

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE BIOLOGIA

LARISSA FRANCO MOREIRA

MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS DE HISTONAS EM Schistosoma mansoni: ANÁLISE DAS MODIFICAÇÕES DE HISTONAS E O PERFIL DE TRANSCRIÇÃO DOS GENES QUE CODIFICAM AS ENZIMAS MODIFICADORAS

> CAMPINAS 2020

LARISSA FRANCO MOREIRA

MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS DE HISTONAS EM Schistosoma mansoni: ANÁLISE DAS MODIFICAÇÕES DE HISTONAS E O PERFIL DE TRANSCRIÇÃO DOS GENES QUE CODIFICAM AS ENZIMAS MODIFICADORAS

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Mestra em Biologia Animal na área de Relações Antrópicas, Meio ambiente e Parasitologia.

Orientadora: FERNANDA JANKU CABRAL

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA LARISSA FRANCO MOREIRA E ORIENTADA PELA FERNANDA JANKU CABRAL

CAMPINAS

2020

Ficha catalográfica Universidade Estadual de Campinas Biblioteca do Instituto de Biologia Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Moreira, Larissa Franco, 1995-

M813m Modificações pós-traducionais de histonas em *Schistosoma mansoni* : análise das modificações de histonas e o perfil de transcrição dos genes que codificam as enzimas modificadoras / Larissa Franco Moreira. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

> Orientador: Fernanda Janku Cabral. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Enzimas. 2. Epigenômica. 3. Histonas. 4. *Schistosoma mansoni*. 5. Esquistossomose mansônica. I. Cabral, Fernanda Janku, 1973-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Post-translational modifications of histones in *Schistosoma mansoni* : analysis of histone modifications and the transcription profile of the genes encoding the modifying enzymes

Palavras-chave em inglês: Enzymes Epigenomics Histones Schistosoma mansoni Schistosomiasis mansonica Área de concentração: Parasitologia Titulação: Mestra em Parasitologia Banca examinadora: Fernanda Janku Cabral [Orientador] Cibele Aparecida Tararam Lizandra Guidi Magalhães Caldas Data de defesa: 06-03-2020 Programa de Pós-Graduação: Parasitologia

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a) - ORCID do autor: https://orcid.org/0000-0003-2226-2055

- Currículo Lattes do autor: http://lattes.cnpq.br/4889639571970855

Campinas, 06/05/2020.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Fernanda Janku Cabral

Prof^a Dr^a. Cibele Aparecida Tararam

Prof^ª Dr^ª. Lizandra Guidi Magalhães Caldas

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade Estadual de Campinas/ Instituto de Biologia.

Dedico essa dissertação de mestrado aos meus pais Claudia e José Mario, por serem minha base de apoio e amor incondicional, por terem me preparado para os desafios da vida e permitirem meu crescimento por meio dos estudos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meu pais, por me apoiarem na realização dos meus sonhos, por me ajudarem e incentivarem a conquistar meus objetivos, pelo carinho e apoio incondicional, pelas palavras de encorajamento, por mesmo de longe conseguirem me tranquilizar e me darem forças para continuar. Cada mínima conquista minha, cada esforço meu, é para um dia retribuir toda a dedicação de vocês no meu progresso, como pessoa e como profissional. Não seria nada sem vocês!

As minhas irmãs que, mesmo mais novas, têm sem as palavras certas pra me motivarem. Pelo carinho e amor que sempre me incentivaram a dar o melhor de mim para um dia ter condições de ajuda-las a realizar seus sonhos. Vocês são um pedaço do meu coração.

As minhas *dolls*, Bruna e Andréia (*in memorian*), por me acompanharem por todos esses anos me oferecendo palavras de incentivo, por me mostrarem sempre o valor de uma amizade verdadeira. Andréia, espero um dia me tornar uma mulher tão incrível como você foi, seu sorriso, nossas conversas, nossos planos serão sempre lembrados, você era boa demais para esse mundo!

Ao meu namorado, Pedro, por todo amor, carinho e cuidado que tem comigo, pela ajuda, por somar tanto na minha vida e por fazer de tudo para colocar um sorriso no meu rosto.

Aos meninos da república URSSO e agregados, por serem meu refúgio nos momentos de surto, pelas risadas e "rolês" incríveis. Com certeza vocês foram imprescindíveis nessa caminhada.

Aos colegas e amigos do departamento de parasitologia, por me ajudarem tanto, pelos momentos de descontração tornando o meu dia-a-dia mais leve e, claro, a todos que me ajudaram de alguma forma a concluir esse mestrado, seja através de palavras gentis que fizeram toda a diferença ou ao compartilhar o conhecimentos de vocês comigo. Me sinto extremamente grata por ter conhecido pessoas tão incríveis como vocês, tenho certeza que se tornarão profissionais que farão toda a diferença nesse meio acadêmico.

A Bianca, sou grata por sua existência na minha vida, eu nem tenho palavras para agradecer toda ajuda que você já me deu, sua amizade foi uma das melhores coisas que me aconteceram. Tenho orgulho de ser amiga de uma pessoa tão incrível, (muito) inteligente, bondosa, generosa e humilde como você. Você é minha inspiração de cientista.

A minha orientadora Dra. Fernanda Janku Cabral, por ter me ensinado e orientado na bancada, me auxiliando e ajudando na execução deste projeto e por ter me dado a oportunidade do mestrado.

A prof^a Dra. Fabiana Morandi Jordão, minha eterna gratidão por ter me ajudado tantas vezes, por ter me dado não só ensinamentos acadêmicos, como também sobre a vida, tudo isso com carinho e respeito. Obrigada por ter me impulsionado na realização do meu sonho de ser uma pesquisadora. Coragem pra nós!

Aos professores do departamento de parasitologia, pelo conhecimento e ensinamentos passados nas aulas e pelos corredores.

Aos Professores que participaram das etapas de avaliação do Mestrado pela disponibilidade de avaliar o trabalho: aos Profs. Drs Silmara Marques Allegretti e Carlos Eduardo Almeida pela avaliação no exame de qualificação. Ao Prof. Dr. Adriano Cappellazzo Coelho pela avaliação no exame de qualificação e pré-banca. A Profa. Dra. Marlene Tiduko Ueta pela avaliação na pré-banca. As Profas Dras Lizandra Guidi Magalhaes, Cibele Aparecida Tararam, Fernanda Freitas Anibal e Silmara Marques Allegretti pela disponibilidade em avaliar o trabalho na defesa.

Aos Laboratórios de Espectrometria de Massas, pelas análises instrumentais em espectrometria de massas: Laboratório Nacional de Biociências (LNBio-CNPEM), Food Research Center da faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FORC-USP) e ao Prof. Dr. William de Castro Borges e Gustavo Gonçalves da Universidade Federal de Ouro Preto pela análise dos espectros de massas.

As agências de fomento pelo financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (2017/07364-9), Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e à Extensão (FAEPEX) (2547/17), FAEPEX (2476/18) pela bolsa de Mestrado, FAEPEX (2813/18) auxilio viagem para a participação no congresso MEDTROP 2018.

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

RESUMO:

O Schistosoma mansoni, agente causador da esquistossomose, tem um processo de desenvolvimento complexo, envolvendodiferentes estágios e habitats que o parasita possui. Recentemente, tem sido investigados aspectos da maquinaria epigenética envolvidos em seu ciclo. Neste trabalho temos por objetivo investigar a transcrição dos genes das enzimas modificadoras de histonas e determinar as modificações pós-traducionais do ciclo de vida de S. mansoni. Sendo assim, uma busca em bancos de dados GeneDB e NCBI foi realizada para as sequências dos genes que codificam essas enzimas. A partir disso, foram obtidos resultados através de qRT-PCR que permitiu uma análise geral do perfil de transcrição ao longo dos diferentes estágios do parasita que teve maior número de genes com expressão aumentada, em cercária e esquistossômulo 3 dias. Os genes encontrados nessas fases pertenciam a classe das metilases e deacetilases e os transcritos que se sobressaíram foram: Smp 091990, Smp 191310, Smp 160700, Smp 121610 е Smp_1368770, demonstrando potenciais alvos terapêuticos. Para verificar as modificações pós-traducionais das histonas presentes ao longo do ciclo, foi padronizado um método de extração de histonas propioniladas que demonstrou-se eficaz em comparação as histonas não-propioniladas. As modificações identificadas foram, sobretudo, metilações no estágio de cercária. Além disso, em verme adulto macho foram vistas marcas nunca antes determinadas em analises por espectrometria de massas como a ubiquitinação e crotonilação. Portanto, conclui-se que os dados obtidos com a espectrometria validaram a análise de expressão dos transcritos que codificam as enzimas modificadoras de histona, tendo visto alta metilação em cercária em ambas análises.

Palavra-chave: enzima, epigenética, histonas, *Schistosoma mansoni,* esquistossomose mansônica

ABSTRACT:

Schistosoma mansoni, the causative agent of schistosomiasis, has a complex developmental process, involving different stages and habitats that the parasite has. Recently, aspects of the epigenetic machinery involved in its cycle have been investigated. In this work we aim to investigate the transcription of histonemodifying enzyme genes and determine post-translational changes in the S. mansoni life cycle. Therefore, a search in GeneDB and NCBI databases was carried out for the sequences of the genes that encode these enzymes. From this, results were obtained through qRT-PCR that allowed a general analysis of the transcription profile along the different stages of the parasite that had a greater number of genes with increased expression, in cercariae and schistosomule 3 days. The genes found in these phases belonged to the class of methylases and deacetylases and the transcripts that stood out were: Smp 091990, Smp 191310, Smp 160700, Smp 121610 and Smp 1368770, demonstrating potential therapeutic targets. In order to verify the posttranslational modifications of histones present throughout the cycle, a method of extracting propionylated histones was standardized, which proved to be effective in comparison to non-propionylated histones. The identified changes were, above all, methylations in the cercaria stage. Furthermore, in adult male worm, marks never seen before in mass spectrometry analyzes such as ubiquitination and crotonylation. Therefore, it is concluded that the data obtained with the spectrometry validated the expression analysis of the transcripts encoding histone-modifying enzymes, having seen high methylation in cercariae in both analyzes.

Keyword: enzyme, epigenetic, histone, *Schistosoma mansoni,* schistosomiasis mansonica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Schistosoma e a esquistossomose	13
1.2 Epigenética	17
1.3 Modificações pós-traducionais em parasitas	18
1.4 Modificações pós-traducionais em <i>S. mansoni</i>	20
1.5 Identificação de modificações pós-traducionais por espectrometria de	
massas	22
3. OBJETIVOS	24
3.1 Objetivos gerais	25
3.2 Objetivos específicos	25
4. METODOLOGIA	26
4.1 Manutenção do ciclo biológico do <i>S. mansoni</i> e transformação mecânica	3
de cercárias e esquistossômulos para a cultura <i>in vitro</i>	27
4.2 Busca de sequências no banco de dados	28
4.3 Extração de RNA total	32
4.4 Síntese do cDNA	32
4.5 Análise da expressão dos genes que codificam para as enzimas utilizano	oc
PCR quantitativo	33
4.6 Extração de histonas e derivatização química para "botton up proteomic	s"
	34
4.7 Espectrometria de massas para proteínas histonas	35
4.8 Análise dos resultados de espectrometria de massas	35
5. RESULTADOS	36
5.1 Perfil de transcrição do mRNA dos genes que codificam as enzimas	
modificadoras de histonas	37
5. 2 Extração de histonas para "botton up proteomics"	42
6. DISCUSSÃO	57

6. 1 Transcrição do mRNA dos genes que codificam as enzimas r	nodificadoras
de histonas.	58
6. 2 Extração de histonas para "botton up proteomics"	64
7. CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
ANEXO	78

1. INTRODUÇÃO

1.1 Schistosoma e a esquistossomose

A esquistossomose é uma enfermidade causada por trematódeos do gênero *Schistosoma*, cujas principais espécies encontradas em humanos são: *Schistosoma haematobium, Schistosoma japonicum* e *Schistosoma* mansoni, sendo essa última a única espécie descrita no Brasil devido a sua coexistência com o hospedeiro intermediário suscetível a esse parasita, o caramujo do gênero *Biomphalaria,* fato este que não ocorre com as demais espécies do helminto (BRASIL, 2018; COLLEY *et al.,* 2014; SOUZA *et al.,* 2011). A doença está concentrada em regiões tropicais e subtropicais do mundo, acometendo a população que se encontra em condição de pobreza e zonas rurais onde o saneamento básico é precário ou inexistente afetando, sobretudo, crianças e jovens [STOTHARD *et al.,* 2011; WHO, 2019a).

Dados da Organização Mundial da Saúde apontam que em 2016, obtevese um registro global de aproximadamente 190 milhões de casos de esquistossomose (GBD, 2017). Já em 2017, estima-se que cerca de 140 milhões de pessoas pertencentes a regiões de baixa e média renda de diferentes países são portadoras da doença. Apesar dos números de casos terem diminuído quando comparamos os levantamentos desses dois anos, o número ainda é bastante elevado, o que obriga diversas organizações a trabalharem ativamente no desenvolvimento de medidas preventivas utilizando quimioterápicos, tendo em vista a economia em um tratamento futuro, pós infecção (WHO, 2019b).

No Brasil, dados do Ministério da Saúde observados entre os anos de 2010 a 2015, indicam que a distribuição de casos positivos para a esquistossomose compreende a região de Minas Gerais até o Rio Grande do Norte, sobretudo a região litorânea (Figura 1). No ano de 2017, foram confirmados 508 óbitos em decorrência das complicações da patologia e, há uma estimativa, de que pelo menos 1,5 milhões de pessoas estejam vivendo em área de risco para a infecção (BRASIL, 2019).





O Schistosoma apresenta ampla variação morfológica e biológica ao longo do seu ciclo de vida, sendo que essa constante mudança ocorre em razão das diferentes localizações que o parasita apresenta. Como exemplo, têm-se a sua necessidade de migrar por diferentes órgãos e tecidos do hospedeiro definitivo vertebrado, além de apresentar fases de vida livre e uma parte do ciclo no interior do hospedeiro intermediário para que seu desenvolvimento seja completo (ABE *et al.*, 2018; BASH, 1990; COLLEY *et al.*, 2014).

Já no estágio final o parasita, sob a forma de verme adulto, se encontra alojado nas veias mesentéricas e encontra-se com dimorfismo sexual, o que possibilita a reprodução do tipo sexuada. Após a cópula, a fêmea deposita os ovos com espicula em veias intestinais de menor calibre, podendo chegar a uma quantidade de 400 ovos em um dia (BASH, 1990; SOUZA *et al*, 2011). Essa

grande quantidade de ovos induz uma reação inflamatória crônica e focal, levando a agregação de células como, por exemplo, os monócitos, tendo como consequência a formação de granulomas (LENZI *et al.*, 1998), que provocam a obstrução e até mesmo o rompimento de vênulas, promovendo o aparecimento de sangue nas fezes (ABE *et al.*, 2018).

Os ovos maduros e imaturos são levados ao ambiente externo através do bolo fecal, onde posteriormente os ovos maduros que contém o miracídio, libera as larvas quando encontram-se em local propício, ou seja, ao entrar em contato com a água, luz e temperatura em torno de 28°C, além de depender do nível de oxigenação da água. Em seguida, os miracídios nadam indo de encontro ao molusco, sendo ele vetor ou não, devido a sua atração pelos quimiorreceptores, no entanto, seu desenvolvimento só ocorrerá nos moluscos do gênero *Biomphalaria*, como já dito anteriormente *(*CARVALHO *et al.,* 2008).

Já no interior do caramujo, o miracídio perde seus cílios e transforma-se em esporocisto primário. Posteriormente, transformam-se em esporocisto secundário através da reprodução do tipo assexuada, a poliembrionia, que dará origem a cerca de 100 a 400 mil cercárias que manterão o sexo do miracídio que o originou (CARVALHO *et al.,* 2008; SOUZA *et al.,* 2011).

Assim que ocorre a formação das cercárias, as mesmas são liberadas no meio aquático nos períodos de maior luminosidade e calor e, em seguida, nadam até encontrarem seu hospedeiro definitivo, infectando-o através da penetração ativa que pode ser tanto pela pele, quanto pela mucosa, levando a irritação no local (CARVALHO *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2011).

No momento da penetração, a cercária libera sua cauda e transforma-se em esquistossômulo, no entanto, para que haja essa transformação completa, o parasita tem que passar por diversas barreiras como o estrato córneo, o conjunto de adesões celulares, a junção dermo-epidérmica, atravessa a derme e por fim passa pela parede dos vasos para alcançar a corrente sanguínea ou linfática (CARVALHO *et al.*, 2008).

Após uma hora sabe-se que o parasita já perdeu boa parte de seu glicocalix, além disso, há modificações tanto em seu tegumento passando de trilaminada para heptalaminada, como em seu metabolismo (STIREWALT, 1974). No entanto, apesar dessas intensas mudanças e altos níveis de mRNA, não é possível relacionar esses eventos com uma alteração na expressão gênica, sugerindo um bloqueio pós-transcricional que impede sua tradução em proteínas como a HSP (Heat Shock Protein 70) por pelo menos 24 horas desde o início da transformação do parasita de cercária para esquistossômulo (BLANTON & LICATE, 1992).

Por fim, que fará um percurso pelos vasos sanguíneos do hospedeiro definitivo até alcançar o sistema portal onde dará início a diferenciação sexual. Em seguida, os vermes adultos, já diferenciados, dirigem-se as veias do mesentério onde farão a postura dos ovos (CARVALHO *et al.,* 2008; SOUZA *et al.,* 2011).



Figura 02: Ciclo biológico do *Schistosoma mansoni*. Fonte: Adaptado de https://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.html

Portanto, tendo em vista a grande e notável complexidade no desenvolvimento e diferenciação do *Schistosoma* ao longo de seu ciclo, estudos têm sido feitos a fim de demonstrar a correlação desses processos com diversos mecanismos epigenéticos (CABEZAS-CRUZ *et al.*, 2014; ROQUIS *et al.*, 2018),

tendo como exemplo as modificações pós-traducionais de histonas (AZZI *et al.,* 2009; COSSEAU *et al.,* 2009; ROQUIS *et al.,* 2015; ROQUIS *et al.,* 2018).

1.2 Epigenética

Epigenética é o termo aplicado para o conjunto de alterações na expressão de genes, sem modificar a sequência de bases do DNA, sendo este processo reversível, mas que se perpetua por todas as gerações dos organismos vivos (WADDINGTON, 1956). Os mecanismos de regulação epigenética estão associados às modificações pós-traducionais, metilação do DNA, histonas variantes, fatores de remodelação da cromatina e RNAs não-codificantes, como os micro-RNAs (miRNAs) que vêm sendo cada vez mais demonstrado sua participação nessa categoria (CABEZAS-CRUZ *et al,* 2014). Com destaque às modificações pós-traducionais, sabe-se que esse mecanismo promove a regulação da expressão gênica atuando diretamente nas proteínas de empacotamento de DNA denominadas histonas (ARROWSMITH *et al.,* 2012; CABEZAS-CRUZ *et al.,* 2014).

As histonas possuem caudas que estão sujeitas a modificações enzimáticas reversíveis promovendo marcas por metilação, acetilação, fosforilação, glicosilação, sumorilação ou ubiquitinação que podem alterar as propriedades estruturais e funcionais da cromatina (Figura 03). Dessa forma, há participação dessas enzimas na regulação da transcrição (ARROWSMITH *et al.,* 2012), devido a sua ação de ativar ou reprimir a expressão gênica.



Figura 03: Demonstração de um nucleossoma onde há presenças de marcações na cauda das histonas, realizadas por enzimas modificadoras de histonas do tipo metilase, acetilase e ubiquitinase. Adaptado de: CUI & MIAO, 2010

Dentre as marcas ocasionadas pela adição de um grupo químico por essas enzimas, as mais abundantemente encontradas são as marcas de acetil e metil e, portanto, são amplamente estudadas como potenciais alvos terapêuticos. No entanto, as diferentes combinações dessas marcas e seu padrão de aparecimento são alterados de acordo com o tipo celular (ERNST *et al.*, 2011).

Já se tem conhecimento que a acetilação da histona está associada ao desempacotamento da cromatina, ou seja, promove um estado permissivo para a transcrição, enquanto a metilação resulta em repressão ou ativação, dependendo da posição da marca nas caudas das histonas (LI, CAREY & WORKMAN, 2007).

1.3 Modificações pós-traducionais em parasitas

Diferentes parasitas com ciclos heteróxenos apresentam variação morfológica, biológica e de habitat no interior de seus hospedeiros e têm a necessidade de regular sua expressão gênica como forma de sobrevivência e adaptação (DIXON *et al.*, 2010; HORROCKS *et al.*, 2009; PICCHI *et al.*, 2017, ROQUIS *et al.*, 2018).

O parasita *Trypanosoma cruzi*, causador da Doença de Chagas, tem sua expressão gênica regulada por modificação pós-traducional comprovada, no entanto, sua descoberta ainda é recente e os mecanismos ainda estão em estudo. Além disso, apesar de possuir histonas com algumas peculiaridades, como caudas N-terminal com sequência diferenciada, os resíduos presentes nessas caudas, que são substratos para as modificações, parecem ser conservados bem como algumas de suas marcas deixadas por essas modificações (PICCHI *et al.,* 2017).

As modificações descritas para esse parasita, até o momento, foram a metilação, fosforilação e acetilação, esta última com cerca de 50 marcas identificadas. Quanto a metilação e a fosforilação há indícios de que as marcas mediadas por essas modificações sejam reguladas durante a sua diferenciação para a forma infecciosa do parasita (da CUNHA *et al.,* 2006).

A importância que essas modificações têm para a progressão dos tripanossomatideos no ciclo, pode ser demonstrado no estudo realizado por Janzen *et al.* (2006), utilizando o *Trypanosoma brucei.* Após silenciar a enzima metiltransferase DOT1A, que promove a marca H3K76, houve desregulação na quantidade de DNA presente nas células do parasita. Esse resultado foi gerado como consequência da progressão antecipada da mitose, sem a replicação do DNA (Janzen *et al.*, 2006).

Assim como no *T. cruzi*, o apicomplexa *Plasmodium falciparum* também possui seu nucleossomo conservado contendo H2A, H2B, H3 e H4, com indícios de marcas nas caudas N-terminais indicando, a presença de modificações póstraducionais (CARY *et al.* (2006) 1994). Nesse apicomplexa foi identificado um padrão de promotores transcricionalmente ativos quando havia a presença da marca H3K9ac e silenciado quando as caudas das histônias possuíam a marca H3K9me3 (CUI, 2007).

É possível notar variação nas modificações presente nas caudas Nterminal das histonas de acordo com o estágio no qual o plasmódio se encontra principalmente entre as fases de desenvolvimento assexual e sexual revelando que essas modificações estão diretamente relacionadas com a fase no qual o parasita se encontra (COETZEE *et al.,* 2017).

Mediante a isso, Coetzee *et al.* (2017) identificaram a presença de modificações associadas a ativação da transcrição em esquizontes durante a fase assexual, contrapondo-se as modificações encontradas em gametócitos em que há maior abundância de marcas repressivas.

1.4 Modificações pós-traducionais em S. mansoni

Em estudo de Dillon *et al.* (2006) foi demonstrado que a expressão gênica do parasita está transcricionalmente menos ativa em estágios larvais e depois durante o desenvolvimento do esquistossômulo, a transcrição se torna, progressivamente, mais ativa até o estágio de vermes adultos, totalmente diferenciados. Desta forma, acredita-se que a transcrição e tradução dessas enzimas responsáveis por realizar essas modificações pós-traducionais variam ao longo dos estágios do parasita *S. mansoni*.

Nos experimentos de Roquis *et al.* (2015), foi visto um alto conteúdo de metilação do tipo H3K27me3 e H3K9me3 que mantém as cercárias em um estado *poised* para transcrição, ou seja, pronto para transcrever, porém ainda silenciado. Enquanto no estágio de esquistôssomulo a enzima deacetilase se faz importante para que o parasita continue evoluindo, visto que a inibição dessa enzima com RNA de interferência (RNAi) teve como consequência uma diminuição significativa de vermes adultos recuperados através da perfusão do sistema porta e veias mesentéricas dos camundongos, após 35 dias de infecção (MAREK *et al.*, 2013).

No estudo realizado por Cabezas-Cruz *et al.* (2014), sugere-se que enzimas como a metiltransferase podem estar relacionadas com o silenciamento da transcrição, pois adiciona grupos metil nas caudas das histonas enquanto a acetilação, que adiciona grupos acetil, agiria de forma contrária, promovendo a descompactação da cromatina permitindo a transcrição. Além disso, também foram realizadas buscas pelas sequências depositadas nos bancos de dados genomicos, dos genes que codificam essas enzimas, para o estabelecimento de novos alvos terapêuticos mais modernos contra a esquistossomose.

A inibição da enzima deacetilase utilizando trichostatin A (TSA) demonstrou-se efetiva contra o parasita, impedindo o desenvolvimento do miracídio para esporocisto sem resultar em apoptose e podendo ser reversível após interrupção da inibição, evidenciando a importância dessa enzima para o desenvolvimento do parasita (MAREK *et al.*, 2013).

Foi visto que a inibição da enzima EZH2 que realiza a trimetilação da histona H3 na lisina 27 (H3K27me3), causou diminuição na postura de ovos pela fêmea, além de promover danos no parasita desse estágio e em esquistossomulos (PEREIRA *et al.*, 2018). Além disso, nesse estudo acima foi relatado os genes que codificam proteínas relacionadas a transporte transmembrana, homeostase celular e desenvolvimento dos ovos apresentaram expressão alterada. A expressão também estava alterada para genes que estão envolvidos na replicação do DNA e em vias relacionadas ao metabolismo de RNAs não codificadores em parasitas fêmeas, sugerindo que a trimetilação das histonas são importantes tanto no desenvolvimento do parasita, quanto na manutenção do parasitismo, visto que, sua inibição levou a inúmeras consequências.

Baseado nesses dados de estudos pontuais que identificam a importância de enzimas especificas através de sua inibição, podemos constatar que os autores sugerem que inibidores específicos dessas enzimas poderão se tornar novos alvos terapêuticos epigenéticos contra a esquistossomose (COETZEE *et al.,* 2017; COUTO, BARBER & GASKELL, 2011; PADALINO *et al.,* 2018). A busca em bancos de dados e posterior investigação de alvos enzimáticos através de inibidores, têm sido estudados como também a utilização de estratégias de reposicionamento de fármacos já existentes (SILVA *et al.,* 2013). Sendo assim, é possível ver a carência na literatura de estudos que forneçam um panorama geral das enzimas que são expressas ao longo do ciclo do parasita.

Essa nova abordagem de terapia é muito promissora visto que existe apenas um fármaco disponível, o Praziquantel (PZQ). Este medicamento está disponivel há mais de 40 anos e sua ação nas fases larvais do parasita é limitada pois sua sensibilidade ao medicamento é menor se compara ao estágio de verme adulto, além de existir a possibilidade de atuar selecionando cepas resistentes quando em uso massivo pela população (COLLEY *et al.,* 2014). A ação do PZQ ocorre na fase de verme adulto, sendo este estágio o responsável pela sintomatologia da doença com a deposição de ovos (HUNT *et al.*, 1986; ZUBAREV, KELLEHER & MCLAFFERTY, 1998). Assim, o estudo sistemático das expressões dos transcritos do parasita, pode clarificar alvos ainda não conhecidos tanto para o estudo da regulação epigenética da expressão gênica, como para a identificação de potenciais alvos quimioterápicos específicos contra a esquistossomose, baseados na expressão gênica e na atividade da proteína em determinados estágios do ciclo de vida do parasita.

1.5 Identificação de modificações pós-traducionais por espectrometria de massas.

Uma das formas de detectar as modificações pós-traducionais é através da técnica de espectrometria de massas que visa determinar o peso molecular dos compostos ionizados, caracterizar sua estrutura e determinar sua abundância. Para uma identificação precisa é necessário alta pureza com baixa degradação e baixa quantidade de contaminantes, além de baixa competitividade de outras proteínas que não se deseja estudar (SILVA *et al.,* 2013).

Para identificar as marcas presentes nas caudas das histonas de parasita, inicialmente cultiva-se o parasita *in vitro*, seguindo os protocolos adequados. Em seguida, realiza-se a extração das histonas que são derivatizadas com anidrido propiônico seguido de digestão com tripsina para gerar peptídeos de 5 - 20 aa de comprimento, tamanho reduzido que facilita a identificação pelo equipamento (SIDOLI *et al.,* 2016).

Os métodos para identificação das modificações pós-traducionais podem se dividir em três: *bottom-up*, *top-down* e *middle-down*, sendo a primeira a técnica tradicionalmente utilizada e consiste no fracionamento da proteína através de enzimas como a, já citada anteriormente, tripsina para só então ser analisada por espectrometria de massa por cromatografia líquida (LC) ou espectrometria de massa em tandem (MS / MS). Já a técnica de *top-down* não realiza o fracionamento da proteínas, no entanto, possui algumas desvantagens como menor sensibilidade, necessidade de grandes quantidades de amostra e instrumentação mais sofisticada. Por fim a *middle-down* promove a digestão das

proteínas em peptídeos de 3 a 9 kDa e sua sensibilidade é maior que de *top-down*, no entanto, a técnica de *bottom-up* continua sendo a melhor alternativa para a identificação de modificações pós-traducionais em histonas (MORADIAN, *et all.* 2013).

A detecção ocorre após separação das moléculas ionizadas de acordo com a massa-carga, gerando um espectro de massa, desta forma, essa técnica tem sido amplamente utilizada na identificação de proteínas de diversos organismos. No entanto, no que diz respeito ao estudo das modificações pós-traducionais em *Schistosoma*, a espectrometria de massas ainda é pouco explorada, tendo sido encontrada poucos trabalhos na literatura relacionados a esse tema (CABY *et al.,* 2017; HONG *et al.,* 2016).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Desta forma, o presente estudo tem por objetivo realizar uma análise da expressão dos transcritos que codificam as enzimas que estão anotadas no banco do parasita e comparar com o mapa de modificações pós-traducionais de histonas, para o estudo da dinâmica das alterações epigenéticas.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar por RT-PCR em tempo real e determinar o perfil de transcrição dos genes codificadores das enzimas modificadoras de histonas, mostrando as expressões das enzimas e comparar com as modificações que ocorrem no ciclo.
- Padronizar um método para mapear as prováveis modificações póstraducionais de histonas através de espectrometria de massas (LC-MS/MS);

4. METODOLOGIA

4.1 Manutenção do ciclo biológico do *S. mansoni* e transformação mecânica de cercárias e esquistossômulos para a cultura *in vitro*.

O ciclo biológico do *S.mansoni*, linhagem Belo Horizonte (BH), é rotineiramente mantido no Departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), em camundongos Swiss femeas de 21 dias, pesando 20 g e moluscos *Biomphalaria glabrata*.

Os ovos do *S.mansoni* presentes nas fezes de camundongos, previamente infectados com o parasita, foram recolhidos pelo método de Hoffmann e expostos por aproximadamente 1 hora sob luz, para a liberação de miracídio. Cerca de 10 miracídios são utilizados para infectar o hospedeiro intermediário, o caramujo da espécie *Biomphalaria glabrata*.

Após 38 a 43 dias da infecção dos caramujos, eles já se encontram aptos a liberar cercárias, forma infectante do parasita para o hospedeiro vertebrado, após ficar sob iluminação artificial por 2 horas. Os camundongos são expostos a cerca de 70 cercárias contadas manualmente, por meio da introdução da sua cauda em um tubo de ensaio contendo água declorada e o parasita, estando sob iluminação por cerca de 2 horas.

Os vermes adultos são perfundidos do sistema porta-hepático após 50 dias mantidos *in vivo*, conforme a metodologia utilizada por Smithers e Terry (1965). Após a coleta, os parasitas são mantidos em solução salina 0,9% ou no meio RPMI (Vitrocell). Para a obtenção dos vermes (macho ou fêmea), estes são mecanicamente separados com o auxílio de um pincel, sendo em seguida congelados e mantidos à -80°C, até o momento do uso.

São estimadas cerca de 100 mil cercárias coletadas do caramujos e que foram transformadas mecanicamente em esquistossômulos para a realização da cultura *in vitro*. A metodologia utilizada foi feita através da quebra mecânica de cauda assim como mostra Ramalho-Pinto *et al.* (1974), utilizando seringa e agulha 23G x 1", incubação por 3h em estufa de CO₂ para que ocorra a inversão metabólica da forma larval aeróbia para a forma intra-mamífero, depois foi feito a lavagem em meio RPMI para a retirada das caudas das cercárias e finalmente a incubação com meio 169 enriquecido com 5% de soro

bovino, hormônios (serotonina, hipoxantina, triiodotironina e hidrocortisona), cuja concentração final foi de 1 mM assim como descreve Paul F. Basch (1981), além da adição de antibiótico e antifúngico (para mimetizar o desenvolvimento intra-mamífero em 24h, 3 e 5 dias sem que haja a interferência de contaminantes.

4.2 Busca de sequências no banco de dados

Através do que já foi descrito na literatura de genes que codificam enzimas modificadoras de histonas (acetilases, deacetilases, metiltransferases e demetilases) e comparando com o levantamento feito por Cabezas-Cruz *et al.* (2014), foi possível obter o número de acesso utilizado para identificação desses genes através da plataforma Gene DB e NCBI, totalizando no final das buscas em 55 genes (Tabela 1)

Tabela 01- Numero de acesso dos genes utilizados para síntese de oligonucleotídeos e sua anotação segundo o Gene DB V7.

Nº de acesso	Anotação no Gene DB V7
Smp_005210	histone deacetylase
Smp_093280	histone deacetylase 3
Smp_091990	histone deacetylase 8
Smp_191310	histone deacetylase 4
Smp_069380	histone deacetylase 4
Smp_138770	histone deacetylase 6
Smp_138640	sirtuin 1
Smp_084140.3	sirtuin 2
Smp_055090	sirtuin 5
Smp_210340	sirtuin 6
Smp_024670	sirtuin 7
Smp_070190	histone acetyltransferase GCN5
Smp_178700	histone acetyltransferase type B catalytic
Smp_053140	histone acetyltransferase tip60
Smp_194520	histone acetyltransferase myst 1
Smp_ 198670	histone acetyltransferase myst 2
Smp_131320	histone acetyltransferase myst
Smp_105910	histone acetyltransferase, CBP/p300 family
Smp_127010	CREB binding protein
Smp_078900	histone lysine N methyltransferase E(z)
Smp_138030	histone lysine methylation
Smp_144180	histone lysine N methyltransferase MLL
Smp_210660	histone-lysine N-methyltransferase MLL
Smp_160700	histone-lysine N-methyltransferase
Smp_137060	histone lysine N methyltransferase

Smp_055310	histone lysine N methyltransferase setd8
Smp_027300	histone lysine N methyltransferase SUV39H2
Smp_062530	histone lysine N methyltransferase SUV4 20
Smp_210650	histone lysine N methyltransferase SETD 2
Smp_140390	histone lysine N methyltransferase
Smp_150850	histone lysine N methyltransferase setb1
Smp_043580	histone lysine N methyltransferase SETMAR
Smp_000700	SET and MYND domain containing protein 4
Smp_124950	SET and MYND domain containing protein 4
Smp_121610	SET and MYND domain containing protein
Smp_165000	histone lysine N methyltransferase
Smp_029240	protein arginine N methyltransferase 1
Smp_137950.1	leucine rich repeat containing protein 56
Smp_070340	protein arginine n methyltransferase
Smp_171150	protein arginine N methyltransferase 5
Smp_025550	protein arginine N methyltransferase 7
Smp_150560	lysine specific histone demethylase 1A
Smp_169550	lysine specific histone demethylase 1B
Smp_160810	amine oxidase
Smp_162940	amine oxidase
Smp_132170	jumonji domain containing protein
Smp_213920.1	jumonji domain containing protein
Smp_137240	phosphatidylserine receptor
Smp_196270	lysine specific demethylase 7
Smp_156290	jumonji domain containing protein
Smp_019170	lysine specific demethylase lid
Smp_034000	lysine specific demethylase 6a
Smp_125110	SET domain protein
Smp_243580	myst histone acetyltransferase
Smp_165360	myst histone acetyltransterase

Em seguida, o número de acesso possibilitou que recuperassemos as sequências dos transcritos depositados no banco de dados (NCBI e Gene DB) para o desenho dos oligosnucleotídeos específicos desses genes utilizando o algoritmo Primer 3. Determinamos para o desenho desses oligos uma temperatura de anelamento de 60°C e conteúdo de GC 50% e delimitamos o tamanho dos transcritos de 80 a 120 pb (Tabela 2).

Tabela 02- Oligonucleotídeos que foram sintetizados com suas respectivas sequências de bases reverse (R) e forward (F), temperatura de melting (TM), porcentagem de gc (GC %) e amplicon (tamanho do transcrito) em números de pares de base (pb).

N° de acesso	Sequência	ТМ	GC (%)	Amplicon (pb)
	R- ACTGAGAGACGGGATGGATG	60.07	55	
Smp_005210	F-CGGGTCGAAAAGTTTCCATA	59.93	45	83
	R-GTACTTCAATGTGGCGCTGA	59.87	50	

Smp_093280	F-GAACACATCTCCCGTGACCT	59.97	55	85
	R-TGAGGCTTCTGGATTTTGCT	59.96	45	
Smp 091990	F- GAAGTTTCTGGTGGGGTTGA	59.94	50	81
· -	R-GTTGTTGATTTGGCATGTCG	59.97	40	
Smp 191310	F- AGCTTGACCTGGTTCTGCAT	59.87	50	95
	R-CAGATCAAGCGATGGGATTT	60.04	45	
Smp 069380	F-TTCGAAACAATACGCTCACG	59.87	45	82
- <u>-</u>	B-GCATGGAATGGGAGAGATGT	59.89	50	
Smp 138770	E-CAGAATCAGCTGTGGTCGAA	59.98	50	99
	B-TTCCCTGGTCAGTTTTCACC	59.94	50	
Smp 138640		59.94	55	113
		59.89	50	110
Smp 084140.3		60.16	50	101
	B-CAAATCCTGGTTTGGTTTGG	60.20	45	101
Smp 055090		60.20	50	91
0p_000000	B- GCTTTCCAAGAGACCGTTTG	59.85	50	01
Smp 210340		59.00	55	107
	B- GCTGTCAATGCCACTTCAAA	59.85	45	107
Smp 024670		50.00	40	102
01110_024070		50.00	40	102
Smp 070190	F. TTACGAACCCCCTTCAAAT	50.50	40	109
0110_070130		60.22	40 50	100
Smn 178700		50.08	55	96
5mp_170700		60.12	45	50
Smp 053140		60.10	40	03
5mp_055140		60.10	50	55
Smp 10/520		60.10	30	117
511p_194520		60.20	45	117
Smn 108670		60.02	50	105
Sinp_ 190070		60.12	50	105
Smn 121220		60.07	50	00
5mp_151520		60.07	50	00
Smn 105010		50.07	33	01
Sillb_102910		59.97	40	31
Smn 107010		59.97	50	116
Ship_127010		60.03	50	110
Smn 079000	R-IGUUIUIGGGAATIUIAIGG	60.03	50	100
Silib_010900		59.99	50	100
Smn 129020		59.94	50	95
311p_130030		59.87	50	00
Cmm 144100		59.91	50	00
Smp_144160		60.07	45	09
Smp 010000		59.94	40	100
Smp_210660		60.05	45	103
Cmm 160700		60	55	110
Smp_160700		59.83	50	113
Cmm 107060	R-AAGICGGIICACAICCIIGG	59.97	50	07
Smp_137060	F-IGAAIGACCGICCIIICICC	60.05	50	8/
0	R-ACGACTIGGCCGATIGATIA	60.47	45	100
Smp_055310	F-IGATITACGCGCAAACAAIG	60.65	40	106
Cmm 007000	K- TICGATTIGGATTICGAAGG	60.0	40	100
Smp_027300	F- IGAGATIGGGATCACACGAA	60.05	45	100
0	K-TUTGGACACTGTCGAAGACG	60.02	55	
Smp_062530	F- IGGATAACTCGGCGGTTAC	59.96	50	111
0	K-AACACATCCCCGTTTCAGAG	59.97	50	00
Smp_210650	F-GIGAGGAICGGAIGICCACT	59.93	55	86
0	R-CGIGIGAIGGGIGAATCTTG	59.96	50	100
Smp_140390	F-CCGACCTIGGTIGAAAGTGT	60.01	50	106
	R-ATTCACCACCGAACGAAGTC	59.97	50	

Smp 150850	F-TTCTTGGGAGGATTCAGTGG	60.04	50	80
• <u> </u>	R-TGGTCGCAATTTTATCATGG	59.38	40	
Smp 043580	F-TTAGGCGTGCTTTCGACTTT	60.02	45	116
	R- GCTGCGAAAAATGATTCCAT	60.05	40	
Smp_000700	F- GGCAAAGAAAATCGCTTCAG	59.96	45	114
	R-TCATTCATGCGATCCGAATA	60	40	
Smp_124950	F- TGCGGTCCATAACAATGAAA	59.93	40	111
	R- CCATTGAAAAAGGCAAGGAA	60.05	40	
Smp_121610	F-ATAGACATGCGGCAACAATG	59.57	45	120
	R-TCCCGTTTTTCAACATCACA	59.94	40	
Smp_165000	F-CCAGTGTCGTTTACGTGGTG	60.06	55	109
	R-ACCTCCAGAATACCCCAAGG	60.18	55	
Smp_029240	F-GGTGCCAACCATTTGTCTCT	59.97	50	114
	R-AGACGGGGAAAAGTCAGGAT	59.93	50	
Smp_137950.1	F-TGTTTCAATGCTGAGGTTGG	59.69	45	96
	R-TTTGCTGGGGTTTGATTCTC	60.05	45	
Smp_070340	F-AATGGAAGTTCGGGTCTCCT	59.93	50	106
	R-CGACGATTGATGTTGATGCT	60.02	45	
Smp_171150	F-TGCAGCCCAACTAAGTTCCT	60.20	45	83
	R-TCCATGTGCTCGATATTGGA	60.03	45	
Smp_025550	F-GTTGCCATTGGAAGAAAGGA	60.05	45	106
	R-CGTTTGCCTGATTGGAAAAT	59.94	40	
Smp_150560	F-TGTGTGAACGATCCCAAAAA	59.94	40	103
	R- CCCATGACTTTTTGGCAAGT	59.97	45	
Smp_169550	F-GGGAGTGGATCAGGAGACAA	60.05	55	115
	R-GTTGCCGTTTACGTGATGTG	60.03	50	
Smp_160810	F-TCCGCTTCTTTGTTCTTCGT	59.99	45	99
	R-CCCATGACTTTTTGGCAAGT	59.97	45	
Smp_162940	F-GGGAGIGGAICAGGAGACAA	60.05	55	115
0 400470	R-CCCAAAGIIGGCGAICIAAA	60.07	45	447
Smp_132170	F-ICCACACCACAAAGGGIACA	59.85	50	117
0	R-GGACACCTITICACGCTGAT	60.12	50	07
Smp_213920.1	F-CAGGAGGAAAAATCCACCAA	59.90	45	8/
0		59.86	50	
Smp_137240	F-CGIGCAGITIIGIGCCATAC	60.18	50	114
Smn 106070		59.93	50	106
Smp_196270		60.10	45	100
Smn 156200		50.00	40	110
Sillb_120230		59.99	40	112
Smp 010170	E CTTCCTACAACCCCTCCATT	59.9	50	80
Sillp_019170		60.05	30	00
Smp 03/000	F. TTGCACAGGTGTTGAAGGA	50.05	40 50	92
3mp_034000		50.07	50	52
Smp 125110		60.07	50	105
5mp_125110	R. ATCCACGTAACGTCCTCCTC	60	55	105
Smn 243580		50 07	15	Q <i>1</i>
011p_240000		60.01	45	54
Smn 165360	F. TTGCATCAGTGGTCCAGAAG	50.01	50	106
5mp_105500	I - I I UCATUAUTGUTUUAGAAG	55.05	50	100

Depois de sintetizados, foi determinada a eficiência desses oligonucleotídeos através de qPCR utilizando DNA genômico, do parasita em diferentes concentrações (1 μ g e 2 μ g) e que deveriam amplificar com uma eficiência de ±2 Cts em relação ao gene endógeno SmEIF4E (Smp_001500),

gene codificador do fator de iniciação da tradução eucariótica 4E e não tem sua expressão variada ao longo do ciclo do parasita, conforme descrito em Cabral & Wunderlich (2009). Também testamos todos os oligos por PCR convencional e analisamos em gel de agarose 1.5% para verificarmos se todos os oligos estavam amplificando no tamanho correto. No entanto, foi visto que 6 oligos não apresentaram eficiência e serão redesenhados, totalizando ao final 49 oligos que serão utilizados para a análise de expressão dos transcritos

4.3 Extração de RNA total

O RNA total foi obtido dos parasitas nos diferentes estágios do ciclo como cercária (≈100mil), esquistossomulo 24h, 3 e 5 dias e verme adulto (um *pool* de amostra com 10 parasitas) adicionando 750µL de Trizol (Sigma) ao *pellet* formado das culturas/massa parasitária, que foi homogeneizado com Politron após ter sido incubado por 15 minutos em temperatura ambiente.

Em seguida, foi adicionado 200µL de clorofórmio, agitou-se em vortex por 1 minuto, deixou em incubação por 15 minutos em temperatura ambiente e centrifugou essas amostras por mais 15 minutos a 4ºC em uma velocidade de 14000 g. Nesse momento, as amostras apresentam 3 fases, estando o DNA/RNA presente na fase aquosa que compreende a parte superior. Retirouse esse líquido, transferindo-a para um novo tubo onde foi adicionado 500 µL isopropanol.

Após incubação do material em gelo por 1 hora, foi centrifugado por 45 minutos a 14000 g a 4°C, promovendo a formação de um *pellet* que foi lavado com 1 mL de etanol 70%. Por fim, as amostras foram secadas naturalmente por 2 minutos e ressuspendidas em 20 µL em água RNAse *free*. Estocou-se a -80°C até o momento do uso.

4.4 Síntese do cDNA

Para a síntese de cDNA inicialmente degradamos qualquer resquício de DNA que ainda esteja presente na amostra de RNA total através da utilização da DNAse (Sigma), cuja metodologia seguida foi a fornecida pelo fabricante, para que não houvesse interferência de DNA genômico. Sendo assim, em seguida, cerca de 0,5 µg de RNA total obtido na extração do parasita nos estágios citados anteriormente foram adicionados ao reagente iScript (Biorad), após diluição de

5x para 1x, que contém uma mistura de random oligos, oligo dT, dNTPs, estabilizadores e transcriptase reversa, seguindo as recomendações do fabricante. Nesse momento, uma alíquota da amostra sem a transcriptase reversa foi separada para ser utilizada como controle durante as análises por PCR convencional, com gel de agarose, para a verificação da integridade do cDNA sintetizado. Desta forma, o aparecimento de bandas sem a presença da enzima caracteriza em contaminação da amostra por DNA.

Em seguida, ciclos de temperaturas foram utilizadas. Para a preparação, a solução foi mantida a uma temperatura de 25ºC por 5 minutos, para a ativação da transcriptase reversa foi deixado a 46ºC por 20 minutos e por fim, para a inativação elevou a temperatura para 95ºC mantendo por 1 minuto.

Após teste com PCR convencional em gel de agarose cujo oligonucleotídeo utilizado foi o SmEIF4E e como controle positivo o gDNA extraído de 10 vermes adulto, foi possível ver se a síntese do cDNA apresentava eficiência e nenhuma contaminação.

O cDNA foi estocado a -20 °C, até o momento do uso.

4.5 Análise da expressão dos genes que codificam para as enzimas utilizando PCR quantitativo

Para quantificação dos níveis de transcritos dos genes que codificam as enzimas modificadoras de histonas em *S. mansoni* foi utilizada a técnica de PCR em tempo real. As reações da PCR foram realizadas utilizando o kit iTaq Universal SYBR Green supermix (Biorad), que contêm em sua formulação uma mistura de DNA polimerase, dNTP, SYBR Green, ROX e estabilizadores. Foram adicionados 7µL desse supermix a 2 µL de primer de cada gene, mais 1 µL de cDNA em cada poço da placa de 96 poços.

As análises foram feitas utilizando o método do Δ Ct, através da fórmula 2- Δ Ct (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001) para calcular a expressão gênica relativa dos genes em estudo, conforme boletim técnico do fabricante do aparelho de qPCR (Applied Biosystems 7500).

4.6 Extração de histonas e derivatização química para "botton up proteomics"

O procedimento de preparo da amostra para espectrometria baseou-se no protocolo publicado por Sidoli *et al.* (2016) e está brevemente descrito a seguir.

Primeiramente, os núcleos foram extraídos em tampão de lise (Tampão Salina-Fosfato PBS, 0,5% Triton x-100, 0,02% NaN₃) e brevemente sonicados. Quanto as histonas, seu processo de extração se deu através da utilização de ácido clorídrico 0,25 M, sob agitação, e precipitadas em 33% TCA visto que esta proteína possui caráter básico, posteriormente lavadas em acetona e ressuspendidas em água ultrapura e inibidores de protease 1x.

Para controlar a qualidade da extração de histona foi realizado um ensaio de quantificação de proteína pelo método de Bradford, utilizando a albumina de soro bovino (BSA) para preparo da curva padrão, tendo como concentração inicial 2 μ g/ μ L. Sendo assim, em uma placa, 10 μ L de amostra foi colocada em cada poço e acrescentou-se 200 μ L de Bradford que foi diluído previamente em 1:4 com água destilada. A placa foi incubada a 37 °C por 30 minutos e medida em um espectrofotômetro Spectrum One – FTIR Spectrometer, marca Perkin Elmer, usando Abs₅₉₅ nm. A partir das absorbâncias obtidas da curva padrão foi montado um gráfico e posteriormente uma equação da reta, aplicando as absorbâncias das amostras na equação da reta, tendo como resultado a concentração das amostras. Apenas as amostras de histonas que obtivessem uma concentração \geq 1 μ g/ μ L foram selecionadas (SIDOLI *et al.* 2016).

Em seguida, essas histonas passaram por um processo de propionilação em que foram ressuspendidas em NH₄HCO₃ e o anidrido propiônico foi adicionado na amostra juntamente com a acetonitrila. Nessa etapa, a basicidade da amostra foi medida diversas vezes para que as histonas permanecessem em meio cujo pH estivesse em torno de 8, ajustando com NH₄OH em caso de estarem fora desse padrão.

Por fim, as amostras foram secadas em *speed vac* para que fosse evaporado o anidrido propiónico não reagido, bem como o acetonitrilo, o ácido acético e o gás amoníaco liberado do NH₄OH podendo, em seguida, dar início a

digestão por tripsina que consiste na clivagem das caudas histônicas principalmente nos resíduos de arginina e lisina. Depois disso as amostras foram dessalinizadas e analisadas por espectrometria de massas.

4.7 Espectrometria de massas para proteínas histonas

Inicialmente a fim de padronização do método foram injetados 1, 2 e 3 ug da amostra na coluna cromatográfica. A cromatografia líquida foi realizada em tampão A (0,1% ácido fórmico em água) tampão B (0,1% de ácido fórmico em ACN). O gradiente foi de 43 minutos: 30 minutos em 0-30% ACN; 5 minutos 30% - 100% de ACN em tampão B e 8 minutos 100% ACN isocrático em tampão B. O fluxo foi ajustado em 250-300nL por minuto. O espectrômetro foi operado em DDA (Data Dependent Acquisition) e cada "full scan" a cada 2 segundos no espectrômetro de massas qTOF Ultima (Waters).

Em seguida, para identificação das modificações pós-traducionais para posterior comparação com expressão de transcritos foram injetados 3 ug de amostra e os procedimentos seguintes se deram da mesma forma descrita para a padronização, no entanto, o espectrômetro de massas utilizado foi o qTOF Impact II da marca Bruker, pois possui maior sensibilidade.

4.8 Análise dos resultados de espectrometria de massas

Os espectros de massas (raw data), foram processados utilizando o programa Mascot (Matrix Science) (PERKINS *et al.*, 1999) (www.matrixscience.com), utilizando metilação, acetilação e propionilação como modificações variáveis. A busca no banco de dados, foi realizada utilizado o arquivo fasta da montagem do proteoma (peptídeos e proteínas) mais recente do banco de dados do Uniprot (BOUTET *et al.*, 2016) para o *S. mansoni*.

5. RESULTADOS
5.1 Perfil de transcrição do mRNA dos genes que codificam as enzimas modificadoras de histonas

Foi demonstrado diferença nos genes expressos nos diferentes estágios parasitários, podendo ser separado em três quadrantes distintos representados pela cor azul (esquistossômulo 24 horas, esquistossomulo 5 dias e verme adulto), verde (esquistossomulo 3 dias) e vermelha (cercária) na figura 4. Foi identificado que o conjunto representado pela cor azul (Esquistossomulo 24 horas, esquistossomulo 5 dias e verme adulto) se encontra no componente principal 1 (PC1), enquanto o conjunto das cores verde (Esquistossomulo 3 dias) e vermelho (Cercária) estão no componente principal 2 (PC2).



Figura 4- Gráfico de PCA (Principal Component Analysis) realizado com o valor da expressão gênica relativa obtidos a partir de PCR quantitativo de cercária (cerc.), esquistossômulo 24 horas (esq 24h), esquistossômulo 3 dias (esq 3d), esquistossômulo 5 dias (esq 5d) e verme adulto. O gráfico foi desenhado utilizando o algoritmo Clustvis (https://biit.cs.ut.ee/clustvis/)

Mediante ao dado obtido pela análise de PCA, outra análise foi realizada a partir dos mesmos resultados das expressões relativas utilizando o algoritmo Clustvis: o *heatmap*. O resultado obtido é a maior expressão dos transcritos nos estágios de cercária e esquistôssomulo 3 dias, diferentemente dos estágios de esquistossomulo 24 horas, esquitossomulo 5 dias e verme adulto.



Figura 5: Genes expressos de cercária (cerc.), esquistossômulo 24 horas (esq 24h), esquistossômulo 3 dias (esq 3d), esquistossômulo 5 dias (esq 5d) e verme adulto, observados após PCR quantitativo (<u>https://biit.cs.ut.ee/clustvis/</u>). O nível de expressão dos transcritos esta sendo representada por uma escala de cores sendo azul o menor nível de expressão e vermelho o maior nível de expressão.

Para conhecer as principais classes de enzimas envolvidas nas modificações pós-traducionais do *S. mansoni*, identificamos no *heatmap* os

genes com maior expressão (destacados em vermelho), sobretudo, nos estágios em que foi demonstrado maior atividade transcricional.

Nos estágio de cercária 22 genes tiveram maior expressão, dessas as classes deacetilases e metilases destacaram-se por estarem em maior porcentagem com 36,36% (8/22) e 27,27% (6/22) respectivamente (Figura 6).



Figura 6: Porcentagem de transcritos que codificam enzimas modificadoras em cercárias separados de acordo com a classe enzimática a qual pertencem.

O esquistôssomulo de 3 dias (Figura 7) foi outro estágio com pico de expressão, com 20 transcritos relevantes, sendo que a classe metilase se destacou representando metade dos genes com alta expressão. Já a classe demetilase e acetilase representam 20% (4/20) e deacetilase representa 10% (2/20) do total de genes nesse estágio.



Figura 7: Porcentagem de transcritos que codificam enzimas modificadoras em esquistossômulos de 3 dias de cultura *in vitro* separados de acordo com a classe enzimática a qual pertencem.

Visto as principais classes enzimáticas nos quais os transcritos altamente expressos estão inseridos, foi analisado em seguida, individualmente, cada transcrito evidenciado pelo *heatmap* na cor vermelha para, desta forma, identificar as enzimas que tem maior potencial como alvo terapêutico, dado que sua expressão elevada pode sugerir importância para a progressão do ciclo (Figura 8 e 9).

Para isso, após normalização do delta CT dos transcritos utilizando o gene housekeeping (HK), foi obtido o 2-delta CT e, por fim, a porcentagem de cada transcrito, separado de acordo com a classe enzimática na qual pertencem, através do cálculo:

> 100*2-deltaCT do transcrito Σ (2-deltaCT de todos os transcritos)

Os transcritos cuja expressão destacou-se no estágio de cercária foram as deacetilases que têm como número de acesso Smp_091990 (13,64%) e Smp_191310 (16,52%) e a metilase Smp_160700 (15,68%).



Figura 8: Transcritos com maior expressão no estágio de cercária separados de acordo com sua classe enzimática, em destaque os genes que apresentam maior porcentagem. O transcritos estão sendo representados de acordo com seu número de acesso (Smp_), ver tabela 01 para conferir sua anotação segundo o Gene DB.

Quanto aos transcritos cuja expressão destacou-se no estágio de esquistossomulo 3 dias foi a deacetilase que tem como número de acesso Smp_138770 (11,19%) e a metilase Smp_121610 (49,34%).



Figura 9: Transcritos com maior expressão no estágio de esquistossomulo 3 dias separados de acordo com sua classe enzimática, em destaque os genes que apresentam maior porcentagem. O transcritos estão sendo representados de acordo com seu número de acesso (Smp_), ver tabela 01 para conferir sua anotação segundo o Gene DB.

5. 2 Extração de histonas para "botton up proteomics"

Em relação aos resultados iniciais obtidos através da espectrometria de massas, estes estão brevemente resumidos na figura 10 e tabelas 3 e 4 mostradas a seguir. Inicialmente, foi necessário estabelecer uma concentração ótima para avaliamos a possibilidade de identificação em relação a concentração e concluímos que 2 ou 3 µg de histonas são necessários para que ocorra uma identificação satisfatória das modificações pós-traducionais. Desta forma, escolhemos para apresentar a seguir os resultados obtidos com 3 µg de injeção no espectrômetro, que será a quantidade utilizada para os próximos experimentos.

Inicialmente, avaliamos o potencial de marcação das aminas terminais e das aminas das cadeias laterais dos peptídeos tripsinizados. Quando comparado, com a preparação de histonas não marcadas (Tabela 4), verificamos que as histonas propioniladas e digeridas para o peptídeo KSTGGKAPR mostraram a modificação de acetilação nas lisinas (K) na posição 1 (K1) e propionil na posição 6 (K6), conforme mostrado na Figura 9 e que o sequenciamento mostrou uma cobertura de 14 íons y e b (destacados em vermelho na Figura 9C), que são provenientes da fragmentação (MS/MS) dos 30 íons mais intensos e originados da clivagem por tripsina.

A	E	ragment	ação N	IS/MS	de KST	GGKA	PR	0								
22							-	R	. KSTGGK	APR.K	Acetyl ((K); Pro	pionyl	(K); P1	copionyl	(N-term
								R	. KSTGGK	APR.K	Acetyl ((K); Pro	pionyl	(K); P1	copionyl	(N-term
					(2			R	. KOLATKI	AAR.K F	Acetyl ((K); Pro	pionyl	(K); P1	copionyl	(N-term
)q. —			R	KOLATKU	AAR.K	2 Propic	nyl (K)	; Propic	onyl (N	V-term)	
								R	. KOLATK	AAR.K	2 Propic	onyl (K)	; Propic	onyl ()	V-term)	
								R	. KSAPST(GGVIKKPHE	R.Y 2 A	Acetyl (K)			
			(9)ñ	(9)9		(8)6										
			(၄)6	-	(¿)ñ	(8)										
	-		0.09	700	- 8	a										
							1									
U																
	#	q	¢‡	p*	p***	b ⁰	₽₀₽	Seq.	y	y**	y*	y*++	\mathbf{y}^{0}	\mathbf{y}^{0++}	#	
	-	227.1390	114.0731	210.1125	105.5599			K							6	
	2	314.1710	157.5892	297.1445	149.0759	296.1605	148.5839	S	829.4526	415.2300	812.4261	406.7167	811.4421	406.224	7 8	
	3	415.2187	208.1130	398.1922	199.5997	397.2082	199.1077	T	742.4206	371.7139	725.3941	363.2007	724.4101	362.708	7 7	
	4	472.2402	236.6237	455.2136	228.1105	454.2296	227.6185	U	641.3729	321.1901	624.3464	312.6768			9	
	S	529.2617	265.1345	512.2351	256.6212	511.2511	256.1292	U	584.3515	292.6794	567.3249	284.1661			2	
	0	713.3828	357.1951	696.3563	348.6818	695.3723	348.1898	K	527.3300	264.1686	510.3035	255.6554			4	
	1	784.4199	392.7136	767.3934	384.2003	766.4094	383.7083	¥	343.2088	172.1081	326.1823	163.5948			3	
	s	881.4727	441.2400	864.4462	432.7267	863.4621	432.2347	Р	272.1717	136.5895	255.1452	128.0762			2	
	0							В	175.1190	88.0631	158.0924	79.5498			1	

E

1

Figura 10: Espectrometria de massas para os peptídeos obtidos através da derivatização química, utilizando o espectrômetro de massas LC-MS/MS qTOF Ultima (Waters) no modo de aquisição de MS no DDA (Data Dependent Acquisition). **A.** Fragmentação do íon de massa monoisotópica 1054.5771 Da. Os espectros de massa foram analisados utilizando o programa MASCOT e como modificações fixas foram

consideradas o carbamidometil, nas posições terminais e como modificações variáveis foram utilizadas Propionil (N-term), Acetil (K) e Metil (K). O valor de score de confiança de identificação do íon foi de 40 e a expectância de 0.0061. **B.** Modificações pós traducionais no peptídeo KSTGGKAPR (em detalhe) e os outros peptídeos também sequenciados. **C.** Tabela com as massas dos íons b e y que determinam a sequência do peptídeo KSTGGKAPR. Os "matches" mostrados na tabela correspondem aos 14 íons fragmentados provenientes dos 30 íons mais intensos na metodologia DDA.

Na Tabela 3 estão resumidos os dados de espectrometria de massas, referentes a confiança na detecção da proteína histona H3 e suas modificações pós-traducionais, que apresentou um score de 144, cuja massa detectada foi de 15.362 kDa. Também está mostrado os dados de alguns outros peptídeos, que foram sequenciados além do KSTGGKAPR.

Tabela 3: Resumo dos dados de espectrometria de massas para os peptídeos de histona H3 com as modificações pós traducionais e com as modificações resultantes do experimento de derivatização química (propionilação).

00 00	577.8738 1153.7 577.8738 1153.7 767.4001 1532.7	15362 577.8738 1153.7 15362 577.8738 1153.7 15362 577.8738 1153.7 15362 577.8738 1153.7 15362 577.8738 1153.7

A Tabela 4 abaixo, mostra um resumo do que foi obtido, através da identificação por espectrometria de massas das histonas que não foram propioniladas. O resultado detectado foram histonas estruturais pertencentes ao conjunto do nucleossomo, como as histonas H2B, H2A, H4, H3 e H2A.2-C.

Tabela 4: Resumo do sequenciamento das proteínas histonas estruturais de *S.mansoni,* na ausência da etapa de propionilação

Nº de acesso (Uniprot/Gene DB)	Descrição da proteína	Score da proteína	Massa da proteína	Sequência da proteína
G4V6E9 Smp_036220	Histone H2B OS=Schistosoma mansoni OX=6183 GN=Smp_036220 PE=3 SV=1	1333	13568	LLLPGELAK
C4QBN1 Smp_053300	Histone H4 OS=Schistosoma mansoni OX=6183 GN=Smp_053300 PE=3 SV=1	685	11360	VFLENVIR
G4VMF9 Smp_210630	Histone H2A OS=Schistosoma mansoni OX=6183 GN=Smp_210630 PE=3 SV=1	159	14267	AGLQFPVGR
C4QHD7 Smp_074610	Histone H3 OS=Schistosoma mansoni OX=6183 GN=Smp_074610 PE=3 SV=1	152	15392	KLPFQR
G4V6K8 Smp_003770	Putative histone h1/h5 OS=Schistosoma mansoni OX=6183 GN=Smp_003770 PE=3 SV=1	145	20434	TVSGVSGGSLAAAPSTAGVR
G4VN61 Smp_031720	Histone H2A OS=Schistosoma mansoni OX=6183 GN=Smp_031720 PE=3 SV=1	58	16559	NDAELNELLK

Vale mencionar também que, após extração das histonas ácidas, correuse um gel de poliacrilamida para verificar a integridade do material extraído, e se as massas observadas no gel, correspondiam as massas determinadas pela espectrometria de massas. As histonas estão marcadas com as flechas que indicam o seu peso molecular observado: H1/H5 (20kDa); H3 (15kDa); H2A (14kDa); H2B (13kDa); H4/H2A.1 (11kDa), estando, portanto de acordo com o determinado por espectrometria de massas.



Figura 11: Perfil eletroforético do extrato de histonas ácidas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15% de vermes adultos de *S. mansoni*. PM é o peso molecular em kDa (Fermentas) e VA (Vermes Adultos) é o extrato de histonas ácidas do parasita.

Após a padronização foi feita uma nova análise das modificações pós traducionais em diferentes estágios do parasita para posterior comparação com os dados obtidos através da expressão dos transcritos. As principais modificações encontras em cercária encontram-se nas histonas H1/H5 e são do tipo metilação. Já as modificações encontradas em verme adulto macho consistem em: acetilação, crotonilação e ubiquitinação e também tem encontrase, em sua maioria, na histona H1/H5. Foram encontradas modificações do tipo metilação em verme adulto fêmea principalmente nas histonas H1/H5 e H2A, como mostra a seguir.

A- CERCÁRIA

	AA -1	AA -2	AA-3	AA-1	AA-2	AA-3	AA-1	AA-2	AA-3	AA-1	AA-2	AA-3
Ac			0					-				
Ub	0											
Met		0	• 0					-			**	**
Di		•					1					
PR	• •		•							٠		
Tri	1	۲								٠		
CR			•									•
Mono	1				*			-	-			•
GGK(+71	.04)GLGK(+28.0	3)GGAK(+71.04)(+14.02)	VST(+14.02) 4.02	K(+28.03)KP	<(+18.04)(+1	S(+18.0 {*)	4)DVPAK	(+42.05)	K(+71.04 18.04)(+)SAPAT(+14 14.02) (*)	1.02)GVK(+
GK(+383	3.23)GGK(+14.0	2)GLGK(+42.01)	(+14.02)	K(+42.01){+	68.03)VARPK	(+68.03)	A(+14.0 (+18.04	2)AGGK() (**)	+18.04)K	K(+42.05 GK(+68.0)(+14.02)57 (3) (**)	(+14.02)G
G(+71.04)LGK(+42.05)GC	GAK(+68.03)	0	K(+42.01)(+	71.04)PVAK(+	68.03)	A(+14.0 +14.02)	2)AGGK((**)	+42.01)(
				T(+71.04)5(-	+14.02)K(+68	.03)PK	A(+42.0 GK (**)	1)RK(+28	8.03)AAG			
				TSK(+42.05)	PKT(+14.02)T	PK(+42.01)						
			A(+71.04)TR	(PK								
	H4 (C	4QBN1)	KPVAK(+68.	03)K(+14.02)	(+14.02)	H2A	4 (G4V8	8L9)*	H	H3 (C4QHD7)* H3 (G4VFY4)**		
			VS(+14.02)7	FK(+28.03)K(+	18.04)PK	H2A (G4VN61)**				G4VFY	FY4)**	
			A(+42.01)T8									
				S(+14.02)VT								
				SVT(+14.02)								
				TTPK(+42.0								
				AT(+14.02)8 02)	((+28.03)PK(+	42.01)(+14.						
				K(+42.01)(+	71.04)PVAK(+	-68.03)						
				ST(+14.02)A 4.02)	KPK(+18.04)⊮	((+42.01)(+1						
				(H	11-H5) G4V6	iK8						

Legenda:

Cada símbolo em diferentes cores (○△□◇), representa um peptídeo diferente sequenciado (PSM – Peptide sequencing matching) de determinada histona anotada no banco de dados (H4 (C4QBN1); (H1-H5) G4V6K8; H2A (G4V8L9); H2A (G4VN61); H3 (C4QHD7);H3 (G4VFY4) do estágio de cercaria do parasita Schistosoma mansoni, em quadruplicata biológica. Os símbolos estão distribuídos na tabela, conforme o aminoácido modificado (AA), exemplo: GGK(+71.04)GLGK(+28.03)GGAK(+71.04)(+14.02)

AA-1 AA-2 AA-3 As modificações determinadas estão abreviadas da seguinte forma: Ac (acetilação), Ub (Ubiquitinação), Met (Metilação), Di (Dimetilação), Propionilação (PR), Trimetilação (Tri), Crotonilação (CR) e Monometilação (Mono).

B- VERME ADULTO MACHO

	AA -1	AA -2	AA-3	AA-1	AA-2	AA-3	AA-1	AA-2	AA-3	AA-1	AA-2	AA-3
Ac	• 0				A	A			•	٩		•
Ub	0	• •	•									
Met										•	•	O
Di					A							
PR		0		▲△	Δ	A						
Tri				A		•	-				\$	۰ 🔷
CR				1	Δ			-		0		
Mono			.н			Δ				٠		
PY										٠	٠	
G(+42.0)	1)GK(+14.02)GLGK(+14.0	2}	T(+42.01)(+14.) 68.03)	02)5K(+28.03)6	PK(+14.02)(+	M(+18.04) (***))AGGK(+42.0	15)	T(+238.23) K(+42.05) (SFTELIADET(-238.23)NE
R(+42.01	l)(+14.02)G(GVK(+71.04)(+14.02} 🔘	K{+42.01)PK{+7	71.04)(+14.02)	Δ	A(+42.01) 8.23) (EK(+14.02)P	K(+14.02)(+23	C(+S7.02)(+ (+42.01) (*	18.04)FQE(+	14.02)DYVK
				V(+71.04)VKPK	(+42.05)(+14.0	⁽²²⁾	K(+42.01) (*)	S(+14.02)DV	PAK(+14.02)	K(+68.03)K 02) (**)	+42.05)PHR	+42.05)(14.
				K(+42.01)PVAK	(+14.02)		S(+14.02)S	SGIT(+14.02)	S(+14.02)	K(+14.02)A	PR(+42.05)	(**) 🔷
				S(+14.02)TAK(+	+68.03)PK(+14.	.02)(+68.03)	S(+42.01)(LIGK(+68.03)	-			
			T(+18.04)SK(+4	12.05)PK(+42.0	(5)							
			K(+42.01)PK(+3	383.23)K(+42.0	01)(+14.02)	1						
			V(+71.04)AR(+	14.02)PK(+18.0	04)(+14.02)	1						
			S(+14.02)GSFK	(+18.04)LADK(+71.04)	1						
	H4 (C	4QBN1)		H1	-H5 (G4V6K	8)	H H2 H2A H2A	12A (G4VE 2A (G4VN (A0A3Q0H (G4VCW	8L9)* 61)** (VK3)*** 3) ****	н	3 (G4VFY4 (C4QHD7	

Legenda:

Cada símbolo em diferentes cores (○△□◇), representa um peptídeo diferente sequenciado (PSM – Peptide sequencing matching) de determinada histona anotada no banco de dados (H4 (C4QBN1); (H1-H5) G4V6K8; H2A (G4V8L9); H2A (G4VN61); H3 (C4QHD7); H3 (G4VFY4) do estágio de cercaria do parasita Schistosoma mansoni, em quadruplicata biológica. Os símbolos estão distribuídos na tabela, conforme o aminoácido modificado (AA), exemplo: GGK(+71.04)GLGK(+28.03)GGAK(+71.04)(+14.02)

AA-1 AA-2 AA-3 As modificações determinadas estão abreviadas da seguinte forma: Ac (acetilação), Ub (Ubiquitinação), Met (Metilação), Di (Dimetilação), Propionilação (PR), Trimetilação (Tri), Crotonilação (CR) e Monometilação (Mono).

C- VERME ADULTO FÊMEA

	AA -1	AA -2	AA-3	AA-1	AA-2	AA-3	AA-1	AA-2	AA-3	AA-1	AA-2	AA-3
Ac												
Ub		1										
Met	000		00				•=		-	••	••	••
Di		0										
PR	0.		•	Δ		Δ					1	
Tri								-	-			••
CR				4								
Mono	•							-	-			
PY												
M(+18.04)SGR(+42.05	5)GK(+71.04)	•	T(+18.04)(+:	14.02)VK(+28.0	03)PK(+68.03)	M(+18.04 (***)	SGR(+42.0	5)GK(+71.04)	K(+14.02) 42.05)(+1/	(+68.03)QLA 4.02) (*)	r(+14.02)K(+
G{+14.02 2)	GKGLGK(+2	8.03)GGAK(+	14.02)(+14.0	T(+18.04)(+ 14.02)	14.02)VK(+28.0	03)PK(+71.04)(+	M(+18.04	SGR(+42.0	5)GK(+71.04)	K(+14.02) 42.05)(+14	(+68.03)QLA 4.02) (**)	r(+14.02)K(+
G(+71.04 2))GK(+42.01)(GLGKGG <mark>A</mark> K(+	14.02)(+14.0	ATKPK(+68.0	D3)	۵	5(+18.04)(4.02) (*)	+14.02)DV	PAK(+14.02)(+1			
G(+71.04	LGKGGAK		•	T(+42.01)(+	14.02)SKPK(+4	2.01)	M(+18.04	SGR(+42.0	5)GK(+71.04)	1		
TLYGFGG	(+14.02)		0	T(+71.04)VK	(+71.04)PK(+4	^{12.01)}	T(+18.04)	, T(+14.02)P	R(+42.05)	1		
G(+14.02	LGKGGAK(+	42.01)	•				A(+14.02) 4.02) (**	, AGGK(+18.)	04)K(+18.04)(+1			
	H4 (C	QBN1)		ŀ	11-H5 (G4V	6KB)	н Н: Н2)	12A (G4V 2A (G4VI 4 (G4VC)	8L9)* V61)** W3) ***	H	H3 (G4VFY 3 (C4QHD	4)* 7)**

Legenda:

Cada símbolo em diferentes cores (○△ □◇), representa um peptídeo diferente sequenciado (PSM – Peptide sequencing matching) de determinada histona anotada no banco de dados (H4 (C4QBN1); (H1-H5) G4V6K8; H2A (G4V8L9); H2A (G4VN61); H3 (C4QHD7); H3 (G4VFY4) do estágio de cercaria do parasita Schistosoma mansoni, em quadruplicata biológica. Os símbolos estão distribuídos na tabela, conforme o aminoácido modificado (AA), exemplo: GGK(+71.04)GLGK(+28.03)GGAK(+71.04)(+14.02)

AA-1 AA-2 AA-3

As modificações determinadas estão abreviadas da seguinte forma: Ac (acetilação), Ub (Ubiquitinação), Met (Metilação), Di (Dimetilação), Propionilação (PR), Trimetilação (Tri), Crotonilação (CR) e Monometilação (Mono).

Figura 12: Resultado das modificações identificadas em diferentes aminoácidos ao longo dos peptídeos que compõe as histonas sequenciadas do *Schistosoma mansoni.* (**A**) Cercária. (**B**) Verme adulto macho. (**C**) Verme adulto fêmea.

Após a identificação das modificações que foram encontradas nas histonas nos estágios de cercária, verme adulto macho e verme adulto fêmea, foi visto qual a chance dessas modificações ocorrerem (0-1000) de acordo com o score obtido através do Mascot (Figura 13). O dado obtido foi que o score para modificações foi maior para metilações.



Figura 13- Score das modificações identificadas nas histonas H1-H5, H2A, H3 e H4 no estágios de cercária, verme adulto (macho e fêmea), demonstrado através de escala de cores sendo verde para scores menores e vermelho para score maiores.

A fim de demonstrar um possível perfil de modificação pós-traducional que os três estágios supracitados possuem, foi feito um gráfico contabilizando essas modificações de acordo com sua categoria (Figura 11A, 11B e 11C). Deste

modo, foi encontrado maior número de metilações no estágio de cercária. Maior número de acetilações no estágio de verme adulto macho e maior número de metilações no estágio de verme adulto fêmea.



A- CERCÁRIA

54







Figura 14- Número de modificações pós-traducionais de cada categoria, sendo que cada cor presente nas barras representam uma entrada diferente para uma modificação. (**A**) Cercária. (**B**) Verme adulto macho. (**C**) Verme adulto fêmea.

6. DISCUSSÃO

6. 1 Transcrição do mRNA dos genes que codificam as enzimas modificadoras de histonas.

A partir dos resultados obtidos das expressões relativas de cada gene comparamos a natureza das amostras, ou seja, uma possível similaridade ou diferença de genes expressos entre as formas larvais de vida livre, larvais intramamífero e vermes adultos, através de uma análise de componente principal (PCA) (Figura 4). Desta forma, observa-se que o conjunto representado pela cor azul se encontra no componente principal 1 (PC1), enquanto o conjunto das cores verde e vermelho, apesar de estarem em regiões diferentes no gráfico de dispersão apresentado, estão no componente principal 2 (PC2). Sendo assim, identifica-se maior correlação na expressão de genes entre os estágios de esquistossomulo 3 dias e cercária se comparado com os estágios de esquistossomulo 24 horas, esquistossomulo 5 dias e verme adulto.

O algoritmo Clustvis: o *heatmap* é uma matriz de dados em que a coloração fornece uma visão geral das diferenças numéricas, nesse caso, das expressões gênicas nos diferentes estágios (METSALU & VILO, 2015). Através da análise utilizando essa ferramenta é possível identificar maior expressão, representado pela cor vermelha, dos transcritos nos estágios de cercária e esquistôssomulo 3 dias (Figura 5), diferentemente dos outros estágios em que a cor azul indica menor expressão de genes. Esse dado confirma, portanto, a análise de PCA, visto que, a expressão entre esses dois estágios (cercária e esquistossomulo 3 dias) diferem-se dos demais.

Portanto, a expressão aumentada dos transcritos nesses dois momentos demonstra a relevância que esses estágios possuem para que o parasita possa evoluir ao longo do ciclo, pois há grande quantidade de genes codificadores de enzimas sendo transcritas, genes esses que podem revelar-se importante para que seja alcançado a maturidade do *Schistosoma* em forma de verme adulto, onde nota-se que, nesse estágio, há baixa expressão de novos genes.

Esses dados corroboram com o estudo de *microarrays* realizado por Dillon *et al.* (2006), visto que nos dados apresentados pelo autor, os transcritos passam a ser expressos a partir da fase de cercária, com aumento marcante em esquistossômulo 2 dias, mantendo-se a expressão dos mesmo genes até a fase de verme adulto, sugerindo a necessidade do parasita em expressar genes nessas fases para que possa se adaptar aos diferentes meios e funções que deverá desempenhar e para que haja o desenvolvimento do parasito ao longo do ciclo.

Sabe-se que há pouca transcrição de genes na fase de cercária (ROQUIS *et al.*, 2015), portanto, visto que a expressão dos transcritos das enzimas modificadoras de histonas se encontram aumentadas nessa fase, supõe-se que essas enzimas que estão sendo mais expressas estejam relacionadas com o fechamento da cromatina tendo como consequência a diminuição da transcrição de outros genes.

Ainda sobre a variância na expressão de genes ao longo do ciclo, foi visto em um estudo que o padrão de transcrição de enzimas que promovem a metilação bivalente de H3K4me3 e H3K27me3 era diferente de acordo com os estágios do parasita, sendo que seu pico de expressão era na fase de cercária (ROQUIS *et al.*, 2018). Este resultado concorda com o dito no parágrafo anterior, pois sabe-se que a metilação promove o fechamento da cromatina (FANTAPPIÉ *et al.*, 2008).

A transcrição dos genes é reativada quando o parasita realiza sua transformação de cercária para esquistossomulo (ROQUIS *et al.*, 2015), portanto, as enzimas modificadoras de histonas podem estar atuando na descompactação dessa cromatina permitindo a transcrição dos genes. No entanto, tendo em vista que, para que essa transformação ocorra, o parasita precisará passar do meio livre para o meio *in vivo* e que essa fase é marcada por intensas modificações como o início da respiração anaeróbica, perda da cauda e reorganização do tegumento (SKELLY & SHOEMAKER, 2000) o parasita ainda mantem algumas características de sua fase cercariana até cerca de 40 horas após penetração na derme (CARVALHO *et al.*,2008), portanto, é compreensível que o esquistossômulo recém formado necessite dessas primeiras horas para adaptação, para então poder voltar a transcrever os genes específicos da sua nova fase. Isso explicaria a maior expressão dos transcritos não na fase de esquistossomulo 24 horas, mas sim já no terceiro dia no novo habitat.

As enzimas modificadoras de histonas podem ser subdividas por classes metilase, acetilase, demetilase e deacetilase, sendo que cada uma pode atuar na compactação e descompactação da cromatina, alterando o nível transcricional dos genes (FANTAPPIE *et al.*, 2008). Desta forma, para saber as principais classes de enzimas envolvidas nas modificações pós-traducionais do *Schistosoma mansoni*, inicialmente identificamos no *heatmap* os genes com maior expressão (destacados em vermelho), sobretudo, nos estágios em que foi demonstrado maior atividade transcricional.

A figura 6 demonstrou que os genes que apresentaram maior expressão no estágio de cercária pertenciam a classe deacetilase e metilase, esse dado concorda com os experimentos de Roquis *et al.* (2015), que evidenciaram um alto conteúdo de metilação do tipo H3K27me3 e H3K9me3 que mantém as cercárias em um estado *poised* para transcrição, ou seja, pronto para transcrever porém ainda silenciado. Além disso a alta parcela de deacetilase, auxiliaria na manutenção desse estado silenciado visto que a acetilase está associada com o aumento da transcrição e a retirada da sua marca na cauda das histonas através da deacetilase, por sua vez, causaria o efeito inverso (GREGORETTI, LEE & GOODSON, 2004).

Os inibidores de deacetilase têm sido vistos como promissores antiparasitários, tendo em vista grande gama de efeitos colaterais e existência de cepas resistentes aos fármacos existentes atualmente (HAILU *et al.*, 2017). Essa terapêutica já vem sendo utilizada clinicamente no tratamento de pacientes com câncer, tornando o reposicionamento de medicação uma interessante estratégia (ANDREWS, HAQUE & JONE, 2012).

Na esquistossomose, esses inibidores induziram a mortalidade do parasita através de mecanismos que ainda são desconhecidos (DUBOIS *et al.*, 2009). No entanto, diversos estudos estão sendo realizados para entender os efeitos e as consequências provenientes da administração de diferentes tipos de fármaco com potencial inibitório para deacetilase para o paciente e para o alvo parasitário em si.

Desta forma, os nossos resultados sugerem que a transcrição de enzimas deacetilases e metilases, podem sustentar o estado quase silenciado das

cercárias, para posteriormente permitir a progressão do ciclo de vida modificando o padrão de transcritos de enzimas modificadoras de histonas que serão expressos. Além disso, percebe-se através da literatura que, sobretudo, a deacetilase é um potencial alvo terapêutico, devido ao fato de ser uma molécula mais estudada e com diversas estratégias terapêuticas que podem ser empregadas para sua inibição.

Quanto ao estágio de esquistôssomulo de 3 dias (Figura 7) observa-se que há permanência dos transcritos pertencentes a classe de metilases já visto em cercária, todavia, não são os mesmo transcritos. Esse dado sugere que há manutenção do silenciamento de alguns genes, mantendo o estado *poised*, e que isso se faz necessário para que o desenvolvimento do parasita o ocorra.

Roquis *et al.* já demostrava em seus estudos que a metilação é uma marca importante para a progressão do ciclo de vida do parasita. Isso se comprova com a inibição da metiltransferase (EZH2), enzima responsável pela metilação, no estágio de esquistossomulo utilizando o composto GSK343 em que obteve como consequência alterações fenotípicas no tegumento do parasita. Além disso, após 48 horas houve aumento da caspase 3 e 7 no parasita, enzimas estas que são encontradas nas vias de apoptose (PEREIRA *et al.*, 2018).

Dessas classes enzimáticas que foram destacadas quando se analisa pontualmente cada gene com expressão em relevância observa-se que dentre elas três enzimas estavam mais expressas no estágio de cercaria (Figura 8), sendo elas duas deacetilases (Smp_091990 e Smp_191310) e uma metilase (Smp_160700). Já na fase de esquistossomulo 3 dias (Figura 9) foi encontrado em maior expressão uma metilase (Smp_121610) e uma deacetilase (Smp_138770).

De acordo com o banco de dados Gene DB, as duas deacetilases (Smp_091990 e Smp_191310) são nomeadas como histone deacetylase 8 (HDAC8) e histone deacetylase 4 (HDAC4), respectivamente.

Das deacetilases mostradas acima, apenas a HDAC8 está caracterizada para *S. mansoni*, com diversos estudos acerca dessa promissora enzima como, por exemplo, o realizado por Marek *et al.* (2013) que infectou camundongos com esquistossomulo cujo HDAC8 tinha passado por um processo de RNA de

interferência que consiste em uma ferramenta de silenciamento póstranscricional através da sua ligação com a sequência de RNAm alvo. Ela tem sido apontada como uma promissora terapia gênica (FRANÇA *et al.*, 2010). Além disso, essa estratégia promoveu diminuição no número de verme adultos recuperados após 35 dias da infecção além de consequente diminuição na quantidade de ovos encontrados (MAREK *et al.*, 2013).

Dada a importância de HDAC8 para a homeostase do parasita e a existência dessa enzima também em humanos, Marek decidiu realizar um comparativo entres as enzimas presentes nos dois distintos organismos levando em consideração a estrutura proteica. Em seguida, identificou inibidores, como o Vorinostat ou ácido hidroxâmico suberoilanilida (SAHA), que apresenta especificidade apenas para a enzima presente no parasita e, portanto, com baixa afinidade para outras HDACs humanas (MAREK *et al.*, 2013).

Além do SAHA outros compostos como o ácido valpróico (VPA) e a trichostatin A (TSA) foram testados como inibidores de HDACs em geral e obtiveram sucesso em todos os estágios do ciclo, sendo o último composto eficiente até mesmo em baixas doses. No entanto, no que se refere a HDAC8 especificamente, o TSA se mostrou menos potente em sua ação se comparado as outras classes de HDAC. O autor do estudo sugere que o motivo seja a necessidade da presença do cátion divalente Fe(II) e não do Zn²⁺ para que suas atividades catalíticas sejam executadas, diferente do que ocorre nas outras classes (DUBOIS *et al.*, 2009).

Sendo assim, outro composto tem sido testado como o benzohidroxamatos ativos para inibição específica de HDAC8, mostrando-se um inibidor seletivo para a enzima, além de apresentar letalidade significativa no estágio de esquistossômulo e oviposição comprometida devido a separação de 90% do casal de vermes adultos após 5 dias incubando com o composto (HEIMBURG *et al.*, 2016).

Quanto a HDAC 4 ainda não existe estudos relacionados a epigenética do *S. mansoni*, mas existem pesquisas envolvendo sua participação em carcinomas de diferentes localidades em humanos, sendo que a presença dessa enzima foi apontada como fator agravante do quadro dos pacientes portadores da enfermidade (GIAGINIS *et al.*, 2013, GIAGINIS *et al.*, 2015).

A HDAC 6 foi o transcrito que apresentou maior quantidade no estágio de esquistôssomulo 3 dias. Mas assim como HDAC 4, também não existem estudos em *S. mansoni*. A dificuldade em obter inibidores seletivos para HDAC 6 tem relação com a falta de conhecimento de sua estrutura visto que não existiam dados de sua cristalização e isso impede a visualização de seu sitio ativo, sendo assim, até então usava-se a estrutura cristalina de enzimas homologas como a HDAC 8 (SEIDEL *et al.*, 2015).

No entanto, estudos recentes conseguiram realizar a caracterização estrutural de HDAC 6, estabelecendo métodos de purificação e cristalização possibilitando um futuro promissor para o desenvolvimento dos inibidores seletivos (OSKO & CHRISTIANSON, 2019). Um exemplo é o composto produzido a partir de derivados de ácido hidroxâmico, inibidor seletivo de HDAC 6, que foi elaborado tendo em vista sua importância para tratar doenças como distúrbios tumorais, inflamatórios, cardíacos e crônicos (SIMÕES-PIRES, BERTRAND & CUENDET, 2017), no entanto, pode abrir possibilidade para testes futuros com agentes parasitários como o *Schistosoma mansoni*, por exemplo.

Dois transcritos para metilase foram encontrados em maior quantidade nos dois estágios em evidência (cercária e esquistôssomulo 3 dias) e, apesar de serem enzimas nomeadas de forma distintas, promovem modificação no mesmo local da histona (H3K36) (SPELLMON *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2014). Além do parasita, a expressão dos transcritos que codificam essas metilases pode ser encontrada de forma aumentada em humano também, estando presente em células tumorais de diferentes tipos (ROGAWSKI, GREMBECKA & CIERPICKI, 2016).

Inibidores para metilases H3K36 têm sido desenvolvidos por pesquisadores visto sua importância para tratamento de câncer. Um exemplo é o Pr-SNF e a N-benzyl que demonstraram expressiva eficiência se comparado ao seu análogo sinefungina, um inibidor específico de SETD2, gene que codifica a Histona-lisina N-metiltransferase ROGAWSKI, GREMBECKA & CIERPICKI, 2016). Vale a pena ressaltar, que modificações do tipo H3K36 também não foram caracterizadas em *S. mansoni*.

Assim, o estudo sistemático das expressões dos transcritos que se encontram anotados no banco de dados do parasita, como está sendo feito aqui, poderão mostrar alvos ainda não conhecidos para a compreensão da regulação epigenética da expressão gênica e para estudo de inibidores em diferentes estágios e fases do ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*, como os esquistossomulos (ANDERSON, PIERCE & VERJOVSKI-ALMEIDA, 2012), que é um promissor estágio para ser tratado como alvo. Sabe-se que esta fase antecede o aparecimento da sintomatologia da doença que ocorre devido a postura dos ovos pela fêmea do verme adulto.

6. 2 Extração de histonas para "botton up proteomics"

Inicialmente foi necessário padronizar os experimentos de extração de histonas e marcação com anidrido propiônico que é uma metodologia diferente daquela utilizada por diversos grupos, que utilizam extração de histonas e a digestão das bandas do gel de SDS-PAGE e posterior análise. Essa nova metodologia, no entanto, consiste na marcação do peptídeo da cauda das histonas por adição de um radical propionil, através da reação química com anidrido propiônico, para que ocorra um aumento de massa dos peptídeos trípticos, denominada derivatização química (SIDOLI, *et al.* 2016).

Sendo assim, esse método de análise das modificações pós-traducionais através da propionilação que promove o elongamento da cauda das histona demonstra-se importante tendo em vista que a digestão por tripsina fraciona as histonas em peptídeos muito curtos (5-20aa) dificultando a visualização das marcas presentes nessas lisinas (PLAZAS-MAYORCA, 2009; SIDOLI & GARCIA, 2016).

Portanto, como foi visto, ao propionilar e digerir histonas foi identificado o peptídeo KSTGGKAPR que mostraram a modificação de acetilação nas lisinas (K) na posição 1 (K1) e propionil na posição 6 (K6), conforme mostrado na Figura 10. Na Tabela 3 é possível ver que o peptídeo encontrado pertence a histona H3 e de acordo na literatura a modificação de acetilação nessa histona de fato é

frequentemente encontrada (ROQUIS *et al.*, 2015; PICARD *et al.*, 2016, ANDERSON et al., 2017).

Já em relação às proteínas histonas não-propioniladas identificadas pelo sequenciamento (Tabela 04), em que a ausência do radical propionil promoveu o aparecimento apenas do nucleossoma de histonas, e que esse apresentavase conservado, sabe-se que esse dado era esperado com base em um estudo *in silico* realizado anteriormente e, também das buscas em bancos de dados (ANDERSON, PIERCE & VERJOVSKI-ALMEIDA et al., 2012).

Além disso, analisando as histonas através de um perfil eletroforético (Figura 11), foi visto que as bandas estão localizadas abaixo de 20 kDa, esse fato corrobora os dados do peso molecular esperado das histonas (HUANG *et al.*, 2015) e, portanto, verifica-se não somente a integridade da amostra obtida, como também um nucleossoma intacto visto que as bandas possuem peso molecular que representam as histonas H1/H5, H2A, H2B, H3, H4.

Portanto, se confrontarmos os dados de peso molecular obtidos por espectrometria de massas (Figura 10), com os dados *in silico* e com a análise do gel de eletroforese SDS-PAGE do extrato de histonas ácidas, corado com Coomassie blue (Figura 11), podemos verificar que as massas calculadas das proteínas sequenciadas por espectrometria, correspondem entre si (ANDERSON, PIERCE & VERJOVSKI-ALMEIDA et al., 2012), indicando que o parasita apresenta as histonas H2A, H2B, H3, H1/H5 e H4 sugerindo um nucleossomo bastante conservado provavelmente relacionada com a regulação epigenética da expressão gênica.

Após esses dados iniciais obtidos sobre a padronização do método de propionilação e comparativo com as histonas não propioniladas é possível concluir a importância da adição do radical propionil para a identificação das modificações pós-traducionais. Portanto, o próximo passo foi identificar, através da espectrometria de massas, as modificações pós-traducionais que o parasita sofre nos estágios de cercária, verme adulto macho e verme adulto fêmea e confrontar os resultados com o que foi visto na análise da expressão dos transcritos, no capítulo anterior.

Sendo assim, nota-se concordância desses resultados demonstrados nas figuras 12A-C e nas figuras 14A-C com o que foi obtido analisando os transcritos, visto no capítulo anterior, pois a metilação também encontra-se acentuada sobretudo no estágio de cercária, concedendo o caráter silenciado para a transcrição de gene, característico desse estágio. Além disso também foi visto, analisando os scores obtidos dessas proteínas modificadoras de histona, maiores chances de marcas de metilação (Figura 13). Desta forma, é possível concluir que os transcritos das enzimas modificadoras de histona que realizam a metilação estão, de fato, sendo traduzidas e exercendo sua função, tendo em vista que foram encontradas suas marcações na proteína.

Já na fase de verme adulto, apesar de ainda ter sido encontrado marcas de metilação nas histonas, outras marcações de modificações pós-traducionais foram vistas como a ubiquitinação e crotonilação. Os transcritos que codificam as enzimas que realizam essas modificações não foram incluídos na análise por PCR, esse fator pode ter contribuído com o perfil transcricional silenciado demonstrado no capítulo anterior, deste mesmo estágio.

A ubiquitinação ao longo do desenvolvimento do *Schistosoma*, já foi observado por alguns autores que demonstraram em seus estudos a presença das diferentes classes de ubiquitinas em todos os estágios do ciclo do parasita (PEREIRA *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2011), acentuando-se ainda mais nos estágios finais de sua evolução (verme adulto) (PERERIA *et al.*, 2012), portanto, não é surpresa seu aparecimento também no presente estudo.

Quanto a crotonilação, pouco se sabe sobre esta modificação póstraducional devido ao pouco tempo de sua descoberta, no entanto, demonstra ter uma funcionalidade e estruturação distinta da acetilação. Além disso, através de sua identificação e quantificação utilizando a espectrometria de massas foi visto ação principalmente em proteínas não-histonas, podendo atuar em processos biológicos como a regulação do remodelamento da cromatina (WAN *et al.*, 2019). Em parasitas, até o momento, a crotonilação foi vista apenas em cepas de *Toxoplasma gondii* através da espectrometria de massas, tendo sido localizada em diversos locais subcelulares envolvidos, por exemplo, com a regulação de genes epigenéticos (YIN *et al.*, 2019). Sendo assim, o presente estudo foi o primeiro a identificar marcas desse tipo de modificação em Schistosoma mansoni.

Através da literatura, é possível identificar principalmente as marcas presentes na histona H3 do *Schistosoma mansoni*, como H3K9me3, H3K27me3, H3K4me3, H3K9me1, H3K9ac (ROQUIS *et al.*, 2015). No entanto, nosso estudo possibilitou não só a descoberta de inúmeras outras modificações que ocorrem nesse parasita, como também sugere uma marcação mais acentuada na histona H1-H5, apontando a importância dessa proteína para modelagem da cromatina e sua possível influência e contribuição no desenvolvimento deste helminto ao longo do ciclo (Figura 12 A-C).

7. CONCLUSÃO

- Estágio de cercária e esquitossômulo 3 dias correlacionam-se, tendo em vista que apresentam padrão de expressão de seus transcritos semelhante;
- Maior expressão dos transcritos que codificam enzimas que promovem as marcas de metilases e deacetilases;
- HDAC8, HDAC4, HDAC6 e a metiltransferase que promove a marca H3K36, destacaram-se por sua expressão elevada e podem se tornar promissores alvos terapêuticos;
- Expressão acentuada de metilases no estágio de cercária, promovendo um estado *poised* para a transcrição de genes;
- O método desenvolvido para a propionilação das histonas demonstrou-se eficaz na demonstração das modificações pós-traducionais de Schistosoma mansoni;
- Os dados obtidos com a espectrometria de massas validaram a análise dos transcritos das enzimas, identificando marcas de metilação principalmente no estágio de cercária;
- Um mapeamento geral das modificações pós-traducionais nos estágios de cercária, verme adulto macho e fêmea foi obtido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, E. M., et.al. Differentiating snail intermediate hosts of Schistosoma spp. using molecular approaches: fundamental to successful integrated control mechanism in Africa. Infectious Diseases of Poverty, v. 7, ed. 1, 2018.

ANDERSON, L., PIERCE, R. J., & VERJOVSKI-ALMEIDA, S. Schistosoma mansoni histones: From transcription to chromatin regulation, an in silico analysis. Molecular and Biochemical Parasitology, v. 183, ed. 2, p. 105–114, 2012

ANDERSON, L. *et al.*. Histone deacetylase inhibition modulates histone acetylation at gene promoter regions and affects genome-wide gene transcription in Schistosoma mansoni. PLOS Neglected Tropical Diseases, v. 11, ed. 4, 2017.

ANDREWS, K. T.; HAQUE, A. & JONES, M. K. **HDAC** inhibitors in parasitic diseases. Immunol. Cell Biol., v. 90, p. 66-77, 2012

ARROWSMITH, C. H., et al. Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery. Nature Reviews Drug Discovery, v. 11, ed. 5, p. 384–400, 2012

AZZI, A.; COSSEAU, C & GRUNAU, C. Schistosoma mansoni: developmental arrest of miracidia treated with histone deacetylase inhibitors. Exp Parasitol. V. 121, ed. 3, p. 288-91, 2009

BASCH, P. F. Cultivation of Schistosoma mansoni In vitro. II. Production of infertile eggs by worm pairs cultured from cercariae. The Journal of Parasitology, v. 67, ed. 2, p.186, 1981

BASCH, P. F. Why do Schistosomes have separete sexes? Parasitology Today, v. 6, p. 160-163, 1990

BIEMANN, K. & PAPAYANNOPOULOS, I. A. **Amino acid sequencing of proteins.** Acc. Chem. Res. V. 27, p. 370–378; 1994.

BLANTON, R. E. & LICATE, L. S. **Developmental regulation of protein synthesis in schistosomes.** Molecular and Biochemical Parasitology, 51: 201-208, 1992. BOUTET, E., *et al.* **UniProtKB/Swiss-Prot, the Manually Annotated Section of the UniProt KnowledgeBase: How to Use the Entry View**. Methods in Molecular Biology, p. 23–54, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Educação em saúde para o controle da esquistossomose / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2018. 40 p.

BRASIL, Ministério da saúde **Esquistossomose** [Disponivel em: http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/esquistossomose#epidemiologia] Acessado em: 16 de Abril de 2019

CABEZAS-CRUZ, A.. et al. Epigenetic control of gene function in schistosomes: a source of therapeutic targets? Front Genet, v, 5, p. 317, 2014.

CABRAL, F. J. & WUNDERLICH, G. **Transcriptional memory and switching in the Plasmodium falciparum rif gene family**. Molecular and Biochemical Parasitology, v. 168, p. 186-190, 2009.

CABRAL, F. J, et al. Dynamic activation and repression of the Plasmodium falciparum rif gene family and their relation to chromatin modification. Plos One, v. 7, 2012

CABY, S., et al. **Analysis of the interactome of Schistosoma mansoni histone deacetylase 8.** PLoS neglected tropical diseases, v. 11, p. 11, 2017

CARVALHO, O. S, et al. Schitosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. FIOCRUZ, p. 1124, 2008.

CARY, C. et al. **Plasmodium falciparum chromatin nucleosomal** organization and histone-like proteins. Parasitology Research, v. 80, p. 255–8, 1994.

COETZEE, N. et al. Quantitative chromatin proteomics reveals a dynamic histone post-translational modification landscape that defines asexual and sexual Plasmodium falciparum parasites. Scientific Reports, v. 7, ed. 1, 2017.

COLLEY, Daniel G et al. Human schistosomiasis. The Lancet, [s.l.], v. 383, n. 9936, p.2253-2264, jun. 2014

COUTO, N.; BARBER, J.; GASKELL, S. J. Matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometric response factors of peptides generated using different proteolytic enzymes. J. Mass Spectrom, v. 46, p. 1233–1240, 2011 COSSEAU, C., et al., **Native chromatin immunoprecipitation (N-ChIP) and ChIP-Seq of Schistosoma mansoni: Critical experimental parameters.** Mol Biochem Parasitol, v. 166, ed. 1, p. 70-6, 2009

CUI, L. GCN5-Mediated histone H3 acetylation plays a key role in gene expression in Plasmodium falciparum. Eukaryotic Cell, v. 6, p. 1219–27, 2007

Cui, L., & Miao, J. Chromatin-Mediated Epigenetic Regulation in the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Eukaryotic Cell*, v. *9*, nº *8*, p. *1138–1149*, 2010

da CUNHA, J. P. C.; *et al.* **Post-translational modifications of Trypanosoma cruzi histone H4.** Mol. Biochem. Parasitol. v. 150, ed. 2, p. 268–277, 2006

DILLON, G. P., et al. **Microarray analysis identifies genes preferentially expressed in the lung schistosomulum of Schistosoma mansoni.** International Journal for Parasitology, v. 36, ed. 1, p. 1–8, 2006

DIXON, S. E., et al. **A decade of epigenetic research in Toxoplasma gondii.** Mol. Biochem. Parasitol. v. 173, p. 1–9, 2010

DUBOIS, F. et al. **Histone deacetylase inhibitors induce apoptosis, histone hyperacetylation and up-regulation of gene transcription in Schistosoma mansoni**. Mol. Biochem. Parasitol. v. 168, p. 7-15, 2009

ERNST, J. et al. **Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types.** Nature, v. 473, 43–49, 2011

FITZPATRICK, J. M., et al. **Transcriptomic Analyses**. PLoS Neglected Tropical Diseases, v.3, ed. 11, 2009

FANTAPPIÉ, Marcelo Rosado et al. **Control of transcription in Schistosoma mansoni: Chromatin remodeling and other regulatory elements**. Acta Tropica, v. 108, n. 2-3, p.186-193, 2008

FRANÇA, N. R. et al. Interferência por RNA: uma nova alternativa para terapia nas doenças reumáticas. Revista Brasileira de Reumatologia, v. 50, ed. 6, p. 695–702, 2010

GBD, 2016. Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. Lancet. v. 390, p. 1211-1259, 2017
GIAGINIS, C., et al. Clinical significance of histone deacetylase (HDAC)-1, HDAC-2, HDAC-4, and HDAC-6 expression in human malignant and benign thyroid lesions. Tumor Biology, v. 35, ed. 1, p. 61–71, 2013

GIAGINIS, C., et al. Histone deacetylase (HDAC)-1, -2, -4 and -6 expression in human pancreatic adenocarcinoma: associations with clinicopathological parameters, tumor proliferative capacity and patients' survival. BMC Gastroenterology, v. 15, ed. 1, 2015

GREGORETTI, I; LEE, Y & GOODSON, H V. Molecular Evolution of the Histone Deacetylase Family: Functional Implications of Phylogenetic Analysis. Journal Of Molecular Biology, v. 338, n. 1, p.17-31, 2004.

HAILU, G. S., et al. Lysine deacetylase inhibitors in parasites: Past, Present, and Future Perspectives. Journal of Medicinal Chemistry, v. 60, ed. 12, p. 4780–4804, 2017

HEIMBURG, T. et al. Structure-Based Design and Synthesis of Novel Inhibitors Targeting HDAC8 from Schistosoma mansoni for the Treatment of Schistosomiasis. Journal of Medicinal Chemistry, v. 59, ed. 6, p. 2423– 2435, 2016.

HONG, Y., et al. **Proteome-wide analysis of lysine acetylation in adult Schistosoma japonicum worm.** Journal of Proteomics, v. 148, p. 202–212, 2016

HORROCKS, P., et al. **Control of gene expression in Plasmodium falciparum – Ten years on.** Molecular and Biochemical Parasitology, v. 164, ed.1, p. 9–25, 2009

HUANG, H., et al. **Quantitative Proteomic Analysis of Histone Modifications**. Chemical Reviews, v. 115, ed. 6, p. 2376–2418, 2015

HUNT, D. F. et al. **Protein sequencing by tandem mass spectrometry.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 83, p. 6233–6237, 1986.

JANZEN, C. J.; et al. Selective di- or trimethylation of histone H3 lysine 76 by two DOT1 homologs is important for cell cycle regulation in Trypanosoma brucei. Mol. Cell, v. 23, ed. 4, p. 497–507, 2006

LENZI, H. L. et al. **Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogeneticand biomechanical approaches.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 93, ed. 1: 141-151, 1998

LI, B., CAREY, M. & WORKMAN, J. L. The role of chromatin during transcription. Cell, v. 128, p. 707–719, 2007

LIVAK, K. J., & SSCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT Method. Methods, v. 25, ed. 4, p. 402–408, 2001

MAREK, M., et al. Structural Basis for the Inhibition of Histone Deacetylase 8 (HDAC8), a Key Epigenetic Player in the Blood Fluke Schistosoma mansoni. PLoS Pathogens, v. 9, ed. 9, 2013.

METSALU, T & VILO, Jaak. ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and *heatmap*. Nucleic Acids Research, v. 43, n. 1, p. 566-570, 2015

MORADIAN, A. *et all.* The top-down, middle-down, and bottom-up mass spectrometry approaches for characterization of histone variants and their post-translational modifications. PROTEOMICS, 14(4-5), 489–497, 2013

OSKO, J. D. & CHRISTIANSON, D. W. Methods for the expression, purification, and crystallization of histone deacetylase 6–inhibitor complexes. Methods In Enzymology, p.447-474, 2019

PADALINO, G, et al. Combining bioinformatics, cheminformatics, functional genomics and whole organism approaches for identifying epigenetic drug targets in *Schistosoma mansoni*. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance, v. 8, p. 559–570, 2018.

PEREIRA, R. V. et al. Molecular characterization of SUMO E2 conjugation enzyme: differential expression profile in *Schistosoma mansoni*. Parasitology Research, [s.l.], v. 109, n. 6, p.1537-1546, 15 maio 2011.

PEREIRA, R. V. *et al.* **Transcriptional Profile and Structural Conservation** of SUMO-Specific Proteases in *Schistosoma mansoni*. Journal Of Parasitology Research, v. 2012, p.1-7, 2012

PEREIRA, R V. et al. **Ubiquitin-specific proteases are differentially** expressed throughout the *Schistosoma mansoni* life cycle. Parasites & Vectors, v. 8, n. 1, p.1-11, 2015

PEREIRA, A. S. A et al. Inhibition of histone methyltransferase EZH2 in Schistosoma mansoni in vitro by GSK343 reduces egg laying and decreases the expression of genes implicated in DNA replication and noncoding RNA metabolism. PLoS Negl Trop Dis. V. 12 ed. 10, 2018.

PERKINS, D. N., et al. **Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data**. Electrophoresis, v. 20, ed. 18, p. 3551–3567, 1999 PICCHI, G. F. A., et al. **Post-translational Modifications of Trypanosoma cruzi Canonical and Variant Histones. Journal of Proteome Research**, v. 16, ed. 3, p. 1167–1179, 2017

PICARD, M. A. L. *et al.* Sex-Biased Transcriptome of Schistosoma mansoni: Host-Parasite Interaction, Genetic Determinants and Epigenetic Regulators Are Associated with Sexual Differentiation. PLOS Neglected Tropical Diseases, v. 10, ed. 9, 2016.

PLAZAS-MAYORCA, M. D. et al. **One Pot Shotgun Quantitative Mass Spectrometry Characterization of Histones.** Journal of proteome research; v. 8, ed. 11, p. 5367–5374, 2009

RAMALHO-PINTO, F. J., *et al.* Schistosoma mansoni: a defined system for the step-wise transformation of the cercariae to schistosomule in vitro. Experimental Parasitology 36: 360-372, 1974.

ROGAWSKI, D. S., GREMBECKA, J., & CIERPICKI, T. **H3K36** methyltransferases as cancer drug targets: rationale and perspectives for inhibitor development. Future Medicinal Chemistry, v. 8, ed. 13, p. 1589, 2016.

ROQUIS, D. et al. **The Epigenome of Schistosoma mansoni Provides Insight about How Cercariae Poise Transcription until Infection.** PLoS Negl Trop Dis, v. 9, ed. 8, 2015

ROQUIS D, et al. Histone methylation changes are required for life cycle progression in the human parasite Schistosoma mansoni. PLoS Pathog v. 14, 2018

SEIDEL, C., et al. **Histone deacetylase 6 in health and disease**. Epigenomics, v. 7, ed. 1, p. 103–118, 2015

SKELLY, P J. & SHOEMAKER, C B. Induction cues for tegument formation during the transformation of Schistosoma mansoni cercariae. International Journal For Parasitology, [s.l.], v. 30, n. 5, p.625-631, 2000.

SIDOLI, S., et al. Complete workflow for analysis of histone posttranslational modifications using bottom-up mass spectrometry: From histone extraction to data analysis. Journal of Visualized Experiments, v. 111, 2016

SIDOLI, S., & GARCIA, B. A. Characterization of individual histone posttranslational modifications and their combinatorial patterns by mass spectrometry-based proteomics strategies. Histones, v. 121–148, 2016

SILVA, A. M. N., et al. **Post-translational Modifications and Mass Spectrometry Detection.** Free Radical Biology and Medicine, v. 65, p. 925–941, 2013 SIMÖES-PIRES, C. A., BERTRAND, P., & CUENDET, M. Novel histone deacetylase 6 (HDAC6) selective inhibitors: a patent evaluation (WO2014181137). Expert Opinion on Therapeutic Patents, v. 27, ed. 3, 229– 236, 2017.

SMITHERS, S. R., & TERRY, R. J. **The infection of laboratory hosts with cercariae of Schistosoma mansoni and the recovery of the adult worms.** Parasitology, V. 55, ed. 04, 695–700, 1965

SOUZA, F. P. C. et al. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. Rev Bras Clin Med, v. 9, ed. 4, p. 300-7, 2011.

SPELLMON, N., et al. Structure and Function of SET and MYND Domain-Containing Proteins. International Journal of Molecular Sciences, v. 16, ed. 1, p. 1406–1428, 2015.

STIREWALT, M. A. Schistosoma mansoni: Cercariae to Schistosomule. Advances in Parasitology, p. 115–182, 1974

STOTHARD, J. R. et al. Closing the praziquantel treatment gap: new steps in epidemiological monitoring and control of schistosomiasis in African infants and preschool-aged children. Parasitology. Ed. 138, p. 1593–606, 2011.

WADDINGTON, C. H. Genetic Assimilation of the Bithorax Phenotype. Evolution, V. 10, N $^{\circ}$ 1, 1956.

WAN, J et al. **Functions and mechanisms of lysine crotonylation**. Journal Of Cellular And Molecular Medicine, v. 23, n. 11, p.7163-7169, 2019

WHO. **Schistosomiasis 2018**, [Disponível em: http://www.who. int/mediacentre/factsheets/fs115/en/] Acessado em: 16 de Abril de 2019a

WHO. Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: report of a WHO expert committee. Geneva: 2002. [Disponivel em:: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42588/WHO_TRS_912.pdf?sequ ence=1&isAllowed=y] Acessado em: 18 de Julho de 2019b

YATES, J. R., RUSE, C.I. & NAKORCHEVSY, A. **Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications.** Annu. Rev.Biomed.Eng. v. 11, p. 49–79, 2009

YIN, D et al. **Global Lysine Crotonylation and 2-Hydroxyisobutyrylation in Phenotypically Different** *Toxoplasma gondii* **Parasites**. Molecular & Cellular Proteomics, v. 18, n. 11, p.2207-2224, 2019

ZHANG, Y., et al. **H3K36 Histone Methyltransferase Setd2 Is Required for Murine Embryonic Stem Cell Differentiation toward Endoderm**. Cell Reports, v. 8, ed. 6, p. 1989–2002, 2014. ZUBAREV, R. A.; KELLEHER, N. L. & MCLAFFERTY, F. W. **Electron capture dissociation of multiply charged protein cations**. A non ergodic process. J. Am. Chem. Soc. V. 120, p. 3265–3266, 1998.

ANEXO 1- CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAL

diam'r. Comissão de Ética no Uso de Animais **CEUA/Unicamp** CERTIFICADO Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado Estudo das modificações pós-traducionais de historias e do co-reguladores da expressão nos estágios de vida do Schistosoma mansoni (protocolo CEUA/UNICAMP nº 4799-1/2018), de responsabilidade da Profa. Dra. Fernanda Janku Cabral, teve aprovada a inclusão de nova executora, pôs-graduanda Lariana Franco Moreira Este documento é válido apenas sa apresentado junto com o certificado emitido originalmente pela CEUAUNICAMP em 26/02/2018. Campinas, 1º, de agosto de 2018. dins 1 Prof. Dr. Wagner José Fávaro Filtima Aloniso Coordenador Secretària Executiva. 12.24 Telefone, (nie znimiech ref. receite/elloritereter Calve Poetal 5208 A DESCRIPTION OF

2- DECLARAÇÃO DE DIREITOS AUTORAIS

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbritagem, que constam da minha Dissertação, intitulada "Modificações pós-traducionais de histonas em *Schistosoma mansoni*: Análise das modificações de histonas e o perfil de transcrição dos genes que codificam as enzimas modificadoras", não infringem os dispositivos da Lei nº 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 04/05/2020 Assinatura: Nome da autora/Larissa Franco Moreira

RG nº: 411430890

Assinatura: Aund And

Nome da orientadora: Fernanda Janku Cabral

RG nº:233703159