



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

Palavras-chave: Esquistossomose; *Schistosoma mansoni*; enzimas modificadoras de histonas.

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

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

INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença negligenciada que afeta ao todo, 54 países dentre eles o Brasil [1] onde está presente em 19 estados [2], sendo, portanto, uma doença muito prevalente. Atualmente, o único fármaco disponível para o tratamento é o Praziquantel (PZQ), sendo efetivo apenas contra vermes adultos [3]. Um ponto importante que deve ser sempre lembrado e citado é que, o uso massivo do Praziquantel pode levar a seleção de cepas resistentes do parasita como mostra um estudo feito por Gryseels et al. em 2001, que reuniu informações e concluiu uma investigação sobre suspeitas de casos de resistência do *S. mansoni* ao PZQ no norte do Senegal: foi comparado o uso da dosagem padrão de PZQ nos pacientes e de uma dosagem maior, que é recomendada em casos de infecções intensas [4]. Além disso, estudos [5][6] observaram que pode ocorrer alteração no polimorfismo genético do parasita nas regiões em que a população foi tratada com Praziquantel, o que nos alerta e nos impulsiona para descobrir novos fármacos que sejam mais eficazes e que causem menos impactos indesejáveis. Para que possamos prosseguir, devemos ter uma visão geral do ciclo de vida do parasita:

- O ciclo de vida se inicia pela presença de fezes contendo **ovos** do parasita na água de lagos que eclodem liberando o **miracídio**, que em contato com o hospedeiro intermediário (o molusco *Biomphalaria glabrata*) irá penetrar o mesmo e se transformar em **esporocisto**; nesta fase, dentro do hospedeiro intermediário, ele se transformará em **cercaria**, será liberado na água e penetrará a pele do hospedeiro definitivo (homem); já nos seres humanos a cercaria se transformará em **esquistossômulo**, que migrará para o sistema porta-hepático e mesentérico e se desenvolverá em **vermes adultos** (macho ou fêmea), resultando na postura de ovos e reinício do ciclo.

O desenvolvimento e descoberta racional de novos fármacos parte do estudo de vias bioquímicas importantes na biologia do parasita. Dentre essas vias, podemos destacar as modificações pós-traducionais de histonas, que atuam enzimaticamente na cromatina regulando o silenciamento e a ativação dos genes do parasita, por meio da abertura e fechamento da cromatina. O silenciamento gênico dos genes que codificam as enzimas modificadoras de histonas envolvem, principalmente, as enzimas que realizam metilação de DNA e as modificações de histonas são considerados alvos com um grande potencial [4].

Os genes escolhidos para o desenvolvimento deste projeto foram: Smp_316180 (receptor de fosfatidilserina com domínio JmjC) que está mais presente no estágio de cercaria 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 desmetilase) que está mais presente no estágio de cercaria. Como podemos observar, os 3 genes escolhidos apresentam domínios que são responsáveis por efetuar modificações pós-traducionais nas histonas [7]: o gene Smp_053140 apresenta domínio MYST-type HAT, que acetila as histonas, já que as HATs são histonas acetiltransferases e, a acetilação da histona, como já é sabido, relaxa a mesma e permite sua ativação transcricional; já o gene Smp_316180 possui domínio Jumonji, que é responsável por desmetilar as histonas, principalmente lisinas mono, di ou tri metiladas, e sabe-se que existem poucos inibidores seletivos potentes para esta classe de desmetilases; por fim, o gene Smp_034000 também

apresenta domínio de uma desmetilase e, especificamente para este gene, já existe um estudo publicado, e de grande importância, que estudou a ação do inibidor GSK-J4 neste gene porém, não foi realizada a técnica de silenciamento gênico com RNAi, o que reforça a importância da execução desta técnica [3]. Vale a pena ressaltar que estes genes foram escolhidos pois foram os genes que apresentaram expressão diferencial nos estágios de esquistossômulo e cercaria, determinado em estudo anterior do nosso grupo. Ademais, o estágio de esquistossômulo é refratário à ação quimioterápica do PZQ, desta forma o estudo das modificações pós-traducionais e da importância dos genes que codificam essas enzimas é de fundamental importância no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

A inibição das modificações pós-traducionais das histonas, principalmente no *Schistosoma mansoni* tem mostrado resultados muito promissores, como é mostrado no estudo de Cabezas-Cruz et al., em 2014, que mostrou que o tratamento com inibidores dos transcritos dos HATs atuou sobre a postura de ovos do parasita além de causar mudanças fenotípicas, que estariam relacionados a diminuição da acetilação nas histonas H3 e H4, além do aumento de metilações em H3K27, que é um marcador da repressão transcricional [7].

OBJETIVOS

Neste projeto, tivemos como objetivos:

- Estudo das modificações pós-traducionais de histonas presentes no estágio de esquistossômulo do *Schistosoma mansoni*;
- Análise do alinhamento dos genes selecionados através de árvore filogenética para verificar se os genes apresentam domínios conservados;
- Desenho dos oligonucleotídeos necessários para a realização da síntese do dsRNA (RNAi);
- Síntese do dsRNA (RNAi);
- Preparo das culturas de parasitos, seguindo nossa escolha dos estágios de vida específicos;
- Incubação do RNAi nas culturas preparadas;
- Análise da expressão dos dsRNA por PCR Real-Time e microscópica dos resultados obtidos a partir do silenciamento gênico.

RESULTADOS

Em continuidade ao andamento dos experimentos realizados em laboratório e como forma de visualizar melhor as modificações pós-traducionais de histonas presentes ao longo do desenvolvimento do parasita, que possui ligação com o tema do presente estudo, foi realizado pelo nosso grupo de pesquisa a extração das histonas, antes do início da pandemia, nos estágios de cercaria, esquistossômulos de 24h, 3 dias, 6 dias e vermes adultos e feita a quantificação das mesmas pelo espectrômetro de massas qTOF impact II (Bruker), em parceria com o laboratório de Espectrometria de Massas do Food Researcher Center (FORC) na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP em São Paulo-SP através do método DDA (Data Dependent Acquisition).

Os dados obtidos a partir da injeção das amostras no espectrômetro de massas e posteriormente os espectros de massa foram então analisados em parceria com o grupo de espectrometria de massas da Universidade Federal de Ouro Preto, coordenado pelo Prof. William de Castro Borges, através da utilização do programa Peaks [8]. A partir dos resultados obtidos foi visto que, principalmente nos estágios de esquistossômulo de 3 dias e 6 dias o parasita consegue acetilar as histonas H4, já que foi observado que mais de um peptídeo relacionado a essa histona em específico estava modificado, e isso pode se dever a atividade de SmCBP1, que já foi descrita como relevante no artigo de Bertin *et al.* 2006 [9]; além da acetilação também foi visto monometilações e sumorilações na histona H4. Também foi observado uma maior quantidade de peptídeos modificados nos estágios de cercaria e esquistossômulos de 24h, que são justamente os estágios onde ocorre a mudança no desenvolvimento do parasita, já que ele passa do estágio larval para o estágio que parasitará o mamífero (Figura 1). A análise ativa dos resultados obtidos a partir destes experimentos gerou diversas discussões e caminhos que podemos seguir, reforçando também a importância da realização da técnica de RNAi para complementar estes experimentos.

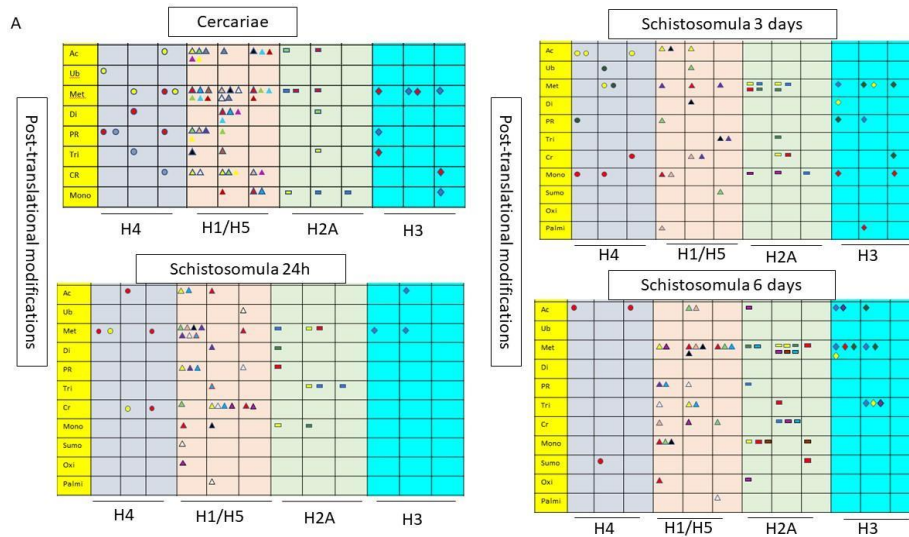


Figura 1. (A) Cada símbolo em diferentes cores representa um peptídeo diferente sequenciado (PSM – Peptide sequencing matching) de determinada histona anotada no banco de dados (H4 (C4QBN1); (H1-H5) G4V6K8; H2A (G4V8L9); H2A (G4VN61); H3 (C4QHD7); H3 (G4VFY4) do estágio de cercaria, esquistossômulo de 24h, 3 dias, 6 dias do parasita *Schistosoma mansoni*, em quadruplicata biológica. 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).

Após a análise das modificações pós-traducionais de histonas, que foi desenvolvido presencialmente, deu-se de forma remota e *in silico*, por causa do desdobramento da pandemia aqui em nossa cidade, a elaboração das árvores filogenéticas e alinhamento das sequências primárias de aminoácidos das enzimas modificadoras de histonas do *S. mansoni* (Figura 2) em comparação com outros organismos, realizadas em colaboração com o grupo de bioinformática do Prof. Matheus de Souza Gomes da Universidade Federal de Uberlândia. Essas análises filogenéticas e de alinhamento de sequências de proteínas tiveram o intuito de mapear os domínios proteicos e comparar a sua conservação entre o *S. mansoni* e os diversos organismos, de todos os genes que foram anteriormente analisados por RT-PCR no início do meu estágio de iniciação científica em 2019, sob a orientação da Profa. Fernanda Janku Cabral. Além disso, o conhecimento dessas análises filogenéticas e dos domínios são importantes para determinarmos as partes específicas e conservadas da sequência para o desenho racional dos oligonucleotídeos contendo na sequência de DNA, partes que codificam os domínios específicos a serem silenciados posteriormente.

Desta forma, na Figura 2 temos a ilustração gráfica e representativa do desenho destas árvores filogenéticas. Esta imagem é ilustrativa pois foram geradas mais imagens, diferentes desta, com os outros genes, porém, por causa do espaço restrito, não é possível inserir as demais.

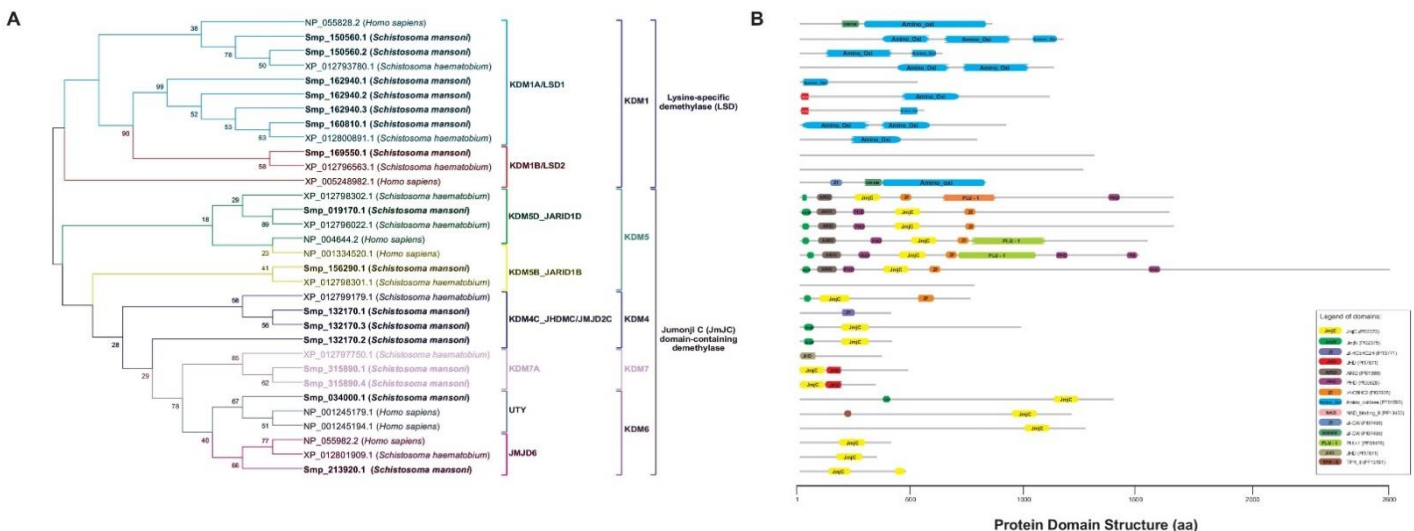


Figura 2. (A) Árvore filogenética das proteínas Demetilase geradas pelo programa MEGAX com proteínas de *S. mansoni* e proteínas ortólogas de *S. haematobium* e *H. sapiens*. **(B)** Distribuição de domínios conservados entre proteínas putativas de Demetilase de *S. mansoni* e suas proteínas ortólogas de *S. haematobium* e *H. sapiens*.

A partir da sequência desses domínios, como foi mostrado acima, temos a elaboração dos primers de cada gene escolhido que será utilizado nos experimentos futuros. Tendo como base o artigo escrito por Stefanic et al. [10], começamos a desenhar os primers utilizando apenas uma parte da sequência codificadora dos genes, pois as sequências encontradas inicialmente eram muito extensas, com mais de 2 mil pares de bases e, se o primer abrangesse toda ela, teríamos problemas para executar o PCR já que teríamos que utilizar ciclos de temperatura muito longos e isso geraria também, conseqüentemente, mais erros. A seguir temos as tabelas contendo as informações dos oligonucleotídeos e seus alinhamentos respectivamente, de cada gene, bem como o oligonucleotídeo controle (mCherry). O alinhamento destes primers na sequência completa do gene escolhido mostra que os mesmos estão alinhados na sequência da forma esperada. A sequência de bases (**TAATACGACTCACTATAGGG**) que se apresenta em negrito no início da sequência dos oligonucleotídeos é o T7, ou seja, é a sequência de bases que irá iniciar a leitura dos oligonucleotídeos para que o silenciamento gênico ocorra; escolhemos utilizar a sequência do T7 utilizando como base, novamente, o artigo publicado por Stefanic et al. [10]. A sequência T7 é vendida no kit T7 RiboMAX™ Express RNAi System, produzido pela Promega.

Smp_316180:

Identificação do gene	Código do gene	Primers (sequência 5'- 3')	Tamanho do amplificado	Temperatura de melting
Receptor de fosfatidilserina com domínio JmjC	Smp_316180 (antigo Smp_137240)	Gene fwd T7: TAATACGACTCACTATAGGG GATGGCGGCAAGAATCGAAA	345 bases	Primer fwd – 59,27 °C Primer rev – 58,44 °C
		Gene rev: ATCTGGAAGTGCTCGGAGA		
		Gene fwd: GATGGCGGCAAGAATCGAAA		
		Gene rev T7: TAATACGACTCACTATAGGG ATCTGGAAGTGCTCGGAGA		

Smp_034000:

Identificação do gene	Código do gene	Primers (sequência 5'- 3')	Tamanho do amplificado	Temperatura de melting
UTX desmetilase	Smp_034000	Gene fwd T7: TAATACGACTCACTATAGGG TCTTCGACCAACTGCTCCTT	398 bases	Primer fwd – 58,95 °C Primer rev – 59,05 °C
		Gene rev: CCCGTATGATGAAGCCAAGC		
		Gene fwd: TCTTCGACCAACTGCTCCTT		
		Gene rev T7: TAATACGACTCACTATAGGG CCCGTATGATGAAGCCAAGC		

Smp_053140:

Identificação do gene	Código do gene	Primers (sequência 5'- 3')	Tamanho do amplificado	Temperatura de melting
Histona acetiltransferase com domínio MYST-type HAT	Smp_053140	Gene fwd T7: TAATACGACTCACTATAGGG GGACCTGAACCCTCCTCTAAAA	308 bases	Primer fwd – 59,09 °C Primer rev – 58,53 °C
		Gene rev: CGCTTGCTAATTCCTGTGGATA		
		Gene fwd: GGACCTGAACCCTCCTCTAAAA		
		Gene rev T7: TAATACGACTCACTATAGGG CGCTTGCTAATTCCTGTGGATA		

mCherry:

Identificação do gene	Código do gene	Primers (sequência 5'- 3')
Proteína fluorescente vermelha de construção sintética	Identificação NCBI – AY678264	Gene fwd T7: TAATACGACTCACTATAGGG ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
		Gene rev: TTA CT TGTACAGCTCGTCC
		Gene fwd: ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
		Gene rev T7: TAATACGACTCACTATAGGG TTACTTGTACAGCTCGTCC

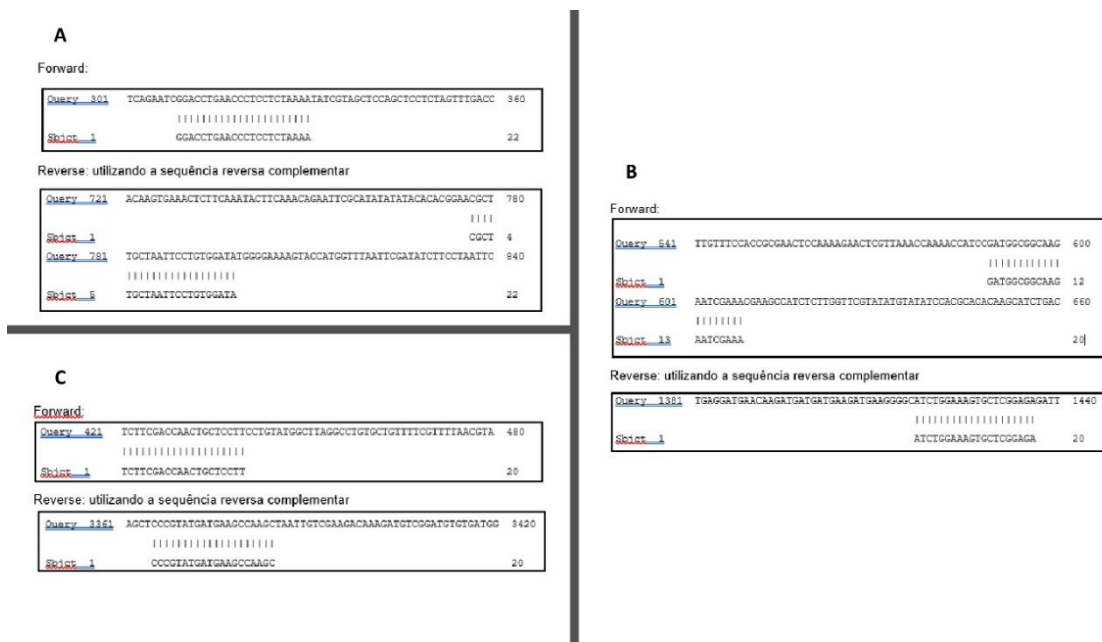


Figura 3. (A) Alinhamento dos primers referente ao gene Smp_053140. **(B)** Alinhamento dos primers referente ao gene Smp_316180 (antigo Smp_137240). **(C)** Alinhamento dos primers referente ao gene Smp_034000.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Schistosomiasis. World Health Organization, 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/schistosomiasis/en/>>.
- Esquistossomose. Sociedade Brasileira de Infectologia, 2019. Disponível em: <<https://www.infectologia.org.br/pg/981/esquistossomose>>.
- LOBO-SILVA, J. et al. The antischistosomal potential of GSK-J4, an H3K27 demethylase inhibitor: Insights from molecular modeling, transcriptomics and in vitro assays. **Parasites and Vectors**, v. 13, n. 1, 2020.
- GRYSEELS, B. et al. **Are poor responses to praziquantel for the treatment of Schistosoma mansoni infections in Senegal due to resistance? An overview of the evidence** **Tropical Medicine and International Health**, 2001.
- NORTON, A. J. et al. Genetic consequences of mass human chemotherapy for Schistosoma mansoni: Population structure pre-and post-praziquantel treatment in Tanzania. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 4, 2010.
- COELI, R. et al. Praziquantel Treatment Decreases Schistosoma mansoni Genetic Diversity in Experimental Infections. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 12, 2013.
- CABEZAS-CRUZ, A. et al. Epigenetic control of gene function in schistosomes: A source of therapeutic targets? **Frontiers in Genetics**, 2014.
- Tran, N. H. et al. Complete De Novo Assembly of Monoclonal Antibody Sequences', **Nature**. 36(1), pp. 1–8, 2016.
- BERTIN, B. et al. Schistosoma mansoni CBP/p300 has a conserved domain structure and interacts functionally with the nuclear receptor SmFtz-F1. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Volume 146, Issue 2, Pages 180-191, 2006.
- ŠTEFANIC, S. et al. RNA interference in Schistosoma mansoni schistosomula: Selectivity, sensitivity and operation for larger-scale screening. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 10, 2010.