



Análise do silenciamento gênico dos genes que codificam enzimas modificadoras de histonas em estágios parasitários do *Schistosoma mansoni*

Giulliana G. Costa*, Profa. Dra. Fernanda J. Cabral

Instituto de Biologia (IB), Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Brasil.

Resumo

A esquistossomose, popularmente conhecida como “barriga d’água”, ainda é uma doença negligenciada que afeta vários países, dentre eles o Brasil. O medicamento mais utilizado no combate a essa doença é o Praziquantel, porém ele não é eficaz contra o estágio de esquistossômulos e vermes jovens do *S. mansoni* e não impede a reinfeção do paciente pelo parasita. Ao longo dos anos, foram surgindo cada vez mais estudos para se buscar novos alvos terapêuticos e com isso, viu-se grande importância no aprofundamento do estudo dos genes que codificam enzimas modificadoras de histonas, sabendo-se agora que elas têm um importante papel na ativação ou na inibição da transcrição gênica. E, para que possamos entender melhor o funcionamento de cada uma dessas enzimas, utilizaremos a técnica do silenciamento gênico através do RNAi, que é o grande foco deste projeto.

Introdução

A esquistossomose mansônica, doença causada pelo *Schistosoma mansoni*, ainda é uma doença negligenciada e que afeta ao todo, 54 países dentre eles o Brasil [1]. Quando analisamos o espectro brasileiro, 19 estados são afetados, em especial os estados mais pobres e com menos disponibilidade de assistência médica e atendimento à população [2]. Tendo isso em vista, o surgimento de pesquisas voltadas para a área de produção e desenvolvimento de medicamentos ou vacinas que combatam essa doença parasitária é de importante relevância. Para que possamos entender os mecanismos da expressão gênica e os diversos estágios do parasita e como cada um deles é importante no seu desenvolvimento, devemos ter uma visão geral do seu ciclo de vida:

O ciclo de vida se inicia pela presença de fezes contendo ovos do parasita, liberados na água através de humanos infectados e a defecação em locais inapropriados (assim como a falta de saneamento básico), em contato com a água de lagos. Estes ovos depositados irão eclodir e liberar o miracídio que, ao encontrar o hospedeiro intermediário (o molusco *Biomphalaria glabrata*), irá penetrar pelos tecidos do mesmo e se desenvolver em esporocisto. O esporocisto agora dará origem a cercaria que, em temperaturas elevadas, sairá do molusco, nadará na água em que o molusco se encontra e penetrará a pele do hospedeiro definitivo, que são os seres humanos.

Já nos seres humanos, a cercária perde sua cauda e se transforma em esquistossômulo que migrará pela corrente sanguínea até o sistema porta-hepático e mesentérico, e no mesmo, o esquistossômulo se desenvolve e se torna adulto (macho ou fêmea), ocorrendo o pareamento entre os dois diferentes sexos; o pareamento resulta na postura de ovos pela fêmea que são liberados nas fezes do hospedeiro, reiniciando o ciclo.

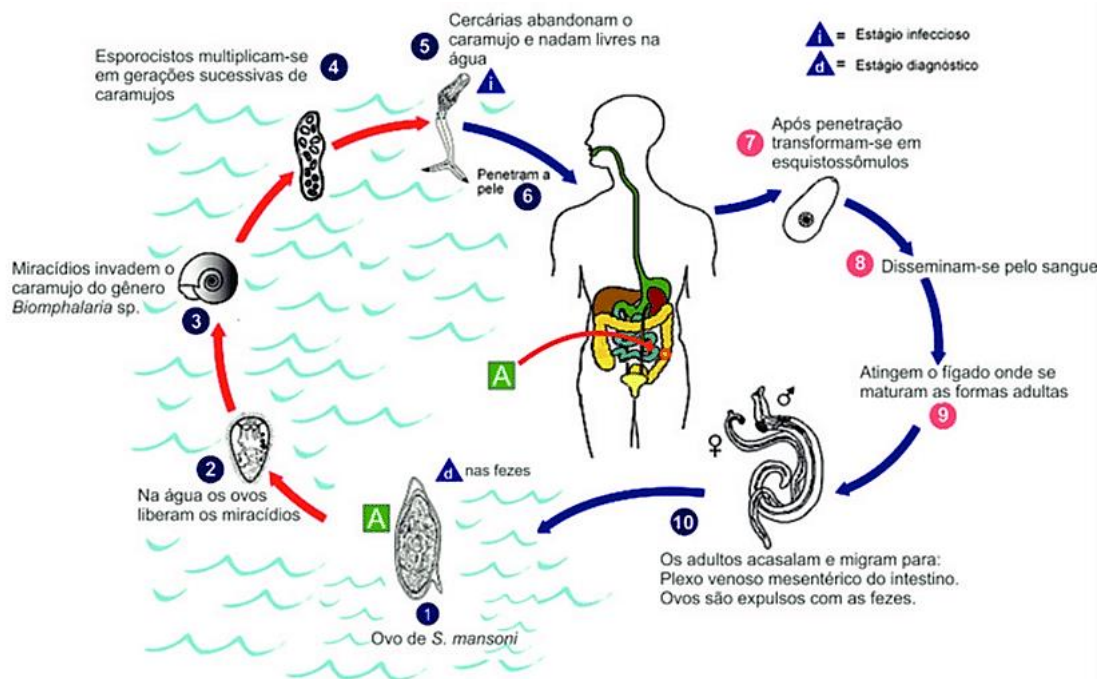


Figura 1. Ciclo de vida do *S. mansoni*, adaptado do CDC que se encontra no site <https://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.html>

Existe a hipótese para que a terapia contra o *S. mansoni* seja aprimorada e melhorada, pois o Praziquantel, embora seja o fármaco mais utilizado nos dias atuais, apresenta o problema de não evitar a reinfecção do paciente pelo parasita e não atuar em esquistossômulos e vermes jovens, portanto, é necessário novos estudos para o entendimento da biologia do parasita no sentido de encontrarmos novos alvos mais eficazes contra o parasita [3]. Atualmente, uma técnica muito eficiente e que traz grandes resultados para a pesquisa da função gênica é a utilização do RNAi (interferência por RNA) que atua no silenciamento de genes específicos e a posterior análise dos efeitos no parasita. Esta técnica contribui para o desenvolvimento de novos fármacos, bem como de novas terapias, justamente por causa do conhecimento biológico que se é possível adquirir através da mesma [4].

No projeto FAPESP recém finalizado no laboratório (2017-2020), tinha por objetivo a análise da transcrição dos genes que codificam as enzimas modificadoras de histonas no ciclo de vida do parasita. Desta forma, depois de realizarmos a análise de PCR em tempo real, partimos para a escolha dos genes nos estágios do parasita, pois estamos procurando os genes que são capazes de romper com o programa epigenético do desenvolvimento do parasita.

Então, os genes selecionados para estudo foram os seguintes: Smp_137240 (receptor de fosfatidilserina com domínio JmjC) que está mais presente no estágio de cercária e esquistossômulo de 24 horas; Smp_053140 (histona acetiltransferase com domínio MYST-type HAT) que está mais presente no estágio de esquistossômulo de 3 dias e

vermes adultos; e Smp_034000 (UTX demetilase) que está mais presente no estágio de cercaria e um estudo envolvendo inibidores foi determinado, mas sem efetivamente determinar a real importância na demetilação das histonas em *S. mansoni* [4]. A expressão desses genes está mostrada em resultados.

Vale a pena ressaltar mais especificamente sobre os genes selecionados para este estudo, que quando analisamos as proteínas que cada um deles transcreve, podemos perceber que todas as três são responsáveis por ativar a transcrição gênica, já que são, como dito anteriormente, acetiltransferases e demetilases, e essa característica se torna importante pois futuramente, esses genes podem se tornar alvos para novas terapêuticas, como já descrito para o combate ao câncer, por exemplo, e podem ser reposicionados para o tratamento da esquistossomose. O estudo realizado por Morozov e colaboradores em 2017, mostrou que a inibição da histona pós-traducional H3K27 demetilase poderia ser um alvo terapêutico no combate ao câncer de próstata, já que ela atua na ativação da transcrição gênica, mostrando realmente a importância de se estudar os referidos genes [5]. Para o Smp_034000 já foi utilizado inibidor em um estudo prévio [3] porém, devemos nos aprofundar para descobrir o mecanismo de ação deste gene, por isso esse gene também foi escolhido para esse estudo.

Objetivo

O objetivo deste estudo é a realização do silenciamento dos genes Smp_137240 (entrada: G4M088 – proteína; receptor de fosfatidilserina, domínio JmjC demetilase), Smp_053140 (entrada: G4LXT0 – proteína: histona acetiltransferase, domínio MYST-type HAT) e Smp_034000 (entrada: G4V9T5 – proteína UTX demetilase) do *Schistosoma mansoni*; a análise do desenvolvimento do parasita após o silenciamento dos genes e a realização de *Western Blotting* e *PCR Real Time* para o estudo da influência do silenciamento genético na metilação e acetilação das caudas das proteínas histonas.

Resultados iniciais

Na figura 1 abaixo estão mostradas as expressões dos genes nos estágios de interesse (cercarias e esquistossomulos de 24h e 3 dias). As sequências dos genes foram obtidas através das entradas presentes no banco de dados [6]. Como esses genes apresentam expressão nos estágios larvais, podem apresentar um papel importante no desenvolvimento do parasita e a possibilidade de serem nocauteados podem representar tanto um avanço no conhecimento da biologia e epigenética do parasita quanto uma possibilidade de intervenção na transição cercaria-esquistossômulo.

Então, a quantificação da expressão dos genes está sendo mostradas nos gráficos seguir:

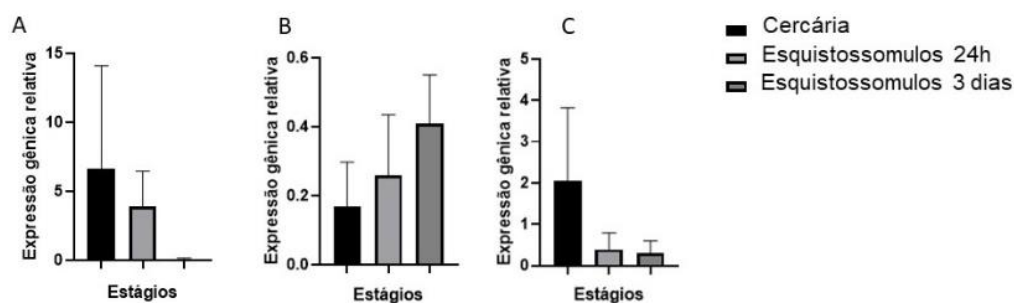


Figura 2. Gráficos da expressão dos transcritos que codificam as enzimas modificadoras de histonas em estágios de vida do *S. mansoni*: (A) Smp_137240; (B) Smp_053140; (C) Smp_034000; As amostras biológicas de cercarias foram recolhidas e realizadas as culturas in vitro de esquistossômulos (somulas 24h, 3 dias). Os cDNAs foram sintetizados utilizando o kit 5x iScript RT-PCR (Biorad) e foram realizadas as análises de PCR em tempo real utilizando o kit iTaq PCR Sybr Green (Biorad) utilizando os oligonucleotídeos sintetizados e mostrados nos relatórios anteriores utilizando os primers Smp_137240 (Rv:CTTTGTTCCCTGGTGGTTGGT/Fw: CGTGCAGTTTTGTGCCATAC), Smp_053140 (Rv:TTTCCCCATATCCACAGGAA/Fw: TGCGCAGACAAGTGAACTC), Smp_034000 (Rv:GCCCAAATGAAACTGAAGGA/Fw: TTGCACAGGTGTTGAAGAGG), endógeno Smp_001500 Fw: 5'-TGTTCCAACCACGGTCTCG-3', Rv: 5'-TCGCCTTCCAATGCTTAGG-3. Para a análise do PCR em tempo real utilizamos o método do Delta Ct (Livak and Schmittgen, 2001). As expressões foram realizadas relativas ao gene endógeno SmEIF4E (Smp_001500). Todas as análises gráficas foram realizadas utilizando o programa GRAPH-PAD Prism 8.

Atualmente estamos trabalhando remotamente na reanálise das sequências dos genes Smp_137240, Smp_053140 e Smp_034000 no banco de dados e no desenho dos oligonucleotídeos específicos para o experimento de RNA de interferência que serão utilizados durante os próximos experimentos. Esses primers serão específicos para cada gene escolhido e eles estão sendo feitos de acordo com a sequência gênica de cada um desses genes junto a sequência iniciadora T7. Os protocolos também estão sendo desenhados e definidos para os experimentos descritos e esquematizados a seguir:

O ciclo biológico do *S. mansoni* é rotineiramente mantido no Departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas em camundongos e nos moluscos *Biomphalaria glabrata*. Para que seja iniciado os experimentos, devemos obter os estágios selecionados do parasita de acordo com os protocolos estabelecidos pelo laboratório (cercaria, esquistossômulo de 24 horas e esquistossômulo de 3 dias). Será feita a cultura desses estágios seguindo os protocolos estabelecidos pelo laboratório e que são feitos rotineiramente.

Com a cultura dos estágios pronta, podemos extrair o RNA desses estágios e sintetizar o cDNA correspondente. A amplificação desse cDNA será feita por PCR, utilizando os primers específicos ou por gel de agarose. Após a amplificação, utilizaremos o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) para que seja feita a purificação desse cDNA sintetizado e será utilizado, majoritariamente, o protocolo oferecido pelo laboratório responsável, com alguns ajustes feitos previamente.

Após esse passo, utilizaremos o kit T7 RiboMAX™ Express RNAi System [7] para que seja feita a síntese do dsRNA, a partir do cDNA purificado e então aplicaremos esse

dsRNA nas culturas dos variados estágios do parasita, para que seja feita a análise posteriormente.

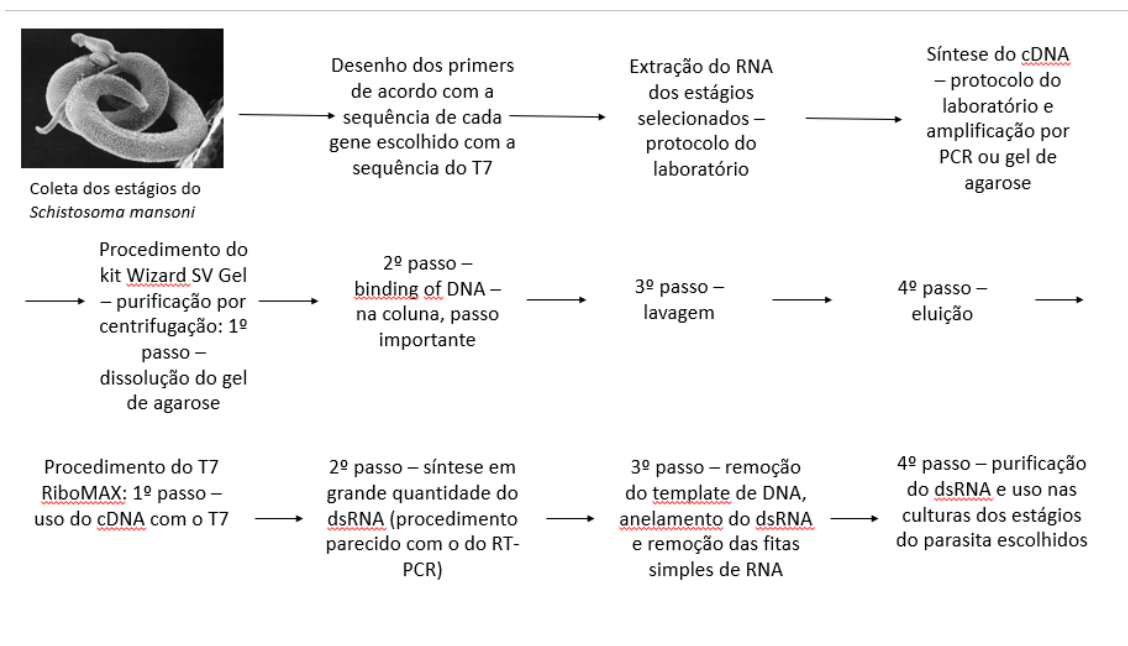


Figura 3. Esquema representando todos os passos para a execução do estudo, desenvolvido pela nossa equipe de pesquisa.

Referências bibliográficas

1. Schistosomiasis. World Health Organization, 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/schistosomiasis/en/>>.
2. Esquistossomose. Sociedade Brasileira de Infectologia, 2019. Disponível em: <<https://www.infectologia.org.br/pg/981/esquistossomose>>.
3. The antischistosomal potential of GSK-J4, an H3K27 demethylase inhibitor: insights from molecular modeling, transcriptomics and *in vitro* assays. Lobo-Silva, J., Cabral, F.J., Amaral, M.S. *et al.* *Parasites Vectors* 13, 140 (2020). Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13071-020-4000-z>>.
4. Applications of RNA Interference in Schistosomiasis: Gene Function Identification and Development of New Therapies. Pereira, T. C., Evangelista, C. C., Borges, G., Zanotti-Magalhães, E. M., Magalhães, L. A., & Lopes-Cendes, I. (2012). *ISRN parasitology*, 2013, 247036. Disponível em: <<https://doi.org/10.5402/2013/247036>>.
5. Inhibitor of H3K27 demethylase JMJD3/UTX GSK-J4 is a potential therapeutic option for castration resistant prostate cancer. Morozov, V. M., Li, Y., Clowers, M. M., & Ishov, A. M. (2017). *Oncotarget*, 8(37), 62131–62142. Disponível em: <<https://doi.org/10.18632/oncotarget.19100>>. Acesso em: 29 de abril de 2020.
6. Gene DB, 2019. Disponível em: <https://www.genedb.org/>.
7. RNA interference in *Schistosoma mansoni* schistosomula: selectivity, sensitivity and operation for larger-scale screening. Stefanić, S., Dvořák, J., Horn, M., Braschi, S., Sojka, D., Ruelas, D. S., Suzuki, B., Lim, K. C., Hopkins, S. D., McKerrow, J. H., & Caffrey, C. R. (2010). *PLoS neglected tropical diseases*, 4(10), e850. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000850>>.