

UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA

PROGRAMA DE DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BASICAS

AREA BIOLOGIA

Tesis presentada para acceder a la
Maestría en Ciencias Biológicas
Opción Biología Celular y Molecular

Estandarización de la interferencia de ARN en
Fasciola hepatica.



Nicolás Dell'Oca Runco

Departamento de Genética, Facultad de Medicina,
Universidad de la Republica, UDELAR.

Orientadores:

Dr. Jose F. Tort

Dr. Jose Gabriel Rinaldi

Tribunal:

Dr. Gustavo Salinas

Dra. Adriana Parodi Tállice

Dr. Uriel Koziol

Agradecimientos

A mi FAMILIA, que siempre me apoyo, gracias por estar, siempre. Los quiero mucho.

A Pepe por transmitirme su gusto por lo que hace, son muchos los años compartidos, de trabajo, de charlas, de consejos.... gracias por todo

A Gabriel por su dedicación en este trabajo...

A todos los compañeros del Departamento de Genética (a los que están y los que siguieron otros caminos) Carlitos, Pablo S, Julio, Ile, Lucia, Rafa, los Santi's, Victor, Naty Pi, Leda, Caro, Bernardo, Monica, Checha, Martin C, Pablo L, Ramiro, Xime, Amalia, Fer, Faride, Ale, Rosario, Alicia, Jorge, Seba Gabriela. Siempre uno de ustedes me dio una mano.

A la subdivisión camping y pesca del departamento de genética, esos momentos de desenchufe fueron imprescindibles para seguir adelante.

A la barra de bioquímica

A la Naranja, el futbol en su mayor expresión, el espíritu de búsqueda inalcanzable de la gloria. Ya la alcanzamos...

A Alfonso Cayota y Rosa por recibirme con mucha amabilidad y simpatía.

Al Centro de Biotecnología da UFRGS, Arnaldo Zaha y Martin Cancela.

A Paul Brindley, Department of Microbiology, Immunology and Tropical Medicine, thank you Paul.

Al la Comisión de Maestrías, Verónica Fernández y Mari Ana Duhagon.

Al tribunal por su tiempo.

A Vale, llegaste cuando menos lo esperaba, y me encantó...

Abreviaturas

ADN	ácido desoxirribonucleico
Ago	Argonauta
ARNm	ARN mensajero
ARN	ácido ribonucleico
ARNi	interferencia de ARN
ARNdc	ARN de doble cadena
DAPI	6-diamino-2-fenilindol
LUC	luciferasa de luciérnaga
cm/s	centímetros segundos
FDA	diacetato de carboxi-fluoresceina
GFP	proteína verde fluorescente
FhLAP	leucinaminopeptidasa de <i>F. hepática</i>
IP	Ioduro de
JRD	Juvenil Recientemente Desenquistado
miRNA	microRNA
μl	microlitros
μm	micrómetros
ng	nanogramos
pb	pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
piRNA	“piwi-interacting RNA”
RdRPs	ARN polimerasas ARN dependientes
RISC	“RNA-induced silencing complex”
siRNA	“short-interfering RNA”
3'UTR	Región 3' no traducida

Contenido

RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
1 Los helmintos como problema sanitario	3
1.1 Nuestro modelo: Fasciola hepatica	3
1.2 Los helmintos en la era post-genómica	6
2 Silenciamiento génico mediado por ARNs pequeños.....	7
2.1 Mecanismo de acción	8
2.1.1 Vía miRNA	9
2.1.2 Vía siRNA.....	10
2.1.2.1 Amplificación de la respuesta iRNA (transitive ARNi).	11
2.1.2.2 Propagación de la señal de interferencia ARNi sistémico y ARNi ambiental.....	12
2.1.3 piRNAs	14
2.1.3.1 Clusters de piRNA y biogénesis de piRNAs primarios.	14
2.1.3.2 Producción de piRNAs secundarios, “Ping-pong”, silenciamiento post transcripcional de transposones.....	15
2.1.3.3 Bloqueo transcripcional de transposones nacientes (TGS).....	16
2.1.3.4 piRNAs en helmintos.	17
3 ARN pequeños en platelmintos parásitos	17
3.1 miRNAs	17
3.2 Interferencia de ARN	20
4 Experimentos de ARNi en trematodos.	21
4.1 Selección del parásito y estadios a analizar	21
4.2 Genes blanco a estudiar.....	23
4.3 El diseño experimental.....	24
4.3.1 Suministro de moléculas interferentes (delivery)	24
4.3.2 Moléculas usadas y concentraciones. Efectos inespecíficos.	27
4.3.3 Controles.....	28
4.4 Análisis del silenciamiento.	31
4.4.1 Eficiencia de transfección.....	31
4.4.1.1 Cuantificar sobrevida	31
4.4.1.2 Cuantificación de la incorporación de moléculas interferentes	32
4.4.2 Determinación de efectos del silenciamiento	33
4.4.2.1 Detección de fenotipos	33
4.4.2.2 Reducción de la expresión del gen blanco y de su proteína.....	33
4.4.2.3 Detección de efectos inespecíficos (“off-targeting”).	33
4.4.2.4 Ensayos biológicos y funcionales.	34
HIPOTESIS	35
OBJETIVOS	35
Objetivo general.....	35
Objetivos Específicos	35
MATERIALES Y METODOS.....	36
1. Obtención de Parásitos.....	36
2. Síntesis de moléculas interferentes.	36
3. Suministro (“delivery”) de moléculas interferentes en juveniles.....	37

4.	Determinación de sobrevivencia de parásitos con colorantes vitales.....	38
5.	Detección de la incorporación de Cy3-siRNA mediante microscopia confocal.....	38
6.	Análisis de la expresión génica.....	39
7.	Ensayos de actividad enzimática.....	39
8.	Ensayos de interferencia en adultos.....	40
9.	Clonado y secuenciado de ARNs pequeños (smRNA) a partir de JRD...	40
10.	Clonado y secuenciado de genes de la vía si/miRNA.....	41
	RESULTADOS	42
1.	Evaluación de la sobrevivencia de parásitos sometidos a procedimientos de transfección de moléculas interferentes.....	42
2.	Estrategias para optimizar la ARNi en JRDs.....	43
3.	Interferencia de ARN en juveniles de <i>Fasciola hepatica</i>	45
4.	Ensayos preliminares de interferencia en Adultos.....	54
5.	Clonado y secuenciado de miRNA.....	56
6.	<i>Clonado y secuenciado de genes de la vía si/miRNA.</i>	57
	DISCUSION	63
	Estandarización de la ARNi en JRD.....	64
	Interferencia de ARN en adultos.	67
	ARNs pequeños en <i>F. hepatica</i>	68
	Identificación de genes de la vía si/miRNA.	68
	BIBLIOGRAFIA	71
	APENDICE 1.....	87
	APENDICE 2.....	89

Las helmintiasis constituyen un grave problema sanitario a escala mundial tanto en la salud humana como animal. El control de estas enfermedades descansa en el uso de un número limitado de drogas, aunque en los últimos años se han reportado numerosos casos de resistencia parasitaria a estas drogas, por lo que es imperioso desarrollar herramientas diagnosticas más efectivas y estrategias terapéuticas alternativas para controlar estas enfermedades. El advenimiento de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva permitió conocer genomas y transcriptomas de varios de estos parásitos, aportando al conocimiento de aspectos relevantes de la biología parasitaria. Sin embargo buena parte de las secuencias génicas identificadas son aun de función desconocida, por lo que se hace necesario desarrollar herramientas de genómica funcional que permitan develar su papel en la biología del parásito.

La interferencia de ARN (ARNi), es esencialmente la única herramienta de genética reversa disponible para el análisis de la función génica en helmintos parásitos, pero dada la heterogeneidad de éstos, la transferencia de la tecnología no es sencilla, y requiere estandarizar la técnica en cada modelo parasitario para aprovechar al máximo esta herramienta.

En el presente trabajo decidimos evaluar las vías de silenciamiento génico en el trematodo *Fasciola hepatica*, agente causal de la fasciolosis, una enfermedad prevalente en el ganado domestico de nuestro país. Focalizamos en (1) explorar la vía de silenciamiento exógena estandarizando la ARNi en juveniles como método de rutina para el estudio de la función génica, (2) investigar los actores relevantes de la(s) vía(s) de silenciamiento endógeno identificando, clonando y secuenciando pequeños RNA reguladores y genes participantes de estas vías.

Tomando como blanco el gen de copia única de la Leucin Aminopeptidasa (FhLAP), analizamos diversos métodos de suministro y demostramos que el “electro-soaking” consistente en la electroporación de los parásitos y subsecuente incubación con la molécula interferente. Ajustamos las dosis de ARN doble cadena (ARNdc) utilizadas en los ensayos, logrando knock-down de FhLAP con tan solo 2,5 ng/µl de ARNdc. Con siARNs y ARNdc fluorescentes seguimos su incorporación y localización. Comparamos la efectividad del silenciamiento mediado por ARNdc y por moléculas interferentes de menor tamaño (siRNA), y observamos que si bien son igualmente efectivas a tiempos cortos, es más persistente el efecto cuando se usa ARNdc llegando a 21 días post-tratamiento.

Intentamos adaptar la experiencia adquirida en Juveniles recientemente desenquistados (JRD) para suprimir la expresión del gen FhLAP en el estadio adulto. En un ensayo preliminar al incubar adultos con 20 ng/µl ARNdc FhLAP se logró reducir la expresión de este gen de manera significativa en uno de los parásitos tratados, observándose además alteraciones en la morfología de huevos producidos por los parásitos tratados, y disminución de la expresión de FhLAP en huevos. Estos datos son preliminares pero promisorios ya que indican que es posible suprimir la expresión génica mediante la ARNi en adultos de *F hepatica*.

Iniciamos la secuenciación e identificación de la población de ARNs pequeños producidos por el parásito abriendo el camino al estudio de los miRNA parasitarios que continúa en nuestro laboratorio. Por otro lado iniciamos la búsqueda de genes involucrados en vías de silenciamiento, identificando la presencia conservada de varios de ellos, y clonando cuatro actores principales de estas vías.

Estos avances permitirán en un futuro utilizar de manera más eficiente esta valiosa herramienta de estudio de la función génica en *F hepática*, abriendo el camino a su utilización para comprender mejor la biología del parásito y eventualmente identificar nuevos blancos terapéuticos para la fasciolosis y otras trematodiasis en general.

1 Los helmintos como problema sanitario

Los helmintos parásitos son animales invertebrados de importancia médica y veterinaria con gran impacto económico ya que infectan humanos y animales a lo largo de todo el mundo produciendo en conjunto una mayor morbimortalidad que malaria y tuberculosis. Son las infecciones más prevalentes en humanos en países en desarrollo con más de 2 billones de personas infectadas y más de 5 billones en riesgo (Peter J. Hotez *et al.*, 2006; Chammartin *et al.*, 2013). A su vez, las pérdidas económicas causadas por helmintos son muy importantes y se deben principalmente a disminución de la producción de leche, carne y lana, interferencias en la fertilidad y por los tratamientos antihelmínticos (Hotez *et al.*, 2008; Moreau e Chauvin, 2010).

Son organismos extremadamente diversos que se dividen en 2 grandes phyla: Nematodos (gusanos cilíndricos) y Platelminos (gusanos planos). Estos últimos constituidos por trematodos (duelas, gusanos planos no segmentados o “flukes”) y cestodos (tenias, gusanos planos segmentados o “tapeworms”), monogeneas (mayoritariamente ecto-parásitos de peces) y turbelarios (organismos de vida libre como planarias).

A pesar de que las helmintiasis son las infecciones más frecuentes en el mundo contamos con un repertorio reducido de drogas para combatirlas, siendo 6 las drogas más utilizadas: albendazol, oxamniquina, praziquantel, ivermectina, diethylcarbamazina, mebendazol. En los últimos años los reportes de resistencia a estas drogas son cada vez más frecuentes por lo que se necesitan nuevos fármacos y nuevos enfoques para combatirlas (Rana e Misra-Bhattacharya, 2013)

1.1 Nuestro modelo: *Fasciola hepatica*

La fasciolosis es una zoonosis de distribución mundial causada por trematodos del genero *Fasciola* (*F.hepatica* y *F.gigantica*) (Keiser e Utzinger, 2009; Utzinger *et al.*, 2012) (Ashrafi *et al.*, 2014). *F. hepatica* se distribuye en todo el mundo aunque predomina en zonas templadas como nuestro país y *F gigantica* se encuentra principalmente en zonas tropicales.

Esta enfermedad afecta principalmente al ganado doméstico con gran impacto en comunidades agricultoras en países en desarrollo, causando pérdidas económicas que alcanzan los 2 billones de dólares anuales (Spithill e Dalton, 1998). En los últimos años se ha registrado un incremento en el número de casos en humanos por lo que la OMS ha considerado a esta enfermedad una zoonosis reemergente (Ashrafi *et al.*, 2014) . Se estima que entre 2.4 y 17 millones de personas están infectadas y unos 90 a 180 millones en riesgo de infección, (Control of foodborne trematode infections. Report of a WHO Study Group, 1995; Toledo, Bernal e Marcilla, 2011; Toledo,

Esteban e Fried, 2012) aunque el número de animales y humanos infectados podría ser mayor debido a la naturaleza asintomática de la infección, la limitada capacidad diagnóstica y la falta de registro de esta enfermedad especialmente en países en desarrollo (Toet, Piedrafita e Spithill, 2014). La fasciolosis humana es un problema creciente en otras zonas de nuestro continente, particularmente en Perú y en el altiplano boliviano (Espinoza *et al.*, 2010). En nuestro país la prevalencia en el ganado se estima que es alta, siendo en muchos casos superior al 50 % en ovinos y algo menor en bovinos, y reportándose algunos casos esporádicos en humanos (Acosta, 1991).

Fasciola hepatica es un trematodo digenético, hermafrodita con un ciclo evolutivo complejo con fases de reproducción asexual en moluscos del género *Lymnaea* (huéspedes intermediarios) y fases de reproducción sexual en vertebrados que son los huéspedes definitivos. En un ciclo típico se observa la secuencia de los siguientes estadios de desarrollo; huevo, miracidio, esporoquiste, redia, cercaria, metacercaria, juvenil y adulto (Figura. 1).

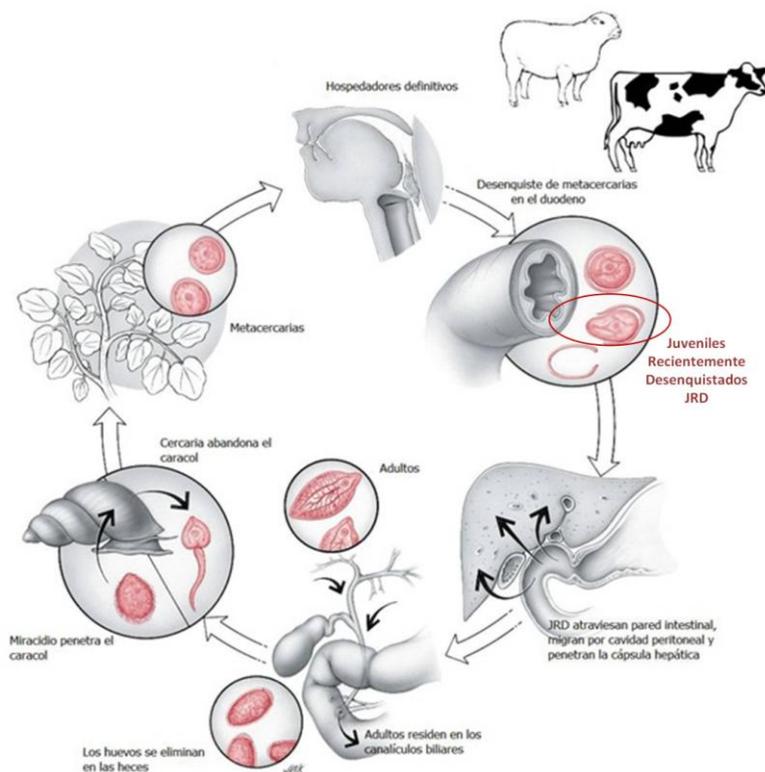


Figura 1: Ciclo de vida de *Fasciola hepatica*.

Los huevos, expulsados con las materias fecales del huésped definitivo al medio ambiente, son de color amarronado y forma oval, operculados de unos 130 a 145 μm de largo y 45 μm de ancho. Una vez en las pasturas los huevos pueden permanecer viables por varios meses dependiendo de condiciones de temperatura, humedad, tensión de oxígeno, pero deben separarse de las materias fecales donde la tensión de oxígeno es menor para desarrollarse completamente a miracidio. La temperatura es muy importante, por debajo de los 10 °C los huevos no completan su desarrollo y por

encima de los 30 °C se inhibe el desarrollo. El rango de temperaturas ideal es entre 23 a 26 °C que permite que los huevos completen su desarrollo entre 2 y 3 semanas. En temperaturas menores de 5 °C se detiene el desarrollo que se reinicia al incrementar las mismas, esto permite que los huevos sean mantenidos durante periodos de hasta 2.5 años refrigerados entre los 2 y 10 °C (Acosta, 1991). La humedad también es crítica en verano la falta de agua y la menor humedad ambiente hacen que los huevos se resequen rápidamente (Acosta, 1991; Andrews, 1999). En condiciones adecuadas el huevo madura hasta miracidio fuera del huésped definitivo donde tiene oportunidad de encontrar el huésped intermediario. Luz y temperatura son determinantes para la eclosión, en ausencia de luz los miracidios no eclosionan. La luz estimula al miracidio a segregar enzimas que digieren sustancias que mantienen cerrado el opérculo (Acosta, 1994). La hipertoniya y el consiguiente aumento de la presión osmótica dentro del huevo también favorecen la salida del miracidio (Christensen, 1980).

El miracidio mide unos 130 µm es de forma piriforme, con una cutícula ciliada, con una papila anterior retráctil y un par de manchas oculares oscuras en el segmento anterior. Una vez en el agua el miracidio se mueve rápidamente hasta encontrar el caracol, proceso que no debe tardar más de 24 horas, tiempo máximo de vida de este primer estadio de vida libre. En condiciones óptimas de temperatura de 15 a 26 °C el miracidio es más infectivo lo que le permite encontrar rápidamente al huésped intermediario. La velocidad de movimiento es un predictor de la infectividad, los miracidios que se mueven rápido de 4 a 12 cm/s son más exitosos. Para encontrar los caracoles los miracidios utilizan diversos recursos. Tienen fototropismo positivo y geotropismo negativo que inducen al miracidio a moverse en los ambientes donde se encuentra el caracol. El moco secretado por los caracoles actúa atrayendo los miracidios (Saladin, 1979; Christensen, 1980).

Una vez que encuentra el caracol se aplica sobre su papila anterior y comienza el proceso de penetración perdiendo su envoltura ciliada. Dentro de cada caracol se dan ciclos de reproducción asexual y multiplicación partenogenética que permiten que a partir de un solo miracidio se produzcan miles de cercarias. Los miracidios ingresan al caracol, ya sin su cubierta ciliada, convirtiéndose en esporocistos, un estadio que asemeja una bolsa que contiene acúmulos de células germinales indiferenciadas, las que dan lugar a las redias, (5 a 8 redias por esporocisto). Las redias también contienen masas de células indiferenciadas a partir de las que se desarrollan asexualmente redias hijas o cercarias (Kendall, 1949). La producción de redias hijas constituye un mecanismo de defensa del parásito frente a condiciones ambientales adversas (como puede ser altas temperaturas) para proteger futuras generaciones de cercarias. En condiciones óptimas las cercarias abandonan el caracol luego de 4 a 7 semanas de la infección, siempre que las temperaturas no sean menores a 10 °C, donde se inhibe la emisión de cercarias (Andrews, 1999). Después de dejar el caracol las cercarias tienen una corta vida libre donde nadan activamente por los movimientos de su cola, hasta adosarse a la superficie de plantas acuáticas. Allí pierden la cola y se enquistan, formando la metacercaria, la forma infectiva para el huésped definitivo. Las metacercarias son formas quiescentes que pueden sobrevivir periodos mayores a un año en temperaturas moderadas con un mínimo de humedad aunque su infectividad disminuye progresivamente.

Normalmente las metacercarias son ingeridas por el huésped definitivo y después de una hora se activan en el estómago y/o duodeno por estímulos como altas concentraciones de anhídrido carbónico, condiciones reductoras, sales biliares y temperaturas de 39° C. El desenquiste ocurre en el intestino delgado del huésped donde emerge el Juvenil Recientemente Desenquistado (JRD). El JRD rápidamente atraviesa la pared intestinal y migra por cavidad peritoneal hasta encontrar el hígado, proceso que lleva 4 a 5 días. Las formas inmaduras penetran en el parénquima hepático atravesando la cápsula de Glisson y migran por este hasta ubicarse en los canalículos biliares luego de 7 semanas. La migración de los parásitos inmaduros a través del tejido hepático provoca extensa inflamación, fibrosis y hemorragia, mientras que los parásitos crecen y comienzan a madurar sexualmente. Después de 8 semanas ya se encuentran huevos en la bilis que más tarde serán expulsados por las heces completando así el ciclo. Sin tratamiento en el huésped definitivo los adultos pueden sobrevivir extensos periodos de tiempo y llegan a emitir 20000 huevos por día (Andrews, 1999).

Si bien la probabilidad de que un huevo llegue a convertirse en adulto es mínima la gran producción de huevos en el huésped definitivo y de cercarias en el caracol aseguran la permanencia en el medio ambiente y su distribución geográfica lo que facilita la infección por este parásito. Teniendo en cuenta el potencial biótico del parásito las estrategias de control deberían considerar los dos hospederos lo que es muy difícil de implementar, especialmente en países en vías de desarrollo por dificultades económicas y falta de personal capacitado (Acosta, 1991)

Actualmente la estrategia de control más utilizada consiste en el uso de drogas anti-helmínticas en el huésped definitivo. Se han empleado distintas drogas que se han discontinuado por falta de eficacia o por efectos adversos (Mas-Coma, 2005). Al momento la droga más utilizada tanto para el ganado como para humanos, es el triclabendazol que a diferencia de otras es efectiva tanto para formas adultas como juveniles, aunque no logra impedir la reinfección. Por otro lado su uso prácticamente exclusivo en varias partes del mundo ha llevado a la aparición de resistencia (Brennan *et al.*, 2007). Otro problema con las medidas de control y el uso de drogas, es que por lo general no se consideran la existencia de otros huéspedes definitivos que no son de interés comercial como especies silvestres (ciervos, carpinchos, nutrias) y que actúan como reservorios dificultando así la erradicación de *Fasciola* (Gaudier *et al.*, 2012).

1.2 Los helmintos en la era post-genómica.

El advenimiento de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva ha facilitado el conocimiento de genomas y transcriptomas de varios helmintos parásitos, entre ellos nuestro modelo (Berriman *et al.*, 2009; Cancela *et al.*, 2010; Young *et al.*, 2010). Esto abre las puertas para la identificación de nuevos mediadores moleculares en la interacción huésped parásito y el desarrollo de nuevos blancos terapéuticos (Zarowiecki e Berriman, 2015).

En esta etapa es fundamental el desarrollo de herramientas de genómica funcional para determinar la función y esencialidad de gran cantidad de secuencias génicas aportadas por estos proyectos de secuenciación masiva. Si bien se ha progresado en entender aspectos básicos de la biología de estos parásitos existen aún muchas

secuencias de función desconocida. Sin embargo en la actualidad la disponibilidad de herramientas genéticas que permitan dilucidar la función de estos genes es aún muy limitada en helmintos en general y en *F. hepatica* en particular (Kalinna e Brindley, 2007; Dalzell *et al.*, 2012; Hagen *et al.*, 2012; Buscaglia, Kissinger e Agüero, 2015).

Se han utilizado herramientas de genética directa en el nematodo *Haemonchus contortus* para identificar genes de resistencia a drogas donde se buscan asociaciones entre el fenotipo de resistencia y polimorfismos asociados a este en genes candidatos (Gilleard, 2006). Esta estrategia ha permitido identificar algunas variantes en pocos genes por lo que se necesitan otros enfoques para identificar más genes y otros mecanismos involucrados a la resistencia.

Las herramientas de genética reversa, donde a partir de la modificación de la secuencia de un gen o de la perturbación de su expresión se estudia el fenotipo como son la mutagénesis dirigida, la transgénesis, la inactivación génica (“knock-out”), han sido difíciles de aplicar en helmintos. Limitaciones propias de estos organismos como ciclos de vida complejos, tegumentos robustos, estructuras anatómicas complejas, incapacidad de mantener estos parásitos en cultivo por periodos prolongados, inexistencia de líneas puras o cepas, y ausencia de líneas celulares estables, han dificultado el desarrollo de estas herramientas.

Solamente en *Schistosoma mansoni* se han logrado algunos avances en transgénesis, pero esta herramienta aún no se ha extendido a otros modelos (Mann *et al.*, 2011; Mourão *et al.*, 2012; Rinaldi *et al.*, 2012; Hagen, Scheerlinck e Gasser, 2015). La interferencia de ARN (del inglés “RNA interference” or ARNi), una técnica de genética reversa en la que se suprime a nivel post-transcripcional la expresión de un gen blanco mediante el uso de moléculas de ARN doble cadena es prácticamente la única herramienta de análisis de la función génica disponible en helmintos (Mourão *et al.*, 2012).

2 Silenciamiento génico mediado por ARNs pequeños.

El descubrimiento de las vías de silenciamiento génico mediado por ARNs pequeños transformó la forma en que entendemos la regulación de la expresión génica. Estas vías regulan post transcripcionalmente la expresión génica y son claves en procesos como la diferenciación celular, desarrollo e integridad del genoma (Moazed, 2009; Morris e Mattick, 2014).

Los principales mediadores del silenciamiento en estas vías son ARNs pequeños de 20-30 nucleótidos de los cuales los más conocidos son microRNA (miRNA), ARNs pequeños de interferencia (siRNA) y ARNs de unión a proteínas Piwi (piRNAs). Otros ARN pequeños se han ido identificando como reguladores de la expresión génica. Algunos ejemplos son ARNs pequeños derivados de tRNA (tsRNA), trans-acting siRNA (ta-siRNA), heterochromatic small interfering RNA (hc-siRNA), natural antisense short interfering RNA (nat-siRNA) y DNA damage-induced small RNA (qiRNA), pero aún se sabe muy poco de estos sistemas de regulación génica (Choudhuri, 2009; Haussecker *et al.*, 2010; Bologna e Voinnet, 2014).

Las vías de regulación mediadas por ARNs pequeños han sido estudiadas originalmente en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, primer organismo en que se describió la interferencia de ARN (ARNi) por medio de un ARN doble cadena exógeno (dcRNA) (Fire *et al.*, 1991; Fire *et al.*, 1998), y en que se identificó por primera vez un miRNA, lin-4 (Lee, Feinbaum e Ambros, 1993). A partir de entonces, rápidamente comenzaron a identificarse miembros de estas vías en organismos tan diversos como mamíferos (humanos)(Rivas *et al.*, 2005), insectos (*Drosophila melanogaster*) (Okamura, Liu e Lai, 2009) y parásitos como *S. mansoni* (Gomes *et al.*, 2009).

Surgieron a partir de estos descubrimientos dos corrientes principales de investigación relacionadas con la regulación de la expresión génica mediada por ARNs pequeños: el estudio de miRNAs y su papel en la regulación génica y el desarrollo del ARNi como herramienta de genómica funcional. Es de destacar que, el mecanismo de regulación de la expresión génica en estas vías descansa en forma parcial sobre una maquinaria común.

2.1 Mecanismo de acción

El mecanismo de acción de miRNAs y siRNA es similar e involucra la formación de un complejo de silenciamiento llamado RISC (del inglés “RNA induced silencing complex”) que reconoce el mensajero blanco en su región 3’UTR y bloquea principalmente la traducción en la vía miRNA y lleva a la degradación del mRNA en la vía siRNA (Figura 2). Las enzimas centrales del complejo RISC pertenecen a una gran familia de proteínas llamadas Argonautas que tienen cuatro dominios principales N-terminal, PAZ (de unión a RNA), Mid (que une el extremo 5’ fosfato de pequeños RNA), y PIWI (que tiene actividad RNasa H)(Su *et al.*, 2009; Bologna e Voinnet, 2014).

Estas proteínas están conservadas evolutivamente y pueden ser clasificadas en 3 subgrupos AGO, PIWI y WAGO de acuerdo a similitud de secuencias y funciones. La subfamilia AGO que se une con ARNs pequeños generados por RNasa III (Drosha y DICER), es la que se une con miRNA y siRNAs. La subfamilia de proteínas PIWI se une a piRNAs para cumplir sus funciones, en particular participan del silenciamiento de elementos transponibles del genoma. Las WAGO son argonautas exclusivamente identificadas en nematodos, que están separadas en un grupo aparte y que estarían involucradas en el silenciamiento mediado por siRNAs secundarios generados por RNA polimerasas dependientes de ARN (Czech e Hannon, 2011).

Una vez generados los ARNs pequeños se unen con una argonauta específica para llevar a cabo su función. En *D.melanogaster* se ha demostrado que complejos formados por Ago 1 intervienen en la vía miRNA, y los que tienen Ago 2 en la vía siRNA. Es más, mutaciones en Ago 2 impiden el mecanismo ARNi pero no afectan el desarrollo y otras funciones importantes, mientras que mutaciones en Ago 1 son letales, reflejando la esencialidad de los miRNAs durante el desarrollo (Okamura, Liu e Lai, 2009).

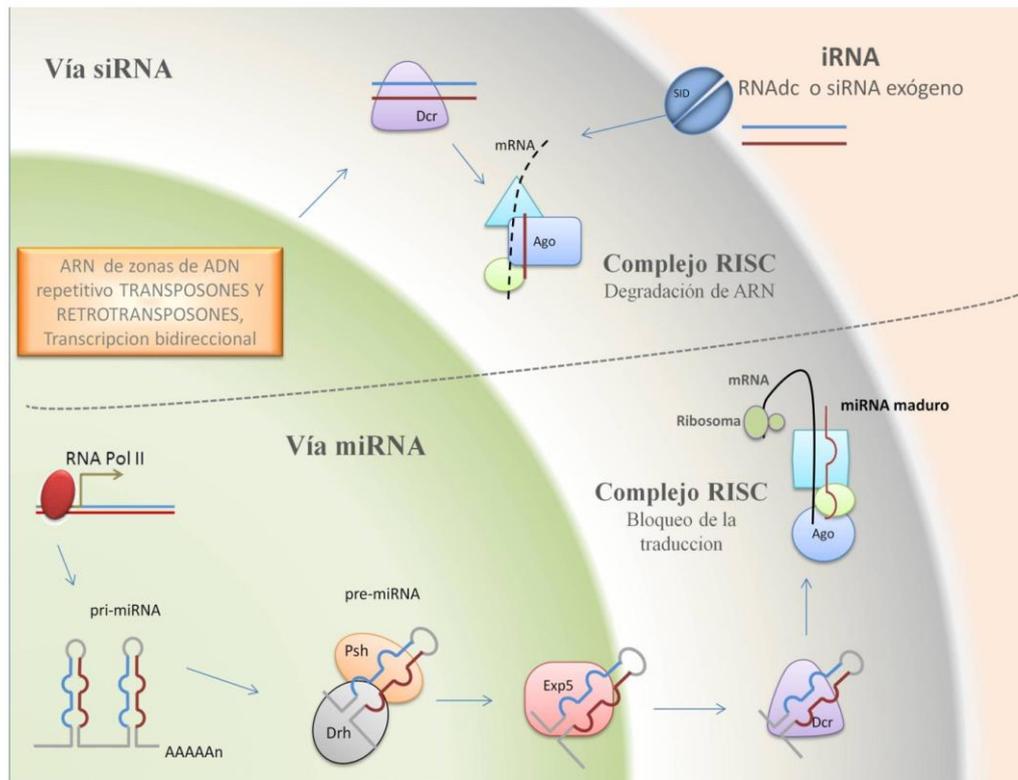


Figura 2: Biogénesis de siRNAs y miRNAs. A Esquema de una célula eucariota, en verde el núcleo, en gris el citoplasma y en rosado el exterior celular. En la vía siRNA los ARNs generados de manera endógena o aportados desde el exterior son procesados por DICER y luego pasan a formar parte de un complejo RISC encargado de silenciar la expresión génica. En la vía miRNA una RNA polimerasa II genera el pri-miRNA que es procesado por Drosha en pre-miRNA. Este abandona el núcleo por medio de exportina 5. En el citoplasma el pre-miRNA es procesado por DICER y el miRNA maduro de una sola hebra es captado por el complejo RISC encargado de bloquear la traducción en la vía miRNA. RNA pol II, RNA polimerasa II, Psh, Enzima Pasha; Drh, enzima Drosha; Exp5, Exportina 5; Dcr, Enzima Dicer; Ago, enzima Argonauta.

2.1.1 Vía miRNA

El proceso de síntesis de miRNA comprende varios pasos e involucra diversas enzimas (Figura 2). La mayoría de los miRNAs se transcriben de manera regulada por medio de la RNA polimerasa II dependiente de ADN (RNA Pol II) que genera un transcripto primario pri-miRNA con estructura de horquilla que alberga el miRNA maduro. Muchos de estos pri-miRNA forman unidades policistronicas que contienen varios miRNA y son similares a transcriptos de genes codificantes ya que contienen caperuza 5', cola poli A e intrones al ser procesados por RNA Pol II (Ha e Kim, 2014).

Antes de abandonar el núcleo un complejo multiproteico llamado complejo microprocesador (Czech e Hannon, 2011) dirigido por la RNasa III Drosha y Pasha procesa el transcripto primario generando una molécula de aproximadamente 70 nt de

largo llamada pre-miRNA. Esta molécula abandona el núcleo por medio de una proteína de membrana homóloga a exportina 5.

En el citoplasma el pre-miRNA es procesado por Dicer una RNasa III que genera el miRNA maduro, un ARN de doble cadena de aproximadamente 22 nt de largo que es captado por proteínas Argonautas para formar el complejo RISC. Solo una de las hebras del miRNA maduro llamada hebra guía o miRNA strand va a formar parte del complejo RISC. La hebra eliminada conocida como hebra pasajera o miRNA* es destruida durante el ensamblado del complejo gracias a la actividad catalítica de las enzimas AGO dada por su dominio PIWI. La selección de la hebra que permanece unida a Argonauta depende de la estabilidad termodinámica del extremo 5' del smRNA. La hebra con menor estabilidad en 5' es incorporada y la otra destruida (RISC loading) lo que se conoce Regla de Asimetría (Figura 3) (Hutvagner e Simard, 2008; Czech e Hannon, 2011).

El complejo RISC es encargado de que el miRNA reconozca su transcripto blanco. Por lo general solo una pequeña porción del miRNA generalmente entre las bases 2-8 conocida como región semilla se aparea con su blanco en la región 3'UTR del transcripto maduro. En este caso el complejo RISC conduce a la vía al bloqueo de la expresión a nivel traduccional. Cuando el miRNA se une de forma completa con el blanco puede llevar a la degradación de este (Czech e Hannon, 2011)..

2.1.2 Vía siRNA

La vía siRNA puede ser activada mediante ARNdc de distintos orígenes como pueden ser secuencias endógenas como transposones, secuencias repetidas o secuencias antisentido en regiones codificantes de mensajeros lo que se conoce como ARNi endógeno. Moléculas de ARNs exógenas también emplean esta vía en la llamada interferencia de RNA (ARNi), herramienta de genética reversa que ha sido empleada para descifrar la función génica y para identificar posibles blancos terapéuticos en diversos sistemas (Hao *et al.*, 2010).

Las moléculas interferentes generadas de maneras endógenas o aportadas desde el exterior son procesadas por la enzima DICER en fragmentos de aproximadamente 21 nucleótidos conocidos como siRNAs (del inglés “short interfering RNAs” o pequeños ARNs de interferencia).

Los siRNA resultantes convergen en una vía común de procesamiento formando un complejo RISC encargado de unir al siRNA con un ARNm blanco llevando a la destrucción de este. En *C.elegans* forman este complejo Ago (RDE-1) y Drosha DRH-1 una helicasa (Fischer, 2010). Enzimas Argonautas son las encargadas de estabilizar el complejo y su actividad slicer les permite eliminar la hebra pasajera lo que es necesario para reconocer el blanco (Figura 3).

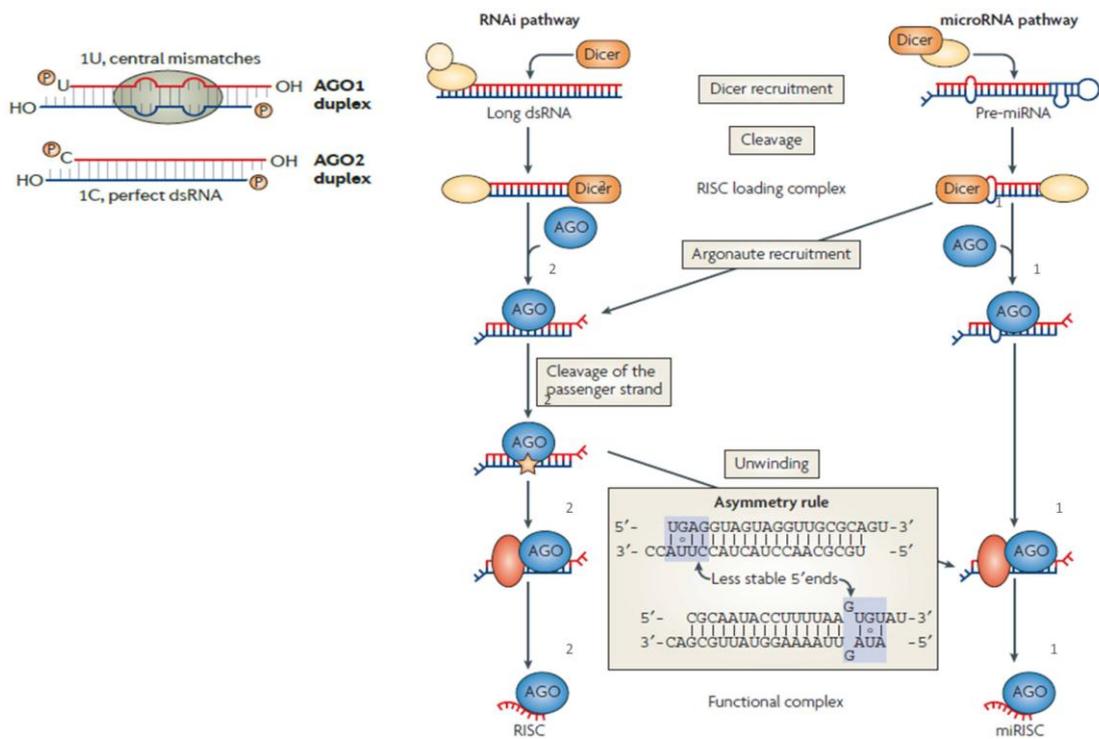


Figura 3: Ensamblado de Argonautas con ARNs pequeños y selección de la hebra guía. Los dúplex de ARNdC generados en ambas vías de silenciamiento son procesados por enzimas DICER. En el paso siguiente las moléculas procesadas por DICER pasan a formar parte del complejo RISC con Argonautas específicas. En la vía siRNA la Ago 2 se une con siARNs que presentan gran homología con el mRNA blanco (recuadro superior). En la vía miRNA en la que participa Ago1 los miRNA establecen una unión imperfecta con el mRNA blanco (recuadro superior). Una vez que las Argonautas se unen con el ARN pequeño su actividad catalítica dada por su dominio PIWI le permite eliminar la hebra pasajera (hebra azul). La selección de la hebra a ser eliminada depende de la estabilidad termodinámica del extremo 5' (Regla de asimetría). La hebra con menor estabilidad en 5' es incorporada y la otra destruida ("RISC loading") lo que se conoce Regla de Asimetría. Modificado de Hutvagner y colaboradores. (Hutvagner e Simard, 2008).

2.1.2.1 Amplificación de la respuesta iRNA (transitive ARNi).

En *C. elegans* y otros organismos hay una respuesta de amplificación interna llamada ARNi transitiva en la que el mensajero blanco sirve de molde para generar nuevos siRNA (siRNA secundarios) por medio de RNA polimerasas RNA dependientes (RdRPs). Los siRNAs secundarios en *C. elegans* se pueden identificar ya que como son sintetizados directamente por RdRPs presentan un extremo 5' trifosfato. En la ARNi transitiva en plantas intervienen enzimas DICER en la generación de siRNA secundarios por lo que estos tienen el 5' monofosfato generado por estas proteínas. Los siRNA secundarios permiten que se prolongue el silenciamiento en ausencia de los siRNA iniciadores haciendo que la ARNi sea más duradera y más eficiente (Fischer, 2010) (Figura 4).

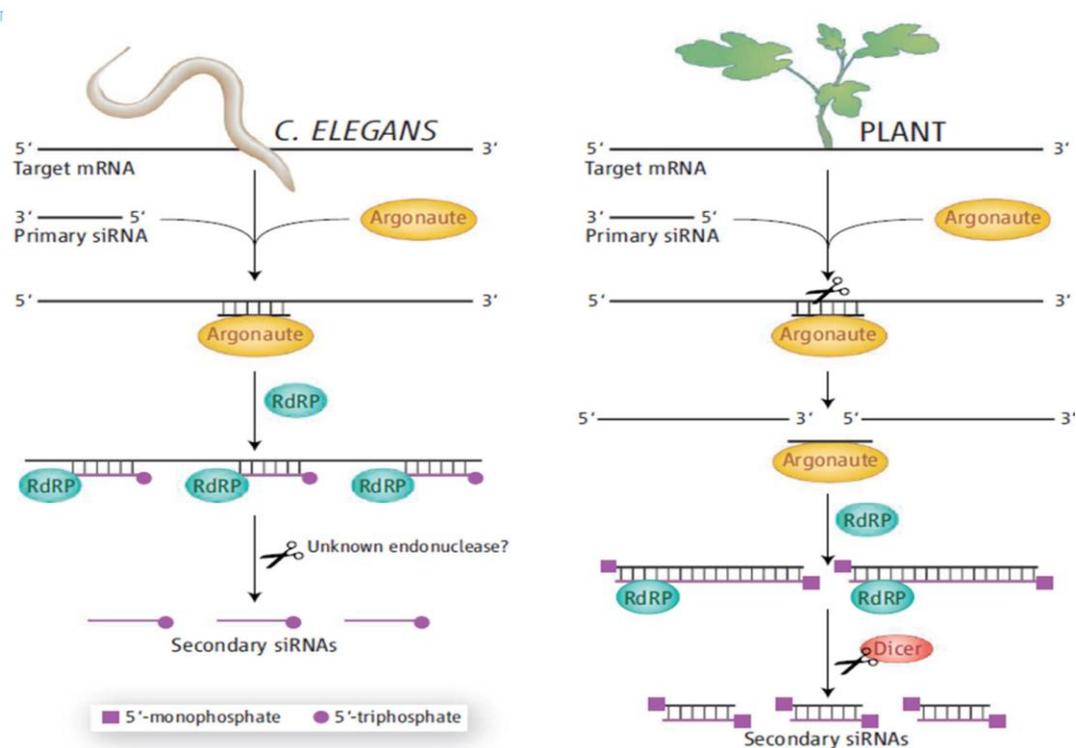


Figura 4: Amplificación de la respuesta en la ARNi transitiva. En la respuesta de amplificación en *C. elegans* el mRNA (hebra en negro) actúa de molde para que RdRP sinteticen siRNA secundarios que son identificados por extremo 5' trifosfato. En plantas los siRNAs secundarios se generan luego de ser cortados por DICER y no tienen el 5' trifosfato generado por RdRP. RdRP ARN polimerasa dependiente de ARN. Modificado de Baulcombe y colaboradores (Baulcombe, 2007).

2.1.2.2 Propagación de la señal de interferencia ARNi sistémico y ARNi ambiental.

En algunos organismos se genera una respuesta sistémica en la que la señal de interferencia se propaga a células y tejidos que no recibieron el RNA iniciador llamada ARNi sistémica. Si el efecto interferente se limita solo a la célula original que incorporó la molécula interferente la interferencia se denomina no sistémica o autónoma.

En *C. elegans* los responsables de estas respuestas son los genes SID-1 y SID-2 que codifican distintas proteínas transmembranas. La proteína SID-1 forma un complejo transmembrana que permite el pasaje pasivo de dsRNAs de una célula a otra pero no desde el ambiente y es responsable del ARNi sistémico (Figura 5).

La ARNi se puede iniciar simplemente sumergiendo estos organismos en una solución con moléculas interferentes (“soaking”) o alimentándolos con bacterias que producen ARNdc (feeding) lo que se conoce como ARNi ambiental. El ARNi ambiental ocurre cuando se induce el silenciamiento al exponer a un organismo a moléculas de ARN presentes en su ambiente. Si a su vez ésta señal interferente se propaga para silenciar un gen entonces se da una respuesta ambiental y sistémica al mismo tiempo (Figura 5).

SID-2 es una proteína transmembrana que se encuentra en la membrana intestinal y permite la entrada de dcRNA desde el medio ambiente pero no es necesaria para la propagación sistémica (Whangbo e Hunter, 2008).

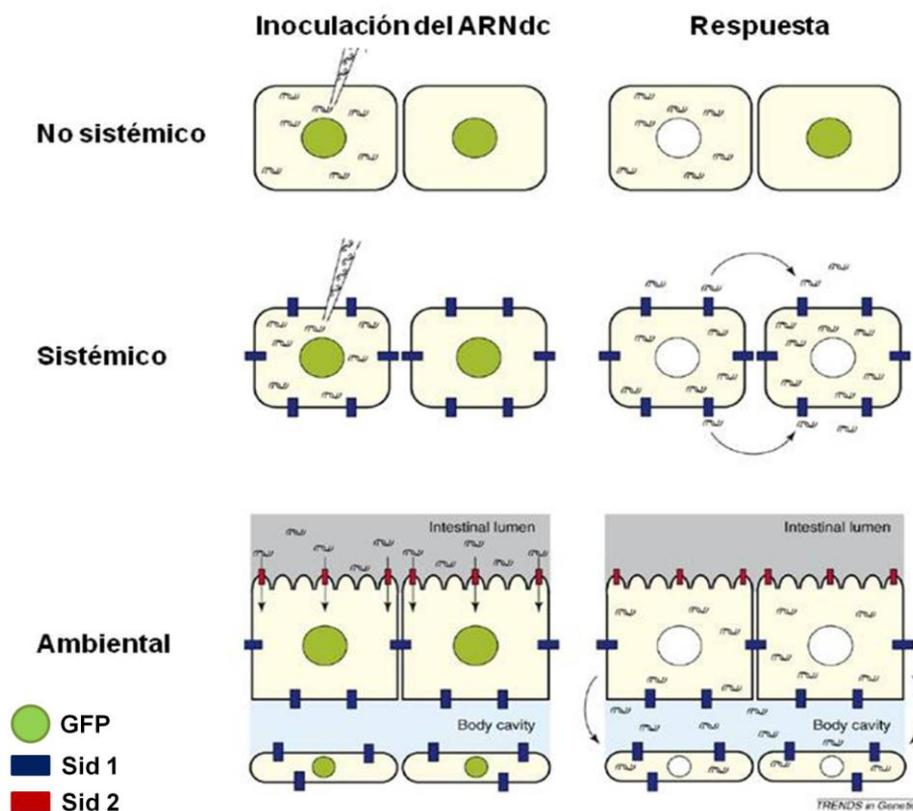


Figura 5: Mecanismos de transmisión de la ARNi. Se ejemplifica los distintos tipos de transmisión basándose en un modelo experimental hipotético donde células que expresan la GFP (círculos verdes) son transfectadas con ARNdc contra este gen. Si la ARNi es exitosa se inhibe la expresión de GFP (células con círculos blancos). Cuando la señal no se propaga (efecto no sistémico) el silenciamiento se da solo en las células que reciben las moléculas interferentes. Cuando el efecto es sistémico la ARNi se propaga entre células vecinas. En la ARNi ambiental las moléculas interferentes pueden ser adquiridas desde el exterior. SID 1 un transportador transmembrana permite que la señal se propague entre células vecinas (rectángulos azules). SID 2 otro transportador permite que las moléculas sean adquiridas desde el exterior y es responsable de la respuesta ambiental (rectángulos rojos). Modificado de Whangbo y colaboradores (Whangbo and Hunter 2008).

2.1.3 piRNAs

Los piwi-RNA (piRNAs) son una especie particular de ARNs de 25–31 nucleótidos expresados principalmente en la línea germinal en humanos, ratones, moscas, y el nematodo *C elegans* (Moazed, 2009; Czech e Hannon, 2016). Para cumplir sus funciones se unen a proteínas PIWI que son una subfamilia de las proteínas argonautas. Si bien es conocida su función protegiendo a las células de la línea germinal de elementos transponibles y otros invasores genómicos asegurando la estabilidad genómica, los detalles de su biogénesis son aún poco claros y su mecanismo de acción varía entre los organismos en que han sido identificados (Saito, 2013; Izumi e Tomari, 2014).

Se han descrito 2 mecanismos de producción de piRNAs distintos que se interconectan entre sí. Uno en que se producen de manera regulada los llamados piRNAs primarios a partir de secuencias genómicas que contienen múltiples secuencias de piRNAs llamadas clusters de piRNAs. En el otro mecanismo se generan piRNAs secundarios por medio de una respuesta de amplificación conocida como “Ping-pong” (Czech e Hannon, 2016; Hira-kata e Siomi, 2016).

2.1.3.1 Clusters de piRNA y biogénesis de piRNAs primarios.

Los clusters de piRNAs se encuentran en distintos loci genómicos, en ratones se ubican en dominios en la eucromatina y en *Drosophila* en regiones de heterocromatina pericentromérica y subtelomérica. En algunos clusters llamados “dual-strand” la transcripción se da en las 2 hebras al mismo tiempo mientras que en otros como en el conocido cluster Flamenco en las células foliculares de *Drosophila* solo se transcribe una sola hebra y se denominan “uni-strand” (Aravin, Hannon e Brennecke, 2007; Brennecke *et al.*, 2007) (Figura 6).

El primer paso en la producción de piRNAs primarios es la transcripción a partir de clusters de piRNAs de precursores de piRNAs por medio de RNA pol II (Czech e Hannon, 2016). Los precursores de piRNA contienen una sola hebra de ARN son exportados al citoplasma para su posterior procesamiento. En las células germinales el procesamiento se da en un dominio perinuclear llamado nuage, mientras que en células foliculares el procesamiento ocurre en estructuras conocidas como cuerpos Yb (Lim e Kai, 2007) (Figura 6).

En el citoplasma los precursores son procesados para generar intermediarios de piRNAs que son cortados y metilados para generar los complejos piRNA-Piwi maduros. En este paso son claves proteínas recientemente descritas como la endonucleasa Zucchini (Zuc) junto con sus cofactores Vreteno, Minotaur y Gaz que generan intermediarios con extremo 5' uracilo que es necesario para el reconocimiento posterior por proteínas Piwi. Estas proteínas se encuentran ancladas a la membrana externa de la mitocondria por lo que este orgánulo cumple una función clave en el procesamiento de piRNAs primarios (Mohn, Handler e Brennecke, 2015; Czech e Hannon, 2016).

Otro corte es necesario para generar el extremo 3' en este paso puede participar nuevamente Zuc dando lugar a la formación de piRNAs en fase asociados a Piwi

(“phased Piwi-associated piRNAs”) o se generan piRNAs maduros por medio de una exonucleasa llamada trimmer y su cofactor Papi. El paso final para completar el procesamiento es necesario para proteger los piRNAs de la degradación e implica la metilación del extremo 3’ de piRNAs por Hen 1 (Czech e Hannon, 2016; Hirakata e Siomi, 2016).

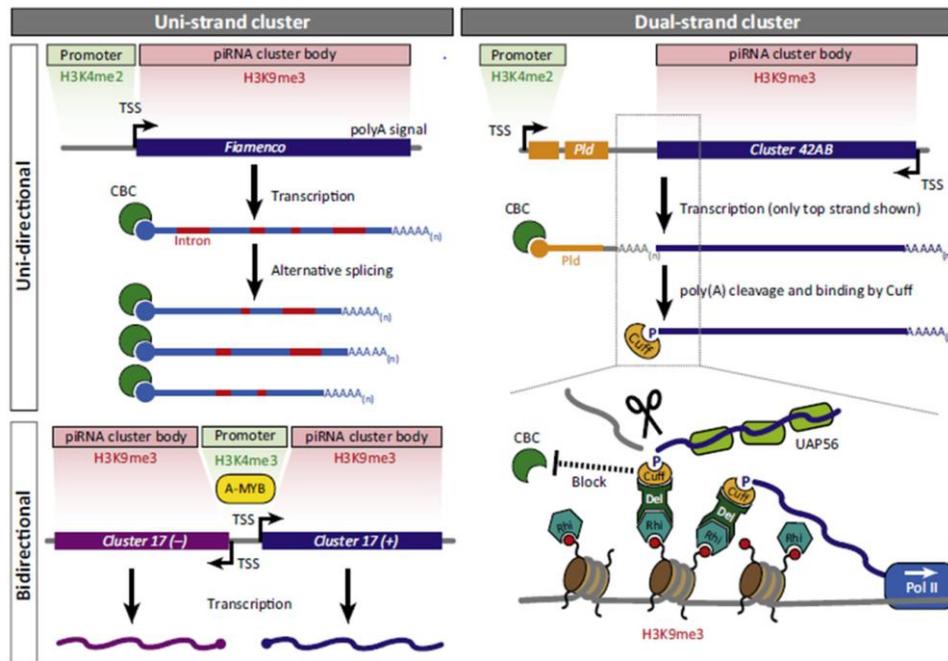


Figura 6: Clusters de piRNAs y biogénesis de piRNAs primarios. A la izquierda 2 ejemplos de clusters “uni-strand”. En la imagen superior el cluster *Flamenco* se transcribe de manera regulada mediante una RNA polimerasa II en una sola dirección (unidireccional) y se generan precursores con caperuja 5’ y cola poli A en el extremo 3’. En la imagen inferior un ejemplo de un clusters “uni-strand” en que comienza la transcripción en dos direcciones (bidireccional). En la imagen de la derecha un cluster “dual-strand” en células germinales de *Drosophila* en el que se transcriben las dos hebras al mismo tiempo a partir de promotores no canónicos de genes vecinos. Tomado de Czech y colaboradores 2016.

2.1.3.2 Producción de piRNAs secundarios, “Ping-pong”, silenciamiento post transcripcional de transposones.

Mediante el mecanismo de “Ping-pong” al mismo tiempo que se silencian post transcripcionalmente transposones activos se producen nuevos piRNAs que amplifican la respuesta de silenciamiento. La producción de piRNAs secundarios por medio de este mecanismo ocurre en el dominio conocido como nuage en la línea germinal.

La proteína Aub se une a piRNAs primarios y se cortan transposones activos liberando piRNAs con orientación sentido con transposones. Los piRNAs sentido

forman complejos con Ago3 que reconocen y procesan transcritos de clusters de piRNAs liberando piRNAs antisentido muy similares en secuencia a piRNAs primarios (Aravin, Hannon e Brennecke, 2007; Czech e Hannon, 2016). Estos se unen a Aub y permiten comenzar otro ciclo de amplificación. Al mismo tiempo los piRNAs pueden ser procesados por Zuc lo que lleva a la producción de piRNAs en fase (Mohn, Handler e Brennecke, 2015) (Figura 7).

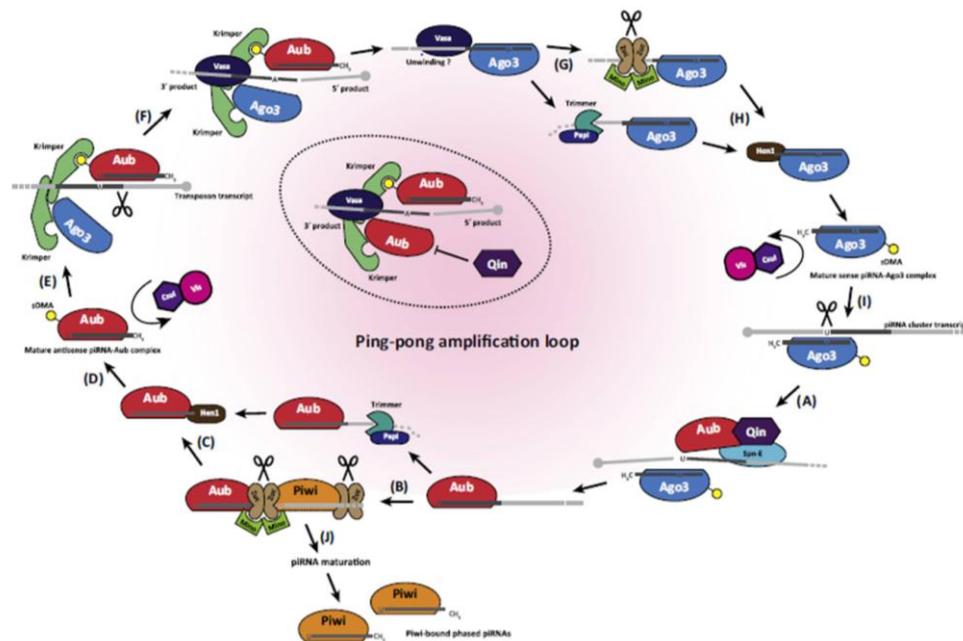


Figura 7: Biogénesis de piRNAs por el mecanismo de “Ping-pong”. La proteína Ago 3 cargada con un piRNA sentido reconoce y procesa clusters de piRNA generando piRNAs antisentido que son captados por la proteína Aub. En el proceso de maduración los piRNAs antisentido son cortados por Zuc y pueden seguir 2 rutas, se producen piRNAs primarios en fase que se unen a proteínas PIWI o los piRNAs se unen a proteínas Aub que continúan su maduración. En la segunda ruta mencionada los piRNA antisentido reconocen por complementariedad de bases transcritos de transposones y los procesan liberando nuevos piRNAs sentido que comienzan otro ciclo de amplificación. Ago3 Argonauta 3; Aub Aubergine. Tomado de Czech y colaboradores 2016.

2.1.3.3 Bloqueo transcripcional de transposones nacientes (TGS).

Evidencia reciente sugiere que la vía piRNA puede trasladarse al núcleo donde produce el bloqueo a nivel de la transcripción de transposones nacientes. En el silenciamiento transcripcional participan múltiples proteínas en asociación con los complejos Piwi. Algunos de los mecanismos propuestos para el TGS son formación de heterocromatina, metilación de histonas y metilación de ADN (Czech e Hannon, 2016).

2.1.3.4 piRNAs en helmintos.

En helmintos se ha demostrado que la vía piRNA está presente en el nematodo *C. elegans* (Fischer, 2010). En este organismo los piRNA llamados 21U RNAs se transcriben por medio de un RNA pol II que genera precursores de 26 pb aproximadamente. Se pueden distinguir dos clases o tipos de 21 U RNAs tipo 1 y tipo 2 que se transcriben de manera regulada por medio de factores de transcripción independientes. Una vez generados ambos tipos de 21 URNAs sufren modificaciones hasta generar el piRNA maduro de 21nt (Izumi e Tomari, 2014).

En platelmintos la disponibilidad de genomas de varios integrantes de este grupo ha permitido realizar búsquedas informáticas para identificar ortólogos de proteínas Piwi en este grupo. En este sentido hay trabajos recientes que muestran que estas proteínas no están presentes en trematodos y cestodos y proponen mecanismos alternativos para mantener la integridad del genoma en la línea germinal de estos organismos (Skinner *et al.*, 2014).

3 ARN pequeños en platelmintos parásitos

Los avances en el silenciamiento génico en el modelo *C. elegans* llevaron a pensar que era fácilmente transferible a otros helmintos. Algunos experimentos tempranos mostraron que era factible utilizar estos nuevos enfoques en platelmintos de vida libre como planarias, donde rápidamente se encontraron ARN pequeños de los tres tipos principales (miRNA, siRNA y piRNA) (Friedländer *et al.*, 2009; Sasidharan *et al.*, 2013). Los estudios rápidamente se extendieron a *Schistosoma mansoni* y luego a otros platelmintos parásitos.

3.1 miRNAs

Los miRNA están conservados en casi toda la escala biológica desde humanos a virus y constituyen importantes reguladores de la expresión génica actuando fundamentalmente a nivel post transcripcional (Huang e Zhang, 2014). En la última versión (numero 21) de la base de datos publica mirBase están descritos aproximadamente 35828 miRNA maduros que pertenecen a 223 especies distintas (Kozomara e Griffiths-Jones, 2014). En conjunto participan en la regulación de procesos importantes como metabolismo, desarrollo, metilación de ADN, modificación de la cromatina, desarrollo neurológico, respuesta inmune y defensa contra infecciones virales (Huang *et al.*, 2011).

Se han utilizado estrategias experimentales, bioinformáticas o combinaciones de estas para identificar miRNAs en distintos organismos. En las estrategias experimentales se utilizan distintas metodologías que permiten obtener miRNAs mediante secuenciación de una muestra. Las estrategias experimentales tienen la ventaja de que permiten identificar miRNAs expresados en distintos tejidos o en distintas etapas de desarrollo de un organismo, o en el caso de parásitos identificar miRNAs expresados de manera diferencial en distintos estadios de desarrollo. En los encares computacionales se utilizan datos de secuencias genómicas y/o de transcriptomas

sobre los que se aplican diversos criterios de búsqueda para identificar miRNAs. Tener acceso a un genoma de referencia sobre el que mapear candidatos a miRNAs generados por secuenciación o por búsquedas bioinformáticas buscando si están presentes precursores típicos permite validar las secuencias encontradas.

En los organismos en los que los genomas no están disponibles esta tarea se dificulta por lo que muchas secuencias de ARNs pequeños no pueden ser asignadas como miRNAs.

La mayoría de los miRNAs identificados pertenecen al superfilum deuterostomados que incluye al hombre donde los miRNA están ampliamente estudiados sobre todo en cáncer (Berindan-Neagoe *et al.*, 2014). En esta enfermedad los miRNAs están desregulados en una gran variedad de cánceres donde actúan como oncogenes o supresores de tumorales por lo que son llamados oncomiRNAs (Manikandan *et al.*, 2008; Subramanian *et al.*, 2015). También se ha encontrado alteraciones de los niveles de miRNAs en patologías muy variadas como arteriosclerosis (Chen e Juo, 2012; Chen *et al.*, 2013), infarto de miocardio (Devaux *et al.*, 2013; Li, Y. Q. *et al.*, 2013) y depresión (Li, Y. J. *et al.*, 2013).

En platelmintos un filo de animales invertebrados que contiene unos 20000 integrantes los miRNAs han sido identificados en unas pocas especies (Ver Tabla 1). Sobre todo se ha avanzado en el estudio de los miRNAs en planarias donde el interés se centra en estudiar estos mecanismos de la expresión génica vinculado a su gran capacidad regenerativa (Sasidharan *et al.*, 2013) mediada por un tipo particular de células pluripotentes similares a células madres llamadas neoblastos. Por esta razón las planarias son un excelente modelo para estudiar el rol de los miRNAs en la biología de células madre y en procesos como regeneración y desarrollo (Friedländer *et al.*, 2009). A partir de estos trabajos han surgido datos interesantes sobre la regulación de la expresión génica en estos organismos y representan un punto de comparación importante para entender la influencia que tienen estas vías en procesos claves vinculados al parasitismo.

En parásitos los miRNA fueron estudiados principalmente en especies capaces de producir enfermedades humanas como *S. mansoni* (De Souza Gomes *et al.*, 2011; Simões *et al.*, 2011) *S. japonicum* (Cai *et al.*, 2011; Cai *et al.*, 2013), *Clonorchis sinensis* (Huang *et al.*, 2012), *Opisthorchis felinus* y *Opisthorchis viverrin* (Ovchinnikov *et al.*, 2015), *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica* (Xu *et al.*, 2012), *Orientobilharzia turkestanicum* (Wang *et al.*, 2012), *Echinococcus granulosus* (Cucher *et al.*, 2011), *E. multilocularis*, *Taenia saginata* (Ai *et al.*, 2012) y *Dicroelium dendriticum* (Bernal *et al.*, 2014) (Tabla 1).

Estos trabajos demuestran la presencia de estos importantes reguladores de la expresión génica en estos parásitos. En *S. mansoni* mediante predicción de blancos se demostró que los miRNAs podrían participar de la regulación de procesos metabólicos, respuesta sistema inmune, locomoción, reproducción diferenciación sexual y respuesta a estímulos. Estos resultados son alentadores pero faltan datos funcionales que confirmen esta hipótesis (Fromm *et al.*, 2013).

La importancia de los miRNAs en la regulación del desarrollo queda demostrada por trabajos que muestran una expresión diferencial de los miRNAs a lo largo de los

complejos ciclos de vida de estos parásitos como se ve en *Schistosomas* y *Echinococcus granulosus*. Los miRNAs expresados particularmente en estadios invasivos podrían desempeñar papeles claves en los procesos de invasión al huésped lo que los convertiría en blancos moleculares para controlar estas infecciones (Cai *et al.*, 2011).

Clase	Especie	Referencia
Turbellaria	<i>Schmidtea mediterranea</i>	(Sasidharan <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Dugesia japonica</i>	(Qin <i>et al.</i> , 2012)
Monogenea	<i>Gyrodactylus salaris</i>	(Fromm <i>et al.</i> , 2013)
Trematoda	<i>Orientobilharzia turkestanicum</i>	(Wang <i>et al.</i> , 2012)
	<i>Schistosoma mansoni</i>	(De Souza Gomes <i>et al.</i> , 2011; Simões <i>et al.</i> , 2011)
	<i>Schistosoma japonicum</i>	(Hao <i>et al.</i> , 2010; Cai <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Clonorchis sinensis</i>	(Xu <i>et al.</i> , 2010)
	<i>Opisthorchis viverrini</i>	(Ovchinnikov <i>et al.</i> , 2015)
	<i>Opisthorchis felini</i>	(Ovchinnikov <i>et al.</i> , 2015)
	<i>Eurytrema pancreaticum</i>	(Xu <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Fasciola gigantica</i>	
	<i>Fasciola hepatica</i>	(Xu <i>et al.</i> , 2012; Fromm <i>et al.</i> , 2015)
	<i>Dicrocoelium dendriticum</i>	(Bernal <i>et al.</i> , 2014)
Cestoda	<i>Echinococcus granulosus</i>	(Cucher <i>et al.</i> , 2011)
	<i>Echinococcus multilocularis</i>	(Cucher <i>et al.</i> , 2011)
	<i>Taenia saginata</i>	(Ai <i>et al.</i> , 2012)
	<i>Hymenolepis microstoma</i>	(Jin <i>et al.</i> , 2013)

Tabla 1: miRNAs presentes en platelmintos.

Los miRNAs encontrados en parásitos de la familia Opistorchiidae causantes de enfermedades como son las opistorquiasis y la clonorquiasis que en su etapa crónica se asocian al desarrollo de cáncer del tracto biliar pueden contribuir al conocimiento de los cánceres inducidos por parásitos (Ovchinnikov *et al.*, 2015).

Se han encontrado miRNAs de parásitos libres en la circulación de huéspedes infectados por *S. japonicum* (Hoy *et al.*, 2014) o en vesículas extracelulares (VE) en el caso de los trematodos *Dicrocoelium dendriticum* y *Fasciola hepatica* (Bernal *et al.*, 2014; Fromm *et al.*, 2015). Los miRNAs libres en la circulación o contenidos en VE podrían desempeñar un rol importante durante el proceso de invasión al huésped facilitando el parasitismo. Como son estables en la circulación estos miRNAs podrían utilizarse como biomarcadores de enfermedades asociadas a estos parásitos.

A pesar de las importantes funciones predichas para los miRNAs en platelmintos el número de miRNAs encontrados es muy bajo debido a una pérdida considerable de miRNAs conservados en otros lofozoos (Fromm *et al.*, 2013). Se ha sugerido que la pérdida de miRNAs en platelmintos puede deberse a una menor complejidad morfológica de estos parásitos. Esta hipótesis no tiene en cuenta que los trematodos tienen ciclos de vida complejos con estadios muy distintos para lo cual son necesarias grandes modificaciones de la expresión génica. En este sentido no se conoce la

función de la mayoría de los miRNAs que se pierden y puede ser que otros mecanismos de control de la expresión génica estén presentes para darles la gran plasticidad que tienen a este grupo de parásitos (Fromm *et al.*, 2013). Otra característica importante es que los miRNAs son más divergentes presentando distintos niveles de conservación con miRNAs de organismos muy distintos como vertebrados, insectos, y parásitos lo que puede ser una estrategia para adaptarse a distintos hospederos y distintos ambientes (Xu *et al.*, 2010).

En paralelo a esto, todos los platelmintos parásitos han perdido la vía de piRNA, que es relevante en el silenciamiento de transposones en la línea germinal, por lo que se desconoce cómo cubren esta función (Friedländer *et al.*, 2009; Ku e Lin, 2014; Skinner *et al.*, 2014).

3.2 Interferencia de ARN

El interés en los ARNs pequeños en platelmintos surgió a partir de los rápidos avances del RNAi en *C. elegans*, y como medida tendiente a la búsqueda de alternativas a el análisis de la función génica (Kalinna e Brindley, 2007; Hagen *et al.*, 2012).

La evaluación de los ensayos de ARNi en *C. elegans* tradicionalmente se basa en la aparición de fenotipos, pero sin confirmar si efectivamente hay disminución de los niveles de ARNm y proteínas. Se ha observado que no siempre los fenotipos generados por el silenciamiento se corresponden con los generados por “knock-out” contra el mismo gen. En los trabajos de ARNi a gran escala un 8 % de los genes producen fenotipos distintos de los producidos por “knock-out” (Kamath *et al.*, 2003). En otros trabajos con genes aislados los mutantes de pérdida de función y la ARNi contra un mismo gen no producen el mismo fenotipo (Pispa *et al.*, 2008). Basados en estos datos no es seguro extrapolar los resultados obtenidos en *C. elegans* a otros organismos hasta no determinar claramente de los efectos provocados por el silenciamiento. Para esto es necesario ser más rigurosos en cómo se controlan los experimentos de ARNi analizando la expresión en el gen blanco y en otros genes buscando posibles efectos inespecíficos, “off-targeting” o analizando el efecto a nivel de la proteína por ensayos de actividad o por anticuerpos.

En los nematodos *H. contortus* y *O. ostertagi* no todos los genes pueden ser silenciados mediante ARNi y los resultados son difíciles de reproducir (Geldhof *et al.*, 2006; Visser *et al.*, 2006). Por su parte los parásitos *Oscheius* sp. *Pristionchus pacificus* y *Heligmosomoides polygyrus*, no son susceptibles al silenciamiento génico mediado por ARNi (Louvet-Vallée *et al.*, 2003; Pires-Dasilva e Sommer, 2004; Lendner *et al.*, 2008). En *Heligmosomoides polygyrus* la falla de respuesta a la ARNi podría deberse a que no están presentes genes SID1/2 que participan de la captación (“uptake”) y propagación (“spread”) de la señal. Estos resultados dispares muestran las complejidades para transferir la tecnología ARNi en nematodos.

En Platelmintos si bien han habido progresos con el uso de esta tecnología solo se ha establecido como técnica de rutina para la elucidación de la función génica en planarias, avanzándose en la caracterización de genes involucrados con la regeneración y el desarrollo (Newmark, 2005). En trematodos la ARNi ha sido

probada y optimizada en *Schistosoma mansoni* y *S.japonicum* (Kalinna e Brindley, 2007) (Krautz-Peterson *et al.*, 2007) (Ndegwa, Krautz-Peterson e Skelly, 2007) y descrita en *S. haematobium* (Rinaldi *et al.*, 2011), *F. hepatica*, (Mcgonigle *et al.*, 2008; Rinaldi *et al.*, 2008; Mcveigh *et al.*, 2014), *Opisthorchis viverrini* (Sripa *et al.*, 2011; Thanasuwan *et al.*, 2014), *Clonorchis sinensis* (Wang *et al.*, 2014) Y recientemente *Opisthorchis felineus* (Pakharukova *et al.*, 2015).

Pese a que la ARNi comienza a usarse con bastante frecuencia como herramienta de análisis de la función génica existen algunos puntos no aclarados sobre su mecanismo de acción y algunos problemas sin resolver. Se ha visto sobre todo en *Schistosoma* que no todos los genes se afectan por igual, que hay estadios más susceptibles al silenciamiento, y que al interferir un gen se ve afectada la expresión de otros genes (efectos off-targeting) (Geldhof *et al.*, 2007; Krautz-Peterson *et al.*, 2010). Otro punto importante cuando se trabaja con organismos enteros es que no se sabe qué proporción de la población tratada de parásitos incorpora efectivamente las moléculas interferentes. Estos inconvenientes han dificultado el uso de la ARNi como técnica de rutina en parásitos.

Basados en estos datos creemos que es necesaria una estandarización buscando mejorar la selectividad y especificidad del efecto. Esto es particularmente relevante cuando se tratan organismos enteros donde la accesibilidad a los distintos tejidos puede ser limitada. Por este motivo decidimos revisar críticamente la información existente en modelos de trematodos.

4 Experimentos de ARNi en trematodos.

4.1 Selección del parásito y estadios a analizar

Si bien en trematodos la ARNi es la única herramienta de genómica funcional disponible solo se ha utilizado de manera frecuente para interrogar la función génica en *S. mansoni*. En este organismo se ha analizado la función de distintos genes en varios estadios de este parásito. Se ha logrado silenciar de manera exitosa la expresión de genes en huevos (Freitas, Jung E e Pearce, 2007; Rinaldi *et al.*, 2009), adultos (Atkinson *et al.*, 2010; Tran *et al.*, 2010), miracidios (Mourão *et al.*, 2009; Taft e Yoshino, 2011), esporocistos (Dinguirard e Yoshino, 2006; Mourão *et al.*, 2009) y esquistosómulas (Atkinson *et al.*, 2010; Mcveigh *et al.*, 2011). En esta especie existe experiencia en el mantenimiento en cultivo de adultos, y se ha avanzado en la transformación in vitro de miracidios a esporocistos, y de cercarias a esquistosómulas, lo que ha posibilitado estos avances (Basch, 1981) (Tabla 2).

En *S. mansoni* se han encontrado diferencias en la eficiencia del silenciamiento entre distintos estadios. Al silenciar el mismo gen en esquistosómulas y adultos el nivel alcanzado de silenciamiento es mayor en esquistosómulas. Tran y colaboradores muestran que utilizando ARNdc contra tetraspanina 2 el silenciamiento es de 90% en esquistosómulas y de 75% en adultos mientras que los niveles de silenciamiento del gen tetraspanina 1 son similares en ambos estadios (Tran *et al.*, 2010). Estos resultados son de dos experimentos en que se trataron los parásitos por “soaking” con 1 ng/μl de ARNdc recambiando el medio y el ARNdc cada 2 días.

REFERENCIA	EstAdulto	Genes AnalizAdultos	Localización gen	Molécula utilizada	Método de Suministro	Concentración de moléculas interferentes
S. mansoni						
Skelly et al. 2003	Schistosomula	SmCat8	Secr/Dig	ARNdc	S	0,25 ng/ml.
Correnti et al. 2005	Schistosomula	SmCat81	Secr/Dig	ARNdc	E	100 ng/ml
Kuntz et al. 2007	Schistosomula	SmTGR	Intracel	ARNdc	S	54 ng/ul
Rinaldi et al. 2008	Schistosomula	Reportero LUC	Reportero	ARNdc	E	30 ng/ul
Morales et al.2008	Schistosomula	SmCD/SmLap1/SmLap2	Secr	ARNdc	E	100 ng/ul
Stefanic et al. 2010	Schistosomula	CB1.1CB1.2/SmCC/SmCD/CB2/annexin/Sm29/GSK3/MetAP/PP-2a/NEC/nMT	Dig/Teg/OTRAS	ARNdc	E/S/ES	30 ng/ul
Atkinson et al. 2010	Schistosomula	SmPal.1/SmPHM	S Nervioso	ARNdc	E/S	1000 ng/ul
McVeigh et al.2011	Schistosomula	Sm-npp-1/SmAP	S Nervioso	ARNdc	E	10 µg
Farias et al. 2013	Schistosomula	SmCD59.1 / SmCD59.2	Teg	siRNA	E	5,6 µM
Patocka et al. 2013	Schistosomula	SmSERT	S Nervioso	siRNA	E	50 nM
Da'dara et al. 2013	Schistosomula	SNaK1a/SNaK1b	Transmem	siRNA	E/TVI	E 2,8 nM/TVI 50 µg
Rojo-Arreola et al. 2014	Schistosomula	SmHMGR	Transmemb	ARNdc	S	2 ARNdc 15 µg c/u
MacDonald et al. 2014	Schistosomula	SmACC-1/SmACC-1	S Nervioso	siRNA	S	50 nM
Andrade et al 2014	Schistosomula	SmCaMK2/SmJNK/SmERK1/SmERK2/SmRas	Diverso	ARNdc	S/Ratones inf Sc trate	100 nM
MacDonald et al. 2015	Schistosomula	SmGAR	S Nervioso	siRNA	S	50 nM
Ndegwa et al. 2007	Adulto /Schistosomula	SmAP	Teg/Dig	ARNdc/siRNA	E/S	ARNdc 25 µg/siRNA 2,5 µg
KrautzPeterson et al. 2007	Adulto /Schistosomula	SmCB	Secr/Dig	ARNdc/siRNA	E/S	0.025-50 µg
Tran et al. 2010	Adulto /Schistosomula	SmTsp1/SmTsp2	Teg	ARNdc	E/S	1 ng/ul/+ARNdc c/2 días
KrautzPeterson et al. 2010	Adulto /Schistosomula	SPRM1hc/SmAQP	Intravasc	ARNdc/siRNA	E/S	ARNdc 20 µg/siRNA 2,5 µg
Krautz-Peterson et al. 2010	Adulto /Schistosomula	SGTP1/SGTP4	Teg	ARNdc/siRNA	E/S	Ad 5,6 µM/Schis 2,6 µM
Bhardwaj et al. 2011	Adulto /Schistosomula	SmNPP-5	Teg	siRNA	Ratones inf Sch tratad	10 µg ARNdc
Patocka et al. 2014	Adulto /Schistosomula	Sm5HTR	S Nervioso	siRNA	S	Ad 5 µg/Sch 50 nM
Delcroix et al. 2006	Adulto	SmCB1/SmCL1/SmCD/SmAE	Dig/Secr	ARNdc	S	400 µg
Swierczewski et al. 2009	Adulto	SmPKAc	Intracel	ARNdc	E	10-30 µg en 100 µl
Krautz-Peterson et al. 2008	Adulto	SmAE/SmCB	Secr	siRNA	E	10 µg
Beckmann et al. 2010	Adulto	SmTK4	O Reproduc	siRNA	E	25 µg
Faghiri et al. 2010	Adulto	SmAQP	Teg	siRNA	E	5 µg
Kasinathan et al. 2011	Adulto	SMDR2/SmMRP1	Transmem	siRNA	E	3 µg
Beckmann et al. 2012	Adulto	SmbInt1/SmDia	O Reproduc	ARNdc/siRNA	E	ARNDC 25-40 µg/siRNA 2,5 µg
Parker-Manuel et al. .2015	Adulto	SmERG		ARNdc	E	25 µg
Pereira et al. 2008	Huevos	HGPRTase	Intracel	3 siRNA	TVI	5 µg
Freitas et al. 2007	Huevos	SmInAct	O Reproduc	ARNdc	S	1ug/ul
Rinaldi et al.2009	Huevos	SmLap1/SmLap2	Dig	ARNdc	S	20 ng/ul/+ARNdc diario
Taft et al. 2011	Miracidio/ Esporocisto	SmCaM1/SmCaM2	Diverso	ARNdc	S	100 nM
Boyle et al. MBP2003	Miracidio/ Esporocisto	SmsGTP1/SmGAPDH LDH/cal.cineurin	Transp membr/intracel	ARNdc	S	10, 50 100 nM
Mourao et al.2009	Miracidio/ Esporocisto	B/SmAdulto2/SmAdulto1/Sm14.3.3/Smeg/PepCK/cal.pain/HEXBP-Tag623/fibrillarín/EF1a/Rho1/Rho2/Sma2/SPO1/PKCβ/PKC receptor/DHHC/glycoprotein K5/SmZF1/SmRbx/GPx/TPx-1/TPx-2/SOD/GST26/GST28	Diverso	ARNdc	S	50 nM 500 parasitos
Dinguirard et al. 2006	Miracidio/ Esporocisto	SmSRB	Teg	ARNdc	S	50 nM
Mourao et al. 2009	Esporocisto	GST26/GST28/Prx1/2/GPx/SOD	Diverso	ARNdc	S	50 nM
Nabhan et al. 2007	Cercaria	SmRPN11/POH1	Intracel	siRNAs	S	50nM
S. hematobium						
Rinaldi et al. 2011	Adulto/Huevos/Schistosomula	Sh-TSP-2/LUC	Teg	siRNA/ARNdc	ES	10 µg
S. japonicum						
Kumagai et al. 2009	Schistosomula	SmPrx1/SmPrx2	Secr/Dig/GV	ARNdc	S	100 nM
Li et al. 2010	Schistosomula	WNT4		siRNAs	E/S	5-40 µg
Zou et al. 2011	Schistosomula	SJCRHSP-24	lulas acinares pancreatic	siRNA	S	100 nM
Wu et al. 2011	Schistosomula	14 Sj-tsp	Teg	siRNA	S	2,5 µg
Ren et al. 2013	Schistosomula	Tsunagi/Y14	O Reproduc	ARNdc	Ratones inf Sch tratad	40 µg
Cao et al. 2014	Schistosomula	Lgl	Teg	siRNA	S/Inyeccion siRNA	100 nm
Liu et al. 2015	Schistosomula	SJZFP1	Intracel	siRNA	S/TVI	100 nM
Cheng et al. 2005	Adulto	SJGCP	O Reproduc	siRNA	S	12,5 a 200 nM
Cheng et al. 2009	Adulto	SJGCP	O Reproduc	siRNA	S/TVI	50 nM 200 nM/TVI 400 µg/ml
He et al. 2012	Adulto	TYRs, SJTYR1 SJTYR2	Teg/Gland Vitel	siRNA	S	50 and 200 nM
You et al. 2015	Adulto	SJIR1/SJIR2	1 Teg/Dig SJIR2 org repro	siRNA	S	12,5 µg
Zhang et al. 2015	Adulto	SJGPX	Organos reproduct	ARNdc	S	10-50 nM
Yang et al. 2012	Adulto	SJCoIV		siRNA	S/Inyeccion siRNA	100 nM
F hepatica						
Rinaldi et al. 2008	JRD	LAP/LUC	Dig/Reportero	ARNdc	E	30 ng/ul
McVeigh et al. 2015	JRD	FheCatB2/FheCatL/FheFABP/FheLAP/FhemGST/FhevGST/FhesGST/siGST1/siGST2/siGST3	Diverso	ARNdc/siRNA	S	0,05-50 ng/ul
Dell'Oca et al. 2015	JRD	LAP	Dig	ARNdc/siRNA	E/S/ES/SP	2,5, 10 ng/ul
McGonigle et al.2008	JRD/Adulto	CL1/CB1	Dig	ARNdc	S	100 ng/ml
O viverrini						
Sripa et al. 2011	Adulto	Ov-CB-/Ov-Grn1	Secr	ARNdc	E	100 µg
Thanasuan et al. 2014	Adulto	Ov-aqp1/Ov-aqp2	Teg	ARNdc	ES	50 µg
Papatpremsiri et al. 2015	Adulto	Ov-grn-1	Secr	ARNdc	ES	50 µg
C sinensis						
Wang et al. 2014	Adulto/Metacercaria	Cs-eno	Secr/Transmemb	ARNdc	S	10 µg/ml
O. felineus						
Pakharukova et al. 2015	Adulto	CYP	Canal.es excretorios	ARNdc	ES	50 µg

Tabla 2: Análisis de la ARNi en trematodos. Se muestran los parásitos trematodos en los que la ARNi ha sido exitosa. Analizando estadio, gen blanco, localización del gen blanco y método de suministro.

Secr, Secretado; Teg, Tegumento; Dig, Digestivo; Intracel, Intracelular; S Nervioso, Sistema Nervioso; Intravasc, Intravascular; Transmem, Transmembrana; O Reproduc, Órganos

Reproductores; GV, Glandula Vitelina; E, Electroporación; S, “soaking”; ES, Electro-soaking; SP, “soaking-poration”.

Un fenómeno similar aunque de menor magnitud se ve al silenciar catepsina B en estos mismos estadios donde la supresión alcanzada es de 90 % y 95% en adultos y esquistosómulas luego de tratarlos por electroporación con 25 mg de ARNdc en experimentos separados (Krautz-Peterson *et al.*, 2007). Llamativamente los adultos parecen ser menos susceptibles, aunque se trata de experimentos por separado y las diferencias de expresión no fueron normalizadas entre estos dos estadios..

Asimismo se vio que incluso dentro de esquistosómulas que la susceptibilidad al silenciamiento varía dependiendo de cuando estas son expuestas al silenciamiento. Las esquistosómulas cultivadas por más de 7 días son más susceptibles al silenciamiento que las recién transformadas (Krautz-Peterson *et al.*, 2007). Esto sugiere que la accesibilidad de las moléculas interferentes difiere entre los distintos estadios de desarrollo y/o que la maquinaria de silenciamiento puede variar a lo largo del desarrollo, por lo que la edad de los parásitos es otro factor que hay que considerar en *S. mansoni* y otros trematodos en general.

La selección del estadio en que se va a realizar la ARNi es otro elemento importante a considerar. En casi todos los casos los parásitos adultos y huevos son los más fáciles de obtener. Los huevos tienen cubiertas duras y poco permeables por lo que su tratamiento no es sencillo. Los estadios de “vida libre” son breves, por lo que resultan ventanas interesantes pero difíciles de obtener y mantener para ensayos de silenciamiento. Estas dificultades hacen que fuera de *S. mansoni* los estudios de silenciamiento en trematodos sean realmente escasos con reportes en *S. japonicum*, *S. haematobium*, *F. hepatica*, *O. viverrini* y *C. sinensis* que ponen de manifiesto la existencia de una vía funcional de silenciamiento disponible para estudiar la función génica en estos parásitos (Kumagai *et al.*, 2009; Sripa *et al.*, 2011; He *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014).

Exceptuando schistosomas, *C. sinensis* es el único trematodo en que la ARNi ha sido demostrada en 2 estadios distintos, donde se logro silenciar el gen enolasa expresado en la membrana celular y encontrado en PES de este parásito en los estadios adulto y metacercaria. (Wang *et al.*, 2014). En *F. hepatica* intentaron silenciar sin éxito el gen Catepsina L1 en adultos (Mcgonigle *et al.*, 2008).

4.2 Genes blanco a estudiar.

Similar a lo encontrado en los nematodos *H. contortus* y *O. ostertagi* (Geldhof *et al.*, 2006; Visser *et al.*, 2006) en *S. mansoni* no todos los genes se afectan por igual. Por ejemplo Mourao y colaboradores analizaron el efecto del silenciamiento en 32 genes y evidenciaron un “knock-down” importante y específico contra solo 12 de estos genes. Otro hecho llamativo de este trabajo es que no todos los genes silenciados inducen un fenotipo y hay ARNdc que sin disminuir la expresión del gen blanco inducen fenotipos (Mourao *et al.* 2009) lo que sugiere que los fenotipos son debidos a otros efectos posiblemente no específicos.

Parecería ser que la eficiencia del silenciamiento depende del gen seleccionado y de su expresión en el parásito. Los genes expresados en el intestino y tegumento que son los más accesibles a la ARNi se silencian con mayor éxito. En este sentido, en un trabajo ilustrativo comparando el silenciamiento en esquistosómulas en genes expresados en distintos tejidos, Stefanić y colaboradores demuestran que los niveles de silenciamiento son superiores al 75% para genes expresados en tegumento y tubo digestivo, mientras que para genes expresados en otros tejidos el “knock-down” en algunas ocasiones llega solamente a un 40% (Stefanić *et al.*, 2010). Otros trabajos apuntan en el mismo sentido, por ejemplo para genes que se expresan en el tejido nervioso donde el silenciamiento alcanzado es de 54% (Mcveigh *et al.*, 2011) y para genes expresados en células germinales en que solo llega a un 32% (Beckmann, Buro, *et al.*, 2010).

Para algunos genes las diferencias en la eficiencia de la ARNi no pueden ser explicadas por el tejido donde el gen se expresa. La estructura del gen, la vida media del mRNA y/o de la proteína podrían determinar una pobre respuesta a la ARNi ya que genes expresados en el mismo tejido tienen susceptibilidad diferente a la ARNi (Krautz-Peterson *et al.*, 2010).

En *O. viverrini* Sripa y colaboradores pudieron silenciar por primera vez 2 genes endógenos en el estadio adulto de este parásito. En los genes seleccionados no se pudo alcanzar el mismo nivel de silenciamiento. Al tratar parásitos con ARNdc contra catepsina B el silenciamiento alcanzado fue superior a 90% y se mantuvo por 9 días. Sin embargo al someter a los parásitos al mismo tratamiento pero utilizando ARNdc contra el gen de la granulina el efecto fue mucho más modesto con una reducción de 60 % en la expresión de dicho gen, que volvió rápidamente a los niveles de expresión normales (Sripa *et al.*, 2011). En un reporte más reciente en este mismo parásito se silenciaron de forma exitosa los genes de acuaporina expresados en el tegumento. En este trabajo el silenciamiento se mantuvo hasta 16 días post tratamiento luego de tratar a parásitos adultos con electroporación y “soaking” posterior con el agregado de mas ARNdc al medio de cultivo (Thanasuwan *et al.*, 2014).

En *F. hepatica* dos trabajos en 2008 ambos en el estadio juvenil, demostraron que la ARNi es viable (Mcgonigle *et al.*, 2008; Rinaldi *et al.*, 2008; Mcveigh *et al.*, 2014). En ambos trabajos utilizaron ARNdc largos como moléculas interferentes en concentraciones elevadas mediante dos métodos de delivery diferentes. McGonigle y colaboradores lograron silenciar genes endógenos mediante “soaking” usando 100 ng/μl de ARNdc. Al mismo tiempo Rinaldi de nuestro grupo logro silenciar un gen reportero exógeno (“firefly luciferase”) y el gen endógeno Leucin Aminopetidasa (FhLAP) usando 30 ng/μl de ARNdc. Si bien ambos trabajos demuestran una reducción consistente en los niveles de mRNAs necesaria la optimización de esta herramienta en este parásito.

4.3 El diseño experimental

4.3.1 Suministro de moléculas interferentes (delivery)

Las primeras técnicas utilizadas para introducir constructos de ADN o RNA en *S. mansoni* fueron la biolística (bombardeo de partículas cubiertas de ADN) y la electroporación sometiendo a los parásitos a un pulso eléctrico que genera poros transitorios en las membranas celulares permitiendo la entrada de partículas (Correnti e Pearce, 2004; Wippersteg *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2005).

El descubrimiento de la ARNi en el nematodo *C. elegans* llevo al desarrollo de nuevos métodos de suministro como microinyección de partículas en las gónadas y cavidades corporales (Fire *et al.*, 1998), “soaking” sumergiendo los parásitos en una solución con moléculas interferentes (Tabara, Grishok e Mello, 1998), “feeding” alimentándolos con bacterias que expresan el ARNdc deseado (Kamath *et al.*, 2001; Kamath *et al.*, 2003) y transgénesis utilizando vectores virales (Figura 8). Estas herramientas fueron adaptadas a otros organismos intentando desarrollar la interferencia de ARN con resultados dispares. Mientras que en algunos nematodos la ausencia de genes relevantes para captar y propagar la señal de interferencia hacen que sean refractarios de ser silenciados por “soaking”o “feeding” (Dalzell *et al.*, 2011), estas metodologías pudieron aplicarse en planarias con relativo éxito (Rouhana *et al.*, 2013).

De las metodologías implementadas por primera vez en *C. elegans* es el “soaking” el que ha dado mejores resultados en *S. mansoni* y otros trematodos. Hoy en día “soaking”, electroporación y combinaciones de estos son los métodos más usados para introducir moléculas interferentes en trematodos. Más recientemente se han utilizado vectores virales para introducir hairpings productores de siRNAs para hacer transgénesis en *S. mansoni* (Tchoubrieva *et al.*, 2010; Duvoisin *et al.*, 2012).

Ya en 2003 en el primer reporte de ARNi en *S. mansoni* se silenció de manera exitosa en esquistosómulas el gen endógeno catepsina B logrando reducir los niveles de mensajeros y de proteína de este gen (Skelly, Da'dara e Harn, 2003). A partir de este trabajo el “soaking” se estableció como método de delivery en *S. mansoni* donde se ha utilizado en numerosos reportes y también en otros trematodos como *F. hepatica* (Mcgonigle *et al.*, 2008), *C. sinensis* (Wang *et al.*, 2014) y *S japonicum* (Kumagai *et al.*, 2009).

En *S. mansoni* se han silenciado por “soaking” genes en huevos (Freitas, Jung E e Pearce, 2007; Rinaldi *et al.*, 2009), miracidio, esquistosómulas y adultos. Mediante esta estrategia se ha logrado silenciar de manera muy eficiente la expresión de genes como catepsinas y tetraspaninas obteniéndose reducciones significativas de la expresión génica (Delcroix *et al.*, 2006; Tran *et al.*, 2010). En algunos trabajos el silenciamiento alcanzado mediante “soaking” es de solo 40% como muestran Freitas y colaboradores intentando suprimir la expresión del gen “inhibin/actibin” en huevos aunque la disminución de la eficiencia en este caso podría deberse al estadio seleccionado (Freitas, Jung E e Pearce, 2007). Hay genes que no pueden ser silenciados por “soaking” pero el fracaso se debe al gen seleccionado y no al método de delivery empleado (Mourão *et al.*, 2009).

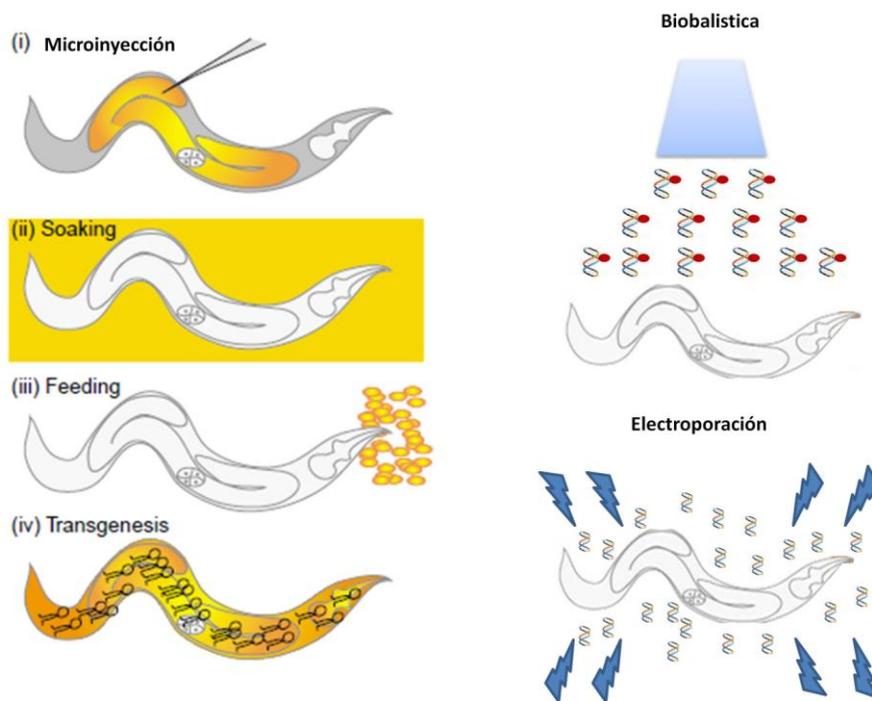


Figura 8: Métodos de suministro utilizados en helmintos.

La electroporación es el otro método de delivery que se usa frecuentemente en trematodos. Ha demostrado ser efectivo para suprimir la expresión génica en todos los estadios en que se utilizó en *S. mansoni* y en otros parásitos como *F. hepatica* (Rinaldi *et al.*, 2008), y *O. viverrini* (Sripa *et al.*, 2011). Usando electroporación también varía la eficiencia del silenciamiento de acuerdo al gen seleccionado. Por ejemplo en *O. viverrini* el silenciamiento es mucho mayor al usar como blanco el gen catepsina B (90 % de supresión) que al usar granulina (40 % de supresión) (Sripa *et al.*, 2011).

Cuando se compara la eficiencia de estos dos métodos de delivery hay trabajos que muestran resultados contradictorios. Por un lado hay reportes que muestran que la electroporación lleva a una mayor supresión de la expresión génica (Krautz-Peterson *et al.*, 2007; Ndegwa, Krautz-Peterson e Skelly, 2007; Krautz-Peterson *et al.*, 2010). En otro trabajo demuestran que si inmediatamente después de electroporar los parásitos estos se lavan exhaustivamente para eliminar RNAs que queden en el medio, los niveles de mRNA blanco no descienden más de un 20 %. En base a estos resultados parecería que la contribución de la electroporación es mínima a la hora de silenciar un gen (Stefanić *et al.*, 2010). Otro trabajo en el que la electroporación es menos eficiente es el de Atkinson y colaboradores trabajando con el gen PAL1 que se expresa en el sistema nervioso. Electroporando los parásitos con 1000 ng/μl de ARNdc no logran suprimir la expresión de este gen. Sin embargo mediante “soaking” con 100 ng/μl recambiando el medio y el ARNdc todos los días la supresión del gen blanco es mayor a 75% (Atkinson *et al.*, 2010).

4.3.2 Moléculas usadas y concentraciones. Efectos inespecíficos.

Son numerosos los trabajos en *S. mansoni* en que la ARNi es exitosa en distintos estadios luego de tratar los parásitos con siRNAs pequeños o ARNdc, ya sea por “soaking” o electroporación. El silenciamiento mediado por estas moléculas varía por como interactúan con la maquinaria enzimática encargada de suprimir la expresión génica en la ARNi. Los ARNdc van a ser procesados por enzimas DICER en múltiples siRNAs más pequeños que son los que en definitiva van a suprimir la expresión del gen blanco. Esta población de siRNAs generada al introducir un ARNdc puede ser responsable de efectos inespecíficos observados al utilizar estas moléculas si los siRNA generados encuentran blancos en otros genes. Esta respuesta no se espera al usar siRNAs, por lo que *a priori* el silenciamiento podría ser más específico. Al mismo tiempo la gran concentración de una molécula interferente contra el mismo blanco podría desencadenar efectos inespecíficos. Esta respuesta es concentración dependiente y podría atenuarse disminuyendo la concentración o introduciendo modificaciones químicas al siRNA disparador (Fedorov *et al.*, 2006).

Por otro lado se ha visto que en mamíferos los ARNdc largos pueden inducir una respuesta inflamatoria mediada por interferón, por lo que en estos organismos se implementó exclusivamente el uso de siRNAs (Reynolds *et al.*, 2006). Sin embargo, hay que tener en cuenta que diferentes siRNAs contra un mismo gen determinan distintos niveles de supresión en el gen blanco (Krautz-Peterson *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2012; Cao *et al.*, 2014). Este fenómeno puede explicarse por diferencias en la accesibilidad del siRNA a su blanco y debe tenerse en cuenta a la hora de planificar un experimento de ARNi (Krautz-Peterson *et al.*, 2007). Por este motivo las compañías dedicadas a la producción comercial de siRNA sugieren generar y utilizar al menos 3 siRNA distintos para cada gen blanco.

Se han empleado distintas concentraciones de moléculas interferentes en distintos trabajos (Krautz-Peterson *et al.*, 2007; Stefanić *et al.*, 2010). Hay una relación directa entre la concentración usada y la supresión alcanzada. Sin embargo en esquistosómulas concentraciones mayores a 90 ng/μl son tóxicas para los parásitos y no aportan un beneficio mayor cuando se analiza la supresión alcanzada (Stefanić *et al.*, 2010). La concentración de moléculas usadas podría estar vinculada a la aparición de efectos inespecíficos y/o tóxicos, también llamados efectos off-targeting en los experimentos de ARNi.

Distintos tipos de efectos secundarios en ensayos donde se incluyen controles irrelevantes han sido reportados en trematodos desde los primeros trabajos de ARNi, aunque no está claro si este es un efecto dosis dependiente (Skelly, Da'dara e Harn, 2003; Dinguirard e Yoshino, 2006; Rinaldi *et al.*, 2008; Rinaldi *et al.*, 2009). Así por ejemplo el uso de reactivos de transfección como lipofectamina para incrementar la eficiencia de la transfección de moléculas interferentes, resultó en cambios de la expresión del gen cathepsina B (Skelly, Da'dara e Harn, 2003). En otro reporte la expresión de genes que no son blanco de interferencia puede disminuir y esporocistos tratados con un ARNdc irrelevante muestran una alteración de su tamaño (Dinguirard e Yoshino, 2006).

Al trabajar con genes de proteasas pertenecientes a familias génicas con distinto grado de similitud de secuencias se puede suprimir la expresión de más de un

miembro de la misma familia. En *O viverrini* al tratar los parásitos con ARNdc contra catepsina B1 disminuye también la expresión de catepsina B2. La similitud de secuencia entre estos 2 genes podría ser responsable del efecto inespecífico, pues al interferir los parásitos con ARNdc contra granulina no hay alteración de la expresión de otros genes como Ov-CB1, Ov-CB2 o actina (Sripa *et al.*, 2011). Otros efectos pueden estar vinculados a genes que participan en una misma vía. En *S. mansoni* al inhibir la expresión del gen de la legumaina SmAE disminuye la actividad de la proteasa catepsina B, lo cual es consistente con el supuesto papel de la legumaina en la maduración de las catepsinas (Delcroix *et al.*, 2006).

Algunos otros fenómenos particulares fueron observados en otros estudios. En JRD de *F. hepatica* transfectados con un ARNm de luciferasa se observó un silenciamiento específico en gusanos tratados con ARNdc de LUC (sin actividad enzimática y con reducción del ARNm) aunque aumentó la actividad de luciferasa al tratar los parásitos con un ARNdc irrelevante male (sin afectar el ARNm) (Rinaldi *et al.*, 2008).

Por otro lado, en *S. mansoni* hay un aumento de la actividad de la proteína SmLAP al tratar los parásitos con un ARNdc irrelevante (Rinaldi *et al.*, 2009) Esto parece apuntar a un efecto inespecífico inducido por el ARNdc. Un fenómeno llamativo se da al tratar esporocistos de *S.mansoni* con ARNdc contra el gen SOD, el que aumenta la expresión unas 1600 veces en respuesta al tratamiento (Mourão *et al.*, 2009). (Figura 9).

El hecho de que la ARNi en si puede desencadenar efectos inespecíficos incrementa la importancia de usar controles adecuados. En los casos descritos el efecto indeseado se observa al comparar un control irrelevante con el blanco, esto es parásitos sin tratar, pero este tipo de controles no son incluidos rutinariamente. La ausencia de controles o metodologías que no son las adecuadas para detectar efectos inespecíficos en otros reportes impide detectar si los efectos detectados son frecuentes (Tabla 3).

4.3.3 Controles

Por las dificultades que han surgido con el uso y la estandarización de la ARNi es fundamental emplear de manera sistemática controles experimentales adecuados. Sin embargo estos no siempre están presentes o no se utilizan de manera adecuada en todos los trabajos de ARNi. En el caso de los estudios de silenciamiento génico en modelos de mamíferos se han establecido pautas precisas que permiten a partir de los controles determinar efectos de modo más cuantitativo y comparable. (MIARE, Minimum Information about an ARNi Experiment, <http://miare.sourceforge.net/HomePage>), y estas son frecuentemente publicitadas por las empresas proveedoras de siRNA.

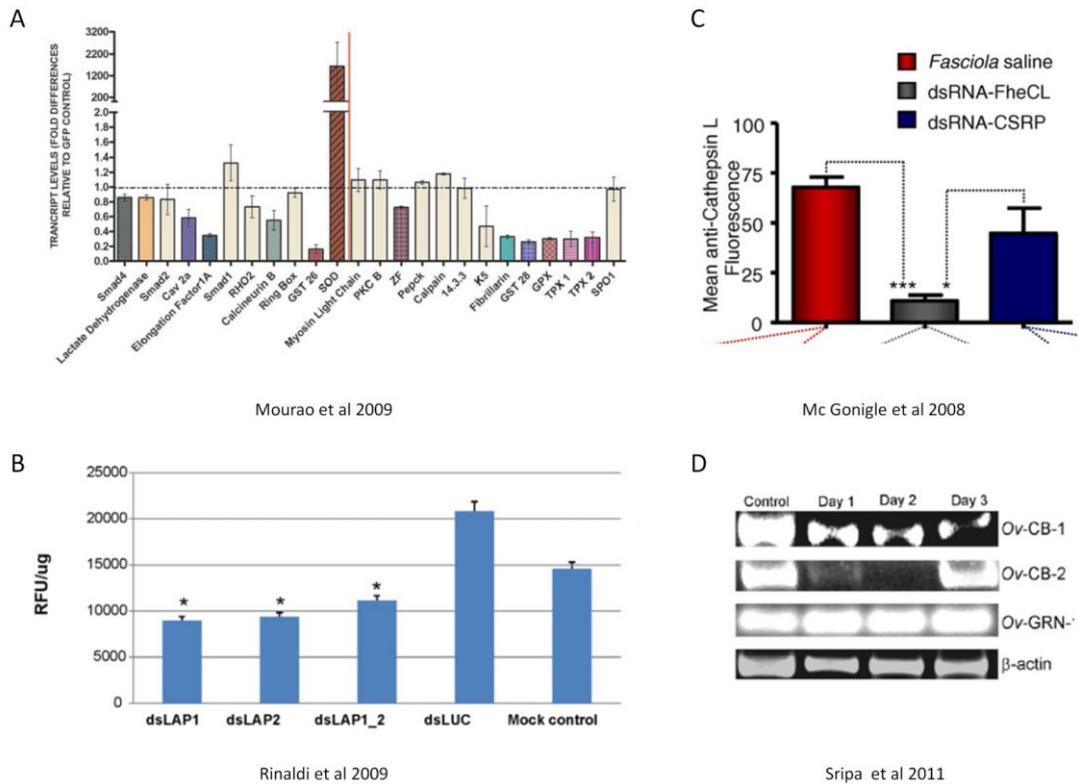


Figura 9: Ejemplos de efectos inespecíficos en la ARNi en trematodos. **A** Aumento de la expresión del gen SOD al tratar parásitos con ARNdc contra este gen. (Mourao et al 2009). **B** Aumento en la actividad de la proteína LAP al tratar parásitos con el ARNdc irrelevante, (Rinaldi 2009). **C** Disminución de la expresión de proteína Fh Cathepsina L1 (imagen superior) detectada por inmunohistoquímica en parásitos tratados con el control irrelevante ARNdc contra el gen CSRP, (columna azul), comparado con parásitos controles (columna roja) y parásitos tratados con ARNdc contra CL1 (columna gris) y Fh Cathepsina B2 (imagen inferior) detectada por inmunohistoquímica en parásitos incubados con solución salina columna roja (control mock), tratados con ARNdc contra CB2 columna verde, y en parásitos tratados con ARNdc contra el gen CSRP, columna azul (control irrelevante) (McGonigle et al 2008). **D** Disminución de la expresión del gen CB2 al tratar los parásitos con ARNdc CB1 detectada por PCR semi-cuantitativo (Sripa 2011).

El control usual en los ensayos es una réplica tratada de igual manera pero sin molécula interferente. Este blanco, generalmente referido como “mock treatment” sirve de referencia para comparar los efectos. Sin embargo, por el método de delivery empleado o por la concentración utilizada de moléculas interferentes que puede saturar el complejo DICER se puede alterar la expresión génica de manera global. Para detectar este tipo de efectos inespecíficos al introducir cualquier tipo de molécula interferente se deben utilizar controles irrelevantes. Estos son generalmente moléculas dirigidas a genes que no están presentes en el genoma del organismo en estudio y se espera que estas no interfieran con la expresión de algún gen endógeno. A pesar de su importancia los controles irrelevantes no siempre se utilizan en trematodos (Boyle *et al.*, 2003; Dinguirard e Yoshino, 2006; Atkinson *et al.*, 2010; Sripa *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2014). En los reportes en que se utiliza el control irrelevante el tamaño de este no siempre coincide con el del ARNdc utilizado para

disparar la ARNi, sin que por este motivo se afecte el silenciamiento. Sin embargo, este tipo de controles permiten detectar efectos más sutiles y poco frecuentes como los descritos en la sección anterior.

REFERENCIA	Método de Entrega	Controles	Detección de Silenciamiento	Nivel de silenciamiento	Persistencia	Efectos inespecíficos
<i>S. mansoni</i>						
Skelly et al. 2003	S	CI/CTL +	Inmunof/Act/RT-PCR		6 días	SI
Boyle et al. 2003	S	Mock	qPCR/Captación de glucosa	Mirracidio 90% Esporocisto 0	28 días	NO
Correnti et al. 2005	E	CI	RT-PCR/Act/Crece/EB	90%	30 días	NO
Delcroix et al. 2006	S	CI	qPCR/Act	> 90 %		SI
Dinguirard et al. 2006	S	Mock/CI	qPCR/Morfología/union LDL	70%	6 días	NO
Freitas et al. 2007	S	CI/CTL+	qPCR/Eclósión Hu/WBlot	40%	6 días	NO
Kuntz et al. 2007	S	CI	qPCR/Act/Mortal.idad		4 días	NO
Ndegwa et al. 2007	E/S	CI	qPCR/Act	70-90%		SI
KrautzPeterson et al. 2007	E/S	Mock/CI	qPCR/Act	90% 95%	40 días	SI
Nabhan et al. 2007	S	Mock/CI	qPCR/Viabilidad/Eclósión huevos	80%	9 días	NO
Pereira et al. 2008	S	Mock/CI	qPCR/RT-PCR/Viabilidad	60%	6 días	NO
Rinal.di et al. 2008	E	CI	Activ		3 hs	
Moral.es et al.2008	E	CI	RT-PCR/Act/CreCIMIENTO/digestionHemogl		9 días	NO
Rinal.di et al.2009	S	Mock/CI	RT-PCR/Act/Eclósion huevos		7 días	SI
Mourao et al. 2009	S	CI	qPCR/WBlot/Crece/Inmunof	Varia con gen seleccionado	7 días	SI
Mourao et al. 2009	S	ARNdc CI	WBlot/Killing Assay		7 días	ND
Swierczewski et al.2009	E	CI	qPCR/WBlot/Mortal.idad	99%		NO
Krautz-Peterson et al. 2008	E		qPCR/WBlot/Mortal.idad	90%	15 días	NO
Stefanic et al. 2010	E/S/ES	CI	qPCR/Act	Tegu y Dig > 75%	30 días	NO
Atkinson et al. 2010	E/S	Mock/CI	RT-PCR			NO
Beckmann et al. 2010		Mock/CTL+	RT-PCR/Morfología	10-32%		NO
Faghiiri Parasitology. 2010	E	CI	qPCR/WBlot/Inmunof	95%	28 días	NO
Tran et al. 2010	E/S	CI	qPCR/WBlot/Morfología/EB	67%-75%	21 días	
KrautzPeterson et al. 2010	E/S	Mock/CI	qPCR	Varia con gen seleccionado	14 días	NO
Krautz-Peterson et al. 2010	E/S	Mock/CI	qPCR/WBlot/Act/Viabilidad/EB	Varia con gen seleccionado	14 días	NO
Taft and Yoshino 2011	S	CI	qPCR/WBlot/Morfología	69 89%	7 días	
Bhardwaj et al. 2011	E	CI/CTL +	qPCR/WBlot/Morfología/EB	95%		no
McVeigh et al.2011	E	Mock/CI	qPCR/Movilidad/Mortal.idad	54%	7 días	SI
Kasinathan et al. 2011	E	Mock/CI	qPCR/	50-70%		
Beckmann et al. 2012	E	No ICI/CTL +	qPCR/	58%		NO
Farias et al. 2013	E	Mock/CI	qPCR/WBlot	60%	5 días	
Patocka et al. 2013	S	CI	qPCR/WBlot	50%	8 días	NO
Da'dara et al. 2013	E	CI	qPCR/WBlot	Varia con gen seleccionado	2 días	
Patocka et al. 2014	S	Mock/CI	qPCR/Movilidad	80%	24 hs	
Rojo-Arreola et al. 2014	S	CI	qPCR/Fenot	50%	7 días	NO
MacDonal.d et al. 2014	S	Mock/CI	qPCR/WBlot/Movilidad	Varia con gen seleccionado	6 días	NO
Andrade et al. 2014	S	CI	qPCR/Viabilidad/Emission huevos	Varia con gen seleccionado	7 días	NO
MacDonal.d et al. 2015	S	CI	qPCR/Movilidad	70%	24 hs	NO
Parker-Manuel et al. .2015	E	Mock	qPCR/Movilidad	50%	5 días	
<i>S. hematobium</i>						
Rinal.di et al. 2011	ES	Mock/CI	qPCR/Act	> 75%	48 hs	NO
<i>S. japonicum</i>						
Cheng et al. 2005	S	CI	RT-PCR/Inmunofluo	75%	7 Dias	No
Kumagai et al. 2009	S	CI	RT-PCR/Killing Assay		14 días	NO
Cheng et al. 2009	S	Mock/CI	qPCR/WBlot/Inmuno/EB	Varia con siRNA seleccionado	7 días	NO
Li et al. 2010	E/S	Mock/CI	qPCR/Viabilidad	Varia con siRNA seleccionado	48 hs	NO
Zou et al. 2011	S	CI	qPCR/WBlot/Fenotipo	Varia con siRNA seleccionado	7 días	NO
Wuet al. 2011	S	CI	qPCR/Viabilidad	Varia con gen seleccionado	14 días	NO
Yang et al. 2012	S	CI	qPCR/Wblot/EB	Varia con siRNA seleccionado	32 hs	NO
Ren et al. 2013	E	CI	qPCR/Wblot/EB	75%	5 días	NO
He et al. 2012	S	Mock/CI	RT-PCR/qPCR/Act	Varia con gen seleccionado	8 días	SI
Cao et al. 2014	S	CI	RT-PCR/qPCR/EB	Varia con siRNA seleccionado	1 dia	NO
Liu et al. 2015	S	Mock/CI	qPCR/EB	80%	72 hs	NO
You et al. 2015	S	CI	qPCR/WBlot/Captacion Gluc	90%	6 días	
Zhang et al. 2015	S	CI	RT-PCR/WBlot/Act/Morfología		5 días	
<i>F. hepatica</i>						
Rinal.di et al. 2008	E	Mock/CI	RT-PCR/Act		48hs	SI
McGonigle et al. 2008	S	Mock/CI	RT-PCR/Inmunoh	80%		NO
McVeigh et al. 2015	S	Mock/CI	qPCR/WBlot/Movilidad	60 -90%	25 días	SI
Dell'Oca et al. 2015	E/S/ES/SP	Mock/CI	qPCR/Act	90%	21	SI
<i>O. viverrini</i>						
J. Sripa et al. 2011	E	Mock	qPCR/Act	Varia con gen seleccionado	9 días	SI
Thanasuwān et al. 2014	ES	Mock/CI	qPCR/Transporte agua	90%	16 días	SI
Papatpremirsiri et al. 2015	ES	Mock/CI	qPCR/Viabilidad	100%	7 días	NO
<i>C. sinensis</i>						
Wang et al. 2014	S	Mock	qPCR/WBlot	> 90 %	120 hs	
<i>O. felinus</i>						
Pakharukova et al. 2015	ES	Mock/CI	qPCR/Act/Morfología/Mortal.idad	100%	7 días	NO

Tabla 3: Análisis de la ARNi en trematodos. Se analiza método de entrega controles utilizados, nivel de silenciamiento, persistencia del silenciamiento, y si se describen efectos inespecíficos.

CI, Control irrelevante; Immunof, Inmunofluorescencia, RT-PCR, PCR semicuantitativo; qPCR, ““Real Time” PCR”, Act, Ensayos de Actividad Proteica; WBlot, Western Blot; Fenot, Fenotipo; Crec, Crecimiento; Immunoh, Inmunohistoquímica; EB, ensayo Biológico; Eclósión hu, Eclósión huevos E, Electroporación; S, “soaking”; ES, Electro-soaking; SP, “soaking-poration”.

Un tercer tipo de control recomendable es el uso controles positivos capaces de afectar la expresión de genes expresados en el mismo tejido del gen que se intenta analizar. De esta forma se asegura que el método de suministro (“delivery”) y la concentración de ARN utilizada sean adecuadas para bloquear la expresión del gen que estamos analizando. A pesar de su utilidad son muy pocos los reportes en que se emplean controles positivos (Freitas, Jung E e Pearce, 2007; Beckmann *et al.*, 2012).

De la misma forma la utilización de moléculas interferentes marcadas con fluorescencia permiten analizar la eficiencia de la incorporación de la misma a los tejidos blanco del organismo a tratar.

4.4 Análisis del silenciamiento.

Las consecuencias esperables de la ARNi son la disminución de la expresión del gen blanco por degradación del mRNA correspondiente, disminución de la abundancia de la proteína que este codifica y posiblemente una alteración del fenotipo dependiendo de la función del gen afectado. En base a esto el silenciamiento se debe detectar buscando un cambio en uno de estos tres niveles ARN, proteína y fenotipo. Un paso previo importante y deseable es determinar la eficiencia del procedimiento de transfección, de modo de poder cuantificar los efectos.

4.4.1 Eficiencia de transfección.

La ARNi se ha utilizado en trematodos para analizar la función de genes importantes en la biología parasitaria en intentos de identificar nuevos blancos terapéuticos. Es necesario contar con métodos que permitan evaluar de forma confiable la viabilidad de los parásitos luego de suprimir la expresión de genes importantes para su desarrollo y para detectar posibles efectos nocivos por los tratamientos utilizados para introducir moléculas interferentes. Asimismo puesto que se trabaja con organismos metazoarios relativamente grandes, es necesario determinar qué proporción de parásitos incorpora las moléculas y si la incorporación es homogénea.

4.4.1.1 Cuantificar sobrevida

Los métodos usados comúnmente para determinar la viabilidad de parásitos se basan en la detección de cambios morfológicos al analizar los parásitos al microscopio. Estos requieren gran conocimiento de la anatomía de los parásitos y pueden dar lugar a errores de interpretación por los observadores.

En *S. mansoni* se han utilizado moléculas fluorescentes con distinta capacidad para marcar parásitos vivos de muertos. El único fluorocromo con capacidad de identificar parásitos vivos es el diacetato de carboxi-fluoresceína (cFDA), mientras que Ioduro de propidio, DAPI y el bromuro de Etidio se pueden utilizar para identificar parásitos muertos (Van Der Linden e Deelder, 1984). El uso de estas moléculas permitió desarrollar un método de análisis de la viabilidad a gran escala que permite identificar de manera objetiva la sobrevida en *S. mansoni* (Peak, Chalmers e Hoffmann, 2010).

4.4.1.2 Cuantificación de la incorporación de moléculas interferentes

Algunos trabajos se han preocupado de determinar la cantidad y localización de las moléculas interferentes luego del tratamiento. Se han utilizado moléculas marcadas de forma fluorescente en distintos trematodos para determinar la principal vía de entrada de la ARNi (Rinaldi *et al.*, 2008; Mourão *et al.*, 2009; Rinaldi *et al.*, 2009; Sripa *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2014). Entender la ruta de entrada en distintos parásitos y en distintos estadio de estos es importante para mejorar la eficiencia de la ARNi (Dalzell *et al.*, 2012).

En esporocistos de *S. mansoni* se monitoreó la entrada de moléculas interferentes con ARNdc marcado con rodamina. Se observó que solo el 67 % de los parásitos incorporaron la señal y que esta era heterogénea en cada parásito, localizándose principalmente en el tegumento, células flamigeras y parénquima. La variación en la incorporación fue considerada como posible responsable de diferencias en los niveles de transcripción observadas al analizar la disminución de la expresión génica por “Real Time” (Mourão *et al.*, 2009). Al mismo tiempo esto se vincula obviamente a la susceptibilidad diferencial de genes de acuerdo a la localización tisular normal de su expresión.

En *F. hepatica* se determinó que la principal vía de entrada en JRDs es el tracto digestivo tanto mediante el tratamiento de juveniles con un siRNA marcado fluorescente (Cy3-siRNA) como por hibridación *in toto* contra un ARNm reportero transfectado (Rinaldi *et al.*, 2008). De modo similar, al tratar parásitos adultos de *O. viverrini* por electroporación con Cy3-siRNA observaron una fuerte señal en el intestino y también en órganos reproductivos (Sripa *et al.*, 2011). Wang y colaboradores monitorearon la entrada de Cy3-dsRNA fluorescente en metacercarias y adultos de *C. sinensis*. En adultos la mayoría de la fluorescencia se acumula en el útero, gónadas y vitelaria, y en metacercarias en la pared del quiste (Wang *et al.*, 2014).

En estos trabajos el intestino es una fuente importante de entrada de moléculas. Sin embargo como ya se ha indicado, genes expresados de manera más ubicua y genes que se expresan en el sistema nervioso pueden ser silenciados sin que la señal se detecte más allá del digestivo. Estos casos sugieren que en estos parásitos deben estar presentes genes que permiten la entrada y esparcimiento de la señal interferente (Atkinson *et al.*, 2010; Beckmann, Quack, *et al.*, 2010; Mcveigh *et al.*, 2011; Beckmann *et al.*, 2012).

4.4.2 Determinación de efectos del silenciamiento

El fin último del experimento es determinar y cuantificar los efectos del silenciamiento. Si la interferencia funciona adecuadamente se van a reducir específicamente los niveles de mRNA y de proteína del gen blanco sin afectar otros genes o vías no vinculadas, y eventualmente se generara un fenotipo detectable

4.4.2.1 Detección de fenotipos

Esta es una de las formas comúnmente usadas para analizar efectos, y consiste en analizar morfológica y funcionalmente el organismo entero. En los ensayos con parásitos algunos de los fenotipos analizados han sido tamaño, movilidad, estructura, mortalidad, y eclosión de huevos en parásitos tratados (Freitas, Jung E e Pearce, 2007; Morales *et al.*, 2008; Mourão *et al.*, 2009; Swierczewski e Davies, 2009). La cuantificación de estos efectos es todavía precaria, por lo que la detección de fenotipos es todavía más una característica cualitativa que cuantitativa.

Es así fundamental diseñar ensayos biológicos adecuados que permitan evidenciar el efecto del silenciamiento. Tener conocimiento sobre la función de genes similares, que participan en una misma vía y/o que son miembros de una familia génica, o contar con información de los efectos de silenciamientos de ortólogos en otras especies permite no solo esperar *a priori* determinados efectos fenotípicos sino también diseñar ensayos biológicos adecuados.

4.4.2.2 Reducción da la expresión del gen blanco y de su proteína

Detectar la disminución de ARN y/o proteína es importante para confirmar que el silenciamiento fue efectivo. Es importante controlar los efectos del silenciamiento a varios niveles por si se genera una respuesta tipo miRNA en que se produce un bloqueo post transcripcional con la consiguiente reducción de los niveles de proteína sin afectar los niveles de mRNA (Rana, 2007). Por otro lado se pueden afectar los niveles de mRNA sin que se reduzcan los niveles de proteína si esta tiene una vida media larga. En este caso sería bueno tomar otra ventana de análisis de la proteína en cuestión. De esta manera, la optimización de los protocolos de ARNi, incluyendo el análisis del efecto interferente a distintos intervalos de tiempo post-tratamiento es relevante.

Metodológicamente para detectar cambios en la expresión del gen blanco las técnicas utilizadas son técnicas de amplificación como PCR-semicuantitativo, el Real Time PCR, y técnicas basadas en hibridación como Northern blot e hibridación *in situ* o *in toto*. El efecto a nivel proteico se ha analizado por Western blot, ensayos de actividad (en caso de enzimas), y técnicas de inmuno-histoquímica con anticuerpos contra la proteína blanco (Tabla 3).

4.4.2.3 Detección de efectos inespecíficos (“off-targeting”).

Los efectos off-target pueden desencadenarse por secuencias similares entre las moléculas interferentes y mRNAs que no son el blanco original de la ARNi y por siRNAs secundarios generados por la amplificación de la ARNi que pueden interferir con la expresión de otros genes. Típicamente es importante analizar posibles efectos “off-targeting” sobre todo cuando se trabaja con genes pertenecientes a familias de proteínas multigénicas donde sus integrantes tienen gran similitud de secuencia. En estos casos al intentar suprimir un gen se puede alterar la expresión de otros genes que sean similares a nivel de secuencia. Pero el problema mayor es cuando existe algún dominio conservado en proteínas que participan en vías o procesos distintos y que pueden verse afectados de manera totalmente inespecífica. Una manera sencilla de evaluar la existencia de este tipo de efectos secundarios no deseados es no solo analizar la expresión del gen blanco, sino también de algunos otros genes vinculados. Este tipo de controles son rara vez utilizados en trematodos. Para controlar de manera global los efectos “off-targeting” debería analizarse la expresión génica a gran escala por secuenciación de transcriptomas o por análisis de microarrays (Hagen *et al.*, 2012) . Otro motivo importante de efectos inespecíficos, especialmente cuando se emplean concentraciones elevadas de ARNdc, es la toxicidad inducida por la molécula interferente (Stefanić *et al.*, 2010). Aunque la molécula interferente no induzca una evidente mortalidad en los organismos tratados, a concentraciones elevadas si puede alterar inespecíficamente la expresión de otros genes.

4.4.2.4 Ensayos biológicos y funcionales.

Otra forma de evaluar el efecto del silenciamiento es mediante ensayos biológicos, donde se intenta determinar de la forma más fisiológica posible la función de un gen en un proceso determinado. Esto se ha realizado por ejemplo en *F. hepatica* donde se evalúa la función de catepsinas en los procesos de invasión haciendo atravesar a los parásitos tratados un segmento de un tubo digestivo (Mcgonigle *et al.*, 2008). Los ensayos biológicos más interesantes son aquellos en donde se busca detectar los efectos en parásitos tratados devolviéndolos al huésped. De esto existen un par de ejemplos. En el caso de *S. mansoni* se evaluó la viabilidad de esquistosómulas tratadas con ARNdc contra tetraspaninas mediante su capacidad de desarrollarse a adulto inyectando ratones con esquistosómulas tratadas (Tran *et al.*, 2010). Un caso más llamativo, se mostró en *S. mansoni* y *S. japonicum* donde es posible silenciar genes inyectando ratones por vía intravenosa con siRNAs contra genes específicos de este parásito (Pereira *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2012; Cao *et al.*, 2014). En *S. mansoni* al usar esta estrategia con siRNAs contra el gen HGPRTase la población de parásitos se redujo hasta un 27 % (Pereira *et al.*, 2008). Estos experimentos podrían visualizarse como primeros intentos de utilización de herramientas de ARNi como estrategias auxiliares de control parasitario.

Como se ve el grado de desarrollo y optimización de la interferencia de ARN en trematodos es diverso, por lo que parece importante buscar optimizar y estandarizar la técnica para su uso rutinario en nuestro modelo de estudio.

HIPOTESIS

Es posible utilizar la ARNi como metodología de rutina para el análisis de la función génica en trematodos logrando modular de manera específica y estable la expresión génica.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar las vías de silenciamiento génico en *F. hepatica*; (1) explorar la vía de silenciamiento exógena estandarizando la ARNi en juveniles como método de rutina para el estudio de la función génica, (2) investigar los actores relevantes de la(s) vía(s) de silenciamiento endógeno identificando, clonando y secuenciando pequeños RNA reguladores y genes participantes de estas vías.

Objetivos Específicos

1. Optimizar un método para cuantificar la incorporación de moléculas interferentes evaluando al mismo tiempo la sobrevivencia de los parásitos a los métodos de suministro (“delivery”) utilizados.
2. Comparar la eficiencia de distintos métodos de suministro (“delivery”) de moléculas interferentes
3. Estudiar la concentración mínima de moléculas interferentes capaz de generar efectos reproducibles evitando efectos inespecíficos.
4. Analizar la persistencia del silenciamiento y la eficiencia de distintas moléculas interferentes.
5. Comparar la eficacia de la ARNi en JRD cultivados por distintos intervalos de tiempo antes de ser transfectados.
6. Evaluar la optimización de la ARNi en otros estadios de desarrollo de *F. hepatica*
7. Clonar e identificar ARNs pequeños en *F. hepatica*
8. Clonar y secuenciar genes de la vía siRNA/miRNA.

MATERIALES Y METODOS

1. Obtención de Parásitos.

Las metacercarias de *Fasciola hepatica* fueron originalmente obtenidas de Baldwin Aquatics Inc. (Monmouth, Oregon) o producidas localmente en el Laboratorio de Parasitología de la Dirección Nacional de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) del MGAP. Posteriormente se consiguió una colonia propia de caracoles del género *Lymnaea*, a partir de la que se inició el mantenimiento del ciclo en el laboratorio. El desenquiste *in vitro* de metacercarias se realizó como esta descrito por (Carmona *et al.*, 1993; Rinaldi *et al.*, 2008) con pequeñas modificaciones. Las metacercarias fueron incubadas en hipoclorito de sodio al 10% de 3 a 5 minutos a temperatura ambiente en filtros de 74 μm para remover la cubierta externa y luego lavadas exhaustivamente en PBS 1X. Inmediatamente las metacercarias fueron activadas incubándolas a 39 °C en medio de desenquiste preparado mediante la mezcla de volúmenes iguales de solución A (0.4% taurocolato de sodio, 120 mM NaHCO₃, 140 mM NaCl pH 8.0) y solución B (50 mM HCl y 33 mM L-cisteína). El proceso de desenquiste fue monitorizado bajo lupa estereoscópica y/o microscopio. Luego de 90 a 180 minutos los juveniles recientemente desenquistados (JRD) comenzaron a emerger atravesando el filtro de 74 μm . Los JRD fueron colectados, lavados exhaustivamente con medio de lavado (RPMI-1640 suplementado con 200 U/ml Penicilina G sulfato, 200 mg/ml sulfato de estreptomycin, 500 ng/ml amfotericina B, 10 mM HEPES), transferidos a placas de cultivo de 12 o 24 pocillos y mantenidos en cultivo en medio de Basch modificado a 37 °C, 5% CO₂ (Mann et al 2010). En cultivos a largo plazo el medio fue cambiado cada 2 días, monitorizando la viabilidad de los parásitos microscópicamente.

Los parásitos adultos se obtuvieron a partir de hígados infectados decomisados en plantas frigoríficas de faena correspondiendo a infecciones naturales en bovinos. Los parásitos fueron extraídos de los canalículos biliares y trasladados hasta el laboratorio en RPMI a temperatura ambiente. Al llegar fueron lavados exhaustivamente en RPMI (para eliminar restos de material del huésped en el tubo digestivo del parásito) y transferidos a una estufa de CO₂ al 5 % a 37 °C en medio de cultivo Somule media.

A partir de las vesículas biliares del ganado infectado se recuperaron los huevos, los que fueron utilizados para iniciar el ciclo biológico. Los huevos se colocan a embrionar en agua a oscuras en estufa a 25 grados y se monitorean bajo lupa. Al cabo de 10-12 días los huevos embrionados son transferidos a un matraz de cuello angosto, y colocados a la luz, estimulando la emisión de miracidios. Se cubre el cuerpo del matraz con papel aluminio y se colectan los miracidios que migran hacia el cuello del matraz expuesto a la luz.

2. Síntesis de moléculas interferentes.

El ARN doble cadena (ARNdc) usado en este estudio fue sintetizado y purificado empleando el kit Megascript ARNi kit Ambion siguiendo las instrucciones del

fabricante. Como moldes para la síntesis de ARNdc se utilizaron productos de PCR generados con cebadores específicos que incorporan la secuencia del promotor viral T7 (**Tabla 4**). Mediante esta estrategia se sintetizaron moldes para proteína verde fluorescente (GFP) de 684 pares de bases utilizando el plásmido pEGFP-N2 y un molde para FhLAP de 287 pb a partir de un plásmido que contiene la secuencia del gen FhLAP (FhLAP, GenBank accession AY64459), que abarca las posiciones 389-655.

La concentración y pureza de los ARNdc se determinó espectrofotométricamente con NanoDrop (ND-1000, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) midiendo absorbancia a 260 nm y la relación A260/A280 respectivamente.

El ARNdc de FhLAP fue marcado agregando el fluoróforo Cy3 de manera covalente usando el kit Silencer® sARNi Labeling Kit (Ambion) siguiendo el protocolo optimizado para ARNdc largos indicado por el fabricante.

Cebadores usados para generar ARNdc				
Blanco	Cebadores/siRNA	Ta °C	Tamaño de amplimero (pb)	
LAP	LAP_For_T7	<i>TAATACGACTCACTATAGGG</i> ATCTGCTACTCAATGCTCTG	55	287
	LAP_Rev_T7	<i>TAATACGACTCACTATAGGG</i> CCTTCATACCACCGAGTGAA		
GFP	GFP_For_T7	<i>TAATACGACTCACTATAGGG</i> CTGGTCGAGCTGGACGGCGACG	55	684
	GFP_Rev_T7	<i>TAATACGACTCACTATAGGG</i> GCGGCCGCTTTACTTGTA		

Tabla 4 Cebadores utilizados en la síntesis de ARNdc. En Rojo y cursiva se marca la secuencia del promotor viral T7.

Dos siRNA contra FhLAP, FhLAP 1 siRNA (5'-GGACGAGTTGGTTCTACGCTTG GCT-3') y FhLAP 2 siRNA (5'-CGAATGGCTGCACCCAGAATTGTGG-3') que ocupan las posiciones 516-540 y 598-622 del gen FhLAP fueron sintetizados usando un recurso *on line* de Integrated DNA Technologies (IDT Inc., IA). Estos siRNA fueron seleccionados de regiones que solapan con el ARNdc largo utilizado (ver Figura 3 A de Dell'Oca et al. 2014, en resultados).

Como control irrelevante se utilizó el siRNA Silencer® CyTM3 Labeled Negative Control #1 siRNA, (Ambion, Austin, TX, USA) ya que esta secuencia no se encuentra en las bases de datos de secuencia genómicas de *F. hepatica*.

3. Suministro (“delivery”) de moléculas interferentes en juveniles.

Para introducir las moléculas interferentes se testaron dos métodos utilizados usualmente en trematodos: (“soaking” y electroporación) y combinaciones de estos. El “soaking” consiste en incubar por 12 horas (“over night”) los JRD en medio de cultivo con moléculas interferentes (siRNA o ARNdc) antes de analizar el efecto. La electroporación consiste en someter los JRD a un pulso eléctrico cuadrado (125 V 30ms) en cubetas de 4mm en electroporador BTX ElectroSquarePorator ECM830 (BTX, San Diego, CA). Inmediatamente después de electroporar los parásitos se lavan en PBS 1x para eliminar moléculas que no fueron incorporadas y se

transfirieren a medio Basch precalentado. Los nuevos métodos de suministro que testamos fueron “electro-soaking” cuando no se remueven las moléculas interferentes después de electroporar los JRDs transfiriéndolos directamente a medio de cultivo y “soaking-poration” consistente en someter a los parásitos a “soaking” toda la noche en medio con siRNA, luego electroporarlos y lavarlos. En los experimentos de evaluación de los efectos a largo plazo se repuso el medio cada 48 hs sin suplementar con ARNdc hasta el día en que se finalizó el experimento

Para evaluar los niveles de incorporación los parásitos fueron tratados con moléculas interferentes siRNA Silencer Cy 3-Labeled Negative Control #1 siRNA, Ambion, Austin, TX, USA) o ARNdc FhLAP marcado con cy3 como fue descrito y visualizados con microscopio (Nikon Eclipse TE 200 inverted microscope). La intensidad de la fluorescencia fue cuantificada analizando las fotos en ImageJ (Schneider, Rasband e Eliceiri, 2012) a través del parámetro Mean gray value (promedio de grises en la selección).

4. Determinación de sobrevivencia de parásitos con colorantes vitales.

Basados en trabajos previos (Van Der Linden e Deelder, 1984; Peak, Chalmers e Hoffmann, 2010) desarrollamos un método para analizar la viabilidad de JRD con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), Fluoresceína (FDA) y Ioduro de propidio (IP).

Para determinar si los colorantes que seleccionamos son útiles para diferenciar parásitos vivos de muertos, JRD de 24 hs de vida, esto es juveniles cultivados por 24 hs después del desenquiste, fueron calentados durante 5 minutos a 65 °C lavados con PBS 1x e incubados en PBS 1x con IP y FDA o con DAPI y FDA. Como control unos 20 JDR sin tratar se incubaron con los 3 colorantes. Las concentraciones usadas de colorantes fueron:

Colorante	Stock	Concentración Final
FDA	10 mg/ml en DMSO	Concentración final 40 ng/ml
DAPI	100ug/ml en PBS 1x	Concentración final 1,0 ug/ml
IP	1mg/ml en PBS 1x	Concentración final 1,0 ug/ml

Los parásitos sometidos a los diferentes tratamientos fueron visualizados y fotografiados con un microscopio de fluorescencia invertido Nikon Eclipse TE 200. Para analizar la viabilidad de JRD luego de tratarlos con ARNdc contra FhLAP se empleó FDA y DAPI ya que el IP emite a la misma longitud de onda que el Cy3 usado para marcar el ARNdc contra FhLAP.

5. Detección de la incorporación de Cy3-siRNA mediante microscopia confocal

Aproximadamente 30 JRD 24hs post-desenquiste fueron expuestos a 5 µg de Cy3-siRNASilencer® Labeled Negative Control #1 siRNA, (Ambion) por “soaking” o “electro-soaking” y 24 hs después se procesaron para la detección de fluorescencia. Los parásitos fueron lavados cuatro veces en PBS 1x, y fijados en Paraformaldeído (PFA) al 4% por 30 minutos a 4 °C, incubados con DAPI 1µg/ml por 10 minutos y

lavados nuevamente con PBS. Las imágenes fueron capturadas en la Unidad de Microscopia Confocal de Facultad de Medicina en microscopio confocal espectral Leica modelo TCS SP5 II, excitando a longitudes de onda de 405 nm y 543 nm para detectar DAPI y Cy3 respectivamente.

6. Análisis de la expresión génica.

Se extrajo ARN total de parásitos con el kit RNAqueus-Micro Kit (Ambion, Austin, TX) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit incorpora el uso de DNasa para eliminar posible DNA residual en la preparación. La síntesis de cDNA fue hecha en cada experimento partiendo de la misma concentración de ARN en todas las muestras midiendo la concentración inicial de ARN de todas las muestras con Nano Drop. La síntesis de cDNA fue hecha con el kit RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas).

A partir de este cDNA analizamos la expresión génica por PCR cuantitativo (“Real Time PCR”) en Rotor-Gene 6000 Real Time PCR System. Como control y normalizador se utilizó la amplificación del gen de β -actina a partir de los primers (Directo 5'-GTGTTGGATTCTGGTGATGGTGTC-3' y Reverso 5'-CAATTTCTCCTTGAT GTCTCG-3'). Los primers para la amplificación del gen blanco de silenciamiento FhLAP (Directo 5'-GCTACTCTTACCGGCCATGTGGTACG -3' y Reverso 5'-CACACGGTGTATACGCGGTGGTC-3') fueron diseñados fuera de la zona utilizada para hacer el ARNdc para evitar contaminación cruzada. Las condiciones de amplificación fueron 1 ciclo (94°C, 5 min), 35 ciclos (94°C, 30 seg; 60°C, 30 seg) usando Rotor gene SYBR Green PCR kit Qiagen, las reacciones fueron hechas en duplicado o triplicado.

La fluorescencia fue detectada durante los pasos de anealing/extensión, y el análisis de la curva de melting de cada PCR mostró la presencia de un pico único para cada amplicón.

Para el análisis de la expresión génica se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrito por Livak y colaboradores en 2001 (Livak e Schmittgen, 2001) usando Fh β actina como gen interno de referencia para la normalización. Primero se normalizó la expresión de FhLAP en cada condición contra la de Fh β actina siguiendo la fórmula ($\Delta Ct = Ct[FhLAP] - Ct[Fh\beta\text{-actina}]$). Luego para ver la variación en la expresión de FhLAP en los parásitos tratados normalizamos contra el control mock (parásitos electroporados sin moléculas interferentes) mediante la fórmula $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct [\text{parásitos tratados}] - \Delta Ct [\text{parásitos controles}]$. Los resultados son presentados mostrando el error estándar EE del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de 2 experimentos. Análisis estadísticos se realizaron con Student t test para datos apareados usando el software GraphPad Prism Software (www.graphpad.com); los p valores ≤ 0.05 fueron considerados significativos.

7. Ensayos de actividad enzimática.

150 JRD fueron tratados por electro-”soaking” con ARNdc FhLAP 2,5 ng/ μ l. Como control la misma cantidad de parásitos fue sometida a electro-soaking en ausencia de moléculas interferentes y/o de control irrelevante. La extracción de proteínas fue realizada con mirVana™ PARIS™ Kit (Part Number AM1556) siguiendo las

instrucciones 24 horas después del tratamiento. La actividad proteolítica fue monitoreada por la hidrólisis del sustrato fluorogenico AMC al incubar el extracto proteico con el sustrato LEU-AMC en un espectrofotómetro FluoStar a 345 de excitación y 440 de longitud de onda. 50 µl de extracto de proteína fueron incubados durante 10 minutos con 50 µl de buffer Glicina 100mM pH 8,5 suplementado con MgCl₂ 1mM como activador. Pasado este tiempo se agregan 100 µl sustrato y se incubó 1 hora a 37°C antes de tomar las medidas.

8. Ensayos de interferencia en adultos

Para evaluar la interferencia en adultos se trabajó con 3 grupos de 3 adultos los que se incubaron en 10 ml de Somule media (control) o medio adicionado con 20 µg de ARNdc GFP (control irrelevante) y 20 µg de ARNdc FhLAP (tratados). Cada 12 horas se repuso el medio de cultivo, agregando ARNdc a los grupos irrelevante e interferido en las condiciones descriptas. Se recuperaron los huevos del medio de cultivo de cada una de las condiciones y se evaluó su morfología directamente al microscopio y a través del análisis de fotos en microscopio invertido para evaluar su morfología. El experimento se culminó a las 30 hs puesto que la movilidad de los parásitos estaba muy disminuida. De los 3 adultos por condición a uno lo fijamos en paraformaldehído al 4 %, los otros dos fueron divididos en dos una mitad se utilizó para extracción de proteínas somáticas y la otra para extracción de ARN con TRI Reagent Solution (Ambion Applied Biosystems).

9. Clonado y secuenciado de ARNs pequeños (smRNA) a partir de JRD.

A partir de 280 ng de ARN de JRD de un día de cultivo se hizo la extracción de ARN enriquecida para fragmentos menores de 200 nt con el kit *mirVana*TM PARISTM Kit (Ambion) según las instrucciones del fabricante. Con este ARN se generó una biblioteca de ARN pequeños concatenados siguiendo el protocolo descrito por (Pfeffer, Lagos-Quintana e Tuschl, 2005) con algunas modificaciones.

Brevemente un fragmento conteniendo ARNs pequeños de 15 a 35 pb aproximadamente fue purificado de un gel de policrilamida al 15% en urea 7.5 de acuerdo a la movilidad relativa de marcadores moleculares teñidos con bromuro de etidio. Se ligaron adaptadores 5' (ACGGAATTCCTCACTrArArA) y 3' (rUrUrUAACCGCAATTCCAG-L) y se hizo la síntesis de primera hebra de cDNA usando el primer RTprimer: GACTACGTGGAATTCGCGGTAAA). Se amplificó por PCR con cebadores comunes a los adaptadores (Directo 2nd PCR 5' GAGCCAACAGGCACCGAATTCCTCACTAAA y Reverso 2nd PCR 3' GACTAGCTTGGTGCCGAATTCGCGGTAAA) que contienen el sitio de restricción Ban I (GGYRCC).

Los productos amplificados se digirieron enzimáticamente con Ban I y se generaron concatámeros los que fueron clonados en el vector pGEM T easy (Promega Corp., Buenos Aires Argentina) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Se transformaron bacterias y se analizaron los insertos a partir de PCR de colonias, seleccionándose los clones con insertos mayores a 500 pb para secuenciar por Sanger. Se secuenciaron 70 clones, se ensamblaron las secuencias resultantes usando Clustal y se analizaron por blast contra las bases de datos de mirBase (www.mirbase.org) y

piRNABank (pirnabank.ibab.ac.in). Más tarde se mapearon las secuencias contra el genoma de *F. hepatica*.

10. Clonado y secuenciado de genes de la vía si/miRNA

Utilizamos distintas estrategias de Blast (blastn, blastx, tblastn) para identificar genes de la vía si/miRNA usando como sondas de búsqueda las secuencias de los genes descritos en *C. elegans*. La base de datos se generó localmente e incluyó secuencias del transcriptoma de *F. hepatica*, que integra los datos disponibles del estadio adulto obtenida en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Melbourne (disponible en internet <http://bioinfosecond.vet.unimelb.edu.au/wblast2.html>) y datos propios del grupo del transcriptoma del estadio juvenil JRDs de *F. hepatica* (Cancela, 2010). Para mejorar los resultados de la búsqueda, se identificaron primero los genes en *Schistosoma mansoni* (por anotación genómica y por Blast como en el paso anterior) y luego se usaron estos para la búsqueda por Blast en *F. hepatica*. Para completar el panorama se buscaron los ortólogos en otros trematodos de los que disponíamos secuencias como *Fasciola gigantica*, *Clonorchis*, *Opisthorchis* y schistosomas (obtenidas del sitio de la Univ. de Melbourne). De esta forma se identificaron varios genes de la vía si/miRNA en *F. hepatica* y otros trematodos. Se alinearon las secuencias utilizando BioEdit para cada uno de los genes, y se definieron dominios conservados a partir de búsquedas con bases de datos. Finalmente se diseñaron primers en zonas conservadas para la amplificación de los genes SID1 (Directo 5'-GATCGCGTTCACGGTATTCT-3' y Reverso 5'-GGTTGATTAAGGGCTCGTGA-3'), ERI 1 (Directo 5'-ACCAAAGCCTGTAATTCTTACACC-3' y Reverso 5'-TAAACGTCCGGAATGCTTTACTTA-3'), Dicer (Directo 5'-AAGCGATTCCGGACAAATC-3' y Reverso 5'-CAAGTCGGTCAGGACTCCA-3') y Argonauta 2 (Directo 5'-AACATGCTTCAGTGCAGTCG-3' y Reverso 5'-AGGGCGTTTTCACTGGTTTA-3'). Estos fueron amplificados por PCR a partir de cDNA de juveniles. Los fragmentos de PCR de tamaño esperado fueron clonados en vectores pGEM-T y confirmados por secuencia.

1. Evaluación de la sobrevida de parásitos sometidos a procedimientos de transfección de moléculas interferentes.

En modelos de mamíferos donde la ARNi se realiza sobre todo en células en cultivo es posible marcar las moléculas administradas y de ese modo determinar la proporción de células tratadas. En este tipo de experimentos la población celular puede estar en crecimiento. En el caso de parásitos multicelulares se trabaja con una población de individuos que no se divide cuya viabilidad puede estar comprometida por el tratamiento utilizado para silenciar la expresión génica. Por este motivo en los experimentos de ARNi con poblaciones de parásitos es importante conocer la viabilidad de la población tratada y qué proporción recibe efectivamente las moléculas.

Para evaluar la viabilidad de los parásitos usamos los colorantes Ioduro de propidio (IP) y 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) para identificar parásitos dañados y Fluoresceína (FDA), que atraviesa las membranas celulares y se utiliza como marcador in vivo de parásitos en buen estado. Estos colorantes demostraron su utilidad en *S. mansoni* para evaluar viabilidad de parásitos a gran escala (Van Der Linden e Deelder, 1984; Peak, Chalmers e Hoffmann, 2010).

Para determinar la utilidad de estos colorantes para diferenciar parásitos vivos de muertos, calentamos JRD de 24 hs de vida durante 5 minutos a 65 °C previamente a la incubación con los colorantes, usando como control JRD sin tratar. Monitoreamos la incorporación de los colorantes en microscopio de fluorescencia, observándose solamente señal con DAPI e IP en los parásitos tratados con calor, mientras que el patrón opuesto de tinción exclusiva con FDA se obtuvo en los controles (Figura 10).

Utilizamos esta estrategia para evaluar la viabilidad de parásitos tratados por diferentes métodos de suministro. Como en alguno de los experimentos los parásitos fueron tratados con Cy3-siRNA que emite fluorescencia en la misma longitud de onda que el IP, utilizamos DAPI y FDA para co-detectar con Cy3. No vimos diferencias significativas en la viabilidad de los parásitos con ninguno de los tratamientos con respecto a los controles. (Ver Figura 2 A del artículo DellOca et al, 2014, incluido en la sección siguiente, pag. 32).

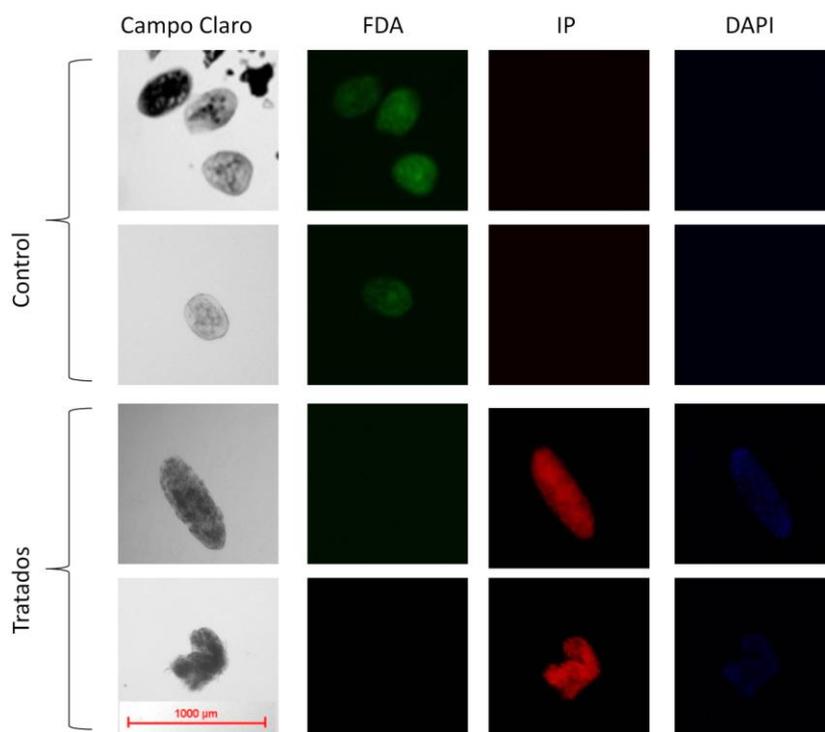


Figura10: Análisis de la viabilidad de JRD utilizando colorantes FDA, Ioduro de Propidio IP y DAPI. JRD fueron calentados 5 minutos a 65 °C e incubados con FDA, IP y DAPI (parásitos tratados). Como controles utilizamos JRDs de 24 horas de desenquistados mantenidos en cultivo.

2. Estrategias para optimizar la ARNi en JRDs.

Decidimos estandarizar la ARNi en JRDs por que estos son el estadio infectivo y el primer contacto para el huésped definitivo por lo que intervenciones que limiten el éxito de este estadio impedirían la infección por *F. hepatica*.

Utilizando como blanco el gen de Leucin Aminopetptidasa (FhLAP) que ya sabíamos por un trabajo previo de nuestro grupo que es susceptible a la ARNi (Rinaldi *et al.*, 2008) desarrollamos distintas estrategias para mejorar esta herramienta en JRDs de *Fasciola hepatica*.

La proteína FhLAP es una exopeptidasa que pertenece a una familia de metalopeptidasas que catalizan la degradación de péptidos simples de proteínas y péptidos. Esta proteína cumple funciones importantes en la nutrición de los parásitos fundamentalmente a través del catabolismo de la hemoglobina. En *Schistosoma mansoni* se demostró que esta enzima es importante para la eclosión de miracidios tratando los parásitos con ARNi contra SmLAP o por medio de su inhibición con bestatina (Rinaldi *et al.*, 2009). Por sus importantes funciones FhLAP es considerada un buen blanco terapéutico y candidato para ensayos de vacunación siendo el candidato vacunal que ha determinado la mayor protección en ovejas hasta el momento contra la infección con metacercarias de *F hepatica* (Acosta *et al.*, 2008).

Con la finalidad de silenciar este gen utilizamos un ARNdc de 287 pb y dos siRNAs de 24 pb que se encuentran dentro de la zona abarcada por el ARNdc. Como controles irrelevantes usamos un ARNdc contra la proteína verde fluorescente (GFP) y Cy3-siRNA (Ambion) que no tienen similitud con ninguna secuencia descrita en *F. hepatica*. Utilizando estas moléculas decidimos trabajar en puntos claves del silenciamiento mediado por la ARNi como son suministro de moléculas, tipo y concentración de moléculas utilizadas, susceptibilidad en JRD de distinta edad y persistencia del efecto.

Cuando se analiza la respuesta a la ARNi a nivel de ARN para ver cambios en la expresión del gen blanco empleamos una muestra heterogénea de parásitos, hayan o no incorporado las moléculas interferentes. Para determinar el porcentaje de parásitos que incorporaron las moléculas interferentes tratamos los JRDs con Cy3-siRNA fluorescente (Ambion, USA) y evaluamos la incorporación de fluorescencia. Primero ajustamos las condiciones de electroporación probando distintos voltajes y tiempos de electroporación y determinamos que 120 V 30 ms los parásitos incorporan muy bien las moléculas fluorescentes con buena sobrevida (datos no mostrados).

Dado que en los trabajos previos en *F. hepatica* se utilizaron tanto electroporación y soaking como métodos de entrega decidimos evaluar cuál era el más efectivo para suprimir la expresión génica. Para ellos tratamos los JRDs con los métodos tradicionales y combinaciones de estos con dos concentraciones distintas de Cy3-siRNA. A partir de la cuantificación relativa de la fluorescencia incorporada concluimos que el método en el cual los parásitos incorporan más fluorescencia es el electro-soaking (ver cap. Siguiente).

En los parásitos tratados la señal fluorescente se localiza predominantemente en el tubo digestivo y con microscopia de fluorescencia común es difícil apreciar si hay señal más allá del digestivo. Para ver si la señal difunde hacia los tejidos tratamos JRDs con 2 métodos de suministro distintos, soaking y electro-soaking, analizando luego los parásitos por microscopia confocal. En los parásitos tratados por electro-soaking la señal fluorescente difunde más en los tejidos que en parásitos tratados por soaking (Figura 1D del artículo Dell’Oca et al, 2014, incluido en la sección siguiente, pag 31).

En trabajos previos de ARNi en *F. hepatica* se usaron grandes concentraciones de dcRNA que pueden generar efectos inespecíficos, o eventualmente efectos “off-targeting”. Con el fin de disminuir posibles efectos inespecíficos y aumentar la especificidad de la ARNi evaluamos el nivel de silenciamiento disminuyendo la concentración ARNdc utilizado e incorporamos el uso de siRNAs. Buscamos determinar cuál era la concentración mínima de ARNdc capaz de inducir un silenciamiento estable y repetible. Tratamos los parásitos por distintos métodos de entrega con 2,5 ng/μl de ARNdc FhLAP marcado fluorescentemente para evaluar al mismo tiempo la incorporación de moléculas y el nivel de silenciamiento al utilizar una concentración mucho menor a la usada previamente. Con esta concentración de ARNdc detectamos la fluorescencia con 3 de los 4 métodos de entrega con los que tratamos a nuestros parásitos. A pesar de esto logramos un buen nivel de silenciamiento con todos los tratamientos. El electro-soaking fue el método más efectivo para reducir los niveles de mRNA del gen FhLAP por lo que consideramos

que es el mejor método de entrega. Las diferencias observadas no se deben a alteraciones de la viabilidad ya que determinamos mediante la tinción con DAPI y FDA que los parásitos resisten los tratamientos utilizados (Figura 2 A y 2 B del Artículo Dell'Oca et al, 2014., incluido en la sección siguiente, pag 32). En conclusión es posible silenciar la expresión de un gen endógeno con una concentración mucho menor a la usualmente utilizada aunque con esta dosis de ARNdc no siempre es posible determinar cuántos parásitos incorporan el tratamiento.

Para interferir la expresión de un gen en invertebrados tradicionalmente se han utilizado ARNdc largos mientras que los siRNAs se han utilizado preferentemente en líneas celulares de vertebrados. Pensando que es posible evitar efectos inespecíficos con el uso de moléculas de menor tamaño diseñamos 2 siRNAs distintos que se encuentran dentro de la región abarcada por el ARNdc (Figura 3 A Artículo Dell'Oca et al, 2014, incluido en la sección siguiente, pag 33).

Los 2 siRNA inducen un buen nivel de silenciamiento aunque con el siLAP2 el silenciamiento alcanzado fue mayor. La mezcla de los 2 siRNAs a la misma concentración final que los siRNAs por separado disminuyó casi por completo los niveles de mRNA de FhLAP (Figura 3 B Artículo Dell'Oca et al, 2014, incluido en la sección siguiente, pag 33). Determinamos que los siRNAs son efectivos para inducir el silenciamiento en JRD de *F. hepatica*.

Es necesario analizar cuánto perdura el silenciamiento luego de tratar los parásitos para establecer con mayor seguridad distintos tiempos en los que analizar el efecto del silenciamiento ya sea a nivel de mRNA, de proteína o de un fenotipo particular. Esto es muy importante ya que nos podemos encontrar con proteínas cuya reposición es muy lenta o que tengan una vida media larga. Si se da alguna de estas situaciones precisamos una ventana mayor de análisis para correlacionar la disminución de la expresión a nivel de ARN con una disminución a nivel de proteína.

Luego de testear el nivel de silenciamiento alcanzado utilizando siRNAs comparamos la eficiencia de estas moléculas frente al uso de ARNdc a lo largo del tiempo. Analizamos el nivel de silenciamiento a largo plazo en parásitos de un día de desenquistados que fueron tratados por electro-soaking una sola vez con 2,5 y 10 ng/μl de ARNdc o con 2,5 ng/μl de siRNA. El nivel de silenciamiento se mantuvo en buenos niveles hasta los 21 días con 2,5 y 10 ng/μl de ARNdc. Usando siARN el silenciamiento fue muy bueno hasta los 7 días, a los 14 la supresión obtenida fue cercana a un 40% y a los 21 días fue escasa (Figura 3 C y 3 D Artículo Dell'Oca et al, 2014, incluido en la sección siguiente, pag 33).

Los resultados de este trabajo se publicaron en el artículo que se adjunta a continuación

3. Interferencia de ARN en juveniles de Fasciola hepatica

RNA interference in *Fasciola hepatica* newly excysted juveniles: Long dsRNA induces more persistent silencing than siRNA Nicolás Dell'Oca, Tatiana Basika, Ileana Corvo, Estela Castillo, Paul J. Brindley, Gabriel Rinaldi, Jose F. Tort. *Molecular & Biochemical Parasitology* 197 (2014) 28–35.



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular & Biochemical Parasitology



RNA interference in *Fasciola hepatica* newly excysted juveniles: Long dsRNA induces more persistent silencing than siRNA



Nicolás Dell'Oca^{a,1}, Tatiana Basika^{a,1}, Ileana Corvo^a, Estela Castillo^c, Paul J. Brindley^b, Gabriel Rinaldi^{a,b,*}, Jose F. Tort^{a,**}

^a Departamento de Genética, Facultad de Medicina, Universidad de la República (UDELAR), Gral. Flores 2125, CP 11800 Montevideo, Uruguay

^b Department of Microbiology, Immunology and Tropical Medicine, and Research Center for Neglected Diseases of Poverty, School of Medicine & Health Sciences, The George Washington University, 2300 I Street NW, Washington, DC 20037, USA

^c Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República (UDELAR), Iguá 4225, CP 11400 Montevideo, Uruguay

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 March 2014

Received in revised form

29 September 2014

Accepted 1 October 2014

Available online 12 October 2014

Keywords:

RNAi silencing

siRNA

RNAi delivery methods

Fasciola

Trematodes

ABSTRACT

In trematodes RNA interference is the current tool of choice for functional analysis of genes since classical reverse genetic approaches remain unavailable. Whereas this approach has been optimized in schistosomes, few reports are available for other trematodes, likely reflecting the difficulties in the establishment of the technology. Here we standardized conditions for RNAi in the liver fluke *Fasciola hepatica*, the causative agent of fasciolosis, one of the most problematic infections affecting livestock worldwide. Targeting a single copy gene, encoding leucine aminopeptidase (LAP) as a model, we refined delivery conditions which identified electro-soaking, *i.e.* electroporation and subsequent incubation as efficient for introduction of small RNAs into the fluke. Knock down of LAP was achieved with as little as 2.5 µg/ml dsRNA concentrations, which may reduce or obviate off-target effects. However, at these concentrations, tracking incorporation by fluorescent labeling was difficult. While both long dsRNA and short interfering RNA (siRNA) are equally effective at inducing a short-term knock down, dsRNA induced persistent silencing up to 21 days after treatment, suggesting that mechanisms of amplification of the interfering signal can be present in this pathogen. Persistent silencing of the invasive stage for up to 3 weeks (close to what it takes for the fluke to reach the liver) opens the possibility of using RNAi for the validation of putative therapeutic targets.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Trematode infections inflict relevant burden on human development especially in impoverished areas around the globe. It is estimated that more than 200 million and 40 million people might

be affected by schistosomiasis and other food borne trematodiasis, respectively [1,2]. Adding to the high morbidity and disability that are produced by these infections, several of them are mainly a food production problem since they affect livestock and consequently generate severe economic losses. *Fasciola hepatica* is the causative agent of fasciolosis, one of the most relevant infections affecting livestock worldwide, with global economic losses estimated at USD 3.2 billions dollars annually with a more pronounced impact to agricultural communities in developing countries. In the last decade fasciolosis has also emerged as a zoonotic disease mainly in rural areas of Northern Asia, Central Africa and the Peruvian Andes in South America, often with >10% prevalence [2,3].

Control measures rely mainly on anthelmintic drugs, but in recent years reports of resistance to commonly used anthelmintic in schistosomes and *Fasciola* have emerged [4]. The continuous pressure of these drugs on less susceptible parasites has led to the selection of resistant organisms, increasing the need for alternative therapeutic targets [5–8]. The advent of new sequencing technologies facilitated the knowledge of the genomes and transcriptomes

* Corresponding author at: Department of Microbiology, Immunology and Tropical Medicine, and Research Center for Neglected Diseases of Poverty, School of Medicine & Health Sciences, The George Washington University, 2300 I Street NW, Washington, DC 20037, USA. Tel.: +1 202-994-3122.

** Corresponding author at: Departamento de Genética, Facultad de Medicina, Universidad de la República (UDELAR), Gral. Flores 2125, CP 11800 Montevideo, Uruguay. Tel.: +598 2 924 95 62; fax: +598 2 924 95 63.

E-mail addresses: ndelloca@fmed.edu.uy (N. Dell'Oca), tbasika@gmail.com (T. Basika), icorvo@fmed.edu.uy (I. Corvo), castillo@fcien.edu.uy (E. Castillo), pbrindley@gwu.edu (P.J. Brindley), grinaldi@gwu.edu (G. Rinaldi), jtort@fmed.edu.uy (J.F. Tort).

¹ Present address: Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre 9500, Brazil.

of trematodes [9–13], providing sources for seeking novel drug targets [14]. However, whereas genome sequence information is expanding massively, many helminth open reading frames encode proteins of unknown function. Accordingly RNAi is imposed as the method for gene function analysis since classical tools of functional genomics are not available in most of these parasites [15,16].

In Platyhelminthes, RNAi has been established as a routine technique for gene function elucidation, advancing in the characterization of genes involved in regeneration and development in the free living planarians [17]. However, the implementation of this technique as routine in parasitic flatworms is less advanced, slowed by the hurdles imposed by the complex developmental cycles, robust teguments, inability to maintain the worms for extended periods *in vitro*, and absence of immortalized cell lines [18–21].

In parasitic flatworms most progress has been reported for schistosomes [20,22–24]. Although this demonstrated the utility of RNAi for functional genomics in trematodes, these findings indicated that genes are not equally affected, off target effects can occur, and developmental stages display different susceptibility to interference [25]. Despite this, and based on optimization efforts in schistosomes [26–28] RNAi is emerging as a tool for the study of gene function in other flukes [1,12,23,29,30]. RNAi reports in other parasitic flatworms are less frequent; two reports in the common liver fluke *F. hepatica* [31,32] and the carcinogenic liver fluke *Opisthorchis viverrini* [33,34], and single reports in the trematodes *Clonorchis sinensis* [35], the monogenean *Neobenedenia giirellae* [36] and the cestodes *Moniezia expansa* [37], *Echinococcus granulosus*, *E. multilocularis* [38,39] and, *Hymenolepis microstoma* [40].

Two pioneering reports demonstrated the presence of a viable RNAi pathway in the liver fluke [31,32]. We have previously employed electroporation as delivery method and knocked-down the expression of both the firefly luciferase reporter gene (mRNA Luciferase) and the endogenous gene leucine aminopeptidase (LAP) in newly excysted juveniles (NEJs) [32]. NEJs were also targeted in a second study aiming to silence cathepsin L and B, two cysteine proteases proposed to be relevant in invasion and immune response evasion [31]. These enzymes belong to a multigene family with stage specific variants [41]. In this study by soaking NEJs with dsRNA targeting the adult cathepsin isoforms, a knock-down of the enzymes was detected. The treated worms displayed a reduction in the invasion ability measured by an invasion assay.

Based on these findings, we focused here on the optimization of the RNAi in juveniles of the liver fluke. We evaluated different delivery methods, we compared long and short interfering RNA directed to the same target (the gene encoding FhLAP) at different concentrations and administered at different times after excystment. The results provide the framework for deployment of this technology as a tool for the interrogation of sequence datasets to investigate function and essentiality of new genes that in turn might represent targets for interventions.

2. Materials and methods

2.1. Parasite culture

Metacercariae (MC) of *F. hepatica* were sourced from Baldwin Aquatics Inc. (Monmouth, OR) and from DILAVE (Division Laboratorios Veterinarios “Miguel C. Rubino” Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Uruguay). MC from DILAVE were used for the initial incorporation assays with Cy3-labeled control siRNA. Thereafter due to shortage of this source, we studied MC from Baldwin Aquatics Inc. All silencing experiments were performed with MC from Baldwin Aquatics Inc. No differences in incorporation of labeled control siRNA were detected between MC from these two sources.

The *in vitro* excystment was performed as described with minor modifications [42]. Briefly, MC were incubated 5 min at room temperature with 1% sodium hypochlorite in 100 mm filters to remove the outer cyst wall, and then washed exhaustively with PBS. MC were activated by incubation at 39 °C in a medium prepared by mixing equal volumes of solution A (0.4% sodium taurocholate, 120 mM NaHCO₃, 140 mM NaCl pH 8.0) and solution B (50 mM HCl and 33 mM L-cysteine). The excystment process was monitored under the stereomicroscope. After 90–180 min of incubation, NEJs began to emerge, and were collected, washed several times with wash medium (RPMI 1640 supplemented with 200 U/ml Penicillin G sulfate, 200 mg/ml streptomycin sulfate, 500 ng/ml amphotericin B, 10 mM HEPES), transferred into 12 wells tissue culture plates and cultured at 37 °C under 5% CO₂ in Basch's medium [43].

Cultured NEJ were treated by different procedures for the incorporation of interfering molecules (Section 2.3) and then cultured in Basch's medium for different times according to the experiment; for long incubations media was changed every 48 h. No evidence of contamination was observed in the cultures consistent with the presence of antibiotic–antimycotic mix (included in Basch's media formula). However, we have regularly observed precipitations appearing on NEJ culture. Complete media or media containing dsRNA or siRNA does not develop precipitates upon incubation in the absence of parasites, while debris and precipitates are commonly observed on NEJ culture. These precipitates were extensively washed out before all the analysis performed.

2.2. Synthesis of interfering RNAs

Long dsRNA were generated by *in vitro* transcription using as templates PCR products generated with gene specific primers tailed with the T7 promoter sequence. A 738 bp dsRNA fragment of the Green Fluorescent Protein gene (GFP) employed as irrelevant dsRNA control was generated using as template the plasmid pEGFP-N2 and the primers GFP_For.T7 (TAATACGACTCACTATAGGGCTGGTCGAGTCGGACGCGCAGC) and GFP_Rev.T7 (TAATACGACTCACTATAGGGGCGGCCGCTTACTTGTA). A 267 bp dsRNA from the *F. hepatica* leucine aminopeptidase gene (FhLAP, GenBank accession AY64459), spanning coding DNA positions 389–655 was generated by PCR employing the full length FhLAP clone as template using the gene-targeted T7 promoter containing primers LAP_For.T7 (TAATACGACTCACTATAGGGATCTGCTACTCAATGCTCTG) and LAP_Rev.T7 (TAATACGACTCACTATAGGGCCTTCATACCACCGAGTGAA). dsRNAs were synthesized and purified using the Megascript RNAi kit (Ambion). Integrity of the dsRNAs was verified by non-denaturing 2% agarose gel electrophoresis and purity was assessed by the ratio A 260/A280. Concentration of dsRNA was determined spectrophotometrically (ND-1000, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). dsLAP was Cy3-labeled with Silencer® sRNAi Labeling Kit with a protocol optimized to long double strand RNAs. Two siRNA (FhLAP1 sRNAi (5'-GGACGAGTTGGTCTACGCTTG GCT-3') and FhLAP2 sRNAi (5'-CGAATGGCTGCACCCAGAATTGTGG-3') spanning positions 516–540 and 598–622 of the FhLAP gene respectively), were synthesized commercially by Integrated DNA Technologies (IDT Inc., IA). The Silencer® CyTM3-Labeled Negative Control #1 siRNA, (Ambion, Austin, TX, USA) was used as irrelevant control, since this sequence is absent from available *F. hepatica* transcriptome data, and the incorporation of Cy3-labeling does not affect the silencing effect (see <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/AM4621>).

2.3. Delivery of interfering molecules

Fluorescent siRNA (Silencer Cy3-labeled Negative Control #1 sRNAi) was included as transfection reporter at the outset, whereas

gene specific siRNA or dsRNA (Section 2.2) were used in subsequent experiments. For the initial experiments juvenile worms were sampled one day after *in vitro* excystment and treated either by soaking in the presence of 2 or 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of fluorescent siRNA, by electroporation of the interfering molecules, or by combinations of these methods. For soaking, NEJs were cultured in 1 ml Basch's medium supplemented with siRNAs. For electroporation, NEJs were removed from the culture, resuspended in 100 μl of wash medium containing the interfering molecules, transferred to 4 mm gap cuvettes, and subjected to square wave electroporation (125 V, 30 ms) in a BTX ElectroSquarePorator ECM830 (BTX, San Diego, CA). Immediately after electroporation, NEJs were recovered with 900 μl of pre-warmed Basch's medium and maintained in culture (electro-soaking) or subjected to extensive washes with wash medium and transferred to Basch's medium without dsRNA/siRNA (simple electroporation). One day after treatment, the worms were rinsed thoroughly in wash medium to remove unincorporated siRNA molecules, and photographed (Nikon Eclipse TE 200 inverted microscope). Dye incorporation was estimated by measuring the area and intensity of fluorescence with Image J [44]. The area of the NEJs was selected and the fluorescence intensity quantified (measured as mean gray value of the selected area).

The same experimental design was used to test viability effects using a labeled gene specific dsRNA, while monitoring the viability of the NEJ by a modification of a two color detection system [45] (see Section 2.4).

The electro-soaking procedure was selected for gene silencing analyses using gene specific dsRNA (labeled or unlabeled) or specific siRNAs (Section 2.2). Briefly, one-day old NEJs were treated with either specific dsLAP (2.5 ng/ μl , 5 ng/ μl or 10 ng/ μl) or siLAP (2.5 ng/ μl or 5 ng/ μl). Worms subjected to electro-soaking without interfering molecules were included as control. dsRNA against GFP or silencer negative control siRNA were used as irrelevant controls at the same concentrations. When analyzing the persistence of the silencing effect after initial exposure, media were changed every 48 h without the addition of fresh dsRNA. The larval flukes were harvested and analyzed 8, 14 or 21 days after treatment.

2.4. Monitoring the viability of the parasites

Since propidium iodide (PI) and carboxyfluoresceine diacetate (C-FDA) discriminate viable from dead schistosomes [45], we used this approach with NEJs. Given that Cy3 was used as reporter for dsRNA incorporation and that its emission wavelength partially overlaps that of PI, diamidinophenylindole (DAPI) was included to detect damaged/dying worms. FDA is an esterase substrate used to stain living cells; membrane integrity is necessary for intracellular retention of the liberated products. Meanwhile DAPI preferentially stains dsDNA nuclei specifically and needs damage of the cell membrane for its penetration so is used to stain dead cells. We tested the substitution of DAPI for PI by a simple assay depicted in Supplementary Fig. 1. Briefly we compared the incorporation of the three dyes in untreated cultured, mock electroporated or heat-killed (by incubation 15 min at 75 °C) NEJs. Parasites were washed and incubated in culture media supplemented with 1 ng/ μl DAPI, 0.5 ng/ μl FDA and 1 ng/ μl PI. The viability of the parasites was analyzed under fluorescence microscopy monitoring the incorporation of the dyes. This experiment validated the use of DAPI as dead/compromised worm track.

The effect of different delivery procedures on the viability of parasites was tested following a procedure similar to that described in Section 2.3. Briefly, one-day old NEJs were treated with 2.5 ng/ μl Cy3-labeled dsLAP by different delivery methods as previously indicated. After 24 h of treatment the worms were washed 3 times and incubated in culture media supplemented with 1 ng/ μl DAPI, and

0.5 ng/ μl FDA. Following incubation for ~2 h, NEJs were washed with PBS and examined by microscope.

2.5. Detection of incorporation of Cy3-labeled RNA by confocal microscopy

About 30 one-day old NEJs were exposed to 5 ng/ μl of Silencer® Cy3-labeled Negative Control #1 siRNA by soaking or electro-soaking, in the conditions previously described and harvested 24 h later. After treatment NEJs were washed 4 times with 1X PBS, fixed for 30 min in 4% PFA at 4 °C, washed 4 \times in 1 \times PBS, incubated with DAPI at 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 10 min and extensively washed with 1 \times PBS. Confocal imaging of the treated parasites was performed on a Leica TCS SP5 II spectral confocal microscope, with excitation of 405 nm and 543 nm to detect DAPI and Cy3, respectively.

2.6. Gene expression

RNA was extracted from the worms using the RNAqueus-Micro Kit (Ambion). Any residual DNA remaining in the RNA preparations was removed by DNase treatment. RNA was quantified by Nanodrop spectrophotometer and equal amounts of RNA from all conditions (usually 500 ng) were used for cDNA synthesis using the iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad, Hercules, CA) or RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas). Real time PCR was carried out in a Rotor-Gene 6000 Real time PCR System (Corbett Life Sciences). Primers employed for real time PCR were for β -actin; (Forward 5'-GTGTTGGATTCTGGTGATGGTGTC-3' and Reverse 5'-CAATTTCTCCTGAT GTCTCG-3'), and for FhLAP; (Forward 5'-GCTACTCTTACCGCCATGTGGTACG-3' and Reverse 5'-CACACGGTGTATACGGGTGGTC-3'). These primers targeted sites outside of the target sequences of the FhLAP dsRNA to avoid cross contamination [32]. Reactions were performed in duplicate or triplicate with cycling conditions of 94 °C, 5 min, 94 °C, 30 s; 60 °C, 30 s (35 cycles) using Rotor gene SYBR Green PCR Kit (Qiagen). Fluorescence was detected during the annealing/extension step, and melting curve analysis was performed immediately after PCR cycling, showing the presence of a single peak for each expected amplicon. The relative transcript levels were analyzed by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [46], using β -actin as the internal reference gene for normalization. In the above method the differences of C_t for the target and reference genes are calculated ($\Delta C_t = C_{t[\text{FhLAP}]} - C_{t[\text{Fh}\beta\text{-actin}]}$) for each condition, and normalized by subtracting the values obtained for treated and non-treated samples ($\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t[\text{treated worms}]} - \Delta C_{t[\text{untreated control worms}]}$). Results are presented as the mean \pm standard error (SE) of the unit value of $2^{-\Delta\Delta C_t}$ from two independent experiments. Statistical analysis was performed by paired Student's *t*-test on ΔC_t values with the GraphPad Prism Software (www.graphpad.com); *p* values of ≤ 0.05 were considered significant.

2.7. Leucine aminopeptidase activity assay

Approximately 150 one-day-old NEJs were treated by electro-soaking with 2.5 ng/ml dsLAP-RNA or mock electro-soaked with no interfering molecules (control) following the protocol above (Section 2.3). One day after treatment, proteins were extracted with mirVana™ PARIS™ Kit (Ambion). Proteolytic activity was monitored by measuring the hydrolysis of 7-amino-4-methyl coumarin (AMC) from the synthetic peptide substrate Leu-AMC in a FluoStar spectrofluorimeter at 345 nm excitation and 440 nm emission, using an AMC standard curve. Briefly, 50 μl of protein extract was incubated for 10 min in 50 μl of glycine buffer 0.1 M pH 8.5 containing 1 mM MnCl_2 . To initiate hydrolysis, 100 μl substrate was added to bring the reaction to a volume of 200 μl and incubated at 37 °C

for 1 h. Assays were performed in duplicates, and the activity was expressed as fluorescence units of AMC released per second.

Supplementary material related to this article can be found in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.10.001>.

3. Results and discussion

3.1. Optimizing the delivery of interfering molecules

Previous reports had demonstrated the activity of experimental RNAi in *F. hepatica*, either by electroporation [32] or soaking [31]. Considering its value for the study of gene function in non-model species, we sought to optimize the technique. We focused on the invasive stage as the target, since NEJs were employed in the pioneering reports, can be easily obtained by *in vitro* excystment of MC and maintained in culture long enough to allow genetic manipulation and analyze the phenotype. Furthermore, functional analyses have been developed for this developmental stage and could be employed to address the nature of the host–parasite relationship.

In order to compare different delivery methods we treated NEJs with fluorescent siRNAs that did not share homology to

known genomes, and followed the incorporation and the viability of worms, assessed by morphological changes and mobility under the microscope. We examined increasing electroporation charge and duration, 125 V 20 ms, 125 V 30 ms, 200 V 20 ms, 200 V 30 ms. Subsequently, we deployed 125 V pulse for 30 ms since this produced an acceptable compromise between incorporation and survival of the cultured worms (not shown). For soaking, we assessed the incorporation after 24 h of treatment. Two concentrations of Cy3-labeled siRNA were employed and four delivery methods tested: (1) soaking, (2) electroporation, and the combination of the two, named (3) “electro-soaking”, when the siRNA was not removed after the pulse, and (4) “soaking–poration”, where the siRNA was incubated with the parasites for 24 h before the pulse (Fig. 1A). When using 5 μ g of the labeled siRNA (in a final 1 ml volume), dye incorporation after 24 h treatment was observed in all conditions except electroporation, but only electro-soaking appeared to be equally effective with a lower dose of the tracking fluorophores (2 μ g/ml) (Fig. 1B and C). It is notable that while with simple electroporation, the worms were washed immediately after treatment, the ‘electro-soaking’ conditions where the interfering molecules remain in the culture media are similar to those we had previously reported [32]. The findings confirmed our previous results [32]

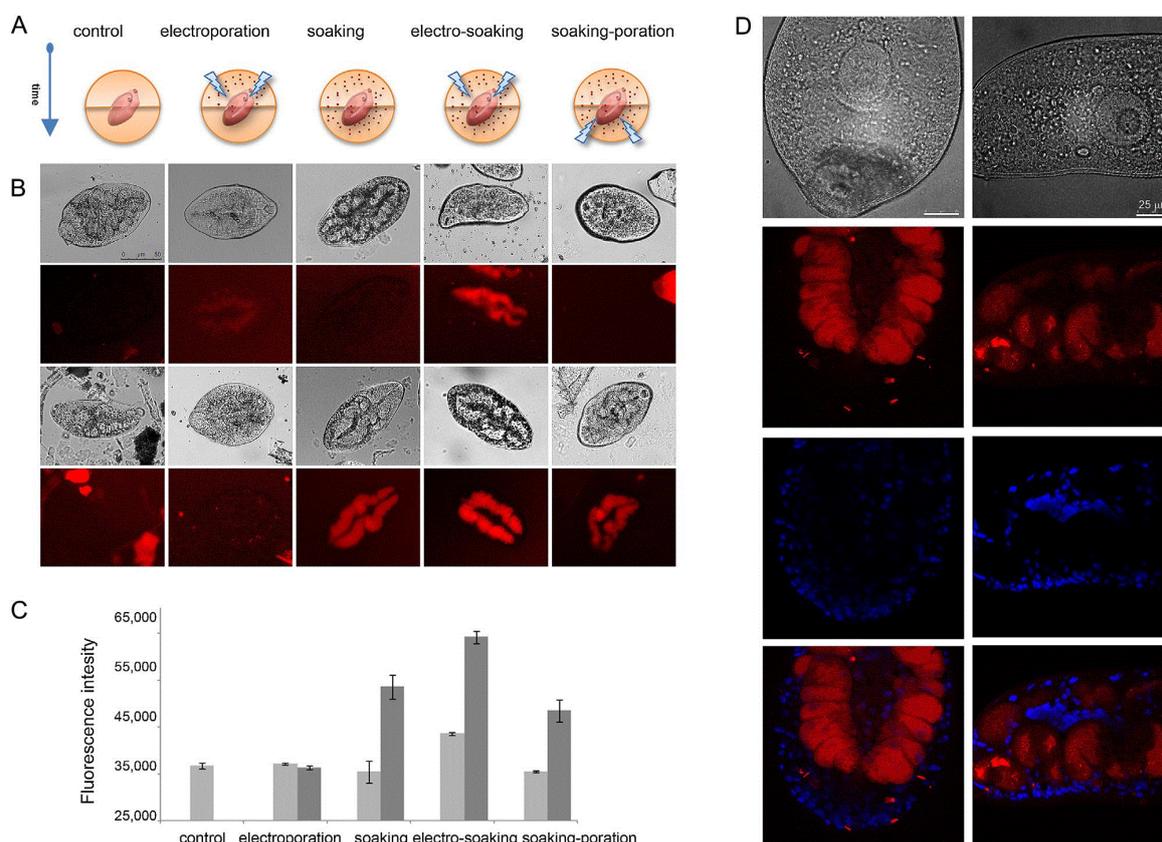


Fig. 1. Comparison of small RNA delivery methods. (A) *In vitro* excysted juveniles were cultured for 1 day and then exposed to 2 ng/μl or 5 ng/μl Cy3-labeled siRNA by different methods according to the scheme: electroporation (electroporation of siRNA and immediate wash before incubation), soaking (incubation with siRNA), electro-soaking (electroporation of siRNA and incubation without wash), soaking–poration (incubation with siRNA for one day before the electroporation). After 24 h of treatment the live parasites were analyzed under fluorescence microscopy. (B) A representative image of a NEJ from each condition and concentration is shown, with NEJ treated with 2 ng/μl in bright field and fluorescence in the upper panels, and those treated with 5 ng/μl in the lower panels respectively. Scale bar 50 μ m. (C) The incorporation was estimated by measuring the fluorescence intensity on images taken from each condition (light gray 2 ng/μl, dark gray 5 ng/μl Cy3-labeled siRNA). Several parasites from each condition were selected and the mean gray value of the area covered by each parasite was computed with Image J. (D) The incorporation of Cy3-labeled siRNA by soaking or electro-soaking was evaluated by confocal microscopy on fixed worms. Selected optical planes of bright field (top), Cy3-labeled siRNA (red), nuclei stained with DAPI (blue) and a merged image (bottom) are represented for soaked (left column) or electro-soaked (right column) worms. Scale bar 25 μ m. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

indicating that RNA molecules could have been incorporated passively into juvenile liver flukes, but alterations in the parasite surface introduced by the electroporation may improve the incorporation. In all the cases the major location of the fluorescence was the gut of the NEJ. In order to further investigate the distribution of the transfected molecules, we used confocal imaging to examine soaked and electro-soaked worms. While there is a strong signal in the digestive lumen in both conditions, a diffuse fluorescence is observed in the parenchyma adjacent to the gut in soaked worms, and a more pronounced labeling of the parenchyma was evident after electro-soaking (Fig. 1D). These observations suggest that whereas the digestive tract might be the main path of incorporation, diffusion of the incorporated nucleic acids to adjacent tissues does occur, and furthermore that the entry of dsRNA/siRNAs into the NEJ was improved by the alterations to the tegument induced by electroporation.

3.2. Electro-soaking induced the strongest knock down in NEJs

Detection of Cy3 fluorescence within the NEJ provides an indicator of incorporation, but in the case of dsRNA does not assure the expected silencing phenotype. In order to test the correlation between fluorescence intensity and RNAi knock down we treated NEJs with an *in vitro* Cy3-labeled FhLAP dsRNA. We selected this gene since is single copy and susceptible to RNAi [32]. One-day-old NEJs were treated with 2.5 ng/ μ l of Cy3-labeled dsLAP and analyzed 24 h later by microscopy and qRT-PCR (Fig. 2A). While the fluorescent signal was detected in NEJs treated by

soaking or 'electro-soaking', a weaker signal was evident in the 'soaking-poration' worms, but little or no fluorescence was observed in the electroporated and controls NEJs. The differences observed were not due to an altered viability of the worms caused by the treatment, since we assessed this by double staining with FDA and DAPI (Fig. 2A and Supplementary Fig. 1).

Despite these differences in dsRNA incorporation, all delivery methods produced a consistent knock down at the mRNA level. The strongest knock-down, ~90%, was observed following 'electro-soaking' and ~80% reduction by both soaking and 'soaking-poration'. Notably, the single electroporated NEJs group exhibited pronounced (60%) knock-down (Fig. 2B). All the delivery methods induced strong knock-down, even though 'electro-soaking' produced marginally stronger signals. Consistently we observed a slightly increased incorporation of the transfected molecules in the parenchyma with electro-soaking (Fig. 1D). It is believed that electroporation induces pores in biological membranes, favoring ingress of environmental molecules [24,47,48]. Keeping the interfering molecules in contact with NEJ after electroporation might further increase incorporation. We employed far less dsRNA (2.5 μ g in a final volume of 1000 μ l, that is 2.5 ng/ μ l) than earlier reports (100 ng/ μ l [31] or 30 ng/ μ l [32]) and observed a consistent effect in reduced mRNA levels. Lowering the concentration of interfering RNA might reduce off target effects while facilitating efficient knock down of the intended target. On the other hand, whereas the low dose is effective at silencing mRNAs, it proved to be undetectable by microscopy, hindering estimation of the proportion of the transformed NEJs. This is relevant since

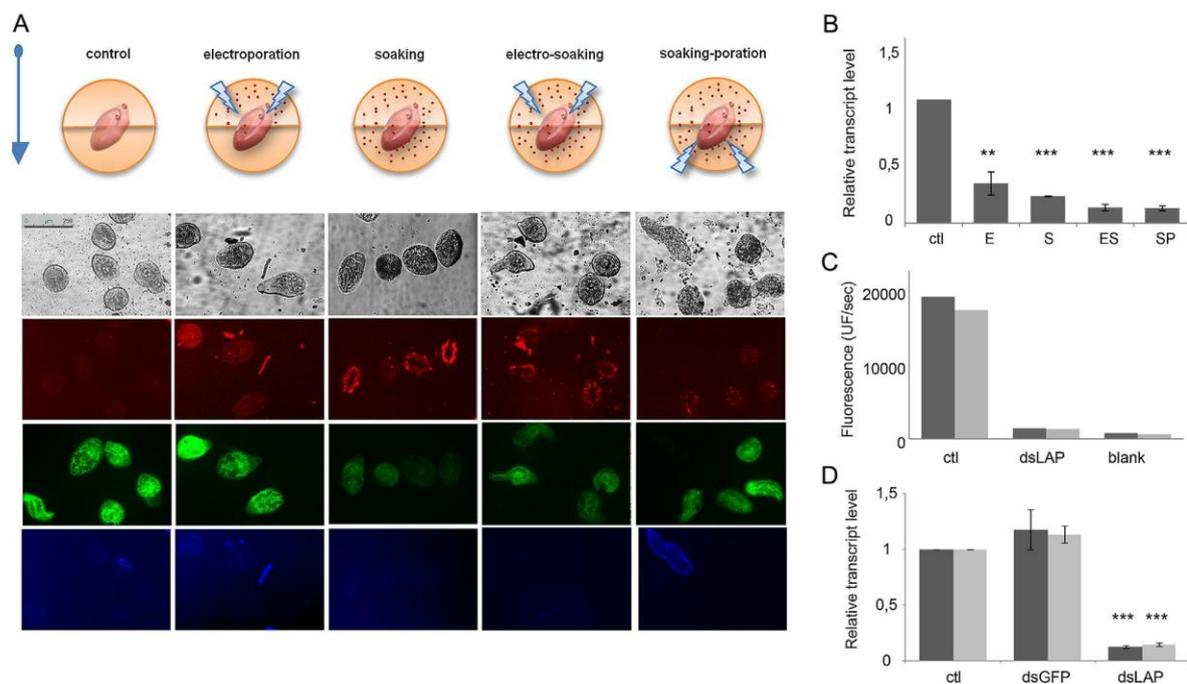


Fig. 2. Silencing effects of dsRNA directed to an endogenous gene. (A) Incorporation of labeled dsLAP by different delivery methods. 1-Day old NEJs were treated with 2.5 ng/ μ l Cy3-labeled dsLAP by different delivery methods as indicated, and followed 1 day later by fluorescence microscopy (red). Worm viability was assessed by live staining with 0.5 ng/ μ l FDA (green, live worms) and 1 ng/ μ l DAPI (blue, damaged or dead worms). As control NEJs were subjected to mock electro-soaking without interfering molecules. The images correspond to live captures, consequently they do not coincide exactly due to movements of the parasites. Scale bar, 250 μ m. (B) Relative FhLAP expression was analyzed by reverse transcription and qPCR using β -actin as internal reference gene for normalization and expressed as $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm$ standard deviation. (C) FhLAP enzymatic activity in dsLAP treated NEJs. One-day old NEJs were electro-soaked with 2.5 ng/ μ l dsLAP (dsLAP) or mock electro-soaked (no dsRNA, Ctl). One day after treatment proteins were extracted and the LAP activity determined by a fluorimetric assay with Leu-AMC as a substrate. Blank corresponds to the background fluorescence of the substrate in the absence of enzyme. Two independent experiments are included, represented by dark and light bars. (D) NEJs of different ages were tested for the silencing effect by qPCR; cultured NEJ were treated on day 1 (dark bars) or day 7 (light bars) post excystment with 2.5 ng/ μ l dsLAP or dsGFP (control) and tested for suppression 24 h later. Significant differences between dsLAP treated worms and controls by paired *t*-tests are indicated (*P* values <0.01 (**)) and <0.001 (***). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

it allows adjusting the effects observed to the proportion of the treated population that effectively received the targeting molecules [49]. Clear reduction in mRNA levels correlated with a reduction in the protein level, and with a decreased LAP activity of dsLAP 'electro-soaking' treated worms (Fig. 2C).

3.3. Sensitivity to dsRNA silencing is similar in juveniles of different age

Since in schistosomes it has been proposed that the ability to induce silencing is variable during development and larval stage [25,26], we tested whether similar effects could be detected in NEJs. We treated one and eight days old NEJs by electro-soaking with dsLAP RNA, and determined the relative gene expression of FhLAP one day later. Significant differences were not observed, indicating that newly excysted, i.e. one-day-old NEJs and one week old juveniles were equally sensitive to dsRNA (Fig. 2D).

3.4. Long dsRNA induced a more persistent silencing than siRNAs

While gene-specific silencing in invertebrate model species is efficiently mediated by long dsRNA, in vertebrate models it is achieved by short siRNAs [50]. In order to compare the silencing effect of long dsRNA versus short siRNA in NEJ, we generated two different siRNAs against FhLAP (siLAP1 and siLAP2) that are within the region targeted by the long dsRNA (Fig. 3A). We electro-soaked the larvae with these siRNAs individually and together, halving the concentration of each siRNA so the final concentration remained the same among all tested groups, including the Cy3-labeled siRNA (irrelevant control). While both specific siRNA markedly reduced levels of LAP mRNA as measured by quantitative PCR one day after treatment siLAP2 induced stronger silencing effects than siLAP1, and the combination of the two interfering siRNAs almost ablated the expression (Fig. 3B). The reasons for such variability between siRNA silencing potency are unclear but may be due to differences in accessibility, since different regions of the mRNA may be more highly structured or bound by regulatory proteins [26].

To test the persistence of the silencing effect, we treated one-day-old NEJs by electro-soaking with two concentrations of dsLAP (2.5 and 10 ng/ μ l) or siLAP2 (2.5 ng/ μ l), and analyzed the expression levels of the FhLAP mRNA by qPCR at both one day and one week after treatment. All conditions produced a robust knock down of the FhLAP mRNA that persisted from one day up to seven days after treatment (Fig. 3C). To determine the duration of the knock down, we repeated the experiment harvesting NEJs at 14 and 21 days after treatment. With long dsRNA, a strong knock-down remained evident until day 21. Furthermore the effect was marginally stronger when higher concentration of dsRNA was used. The level of suppression achieved with siLAP was modest (40%) at day 14, and close to unapparent by day 21 (Fig. 3D). These findings showed that both long and short double stranded RNA induced a robust short-term silencing effect, but only long dsRNA conveyed long lasting effects. It is expected that these dsRNAs are targeted by the RNA-induced silencing complex (RISC) complex to yield siRNAs. In *Caenorhabditis elegans* and in flowering plants, an amplification mechanism dependent on a RNA dependent RNA polymerase (RdRP) [51] is responsible for the maintenance of silencing signals, which are transferred between cells in order to establish systemic silencing [25,52]. However, while the spreading genes are present in all trematodes, the amplification genes may to be absent (Fontenla and Dell'Oca, unpublished).

We observed variations on the FhLAP activity on NEJs treated with dsRNA against GFP, a negative control. These variations were not consistent being expressed as a slight increase in some cases (Figs. 2D and 3D) or decrease in others (Fig. 3C), and divergent among replicates (not shown). Although none of these differences

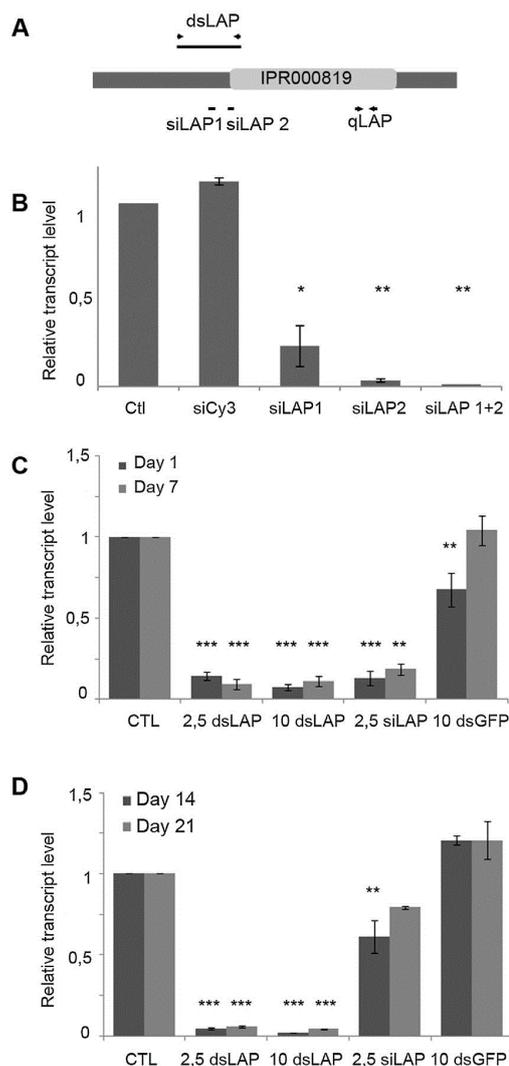


Fig. 3. Comparison of siRNA and dsRNA silencing effects. (A) Schematic representation of the FhLAP gene, showing regions targeted by the dsRNA, siLAP, siLAP2 and location of the real time PCR primers used to test the effect. The conserved carboxy domain of FhLAP (Interpro domain IPR000819) is indicated by light shading. (B) Relative FhLAP expression in parasites electrosoaked with different synthetic siRNAs (siLAP1 and siLAP2). One-day old NEJs were treated by electro-soaking with 5 ng/ μ l of siRNA1, siRNA2, a mix of both (2.5 ng/ μ l each, siLAP 1 + 2) or 5 ng/ μ l Cy-3 labeled siRNA (irrelevant control, siCy3). Mock electro-soaking (no siRNA) was used as a control (Ctl). Relative levels of FhLAP mRNA were assessed one day later by qPCR using the mock condition as reference and β -actin as internal reference gene for normalization and expressed as $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm$ standard deviation. (C) Longevity of the RNAi suppressive effect. Relative FhLAP expression in parasites electro-soaked with dsLAP (2.5 ng/ μ l and 10 ng/ μ l), dsGFP (irrelevant control, 10 ng/ μ l) or siLAP2 (2.5 ng/ μ l). Mock electro-soaked parasites were used as control. Suppression effect was tested by measuring the relative levels of FhLAP mRNA by qPCR at one (dark gray bars) and seven (light gray bars) days, respectively, using the mock condition as reference and β -actin as internal reference gene for normalization. (D) Persistence of the silencing effect was tested after a single initial treatment in identical conditions as described in (C) and analyzed by qPCR at 14 (dark bars) or 21 (light bars) days after treatment.

were statistically significant, why this effect occurs remains unclear but, in any event, is dissimilar to the outcome following treatment with FhLAP dsRNA, which produced consistent, specific and persistent reduction of the FhLAP mRNA levels.

Notably, other 'up-regulation' phenomena have been reported. Slightly increased levels of cathepsin B in relation to the untreated

control are shown in schistosomules treated with an irrelevant control siRNA while a specific reduction is seen when exposed to cathepsin B derived siRNA sequences (see Fig. 6, Ref. [26]). Similar variations in the relative mRNA levels in non-target controls (higher than in the untreated control) are evident in a more recent report on schistosomules [53]. Other up-regulation phenomena were reported in schistosomules, but in this case the samples were compared to a GFP irrelevant control and no untreated control was included [54]. Besides these variations at mRNA level other variations in controls have been observed: we observed increased luciferase activity in NEJs co-transfected with the LUC mRNA and an irrelevant dsRNA [32]. The immune-histochemical detection of cathepsins B and L in *F. hepatica* juveniles treated with an irrelevant 200 bp dsRNA resulted in lower signals than the untreated controls, but much higher than the specific reduction observed in the respective cathepsin-dsRNA treated conditions [31]. Furthermore, an increased alkaline phosphatase activity was seen in control dsRNA treated males of *Schistosoma mansoni* while a specific reduction was seen when treated with SmAP dsRNA [28]. Whether this represents a generalized non-specific effect related to the presence of any dsRNA needs further investigation. It could be stated that the differences in size between the target (dsLAP) and control dsRNA (dsGFP) might underlay the inconsistent variations observed. However, erratic effects could be equally observed in experiments with paired size controls [28,31,53,54] or in those with larger controls [32,26]. Consequently other hypotheses and experimental designs need to be generated in order to address this phenomenon. Further standardized gene silencing protocols applied to trematodes and helminth parasites at large need to be developed. Multiple approaches for RNAi experimental validation, including appropriate controls, to aid reproducibility and comparative analyses have been recommended [15]. In this regard, the current study advances the optimization of RNAi protocols that allow a persistent gene silencing for up to 3 weeks, opening a prospective *in vivo* functional validation of putative therapeutic targets.

4. Conclusions

We have optimized experimental RNAi for functional analyses of the juvenile stage of the liver fluke *F. hepatica*. RNAi is an important tool for analyzing gene function fundamentally in trematodes in which classical methods of gene function analysis are generally not available [16,19]. We investigated the gene encoding FhLAP as a model target since it is known from previous reports to be amenable to silencing. Silencing effects detected both at the transcription and protein levels were evident. The combination of electroporation and soaking produced the most impressive knockdown, consistent with low concentrations of dsRNA. Although in all the delivery methods the gut seems to be the principal route of ingress of the interfering RNAs, electro-soaking might induce sub-tegumental incorporation, and might offer a way to reach tegumental targets. It is worth noting that most of the successfully silenced genes in schistosomules were secreted or digestive [23,24,32,26], or exposed in the surface [28,53,55]. However some reports of effective silencing of less accessible targets are starting to emerge [22,25,30,56]. Our results open the possibility of testing other genes not easily accessible through the gut to confirm the efficacy of the procedure.

We compared the effect of long dsRNA and two siRNAs directed to the same target. Both siRNAs resulted in effective silencing, and when administered together they produced greater effects than a single dose, suggesting that they act in synergy. However, the long dsRNA delivered more persistent effects than short siRNAs lasting up to 21 days after a single dose treatment. This supports the notion that transitive RNAi exists in flatworms [57]. Indeed, in schistosomules RNAi lasts up to 40 days, and in *O. viverrini* for at least

nine days [33]. Furthermore, because feeding is an efficient RNAi delivery method in planarians for genes expressed in diverse tissues and locations, this would indicate that free living flatworms are able to incorporate RNAi inducers and transport the signal [58,59]. Likewise our confocal results suggest that diffusion of the silencing signal also in *F. hepatica*. Taken together these results may indicate that this response is conserved in Platyhelminthes at large. In *C. elegans* an RNA dependent RNA polymerase (RdRP) is responsible for the amplification of the silencing signal [51] but orthologues of this enzyme have not been described in other metazoans so far, and homologs are consistently absent in the genome drafts of planarians [60], schistosomules [61] and tapeworms [62]. The mechanisms responsible for the transitive RNAi effect remain unclear, and warrant further investigation.

Acknowledgements

We would like to thank Dra. Leda Roche, Dr. Pablo Smircich and Mag. Alicia Costabile for useful comments and discussions. We would like to thank Dr. Valeria Gayo from DILAVE for contributing metacercariae for this work and Mag. Mariana di Domenico for her helpful assistance and advice in confocal microscopy. We acknowledge the insightful comments of the referees that helped to improve this manuscript. This work was partially funded by CSIC, PEDECIBA.

References

- [1] Utzinger J, Becker SL, Knopp S, Blum J, Neumayr AL, Keiser J, et al. Neglected tropical diseases: diagnosis, clinical management, treatment and control. *Swiss Med Wkly* 2012;142:w13727.
- [2] Keiser J, Utzinger J. Food-borne trematodiasis. *Clin Microbiol Rev* 2009;22:466–83.
- [3] Espinoza JR, Terashima A, Herrera-Velitz P, Marcos LA. Human and animal fascioliasis in Peru: impact in the economy of endemic zones. *Rev Peru Med Exp Salud Públ* 2010;27:604–12.
- [4] Brennan GP, Fairweather I, Trudgett A, Hoey E, McCoy, McConville M, et al. Understanding triclabendazole resistance. *Exp Mol Pathol* 2007;82:104–9.
- [5] Charlier J, Vercrusse J, Morgan E, van Dijk J, Williams DJ. Recent advances in the diagnosis, impact on production and prediction of *Fasciola hepatica* in cattle. *Parasitology* 2013;1–10.
- [6] Martínez-Valladares M, Cordero-Pérez C, Rojo-Vázquez FA. Efficacy of an anthelmintic combination in sheep infected with *Fasciola hepatica* resistant to albendazole and clorsulon. *Exp Parasitol* 2014;136:59–62.
- [7] Moreno L, Ceballos L, Fairweather I, Lanusse C, Alvarez L. Time-course and accumulation of triclabendazole and its metabolites in bile, liver tissues and flukes collected from treated sheep. *Exp Parasitol* 2014;136:14–9.
- [8] Savage J, Meaney M, Brennan GP, Hoey E, Trudgett A, Fairweather I. Increased action of triclabendazole (TCBZ) *in vitro* against a TCBZ-resistant isolate of *Fasciola hepatica* following its co-incubation with the P-glycoprotein inhibitor, R(+)-verapamil. *Exp Parasitol* 2013;135:642–53.
- [9] Berriman M, Haas BJ, LoVerde PT, Wilson RA, Dillon GP, Cerqueira GC, et al. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature* 2009;460:352–8.
- [10] Young ND, Jex AR, Cantacessi C, Hall RS, Campbell BE, Spithill TW, et al. A portrait of the transcriptome of the neglected trematode, *Fasciola gigantica* – biological and biotechnological implications. *PLoS Negl Trop Dis* 2011;5:e1004.
- [11] Young ND, Jex AR, Li B, Liu S, Yang L, Xiong Z, et al. Whole-genome sequence of *Schistosoma haematobium*. *Nat Genet* 2012;44:221–5.
- [12] Cancela M, Ruétalo N, Dell'Oca N, da Silva E, Smircich P, Rinaldi G, et al. Survey of transcripts expressed by the invasive juvenile stage of the liver fluke *Fasciola hepatica*. *BMC Genomics* 2010;11:227.
- [13] Consortium SJGsaFA. The *Schistosoma japonicum* genome reveals features of host-parasite interplay. *Nature* 2009;460:345–51.
- [14] Keiser J. *In vitro* and *in vivo* trematode models for chemotherapeutic studies. *Parasitology* 2010;137:589–603.
- [15] Dalzell JJ, Warnock ND, McVeigh P, Marks NJ, Mousley A, Atkinson L, et al. Considering RNAi experimental design in parasitic helminths. *Parasitology* 2012;139:589–604.
- [16] Hagen J, Lee EF, Fairlie WD, Kalinna BH. Functional genomics approaches in parasitic helminths. *Parasite Immunol* 2012;34:163–82.
- [17] Newmark PA. Opening a new can of worms: a large-scale RNAi screen in planarians. *Dev Cell* 2005;8:623–4.
- [18] Geldhof P, Visser A, Clark D, Saunders G, Britton C, Gilleard J, et al. RNA interference in parasitic helminths: current situation, potential pitfalls and future prospects. *Parasitology* 2007;134:609–19.
- [19] Kalinna BH, Brindley PJ. Manipulating the manipulators: advances in parasitic helminth transgenesis and RNAi. *Trends Parasitol* 2007;23:197–204.
- [20] Bhardwaj R, Krautz-Peterson G, Skelly PJ. Using RNA interference in *Schistosoma mansoni*. *Methods Mol Biol* 2011;764:223–39.

- [21] Knox DP. Developments in RNA interference and genetic transformation to define gene function in parasitic helminths. *Parasitology* 2012;139:557–9.
- [22] Boyle JP, Wu XJ, Shoemaker CB, Yoshino TP. Using RNA interference to manipulate endogenous gene expression in *Schistosoma mansoni* sporocysts. *Mol Biochem Parasitol* 2003;128:205–15.
- [23] Rinaldi G, Morales ME, Alrefaei YN, Cancela M, Castillo E, Dalton JP, et al. RNA interference targeting leucine aminopeptidase blocks hatching of *Schistosoma mansoni* eggs. *Mol Biochem Parasitol* 2009;167:118–26.
- [24] Correnti JM, Brindley PJ, Pearce EJ. Long-term suppression of cathepsin B levels by RNA interference retards schistosome growth. *Mol Biochem Parasitol* 2005;143:209–15.
- [25] Krautz-Peterson G, Bhardwaj R, Faghiri Z, Tararam CA, Skelly PJ. RNA interference in schistosomes: machinery and methodology. *Parasitology* 2010;137:485–95.
- [26] Krautz-Peterson G, Radwanska M, Ndegwa D, Shoemaker CB, Skelly PJ. Optimizing gene suppression in schistosomes using RNA interference. *Mol Biochem Parasitol* 2007;153:194–202.
- [27] You H, McManus DP, Hu W, Smout MJ, Brindley PJ, Gobert GN. Transcriptional responses of in vivo praziquantel exposure in schistosomes identifies a functional role for calcium signalling pathway member CamKII. *PLoS Pathog* 2013;9:e1003254.
- [28] Ndegwa D, Krautz-Peterson G, Skelly PJ. Protocols for gene silencing in schistosomes. *Exp Parasitol* 2007;117:284–91.
- [29] Patocka N, Ribeiro P. The functional role of a serotonin transporter in *Schistosoma mansoni* elucidated through immunolocalization and RNA interference (RNAi). *Mol Biochem Parasitol* 2013;187:32–42.
- [30] He Y, Cai G, Ni Y, Li Y, Zong H, He L. siRNA-mediated knockdown of two tyrosinase genes from *Schistosoma japonicum* cultured in vitro. *Exp Parasitol* 2012;132:394–402.
- [31] McGonigle L, Mousley A, Marks NJ, Brennan GP, Dalton JP, Spithill TW, et al. The silencing of cysteine proteases in *Fasciola hepatica* newly excysted juveniles using RNA interference reduces gut penetration. *Int J Parasitol* 2008;38:149–55.
- [32] Rinaldi G, Morales ME, Cancela M, Castillo E, Brindley PJ, Tort JF. Development of functional genomic tools in trematodes: RNA interference and luciferase reporter gene activity in *Fasciola hepatica*. *PLoS Negl Trop Dis* 2008;2:e260.
- [33] Sripa J, Pinlaor P, Brindley PJ, Sripa B, Kaewkes S, Robinson MW, et al. RNA interference targeting cathepsin B of the carcinogenic liver fluke, *Opisthorchis viverrini*. *Parasitol Int* 2011;60:283–8.
- [34] Thanasuwan S, Piratae S, Brindley PJ, Loukas A, Kaewkes S, Laha T. Suppression of aquaporin, a mediator of water channel control in the carcinogenic liver fluke, *Opisthorchis viverrini*. *Parasit Vectors* 2014;7:224.
- [35] Wang X, Chen W, Tian Y, Huang Y, Li X, Yu X. RNAi-mediated silencing of enolase confirms its biological importance in *Clonorchis sinensis*. *Parasitol Res* 2014;113:1451–8.
- [36] Ohashi H, Umeda N, Hirazawa N, Ozaki Y, Miura C, Miura T. Expression of vasa (vas)-related genes in germ cells and specific interference with gene functions by double-stranded RNA in the monogenean, *Neobenedenia girellae*. *Int J Parasitol* 2007;37:515–23.
- [37] Pierson L, Mousley A, Devine L, Marks NJ, Day TA, Maule AG. RNA interference in a cestode reveals specific silencing of selected highly expressed gene transcripts. *Int J Parasitol* 2010;40:605–15.
- [38] Mizukami C, Spiliotis M, Gottstein B, Yagi K, Katakura K, Oku Y. Gene silencing in *Echinococcus multilocularis* protoscolices using RNA interference. *Parasitol Int* 2010;59:647–52.
- [39] Spiliotis M, Mizukami C, Oku Y, Kiss F, Brehm K, Gottstein B. *Echinococcus multilocularis* primary cells: improved isolation, small-scale cultivation and RNA interference. *Mol Biochem Parasitol* 2010;174:83–7.
- [40] Pouchkina-Stantcheva NN, Cunningham LJ, Hrčkova G, Olson PD. RNA-mediated gene suppression and in vitro culture in *Hymenolepis microstoma*. *Int J Parasitol* 2013;43:641–6.
- [41] Cancela M, Acosta D, Rinaldi G, Silva E, Duran R, Roche L, et al. A distinctive repertoire of cathepsins is expressed by juvenile invasive *Fasciola hepatica*. *Biochimie* 2008;90:1461–75.
- [42] Carmona C, Dowd AJ, Smith AM, Dalton JP. Cathepsin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica* in vitro prevents antibody-mediated eosinophil attachment to newly excysted juveniles. *Mol Biochem Parasitol* 1993;62:9–17.
- [43] Basch P. Cultivation of *Schistosoma mansoni* in vitro. I. Establishment of cultures from cercariae and development until pairing. *J Parasitol* 1981;67:179–85.
- [44] Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 2012;9:671–5.
- [45] Peak E, Chalmers IW, Hoffmann KF. Development and validation of a quantitative, high-throughput, fluorescent-based bioassay to detect schistosoma viability. *PLoS Negl Trop Dis* 2010;4:e759.
- [46] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} method. *Methods* 2001;25:402–8.
- [47] Correnti JM, Pearce EJ. Transgene expression in *Schistosoma mansoni*: introduction of RNA into schistosomula by electroporation. *Mol Biochem Parasitol* 2004;137:75–9.
- [48] Yuan X-S, Shen J-L, Wang X-L, Wu X-S, Liu D-P, Dong H-F, et al. *Schistosoma japonicum*: a method for transformation by electroporation. *Exp Parasitol* 2005;111:244–9.
- [49] Sigoillot FD, King RW. Vigilance and validation: keys to success in RNAi screening. *ACS Chem Biol* 2011;6:47–60.
- [50] Simpson KJ, Davis GM, Boag PR. Comparative high-throughput RNAi screening methodologies in *C. elegans* and mammalian cells. *New Biotechnol* 2012;29:459–70.
- [51] Fischer SE. Small RNA-mediated gene silencing pathways in *C. elegans*. *Int J Biochem Cell Biol* 2010;42:1306–15.
- [52] Whangbo JS, Hunter CP. Environmental RNA interference. *Trends Genet* 2008;24:297–305.
- [53] Da'dara AA, Bhardwaj R, Ali YBM, Skelly PJ. Schistosome tegumental ecto-ATPase (SmATPase1) degrades exogenous pro-inflammatory and pro-thrombotic nucleotides. *PeerJ* 2014;2:e316.
- [54] Mourão MM, de Moraes Mourão M, Dinguirard N, Franco GR, Yoshino TP. Phenotypic screen of early-developing larvae of the blood fluke, *Schistosoma mansoni*, using RNA interference. *PLoS Negl Trop Dis* 2009;3:e502.
- [55] Tran MH, Freitas TC, Cooper L, Gaze S, Gatton ML, Jones MK, et al. Suppression of mRNAs encoding tegument tetraspanins from *Schistosoma mansoni* results in impaired tegument turnover. *PLoS Pathog* 2010;6:e1000840.
- [56] Freitas TC, Jung E, Pearce EJ. TGF-beta signaling controls embryo development in the parasitic flatworm *Schistosoma mansoni*. *PLoS Pathog* 2007;3:e52.
- [57] Alder MN, Dames S, Gaudet J, Mango SE. Gene silencing in *Caenorhabditis elegans* by transitive RNA interference. *RNA* 2003;9:25–32.
- [58] Forsthoefel DJ, James NP, Escobar DJ, Stary JM, Vieira AP, Waters FA, et al. An RNAi screen reveals intestinal regulators of branching morphogenesis, differentiation, and stem cell proliferation in planarians. *Dev Cell* 2012;23:691–704.
- [59] Rouhana L, Weiss JA, Forsthoefel DJ, Lee H, King RS, Inoue T, et al. RNA interference by feeding in vitro-synthesized double-stranded RNA to planarians: methodology and dynamics. *Dev Dyn* 2013;242:718–30.
- [60] Robb SM, Ross E, Sanchez Alvarado A. SmedGD: the *Schmidtea mediterranea* genome database. *Nucleic Acids Res* 2008;36:D599–606.
- [61] Zerlotini A, Aguiar ER, Yu F, Xu H, Li Y, Young ND, et al. SchistoDB: an updated genome resource for the three key schistosomes of humans. *Nucleic Acids Res* 2012;41:D728–31.
- [62] Tsai IJ, Zarowiecki M, Holroyd N, Garciarubio A, Sanchez-Flores A, Brooks KL, et al. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature* 2013;496:57–63.

4. Ensayos preliminares de interferencia en Adultos

Para comprobar si el silenciamiento de ARN es efectivo en el estadio adulto de *F. hepatica* dos parásitos fueron tratados por soaking con ARNdc FhLAP. Como controles utilizamos parásitos cultivados en ausencia de moléculas interferentes (control mock) y tratados con ARNdc GFP (control irrelevante). Dado que los adultos son muy voluminosos se repuso el ARNdc con los recambios de medio para mantener el un buen nivel de silenciamiento. En cada recambio de medio recuperamos los huevos emitidos por decantación y tomamos fotos en microscopio invertido para evaluar su morfología. Pasadas las 30 horas como la movilidad de los parásitos estaba muy disminuida decidimos finalizar el experimento. Los adultos fueron divididos separando la región superior que contiene la las ventosas oral y ventral del resto del cuerpo. Utilizamos en forma alternante las dos mitades para extraer ARN y proteína somáticas.

Analizamos los niveles de expresión del gen FhLAP en parásitos tratados con ARNdc FhLAP y con el ARNdc irrelevante por Real Time utilizando el control mock para normalizar la expresión génica. El silenciamiento fue efectivo en el adulto 1 tratado con ARNdc FhLAP en el que se aprecia una gran disminución de la expresión de LAP. En el adulto 2 de la misma condición la expresión aumenta con respecto al control sin tratamiento aunque la diferencia no es estadísticamente significativa. En los parásitos tratados con el control irrelevante hay una disminución de la expresión génica que no es estadísticamente significativa (Figura 11 A). Las diferencias en la eficiencia de la ARNi en los adultos tratados con ARNdc FhLAP pueden deberse a que medimos el silenciamiento en distintas regiones del adulto y a que la señal interferente no se distribuyo de forma homogénea.

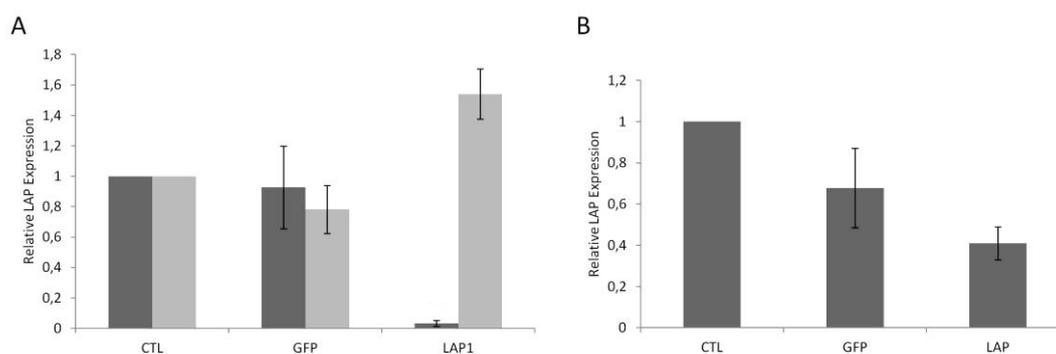


Figura 11: Análisis de la expresión génica por “Real Time” en Adultos y huevos. A 2 adultos fueron tratados por soaking con ARNdc contra LAP. Adulto 1 barra oscura, Adulto 2 barra clara. **B** Análisis de la expresión génica de FhLAP en huevos recolectados en controles, tratados con ARNdc GFP y tratados con ARNdc FhLAP. Los valores mostrados fueron calculados con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ usando el gen actina como referencia interna normalizando cada condición contra el control mock. Las barras de error muestran el error estándar.

Observamos los huevos al microscopio para determinar si el silenciamiento de FhLAP afecta el desarrollo y la producción de huevos. Los parásitos tratados con FhLAP emitieron gran cantidad de huevos cuya morfología se encuentra alterada. En este grupo encontramos huevos más pequeños y de forma redondeada y otros de tamaño variable de forma y contorno irregulares (Figura 12). La muestra de huevos fue separada en dos, una parte se utilizó para extracción de ARN y la otra para evaluar el desarrollo de estos huevos dejándolos madurar en agua a 26 °C protegidos de la luz durante 14 días.

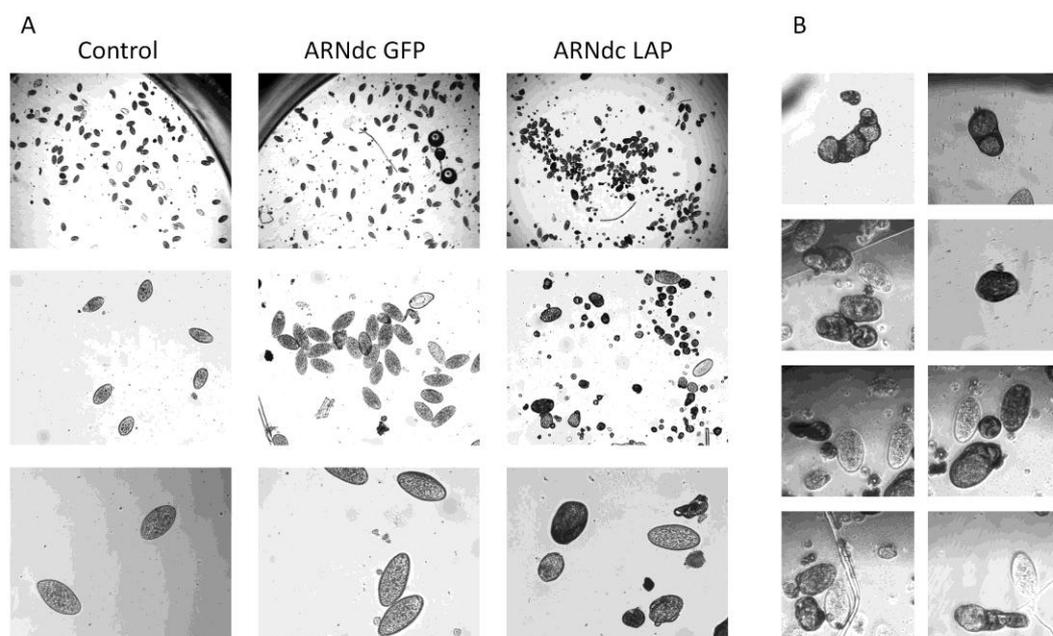


Figura 12: Análisis de la morfología de huevos emitidos en ensayo de RNAi en adultos de *F hepatica*. A Comparación en la morfología de Huevos emitidos por parásitos controles, tratados con ARNdc GFP y tratados con ARNdc LAP. Primer fila aumento 4x, segunda fila 10 x y tercer fila 20x. B Fotografías de huevos emitidos por parásitos tratados con ARNdc LAP, aumento 20x.

La expresión relativa de FhLAP por “Real Time” en huevos determino que hay un “knock-down” cercano a 60 % en los interferidos con ARNdc FhLAP (Figura 11 B). En los tratados con GFP nuevamente y como en adultos hay una disminución no significativa de la expresión de FhLAP. Es difícil determinar en este experimento si la disminución de la expresión de FhLAP se da por que los huevos entran en contacto con las moléculas interferentes o si es debido a la silenciamiento producido en adultos. Debido a la naturaleza de los huevos con una cubierta prácticamente impermeable creemos que el efecto se debe principalmente al silenciamiento de FhLAP en adultos. Para analizar este efecto, en futuros ensayos se incorporará un control con huevos aislados expuestos al ARNdc donde se evaluará la incorporación de la molécula interferente y efecto de silenciamiento.

El desarrollo de los huevos también se vio afectado en los parásitos tratados con ARNdc FhLAP incluso en el adulto en que no determinamos disminución de la

expresión génica. En los controles la mayoría de los huevos completa su desarrollo generando miracidios. En los tratados con ARNdc FhLAP los huevos cuya morfología está alterada no son capaces de madurar aunque un pequeño grupo de huevos en esta condición con morfología normal completó su desarrollo.

Al observar los huevos emitidos por parásitos tratados con el control irrelevante aparecen huevos que no completan su desarrollo a pesar de que su morfología no parece estar alterada. Este fenómeno no lo observamos en huevos obtenidos del control mock. Algún efecto inespecífico disparado al tratar parásitos con un ARNdc irrelevante podría ser responsable de este efecto.

5. Clonado y secuenciado de miRNA.

Con la finalidad de identificar ARNs pequeños endógenos en *F. hepatica* decidimos clonar y secuenciar una población de ARNs menores a 30 nucleótidos en JRD. Estos experimentos se realizaron previamente a la disponibilidad de tecnologías de secuenciación masiva por lo que se utilizó el protocolo corriente a la fecha. A partir de una muestra de ARNs de JRDs enriquecida en fragmentos menores a 200 nt generamos una biblioteca de ARNs pequeños concatenados siguiendo el protocolo descrito por Pfeffer y colaboradores con algunas modificaciones (Figura 13 A).

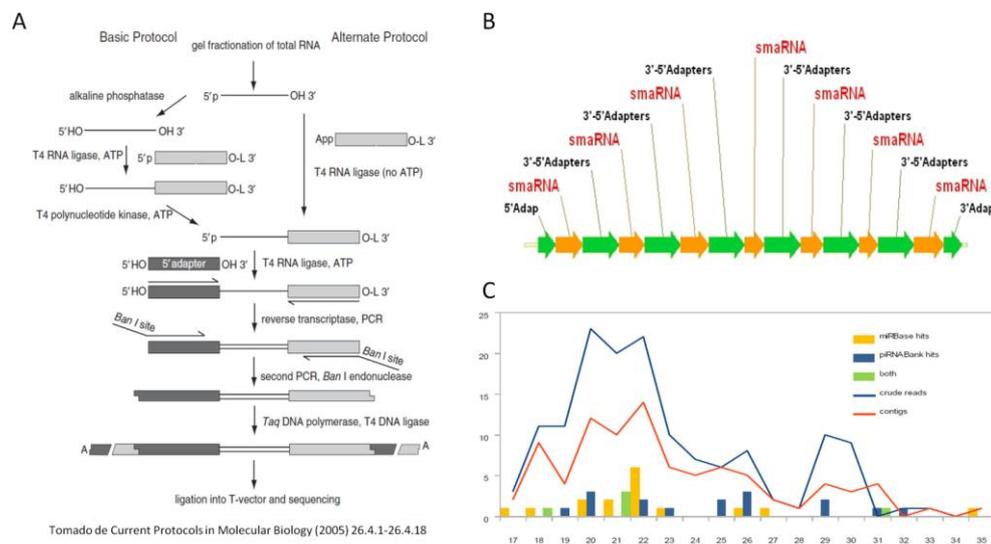


Figura 13: Clonado y secuenciado de ARNs pequeños. **A** Estrategia utilizada para generar una biblioteca de ARNs pequeños. **B** Imagen de uno de los concatámeros generada utilizando el software Vector NTI. **C** Distribución por tamaños de las secuencias crudas de ARNs pequeños (línea azul) y de contigs de ARNs pequeños (línea roja). Las barras de colores indican con qué tipo de secuencias tienen homología las secuencias generadas.

Seguendo el protocolo se seleccionaron 70 clones con insertos con un tamaño superior a los 500 pb que fueron secuenciados con el método Sanger. Obtuvimos 146 secuencias correspondientes a ARN pequeños de entre 17 y 35 nt. Alineamos y

ensamblamos las secuencias usando CAP contig assembly y de esta forma generamos 88 secuencias de ARNs pequeños distintas (Tabla de secuencias Anexo).

Cuando identificamos estas secuencias de ARNs pequeños no contábamos con el genoma de *F. hepatica* sobre el que mapear y validar las secuencias encontradas. Intentamos validar nuestros datos analizando la distribución de tamaños de los ARNs secuenciados y buscando homología con secuencias de miRNA y piRNA obtenidas de las bases de datos mirBase (www.mirbase.org) y piRNA Bank (pirnabank.ibab.ac.in) respectivamente.

La distribución de tamaños de nuestra población era similar a la reportada en planarias (Friedländer *et al.*, 2009; Qin *et al.*, 2012) con dos picos en torno a los 22 y 30 nucleótidos (Figura 12 C) que podrían corresponder con miRNAs y piRNAs respectivamente, dos de los principales ARNs pequeños no codificantes (snRNAs).

Mediante la búsqueda por Blast contra las bases de datos de ARNs pequeños identificamos 16 secuencias con muy buena similitud con miRNAs, la mayoría con un tamaño cercano a los 22 nt acorde con el tamaño de esta población de ARNs pequeños. Otras 16 secuencias presentaban similitud solo con piRNAs sin embargo el rango de tamaños no correspondía con el de este tipo de ARN regulados (Tabla Apéndice 1). Sin embargo, las homologías observadas no se correspondían con el patrón filogenético esperado, siendo mayoritariamente parecidas a miRNAs de vertebrados.

La distribución por tamaños de nuestras secuencias y la gran homología con miRNAs descritos en mirBase parecían indicar que estábamos ante la presencia de miRNAs en *F. hepatica* aunque no pudimos confirmar esta hipótesis.

Estos resultados fueron una primer aproximación al estudio de ARNs pequeños en *F. hepatica* en nuestro grupo y despertaron nuestro interés. Más tarde retomamos el estudio de los ARNs pequeños en nuestro modelo de estudio mediante plataformas de secuenciación masiva. Estudiamos el papel de los ARNs pequeños reguladores en el proceso de invasión analizando secuencias de ARNs menores a 30 nucleótidos en JRD. Determinamos que en este estadio están presentes dos tipos de ARNs pequeños, miRNAs de 22 nt y tRNAs de 30 -32 nucleótidos lo que sugiere que estas moléculas podrían participar en la regulación de la expresión génica en *F. hepatica*. Identificamos 40 miRNA en esta especie 5 de los cuales son específicos de *F. hepatica*. Al mismo tiempo se confirmó la ausencia de piRNAs en platelmintos parásitos. Este trabajo es parte de la tesis de maestría de un integrante de nuestro grupo y fue publicado recientemente (Anexo). Participe en la discusión inicial de la estrategia utilizada en la generación de las bibliotecas de ARN y en la discusión final del artículo.

6. Clonado y secuenciado de genes de la vía si/miRNA.

Las vías de silenciamiento se estudiaron principalmente en *C. elegans* lo que permitió conocer con mayor detalle el papel de los ARNs pequeños reguladores en el control post transcripcional de la expresión génica. A partir de los genes de la vía descritos en *C. elegans* se han encontrado miembros de estas vías en organismos como Plantas

(Martínez De Alba, Elvira-Matelot e Vaucheret, 2013; Bologna e Voinnet, 2014), humanos (Ha e Kim, 2014), insectos (Yang *et al.*, 2014) confirmando que este es un mecanismo conservado de control de la expresión génica. En trematodos estos mecanismos de la expresión génica recién comienzan a estudiarse y se han identificado algunos genes solo en *Schistosomas* (Gomes *et al.*, 2009; Cai *et al.*, 2012).

El conocimiento de las vías de regulación de la expresión génica mediada por ARNs pequeños es importante para entender cómo se regula la expresión génica y puede facilitar el desarrollo de la ARNi en *F. hepatica*. Decidimos comenzar el estudio de los genes que participan en estas vías en *F. hepatica* aprovechando la disponibilidad de datos de transcriptoma en los estadio juvenil (Cancela *et al.*, 2010) y adulto (Young *et al.*, 2010). A partir de los genes de la vía descritos en el nematodo *C. elegans* (Fischer, 2010) y en *S. mansoni* (Gomes *et al.*, 2009) utilizamos distintas estrategias bioinformáticas de búsqueda por Blast para identificar estos genes en *F. hepatica*. Como no todos los genes encontrados en *C. elegans* estaban reportados en *S. mansoni* realizamos una búsqueda en este último parásito para identificar genes no descritos. Utilizamos luego los ortólogos identificados en *S. mansoni* para realizar luego la búsqueda en *F. hepatica*, lo que permitió extender la lista de genes detectados y mejoro la homología de secuencias ya identificadas en Blast previos *contra C. elegans*. Como era esperado los genes de *F. hepatica* se parecen más a los de *S. mansoni* un parasito más cercano filogenéticamente.

Identificamos varias secuencias con buena similitud a proteínas que participan en distintos pasos en las vías de regulación post transcripcional mediadas por ARNs pequeños (Tabla 5) En total identificamos 17 genes que forman parte los complejos principales de silenciamiento, como DICER, Complejo RISC, Complejo Microprocesador (Drosha y Pasha), respuesta sistémica a la ARNi, otros genes requeridos para la ARNi. Todos los genes descritos en *S. mansoni* están presentes en *F. hepatica* por lo que estos parásitos comparten mecanismos importantes de regulación de la expresión génica.

No identificamos ningún gen con homología a ARN polimerasas dependientes de ARN (RdRPs) que participan en la respuesta de amplificación de la ARNi conocida como ARNi Transitiva a partir de los genes descritos en *C. elegans* mediante las estrategias de búsqueda por blast utilizadas. Se ha postulado que la persistencia de la ARNi en *C. elegans* puede estar vinculada a la acción de los genes SMG, que participan principalmente en la vía de Nonsense Mediated Decay (Fischer, 2010) , y consistentemente encontramos homologos en *F. hepatica* para varios de estos genes.

Una vez identificados los genes de la vía en nuestro parásito decidimos clonar y secuenciar 4 de los genes encontrados. Seleccionamos los genes Argonauta 2 (Ago2), ERI, DICER y el transportador SID 1 que presentaron buena similitud con los genes de la vía descritos y son relevantes en los procesos de regulación post transcripcional de la expresión génica, Ago 2 es uno de los integrantes de la familia de proteínas Argonautas, claves en todos los procesos de silenciamiento mediados por ARN pequeños, participando principalmente en el silenciamiento mediado por siRNA en la ARNi (Czech e Hannon, 2011). La enzima DICER es también un actor clave, encargado de procesar dúplex de ARNs para que ingresen al complejo RISC (Hutvagner e Simard, 2008). SID 1 codifica para una proteína transmembrana que

permite el pasaje de la señal interferente entre células vecinas y es responsable del efecto sistémico de la ARNi (Whangbo e Hunter, 2008).

Vía si/miRNA	Ref en <i>C. elegans</i>	blastp Fhep	Ref <i>S. mansoni</i>	tblastx F hep
Complejo Dicer	dcr-1_1	Contig13085	Smp_169750 dcr1	Contig13085
	Drh-2	∅	∅	∅
	drh-1_1	∅	Smp_083710	Contig6631
	rde-1_1	Fh_Contig1038	Smp_102690.2 Ago3	Fh_Contig3657
	rde-2_1	∅	∅	∅
	rde-3_1	Contig5373	Smp_005640	Contig5373
	rde-4_1	∅	∅	∅
	∅		Smp_023670 Parthn dcr	Fh_F_hep_A_c40810
Complejo RISC	Alg-1	Contig6746	Smp_140010 Ago1	Contig6746
	Alg-2	Contig3657	Smp_179320 Ago2	Contig3657
	tsn-1_1	Contig141	Smp_166110	Contig141
	vig-1_1	∅	∅	∅
Amplificación de la respuesta (RdRp)	<u>ego-1_1</u>	∅	∅	∅
	<u>rfr-1_1</u>	∅	∅	∅
	<u>rfr-3_1</u>	∅	∅	∅
RNAi Sistémica	<u>rsd-2_1</u>	∅	∅	∅
	<u>rsd-6_1</u>	∅	∅	∅
	<u>sid-1_1</u>	Contig8825	Smp_152020	Contig8825
	<u>sid-2_1</u>	∅	∅	∅
	<u>zfp-1_1</u>	Fh_Contig36	Smp_137970	Fh_Contig36
Otros genes requeridos para la RNAi	<u>smg-2_1</u>	Fh_Contig1474	Smp_061590.1	Fh_Contig3088
	<u>smg-5_1</u>	∅	∅	∅
	<u>smg-6_1</u>	∅	Smp_131650	Fh_Contig2032
	<u>gfl-1_1</u>	Fh_Contig364	Smp_070760	Fh_Contig364
	<u>mut-16_1</u>	∅	∅	∅
	<u>mut-7_1</u>	∅	∅	∅
	mes-3	∅	∅	∅
Complejo microprocesador	Drsh-1	Fh_FVHQEPK01EOE88	Smp_142510.2 Drosha2	Fh_FVHQEPK01AER76
	<u>eri-1_1</u>	Fh_Contig236	Smp_029850-eri1	Fh_Contig236
	xrn-1_1	Fh_Contig2708	Smp_133300	Fh_Contig2708
	<u>rha-1_1</u>	Fh_Contig581	Smp_035030	Fh_Contig581
	T22A3.5a pash-1		Smp_087220_Partner Drsh	Contig13184
	∅		Smp_152800.1_Expo 5	Fh_Contig12618
	∅		Smp_099630_Fmr1	Fh_Contig1579

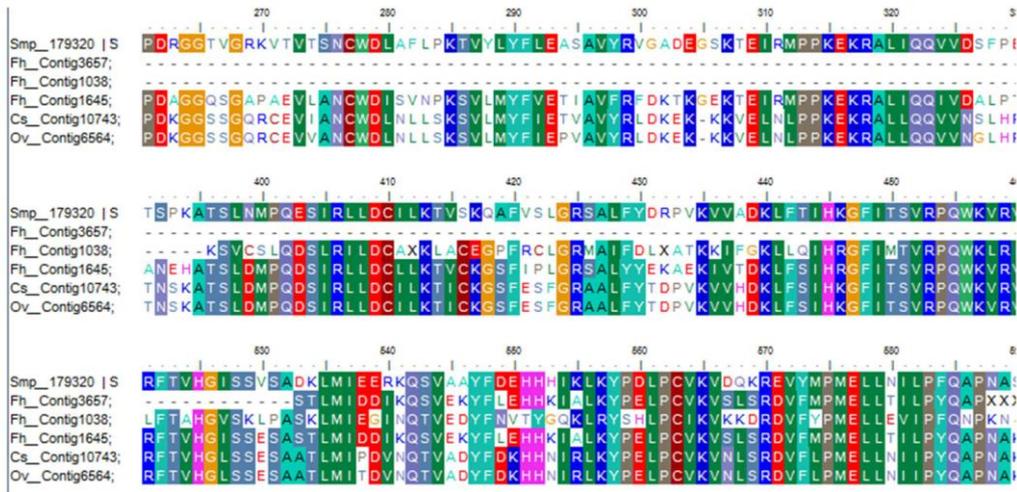
Tabla 5. Búsqueda de genes de las vías de silenciamiento mediadas por ARNs pequeños en *F. hepatica* utilizando como referencia genes descritos en *C. elegans* y ortólogos identificados en *S. mansoni*. El símbolo ∅ se utiliza para indicar la ausencia del gen.

Las proteínas ERI fueron identificadas en *C. elegans* como potenciadores de la ARNi, pues al estar mutados aumentan los efectos del silenciamiento. ERI-1 es una exonucleasa que normalmente actúa regulando negativamente el silenciamiento, mutaciones en el gen que codifica esta proteína potencian la ARNi (Fischer, 2010; Jadiya e Nazir, 2014). Para clonar y secuenciar estos genes buscamos ortólogos de los genes seleccionados en otros trematodos, hicimos alineamientos de secuencias aminoácidas, identificamos dominios conservados con Pfam y diseñamos primers en estos dominios. Amplificamos y clonamos estos genes utilizando cDNA de JRD con el kit Gene Racer (Figura 14). Al encontrar ortólogos de estos genes en otros

trematodos demostramos que la vía esta conservada en este importante grupo de parásitos.

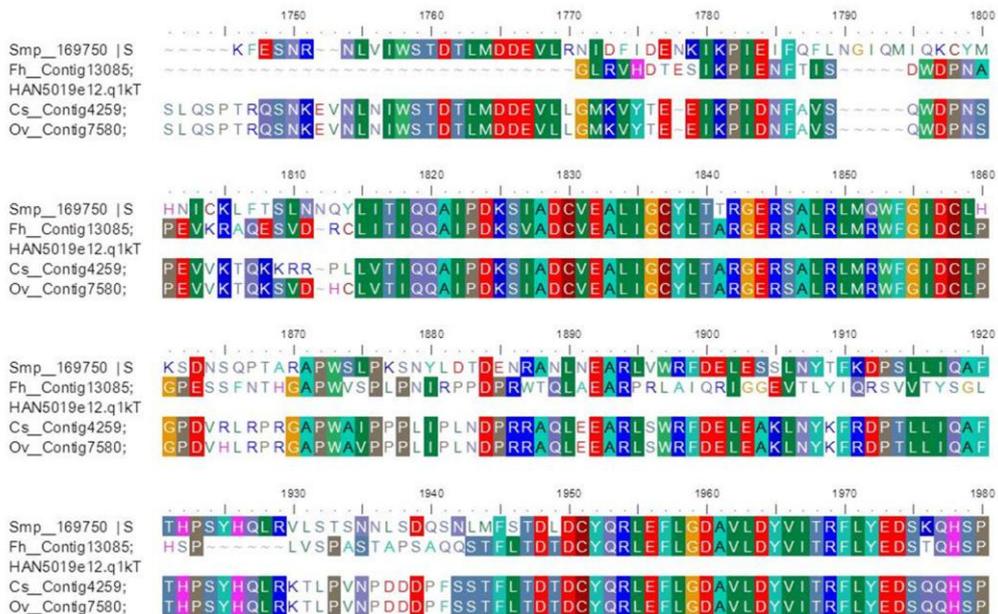
A

Argonauta 2



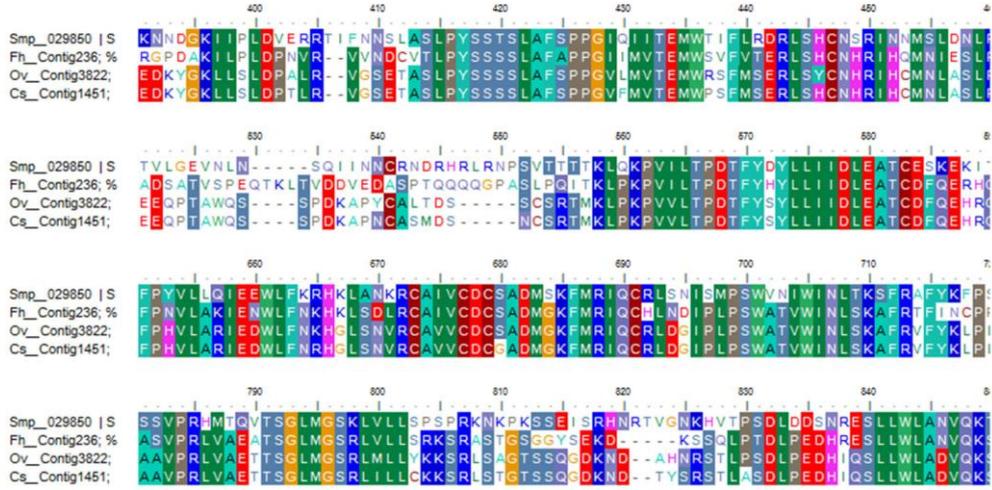
B

Dicer



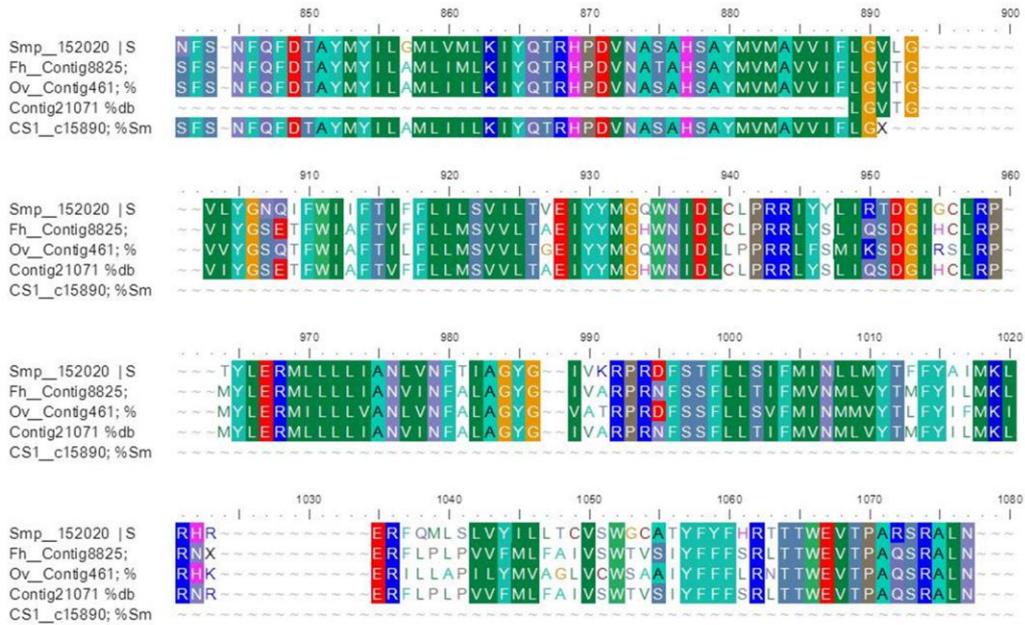
C

ERI 1



D

SID 1



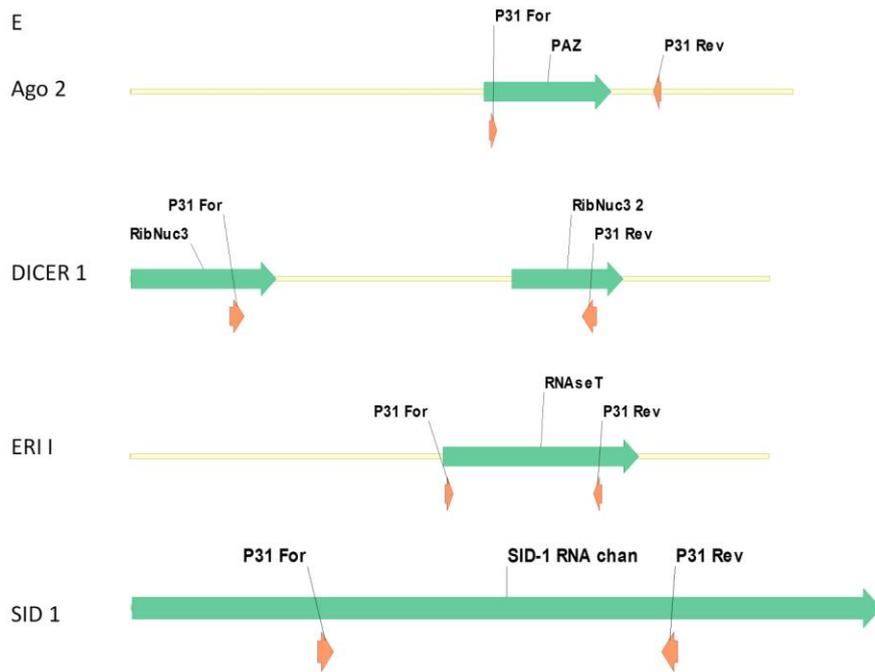


Figura 14 Alineamiento de las secuencias obtenidas del clonado de genes de la vía. *A. Ago2 B DICER C Eri 1 D Sid 1.E Esquema de las estructuras génicas y región amplificada.*

Las infecciones por parásitos tienen un fuerte impacto en salud pública por la gran cantidad de personas afectadas por estas enfermedades. Más de 2 billones de personas en todo el mundo está infectada con al menos un helminto de los phyla platelminto y nematodos (Hagen *et al.*, 2012). Las trematodiasis juegan un gran papel dentro de estas enfermedades afectando a más de 200 millones de personas principalmente en áreas empobrecidas del planeta.

Nuestro modelo de estudio *F. hepatica* es el agente causal de la fasciolosis una enfermedad principalmente del ganado domestico con cifras de prevalencia estimadas en nuestro país de 50% en bovinos y 60% en ovinos (Acosta, 1991). Se cree que un cuarto del ganado pastorea en áreas donde reside este parásito por lo que representa un grave problema para el sector ganadero en todo el mundo provocando importantes pérdidas económicas (Chen, 1990). El número de casos en humanos ha aumentado significativamente sobre todo en algunas regiones de América del Sur (Bolivia, Perú y Ecuador), en el norte de Asia y de África central por lo que la OMS ha considerado a esta enfermedad una zoonosis reemergente (Mcmanus e Dalton, 2006).

A pesar del grave problema que representan estas enfermedades los recursos disponibles para combatirlas son escasos y se basan en el uso de un número muy reducido de drogas. La continua presión con drogas en monoterapia ha llevado al desarrollo de resistencia a los tratamientos habitualmente usados. En *F. hepatica* se han reportado casos de resistencia a la única droga usada, el Triclabendazole (Devine *et al.*, 2009; Flynn, Mulcahy e Elsheikha, 2010). En *S mansoni* un caso similar se da con el uso del Praziquantel (Mcmanus e Loukas, 2008). No es sustentable a largo plazo el uso de drogas en monoterapia y se deben implementar nuevas medidas para combatir estas enfermedades.

En la búsqueda de nuevas estrategias de control muchos investigadores han dirigido sus esfuerzos a la comprensión de los procesos de regulación de la expresión génica mediada por ARNs pequeños y a la identificación de nuevos genes y nuevas proteínas a través de la secuenciación de genomas y transcriptomas de estos parásitos.

Hoy en día tenemos acceso a genomas y/o transcriptomas de varios trematodos de interés sanitario como son *S. mansoni* (Berriman *et al.*, 2009), *S. japonicum* (Consortium, 2009), *S. hematobium* (Young *et al.*, 2012), *F. hepatica* (Cancela *et al.*, 2010; Young *et al.*, 2010; Cwiklinski *et al.*, 2015), *F. gigantica* (Young *et al.*, 2011), *C. sinensi* (Huang *et al.*, 2013).

Es necesario implementar nuevas herramientas de genómica funcional para analizar y descifrar la función y esencialidad de la gran cantidad de secuencias aportadas por estos trabajos. El desarrollo de estas herramientas es fundamental no solo para conocer aspectos relevantes de la biología parasitaria, sino también para la identificación de nuevos blancos terapéuticos que permitan el desarrollo de drogas y/o vacunas. La ARNi es la única herramienta disponible en la actualidad para el análisis de la función génica en trematodos. Pese a su utilidad se han encontrado algunas dificultades con el uso de esta tecnología en trematodos.

Teniendo en cuenta estos problemas en el presente trabajo llevamos a cabo una serie de experimentos con el fin de mejorar esta herramienta en *F. hepatica*. Ajustamos métodos de suministro, concentraciones utilizadas, analizamos la persistencia del silenciamiento y evaluamos la eficiencia del silenciamiento JRD de distinta edad.

Por otro lado intentamos el silenciamiento en adultos, y si bien los resultados son primarios, indican que es también posible silenciar un gen endógeno en adultos, lo que abre paso a la optimización en ese estadio. Estudiamos genes de las vías de silenciamiento para comprender mejor cómo funcionan estas vías de silenciamiento génico, Identificamos, clonamos y secuenciamos ARNs pequeños como una primera aproximación al estudio de los mecanismos de regulación mediados por ARNs pequeños, lo que abrió el camino al análisis de los miRNAs en *F.hepatica*, línea que se ha iniciado en nuestro grupo.

Estandarización de la ARNi en JRD.

En los trabajos de ARNi en parásitos el efecto del silenciamiento se analiza en una población de organismos tratados sin analizar el porcentaje de incorporación, y sin conocimiento real de que número efectivo de parásitos recibe las moléculas interferentes. En uno de los trabajos en *S. mansoni* se demostró mediante el empleo de moléculas marcadas que la incorporación de ARNdc no es homogénea en la población de parásitos tratados (Mourão *et al.*, 2009). Esto implica que si no se seleccionan los parásitos que efectivamente incorporan la señal interferente como sucede habitualmente el efecto de silenciamiento se diluiría y se podría estar subestimando el efecto generado por la ARNi.

En nuestro trabajo analizamos la incorporación de moléculas marcadas luego de tratar los parásitos con distintos métodos de suministro utilizando dos concentraciones distintas de Cy3-siRNA 2 ng/μl o 5 ng/μl. De esta forma analizamos la eficiencia para introducir moléculas marcadas de los métodos de suministro que ya habían demostrado ser efectivos en JRD (“soaking” y electroporación) (Mcgonigle *et al.*, 2008; Rinaldi *et al.*, 2008) y de nuevos métodos no testeados hasta ahora en este organismo.

Cuando utilizamos 5 ng/μl de Cy3-siRNA visualizamos la señal fluorescente con todos los métodos empleados excepto la electroporación. Al usar 2 ng/μl solo detectamos la señal fluorescente en los parásitos tratados por electro-soaking. La intensidad de la señal fluorescente fue mayor en parásitos tratado por electro-soaking por lo que este parece ser el método más efectivo.

Al analizar la localización de la señal observamos que es más intensa en el tubo digestivo de los parásitos tratados lo que coincide con otros reportes en trematodos que muestran que esta es la principal vía de entrada de moléculas interferentes (Stefanić *et al.*, 2010). Este fenómeno puede explicar por qué genes expresados en tubo digestivo y tegumento muestran una susceptibilidad mayor a la ARNi. Por microscopia confocal analizamos la incorporación al tratar los parásitos por “soaking” y por electro-soaking. Con los dos métodos se observa una fuerte señal en el tubo digestivo y en tejidos aledaños que es más fuerte en los tratados por electro-soaking. Esto sugiere que es posible la transferencia a otros tejidos de la señal interferente, que normalmente ingresaría por el digestivo y el tegumento.

Para determinar si la intensidad de la señal fluorescente se corresponde con un efecto a nivel del silenciamiento tratamos parásitos con moléculas de 2,5 ng/μl de ARNdc marcado con Cy3 con los mismos métodos de suministro empleados para monitorizar la entrada de Cy3-siRNA. Todos los métodos determinaron un gran nivel de silenciamiento incluido la electroporación con la que no fue posible detectar la señal fluorescente. Es posible disminuir la expresión génica electroporando y lavando rápidamente las moléculas que no se incorporan aunque la eficiencia del silenciamiento disminuye comparado con otros métodos de suministro. Resultados similares se encontraron en *S. mansoni* al analizar el silenciamiento en parásitos tratados con distintos métodos de suministro (Stefanić *et al.*, 2010). En nuestro caso el soaking por sí sólo es más efectivo que la simple electroporación y la combinación de estos dos métodos en el electro-soaking produce el mayor “knockdown” alcanzado en JRD cercano a 90%. Esto sugiere que si bien es posible la entrada pasiva de moléculas interferentes en el soaking, la apertura de poros en las membranas biológicas mediante la electroporación favorece esta entrada permitiendo una mayor incorporación. En *S. mansoni* se reportaron resultados similares a los nuestros que demuestran que la electroporación induce niveles de silenciamiento mayores (Krautz-Peterson *et al.*, 2007; Ndegwa, Krautz-Peterson e Skelly, 2007).

En otro reporte reciente de ARNi en *F. hepatica* se probaron 5 estrategias distintas utilizando soaking para suprimir la expresión génica. En ese estudio se determinó que el método más efectivo consiste en tratar los parásitos por soaking 4 hs con 50 ng/μl de ARNdc, pasando luego de este tiempo a una concentración de 2,5 ng/μl al diluir la muestra en 1 ml de medio de cultivo, que se mantiene en los sucesivos recambios de medio. Estos autores apoyan la idea de una concentración alta inicial y una exposición residual larga como método de optimizar la incorporación. En cualquier caso, sus resultados son consistentes con los nuestros en cuanto a que las exposiciones largas favorecen una incorporación estable (Mcveigh *et al.*, 2014).

Demostramos que es posible silenciar la expresión génica con una concentración menor a la utilizada en los reportes previos en *F. hepatica* (Mcgonigle *et al.*, 2008; Rinaldi *et al.*, 2008), y a la generalmente usada en trematodos. Recientemente McVeigh y colaboradores lograron disminuir de manera significativa la expresión del gen Catepsina B usando tan solo 0.05 ng/μl de ARNdc por soaking en JRD de *F. hepatica*, (Mcveigh *et al.*, 2014) si bien los niveles de silenciamiento fueron menores a los observados con concentraciones en el rango de las usadas en nuestro caso. Estos autores demostraron además que reduciendo la concentración de moléculas interferentes es posible combinar distintos blancos sin llegar a una dosis tóxica de ARNdc y logrando el silenciamiento de todos los genes blanco. En *S. mansoni* también se testó con éxito la interferencia conjunta contra distintos blancos (Stefanić *et al.*, 2010) lo que abre la puerta a estudios más complejos de efectos sobre vías particulares, o de interacción entre estas.

Por medio de la tinción con DAPI y FDA demostramos que las diferencias en el silenciamiento alcanzado no se deben a alteraciones en la viabilidad de los parásitos. El uso de este método para evaluar la viabilidad de los parásitos nos permitió monitorear la sobrevivencia de un gran número de parásitos de forma rápida. Podría utilizarse para evaluar a gran escala el efecto en el silenciamiento de posibles blancos terapéuticos que aumenten la mortalidad de los parásitos.

Buscando mejorar la eficiencia del silenciamiento y disminuir la posible aparición de efectos inespecíficos que se han visto en este y otros parásitos incorporamos el uso de siRNAs de menor tamaño. Los siRNAs se han usado preferentemente en líneas celulares de vertebrados pero comienzan a usarse con más frecuencia sobre todo en el parásito *S. japonicum* (Zou *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2015) Se hipotetiza que por su menor tamaño es posible disminuir la aparición de efectos inespecíficos con el uso de estas moléculas. En este trabajo utilizamos 2 siRNAs contra FhLAP que se encuentran dentro de la región abarcada por el ARNdc, y observamos diferencias leves pero detectables en los niveles de silenciamiento obtenido. Otro grupo de investigación focalizado en *Fasciola hepatica* también testó la utilidad de siRNAs generando 3 siRNAs que demostraron ser efectivos para silenciar el gen endógeno GST, y observaron como en nuestro caso que hay diferencias en el nivel de silenciamiento alcanzado al utilizar estas moléculas (Mcveigh *et al.*, 2014).

Luego de ajustar el uso de los siRNA-FHLAP decidimos comparar la eficiencia del silenciamiento en el tiempo al tratar parásitos una sola vez por electro-soaking con 2,5 y 10 ng/μl de ARNdc y con 2,5 ng/μl de siRNA-LAP. Normalizamos la expresión de los parásitos tratados con los dos tipos de moléculas contra el control mock para evitar errores de interpretación al comparar la eficiencia de estos tipos de moléculas. La expresión disminuyó de manera significativa y similar con todos los métodos empleados hasta el día 7. Mientras que con siRNAs el silenciamiento se mantuvo de manera aceptable hasta los 14 días. Al utilizar ARNdc logramos mantener un silenciamiento significativo de la expresión génica hasta el día 21 cuando los siRNAs ya no son efectivos.

Recientemente McVeigh y colaboradores también analizaron el silenciamiento a largo del tiempo en *Fasciola hepatica* y demostraron que para algunos genes la supresión disminuye de manera significativa a partir de las 4 horas y se mantiene en el tiempo hasta 25 días luego de tratar los parásitos con ARNdc, resultados que espejan nuestras observaciones.

Estos reportes se suman a la lista de trabajos en trematodos que demuestran que el silenciamiento persiste en el tiempo. En *S. mansoni* el “knock-down” se mantiene hasta 40 días (Krautz-Peterson *et al.*, 2007), en *S. japonicum* 14 días (Kumagai *et al.*, 2009) y en *O. viverrini* 16 días (Thanasuwan *et al.*, 2014). La permanencia de la ARNi en el tiempo sugiere que hay una respuesta de amplificación de la señal interferente como la que se da en *C. elegans* o un mecanismo que asegura la persistencia de las moléculas interferentes. En nuestro caso no pudimos encontrar por búsqueda bioinformática RdRP involucradas en la amplificación de la señal en la ARNi transitiva pero si encontramos genes SMG, los que estarían involucrados en la persistencia de la señal en *C. elegans*, sugiriendo que este podría ser el mecanismo.

A diferencia de lo que sucede en *S. mansoni* no encontramos diferencias en la susceptibilidad en JRD transfectados con las moléculas interferentes a diferentes tiempos post-desenquiste. Más allá de las implicancias biológicas de esta posible diferencia, esta tiene una importancia práctica esencial pues en nuestro modelo es posible analizar la función génica sin necesidad de mantener los parásitos varios días en cultivo evitando de esta manera problemas de contaminación en los cultivos a largo plazo.

Interferencia de ARN en adultos.

Es importante analizar la expresión génica en todos los estadios de estos parásitos con ciclos de vida complejo para entender aspectos relevantes de la biología parasitaria y para identificar blancos terapéuticos específicos de los estadios invasivos. En trematodos la ARNi solo se utiliza como técnica de rutina para analizar la expresión génica en *S. mansoni*. En este parásito la ARNi se ha utilizado para suprimir la expresión génica en prácticamente todos sus estadios. En *O. viverrini* se logró silenciar con éxito genes en adultos y metacercarias, pero esto no ha sido reportado en otros organismos. McGonigle y colaboradores reportaron que intentaron silenciar sin éxito el gen endógeno FheCL1 en adultos de *F. hepatica*, tratando los parásitos durante 4 hs por soaking con 100 ng/μl de ARNdc sin apreciar una reducción en la expresión del gen blanco (Mcgonigle *et al.*, 2008).

En nuestro laboratorio nos propusimos testar nuevamente la viabilidad de la interferencia en adultos. Buscamos interferir la expresión del gen endógeno FhLAP mediante “soaking” con 20 ng/μl de ARNdc FhLAP. Como controles utilizamos parásitos tratados con la misma concentración de ARNdc GFP (control irrelevante) y parásitos mantenidos en medio de cultivo sin adición de moléculas interferentes (control “mock”). Analizamos la expresión de FhLAP en dos parásitos de cada condición. Nuestros resultados de silenciamiento no fueron concluyentes, pues logramos suprimir la expresión de FhLAP de manera significativa solo en uno de los parásitos, pero son alentadores en que el silenciamiento es viable. Las diferencias observadas en la eficiencia de la ARNi podrían deberse a que usamos regiones distintas de cada parásito, la región superior que contiene las ventosas oral y ventral, el ovario y útero en el adulto 1, y la región inferior que tiene testículos y saco vitelino en el adulto 2. Podría ser que la ruta de entrada de las moléculas interferentes en adultos sea por las ventosas oral y ventral y que los tejidos adyacentes a esta sean más susceptibles de ser interferidos. Este mecanismo implicaría una pobre distribución de la señal interferente más allá del sitio de entrada.

Nuestro intento difirió del de McGonigle en la concentración del ARNdc usado y fundamentalmente en un tratamiento de los parásitos durante más tiempo, con lo que logramos silenciar el gen endógeno FhLAP. No creemos que el éxito dependa en este caso del gen seleccionado ya que la Catepsina L que no pudo ser silenciada en adultos en un trabajo previo y el gen FhLAP tienen un patrón de expresión similar pudiendo encontrar estas enzimas en los productos de excreción secreción de adultos.

Tal vez los resultados más alentadores de este experimento primario tengan que ver con los efectos observados en los huevos. Una gran proporción de los huevos emitidos por adultos tratados con FhLAP presentaron grandes alteraciones de su morfología comparado con los controles sin tratamiento y con el control irrelevante. Cuando pusimos a eclosionar los huevos, los que presentaban alteraciones no completaron su desarrollo a miracidios. Además la expresión de FhLAP disminuyó un 60 % en los huevos de parásitos tratados con FhLAP. Es difícil determinar si la expresión de FhLAP disminuyó por que los huevos en formación entran en contacto con moléculas interferentes o debido a alguna alteración generada al tratar los adultos. En futuros ensayos se incorporarán huevos aislados sometidos a moléculas interferentes para estudiar el efecto observado.

Dependiendo de la tasa de producción de huevos puede haber huevos que no entren mucho tiempo en contacto con las moléculas interferentes. En nuestro laboratorio hemos tenido dificultades para introducir moléculas interferentes como Cy3-siRNAs y/o para teñir los huevos con distintas clases de colorantes. Los huevos son impermeables a los tratamientos a los que los sometimos aunque los huevos recién emitidos, antes de que se complete el proceso de esclerotización de la cubierta podrían permitir la entrada de moléculas interferentes. Se sabe que FhLAP se expresa en huevos en *Fasciola hepatica* y trabajos de interferencia en *S mansoni* confirmaron que LAP es importante para la eclosión de miracidios (Rinaldi *et al.*, 2009). Nuestros datos apuntan a funciones consistentes con estas, asociadas al desarrollo de huevos y miracidios.

ARNs pequeños en *F. hepatica*

Una nueva área de investigación se generó con el descubrimiento de los ARNs pequeños y de su papel en la regulación post transcripcional de la expresión génica en importantes procesos biológicos. Los principales ARNs pequeños en las vías de silenciamiento mediado por RNA como miRNAs, siRNAs y piRNAs se identificaron y estudiaron en una gran variedad de organismos (Moazed, 2009; Morris e Mattick, 2014).

Teniendo en cuenta la importante función de los ARNs pequeños no codificantes decidimos identificar miembros de estas vías de regulación en JRD de *F. hepatica*. Cuando comenzamos a trabajar recién se estaban estableciendo las tecnologías de secuenciación masiva y era difícil acceder a ellas por los altos costos de secuenciación. Utilizando el protocolo reinante en la época que consistía en generar clones de concatámeros con secuencias de ARNs para secuenciar por SANGER (Pfeffer, Lagos-Quintana e Tuschl, 2005) logramos identificar 146 secuencias que se agrupaban en 88 contigs distintos de miRNA. En ese momento como no contábamos con el genoma de *F. hepatica* nos encontramos con dificultades para validar las secuencias encontradas por lo que buscamos indicios que indicaran que estábamos ante la presencia de ARNs pequeños reguladores. La distribución por tamaño hallada con 2 picos de secuencias en 22 y 30 nucleótidos era similar a la encontrada en planarias (Palakodeti, Smielewska e Graveley, 2006). Mediante Blast vimos que nuestras secuencias presentaban gran similitud con miRNAs que estaban validados en mirBase lo que nos hacía pensar que habíamos logrado secuenciar ARNs pequeños reguladores en *F.hepatica*. Estos resultados eran alentadores y fueron el punto de partida para el estudio de ARNs pequeños mediante nuevas tecnologías de secuenciación en nuestro grupo. En este sentido, participé en la generación de bibliotecas de ARN pequeños para su secuenciación masiva por Illumina. Este trabajo de análisis de miRNAs en *Fasciola hepatica* es el eje central del trabajo de tesis de Santiago Fontenla, en el que logramos identificar 40 secuencias de miRNA, así como secuencias de tRNA reguladores en JRDs de *F.hepatica*. Este trabajo, en el que colaboré en la generación de bibliotecas iniciales y en la discusión de estrategias de análisis y de resultados se publicó recientemente y se adjunta como anexo.

Identificación de genes de la vía si/miRNA.

En trematodos las vías de silenciamiento mediadas por ARNs deben estar presentes ya que es posible suprimir la expresión génica por medio de la ARNi y porque se han

encontrado miRNAs en varios integrantes de este grupo. Sin embargo se conoce muy poco sobre los genes que participan en las vías de silenciamiento mediada por ARN con unos pocos reportes en Schistosomas (Krautz-Peterson e Skelly, 2008; Gomes *et al.*, 2009; Krautz-Peterson *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2010; Skinner *et al.*, 2012).

Comenzamos la búsqueda en *F. hepatica* en bases de datos de transcriptoma de adultos (Young *et al.*, 2010) y de juveniles generadas por nuestro laboratorio (Cancela *et al.*, 2010) utilizando las secuencias de genes de la vía descritas en *C. elegans* (Fischer, 2010) y en *S. mansoni* (Gomes *et al.*, 2009). Identificamos varios hits con buena homología con genes descritos en *C. elegans* y en *S. mansoni*. Las proteínas centrales para el silenciamiento Argonauta y DICER están presentes pero hay una pérdida de genes de la vía con respecto a *C. elegans*, un fenómeno similar a lo encontrado analizando la vía de silenciamiento en nematodos (Dalzell *et al.*, 2011).

Todos los genes descritos en *S. mansoni* fueron identificados en *F. hepatica*. Los genes FMR1 y Exportina5 presentes en *S. mansoni* pero no en *C. elegans* fueron encontrados en nuestras bases de datos lo que podría estar reflejando algunas diferencias en los mecanismos de regulación de la expresión génica entre trematodos y *C. elegans*. Al mismo tiempo identificamos los miembros de estas vías por homología de secuencias en los datos transcriptómicos disponibles de otros trematodos y mostramos que algunos de los genes están conservados lo que confirma que las vías de silenciamiento mediadas por miRNA y siRNA están presentes en estos parásitos como era de esperar.

Pese a que la interferencia perdura varios días en trematodos luego de tratar los parásitos (Boyle *et al.*, 2003; Krautz-Peterson *et al.*, 2007; Kumagai *et al.*, 2009; Sripa *et al.*, 2011) no encontramos ninguna de las RdRPs responsables del fenómeno de amplificación de la respuesta interferente conocida como ARNi transitiva, pero si encontramos genes SMG que han sido involucrados en la persistencia del silenciamiento en *C. elegans* (Fischer, 2010) en las bases de datos de *F. hepatica* y *S. mansoni*. Esta proteína podría ser responsable del fenómeno de amplificación y persistencia de la señal en trematodos. En *C. elegans* se demostró que en mutantes algunos de los genes smg cuando los tratan con ARNdc contra el gen unc 54 estos se recuperan rápido de la ARNi aunque el mecanismo de acción no esta del todo aclarado (Domeier *et al.*, 2000).

Logramos identificar y clonar el gen SID 1 en *F. hepatica*. Este gen permite el pasaje de la señal interferente entre células y es responsable del efecto sistémico de la ARNi. En líneas celulares de *Drosophila* la expresión de SID-1 facilita la entrada de moléculas por soaking potenciando el efecto de la ARNi por lo que participa en la respuesta ambiental (Shih *et al.*, 2009; Krautz-Peterson *et al.*, 2010).

La ausencia de SID2 en *F. hepatica* y *S. mansoni* y datos que indican que SID1 permite la entrada de moléculas desde el exterior en otros organismos podrían indicar que SID1 participa de la respuesta sistémica y ambiental en trematodos. Es posible que este gen esté vinculado a la difusión de la señal observada en los tejidos del parásito.

El gen ERI 1 (un inhibidor negativo de la ARNi) identificado en este trabajo podría utilizarse para mejorar la eficiencia de la ARNi en *F. hepatica*. Hay trabajos que muestran en *C. elegans* que líneas mutantes que no expresan este gen son más sensibles a la ARNi (Kennedy, Wang e Ruvkun, 2004). En un trabajo reciente en este

nematodo se demostró que al silenciar por “feeding” este gen aumenta la eficiencia del silenciamiento de otros genes (Jadiya e Nazir, 2014). Este último experimento podría adaptarse fácilmente para evaluar la función de este gen a organismos en los que la ARNi es viable como *F. hepatica*. Considerando la posibilidad demostrada de silenciar más de un gen a la vez, un diseño experimental que incluya a ERI I como blanco puede ofrecer un camino a testar el desarrollo más eficiente de la interferencia de ARN en trematodos.

El conocimiento de los mecanismos de control de la expresión génica generado a partir del estudio de las vías de silenciamiento puede facilitar el desarrollo de la interferencia de ARN, y de otras herramientas de estudio de la función génica y eventualmente aportar al control de las parasitosis. Este trabajo pretendió ser un puntapié inicial en ese camino.

BIBLIOGRAFIA

ACOSTA, D. **Epidemiología y control de Fasciola hepatica en el Uruguay. En Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos: Bases epidemiológicas para su prevención y control en Argentina y Uruguay.** NARI, A. e FIEL, C. Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur.: 233-236. p. 1991.

ACOSTA, D. et al. Fasciola hepatica leucine aminopeptidase, a promising candidate for vaccination against ruminant fasciolosis. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 158, n. 1, p. 52--64, 2008. ISSN 0166-6851. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18178266> >.

AI, L. et al. Characterization of microRNAs in Taenia saginata of zoonotic significance by Solexa deep sequencing and bioinformatics analysis. **Parasitol Res**, v. 110, n. 6, p. 2373-8, Jun 2012. ISSN 1432-1955. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22203522> >.

ANDREWS, S. **The life cycle of Fasciola hepatica. Fasciolosis.** 1999.

ARAVIN, A. A.; HANNON, G. J.; BRENNECKE, J. The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. **Science**, v. 318, n. 5851, p. 761-4, Nov 2007. ISSN 1095-9203. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17975059> >.

ASHRAFI, K. et al. Fascioliasis: a worldwide parasitic disease of importance in travel medicine. **Travel Med Infect Dis**, v. 12, n. 6 Pt A, p. 636-49, 2014 Nov-Dec 2014. ISSN 1873-0442. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25287722> >.

ATKINSON, L. E. et al. A PAL for Schistosoma mansoni PHM. **Mol Biochem Parasitol**, v. 173, n. 2, p. 97-106, Oct 2010. ISSN 1872-9428. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20488212> >.

BASCH, P. Cultivation of Schistosoma mansoni in vitro. I. Establishment of cultures from cercariae and development until pairing. **The Journal of parasitology**, v. 67, n. 2, p. 179-185, 1981.

BECKMANN, S. et al. The Syk kinase SmTK4 of Schistosoma mansoni is involved in the regulation of spermatogenesis and oogenesis. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 2, p. e1000769, Feb 2010. ISSN 1553-7374. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20169182> >.

_____. Schistosoma mansoni: signal transduction processes during the development of the reproductive organs. **Parasitology**, v. 137, n. 3, p. 497-520, Mar 2010. ISSN 1469-8161. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20163751> >.

_____. Discovery of platyhelminth-specific α/β -integrin families and evidence for their role in reproduction in *Schistosoma mansoni*. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e52519, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23300694> >.

BERINDAN-NEAGOE, I. et al. MicroRNAome genome: a treasure for cancer diagnosis and therapy. **CA Cancer J Clin**, v. 64, n. 5, p. 311-36, 2014 Sep-Oct 2014. ISSN 1542-4863. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25104502> >.

BERNAL, D. et al. Surface analysis of *Dicrocoelium dendriticum*. The molecular characterization of exosomes reveals the presence of miRNAs. **J Proteomics**, v. 105, p. 232-41, Jun 2014. ISSN 1876-7737. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24561797> >.

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

BOLOGNA, N. G.; VOINNET, O. The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in *Arabidopsis*. **Annu Rev Plant Biol**, v. 65, p. 473-503, 2014. ISSN 1545-2123. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24579988> >.

BOYLE, J. P. et al. Using RNA interference to manipulate endogenous gene expression in *Schistosoma mansoni* sporocysts. **Mol Biochem Parasitol**, v. 128, n. 2, p. 205-15, May 2003. ISSN 0166-6851 (Print) 0166-6851 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12742587 >.

BRENNAN, G. P. et al. Understanding triclabendazole resistance. **Exp Mol Pathol**, v. 82, n. 2, p. 104-9, Apr 2007. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17398281 >.

BRENNECKE, J. et al. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. **Cell**, v. 128, n. 6, p. 1089-103, Mar 2007. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17346786> >.

BUSCAGLIA, C. A.; KISSINGER, J. C.; AGÜERO, F. Neglected Tropical Diseases in the Post-Genomic Era. **Trends Genet**, v. 31, n. 10, p. 539-55, Oct 2015. ISSN 0168-9525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26450337> >.

CAI, P. et al. Profiles of small non-coding RNAs in *Schistosoma japonicum* during development. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 8, p. e1256, Aug 2011. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21829742> >.

_____. A deep analysis of the small non-coding RNA population in *Schistosoma japonicum* eggs. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e64003, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23691136> >.

_____. Identification and characterization of argonaute protein, Ago2 and its associated small RNAs in *Schistosoma japonicum*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 7, p. e1745, 2012. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22860145> >.

CANCELA, M. et al. Survey of transcripts expressed by the invasive juvenile stage of the liver fluke *Fasciola hepatica*. **BMC Genomics**, v. 11, p. 227, 2010. ISSN 1471-2164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20374642> >.

CAO, Y. et al. Distribution of lethal giant larvae (Lgl) protein in the tegument and negative impact of siRNA-based gene silencing on worm surface structure and egg hatching in *Schistosoma japonicum*. **Parasitol Res**, v. 113, n. 1, p. 1-9, Jan 2014. ISSN 1432-1955. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24096609> >.

CARMONA, C. et al. Cathepsin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica* in vitro prevents antibody-mediated eosinophil attachment to newly excysted juveniles. **Mol Biochem Parasitol**, v. 62, n. 1, p. 9-17, Nov 1993. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8114830> >.

CHAMMARTIN, F. et al. Modelling the geographical distribution of soil-transmitted helminth infections in Bolivia. **Parasit Vectors**, v. 6, p. 152, 2013. ISSN 1756-3305. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23705798> >.

CHEN, K. C.; JUO, S. H. MicroRNAs in atherosclerosis. **Kaohsiung J Med Sci**, v. 28, n. 12, p. 631-40, Dec 2012. ISSN 1607-551X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23217354> >.

CHEN, M. G., MOTT, K. E. Progress in assessment of morbidity due to *Fasciola hepatica* infection: a review of recent literature. **Tropical Diseases Bulletin**, v. 87, n. 4, p. 1-37, 1990.

CHEN, W. J. et al. MicroRNA-33 in atherosclerosis etiology and pathophysiology. **Atherosclerosis**, v. 227, n. 2, p. 201-8, Apr 2013. ISSN 1879-1484. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23261171> >.

CHOUDHURI, S. Lesser known relatives of miRNA. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 388, n. 2, p. 177-80, Oct 2009. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19679101> >.

CHRISTENSEN, N. O. A review of the influence of host- and parasite-related factors and environmental conditions on the host-finding capacity of the trematode

miracidium. **Acta Trop**, v. 37, n. 4, p. 303-18, Dec 1980. ISSN 0001-706X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6110321> >.

CONSORTIUM, S. J. G. S. A. F. A. The Schistosoma japonicum genome reveals features of host-parasite interplay. **Nature**, v. 460, n. 7253, p. 345-51, Jul 2009. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19606140> >.

Control of foodborne trematode infections. Report of a WHO Study Group. **World Health Organ Tech Rep Ser**, v. 849, p. 1-157, 1995. ISSN 0512-3054. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7740791> >.

CORRENTI, J. M.; PEARCE, E. J. Transgene expression in Schistosoma mansoni: introduction of RNA into schistosomula by electroporation. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 137, p. 75-9, 2004.

CUCHER, M. et al. Identification of Echinococcus granulosus microRNAs and their expression in different life cycle stages and parasite genotypes. **Int J Parasitol**, v. 41, n. 3-4, p. 439-48, Mar 2011. ISSN 1879-0135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21219906> >.

CWIKLINSKI, K. et al. The Fasciola hepatica genome: gene duplication and polymorphism reveals adaptation to the host environment and the capacity for rapid evolution. **Genome Biol**, v. 16, p. 71, 2015. ISSN 1474-760X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25887684> >.

CZECH, B.; HANNON, G. J. Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. **Nat Rev Genet**, v. 12, n. 1, p. 19-31, Jan 2011. ISSN 1471-0064. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21116305> >.

_____. One Loop to Rule Them All: The Ping-Pong Cycle and piRNA-Guided Silencing. **Trends Biochem Sci**, Jan 2016. ISSN 0968-0004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26810602> >.

DALZELL, J. J. et al. RNAi effector diversity in nematodes. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 6, p. e1176, Jun 2011. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21666793> >.

_____. Considering RNAi experimental design in parasitic helminths. **Parasitology**, v. 139, n. 5, p. 589-604, Apr 2012. ISSN 1469-8161. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22216952> >.

DE SOUZA GOMES, M. et al. Genome-wide identification of novel microRNAs and their target genes in the human parasite Schistosoma mansoni. **Genomics**, v. 98, n. 2, p. 96-111, Aug 2011. ISSN 1089-8646. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21640815> >.

DELCROIX, M. et al. A multienzyme network functions in intestinal protein digestion by a platyhelminth parasite. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 51, p. 39316--29, 2006. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17028179> >.

DEVAUX, Y. et al. Diagnostic and prognostic value of circulating microRNAs in patients with acute chest pain. **J Intern Med**, Dec 2013. ISSN 1365-2796. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24345063> >.

DEVINE, C. et al. Effect of the metabolic inhibitor, methimazole on the drug susceptibility of a triclabendazole-resistant isolate of *Fasciola hepatica*. **Parasitology**, v. 136, n. 2, p. 183--92, 2009. ISSN 1469-8161. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19079818> >.

DINGUIRARD, N.; YOSHINO, T. P. Potential role of a CD36-like class B scavenger receptor in the binding of modified low-density lipoprotein (acLDL) to the tegumental surface of *Schistosoma mansoni* sporocysts. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 146, n. 2, p. 219--30, 2006. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16427708> >.

DOMEIER, M. E. et al. A link between RNA interference and nonsense-mediated decay in *Caenorhabditis elegans*. **Science**, v. 289, n. 5486, p. 1928-31, Sep 2000. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10988072> >.

DUVOISIN, R. et al. Human U6 promoter drives stronger shRNA activity than its schistosome orthologue in *Schistosoma mansoni* and human fibrosarcoma cells. **Transgenic Res**, v. 21, n. 3, p. 511-21, Jun 2012. ISSN 1573-9368. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21953124> >.

ESPINOZA, J. R. et al. Human and animal fascioliasis in Peru: impact in the economy of endemic zones. **Revista Peruana de Idots**, v. 27, n. 4, p. 604--612, 2010. Disponível em: < http://www.scielosp.org/scielo.php?pid=S1726-46342010000400018&script=sci_arttext >.

FEDOROV, Y. et al. Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype. **RNA**, v. 12, n. 7, p. 1188-96, Jul 2006. ISSN 1355-8382. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16682561> >.

FIRE, A. et al. Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle. **Development**, v. 113, n. 2, p. 503-14, Oct 1991. ISSN 0950-1991. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1782862> >.

_____. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 806-11, Feb 1998. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9486653> >.

FISCHER, S. E. Small RNA-mediated gene silencing pathways in *C. elegans*. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 42, n. 8, p. 1306-15, Aug 2010. ISSN 1878-5875. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20227516> >.

FLYNN, R. J.; MULCAHY, G.; ELSHEIKHA, H. M. Coordinating innate and adaptive immunity in *Fasciola hepatica* infection: implications for control.

Veterinary parasitology, v. 169, n. 3-4, p. 235--40, 2010. ISSN 1873-2550. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20219284> >.

FREITAS, T. C.; JUNG E; PEARCE, E. J. TGF-beta signaling controls embryo development in the parasitic flatworm *Schistosoma mansoni*. **PLoS pathogens**, v. 3, n. 4, p. e52, 2007. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1847691&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> >.

FRIEDLÄNDER, M. R. et al. High-resolution profiling and discovery of planarian small RNAs. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 28, p. 11546-51, Jul 2009. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19564616> >.

FROMM, B. et al. The revised microRNA complement of *Fasciola hepatica* reveals a plethora of overlooked microRNAs and evidence for enrichment of immunoregulatory microRNAs in extracellular vesicles. **Int J Parasitol**, v. 45, n. 11, p. 697-702, Sep 2015. ISSN 1879-0135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26183562> >.

_____. Substantial loss of conserved and gain of novel MicroRNA families in flatworms. **Mol Biol Evol**, v. 30, n. 12, p. 2619-28, Dec 2013. ISSN 1537-1719. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24025793> >.

GAUDIER, J. F. et al. Biochemical characterization and differential expression of a 16.5-kilodalton tegument-associated antigen from the liver fluke *Fasciola hepatica*. **Clin Vaccine Immunol**, v. 19, n. 3, p. 325-33, Mar 2012. ISSN 1556-679X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22278327> >.

GELDHOF, P. et al. Testing the efficacy of RNA interference in *Haemonchus contortus*. **Int J Parasitol**, v. 36, n. 7, p. 801-10, Jun 2006. ISSN 0020-7519. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16469321> >.

_____. RNA interference in parasitic helminths: current situation, potential pitfalls and future prospects. **Parasitology**, v. 134, n. Pt 5, p. 609-19, May 2007. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17201997 >.

GILLEARD, J. S. Understanding anthelmintic resistance: the need for genomics and genetics. **Int J Parasitol**, v. 36, n. 12, p. 1227-39, Oct 2006. ISSN 0020-7519. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16889782> >.

GOMES, M. S. et al. Preliminary analysis of miRNA pathway in *Schistosoma mansoni*. **Parasitol Int**, v. 58, n. 1, p. 61-8, Mar 2009. ISSN 1383-5769. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19007911> >.

HA, M.; KIM, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 15, n. 8, p. 509-24, Aug 2014. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25027649> >.

HAGEN, J. et al. Functional genomics approaches in parasitic helminths. **Parasite Immunol**, v. 34, n. 2-3, p. 163-82, 2012 Feb-Mar 2012. ISSN 1365-3024. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21711361> >.

HAGEN, J.; SCHEERLINCK, J. P.; GASSER, R. B. Knocking down schistosomes - promise for lentiviral transduction in parasites. **Trends Parasitol**, v. 31, n. 7, p. 324-32, Jul 2015. ISSN 1471-5007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25933926> >.

HAO, L. et al. Identification and characterization of microRNAs and endogenous siRNAs in *Schistosoma japonicum*. **BMC Genomics**, v. 11, p. 55, 2010. ISSN 1471-2164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20092619> >.

HAUSSECKER, D. et al. Human tRNA-derived small RNAs in the global regulation of RNA silencing. **RNA**, v. 16, n. 4, p. 673-95, Apr 2010. ISSN 1469-9001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20181738> >.

HE, Y. et al. siRNA-mediated knockdown of two tyrosinase genes from *Schistosoma japonicum* cultured in vitro. **Experimental parasitology**, v. 132, n. 4, p. 394--402, 2012. ISSN 1090-2449. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23073288> >.

HIRAKATA, S.; SIOMI, M. C. piRNA biogenesis in the germline: From transcription of piRNA genomic sources to piRNA maturation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1859, n. 1, p. 82-92, Jan 2016. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26348412> >.

HOTEZ, P. J. et al. Helminth infections: the great neglected tropical diseases. **J Clin Invest**, v. 118, n. 4, p. 1311-21, Apr 2008. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18382743> >.

HOY, A. M. et al. Parasite-derived microRNAs in host serum as novel biomarkers of helminth infection. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 2, p. e2701, Feb 2014. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24587461> >.

HUANG, B.; ZHANG, R. Regulatory non-coding RNAs: revolutionizing the RNA world. **Mol Biol Rep**, Feb 2014. ISSN 1573-4978. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24549720> >.

HUANG, S. Y. et al. Genomics and molecular genetics of *Clonorchis sinensis*: current status and perspectives. **Parasitol Int**, v. 61, n. 1, p. 71-6, Mar 2012. ISSN 1873-0329. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21704726> >.

HUANG, Y. et al. The carcinogenic liver fluke, *Clonorchis sinensis*: new assembly, reannotation and analysis of the genome and characterization of tissue transcriptomes. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e54732, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23382950> >.

_____. Biological functions of microRNAs: a review. **J Physiol Biochem**, v. 67, n. 1, p. 129-39, Mar 2011. ISSN 1877-8755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20981514> >.

HUTVAGNER, G.; SIMARD, M. J. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 1, p. 22-32, Jan 2008. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18073770> >.

IZUMI, N.; TOMARI, Y. Diversity of the piRNA pathway for nonself silencing: worm-specific piRNA biogenesis factors. **Genes Dev**, v. 28, n. 7, p. 665-71, Apr 2014. ISSN 1549-5477. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24696451> >.

JADIYA, P.; NAZIR, A. A pre- and co-knockdown of RNaseT enzyme, Eri-1, enhances the efficiency of RNAi induced gene silencing in *Caenorhabditis elegans*. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e87635, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24475317> >.

JIN, X. et al. Comparative analysis of known miRNAs across platyhelminths. **FEBS J**, v. 280, n. 16, p. 3944-51, Aug 2013. ISSN 1742-4658. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23777576> >.

KALINNA, B. H.; BRINDLEY, P. J. Manipulating the manipulators: advances in parasitic helminth transgenesis and RNAi. **Trends Parasitol**, v. 23, n. 5, p. 197-204, May 2007. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17383233 >.

KAMATH, R. S. et al. Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. **Nature**, v. 421, n. 6920, p. 231-7, Jan 2003. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12529635> >.

_____. Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Genome Biol**, v. 2, n. 1, p. RESEARCH0002, 2001. ISSN 1474-760X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11178279> >.

KEISER, J.; UTZINGER, J. Food-borne trematodiasis. **Clin Microbiol Rev**, v. 22, n. 3, p. 466-83, Jul 2009. ISSN 1098-6618 (Electronic) 1098-6618 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19597009 >.

KENDALL, S. B. Nutritional factors affecting the rate of development of *Fasciola hepatica* in *Limnaea truncatum*. **J Helminthol**, v. 23, n. 3-4, p. 179-90, 1949. ISSN 0022-149X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15409355> >.

KENNEDY, S.; WANG, D.; RUVKUN, G. A conserved siRNA-degrading RNase negatively regulates RNA interference in *C. elegans*. **Nature**, v. 427, n. 6975, p. 645-

9, Feb 2004. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14961122> >.

KOZOMARA, A.; GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. **Nucleic Acids Res**, v. 42, n. Database issue, p. D68-73, Jan 2014. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24275495> >.

KRAUTZ-PETERSON, G. et al. RNA interference in schistosomes: machinery and methodology. **Parasitology**, v. 137, n. 3, p. 485-95, Mar 2010. ISSN 1469-8161. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19765345> >.

_____. Optimizing gene suppression in schistosomes using RNA interference. **Mol Biochem Parasitol**, v. 153, n. 2, p. 194-202, Jun 2007. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17420062](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=17420062) >.

KRAUTZ-PETERSON, G.; SKELLY, P. J. Schistosoma mansoni: the dicer gene and its expression. **Exp Parasitol**, v. 118, n. 1, p. 122-8, Jan 2008. ISSN 0014-4894. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17707814> >.

KU, H. Y.; LIN, H. PIWI proteins and their interactors in piRNA biogenesis, germline development and gene expression. **Natl Sci Rev**, v. 1, n. 2, p. 205-218, Jun 2014. ISSN 2095-5138. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25512877> >.

KUMAGAI, T. et al. Peroxiredoxin-1 from Schistosoma japonicum functions as a scavenger against hydrogen peroxide but not nitric oxide. **Mol Biochem Parasitol**, v. 164, n. 1, p. 26-31, Mar 2009. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19041905> >.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843-54, Dec 1993. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8252621> >.

LENDNER, M. et al. Attempts to establish RNA interference in the parasitic nematode Heligmosomoides polygyrus. **Mol Biochem Parasitol**, v. 161, n. 1, p. 21-31, Sep 2008. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18606194> >.

LI, Y. J. et al. Alterations of serum levels of BDNF-related miRNAs in patients with depression. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e63648, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23704927> >.

LI, Y. Q. et al. Comparing the diagnostic values of circulating microRNAs and cardiac troponin T in patients with acute myocardial infarction. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 68, n. 1, p. 75-80, Jan 2013. ISSN 1980-5322. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23420161> >.

LIM, A. K.; KAI, T. Unique germ-line organelle, nuage, functions to repress selfish genetic elements in *Drosophila melanogaster*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 16, p. 6714-9, Apr 2007. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17428915> >.

LIU, X. et al. The molecular characterization and RNAi silencing of SjZFP1 in *Schistosoma japonicum*. **Parasitol Res**, v. 114, n. 3, p. 903-11, Mar 2015. ISSN 1432-1955. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25512211> >.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001. ISSN 1046-2023. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609> >.

LOUVET-VALLÉE, S. et al. Control of vulval competence and centering in the nematode *Oscheius sp. 1 CEW1*. **Genetics**, v. 163, n. 1, p. 133-46, Jan 2003. ISSN 0016-6731. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12586702> >.

LUO, R. et al. Analysis and characterization of the genes encoding the Dicer and Argonaute proteins of *Schistosoma japonicum*. **Parasit Vectors**, v. 3, p. 90, 2010. ISSN 1756-3305. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20849617> >.

MANIKANDAN, J. et al. Oncomirs: the potential role of non-coding microRNAs in understanding cancer. **Bioinformatics**, v. 2, n. 8, p. 330-4, 2008. ISSN 0973-2063. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18685719> >.

MANN, V. H. et al. Establishing transgenic schistosomes. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 8, p. e1230, Aug 2011. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21912709> >.

MARTÍNEZ DE ALBA, A. E.; ELVIRA-MATELOT, E.; VAUCHERET, H. Gene silencing in plants: a diversity of pathways. **Biochim Biophys Acta**, v. 1829, n. 12, p. 1300-8, Dec 2013. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24185199> >.

MAS-COMA, S. Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. **J Helminthol**, v. 79, n. 3, p. 207-16, Sep 2005. ISSN 0022-149X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16153314> >.

MCGONIGLE, L. et al. The silencing of cysteine proteases in *Fasciola hepatica* newly excysted juveniles using RNA interference reduces gut penetration. **Int J Parasitol**, v. 38, n. 2, p. 149-55, Feb 2008. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18048044 >.

MCMANUS, D. P.; DALTON, J. P. Vaccines against the zoonotic trematodes *Schistosoma japonicum*, *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. **Parasitology**, v. 133 Suppl, p. S43-61, 2006. ISSN 0031-1820. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17274848> >.

MCMANUS, D. P.; LOUKAS, A. Current status of vaccines for schistosomiasis. **Clin Microbiol Rev**, v. 21, n. 1, p. 225-42, Jan 2008. ISSN 1098-6618. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18202444> >.

MCVEIGH, P. et al. Schistosome I/Lamides--a new family of bioactive helminth neuropeptides. **Int J Parasitol**, v. 41, n. 8, p. 905-13, Jul 2011. ISSN 1879-0135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21554884> >.

_____. RNAi dynamics in Juvenile Fasciola spp. Liver flukes reveals the persistence of gene silencing in vitro. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 9, p. e3185, Sep 2014. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25254508> >.

MOAZED, D. Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. **Nature**, v. 457, n. 7228, p. 413-20, Jan 2009. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19158787> >.

MOHN, F.; HANDLER, D.; BRENNECKE, J. Noncoding RNA. piRNA-guided slicing specifies transcripts for Zucchini-dependent, phased piRNA biogenesis. **Science**, v. 348, n. 6236, p. 812-7, May 2015. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25977553> >.

MORALES, M. E. et al. RNA interference of Schistosoma mansoni cathepsin D, the apical enzyme of the hemoglobin proteolysis cascade. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 157, p. 160-8, 2008.

MOREAU, E.; CHAUVIN, A. Immunity against helminths: interactions with the host and the intercurrent infections. **J Biomed Biotechnol**, v. 2010, p. 428593, 2010. ISSN 1110-7251. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20150967> >.

MORRIS, K. V.; MATTICK, J. S. The rise of regulatory RNA. **Nat Rev Genet**, v. 15, n. 6, p. 423-37, Jun 2014. ISSN 1471-0064. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24776770> >.

MOURÃO, M. M. et al. Phenotypic screen of early-developing larvae of the blood fluke, schistosoma mansoni, using RNA interference. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 3, n. 8, p. e502, 2009. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19668375> >.

_____. Recent advances in Schistosoma genomics. **Parasite Immunol**, v. 34, n. 2-3, p. 151-62, 2012 Feb-Mar 2012. ISSN 1365-3024. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22145587> >.

NDEGWA, D.; KRAUTZ-PETERSON, G.; SKELLY, P. J. Protocols for gene silencing in schistosomes. **Exp Parasitol**, v. 117, n. 3, p. 284-91, Nov 2007. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17870072 >.

NEWMARK, P. A. Opening a new can of worms: a large-scale RNAi screen in planarians. **Dev Cell**, v. 8, n. 5, p. 623-4, May 2005. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15866153 >.

OKAMURA, K.; LIU, N.; LAI, E. C. Distinct mechanisms for microRNA strand selection by Drosophila Argonautes. **Mol Cell**, v. 36, n. 3, p. 431-44, Nov 2009. ISSN 1097-4164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19917251> >.

OVCHINNIKOV, V. Y. et al. Identification of microRNA genes in three opisthorchiids. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 4, p. e0003680, Apr 2015. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25898350> >.

PAKHARUKOVA, M. Y. et al. Functional Analysis of the Unique Cytochrome P450 of the Liver Fluke *Opisthorchis felinus*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 12, p. e0004258, Dec 2015. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26625139> >.

PALAKODETI, D.; SMIELEWSKA, M.; GRAVELEY, B. R. MicroRNAs from the Planarian *Schmidtea mediterranea*: a model system for stem cell biology. **RNA**, v. 12, n. 9, p. 1640-9, Sep 2006. ISSN 1355-8382. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16849698> >.

PEAK, E.; CHALMERS, I. W.; HOFFMANN, K. F. Development and validation of a quantitative, high-throughput, fluorescent-based bioassay to detect schistosoma viability. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 7, p. e759, 2010. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20668553> >.

PEREIRA, T. C. et al. *Schistosoma mansoni*: evaluation of an RNAi-based treatment targeting HGPRTase gene. **Exp Parasitol**, v. 118, n. 4, p. 619-23, Apr 2008. ISSN 0014-4894. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18237732> >.

PETER J. HOTEZ, D. A. P. B., KATHLEEN BEEGLE, SIMON BROOKER, et al. **Helminth Infections: Soil-Transmitted Helminth Infections and Schistosomiasis**. 2006.

PFEFFER, S.; LAGOS-QUINTANA, M.; TUSCHL, T. Cloning of small RNA molecules. **Curr Protoc Mol Biol**, v. Chapter 26, p. Unit 26.4, Nov 2005. ISSN 1934-3647. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18265364> >.

PIRES-DASILVA, A.; SOMMER, R. J. Conservation of the global sex determination gene *tra-1* in distantly related nematodes. **Genes Dev**, v. 18, n. 10, p. 1198-208, May 2004. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15155582> >.

PISPA, J. et al. *C. elegans* *dss-1* is functionally conserved and required for oogenesis and larval growth. **BMC Dev Biol**, v. 8, p. 51, 2008. ISSN 1471-213X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18471277> >.

QIN, Y. F. et al. Identification of small non-coding RNAs in the planarian *Dugesia japonica* via deep sequencing. **Genomics**, v. 99, n. 5, p. 315-21, May 2012. ISSN 1089-8646. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22425900> >.

RANA, A. K.; MISRA-BHATTACHARYA, S. Current drug targets for helminthic diseases. **Parasitol Res**, v. 112, n. 5, p. 1819-31, May 2013. ISSN 1432-1955. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23529336> >.

RANA, T. M. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 1, p. 23-36, Jan 2007. ISSN 1471-0072. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17183358> >.

REYNOLDS, A. et al. Induction of the interferon response by siRNA is cell type- and duplex length-dependent. **RNA**, v. 12, n. 6, p. 988-93, Jun 2006. ISSN 1355-8382. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16611941> >.

RINALDI, G. et al. RNA interference targeting leucine aminopeptidase blocks hatching of *Schistosoma mansoni* eggs. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 167, p. 118-26, 2009.

_____. Development of functional genomic tools in trematodes: RNA interference and luciferase reporter gene activity in *Fasciola hepatica*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, n. 7, p. e260, 2008. ISSN 1935-2735 (Electronic) 1935-2727 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18612418 >.

_____. Genetic Manipulation of *Schistosoma haematobium*, the Neglected Schistosome. v. 5, n. 10, p. 1--10, 2011.

_____. An antibiotic selection marker for schistosome transgenesis. **Int J Parasitol**, v. 42, n. 1, p. 123-30, Jan 2012. ISSN 1879-0135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22155152> >.

RIVAS, F. V. et al. Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. **Nat Struct Mol Biol**, v. 12, n. 4, p. 340-9, Apr 2005. ISSN 1545-9993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15800637> >.

ROUHANA, L. et al. RNA interference by feeding in vitro-synthesized double-stranded RNA to planarians: methodology and dynamics. **Dev Dyn**, v. 242, n. 6, p. 718-30, Jun 2013. ISSN 1097-0177. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23441014> >.

SAITO, K. The epigenetic regulation of transposable elements by PIWI-interacting RNAs in *Drosophila*. **Genes Genet Syst**, v. 88, n. 1, p. 9-17, 2013. ISSN 1880-5779. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23676706> >.

SALADIN, K. S. Behavioral parasitology and perspectives on miracidial host-finding. **Z Parasitenkd**, v. 60, n. 3, p. 197-210, Dec 1979. ISSN 0044-3255. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/396728> >.

SASIDHARAN, V. et al. Identification of neoblast- and regeneration-specific miRNAs in the planarian *Schmidtea mediterranea*. **RNA**, v. 19, n. 10, p. 1394-404, Oct 2013. ISSN 1469-9001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23974438> >.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nat Methods**, v. 9, n. 7, p. 671-5, Jul 2012. ISSN 1548-7105. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22930834> >.

SHIH, J. D. et al. The SID-1 double-stranded RNA transporter is not selective for dsRNA length. **RNA**, v. 15, n. 3, p. 384-90, Mar 2009. ISSN 1469-9001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19155320> >.

SIMÕES, M. C. et al. Identification of *Schistosoma mansoni* microRNAs. **BMC Genomics**, v. 12, p. 47, 2011. ISSN 1471-2164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21247453> >.

SKELLY, P.; DA'DARA, A.; HARN, D., A. Suppression of cathepsin B expression in *Schistosoma mansoni* by RNA interference. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 4, p. 363--369, 2003. ISSN 00207519. Disponível em: < <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751903000304> >.

SKINNER, D. E. et al. How might flukes and tapeworms maintain genome integrity without a canonical piRNA pathway? **Trends Parasitol**, v. 30, n. 3, p. 123-9, Mar 2014. ISSN 1471-5007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24485046> >.

_____. Vasa-Like DEAD-Box RNA Helicases of *Schistosoma mansoni*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 6, p. e1686, 2012. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22720105> >.

SPITHILL, T. W.; DALTON, J. P. Progress in development of liver fluke vaccines. **Parasitol Today**, v. 14, n. 6, p. 224-8, Dec 1998. ISSN 0169-4758. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17040765> >.

SRIPA, J. et al. RNA interference targeting cathepsin B of the carcinogenic liver fluke, *Opisthorchis viverrini*. **Parasitology international**, v. 60, p. 283-8, 2011.

STEFANIĆ, S. et al. RNA interference in *Schistosoma mansoni* schistosomula: selectivity, sensitivity and operation for larger-scale screening. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 10, p. e850, 2010. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20976050> >.

SU, H. et al. Essential and overlapping functions for mammalian Argonautes in microRNA silencing. **Genes Dev**, v. 23, n. 3, p. 304-17, Feb 2009. ISSN 1549-5477. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19174539> >.

SUBRAMANIAN, N. et al. Blocking the maturation of OncomiRNAs using pri-miRNA-17~92 aptamer in retinoblastoma. **Nucleic Acid Ther**, v. 25, n. 1, p. 47-52,

Feb 2015. ISSN 2159-3345. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25513843> >.

SWIERCZEWSKI, B. E.; DAVIES, S. J. A schistosome cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit is essential for parasite viability. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 3, n. 8, p. e505, 2009. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19707280> >.

TABARA, H.; GRISHOK, A.; MELLO, C. C. RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. **Science**, v. 282, n. 5388, p. 430-1, Oct 1998. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9841401> >.

TAFT, A. S.; YOSHINO, T. P. Cloning and functional characterization of two calmodulin genes during larval development in the parasitic flatworm *Schistosoma mansoni*. **J Parasitol**, v. 97, n. 1, p. 72-81, Feb 2011. ISSN 1937-2345. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21348610> >.

TCHOUBRIEVA, E. B. et al. Vector-based RNA interference of cathepsin B1 in *Schistosoma mansoni*. **Cell Mol Life Sci**, v. 67, n. 21, p. 3739-48, Nov 2010. ISSN 1420-9071. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20339897> >.

THANASUWAN, S. et al. Suppression of aquaporin, a mediator of water channel control in the carcinogenic liver fluke, *Opisthorchis viverrini*. **Parasit Vectors**, v. 7, p. 224, 2014. ISSN 1756-3305. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24885060> >.

TOET, H.; PIEDRAFITA, D. M.; SPITHILL, T. W. Liver fluke vaccines in ruminants: strategies, progress and future opportunities. **Int J Parasitol**, v. 44, n. 12, p. 915-27, Oct 2014. ISSN 1879-0135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25200351> >.

TOLEDO, R.; BERNAL, M. D.; MARCILLA, A. Proteomics of foodborne trematodes. **J Proteomics**, v. 74, n. 9, p. 1485-503, Aug 2011. ISSN 1876-7737. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21459168> >.

TOLEDO, R.; ESTEBAN, J. G.; FRIED, B. Current status of food-borne trematode infections. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 31, n. 8, p. 1705-18, Aug 2012. ISSN 1435-4373. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22228314> >.

TRAN, M. H. et al. Suppression of mRNAs encoding tegument tetraspanins from *Schistosoma mansoni* results in impaired tegument turnover. **PLoS pathogens**, v. 6, p. e1000840, 2010.

UTZINGER, J. et al. Neglected tropical diseases: diagnosis, clinical management, treatment and control. **Swiss Med Wkly**, v. 142, p. w13727, 2012. ISSN 1424-3997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23180107> >.

VAN DER LINDEN, P. W.; DEELDER, A. M. *Schistosoma mansoni*: a diamidinophenylindole probe for in vitro death of schistosomula. **Exp Parasitol**, v.

57, n. 2, p. 125-31, Apr 1984. ISSN 0014-4894. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6201384> >.

VISSER, A. et al. Efficacy and specificity of RNA interference in larval life-stages of *Ostertagia ostertagi*. **Parasitology**, v. 133, n. Pt 6, p. 777-83, Dec 2006. ISSN 0031-1820. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16879764> >.

WANG, C. R. et al. Characterization of microRNAs from *Orientobilharzia turkestanicum*, a neglected blood fluke of human and animal health significance. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e47001, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23071694> >.

WANG, X. et al. RNAi-mediated silencing of enolase confirms its biological importance in *Clonorchis sinensis*. **Parasitol Res**, v. 113, n. 4, p. 1451-8, Apr 2014. ISSN 1432-1955. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24458653> >.

WHANGBO, J. S.; HUNTER, C. P. Environmental RNA interference. **Trends Genet**, v. 24, n. 6, p. 297-305, Jun 2008. ISSN 0168-9525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18450316> >.

WIPPERSTEG, V. et al. Biolistic transformation of *Schistosoma mansoni* with 5' flanking regions of two peptidase genes promotes tissue-specific expression. **Int J Parasitol**, v. 35, n. 6, p. 583-9, May 2005. ISSN 0020-7519. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15862572> >.

XU, M. J. et al. Comparative characterization of microRNAs from the liver flukes *Fasciola gigantica* and *F. hepatica*. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e53387, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23300925> >.

_____. Identification and characterization of microRNAs in *Clonorchis sinensis* of human health significance. **BMC Genomics**, v. 11, p. 521, 2010. ISSN 1471-2164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20920166> >.

_____. Identification and characterization of microRNAs in the pancreatic fluke *Eurytrema pancreaticum*. **Parasit Vectors**, v. 6, p. 25, 2013. ISSN 1756-3305. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23351883> >.

YANG, J. S. et al. Intertwined pathways for Argonaute-mediated microRNA biogenesis in *Drosophila*. **Nucleic Acids Res**, v. 42, n. 3, p. 1987-2002, Feb 2014. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24220090> >.

YANG, Y. et al. RNAi silencing of type V collagen in *Schistosoma japonicum* affects parasite morphology, spawning, and hatching. **Parasitol Res**, v. 111, n. 3, p. 1251-7, Sep 2012. ISSN 1432-1955. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22638918> >.

YOUNG, N. D. et al. Elucidating the transcriptome of *Fasciola hepatica* - a key to fundamental and biotechnological discoveries for a neglected parasite. **Biotechnol**

Adv, v. 28, n. 2, p. 222-31, 2010 Mar-Apr 2010. ISSN 1873-1899. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20006979> >.

_____. A portrait of the transcriptome of the neglected trematode, *Fasciola gigantica*--biological and biotechnological implications. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 2, p. e1004, 2011. ISSN 1935-2735. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21408104> >.

_____. Whole-genome sequence of *Schistosoma haematobium*. **Nature genetics**, v. 44, p. 221-5, 2012.

YUAN, X.-S. et al. *Schistosoma japonicum*: a method for transformation by electroporation. **Experimental parasitology**, v. 111, p. 244-9, 2005.

ZAROWIECKI, M.; BERRIMAN, M. What helminth genomes have taught us about parasite evolution. **Parasitology**, v. 142 Suppl 1, p. S85-97, Feb 2015. ISSN 1469-8161. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25482650> >.

ZOU, X. et al. RNAi silencing of calcium-regulated heat-stable protein of 24 kDa in *Schistosoma japonicum* affects parasite growth. **Parasitol Res**, v. 108, n. 3, p. 567-72, Mar 2011. ISSN 1432-1955. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21085993> >.

APENDICE 1

Tabla de secuencias putativamente correspondientes a miRNA identificadas a partir de secuenciación Sanger de concatámeros.

Nombre	Secuencia	Tamaño	Blast mi/piRNA
>FHNSR-00	CGCAGGATGAGAGACATTCAACGGACC	27	No hits
>FHNSR-01	CCGTGGCGCAATGAAGGTGAAGGGCC	26	pi
>FHNSR-02	CGGGGGAGAACGTACTGGGGCGTCAGAG	28	No hits
>FHNSR-03	GGCCCCGGCGCGCCGGGC	19	No hits
>FHNSR-04	TAGGAGGGCCGCTGCGGTGAGCC	23	No hits
>FHNSR-05	GCTGAGGAGCCAATGGGGC	20	pi

>FHNSR-06	GGAGGAATGCATGTCACAGGCGGGACTTTC	30	No hits
>FHNSR-07	GGAGGGCAGCAGGCGCGC	18	No hits
>FHNSR-08	CGGGGCCCGGTGGGGGGCGGGGCGGAC	27	mi
>FHNSR-09	GCTGGGAATACCGGTGTTGCGGCC	25	pi
>FHNSR-10	GTGGCGGCCAAGCGTTCATAGC	22	pi
>FHNSR-11	AGAGGGGGATGGAATTCCGC	20	No hits
>FHNSR-12	CGGGCTGGGGCGCGAAGCGGGGCC	24	No hits
>FHNSR-13	TCAGTGGTAGAGCGTGC	17	mi
>FHNSR-14	CACGCGAGAGGTCCCCGG	19	No hits
>FHNSR-15	GCCAGGGATTGTGGGTTA	18	mi
>FHNSR-16	CCCAGCTCACGTTCCCTGTCA	21	mi/pi
>FHNSR-17	GATGGTAGTCGCCGTGCCTACC	22	No hits
>FHNSR-18	CCCCGCGGGGCCCGTCCCGGC	26	mi
>FHNSR-19	GAGAGCCGTTTCGTCTTGAACG	22	No hits
>FHNSR-20	TGGTGCGGACCAGGGGAATCCGAC	24	No hits
>FHNSR-21	ATGGTATAACGTTAGAACACCTG	24	No hits
>FHNSR-22	CCGGGGCTACGCTGTCTGAGC	22	mi
>FHNSR-23	CGGGGCCGGTGGGGGGCGGGC	21	mi
>FHNSR-24	TCGGGGTCGGGGCACGCCGGCCTCGC	26	No hits
>FHNSR-25	CGGGCCCCGGGTGGAGCCGCCG	21	No hits
>FHNSR-26	GCTGGGGCGGAACGGGGC	18	No hits
>FHNSR-27	GTAGTCGTGGCCGAGTTGG	19	pi
>FHNSR-28	GGAGGAAATGCATGTCACAGCGGACTTTC	29	No hits
>FHNSR-29	GCAGCCGCGGTAATTCCAGC	20	No hits
>FHNSR-30	GGTGGCTCGGGGGGGCGGCGCGTCTCAGGGC	31	No hits
>FHNSR-31	TGTCCGGGGCTGCACGCGCGC	21	mi/pi
>FHNSR-32	AGACAGGCTCCAGACATGCAGTTAGCAAGC	30	No hits
>FHNSR-33	CGGGGGTACCACCAGGTTGCC	21	No hits
>FHNSR-34	CTGGCTGTTGCGGTTAAACCGGC	23	No hits
>FHNSR-35	GTACAGGGATACGTGAGCTGGGT	24	No hits
>FHNSR-36	CCCTGTGTCAGCACCGCGCCCC	23	No hits
>FHNSR-37	ACCAAGCGTCCGTCCCGCGC	21	No hits
>FHNSR-38	GTGGGGGGGCCCAAGTCCTTCTGATCGAGGGCCC	33	pi
>FHNSR-39	GCCGTGATCGTATAGTGTTAGTACTCTGC	31	pi
>FHNSR-40	CTAAGGGCTGGGTCGGTCGGG	22	mi
>FHNSR-41	GCGAAGGTGGCGGAATTGG	20	mi
>FHNSR-42	GTAGTCGTGGCCGAGTGG	18	mi/pi
>FHNSR-43	CGGGGGCGGCGGGCGTCC	18	No hits
>FHNSR-44	GACAGGGACGTGAGCTGG	18	No hits
>FHNSR-45	TCGGGGTCGGCGCGCGCGCGGGC	24	No hits
>FHNSR-46	CCGAAGGAGCCTCGGTTGGC	20	pi
>FHNSR-47	CCCGGAGAGCGTTCGATGAACGGNC	25	No hits
>FHNSR-48	CGGGGGGGCCGGCGGCGGCGG	21	mi/pi
>FHNSR-49	GCCAGNGTGGGGAGTTTACTGGGGCGGT	29	pi
>FHNSR-50	CGGGGCGCCGGGGTCCNAACCCCGGTGGGT	31	No hits

>FHNSR-51	CGGGGCCCGTGGNGTGCGGGTC	22	No hits
>FHNSR-52	GCGCATTGGNAGAAGCTCCTC	21	No hits
>FHNSR-53	CACGTCCCCTGGCGGAGCGC	20	No hits
>FHNSR-54	CGGGGACCCGTGGGGGCGGGGC	22	mi
>FHNSR-55	CGACTCTTAGCGGTGGATCACTCGGC	26	pi
>FHNSR-56	GGCGACGAGTGCCACACACAGAG	25	No hits
>FHNSR-57	TATAGTGGCTAGAACAAAGCGGC	22	No hits
>FHNSR-58	GCGCGGGTAAACGCGGGAGTAAC	23	No hits
>FHNSR-59	CGGGAGCGGCCGCGGGTGCG	20	No hits
>FHNSR-60	CGGTTAGCGCTTTCGGCTG	19	No hits
>FHNSR-61	CCGGGGCCGTGCGTCGTACG	20	No hits
>FHNSR-62	GCCGGCGGGAGCCCCGGGGA	20	mi
>FHNSR-63	ATCGTCCGACCTGGGTATAGGG	22	pi
>FHNSR-64	CGGGCGGGCGGTCCGCCGCGAG	23	mi
>FHNSR-65	GCGGCGTCCGGTGAGCTCTCGCTGC	25	pi
>FHNSR-66	CGGGCCCCGTGGGGGCGGGGC	21	mi
>FHNSR-67	GGCTCGTAGCGTTCTGAC	20	No hits
>FHNSR-68	CGGGGAGAGGCCAACACACTTCC	23	pi
>FHNSR-69	TGGAGCGGCGGCGGTCCGCCGAGGCGAT	30	No hits
>FHNSR-70	CTTCACAGTGGCTAAGTTCCGC	22	mi
>FHNSR-71	GGGGCGAAGTTACCATC	17	No hits
>FHNSR-72	CTCGGTAGTATAGTGGTTAGTATACCCGCC	31	mi/pi
>FHNSR-73	AAGGTTACTTGTTAGTTCAGG	22	mi
>FHNSR-74	GGTGACGGGGAATCAGGGTTCGATTC	26	pi
>FHNSR-75	GCGAAGGTGGCGGAATGG	18	No hits
>FHNSR-76	GGTCGCGGGTTCGTTCCCCG	20	Pi
>FHNSR-77	CAGGGGGAGTACGTTCGC	18	No hits
>FHNSR-78	GGCGGCGTGGTGAGCTCTCGCTGG	25	No hits
>FHNSR-79	GGANGGAATGCACTCGTCCACACGGCGGGACTTTC	35	Mi
>FHNSR-80	TAGCAGCACATAATGGTTTGTG	22	Mi
>FHNSR-80	CCGAATCCGGAGTGCCGGA	20	No hits
>FHNSR-82	GCCGGATAGCTCAGTCGGTAGAGCATCAG	29	Pi
>FHNSR-83	ACGGCGCGCGNGCGGGC	18	No hits
>FHNSR-84	TGCCAGGTGGGGAGTNATGACTGGGGCGG	29	No hits
>FHNSR-85	CGAGAATTAATGTGAATGCAGG	22	No hits
>FHNSR-86	TGGGGGGAACCTCCGCGTCGAGCTG	25	No hits
>FHNSR-87	CGTCCC GGCCCGTACGCCCC	22	No hits

APENDICE 2

Articulo

The miRNome of Fasciola hepatica juveniles endorses the existence of a reduced set of highly divergent micro RNAs in parasitic flatworms

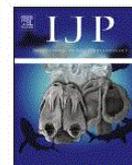
Santiago Fontenla, **Nicolas Dell'Oca**, Pablo Smircich, Jose F. Tort y Mar Siles-Lucas.

Publicado en Internatuonal Journal for Parasitology



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal for Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpara

The miRnome of *Fasciola hepatica* juveniles endorses the existence of a reduced set of highly divergent micro RNAs in parasitic flatworms [☆]

Santiago Fontenla ^a, Nicolás Dell'Oca ^a, Pablo Smircich ^{a,b}, José F. Tort ^{a,*}, Mar Siles-Lucas ^c^a Departamento de Genética, Facultad de Medicina, Universidad de la República (UdelaR), Montevideo, Uruguay^b Laboratorio de Interacciones Moleculares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República (UdelaR), Montevideo, Uruguay^c Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Salamanca, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 May 2015

Received in revised form 27 June 2015

Accepted 30 June 2015

Available online xxxx

Keywords:

Fasciola hepatica

Newly excysted juveniles

miRNAs

tRNA halves

ABSTRACT

The liver fluke *Fasciola hepatica* is a foodborne zoonotic parasite affecting livestock worldwide, with increasing relevance in human health. The first developmental stage that the host meets after ingestion of the parasite is the newly excysted juvenile, that actively transverse the gut wall and migrates to its final location in the liver. The regulation of the early developmental events in newly excysted juveniles is still poorly understood and a relevant target for control strategies. Here we investigated the putative involvement of small regulatory RNAs in the invasion process. The small RNA population of the newly excysted juvenile fall into two classes, one represented by micro (mi)RNAs and a secondary group of larger (32–33 nucleotides) tRNA-derived sequences. We identified 40 different miRNAs, most of those belonging to ancient miRNAs conserved in protostomes and metazoans, notably with a highly predominant miR-125b variant. Remarkably, several protostomian and metazoan conserved families were not detected in consonance with previous reports of drastic miRnome reduction in parasitic flatworms. Additionally, a set of five novel miRNAs was identified, probably associated with specific gene regulation expression needs in *F. hepatica*. While sequence conservation in mature miRNA is high across the metazoan tree, we observed that flatworm miRNAs are more divergent, suggesting that mutation rates in parasitic flatworms could be high. Finally, the distinctive presence of tRNA-derived sequences, mostly 5' tRNA halves of selected tRNAs in the small RNA population of newly excysted juveniles, raises the possibility that both miRNA and tRNA fragments participate in the regulation of gene expression in this parasite.

© 2015 Australian Society for Parasitology Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Fasciolosis is one of the most widespread helminthic diseases of livestock, caused by the liver flukes *Fasciola hepatica* in temperate areas and *Fasciola gigantica* in tropical regions of Africa, the Middle East and south eastern Asia. Economic losses related to this infection are estimated in billions of US \$, mainly due to reduction in meat, wool and milk output by infected animals, with additional costs derived from liver condemnation and use of flukicide drugs (Mas-Coma et al., 2005; Charlier et al., 2014). In addition to its impact on production, fasciolosis is becoming a major concern in human health. The World Health Organization has estimated that

at least 2.4 million people are infected in more than 70 countries worldwide (http://www.who.int/foodborne_trematode_infections/fascioliasis/en/). While treatment with anthelmintic drugs is effective, it does not usually prevent re-infection and growing reports of resistance are emerging in several countries (Brennan et al., 2007). Novel drugs and/or strategies for controlling this infection are urgently needed. Understanding the molecular mechanisms behind the early invasion process might provide clues for novel control strategies.

Fasciola hepatica infection in livestock or humans occurs when water plants (e.g., watercress) contaminated with the resistant stage of the parasite (metacercariae) are ingested. Gastric and duodenal contents promote larval excystation, and the newly excysted juveniles (NEJs) actively migrate through the intestinal wall, the peritoneal cavity and the liver parenchyma into the biliary ducts in the liver where they reach maturity (Keiser and Utzinger, 2009). Clinically, parasite invasion is characterised by marked eosinophilia, abdominal pain and fever. Intermittent obstruction

[☆] Note: New sequence data reported in this paper are available in the GEO database under accession number [GSE66490](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE66490).

* Corresponding author at: Departamento de Genética, Facultad de Medicina, Universidad de la República (UdelaR), Gral. Flores 2125, CP 11800 Montevideo, Uruguay. Tel.: +598 2924 9562.

E-mail address: jtort@fmed.edu.uy (J.F. Tort).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.06.007>

0020-7519/© 2015 Australian Society for Parasitology Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Please cite this article in press as: Fontenla, S., et al. The miRnome of *Fasciola hepatica* juveniles endorses the existence of a reduced set of highly divergent micro RNAs in parasitic flatworms. Int. J. Parasitol. (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.06.007>

of bile ducts after worm entry causes symptoms that resemble biliary colic and cholecystitis (Garcia et al., 2007). Chronic infection has been associated with hepatic fibrosis and cirrhosis (Marcos et al., 2008). During the invasion process the invasive NEJs are confronted with different environments in their passage from the intestine to the liver. It has been demonstrated that changes in gene expression underlie the early stages of invasion (Cancela et al., 2008, 2010) but little is known of how these processes are regulated.

MicroRNAs (miRNAs) have recently emerged as relevant regulators of metazoan gene expression, being involved in many different biological processes, and play a key role in developmental timing (Berezikov, 2011). These small regulatory single-stranded RNAs are widely conserved through metazoan evolution and once acquired they are rarely lost in descendent branches (Sempere et al., 2007; Wheeler et al., 2009; Tarver et al., 2013). They are transcribed as hairpin precursors that are cleaved by the nuclear ribonuclease III Drosha. The resulting double-stranded (ds) pre-miRNAs are exported to the cytoplasm by exportin 5, where they are further processed by the ribonuclease III Dicer, producing a 21–23 nucleotide (nt) dsRNA. One of the strands of this duplex is the mature miRNA that is loaded into the miRNA Induced Silencing Complex (miRISC). By pairing to complementary sequences most commonly located in the 3' untranslated region (3'-UTR) of diverse target mRNAs, different miRNAs can trigger mRNA degradation and/or blocking of translation (Bartel, 2009). In addition, miRNAs can silence gene expression by sequestering mRNAs and by chromatin remodelling of target genes (Grishok, 2005; Eulalio et al., 2008; Jamalkandi and Masoudi-Nejad, 2009; Fischer, 2010). miRNAs* corresponding to the complementary strand of mature miRNAs, and first thought to be degraded after separation of mature miRNAs, may also have a regulatory function in gene expression (Ghildiyal et al., 2010).

Regulation of gene expression by miRNAs has been extensively demonstrated in all metazoans, including several reports in flatworms (Manzano-Román and Siles-Lucas, 2012). Early studies detected miRNAs in free living planarians (Palakodeti et al., 2006; Friedländer et al., 2009; Lu et al., 2009), and were promptly followed by studies in schistosomes (reviewed in Zhu et al., 2014), cestodes (Cucher et al., 2011; Ai et al., 2012; Bai et al., 2014) and a monogenean species (Fromm et al., 2013). Within trematodes other than schistosomes, miRNAs has only been reported in *Clonorchis sinensis* (Xu et al., 2010) and the *Fasciola* spp. *F. hepatica* and *F. gigantica* (Xu et al., 2012). This later study describes a few miRNA from the adult liver stage of both species. To gain further insight into the putative role of small regulatory RNAs in the invasion process in *F. hepatica*, we investigated the expression profile of miRNAs in the NEJ stage of the parasite, comparing it with what has been described in other flatworms, both free living and parasitic. We describe the presence of several conserved miRNA families and we discover some novel miRNAs that might be liver fluke-specific. In addition, we describe flatworm miRNA sequences less conserved in comparison with other metazoans, and discuss the relevance of these findings in view of their parasitic lifestyle.

2. Materials and methods

2.1. In vitro excystation of metacercariae

Fasciola hepatica metacercariae (field strain Shrewsbury) were purchased from Ridgeway Research Ltd. (UK). Five thousand metacercariae were excysted in vitro as described previously (Hernández-González et al., 2010). Briefly, pure CO₂ was bubbled for 30 s in 10 ml of cold distilled water. Sodium dithionite to a final concentration of 0.02 M was added to the water, and the tube

was closed and incubated at 37 °C until a fine cloudy precipitate was produced. Metacercariae were then added to the tube and further incubated at 37 °C for 1 h. After incubation, parasites were washed twice by sedimentation with warm distilled water, and 5 ml of Hank's balanced salt solution (Sigma, USA) plus 10% (v/v) rabbit bile and 30 mM HEPES (Sigma) pH 7.4 was added to the dry metacercariae. Parasites were then incubated for 5 h at 37 °C. Emerging active parasites were collected with a 20 µl pipette, washed twice with sterile PBS, and stored dry at –80 °C until use.

2.2. Small RNA isolation and sequencing

Samples were homogenised using the TissuLyser II (QIAGEN, USA) and the RNA extraction was performed with the RNeasy Mini Kit (QIAGEN, USA) following the manufacturer's instructions. The amount and integrity of total RNA was determined using a 2100 BioAnalyzer (Agilent, USA). Three micrograms of total RNA were size-fractionated on a 15% TBE urea polyacrylamide gel and a 15–30 bp fraction was excised. The RNA was retrotranscribed into single-stranded cDNA using the Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, USA) and the Illumina small RNA RT-Primer following the manufacturers' instructions. The cDNA was PCR amplified for 15 cycles using an Illumina small RNA primer set. The PCR products were quantified and subjected to single end Illumina sequencing for 75 cycles. Raw sequencing reads, as well as processed data, were deposited in the GEO database (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) under accession number **GSE66490** and submitted to miRBase (www.mirbase.org/).

2.3. Data processing and filtering

After masking of adaptor sequences and removal of reads smaller than 18 nt, the clean reads were subjected to quality analysis with Fastx Tools (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/). Reads where 90% of the bases had a Phred score higher than 20 were conserved. Redundant reads were merged and counted. High quality reads were screened against transcriptomic (mRNA) data of platyhelminths available at GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/), SchistoDB (schistodb.net/schisto/) (Zerlotini et al., 2013) and HelmDB (gasser-research.vet.unimelb.edu.au/helmdb/) (Mangiola et al., 2013), discarding all reads matching over 85%. Data were further screened with the same stringent criteria (mismatches ≤ 3) against other non-coding RNA databases such as Rfam (rfam.xfam.org/) (Burge et al., 2013) and tRNADB (www.ncrna.org/frnadb/) (Mituyama et al., 2009) (both excluding miRNA) and those reported in *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum* (Copeland et al., 2009) to identify and remove non-coding (nc) RNAs, rRNA, tRNA, small nuclear (sn)RNA, small nucleolar (sno) RNA and other ncRNAs.

2.4. Data analysis and miRNA classification

The processed read dataset was used to perform homology searches against the Sanger miRBase release 20 (www.mirbase.org/) (Kozomara and Griffiths-Jones, 2014), the miRNA sections of Rfam (Burge et al., 2013), and miRNAs present in the functional RNA database (www.ncrna.org/frnadb/) (Mituyama et al., 2009). Furthermore, processed reads were compared with a local database generated with putative flatworm miRNAs reported in the literature that were not integrated in miRBase, Rfam or tRNADB. This database included sequences from the *S. japonicum* miRNA database (http://omics.biosino.org:14000/kweb/sj_miRNA/) and those published in *S. japonicum* (Huang et al., 2009), *S. mansoni* (Simões et al., 2011), *C. sinensis* (Xu et al., 2010), *F. hepatica* and *F. gigantica* (Xu et al., 2012), and the monogenean *Gyrodactylus salaris*

Please cite this article in press as: Fontenla, S., et al. The miRNome of *Fasciola hepatica* juveniles endorses the existence of a reduced set of highly divergent micro RNAs in parasitic flatworms. Int. J. Parasitol. (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.06.007>

(Fromm et al., 2013). Reads showing high similarity (>85%) to known miRNAs of other organisms (mismatches ≤ 3) were classified into the same miRNA family. All miRNAs showing the same annotation and slight differences in length or sequence were inspected and their read counts added if they had less than three mismatches. At this stage all miRNA candidates with less than 10 reads or lengths below 20 or over 23 nts were discarded. The searches were performed using miRExpress (mirexpress.mbc.ntu.edu.tw/) (Wang et al., 2009) and the miRNA module of CLC Genomics Workbench v6.5 (CLC Inc, Aarhus, Denmark) with similar outputs from both procedures. Consequently the remaining analyses were performed with the dataset generated by CLC Genomics Workbench. Read counts were normalised and expressed as reads per million.

2.5. Phylogenetic distribution and conservation of miRNA families found in *F. hepatica* NEJs

The phylogenetic distribution of the miRNA candidates was assessed based on the family classifications made by Wheeler et al. (2009) and Tarver et al. (2013), and further confirmed by comparing the NEJ putative miRNAs with entries with similar annotations in miRBase (Kozomara and Griffiths-Jones, 2014) and/or mirOrtho (cegg.unige.ch/mirortho) (Gerlach et al., 2009). The absence and presence of members of the different families in deuterostomes, ecdysozoans, lophotrochozoans and platyhelminths were registered. Sequences of different precursors and mature miRNAs from selected species covering the metazoan diversity (see list below) were downloaded from miRBase and aligned with the corresponding miRNAs from flatworms using the multiple aligner MAFFT (Katoh and Standley, 2013). Alignments were visualised within CLC Genomics Workbench, generating the corresponding consensus logos. Conservation was quantified by counting substitutions using the most parsimonious interpretation following the procedure described by Wheeler et al. (2009). Briefly, if a substitution is shared by closely related species or sister taxa (i.e. shared in cestodes) it was counted as a single change; if more than two different residues were present in a position within a taxa they were counted as separate individual changes. Changes by position were averaged for deuterostomes, ecdysozoans and platyhelminths.

Species considered for alignments were: Deuterostomia (human, cattle, mouse, chicken, clawed frog, zebrafish, lancelet (cephalochordate), Ciona (urochordate) and sea urchin (echinodermata)); Ecdysozoa (Arthropoda: (fruit fly, mosquito, bee, silkworm, beetle), nematodes: *Caenorhabditis elegans* (free living roundworm), *Pristionchus pacificus* (free living roundworm), *Haemonchus contortus* (barber's pole worm, parasite) and *Brugia malayi* (lymphatic filariae, parasite)), Lophotrochozoa (*Capitella teleta* (annelid worm) and *Lottia gigantea* (owl limpet, mollusk)); Platyhelminthes (*Schmidtea mediterranea*, (free living planaria), *G. salaris* (monogenean fish ectoparasite), Trematoda: *S. mansoni*, *S. japonicum* (blood flukes), *C. sinensis* (bile duct fluke), *F. hepatica* (liver fluke), Cestoda: *Echinococcus granulosus* (hydatid cyst tapeworm) and *Echinococcus multilocularis* (alveolar cyst tapeworm)).

2.6. Identification of novel miRNAs

After requesting permission, *F. hepatica* genomic sequencing reads generated by the Wellcome Trust Sanger Center (England) and deposited at the European Bioinformatics Institute repository (ftp.sra.ebi.ac.uk/vol1/fastq/ERR065/ERR065038/) were downloaded. The crude pair end reads were preprocessed by trimming and quality filtering, and assembled de novo with CLC Genomic Workbench. In order to identify novel *F. hepatica*-specific miRNAs, sequences that produced no matches in the previous analysis and

with lengths between 20 and 23 nts were mapped with miRDeep2 (Friedländer et al., 2012) on this genomic assembly. Putative predicted miRNAs were considered novel if they had a miRDeep2 score equal to or higher than 10. The resulting predictions were then manually checked for possible false positives. The same approach was followed to confirm those miRNA candidates found by homology, using a less stringent miRDeep2 score cut-off of 1, since only confirmation was required. Resulting predictions were manually inspected in order to discard false positives. Furthermore, since two different assemblies of the *F. hepatica* genome were recently released (PRIEB6687 (Cwiklinski et al., 2015), PRINA179522 (Martin et al., 2015)) all the identified miRNAs were mapped to these assemblies in order to confirm their presence and location.

2.7. Identification of tRNA-derived sequences

The primary analysis of the 25–35 nt long reads showed homology to tRNA sequences. In order to confirm this, we mapped the 25–35 nt fraction to the partial genome assembly of *F. hepatica*. Reads that mapped to the genome were searched, using BLAST, against tRNAs predicted with tRNAscan-SE (Lowe and Eddy, 1997) with a cutoff of E^{-10} . A total of 99,014 reads matched tRNAs. The tRNA-derived sequences were mapped to the structures available in the tRNAscan-SE to determine their origin.

3. Results and discussion

3.1. Small RNAs identified in the juvenile liver fluke have two length classes corresponding to miRNA and tRNA halves

In order to initiate the characterisation of the miRNAs in the invasive juvenile stage of *F. hepatica*, we obtained and sequenced the small RNA population from in vitro NEJs. From an initial set of nearly 10 million raw reads, more than 8.6 million remained after adapter clipping and quality trimming, indicating the good quality of the dataset generated. These reads were collapsed into more than 2 million different unique sequences, with diverse levels of redundancy. The length distribution of this collection of high quality sequences show a prominent peak at 21 nts, compatible with miRNAs and a secondary peak at 32–33 nts (Supplementary Fig. S1). Since there was no public genome assembly for *F. hepatica* to map these sequences when we initiated this study, our analysis pipeline was based on homology searches to public databases. More than a quarter of the sequences (569,978) were discarded after comparison with all the available flatworm transcriptomes, since those might have originated from partial mRNA transcripts. Another set of sequences were also discarded due to their homology to other functional ncRNAs such as rRNA, tRNA, snRNA, snoRNA, and other ncRNAs (see Section 2.3). The remaining set consisted of 1,326,249 putative small RNAs representing more than 3 million reads, approximately 30% of the initial dataset (Fig. 1).

In order to classify this collection of small RNAs, we compared them with miRBase and other putative miRNAs from flatworms described in the literature but not included in miRBase (see Section 2.4 for details). We identified representatives of 40 miRNAs, most of those belonging to conserved families, as well as a few putative miRNAs only described to date in flatworms (Table 1). All the conserved miRNA families previously reported in the adult stage of *F. hepatica* (fhe-mir-10, fhe-let-7, fhe-mir-71, fhe-mir-124 -reported before as sja miR-12-, fhe-mir-2 and fhe-bantam) (Xu et al., 2012) were detected, being expressed at very high levels in the juvenile stage. Furthermore, we extended the miRnome of *F. hepatica* by identifying representatives of 19 additional conserved families of miRNAs. None of the novel sequences reported in adults

Please cite this article in press as: Fontenla, S., et al. The miRnome of *Fasciola hepatica* juveniles endorses the existence of a reduced set of highly divergent micro RNAs in parasitic flatworms. Int. J. Parasitol. (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.06.007>

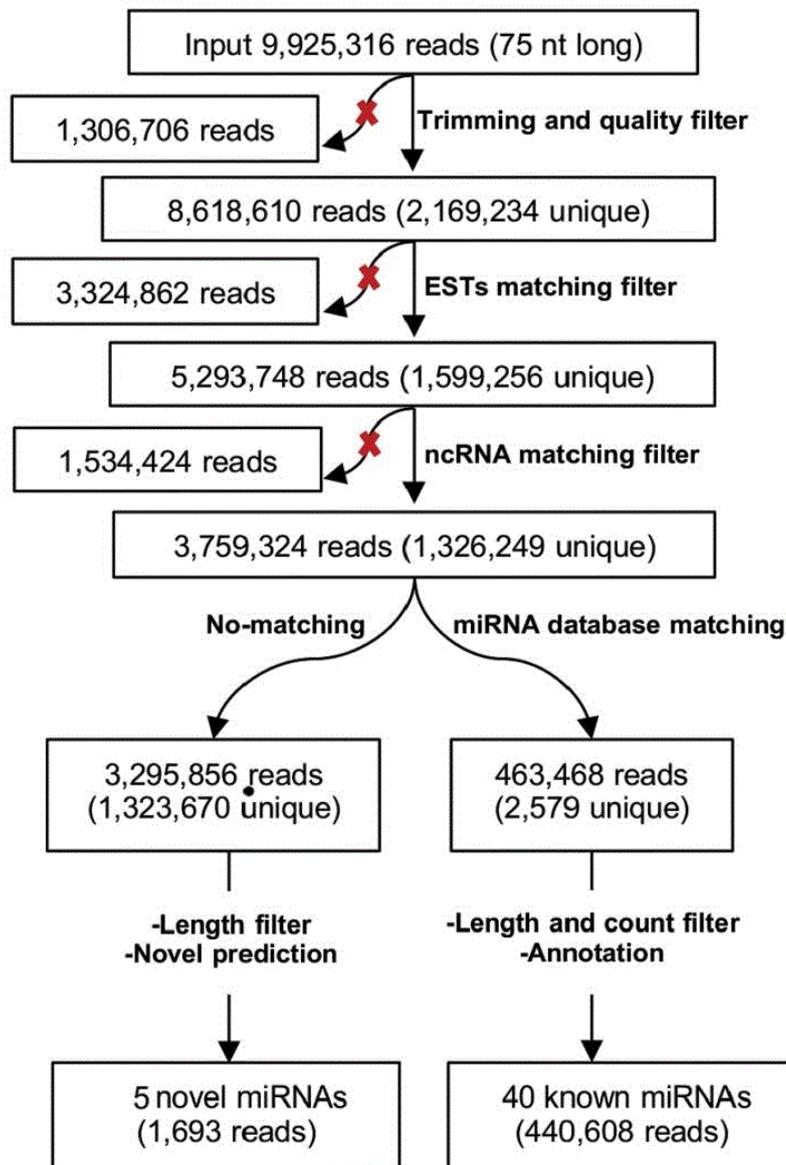


Fig. 1. Data processing pipeline of small RNA sequencing reads from *Fasciola hepatica* newly excysted juveniles. Schematic representation of the data processing pipeline followed; crude reads (in nucleotides) were first trimmed and quality filtered, then filtered against expressed sequence tags (ESTs) and non-coding (nc)RNA (rRNA, tRNA, small nuclear (sn)RNA, small nucleolar (sno)RNA). Filtered reads were screened for homology against micro (mi)RNA databases (mirBASE, Rfam and tRNADB) and a local database of published miRNAs from flatworms. Conserved miRNAs were annotated by homology to miRBase and miROrtho, while novel miRNAs were predicted with miRDeep2 from the remaining reads based on an in house assembly of the publically available *Fasciola hepatica* genomic data.

(Xu et al., 2012) was detected here, with the exception of three sequences (Fgi-miR-novel-10, Fgi-miR-novel-15 and Fhe-miR-novel-7) that actually correspond to repetitive sequences rather than bona fide miRNAs.

Despite the substantial skew of miRBase to vertebrate sequences, most of the *F. hepatica* miRNA sequences find their best matches within miRNA sequences from other helminths. The length distribution of the identified miRNAs coincides with the 21 nt peak observed in the crude high quality reads, indicating that miRNAs are the prominent class of small RNAs found in the com-

mon liver fluke. We also analysed the secondary peak centred at 32 nts, finding that it corresponds mainly to tRNA-derived sequences, mostly tRNA halves (see Section 3.5). However, the vast majority of the dataset remained unannotated with positive hits representing less than 1% of the total small RNAs (2,579 miRNAs) and 12% of the reads (463,468).

In order to identify putative novel miRNAs within this non-matching group of reads, we decided to compare them with partial genomic sequences available at the moment. An in-house generated assembly of the available (but partial) *F. hepatica* genome

Table 1
Conserved micro (mi)RNAs identified in newly excysted juveniles of *Fasciola hepatica*.

miRNome		Small RNA sequence
bantam-3p	^a	UGAGAUCGCGAUUAAAGCUG
let-7c-5p		AGAGGUAGUGACUCAUAGACU
let-7-5p		UGAGGUAGUAGGUUUAUAGU
miR-1-3p	^a	UGGAAUGUGGCGAAGUAUGGU
miR-2a-3p		UCACAGCCAGAAUUGAUGAACG
miR-2b-3p	^a	UAUCACAGCCUUGCUUGGGACA
miR-2c-3p		UAUCACAGCCGUGCUUAAAGGCGU
miR-2d-3p		UAUCACAGUCCUGCUUAGGUG
miR-2e-3p	^a	UAUCACAGUCCAGCUUUGG
miR-2e-5p		UACCACAUAGACUGCGUUAU
miR-2f-3p		UCACAGCCAAUUAUUGAUCCCA
miR-7-5p		UGGAAAGACUGGUAUUGUUGU
miR-8-3p		UAAUACUGUUGGUAAGAUCC
miR-9-5p		UCUUUGGUUAUCAAGCAGUAUG
miR-10-5p	^a	AACCCUGUAGACCCGAGUUUGCA
miR-10-3p		AAAUUUGGAGUUCUACAAGGAAC
miR-31-5p		UGGCAAGAUUAUGGCGAAGCUG
miR-36a-3p		UCACCCGGUAGACAUUCAUUCAC
miR-36b-3p		CCACCCGGUAGACAUUCAUUCAC
miR-46/281-3p		UGUCAUGGAGUUGCUCUACA
miR-61-3p		UGACUAGAAGUGCACUCACUUC
miR-61-5p		UGUGAGUCUCUUUUCUUGCCAUG
miR-71a-5p	^a	UGAAAGACCAUGGUAGUGAGAUG
miR-71b-5p	^a	UGAAAGACUUGAGUAGUGAG
miR-87-3p		GUGAGCAAAGUUUCAGGUGUGA
miR-96-5p		CUUGGCACUUUGGAAUUGUCA
miR-124-3p	^a	UAAGGCACCGGUGAAUUGCA
miR-125a-5p		UCCUGAGACCCUAGAGUUUC
miR-125b-5p		CCCCUGAGACUGAUAAUUGCUC
miR-190-5p		AGAUUUGUUUGGUAUUCUUGGUG
miR-190-3p		CCAGUGACCAACAUUUUUCUC
miR-219-5p		UGAUUUGUCCAUUCGAAUUCUUG
miR-277-3p		UAAAUGCAUUUUCUGGCCCG
miR-307/67-3p		UCACAACCUACUUGAUUGAGGGG
miR-745b-3p		AAAGCUGCCAAGCGAAGGGC
miR-745-3p		UGCUGCCUUAUAAAGACUGUG
miR-750-3p		CCAGAUCUGACUCUUCACGUCU
miR-2162-3p		UAUUUUGCAACAUUUCACUCU
miR-3479-3p		UAUUUGCACUUUCUUCGCCUUA
miR-3487-5p		UCCCCGUAUUCGAACUGUUGU

^a miRNAs already found in adult *F. hepatica* (Xu et al., 2012).

sequences obtained from the Sanger Center was used to identify putative novel miRNAs using the miRNA prediction programme miRDeep2. The analysis produced five novel precursor sequences with good confidence statistics and appropriate hairpin structures (Fig. 2, Table 2 and Supplementary Fig. S2). These novel *F. hepatica*-specific miRNA sequences were used to interrogate the available genomes of *S. japonicum*, *Opisthorchis viverrini* and *C. sinensis* in order to explore whether they represent conserved trematode novelties, but were not detected in any of them. Consequently they might be specific, modulating, relevant pathways associated with the life cycle and developmental stages of the liver fluke.

Besides these putative novel miRNAs, we confirmed all those predicted by homology by mapping them to our in-house assembly with miRDeep2. Very recently, two draft assemblies of the *F. hepatica* genome were made available (Cwiklinski et al., 2015; Martin et al., 2015), providing an essential tool to further investigate the miRnome of this species. Since these novel assemblies are based on different datasets than the one we used, we confirmed all the miRNAs identified by mapping them to these reference genomes. The supporting evidence is summarised in Supplementary Table S1.

3.2. Ancient metazoan and protostome conserved miRNAs are the most abundant in juvenile liver flukes

The diverse miRNAs found in *F. hepatica* juveniles are quantitatively expressed at very different levels. Few conserved

sequences are strongly predominant in the sample, while a wide dynamic range of miRNAs that varies from single to hundreds of thousands of reads can be detected. Only one miRNA, miR-125b, accounts for more than three quarters of the total reads identified in *F. hepatica* juveniles, and just five miRNAs represent 90% of the total reads (Fig. 3). Similarly skewed expression levels have been observed in *S. japonicum* (Cai et al., 2011, 2013). Unfortunately, the adult *F. hepatica* dataset is very scant, and no comparable quantitative data is available (Xu et al., 2012), so it was not possible to check whether expression levels change from juvenile to adult stages.

The most abundantly expressed miRNA is miR-125b, one of the oldest known miRNAs well conserved in all metazoans (Sokol, 2012). MiR-125 has been related to very diverse functions, and it is highly studied in humans due to its association with both tumour promoting and tumour suppression phenotypes. Several mRNA targets for miR-125 have been identified including transcription factors, apoptotic pathway genes and genes associated with host defense, especially in response to bacterial or viral infections (Sun et al., 2013). In several metazoans, miR-125 is part of a genomic cluster that also includes the precursors for miR-100 and let-7. Interestingly, let-7 and miR-125 are clustered in *S. mansoni* and in the planarian *S. mediterranea* (Hertel et al., 2012), but they are separated in the genomes of the cestodes, while miR-100 is absent from all flatworms analysed to date (Jin et al., 2013). Let-7 is the third most highly expressed miRNA in NEJs, if we consider a novel variant of let-7 (let-7c) which is poorly conserved out of the seed region (Table 1). This variant is identical to a putative miRNA described as novel in *S. japonicum* (Sja-novel-137), that was also among those miRNAs highly expressed in adults and schistosomules (Hao et al., 2010) and has homology to the planarian sme-let-7c and sme-let-7d. The canonical let-7 was also found here but expressed at very low levels. It is noteworthy that another putative miRNA described as novel in *S. japonicum*, Sja novel-148 (Hao et al., 2010), corresponds to miR-125b. Despite the clustered organisation of let-7 and miR-125 in planarians and schistosomes, our mapping of data to all available genome assemblies suggests that they are separated in *F. hepatica* as in cestodes (see Supplementary Table S1).

One of the most ancient miRNAs that emerged in the protostome lineage, bantam, is also thoroughly represented in NEJs. In insects, bantam has been implicated in the regulation of cell proliferation and apoptosis (Brennecke et al., 2003) and more recently it has been demonstrated to have a role in systemic growth by regulating ecdysone production (Boulan et al., 2013). Interestingly, bantam expression was differentially upregulated in *S. mansoni* females from paired infections when compared with female only infections, suggesting that it plays a role in the pairing-dependent female sexual maturation (Sun et al., 2014). Contrasting roles in this process might be played by miR-1 and miR-71 which were upregulated in unpaired females (Sun et al., 2014). Both miRNAs were detected in the NEJs of *F. hepatica*, but only miR-71 is highly expressed.

MiR-71 is found only in protostomes and resides in a cluster with members of the unrelated miR-2 family. This cluster has been duplicated in the genome of schistosomes (De Souza Gomes et al., 2011), and four additional copies exist in planarians, but a single cluster is found in the genomes of cestodes (Jin et al., 2013). The reason for the expansion of the cluster in specific flatworm lineages remains unknown. We found all the described members of the miR-2 families and two isoforms of miR-71. To further investigate the genomic organisation of the loci responsible for the expression of these miRNAs, we mapped these reads to our partial genome assembly and found two clusters as in other trematodes (Fig. 4). This arrangement was also confirmed by mapping to the novel genome assemblies.

Please cite this article in press as: Fontenla, S., et al. The miRnome of *Fasciola hepatica* juveniles endorses the existence of a reduced set of highly divergent micro RNAs in parasitic flatworms. Int. J. Parasitol. (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.06.007>

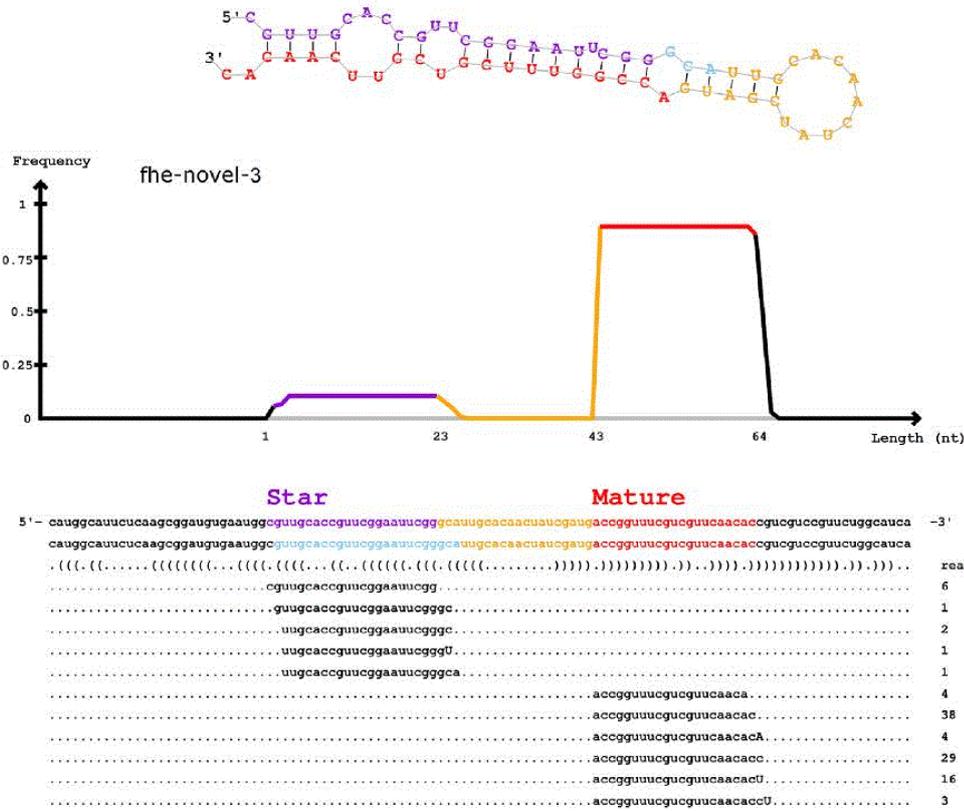


Fig. 2. Novel *Fasciola hepatica* micro (mi)RNA predictions. Hairpin structure and mapping of one of the novel miRNAs (fhe-novel-3) to a locally generated assembly of the publically available liver fluke genomic data; counts and mismatches for each read are indicated. Images corresponding to all predicted novel miRNAs can be found in Supplementary Fig. S2.

Table 2
Annotation of novel micro RNAs of *Fasciola hepatica* predicted with miRDeep2.

Provisional ID	Mature sequence	Strand	Count	Star sequence	Strand	Count	Genome PRJNA179522 ^a	Genome PRJEB6687 ^a
fhe-novel-1	CAUUUAUAAGAUUGAGGCUCU	3p	278	CGCCUGAAUCUUUAUAAAG	5p	1	Cont1047:150722..150789:-	scaffold651:176763..176696:-
fhe-novel-2	GUAAGACGAUCGUAGUUGACG	3p	134	UGACUGCUAUUCGUAGGGCUGU	5p	41	Cont1698:19871..19950:+	scaffold422:255752..255674:-
fhe-novel-3	ACCGGUUUCGUUGCAACAC	3p	94	CGUUGCACCGUUCGGAUUCGG	5p	11	Cont3792:23865..23927:+	scaffold1311:338595..338657:+
fhe-novel-4	UUCGGCAGCUUAGUACAGCU	3p	52	UACCCAGUUGAGGAAGUCGCG	5p	1	Cont5373:19137:19207:+	scaffold3850:1867..1934:+
fhe-novel-5	UAGAGUACCGUAGAUUUG	3p	51	UAAGAUCUACAUAUCUGAAC	5p	2	Cont7415:7171..7255:-	Scaffold7417:3262..3346:-

^a Position in genome.

Little is known of the function of mir-71, but interestingly it has been found highly expressed in schistosomules and adults of *S. japonicum* (Hao et al., 2010), and in the cestodes *Taenia saginata* (Ai et al., 2012) and *E. granulosus* (Bai et al., 2014). In the nematode *C. elegans*, miR-71 has been involved in stress responses (Zhang et al., 2011) and mediating the effects of germ cell loss on life span (Boulias and Horvitz, 2012). Interestingly, it has been shown that mir-71b expression is down-regulated in planarians upon exposure to irradiation, suggesting a role in maintenance of neoblast function (Lu et al., 2009). Whether this association stands in parasitic flatworms deserves a more detailed study.

The miR-2 family members are also expressed at relatively high levels in *F. hepatica* NEJs. The different miR-2 isoforms usually share the first 10 nucleotides of the functional 3' arm and conse-

quently they might share the same targets. In *Drosophila melanogaster*, three apoptotic genes relevant in neural development were identified as targets, and target predictions in *C. elegans* also suggest a role in neural development (Marco et al., 2012). In contrast to the high conservation within protostomes, in flatworms miR-2 family members showed seed shifts and sequence changes (see Section 3.4).

Other miRNAs found only in protostomes and unfortunately poorly characterised (miR-277, miR-750), were also detected as relatively highly expressed in NEJs. A study of target detection in insects identified several enzymes of the aliphatic amino acid catabolism as putative targets of miR-277, probably acting on starvation or stress conditions (Stark et al., 2003). Most of these enzymes detected as targets in insects are missing in the genomes of the

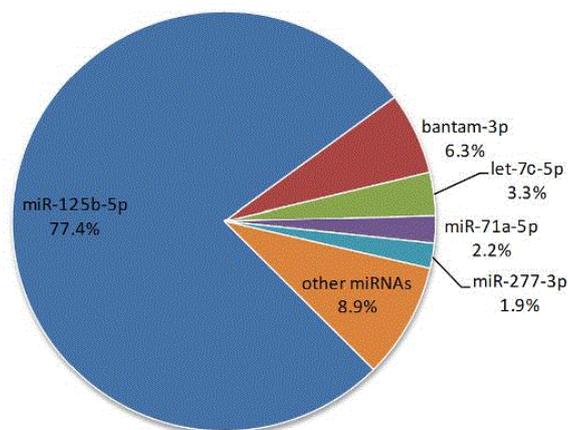


Fig. 3. Skewed expression of conserved micro (mi)RNAs in *Fasciola hepatica* newly excysted juveniles. Relative abundance of known miRNAs in juvenile liver flukes (represented as a percentage of the total conserved miRNA reads), indicate that only five miRNAs represent more than 90% of the miRNAs detected.

schistosomes (*Schistosoma japonicum* Genome Sequencing and Functional Analysis Consortium, 2009) suggesting that miR-277 might play a different role in flatworms.

3.3. The *F. hepatica* miRnome confirms flatworm-specific miRNA family losses

Animal evolutionary history shows that after a miRNA emerges in a particular lineage, it is rarely lost in the descendant lineages (Sempere et al., 2007). miRNA acquisition has been related to morphological complexity, exemplified by the gain of 128 miRNAs and

no family losses in primates (Berezikov, 2011). Given their strong conservation, it was suggested that miRNAs are under intense negative selection and consequently considered to be relevant phylogenetic markers (Wheeler et al., 2009; Tarver et al., 2013). According to their position within lophotrochozoans, flatworms are expected to share at least 46 miRNA families (Tarver et al., 2013), but recent studies have described that several miRNA families are missing, especially in the parasitic lineages (Fromm et al., 2013). In agreement with this study, our extended dataset of the *F. hepatica* miRnome shows that only half of the families expected for a lophotrochozoan are present (23 families). Very recently a similar reduction has been confirmed in cestodes (Bai et al., 2014).

To further characterise the possible diminution of the flatworm miRnome, we compared the available miRNA complements of selected species representing the three major metazoan lineages (deuterostomes, ecdysozoans and lophotrochozoans) with those found in platyhelminthes. Consistent with previously published data, we found that eight families expressed in all bilateral metazoans are missing in all flatworms (Fig. 5). The simplification of the miRnome is even more extensive in the parasitic neodermatans, since seven additional ancient miRNAs are absent, while those are still present in free-living planarians. Further reductions were found in cestodes and trematodes that share the absence of miR-278, miR-184, miR-76, miR-1175 and miR-2001. Besides these reductions, we found evidence of the presence in *F. hepatica* of miR-96, miR-281, miR-745 (member of the miR-22 seed family) originally reported as missing in trematodes (Fromm et al., 2013) and miR-750 previously reported only in planarians (Lu et al., 2009). In addition, miR-3487 originally reported as exclusive to schistosomes was also detected in *F. hepatica* and might represent an innovation which has emerged in trematodes. Mir-3479, also originally described in schistosomes and detected in *F. hepatica*, was recently reported in *E. granulosus* (Bai et al., 2014). From what is known, this is the first miRNA family exclusively shared between trematodes and cestodes. Further innovations are represented by

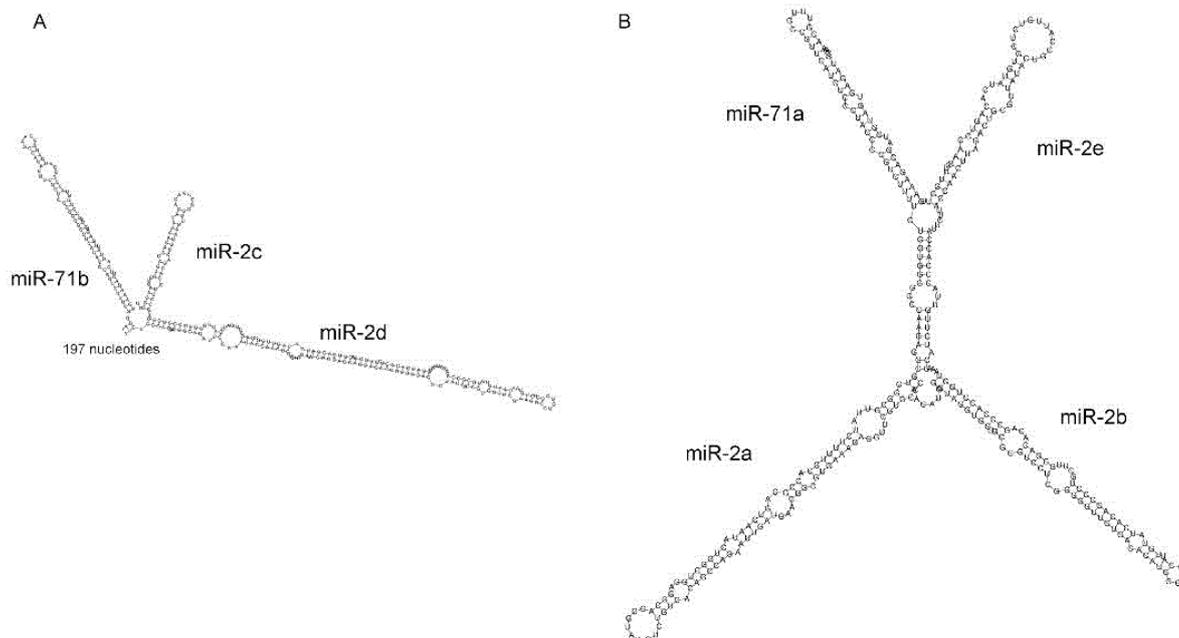


Fig. 4. Cluster structure of miR-71 and miR-2 in *Fasciola hepatica*. miR-71 and miR-2 family members were mapped to the genome assembly. Secondary structure prediction of the region was performed with RNAfold in the Vienna package (www.tbi.univie.ac.at/RNA/RNAfold.html). The two identified clusters containing (A) miR-71b, miR-2c and miR-2d and (B) miR-71a, miR-2a, miR-2b and miR-2e are depicted.

Please cite this article in press as: Fontenla, S., et al. The miRnome of *Fasciola hepatica* juveniles endorses the existence of a reduced set of highly divergent micro RNAs in parasitic flatworms. Int. J. Parasitol. (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.06.007>

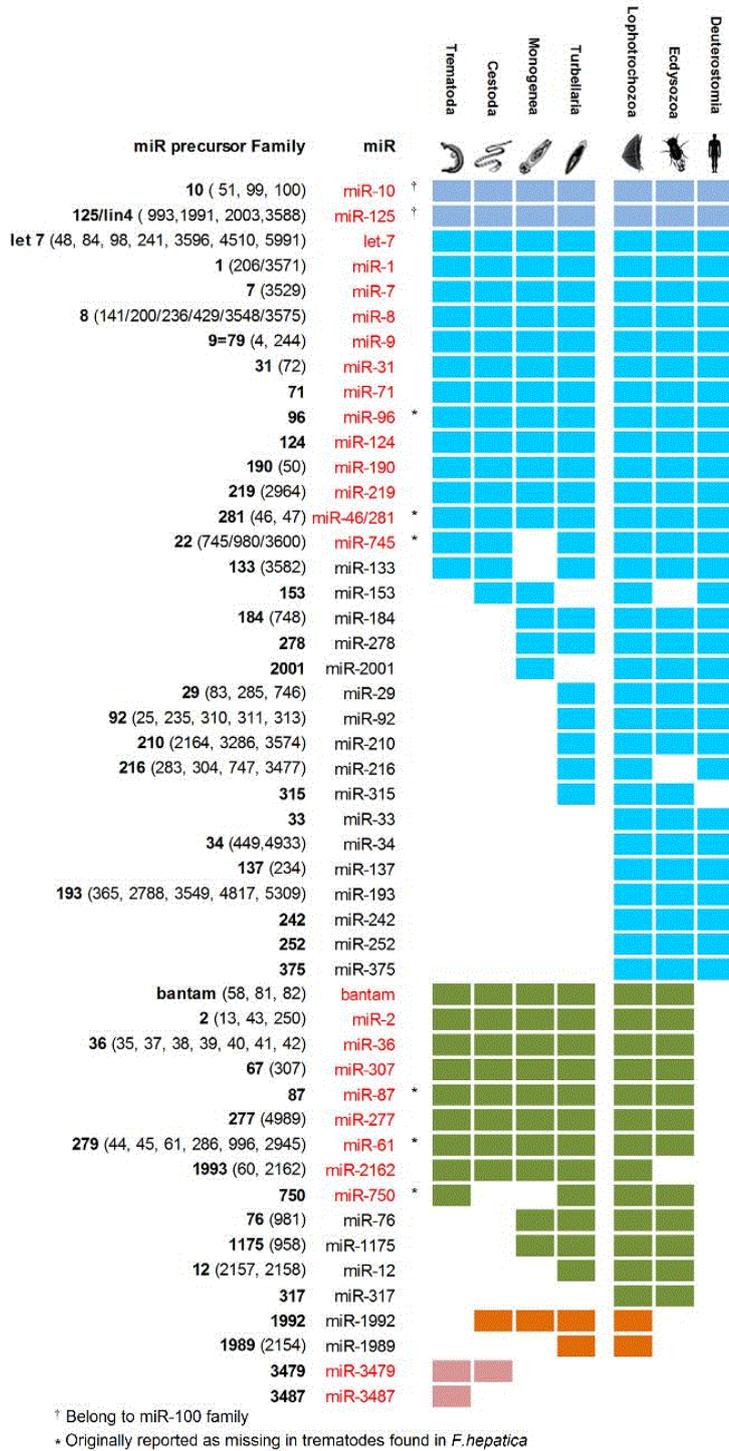


Fig. 5. Micro (mi)RNA family conservation in flatworms compared with other metazoans. The *Fasciola hepatica* dataset was compared with those present in other lineages and included in the trematode dataset. miRNAs described in *F. hepatica* newly excysted juveniles (this work) are indicated (red (light grey) lettering). Gains and losses of miRNA families in the different lineages are indicated. Losses are depicted as empty (white) blocks while conserved miRNA families are highlighted in shaded blocks (blue (upper, very light grey), conserved in Metazoans; light blue (light grey), conserved in Bilateria; green (mid, dark grey), conserved in Protostomia; orange (black), conserved in Lophotrochozoa; pink (lower, light grey), conserved in Trematoda and Cestoda). Conservation inferences are taken from the literature (Wheeler et al., 2009; Tarver et al., 2013) and were confirmed by database searches against miRBASE and mirOrtho. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Please cite this article in press as: Fontenla, S., et al. The miRnome of *Fasciola hepatica* juveniles endorses the existence of a reduced set of highly divergent micro RNAs in parasitic flatworms. Int. J. Parasitol. (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.06.007>

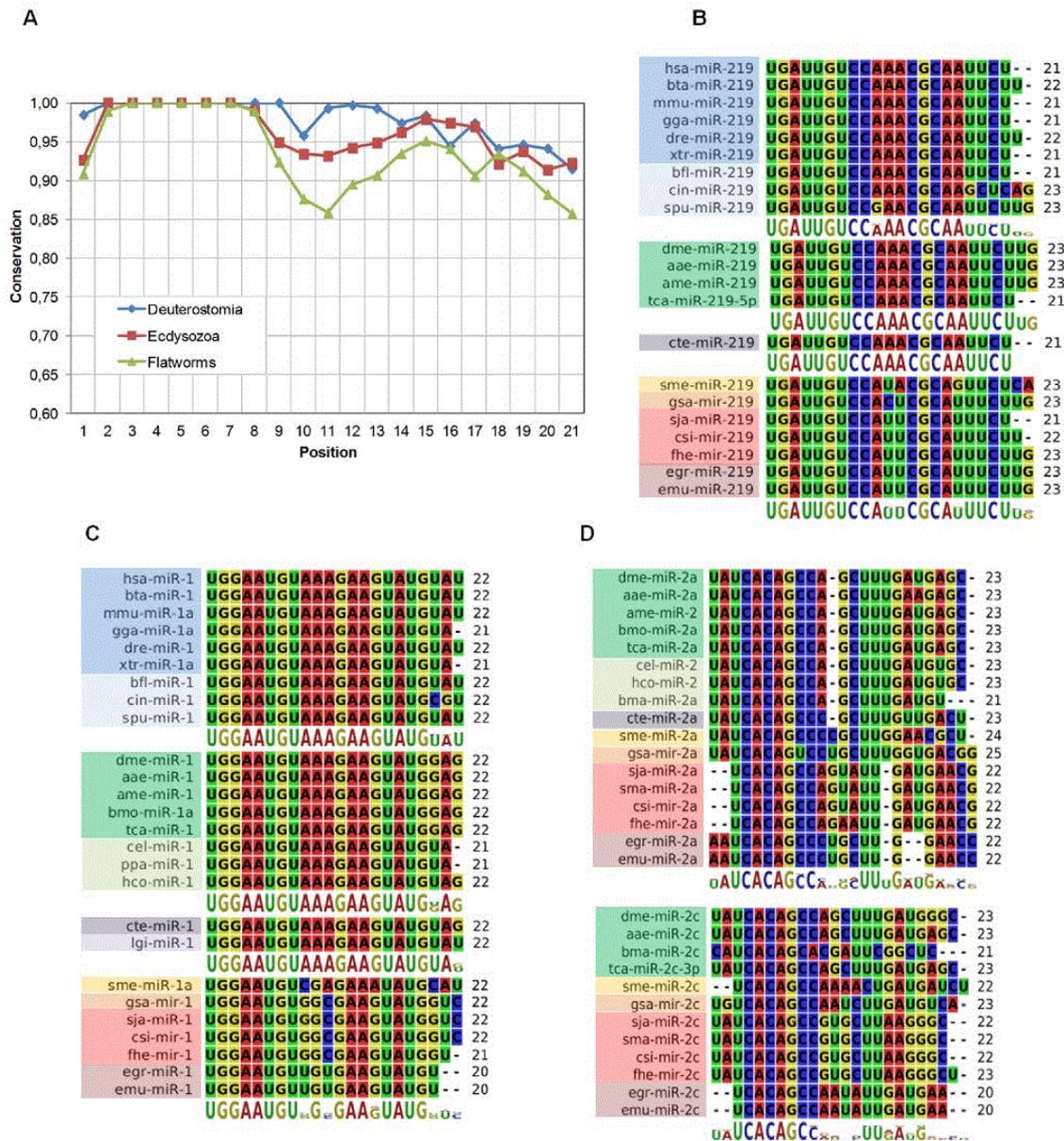


Fig. 6. Micro (mi)RNA sequence conservation through evolution. Alignments of sequences and consensus logos were generated for the different lineages comparing Deuterostomes (from sea urchin to mammals, colour coded in shades of blue), Ecdysozoans (including arthropods and nematodes, green), Lophotrochozoans (represented by the owl limpet (mollusk) and the annelid *Capitella teleta*, lavender shaded), and flatworms (planaria (yellow), monogenean (orange), trematodes (red) and cestodes (purple)). (A) Average sequence conservation by position between Deuterostomia, Ecdysozoa and Platyhelminthes was calculated based on scoring changes by position for all the identified miRNAs. Less conservation of Platyhelminthes outside the seed region (2–8 nt) is evident. (B) miR-219 represents one of the less variable miRNAs found across different taxa, with flatworms being the more divergent. Within flatworms, different substitutions allow differentiating flatworm lineages (see Section 3.4 for description). (C) miR-1a families. (D) Seed shifts observed in miR-2 subfamilies of flatworms. miR-2a 3p alignment shows a conserved two base shift of the miRNA sequences in trematodes. The seed shift in miR-2c-3p is in planarians and cestodes. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

five novel *F. hepatica*-specific miRNAs detected in this study which are absent in the genomes of other trematodes. These novel miRNAs are expressed at modest levels (according to their low read counts), and they might be involved in the fine modulation of the expression of *F. hepatica*-specific genes or functions. Interestingly, slightly different repertoires are shown between *F. hepatica*,

S. mansoni and *S. japonicum*, with less conserved and more species-specific miRNAs in the blood flukes. This might reflect truly biological variations within trematodes, but could be also due to under-sampling of the miRNA populations since not all relevant life stages of these parasites have yet been studied. Similarly, novel miRNAs are being described in each flatworm species studied to

Please cite this article in press as: Fontenla, S., et al. The miRNome of *Fasciola hepatica* juveniles endorses the existence of a reduced set of highly divergent micro RNAs in parasitic flatworms. Int. J. Parasitol. (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.06.007>

Table 3
Annotation of tRNA halves found in *Fasciola hepatica* newly excysted juveniles.

tRNA Family	tRNA-anticodon	Sequence	Fragment	Total count	Counts by cleavage point												
					30	31	32	33	34	35	36–67	36–68	36–69	40–72			
Gly	tRNA ^{Gly} (GCC)	GCCGCCGUGGUUUCAGUGGUAGAAUUCUCGCCUCG	5' half	66,887	244	364	52,716	12,218	1,217	128							
	tRNA ^{Gly} (UCC)	GCGAAGCUGGUGUAAUGGUUAUCAUGGUUGCCU	5' half	944			569	375									
Met	tRNA ^{Met} (CAU)	AGCAGAGUGGCGCAGUGGAAGCGUGCGGGCCC	5' half	12,341		11,039	349	953									
Lys	tRNA ^{Lys} (UUU)	GCCCGAUAGCUCAGUCGGUAGAGCAUCAGACUU	5' half	3,701			1,555	2,090	56								
Cys	tRNA ^{Cys} (GCA)	GGAGCAUAGCUCAGUGGUAAGCAUUCGACUCG	5' half	3,594			2,523	57	1,014								
	tRNA ^{Cys} (CUG)	GGCCCCAUGGUAGCGGUUAUCACUCUGGACUC	5' half	2,556					1,996	560							
Gln	tRNA ^{Gln} (UUG)	GGUCCCAUGGUAGCGGUUAUCACUCUGGACUC	5' half	1,313			279	1,034									
	tRNA ^{Gln} (GUA)	CCGACGAUAGCUCAGUUGGUAAGCGGAGGACU	5' half	2,148			959	1,189									
Tyr	tRNA ^{Tyr} (GUA)	CCGACGAUAGCUCAGUUGGUAAGCGGAGGACU	5' half	2,148			959	1,189									
	tRNA ^{Tyr} (CUC)	CACCCAGGCGGCCGGGUUCGACUCCCGGCCGCG	3' half	1,908							325	500	526	557			
Glu	tRNA ^{Glu} (CUC)	CACCCAGGCGGCCGGGUUCGACUCCCGGCCGCG	3' half	1,908							325	500	526	557			
	tRNA ^{Glu} (CUC)	UCCCGCGUGGUUAGCGGUUAAGCAUUCUGGCUU	5' half	383			73	95	215								
Pro	tRNA ^{Pro} (AGG)	GGCCUGGUGGUUAGCGGUUAAGCAUUCUGGCUU	5' half	1,385				1,385									
	tRNA ^{Pro} (CGG)	GGCUCAGUGGUUAGCGGUUAAGCAUUCUGGCUU	5' half	302		50	252										
Ala	tRNA ^{Pro} (UGG)	GGCCUAGUGGUUAGCGGUUAAGCAUUCUGGCUU	5' half	165		92	73										
	tRNA ^{Ala} (CGC)	GGGGAUGUAGCUCAGUGGUAAGCGGUUUCUUC	5' half	774			344	430									
Asp	tRNA ^{Ala} (AGC)	GGGGAUGUAGCUCAGUGGUAAGCGGUUUCUUC	5' half	59				59									
	tRNA ^{Asp} (GUC)	UCCUCGGUAGUUAUGUGGUUUCUUCGCGCUU	5' half	471			184	287									
Leu	tRNA ^{Asp} (GUC)	CACGUGGAAAGCCCGGUUCGAAUCCCGCCGCG	3' half	111												111	
	tRNA ^{Leu} (UAA)	GGUAGGUUGCGGAGUGGUUAAGCGGUGGAC	5' half	104			104										

date (as included here), but those might not always reflect specific new adaptations. Some of those might correspond to shared innovations that were undetected in previous studies of the related taxa. Searching for homologues in related species' genomes when available (as we did here) might end up being a necessary and/or recommended step in novel miRNA description (Thomson et al., 2014). In any case, while miRNA predictions can be made based on genomes, experimental detection of the actual miRNAs is necessary for validation.

While free-living trematodes are devoid of 10 conserved miRNA families, in monogeneans 18 families are missing, whereas 21 families have not yet been detected in cestodes and 22 in trematodes. The remarkable progressive decrease in the conserved miRNA repertoire in flatworms could be associated with the parasitic way of life. Interestingly, this decrease correlates with variations in genome size and gene counts, with the planarians displaying the largest genomes – more than 30,000 predicted genes – trematodes with smaller genomes (1000–300 Mb) and close to 15,000 genes, and cestodes and monogeneans with the smallest genomes (100–150 Mb) and 15,000 predicted genes. Furthermore, a recent study has identified a substantial reduction in the core bilaterian gene complement, including the homeodomain-containing genes, loss of the *piwi* and *vasa* genes that are considered essential for animal development (Skinner et al., 2014), loss of functional fatty acid biosynthesis pathways and the absence of peroxisomes as shared genomic features for the ecto- and endoparasitic lineages (Hahn et al., 2014). Whether these gene losses precede or are the consequence of the absence of the corresponding modulating miRNAs is still not clear, raising novel questions with possibly wide evolutionary implications. On the other hand, novel miRNAs are consistently being described in flatworms but it is still difficult to assess whether novel families shared across flatworms might have emerged to compensate for those lost, or if novelties emerged repeatedly in different flatworm lineages to drive diverse functions in the parasites' biology.

3.4. Low sequence conservation in ancient miRNA suggests a high mutational rate in parasitic flatworms

miRNAs are among the most evolutionarily conserved sequences with low rates of mutations. A 3.5% substitution rate was calculated for 93 miRNA genes across 14 nephrozoan taxa,

which makes miRNAs one of the most conserved sequences throughout evolution (Wheeler et al., 2009). Within mature miRNAs the 'seed' region that spans from positions 2–8 is the main determinant of target selectivity and consequently extremely conserved. A second highly preserved region involves residues 13–16 of the mature miRNA (Wheeler et al., 2009). When analysing conserved miRNA families present in *F. hepatica*, we observed several differences in the sequence outside the seed regions. Interestingly, this sequence divergence was not restricted to *F. hepatica* but seems to be characteristic of flatworms in general. While sequence conservation is notoriously high even between distant deuterostomes, ecdysozoans and lophotrochozoans, platyhelminthes show marked and in general lineage-specific variations, with strict conservation restricted to the seed region (Fig. 6A). For example, an almost complete conservation of miR-219 is observed from lophotrochozoans to mammals, while in flatworms different substitutions at positions 11, 12, 17, 22 and 23 allow us to differentiate planarians from monogeneans and these from cestodes and trematodes that share the miR-219 sequence (Fig. 6B). A second and more drastic example is provided by miR-1a, with almost complete conservation observed in deuterostomes from sea urchins to humans with single variations in position 20 of *Ciona intestinalis*; the same position allows differentiation of insects from nematodes within ecdysozoans, while position 22 discriminates between the annelid *C. teleta* and the mollusk *L. gigantea* (owl limpet) (Fig. 6C). Platyhelminth sequences, on the other hand, presented multiple differences that are lineage-specific. All flatworm sequences showed one A to G transition at position 10, indicating that this substitution probably first appeared in a common ancestor of these organisms. Besides this change, the planarian *S. mediterranea* presented three other changes, a transversion at position 9 and transitions at positions 15 and 20. Cestode sequences are shorter and with transversions at positions 9 and 11; monogeneans and trematodes shared three transversions at positions 11, 20 and 21, and two transitions at positions 9 and 22 (Fig. 6C). Similar examples can be found in several miRNA families (Supplementary Fig. S3).

Sequence variation was accompanied by seed shifts in the case of the miR-2 family members. While a +2 base shift is observed in miR-2c of planarians and cestodes, a similar change is detected in the miR-2a of trematodes (Fig. 6D). Interestingly, miR-2b of flatworms and ecdysozoans share the seed, but the other protostomes

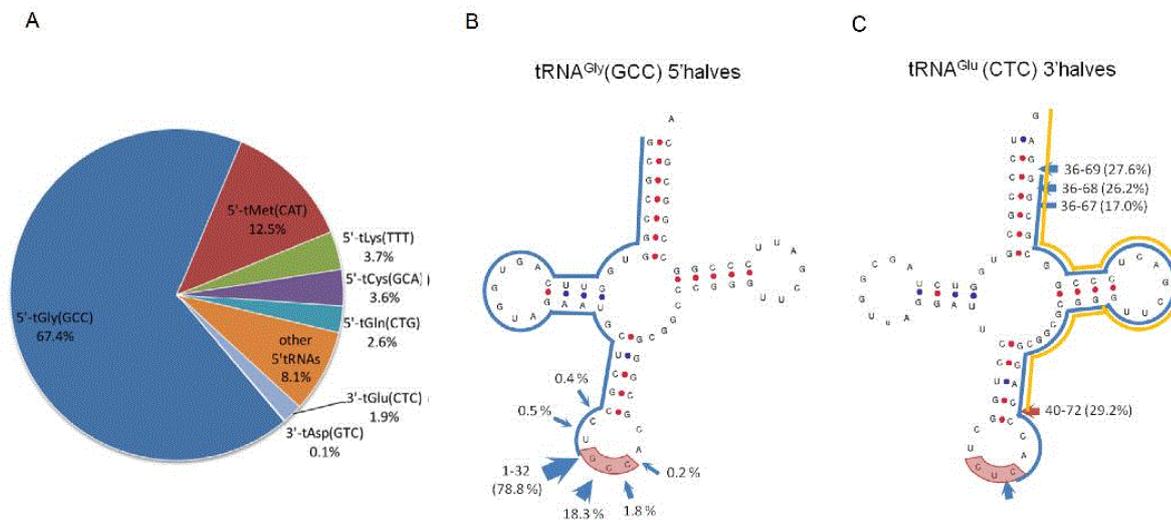


Fig. 7. Fragmented tRNAs detected in the small RNAome of *Fasciola hepatica* newly excysted juveniles. (A) The proportional distribution of the RNA halves detected is indicated. (B) Approximately 98% of the tRNA halves detected were 5' halves with tRNA^{Gly}(GCC)-derived being the most frequent. (C) Within the 3' fragments, the most abundant is tRNA^{Glu}(CTC), presenting two types of fragments, one generated by a single cleavage at the 3' base of the anticodon loop (yellow (clear)) and the remaining by two cleavages (blue (dark)). Variation at the cleavage site is indicated by arrows. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

show a +2 shift (not shown). Despite this generalised picture of miRNA sequence variation, a few families such as miR-219 or miR-124 have very low sequence variation while others are more prone to change (Supplementary Fig. S3).

It is worth highlighting that further minor variants might also exist. Within the *F. hepatica* dataset for a given miRNA, the most abundant sequence was taken as the canonical but variants at 5' and 3' with lower counts or shifts to the 3' or 5' were detected (see Section 2.4). These variations might represent diverse isomiRs that might be biologically relevant, since they eventually provide fine modulation at target recognition (Morin et al., 2008; Wang et al., 2010). A typical example of this is the let-7 family. We found a canonical let-7 that is expressed at a very low level. However, a highly expressed variant with the same seed and homologous to a putative miRNA described as novel in *S. japonicum* (Sja-novel-137) (Hao et al., 2010) was found (let-7c). Four different let-7 variants have emerged in free-living planarians, but diversification in the let-7 complement in trematodes has not yet been described. Despite this generalised picture of miRNA sequence variation, a few families such as miR-219 or miR-124 have very low sequence variation, while others are more prone to change (Supplementary Fig. S3).

The sequence variations observed to date demand a more detailed study of the residue change rate in flatworm miRNAs. The high variation rate observed in the flatworm sequences might affect the targets identified by these miRNAs. In any case, if they are coevolving, a high substitution rate seems to be characteristic of flatworms. The origins and consequences of these variations are interesting questions that emerge from this study.

3.5. The 5' halves of some tRNAs are present in the small RNA population

A second peak of abundance at 32 nts was observed in the NEJ small RNA dataset (see Supplementary Fig. S1). This size corresponds approximately to the 30 nt average size of the piwi-interacting RNAs (piRNA). piRNAs are related to post-transcriptional silencing of retrotransposons and repetitive sequences

in the germline (Weick and Miska, 2014). piRNAs are highly expressed in neoblasts of the free-living flatworm *S. mediterranea* (Palakodeti et al., 2008; Friedländer et al., 2009). While neoblasts do exist in parasitic flatworms, piRNAs have not been identified in cestodes or trematodes. Consistent with this absence, the canonical PIWI protein is missing in these organisms (Zheng, 2012; Tsai et al., 2013), posing the question of how these organisms maintain genomic integrity (Skinner et al., 2014). It has been proposed that other small RNAs may carry out these key roles in flatworms and in some nematodes in which piRNAs have not been identified (Britton et al., 2014). In agreement with this, we did not find sequences that might be consistently assigned to piRNAs in our dataset.

However some of these longer reads were flagged as being related to tRNA sequences. In order to confirm this, we mapped the 25–35 nt fraction to the *F. hepatica* partial genome assembly, and compared this dataset by stringent BLAST searches against all the predicted tRNAs. A total of 99,014 reads matched tRNAs, surprisingly corresponding almost exclusively to tRNA halves. A strong skew towards the 5' half of tRNAs was observed, with only 2.04% of the tRNA-derived sequences corresponding to 3' tRNA halves (Table 3). Notably, there is a marked preference for the tRNA^{Gly} (68.3%), with a major fraction that accounted by the transfer with the GCC anticodon (67.3%). The second most abundant was tRNA^{Met}, representing more than 12% of the identified tRNAs (Fig. 7). The two halves were found only for two tRNAs (Asp and Glu), and interestingly the tRNA^{Glu} 3' half had a higher count than the 5' half. tRNA halves are tRNA-derived fragments of 30–35 nts long generated by the cleavage of tRNAs at anticodon loops and have been claimed to be post-transcriptional regulators in response to stress (Garcia-Silva et al., 2013). tRNA fragmentation in response to stress has been reported in a wide variety of organisms ranging from bacteria to humans (Thompson and Parker, 2009). tRNA halves have been reported to be major post-transcriptional regulators in *Trypanosoma cruzi*, an organism where canonical small RNA regulation is hampered due to the absence of a canonical RNA pathway (Garcia-Silva et al., 2010). In general, tRNAs are processed by different RNAses that are usually bound to organelle membranes and separated from cytoplasmic RNA.

During oxidative stress these nucleases move into the cytoplasm to process tRNAs, and the cleaved halves could be used by the silencing machinery of the cell (Kumar et al., 2014). More recently, in *T. cruzi* the argonaute family protein TcPIWI-tryp has been shown to immunoprecipitate with tRNA halves and was claimed to be involved in the interference mechanism (Garcia-Silva et al., 2014a). In these organisms the tRNA half containing complexes localise mostly to intracellular vesicles called reservosomes that are involved in parasite communication via the endocytic/exocytic pathway. Interestingly, these vesicles might take part in host cell susceptibility to parasitic infection, since changes in gene expression were found in HeLa cells exposed to parasite extracellular vesicles (Garcia-Silva et al., 2014b). Our finding of tRNA-derived small RNAs in the juvenile stage opens new and interesting questions. Assuming that tRNA-derived sequences originated in response to stress as in other organisms, it is still not known if this is triggered by culture conditions or if it happens naturally as a response by the parasite to the initial contact with the host, and consequently plays a role in invasion. Further work is needed in order to confirm if they are present in other parasitic stages and if they can be modulated experimentally by culture conditions.

3.6. Conclusion

We found that a diverse set of small RNAs is produced by the invading NEJ of *F. hepatica*. These molecules essentially fall into two classes, one represented by miRNAs and a secondary group of larger (32–33 nts) tRNA-derived sequences. Some ancient miRNAs conserved in metazoans and protostomes are very highly expressed by the NEJs. Our results also confirm that no less than eight conserved miRNA families have been lost in all flatworms, while more than 20 are missing in all parasitic trematodes analysed to date. Besides this reduction, the miRnome is enriched by novel flatworm and *F. hepatica*-specific miRNAs generally expressed at lower levels. Interestingly, sequence conservation in flatworm miRNAs was lower than in other lineages, suggesting a high mutational rate in parasitic flatworms. While no piRNA was found, a distinctive set of tRNA-derived sequences represented mostly by 5' halves of selected tRNAs was detected. The singularities found in the small RNA repertoire of flatworms suggest that more effort is needed to understand their role in parasite evolution and adaptation.

Acknowledgments

We would like to thank Drs. Gabriel Rinaldi and Paul Brindley for valuable comments, discussions and suggestions. The work was partially supported by the Maestría de Bioinformática, Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas (PEDECIBA), Uruguay, and Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC-UdelAR), Uruguay. SF is recipient of a scholarship from the Sistema Nacional de Becas from the Agencia Nacional de Investigación e Innovación (SNB-ANII), Uruguay; SF and NDO are postgraduate students in PEDECIBA (Bioinformatics and Biology) and received support from this program. PS and JFT were supported by the Sistema Nacional de Investigadores from ANII (SNI-ANII). MSL was supported by the Consejo Superior de Investigación Científica (CSIC), Spain. No other specific funding was received for this work.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.06.007>.

References

- Ai, L., Xu, M.J., Chen, M.X., Zhang, Y.N., Chen, S.H., Guo, J., Cai, Y.C., Zhou, X.N., Zhu, X.Q., Chen, J.X., 2012. Characterization of microRNAs in *Taenia saginata* of zoonotic significance by Solexa deep sequencing and bioinformatics analysis. *Parasitol. Res.* 110, 2373–2378.
- Bai, Y., Zhang, Z., Jin, L., Kang, H., Zhu, Y., Zhang, L., Li, X., Ma, F., Zhao, L., Shi, B., Li, J., McManus, D.P., Zhang, W., Wang, S., 2014. Genome-wide sequencing of small RNAs reveals a tissue-specific loss of conserved microRNA families in *Echinococcus granulosus*. *BMC Genomics* 15, 736.
- Bartel, D.P., 2009. MicroRNA target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215–233.
- Berezikov, E., 2011. Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. *Nat. Rev. Genet.* 12, 846–860.
- Boulan, L., Martín, D., Milán, M., 2013. Bantam miRNA promotes systemic growth by connecting insulin signaling and ecdysone production. *Curr. Biol.* 23, 473–478.
- Boulias, K., Horvitz, H.R., 2012. The *C. elegans* microRNA mir-71 acts in neurons to promote germline-mediated longevity through regulation of DAF-16/FOXO. *Cell Metab.* 15, 439–450.
- Brennan, G.P., Fairweather, I., Trudgett, A., Hoey, E., McCoy, McConville, M., Meaney, M., Robinson, M., McFerran, N., Ryan, L., Lanasce, C., Mottier, L., Alvarez, L., Solana, H., Virkel, G., Brophy, P.M., 2007. Understanding triclabendazole resistance. *Exp. Mol. Pathol.* 82, 104–109.
- Brennecke, J., Hipfner, D.R., Stark, A., Russell, R.B., Cohen, S.M., 2003. Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell* 113, 25–36.
- Britton, C., Winter, A.D., Gillan, V., Devaney, E., 2014. MicroRNAs of parasitic helminths – identification, characterization and potential as drug targets. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 4, 85–94.
- Burge, S.W., Daub, J., Eberhardt, R., Tate, J., Barquist, L., Nawrocki, E.P., Eddy, S.R., Gardner, P.P., Bateman, A., 2013. Rfam 11.0: 10 years of RNA families. *Nucleic Acids Res.* 41, D226–D232.
- Cai, P., Hou, N., Piao, X., Liu, S., Liu, H., Yang, F., Wang, J., Jin, Q., Wang, H., Chen, Q., 2011. Profiles of small non-coding RNAs in *Schistosoma japonicum* during development. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1256.
- Cai, P., Piao, X., Hao, L., Liu, S., Hou, N., Wang, H., Chen, Q., 2013. A deep analysis of the small non-coding RNA population in *Schistosoma japonicum* eggs. *PLoS One* 8, e64003.
- Cancela, M., Acosta, D., Rinaldi, G., Silva, E., Durán, R., Roche, L., Zaha, A., Carmona, C., Tort, J.F., 2008. A distinctive repertoire of cathepsins is expressed by juvenile invasive *Fasciola hepatica*. *Biochimie* 90, 1461–1475.
- Cancela, M., Ruéto, N., Dell’Oca, N., da Silva, E., Smirich, P., Rinaldi, G., Roche, L., Carmona, C., Alvarez-Valín, F., Zaha, A., Tort, J.F., 2010. Survey of transcripts expressed by the invasive juvenile stage of the liver fluke *Fasciola hepatica*. *BMC Genomics* 11, 227.
- Charlier, J., van der Voort, M., Kenyon, F., Skuce, P., Vercrucy, J., 2014. Chasing helminths and their economic impact on farmed ruminants. *Trends Parasitol.* 30, 361–367.
- Copeland, C.S., Marz, M., Rose, D., Hertel, J., Brindley, P.J., Santana, C.B., Kehr, S., Attolini, C.S., Stadler, P.F., 2009. Homology-based annotation of non-coding RNAs in the genomes of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *BMC Genomics* 10, 464.
- Cucher, M., Prada, L., Mourglia-Ettlin, G., Dematteis, S., Camicia, F., Asurmendi, S., Rosenzvit, M., 2011. Identification of *Echinococcus granulosus* microRNAs and their expression in different life cycle stages and parasite genotypes. *Int. J. Parasitol.* 41, 439–448.
- Cwiklinski, K., Dalton, J.P., Dufresne, P.J., La Course, J., Williams, D.J., Hodgkinson, J., Paterson, S., 2015. The *Fasciola hepatica* genome: gene duplication and polymorphism reveals adaptation to the host environment and the capacity for rapid evolution. *Genome Biol.* 16, 71.
- De Souza Gomes, M., Muniyappa, M.K., Carvalho, S.G., Guerra-Sá, R., Spillane, C., 2011. Genome-wide identification of novel microRNAs and their target genes in the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Genomics* 98, 96–111.
- Eulalio, A., Huntzinger, E., Izaurralde, E., 2008. Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* 132, 9–14.
- Fischer, S.E.J., 2010. Small RNA-mediated gene silencing pathways in *C. elegans*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 1306–1315.
- Friedländer, M.R., Adamidi, C., Han, T., Lebedeva, S., Isenbarger, T.A., Hirst, M., Marra, M., Nusbaum, C., Lee, W.L., Jenkin, J.C., Sánchez Alvarado, A., Kim, J.K., Rajewsky, N., 2009. High-resolution profiling and discovery of planarian small RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 11546–11551.
- Friedländer, M.R., Mackowiak, S.D., Li, N., Chen, W., Rajewsky, N., 2012. MiRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Res.* 40, 37–52.
- Fromm, B., Warren, M.M., Hahn, C., Hovig, E., Bachmann, L., 2013. Substantial loss of conserved and gain of novel microRNA families in flatworms. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2619–2628.
- García, H.H., Moro, P.L., Schantz, P.M., 2007. Zoonotic helminth infections of humans: echinococcosis, cysticercosis and fascioliasis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 20, 489–494.
- García-Silva, M.R., Frugier, M., Tosar, J.P., Correa-Dominguez, A., Ronalde-Alves, L., Parodi-Talice, A., Rovira, C., Robello, C., Goldenberg, S., Cayota, A., 2010. A population of tRNA-derived small RNAs is actively produced in *Trypanosoma cruzi* and recruited to specific cytoplasmic granules. *Mol. Biochem. Parasitol.* 171, 64–73.

- García-Silva, M.R., Cabrera-Cabrera, F., Güida, M.C., Cayota, A., 2013. Novel aspects of tRNA-derived small RNAs with potential impact in infectious diseases. *ABB* 4, 17–25.
- García-Silva, M.R., Cabrera-Cabrera, F., das Neves, R.F.C., Souto-Pradrón, T., de Souza, W., Cayota, A., 2014. Gene expression changes induced by *Trypanosoma cruzi* shed microvesicles in mammalian host cells: relevance of tRNA-derived halves. *Biomed. Res. Int.* 2014, 305239.
- García-Silva, M.R., Sanguinetti, J., Cabrera-Cabrera, F., Franzén, O., Cayota, A., 2014. A particular set of small non-coding RNAs is bound to the distinctive Argonaute protein of *Trypanosoma cruzi*: insights from RNA-interference deficient organisms. *Gene* 538, 379–384.
- Gerlach, D., Kriventseva, E.V., Rahman, N., Vejnár, C.E., Zdobnov, E.M., 2009. MiROrtho: computational survey of microRNA genes. *Nucleic Acids Res.* 37, D111–D117.
- Ghildiyal, M., Xu, J., Seitz, H., Weng, Z., Zamore, P.D., 2010. Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs partitions microRNA* strands into the RNA interference pathway. *RNA* 16, 43–56.
- Grishok, A., 2005. RNAi mechanisms in *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett.* 579, 5932–5939.
- Hahn, C., Fromm, B., Bachmann, L., 2014. Comparative genomics of flatworms (Platyhelminthes) reveals shared genomic features of ecto- and endoparasitic Neodermata. *Genome Biol. Evol.* 6, 1105–1117.
- Hao, L., Cai, P., Jiang, N., Wang, H., Chen, Q., 2010. Identification and characterization of microRNAs and endogenous siRNAs in *Schistosoma japonicum*. *BMC Genomics* 11, 55.
- Hernández-González, A., Valero, M.L., del Pino, M.S., Oleaga, A., Siles-Lucas, M., 2010. Proteomic analysis of *in vitro* newly excysted juveniles from *Fasciola hepatica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 172, 121–128.
- Hertel, J., Bartschat, S., Wintsche, A., Otto, C., Stadler, P.F., 2012. Evolution of the let-7 microRNA family. *RNA Biol.* 9, 231–241.
- Huang, J., Hao, P., Chen, H., Hu, W., Yan, Q., Liu, F., Han, Z.G., 2009. Genome-wide identification of *Schistosoma japonicum* microRNAs using a deep-sequencing approach. *PLoS One* 4, e8206.
- Jamalkandi, S.A., Masoudi-Nejad, A., 2009. Reconstruction of *Arabidopsis thaliana* fully integrated small RNA pathway. *Funct. Integr. Genomics* 9, 419–432.
- Jin, X., Lu, L., Su, H., Lou, Z., Wang, F., Zheng, Y., Xu, G.T., 2013. Comparative analysis of known miRNAs across platyhelminths. *FEBS J.* 280, 3944–3951.
- Katoh, K., Standley, D.M., 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30, 772–780.
- Keiser, J., Utzinger, J., 2009. Food-borne zoonoses. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 466–483.
- Kozomara, A., Griffiths-Jones, S., 2014. MiRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 42, D68–D73.
- Kumar, P., Anaya, J., Mudunuri, S.B., Dutta, A., 2014. Meta-analysis of tRNA derived RNA fragments reveals that they are evolutionarily conserved and associate with AGO proteins to recognize specific RNA targets. *BMC Biol.* 12, 78.
- Lowe, T.M., Eddy, S.R., 1997. TRNAScan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res.* 25, 955–964.
- Lu, Y., Smielewska, M., Palakodeti, D., Lovci, M.T., Aigner, S., Yeo, G.W., Graveley, B. R., 2009. Deep sequencing identifies new and regulated microRNAs in *Schmidtea mediterranea*. *RNA* 15, 1483–1491.
- Mangiola, S., Young, N.D., Korhonen, P., Mondal, A., Scheerlinck, J.P., Sternberg, P.W., Cantacessi, C., Hall, R.S., Jex, A.R., Gasser, R.B., 2013. Getting the most out of parasitic helminth transcriptomes using HelmiDB: implications for biology and biotechnology. *Biotechnol. Adv.* 31, 1109–1119.
- Manzano-Román, R., Siles-Lucas, M., 2012. MicroRNAs in parasitic diseases: potential for diagnosis and targeting. *Mol. Biochem. Parasitol.* 186, 81–86.
- Marco, A., Hooks, K.B., Griffiths-Jones, S., 2012. Evolution and function of the extended miR-2 microRNA family. *RNA Biol.* 9, 242–248.
- Marcos, L.A., Terashima, A., Gotuzzo, E., 2008. Update on hepatobiliary flukes: fascioliasis, opisthorchiasis and clonorchiasis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 21, 523–530.
- Martin, J., Rosa, B.A., Ozersky, P., Hallsworth-Pepin, K., Zhang, X., Bhonegiri-Palsikar, V., Tyagi, R., Wang, Q., Choi, Y., Gao, X., McNulty, S., Brindley, P.J., Mitreva, M., 2015. Helminth.net: expansions to Nematode.net and an introduction to Trematode.net. *Nucleic Acids Res.* 43, 698–706.
- Mas-Coma, S., Bargues, M.D., Valero, M.A., 2005. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 35, 1255–1278.
- Mituyama, T., Yamada, K., Hattori, E., Okida, H., Ono, Y., Terai, G., Yoshizawa, A., Komori, T., Asai, K., 2009. The Functional RNA Database 3.0: databases to support mining and annotation of functional RNAs. *Nucleic Acids Res.* 37, D89–D92.
- Morin, R.D., Connor, M.D.O., Griffith, M., Kuchenbauer, F., Delaney, A., Prabhu, A.L., Zhao, Y., McDonald, H., Zeng, T., Hirst, M., Eaves, C.J., Marra, M.A., 2008. Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells. *Genome Res.* 18, 610–621.
- Palakodeti, D., Smielewska, M., Graveley, B.R., 2006. MicroRNAs from the Planarian *Schmidtea mediterranea*: a model system for stem cell biology. *RNA* 12, 1640–1649.
- Palakodeti, D., Smielewska, M., Lu, Y.C., Yeo, G.W., Graveley, B.R., 2008. The PIWI proteins SMEDWI-2 and SMEDWI-3 are required for stem cell function and piRNA expression in planarians. *RNA* 14, 1174–1186.
- Schistosoma japonicum* Genome Sequencing and Functional Analysis Consortium, 2009. The *Schistosoma japonicum* genome reveals features of host–parasite interplay. *Nature* 460, 345–351.
- Sempere, L.F., Martínez, P., Cole, C., Bagnù, J., Peterson, K.J., 2007. Phylogenetic distribution of microRNAs supports the basal position of acel flatworms and the polyphyly of Platyhelminthes. *Evol. Dev.* 9, 409–415.
- Simões, M.C., Lee, J., Djikeng, A., Cerqueira, G.C., Zerlotini, A., da Silva-Pereira, R.A., Dalby, A.R., LoVerde, P., El-Sayed, N.M., Oliveira, G., 2011. Identification of *Schistosoma mansoni* microRNAs. *BMC Genomics* 12, 47.
- Skinner, D.E., Rinaldi, G., Koziol, U., Brehm, K., Brindley, P.J., 2014. How might flukes and tapeworms maintain genome integrity without a canonical piRNA pathway? *Trends Parasitol.* 30, 123–129.
- Sokol, N.S., 2012. Small temporal RNAs in animal development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 22, 368–373.
- Stark, A., Brennecke, J., Russell, R.B., Cohen, S.M., 2003. Identification of *Drosophila* microRNA targets. *PLoS Biol.* 1, E60.
- Sun, Y.M., Lin, K.Y., Chen, Y.Q., 2013. Diverse functions of miR-125 family in different cell contexts. *J. Hematol. Oncol.* 6, 6.
- Sun, J., Wang, S., Li, C., Ren, Y., Wang, J., 2014. Novel expression profiles of microRNAs suggest that specific miRNAs regulate gene expression for the sexual maturation of female *Schistosoma japonicum* after pairing. *Parasit. Vectors* 7, 177.
- Tarver, J.E., Sperling, E.A., Nailor, A., Heimberg, A.M., Robinson, J.M., King, B.L., Pisani, D., Donoghue, P.C., Peterson, K.J., 2013. MiRNAs: small genes with big potential in metazoan phylogenetics. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2369–2382.
- Thompson, D.M., Parker, R., 2009. Stressing out over tRNA cleavage. *Cell* 138, 215–219.
- Thomson, R.C., Plachetzki, D.C., Mahler, D.L., Moore, B.R., 2014. A critical appraisal of the use of microRNA data in phylogenetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, E3659–E3668.
- Tsai, I.J., Zarowiecki, M., Holroyd, N., Garcia-rrubio, A., Sanchez-Flores, A., Brooks, K. L., Tracey, A., Bobes, R.J., Fragoso, G., Sciutto, E., Aslett, M., Beasley, H., Bennett, H.M., Cai, J., Camicia, F., Clark, R., Cucher, M., De Silva, N., Day, T.A., Deplazes, P., Estrada, K., Fernández, C., Holland, P.W., Hou, J., Hu, S., Huckvale, T., Hung, S., Kamenetzky, L., Keane, J.A., Kiss, F., Koziol, U., Lambert, O., Liu, K., Luo, X., Luo, Y., Macchiaroli, N., Nichol, S., Paps, J., Parkinson, J., Pouchkina-Stantcheva, N., Riddiford, N., Rosenzvit, M., Salinas, G., Wasmuth, J.D., Zamanian, M., Zheng, Y., Tania solium Genome Consortium, Cai, X., Soberón, X., Olson, P.D., Lacleste, J.P., Brehm, K., Berriman, M., 2013. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature* 496, 57–63.
- Wang, W.C., Lin, F.M., Chang, W.C., Lin, K.Y., Huang, H.D., Lin, N.S., 2009. MiRExpress: analyzing high-throughput sequencing data for profiling microRNA expression. *BMC Bioinformatics* 10, 328.
- Wang, Z., Xue, X., Sun, J., Luo, R., Xu, X., Jiang, Y., Zhang, Q., Pan, W., 2010. An “in-depth” description of the small non-coding RNA population of *Schistosoma japonicum* schistosomulum. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e596.
- Weick, E.M., Miska, E.A., 2014. PiRNAs: from biogenesis to function. *Development* 141, 3458–3471.
- Wheeler, B.M., Heimberg, A.M., Moy, V.N., Sperling, E.A., Holstein, T.W., Heber, S., Peterson, K.J., 2009. The deep evolution of metazoan microRNAs. *Evol. Dev.* 11, 50–68.
- Xu, M.J., Liu, Q., Nisbet, A.J., Cai, X.Q., Yan, C., Lin, R.Q., Yuan, Z.G., Song, H.Q., He, X.H., Zhu, X.Q., 2010. Identification and characterization of microRNAs in *Clonorchis sinensis* of human health significance. *BMC Genomics* 11, 521.
- Xu, M.J., Ai, L., Fu, J.H., Nisbet, A.J., Liu, Q.Y., Chen, M.X., Zhou, D.H., Zhu, X.Q., 2012. Comparative characterization of microRNAs from the liver flukes *Fasciola gigantica* and *F. hepatica*. *PLoS One* 7, e53387.
- Zerlotini, A., Aguiar, E.R.G.R., Yu, F., Xu, H., Li, Y., Young, N.D., Gasser, R.B., Protasio, A. V., Berriman, M., Roos, D.S., Kissinger, J.C., Oliveira, G., 2013. SchistoDB: an updated genome resource for the three key schistosomes of humans. *Nucleic Acids Res.* 41, D728–D731.
- Zhang, X., Zabinsky, R., Teng, Y., Cui, M., Han, M., 2011. MicroRNAs play critical roles in the survival and recovery of *Caenorhabditis elegans* from starvation-induced L1 diapause. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 17997–18002.
- Zheng, Y., 2012. Phylogenetic analysis of the Argonaute protein family in platyhelminths. *Mol. Phylogenet. Evol.* 66, 1050–1054.
- Zhu, L., Liu, J., Cheng, G., 2014. Role of microRNAs in schistosomes and schistosomiasis. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 4, 165.

