



DETERMINAÇÃO DO *KNOCKDOWN* DOS GENES METILTRANSFERASE, DESACETILASE E PROTEÍNA DE LIGAÇÃO AO CREB DO *Schistosoma mansoni* NOS CINCO ESTÁGIOS DO DESENVOLVIMENTO, PARA ANALISAR O SILENCIAMENTO DA EXPRESSÃO GÊNICA E A BUSCA DE NOVOS ALVOS TERAPÊUTICOS

Gabriela de Freitas Cruvinel (graduanda em Farmácia), Dra. Fernanda Janku Cabral (orientadora). Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, Unicamp

RESUMO

O Praziquantel é o fármaco recomendado para o tratamento da esquistossomose. Apesar de ser efetivo na clínica, este fármaco atua somente nos vermes adultos e não age sobre os vermes jovens e ovos que estão no tecido intestinal ou no fígado. Portanto, ao longo dos anos, vários grupos perceberam a necessidade de realizar estudos para um novo fármaco que agisse sobre as outras formas de vida do *Schistosoma mansoni*, inclusive fármacos que atuam sobre mecanismos epigenéticos. Este estudo foca nos genes Smp_025550, Smp_069380 e Smp_105910 que codificam as enzimas arginina N-metiltransferase; histona putativa desacetilase 4, 5; e proteína ligada ao CREB, respectivamente. O silenciamento poderá evidenciar a importância desses genes no desenvolvimento do parasita, inclusive bloqueando o desenvolvimento. Esse bloqueio no desenvolvimento pode levar a possibilidade do desenho racional de novos inibidores dessas enzimas, que poderão ser testados como novos fármacos mais eficientes na fase aguda da doença, visto que o fármaco atual não tem ação sobre as formas jovens do parasita. Para o silenciamento dos genes, o método utilizado será o RNAi (RNA interferente). Os genes Smp_025550, Smp_069380 e Smp_105910 do *S. mansoni* que são expressos em cercaria, 24 horas, três dias e seis dias respectivamente serão silenciados nestes tempos e estágios e depois verificaremos o silenciamento dos genes e das proteínas através de western blotting com anticorpo para detectar se ainda ocorre a metilação e demetilação e RT-PCR.

Apoio financeiro: FAPESP (#2017/07364-9), FAEPEX (#2020/2051)

1. OBJETIVOS

O intuito da pesquisa é estudar os genes Smp_0255550, Smp_069380 e Smp_105910 do *S. mansoni* que estão expressos em cercaria, 24 horas, três dias e seis dias; três dias e seis dias; três dias e seis dias, respectivamente. Sendo assim, é necessário realizar o *knockdown*, através do método de RNAi (RNA interferente), de tais genes, para o combate definitivo da doença; realizar o western blotting com anticorpo para detectar se ainda ocorre a metilação e demetilação dos genes; e realizar o PCR – real time para analisar se ocorreu o *knockdown* dos genes expressos.

2. MÉTODOS

Os métodos serão descritos a seguir:

2.1 Manutenção do ciclo biológico

O ciclo biológico do *Schistosoma mansoni* é mantido diariamente no departamento de parasitologia, no Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

O ciclo se inicia através dos camundongos, hospedeiro definitivo, que são infectados na região caudal com as cercarias que são expelidas dos caramujos do gênero *Biomphalaria*, hospedeiro intermediário, em temperatura e iluminação adequada.

Após 5 ou 6 semanas da infecção dos camundongos, há presença de vermes adultos no mesentério, que são coletados através da perfusão para os estudos, e de ovos nas fezes que são recolhidos para o método de Hoffmann, que libera o miracídio. Cerca de 10 miracídios são utilizados para infectar o caramujo¹, que após o desenvolvimento dentro do hospedeiro são transformadas em cercarias e liberadas na água quando induzidas pela luz e temperatura acima de 25° C. É feita a coleta delas.

2.2 Preparação mecânica de esquistossômulos

Após a coleta é realizado o protocolo para retirada das caudas das cercarias e em seguida é feita a cultura em meio RPMI com antibiótico e antimicótico e, então, deixada na estufa a 37° C e 5% de CO₂ por 3 horas. Depois de completado o tempo inicial na estufa, a cultura é lavada com meio RPMI com antibiótico e antimicótico. As culturas são ressuspensas em meio 169 completo, com hormônios, soro bovino fetal 10% e antibiótico e antimicótico e retorna para a estufa durante o tempo necessário de incubação para a diferenciação e/ou inibição por 24 horas, 72 horas ou 6 dias.

2.3 Extração RNA

Após a preparação dos esquistossômulos, escolher o estágio de vida desejado para realizar a extração do RNA. O método utilizado é o Trizol, que é adicionado aos parasitas. Após o procedimento de extração, haverá formação de pellet.

2.4 Síntese cDNA

O RNA extraído deve ser quantificado no Nanodrop para avaliar a quantidade correta que deverá ser adicionada de água. A síntese é realizada com o 5x iScript Reverse.

2.5 Purificação cDNA

Após a síntese, o cDNA deve ser purificado, o método utilizado será o do Wizard SV gel and PCR clean-up System. A purificação pode ser feita a partir de um pedaço de gel de agarose, ou produto de amplificação do PCR.

2.6 RNA interferente

Antes de iniciar, o cDNA deve ser quantificado por absorvância a 260 nm. Os genes escolhidos para serem tratados com RNAi foram o Smp_0255550, Smp_069380 e Smp_105910, utilizando o kit T7-ribomax (promega) conforme instruções do fabricante.

2.6.1 Desenho dos primers

Os primers são utilizados para iniciar a reação. Os pares de oligonucleotídeos de DNA são combinados para gerar ou sentido sense ou sentido antisense de RNA.

2.6.2 Síntese e purificação do dsRNA

A síntese do dsRNA será feita com o kit t7 Ribomax Expression System (PROMEGA). Seguindo as instruções do fabricante, ocorrerá a reação de transcrição reversa, permitindo que se estendesse pela noite a 37° C, sendo que a hora final tem um aumento para 42° C. Após essa etapa o dsRNA é precipitado com 10% de acetato de sódio 3M pH 5,2 em 100% de isopropanol e sedimentado a 12000 g por 15 minutos a uma temperatura de 4° C. O sedimento é lavado em etanol 70%, seco e ressuspenso em água. A concentração do dsRNA será medida no Nanodrop e acertado em 3,0 mg/ml. ²

2.6.3 Determinar a quantidade do dsRNA

Realizar a eletroforese em gel de agarose, ou acrilamida. Visualizar as bandas com brometo de etídio ou SYBR Green II. Observar que o RNA de fita dupla (dsRNA) pode migrar mais lentamente, do que o DNA de fita dupla.

2.6.4 Síntese e purificação siRNA

Após a síntese e purificação do dsRNA, o RNA precisa ser “cortado” em pequenos pedaços, se tornando então, o siRNA. O procedimento é realizado conforme o fabricante recomenda.

2.6.5 Incubação

O *knockdown* será realizado em culturas de esquistossômulos, que serão tratados com 1 mL do meio 169 e o regente RNAi, e colocados em placas de 24 poços e deixados na estufa a 37°C e 5% de CO₂ no período de 24 horas, 3 dias e 6 dias.³

		Tempo de incubação		
		24h	72h	6 dias
Genes	Smp_025550	X	X	X
	Smp_069380		X	X
	Smp_105910		X	X

Tabela 1 – mostra quais genes serão incubados para cada estágio de vida.

2.7 Análise PCR quantitativa em tempo real do silenciamento do gene

A análise do PCR é realizada no equipamento de PCR em tempo real QuantStudio 3 (Life Technologies) para verificar se o nocaute dos genes expressos do *S. mansoni* ocorreu.

3. RESULTADOS

Os genes foram escolhidos de um estudo maior que analisou todas as entradas anotadas no banco de dados www.geneDB.org em 5 estágios do parasita que poderiam eventualmente ser nocauteados se fossem expressos durante os estágios do desenvolvimento na transição cercaria-esquistossômulos-vermes adultos. Portanto, a quantificação das expressões dos genes no ciclo de vida do parasita, estão mostradas nos gráficos a seguir.

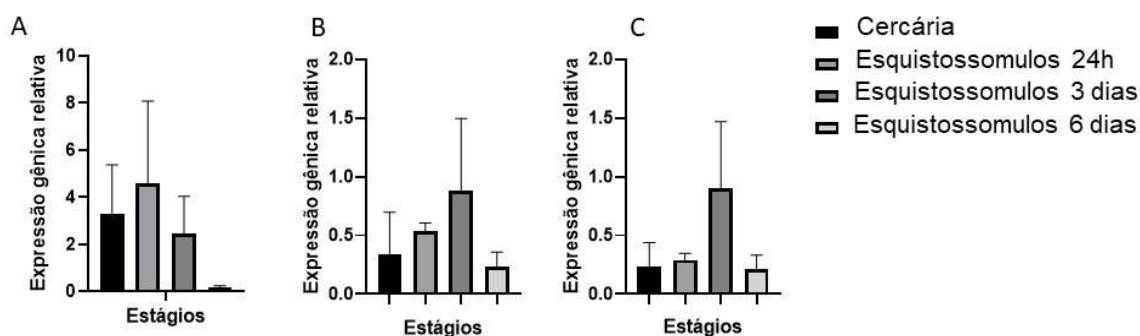


Figura 1: Gráficos da expressão dos transcritos que codificam as enzimas modificadoras de histonas em estágios de vida do *S. mansoni*: (A) Smp_0255580; (B) Smp_069380; (C) Smp_105910; As amostras biológicas de cercarias foram recolhidas e realizadas as culturas in vitro de esquistossômulos (somulas 24h, 3 dias e 6 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_0255580 (Rv:TCCATGTGCTCGATATTGGA/Fw: GTTGCCATTGGAAGAAAGGA), Smp_069380 (Rv:CAGATCAAGCGATGGGATTT/Fw: TTCGAAACAATACGCTCACG), Smp_105910 (Rv: GGCTCCTGTTTCAAGCACTC/Fw: ACGTTTTCCGGATCTGTTG), 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.

Para a análise do *knockdown* dos genes expressos acima, no momento, estamos montando os experimentos conforme o esquema abaixo:

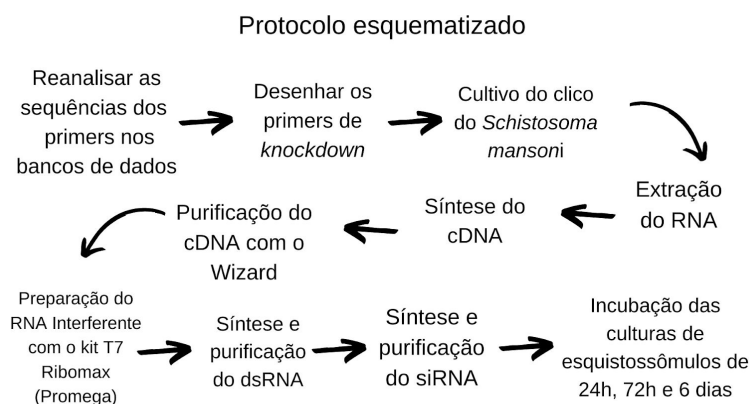


Figura 2: Protocolo esquematizado dos métodos que serão realizados no laboratório para o *knockdown* dos genes do *S. mansoni*: Smp_0255580; Smp_069380; Smp_105910.

No momento, estamos reanalisando as sequências correspondentes aos genes investigados e desenhando os primers para o experimento de RNAi. Este trabalho está sendo realizado remotamente devido a pandemia do COVID-19.

REFERÊNCIAS

- 1- PEREIRA, 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, 2018
- 2- GUIDI, A, et, al. **Identification of novel multi-stage histone deacetylase (HDAC) inhibitors that impair *Schistosoma mansoni* viability and egg production.** Parasit Vectors, 2018
- 3- MOREIRA, Larissa Franco. **Modificações pós-traducionais de histonas e o perfil de transcrição dos genes que codificam as enzimas modificadoras.** 2020 Dissertação. (Mestrado em biologia animal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2020.
- 4- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001) ‘Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method’, Methods, 25(4), pp. 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.