os iniciadores forward e reverse [300 nM], 4,9 µL de um mix da reação e 0,1 µL de CXR. Para os experimentos foram utilizados os cDNAs das amostras de baço, verme adulto e cercária.

Para cada gene que foi analisado, todos os experimentos foram conduzidos em triplicata biológica, e o gene de referência utilizado foi o lncRNA167632. Dentro dessas triplicatas, foram consideradas aquelas em que a diferença entre elas foi igual ou inferior a 0,5 Ct. Caso alguma triplicata apresentasse uma diferença maior, a amplificação correspondente era repetida. Os resultados finais da quantificação do gene foram obtidos por meio da aplicação da fórmula $2^{-\Delta CT}$, em que $-\Delta CT = (CT \text{ gene de interesse} - CT \text{ controle interno})$. Essa abordagem forneceu dados quantitativos relativos para cada um dos genes em análise.

4.7 Identificação de possíveis alvos dos lncRNAs

O Genome Browser disponível no WormBase Parasite (https://parasite.wormbase.org/Schistosoma_mansoni_prjea36577) foi utilizado como base para a identificação de genes codificadores de proteínas que podem ser potenciais alvos para cada um desses lncRNAs. Como estratégia, realizou-se um BLAST (Ferramenta de Alinhamento Local Básico) nas sequências individuais dos lncRNAs contra a sequência genômica do *S. mansoni*. O resultado gerado permite a visualização da sequência por sua localização exata no genoma pelo Genome Browser. Por meio dessa visualização, também é possível identificar quais são os genes mais próximos à sequência do lncRNA no genoma.

Considerando a regulação em cis dos lncRNAs selecionou-se o gene codificador de proteína mais próximo, na fita sense ou antisense, como o alvo mais provável dos lncRNAs aqui analisados.

4.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 8. A significância estatística foi considerada com $p \leq 0,05$. Os resultados da amplificação foram organizados em uma planilha no aplicativo separando grupos controle x infectado e cada um dos lncRNAs. Após isso foi feito o teste de normalidade (Shapiro-Wilk) que evidenciou uma distribuição não normal com valor de $p \leq 0,0001$ (grupo controle) e $p = 0,0339$ (grupo infectado). Dessa maneira, para a análise estatística escolhemos um teste não paramétrico T de múltiplas comparações e distribuimos os valores entre grupo controle e grupo infectado. Após o resultado estatístico produzimos gráficos no formato boxplot para melhor visualização e comparação dos grupos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Reanotação dos lncRNAs preditos de *S.mansoni*

A reanotação dos lncRNAs com base nas ferramentas selecionadas revelou diferentes níveis de conservação e potencial codificador entre os transcritos analisados. No WormBase Parasite (Tabela 2), todos os transcritos apresentaram resultados positivos para espécies pertencentes ao gênero *Schistosoma*. A maioria demonstrou alinhamento perfeito, com E-values igual a 0,0 ou extremamente baixos (menores que 10^{-100}), especialmente para *S. mansoni* e *S. rodhaini*. Esses dados sugerem que alguns dos transcritos analisados apresentam alta conservação gênica dentro do gênero.

Tabela 2 – Dados de transcritos obtidos no WormBase Parasite.

	Worm Base Parasite		
	Nº de hits	Hit com melhor E value	E value
Sm-lncRNA17	105	<i>Schistosoma mansoni</i>	0,0
Sm-lncRNA19	301	<i>Schistosoma intercalatum</i>	$1,9 \times 10^{-51}$
Sm-lncRNA20	214	<i>Schistosoma mansoni</i>	0,0
Sm-lncRNA63	80	<i>Schistosoma curassoni</i>	$1,1 \times 10^{-33}$
Sm-lncRNA64	79	<i>Schistosoma mansoni</i>	$6,5 \times 10^{-93}$
Sm-lncRNA65	84	<i>Schistosoma mansoni</i>	$1,8 \times 10^{-34}$
Sm-lncRNA66	51	<i>Schistosoma bovis</i>	$9,1 \times 10^{-43}$
Sm-lncRNA67	59	<i>Schistosoma rodhaini</i>	$1,6 \times 10^{-14}$
Sm-lncRNA68	55	<i>Schistosoma rodhaini</i>	$8,9 \times 10^{-74}$
		<i>Trichinella sp.</i>	
Sm-lncRNA69	27	<i>Meloidogyne chitwoodi</i>	0,2
		<i>Trichinella nelsoni</i>	
		<i>Schistosoma japonicum</i>	
Sm-lncRNA70	241	<i>Schistosoma mansoni</i>	0,0
		<i>Schistosoma rodhaini</i>	
Sm-lncRNA71	268	<i>Schistosoma mansoni</i>	0,0
		<i>Schistosoma rodhaini</i>	
Sm-lncRNA72	50	<i>Schistosoma rodhaini</i>	$6,0 \times 10^{-25}$
Sm-lncRNA73	64	<i>Schistosoma haematobium</i>	$1,5 \times 10^{-21}$
		<i>Schistosoma bovis</i>	
Sm-lncRNA74	64	<i>Schistosoma rodhaini</i>	$1,2 \times 10^{-19}$
Sm-lncRNA75	62	<i>Schistosoma rodhaini</i>	0,0
Sm-lncRNA76	50	<i>Schistosoma rodhaini</i>	0,0
Sm-lncRNA77	101	<i>Schistosoma mansoni</i>	$6,6 \times 10^{-177}$
Sm-lncRNA78	57	<i>Schistosoma rodhaini</i>	$4,2 \times 10^{-122}$

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Na análise pelo RNAcentral (Tabela 3), foram obtidos diversos hits em espécies variadas. No entanto, nenhum desses alinhamentos atingiu E-values menores que 10^{-100} , o que pode indicar que os transcritos possuem baixa conservação entre diferentes organismos e, portanto, maior probabilidade de serem espécie específicos.

Tabela 3 – Dados de transcritos obtidos no RNAcentral.

RNAcentral			
	Nº de hits	Hit com maior alinhamento	E value
Sm-lncRNA 17	4385	<i>Xyrichtys novacula</i> (pearly razorfish) non-coding RNA	$1,2 \times 10^{-1}$
Sm-lncRNA 19	45	<i>Elaeis guineensis</i> (African oil palm) long non-coding RNA (EGUI_LNC077405)	$2,4 \times 10^1$
Sm-lncRNA 20	102	<i>Eucalyptus grandis</i> (E. grandis) long non-coding RNA (EGRA_LNC003664)	$1,1 \times 10^2$
Sm-lncRNA 63	469	<i>Sinocyclocheilus grahami</i> (golden-line barbel) lncRNA (ENSSGRG00000038463.1)	$2,5 \times 10^1$
Sm-lncRNA 64	826	<i>Vararia minispora</i> EC-137 tRNA-Ser	$4,9 \times 10^1$
Sm-lncRNA 65	7001	<i>Xyrichtys novacula</i> (pearly razorfish) non-coding RNA	$1,8 \times 10^{-1}$
Sm-lncRNA 66	3889	<i>Limnephilus lunatus</i> (Caddisflies) misc RNA ENSLLSG00015000659.1	$7,2 \times 10^{-13}$
Sm-lncRNA 67	724	<i>Homo sapiens</i> (human) ncRNA	$1,2 \times 10^1$
Sm-lncRNA 68	798	<i>Talaromyces marneffei</i> PM1 putative non-coding RNA	8,9
Sm-lncRNA 69	634	<i>Homo sapiens</i> (human) non-protein coding lnc-MORF4L1-3:1	4,6
Sm-lncRNA 70	186	<i>Schistosoma curassoni</i> Eukaryotic small subunit ribosomal RNA	$7,9 \times 10^{-4}$
Sm-lncRNA 71	160	<i>Triticum aestivum</i> (bread wheat) long non-coding RNA (TAES_LNC018296)	7,3
Sm-lncRNA 72	2174	<i>Phoenix dactylifera</i> (date palm) long non-coding RNA (PDAC_LNC005080)	7,9
Sm-lncRNA 73	216	<i>Schistosoma haematobium</i> Eukaryotic small subunit ribosomal RNA	$1,2 \times 10^{-5}$
Sm-lncRNA 74	2590	<i>Gallus gallus</i> (chicken) lncRNA (ENSGALG00010002236.1)	$3,4 \times 10^1$
Sm-lncRNA 75	745	<i>Schistosoma rodhaini</i> Eukaryotic small subunit ribosomal RNA	$2,3 \times 10^{-1}$
Sm-lncRNA 76	2865	<i>Erythrura gouldiae</i> (Gouldian finch) lncRNA (ENSEGOG00005018438.1)	2,0
Sm-lncRNA 77	1188	<i>Dreissena polymorpha</i> (Zebra mussle) uncharacterized LOC127843720	6,9
Sm-lncRNA 78	1009	<i>Brassica napus</i> (rape) long non-coding RNA (BNAP_LNC008273)	$3,4 \times 10^1$

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

A ferramenta ORFFinder identificou alguns ORFs nos transcritos avaliados (Tabela 4). No entanto, nenhum desses ORFs apresentou E-value inferior a 10^{-100} , critério adotado neste estudo para considerar uma região como potencialmente codificadora de proteínas. Esses resultados reforçam o caráter não codificante da maioria dos transcritos analisados.

Tabela 4 – Dados de transcritos obtidos no ORF Finder (NCBI).

	Quantidade de ORFs com tamanho maior ou igual a 60 nucleotídeos	ORF		
		Tamanho da ORF	Matches no BLAST	Melhor E value das BLASTs
Sm-lncRNA 17	0	-	-	-
Sm-lncRNA 19	3	89	6	1,1
		72	3	2,4
Sm-lncRNA 20	1	77	6	4,2x10 ⁻¹
Sm-lncRNA 63	1	63	9	3,8x10 ⁻¹
Sm-lncRNA 64	0	-	-	-
Sm-lncRNA 65	0	-	-	-
Sm-lncRNA 66	1	65	2	3,4
Sm-lncRNA 67	0	-	-	-
Sm-lncRNA 68	1	60	11	3,6
Sm-lncRNA 69	1	89	11	1,8
		73	14	4,3x10 ⁻¹
		74	20	05,1x10 ⁻¹
		76	4	4,2x10 ⁻²
		77	6	3,5
		86	4	4,6
Sm-lncRNA 70	7	89	14	3,1x10 ⁻¹
		110	3	6,1
		71	7	9,5x10 ⁻¹
		62	16	7,6x10 ⁻¹
		75	4	1,8
Sm-lncRNA 71	0	-	-	-
Sm-lncRNA 72	1	75	4	1,8
Sm-lncRNA 73	2	71	7	9,5x10 ⁻¹
		62	16	7,6x10 ⁻¹
Sm-lncRNA 74	0	-	-	-
Sm-lncRNA 75	1	63	5	3,9
Sm-lncRNA 76	0	-	-	-
Sm-lncRNA 77	1	98	13	3,1x10 ⁻¹
Sm-lncRNA 78	0	-	-	-

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Por fim, no BLASTN (Tabela 5), também foi adotado como critério de corte um E-value inferior a 10⁻¹⁰⁰, com o objetivo de excluir alinhamentos aleatórios. Os transcritos Sm-lncRNA 19, Sm-lncRNA 70, Sm-lncRNA 71, Sm-lncRNA 73, Sm-lncRNA 75, Sm-lncRNA 77 e Sm-lncRNA 78 atingiram esse limiar e, portanto, foram descartados como possíveis lncRNAs. Alguns desses transcritos já estão anotados como codificantes, enquanto outros ainda permanecem como hipotéticos ou não caracterizados.

Tabela 5 – Dados de transcritos obtidos no BLAST (NCBI).

BLAST			
	Nº de hits	Hit com melhor E value	E value
Sm-lncRNA 17	2	<i>Schistosoma haematobium</i> DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 1 (FRM-1_2), mRNA	1,0x10 ⁻⁹⁴
		<i>Schistosoma haematobium</i> KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 2, variant 2 (KHDRBS2_2), mRNA	
Sm-lncRNA 19	4	<i>Schistosoma haematobium</i> KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 2 (KHDRBS2_2), mRNA	0,0
		<i>Schistosoma haematobium</i> KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated (KHDRBS1), mRNA	
		<i>Schistosoma haematobium</i> KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated, variant 2 (KHDRBS1), mRNA	
Sm-lncRNA 20	0	-	-
Sm-lncRNA 63	0	-	-
Sm-lncRNA 64	20	<i>Schistosoma mansoni</i> SmTRC1 transposon mRNA for PrA protein	3,0x10 ⁻²⁷
		<i>Schistosoma mansoni</i> transposon SmTRC1, clone SmTRC1fl	
Sm-lncRNA 65	40	<i>Schistosoma haematobium</i> uncharacterized protein (MS3_00011174), mRNA	2,0x10 ⁻²⁴
Sm-lncRNA 66	0	-	-
Sm-lncRNA 67	0	-	-
Sm-lncRNA 68	0	-	-
Sm-lncRNA 69	0	-	-
		<i>Schistosoma mansoni</i> unnamed protein product partial mRNA	7,0x10 ⁻¹⁷⁶
Sm-lncRNA 70	97	<i>Schistosoma mansoni</i> uncharacterized protein partial mRNA	6,0x10 ⁻¹⁵⁷
		<i>Schistosoma mansoni</i> uncharacterized protein partial mRNA	3,0x10 ⁻¹³⁰
		<i>Schistosoma mansoni</i> hypothetical protein partial mRNA	5,0x10 ⁻¹¹³
Sm-lncRNA 71	18	<i>Schistosoma mansoni</i> hypothetical protein partial mRNA	0,0
Sm-lncRNA 72	0	-	-
Sm-lncRNA 73	1	<i>Schistosoma haematobium</i> uncharacterized protein (MS3_00003129), partial mRNA	1,0x10 ⁻¹²⁸
Sm-lncRNA 74	0	-	-
		<i>Schistosoma mansoni</i> hypothetical protein partial mRNA	2,0x10 ⁻¹⁰¹
Sm-lncRNA 75	49	<i>Schistosoma mansoni</i> Perere-2 non-LTR retrotransposon	5,0x10 ⁻¹⁰¹
Sm-lncRNA 76	0	-	-
		<i>Schistosoma mansoni</i> hypothetical protein partial mRNA	3,0x10 ⁻¹⁷³
Sm-lncRNA 77	2	<i>Schistosoma haematobium</i> Afadin- and alpha-actinin-binding protein (SSX2IP), mRNA	1,0x10 ⁻¹³¹
		<i>Schistosoma mansoni</i> Perere-5 non-LTR retrotransposon	
Sm-lncRNA 78	5	<i>Schistosoma mansoni</i> LTR-retrotransposon Boudicca, complete sequence	4,0x10 ⁻¹⁰⁶

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

5.2 Validação dos primers

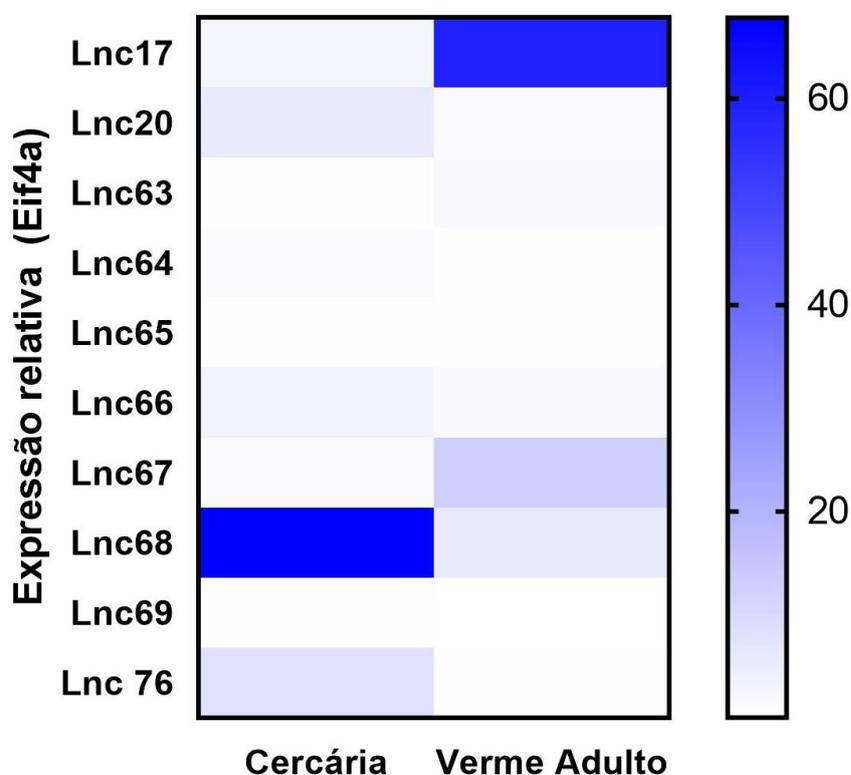
Após a realização da PCR convencional e da eletroforese em gel de agarose 2,2% observou-se que houve amplificação de todos os cDNAs. Devido à presença de subprodutos/dímeros observados na curva de dissociação da PCR quantitativa (qPCR), duas moléculas foram excluídas, os lncRNAs: Sm-lncRNA 72 e Sm-lncRNA 74.

5.3 Perfil de expressão nas fases de cercária e verme adulto do *S. mansoni*

Os níveis de expressão dos lncRNAs estudados nas fases de cercária e verme adulto do parasita (Figura 19), cujo gene de referência utilizado foi o Eif4a (Eukaryotic Translation Initiation Factor 4A). As expressões dos lncRNAs foram significativamente diferentes entre

essas fases de vida do parasito, indicando que estas moléculas possuem um potencial regulatório estágio-específico. Estes resultados corroboram com os achados em outros estudos envolvendo diferentes estágios de desenvolvimento do *S. mansoni* e outras espécies analisadas, demonstrando que os lncRNAs possuem um grande potencial regulatório, e podem ser moléculas de grande papel na manutenção do ciclo altamente complexo que o verme possui (Kim; Khalil; Jolly, 2020; Liao *et al.*, 2018; Maciel *et al.*, 2020; Mota *et al.*, 2021; Oliveira *et al.*, 2019; Sirekbasan; Gurkok, 2021; Vasconcelos *et al.*, 2017). Essa especificidade de expressão entre os estágios de desenvolvimento também ressalta o potencial dessas moléculas como biomarcadores diagnósticos para diversas enfermidades.

Figura 19 – Heat Map da expressão dos lncRNAs nas fases de cercária e verme adulto do *S. mansoni* utilizando como referência o gene Eif4a.



Na fase de cercária o lncRNA mais expresso foi o Sm-lncRNA 68 e na fase de verme adulto o Sm-lncRNA 17. Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

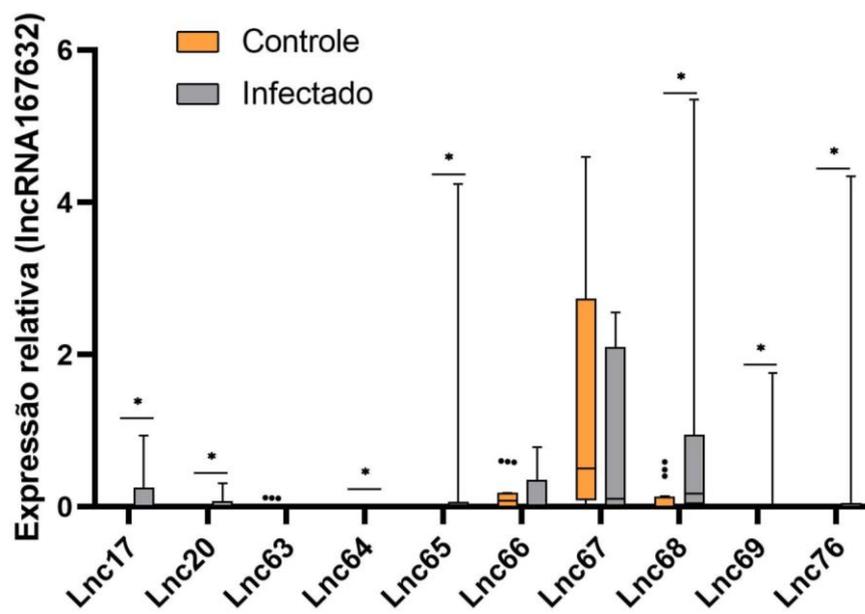
O lncRNA mais expresso em cercária foi o Sm-lncRNA 68, e em verme adulto foi o Sm-lncRNA 17. A maioria dos lncRNAs estudados apresentaram expressão maior no estágio de cercária, corroborando com outros estudos que reforçam que a expressão de lncRNAs e outras moléculas regulatórias tende a ser maior nos estágios larvais do *S. mansoni*, pois estes passam por pressões ambientais mais diversas do que o verme adulto (Kim; Khalil; Jolly, 2020; Mota *et al.*, 2021).

Como sequência deste estudo, pretende-se analisar a expressão dos lncRNAs em outros estágios de desenvolvimento do *S. mansoni* que estejam relacionados com o hospedeiro humano. Essa análise poderá confirmar o nível de atuação estágio-específico dessas moléculas, e auxiliar na escolha de biomarcadores ao longo do estabelecimento da infecção em humanos.

5.4 Perfil de expressão de lncRNAs selecionados em amostras de baço

A análise estatística da expressão gênica no modelo murino de esquistossomose revelou que houveram resultados diferentes entre os grupos infectados e controle para a maioria dos lncRNAs, com exceção dos Sm-lncRNA 63, Sm-lncRNA 66 e Sm-lncRNA 67 (Figura 20). Isso pode indicar a não-especificidade desses lncRNAs ao organismo do *S. mansoni* ou limitações da técnica. Os demais não apresentaram expressão nos animais controle e, quando houve, a expressão foi próxima de zero, sendo até então considerados melhores candidatos a biomarcadores da esquistossomose murina a serem levados em consideração nas análises futuras.

Figura 20 – Expressão relativa (lncRNA167632) dos lncRNAs do baço dos camundongos BALB/c infectados e não infectados por *S. mansoni*.



* $p > 0,05$. Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

Nossa análise revela um campo de pesquisa relativamente inexplorado em relação à interação entre o parasito *Schistosoma* e o hospedeiro. É importante destacar que, até o momento, existem poucos estudos que abordam a relação entre a esquistossomose e lncRNAs no baço. O único estudo conhecido, desenvolvido por Xia e colaboradores (2020), concentrou-se principalmente na análise da expressão de lncRNAs no fígado e baço de camundongos infectados com *S. japonicum*. Neste estudo foi previsto que 660 lncRNAs com expressão diferencial afetariam 2.673 genes no baço, sugerindo uma possível ligação entre lncRNAs e a infecção por *S. japonicum*, de modo que essas moléculas podem desempenhar um papel na patogênese da doença, possivelmente contribuindo para a sobrevivência do parasita ou influenciando vias de virulência (Xia *et al.*, 2020). Este estudo também indicou que diferentes lncRNAs podem coordenar a regulação de um mesmo gene, assim como os mesmos lncRNAs podem influenciar a expressão de genes diversos, sugerindo que os lncRNAs não atuam de maneira isolada, mas interagem em grupos com outros lncRNAs e mRNAs para modular a expressão gênica, além de terem um papel na patogênese da infecção por *Schistosoma*, apesar de ainda não serem compreendidas (Xia *et al.*, 2020).

Além disso, vale ressaltar que a detecção de moléculas do verme em órgãos do organismo hospedeiro tem sido amplamente e exclusivamente conduzida pelo LBBM, permitindo traçar paralelos valiosos entre os resultados obtidos em diferentes órgãos do hospedeiro. Foi evidenciado no estudo de Mota e colaboradores (2021) e de Rocha (2021) que lncRNAs específicos de *S. mansoni* validados experimentalmente podem ser detectados em fígado de camundongos infectados.

Os lncRNAs do parasito sendo detectados no organismo hospedeiro podem indicar uma função modulatória das moléculas do verme no processo de patogênese da esquistossomose. Além disso, essa detecção demonstra o potencial dos lncRNAs em serem biomarcadores, incentivando a análise futura desse grupo em amostras de coleta fácil, que poderiam permitir uma análise de detecção da esquistossomose mais específica e precoce.

Os resultados aqui apresentados, combinados com os encontrados por Xia e colaboradores, podem sugerir também, uma interação direta ou indireta entre lncRNAs do verme na regulação da expressão gênica no baço, e seu consequente aumento de tamanho durante a infecção.

5.5 Identificação de possíveis alvos dos lncRNAs de *S. mansoni*

A abundância dos lncRNAs entre as partes transcritas do genoma, só foi revelada após o fim do projeto ENCODE, sendo assim, a busca por entender sua presença em diferentes espécies e identificar suas funções tem sido cada vez mais intensa (Derrien *et al.*, 2012; Rinn, Chang, 2020).

Em espécies de *Schistosoma*, ainda não se tem identificados lncRNAs com funções específicas definidas. Os estudos sobre essas moléculas no gênero tiveram sua primeira publicação em 2017 (Vasconcelos *et al.*, 2017). Desde então, pouco mais de uma dezena de estudos foram publicados sobre o tema, o que resulta principalmente da dificuldade de identificação dessas moléculas devido ao genoma do *S. mansoni* não estar completo e sofrer constantes atualizações.

Buscando agregar mais informações sobre as funções dos lncRNAs no *S. mansoni*, realizou-se uma busca dos possíveis genes alvo dos lncRNAs trabalhados nesse estudo, considerando a versão mais recente do genoma do *S. mansoni*. Os genes que codificam proteínas mais próximos à sequência de lncRNAs ao longo do genoma foram escolhidos como possível alvo (Tabela 2), pois até o presente momento, a maioria dos lncRNAs com função categorizada atuam com a regulação em cis, nas proximidades da região em que ocupam no genoma (Qian et al, 2019).

Tabela 6 – Possíveis genes alvos dos lncRNAs trabalhados no estudo.

Sm-lncRNAs	Localização cromossomal	Possível Alvo	Simbolo do gene
Sm-lncRNA17	CrZ: 13112759-13129294	Putative 4.1 G protein	Smp_164880.1
Sm-lncRNA20	CrZ: 25230368-25247423	Gap associated protein-related	Smp_006320.1
Sm-lncRNA63	CrI: 3249681-34947387	ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase	Smp_025830
Sm-lncRNA64	CrI: 56607429-56610807	RRM domain-containing protein	Smp_008140.1
Sm-lncRNA65	CrPAR2: 504405-515741	Golgi SNAP receptor complex member 1	Smp_377230
Sm-lncRNA66	CrZ: 41860654-41861021	Non-specific serine/threonine protein kinase	Smp_303970.1
Sm-lncRNA67	Cr5: 19300176-19303512	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit	Smp_061560.6
Sm-lncRNA68	CrPAR2: 3384042-3398682	Secreted protein	Smp_323200
Sm-lncRNA69	CrZ: 5875480-5828148	Putative dynein homolog subfamily B member 2, 6, 8	Smp_022330.1
Sm-lncRNA76	CrZ: 32099899-32099426	RRM domain-containing protein	Smp_047330.1

Os genes que codificam proteínas mais próximos à sequência de lncRNAs ao longo do genoma foram escolhidos como possível alvo. Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

Esse resultado, será um importante guia para análises futuras sobre as possíveis funções dos lncRNAs específicos de *S. mansoni*, e quais seriam seus reflexos na interação parasito-hospedeiro. Porém, ainda são necessários a análise da correlação da expressão entre ambas as moléculas, para confirmar a possibilidade de regulação em cis, além de outros ensaios experimentais que confirmem a associação entre elas para verificarmos a função dos lncRNAs.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu identificar e caracterizar lncRNAs provenientes de *Schistosoma mansoni* encontrados no baço de modelos murinos infectados. As análises revelaram que as expressões desses lncRNAs variam significativamente entre as diferentes fases do ciclo de vida do parasito, sugerindo um papel regulatório estágio-específico e reforçando seu potencial como biomarcadores da infecção.

Adicionalmente, a reanotação funcional dos transcritos trouxe contribuições importantes para a validação dessas moléculas. A análise de conservação mostrou que, embora muitos lncRNAs apresentem forte similaridade com outras espécies do gênero *Schistosoma*, especialmente *S. mansoni* e *S. rodhaini*, há baixa conservação entre organismos mais distantes, o que indica uma possível especificidade de espécie — característica desejável em biomarcadores. As análises com ORFfinder e BLASTN, utilizando critérios rigorosos de E-value, reforçaram o caráter não codificante da maioria dos transcritos, embora alguns tenham sido descartados por apresentarem potencial codificador. Esses achados ressaltam a importância de reanotações periódicas, já que as anotações originais foram realizadas há cerca de uma década, e muitas informações podem estar desatualizadas frente às ferramentas e bases de dados disponíveis atualmente.

Por fim, embora os resultados sejam promissores, futuros estudos são necessários para validar esses achados e avançar no desenvolvimento de novas estratégias diagnósticas e terapêuticas para a esquistossomose, com maior sensibilidade e eficácia que os métodos atualmente disponíveis.

REFERÊNCIAS

- AKALIN, Pinar Kondu. Introduction to bioinformatics. **Molecular nutrition & food research**, v. 50, n. 7, p. 610-619, 2006.
- ANATPAT, Unicamp. **Esplenomegalia esclerocongestiva na esquistossomose**. Disponível em: <https://anatpat.unicamp.br/lamfig11.html>. Acessado em: 07 abr. 2025.
- ANATPAT, Unicamp. **Esquistossomose hepática**. Disponível em: <https://anatpat.unicamp.br/pecasfig8.html>. Acessado em: 07 abr. 2025.
- ANATPAT, Unicamp. **Granulomas esquistossomóticos no fígado**. Disponível em: <https://anatpat.unicamp.br/lamfig10.html>. Acessado em: 07 abr. 2025.
- ARONSON, Jeffrey K. Biomarkers and surrogate endpoints. **British journal of clinical pharmacology**, v. 59, n. 5, p. 491, 2005.
- BATISTA, Carolina. Síntese Proteica. Toda Matéria, [s.d.]. Disponível em: <https://www.todamateria.com.br/sintese-proteica/>. Acessado em: 07 abr. 2025.
- BERRIMAN, Matthew et al. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. **Nature**, v. 460, n. 7253, p. 352-358, 2009.
- BRASIL, M DA S. S. **Vigilância da esquistossomose mansoni: diretrizes técnicas**. Brasília: Ministério da Saúde, 2024. 116 p. E-book.
- CARDOSO, Daniel Madeira et al. Aspectos espaciais, sociodemográficos, clínicos e temporais da esquistossomose no estado de Minas Gerais entre os anos de 2011 e 2020. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 8, p. 78130-78143, 2021.
- CDC. Disponível em: https://phil.cdc.gov/PHIL/Images/20031013/27a2193351934dfb810142590025f258/4841_lor es.jpg. Acessado em: 07 abr. 2025.
- CDC. Schistosomiasis. 07 jun. 2024. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/schistosomiasis/index.html>. Acessado em: 07 abr. 2025.
- CESTA, Mark F. Normal structure, function, and histology of the spleen. **Toxicologic pathology**, v. 34, n. 5, p. 455-465, 2006.2
- COLLEY, D. G.; SECOR, W. E. Immunology of human schistosomiasis. **Parasite immunology**, v. 36, n. 8, p. 347-357, 2014.
- COSTA, João Victor Barreto; DA SILVA FILHO, José Marques. Esquistossomose mansônica: uma análise do perfil epidemiológico na região sudeste. **Saúde. com**, v. 17, n. 3, 2021.
- DAI, Xiaofeng; ZHANG, Shuo; ZAleta-RIVERA, Kathia. RNA: interactions drive functionalities. **Molecular biology reports**, v. 47, n. 2, p. 1413-1434, 2020.

DÍAZ, Adriana V.; WALKER, Martin; WEBSTER, Joanne P. Reaching the World Health Organization elimination targets for schistosomiasis: the importance of a One Health perspective. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 378, n. 1887, p. 20220274, 2023.

DI BELLA, Stefano 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.

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

FARDILHA, Margarida; DA CRUZ E SILVA, O. A. B.; DA CRUZ E SILVA, E. F. A importância do mecanismo de “splicing” alternativo para a identificação de novos alvos terapêuticos. **Acta Urológica**, v. 25, n. 1, p. 39-47, 2008.

FLORES, Heloísa Fernandes. **Baço**. Brasil Escola. Disponível em: <https://brasilecola.uol.com.br/biologia/baco.htm>. Acessado em: 07 abr. 2025.

FOLHA DE SÃO PAULO. **Pesquisa infecta humanos com 20 vermes da esquistossomose**. Disponível em: <https://www1.folha.uol.com.br/equilibrioesaude/2018/03/pesquisa-infecta-humanos-com-20-vermes-da-esquistossomose.shtml>. Acessado em: 07 abr. 2025.

FONSECA, Ana Carolina Rezende et al. **“Esquistossomose: na qual tudo é difícil, inclusive o nome”**: a doença como problema de saúde pública no Brasil (1938-1975). 2022.

GAZZINELLI, A. et al. Schistosoma mansoni reinfection: Analysis of risk factors by classification and regression tree (CART) modeling. **PLoS ONE**, v. 12, n. 8, p. 1–16, 2017.

GÓMEZ-DÍAZ, Elena et al. Epigenetic regulation of Plasmodium falciparum clonally variant gene expression during development in Anopheles gambiae. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 40655, 2017.

HIGGS, Paul G.; LEHMAN, Niles. The RNA World: molecular cooperation at the origins of life. **Nature Reviews Genetics**, v. 16, n. 1, p. 7-17, 2015.

IWAKIRI, Junichi; HAMADA, Michiaki; ASAI, Kiyoshi. Bioinformatics tools for lncRNA research. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1859, n. 1, p. 23-30, 2016.

JAUURÉGUIBERRY, S. et al. Bilharzioses invasives. **La Presse Médicale**, v. 34, n. 21, p. 1641-1645, 2005.

KANSAS STATE UNIVERSITY. **Schistosoma haematobium (urine; eggs 115-170 x 45-65 micrometers) (primates)**. Disponível em: <https://www.k-state.edu/parasitology/625tutorials/Trematodes01.html>. Acessado em: 07 abr. 2025.

KAPUSTA, Aurélie; FESCHOTTE, Cédric. Volatile evolution of long noncoding RNA repertoires: mechanisms and biological implications. **Trends in Genetics**, v. 30, n. 10, p. 439-452, 2014.

KIM, Hyung Chul; KHALIL, Ahmad M.; JOLLY, Emmitt 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.

LAMBERTUCCI, José Roberto; RESENDE, Vivian; VOIETA, Izabela. Trombose da veia porta em paciente com esquistossomose mansônica hepatoesplênica. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 42, p. 235-236, 2009.

LEWIS, Steven M.; WILLIAMS, Adam; EISENBARTH, Stephanie C. Structure and function of the immune system in the spleen. **Science immunology**, v. 4, n. 33, p. eaau6085, 2019.

LICHTENBERG, Franz Von. Schistosomiasis as a worldwide problem: pathology. **Journal of toxicology and environmental health** vol. 1,2, 1975

LÓPEZ-JIMÉNEZ, Elena; ANDRÉS-LEÓN, Eduardo. The implications of ncRNAs in the development of human diseases. **Non-coding RNA**, v. 7, n. 1, p. 17, 2021.

LOVERDE, Philip T. Schistosomiasis. **Advances in experimental medicine and biology** vol. 1154, 2019

MACHADO-SILVA, José Roberto; NEVES, Renata Heisler; GOMES, Delir Corrêa. *Schistosoma mansoni* specimens first described by Pirajá da Silva in Brazil (1908) re-examined by confocal laser scanning microscopy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 3, p. 331-333, 2011.

MAIA, Keila. **Genoma de caramujo transmissor do *Schistosoma mansoni* é sequenciado**. 23 maio 2017. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/genoma-de-caramujo-transmissor-do-schistosoma-mansoni-e-sequenciado>. Acessado em: 07 abr. 2025.

MARINHO, Carolina Coimbra et al. Morbidity of schistosomiasis mansoni in a low endemic setting in Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, p. 805-811, 2017.

MASI, Brice et al. Clinical and preclinical imaging of hepatosplenic schistosomiasis. **Trends in parasitology**, v. 36, n. 2, p. 206-226, 2020.

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

MEBIUS, Reina E.; KRAAL, Georg. Structure and function of the spleen. **Nature reviews immunology**, v. 5, n. 8, p. 606-616, 2005.

NECSULEA, Anamaria et al. The evolution of lncRNA repertoires and expression patterns in tetrapods. **Nature**, v. 505, n. 7485, p. 635-640, 2014

NELWAN, Martin. **Global Epidemiology of Schistosomiasis**. Available at SSRN 3722378, 2020.

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

NOGUEIRA, Raiany T. et al. Phylogeny, morphology, and haplotypic distribution of *Biomphalaria straminea* populations from the five geographic regions of Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 96, n. 4, p. e20230770, 2024.

OLIVEIRA, Victor F. et al. Identification of 170 new long noncoding RNAs in *Schistosoma mansoni*. **BioMed research international**, v. 2018, n. 1, p. 1264697, 2018.

OSAKUNOR, Derick NM; WOOLHOUSE, Mark EJ; MUTAPI, Francisca. Paediatric schistosomiasis: What we know and what we need to know. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 2, p. e0006144, 2018.

PEREIRA, Caroline Louise Diniz et al. Evaluation of Schistosomiasis mansoni morbidity by hepatic and splenic elastography. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 47, n. 5, p. 1235-1243, 2021.

REY, Luís. **Bases da Parasitologia Médica**. 3. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. 424 p.

RIVA, Michele Augusto et al. From sadness to stiffness: the spleen's progress. **Internal and emergency medicine**, v. 14, p. 739-743, 2019.

ROCHA, F. A. Avaliação de RNAs não codificadores longos específicos de *Schistosoma mansoni*, como candidatos a biomarcadores da esquistossomose murina. 2021. 60 f. **Universidade Federal de Ouro Preto**, 2021.

SILVA, Catherine F. et al. Liver stiffness is able to differentiate hepatosplenic Schistosomiasis mansoni from liver cirrhosis and spleen stiffness may be a predictor of variceal bleeding in hepatosplenic schistosomiasis. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 116, n. 1, p. 26-33, 2022.

SILVA, Lucas Emanuel de Oliveira; WANDERLEY, Flaviana Santos. Análise do Programa de Controle da Esquistossomose na redução dos indicadores epidemiológicos da doença no Brasil, de 1995 a 2017. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 13, p. 9-9, 2022.

SOUSA, Darlesson Geovani dos Santos et al. Desafios e perspectivas do diagnóstico da esquistossomose mansônica no Brasil: revisão de literatura. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 13, n. 3, p. e6430-e6430, 2021.

TIBIRIÇÁ, Sandra Helena Cerrato; GUIMARÃES, Frederico Baêta; TEIXEIRA, Maria Teresa Bustamente. A esquistossomose mansoni no contexto da política de saúde brasileira. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, n. suppl 1, p. 1375-1381, 2011.

USP. **Cercária de *Schistosoma mansoni***. Disponível em: <http://www.icb.usp.br/~livropar/img/capitulo11/5.html>. Acessado em: 07 abr. 2025.

USP. **Miracídio de *Schistosoma mansoni* nadando em água fresca**. Disponível em: <http://www.icb.usp.br/~livropar/img/capitulo11/3.html>. Acessado em: 07 abr. 2025.

VASCONCELOS, Elton JR 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. 10508, 2017.

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

WHO. **Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals: A road map for neglected tropical diseases 2021–2030**. Geneva, 2020. E-book.

WORMBASE PARASITE. **Schistosoma mansoni - WormBase ParaSite**. Disponível em: https://parasite.wormbase.org/Schistosoma_mansoni_prjea36577/Info/Index/. Acesso em: 8 abr. 2025.

WRIGHT, Mathew W.; BRUFORD, Elspeth A. “Naming junk”: human non-protein coding RNA (ncRNA) gene nomenclature. **Human genomics**, v. 5, p. 1-9, 2011.

XIA, Tianqi et al. RNA sequencing analysis of altered expression of long noncoding RNAs associated with *Schistosoma japonicum* infection in the murine liver and spleen. **Parasites & Vectors**, v. 13, p. 1-15, 2020.

XIE, Yujiao 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.

ZANARDI, Vanessa Sousa et al. Prevalence of Infection of *Biomphalaria glabrata* by *Schistosoma mansoni* and the risk of urban Schistosomiasis mansoni in Salvador, Bahia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, p. e20190171, 2019.

ZHANG, Yu et al. Circulating cell-free DNA as a biomarker for diagnosis of Schistosomiasis japonica. **Parasites & Vectors**, v. 17, n. 1, p. 114, 2024.

ZHONG, Haoran; JIN, Yamei. Multifunctional roles of microRNAs in schistosomiasis. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 925386, 2022.